

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861141

研究課題名(和文)ポリノスタットによるオートファジー誘導とMGMT抑制効果に関する研究

研究課題名(英文) Research of the induction of autophagy and the suppression mechanism in MGMT activity by vorinostat

研究代表者

小倉 良介(Ogura, Ryosuke)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：70626423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるポリノスタットには、悪性神経膠腫の薬剤耐性のひとつであるMGMT活性を抑制する作用を有するが、その機序は不明な点が多い。本研究では、オートファジーとの関係に注目し、ポリノスタットによるMGMT活性を抑制する機序について検討した。MGMTがテモゾロミド耐性を発揮するためには、核内に局在している必要がある可能性が示唆された。さらに核外で過剰に発現したMGMT蛋白は、シャペロン介在性オートファジーで分解される可能性が示唆された。本研究を通して、MGMT蛋白をはじめとする薬剤耐性酵素の局在を変化させることは、薬剤耐性克服の新たな治療戦略である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, suppress O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) activity, but the mechanism is unknown. In this study, we found that it was necessary to resistant to temozolomide that MGMT localized in nucleus. And MGMT overexpression in cytoplasm may be degraded by chaperone-mediated autophagy. It can be new treatment strategy to change MGMT localization by vorinostat.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：ポリノスタット MGMT 局在 テモゾロミド シャペロン介在性オートファジー

1. 研究開始当初の背景

当教室では、悪性神経膠腫の薬剤耐性にオートファジーが関係することを報告してきた。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるポリノスタットには、テモゾロミド耐性のひとつである MGMT 活性を抑制する作用を有するが、その機序は不明な点が多い。また、ポリノスタットは、単独で抗腫瘍効果を有するが、p53 を介したオートファジー誘導作用も有する。

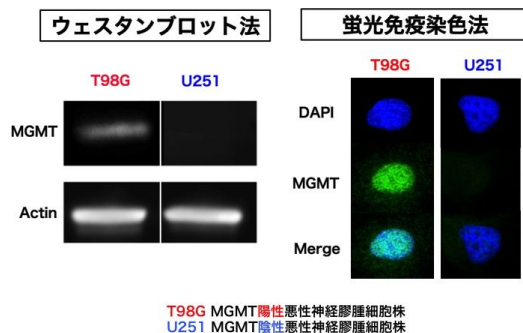
2. 研究の目的

本研究では、オートファジーとの関係に注目し、ポリノスタットによる MGMT 活性を抑制する機序について検討した。

3. 研究の方法

MGMT 陽性悪性神経膠腫細胞株 T98G と、MGMT 陰性悪性神経膠腫細胞株 U251 を用いて、悪性神経膠腫の代表薬であるテモゾロミドとポリノスタットの細胞増殖抑制効果を WST-1 assay を用いて評価した。MGMT 蛋白の発現と局在については、ウェスタンブロット法、蛍光免疫染色により評価した(図1)。

図1. MGMTの評価法



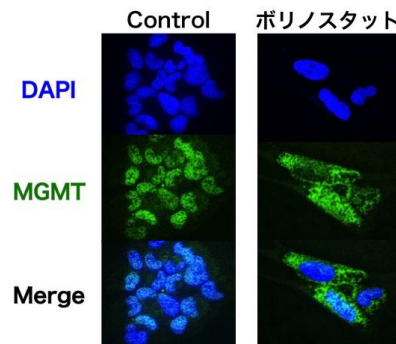
4. 研究成果

細胞増殖抑制効果：テモゾロミド、ポリノ

スタットには、いずれも悪性神経膠腫細胞株に対して、容量依存性の細胞増殖抑制効果を認めた。両者を併用することでさらに強力な細胞増殖抑制効果が認められた。

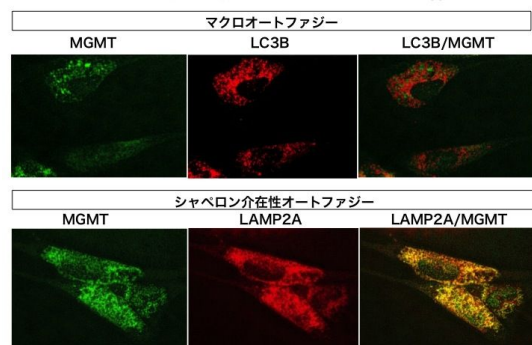
MGMT 蛋白の発現と局在：MGMT 蛋白の発現を、ウェスタンブロット法で確認すると、ポリノスタット治療群において MGMT 蛋白の発現が亢進していた。その局在について、蛍光免疫染色法で確認すると、MGMT 蛋白の局在は核内から核外へ移行していた(図2)。

