

氏名	山城 慧
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第1240号
学位授与の日付	2020年9月28日
学位論文題名	Human Glioma Cells Acquire Temozolomide Resistance After Repeated Drug Exposure <i>Via</i> DNA Mismatch Repair Dysfunction 「テモゾロミド反復投与により誘導されるDNAミスマッチ修復機構異常によるヒトグリオーマ細胞のテモゾロミド耐性機構について」 Anticancer Research. 2020;40:1315-1323
指導教授	廣瀬 雄一
論文審査委員	主査 教授 鈴木 元 副査 教授 廣岡 芳樹 教授 富田 章裕

論文内容の要旨

【緒言】

悪性グリオーマにおいてtemozolomide(TMZ)の長期使用に伴いTMZ耐性が出現することが治療上の大きな問題となっている。よく知られたTMZ耐性機構の一つとしてO⁶-methylguanine-DNA methyltransferase(MGMT)が挙げられるが、MGMTのプロモーター領域のメチル化を認める症例も多く、TMZ耐性を考える上でMGMT以外の耐性機構の解明が重要である。

我々は以前、ヒトグリオーマ細胞株にTMZを使用することでG2/M arrestが生じた後に細胞死につながることで、G2/M checkpoint関連タンパクの阻害でTMZ効果が増強されることを報告しており、悪性グリオーマにおいてTMZによるDNA障害の修復にG2/M checkpointが関連していることが推察される。

【目的】

ヒトグリオーマ細胞株U87MGを用いてMGMT低発現のTMZ耐性株を作成し、TMZが誘導するG2/M checkpoint活性の変化に着目してその耐性機構を詳細に検討した。

【方法】

ヒトグリオーマ細胞株U87MGに対して徐々に濃度を上げながら4ヶ月以上反復してTMZを投与してTMZ耐性株を作成した。作成した耐性株に対してフローサイトメトリー法を用いて細胞周期を、ウェスタンブロット法で各種タンパク質の発現をそれぞれ測定した。また、作成した耐性株をchk1阻害薬及びcdc2阻害薬で処理し、G2/M checkpointの修飾によるTMZ効果の変化について集落形成能で検討した。

【結果】

TMZ暴露期間が4ヶ月の時点では、作成したTMZ耐性株にTMZ処理をすると一時的なTMZ誘発性G2/M arrestを認めるものから認めないものまで様々な反応が得られた一方、TMZ暴露期間が6ヶ月以上の長期になるとTMZ誘発性G2/M arrest(-)の耐性株のみ作成された。更に、TMZ誘発性G2/M arrest(-)の耐性株はMGMT発現を認めない一方でMSH2及びMSH6の発現低下を認め、TMZが効果を発揮する上で必要なmismatch repair system(MMR)の機能異常がTMZ耐性につながっていると考えられた。TMZ誘発性G2/M arrest(-)の耐性株に対してG2/M checkpointを修飾する薬剤を投与しても過去の我々の報告と異なりTMZ耐性が解除されなかった。

【考察】

今回の結果からTMZ耐性株作成過程においてTMZ暴露期間が長期になるとその耐性機構を変化させながらTMZ耐性が強固に進む可能性が示され、今後のTMZ耐性に関する基礎研究および臨床試験では複数のTMZ耐性機構が存在することを認識し、腫瘍の遺伝学的背景の差に基づいた細やかな検討及びTMZ耐性機構の違いを意識した治療の最適化が必要と考えられた。また、MMR異常を認