図2. ポリノスタット治療後、T98GのMGMT蛋白の局在が核内から核外へ変化



さらに、細胞質内に移行した MGMT は、選択的オートファジーであるシャペロン介在性オートファジーの指標である LAMP2a を局在が近接していた(図3)。

図3. ポリノスタット治療による MGMTの局在変化とオートファジーの関係



MGMT がテモゾロミド耐性を発揮するためには、核内に局在している必要がある可能性が示唆された。さらに核外で過剰に発現した MGMT 蛋白は、シャペロン介在性オートファジーで分解される可能性が示唆された。本研究

を通して、MGMT 蛋白をはじめとする薬剤耐性酵素の局在を変化させることは、薬剤耐性克服の新たな治療戦略である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Tsukamoto Y, Ohtsu N, Echizenya S, Otsuguro S, Ogura R, Natsumeda M, Isogawa M, Aoki H, Ichikawa S, Sakaitani M, Matsuda A, Maenaka K, Fujii Y, Kondo T.

Chemical screening identifies EUrl as a

novel inhibitor against

Temozolomide-resistant

glioblastoma-initiating cells.

Stem Cells. 2016 Apr 19. doi:

10.1002/stem.2380. [Epub ahead of print]

査読有

2. Ogura R, Tsukamoto Y, Natsumeda M, Isogawa M, Aoki H, Kobayashi T, Yoshida S, Okamoto K, Takahashi H, Fujii Y, Kakita A.

Immunohistochemical profiles of IDH1, MGMT and P53: practical significance for prognostication of patients with diffuse gliomas.

Neuropathology. 2015 Aug;35(4):324-35.

doi: 10.1111/neup.12196. 査読有

3. Fukuda M, Takao T, Hiraishi T, Aoki H, Ogura R, Sato Y, Fujii Y.

Cortico-cortical activity between the primary and supplementary motor cortex: An intraoperative near-infrared

spectroscopy study.

Surg Neurol Int. 2015 Mar 24;6:44. doi:

10.4103/2152-7806. 査読有

4. Natsumeda M, Igarashi H, Nomura T, Ogura R, Tsukamoto Y, Kobayashi T, Aoki H, Okamoto K, Kakita A, Takahashi H, Nakada T, Fujii Y.

Accumulation of 2-hydroxyglutarate in gliomas correlates with survival: a study by 3.0-tesla magnetic resonance spectroscopy.

Acta Neuropathol Commun. 2014 Nov 7;2:158.

doi: 10.1186/s40478-014-0158-y. 査読有

[学会発表](計12件)

1. 小倉良介、テモゾロミド時代の遺伝子解析と今後の治療戦略、第20回新潟脳腫瘍研究会、2015.12.11、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

2. 小倉良介、悪性神経膠腫の経過中に BRAF V600E 変異を伴う epithelioid component を認めた一例、第33回日本脳腫瘍学会学術集会、2015.12.6-12.8、グランドプリンスホテル京都(京都・京都市)

3. 小倉良介、TMZ 時代における膠芽腫の分子プロファイリングと予後、日本脳神経外科学会第74回学術総会、2015.10.14-10.16、ロイトン札幌(北海道・札幌市)

4. 小倉良介、フルオレサイト®を用いた定位脳生検術、第20回日本脳腫瘍の外科学会、2015.9.25-9.26、名古屋観光ホテル(愛知県・名古屋市)

5. 小倉良介、NGTN 予後因子解析、第19回新潟脳腫瘍研究会、2015.6.19、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

6. 小倉良介、悪性星細胞腫瘍における p53

の発現意義、第 33 回 日本脳腫瘍病理学会、
2015.5.29-5.30、JR ホテルクレメント高松
(香川県・高松市)

7. 小倉良介、Temozolomide (TMZ) の有害事
象 結核に関する症例提示、第 18 回 新潟脳
腫瘍研究会、2014.12.12、朱鷺メッセ (新潟
県・新潟市)

8. 小倉良介、免疫染色法による神経膠腫の
分子プロファイリング、第 32 回 日本脳腫瘍
学会学術集会、2014.11.30-12.2、シェラト
ングランド・トーキョーベイ・ホテル (千葉
県・浦安市)

9. 小倉良介、免疫染色法を用いた神経膠腫
の予後因子解析、日本脳神経外科学会第 73
回学術総会、2014.10.9-10.11、グランドブ
リンス ホテル新高輪 (東京・港区)

10. 小倉良介、ポリノスタットによるオート
ファジー誘導と MGMT 抑制効果に関する研究、
第 15 回 日本分子脳神経外科学会、
2014.9.25-9.26、大手門パルズ (山形県・山
形市)

11. 小倉良介、神経膠腫の予後因子解析、第
17 回 新潟脳腫瘍研究会、2014.6.20、朱鷺メ
ッセ (新潟県・新潟市)

12. 小倉良介、小脳半球に発生した
tanycytic ependymoma の 1 例、第 32 回 日本
脳腫瘍病理学会、2014.5.23-5.24、あわぎん
ホール (徳島県・徳島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 良介 (OGURA Ryosuke)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号 : 70626423

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :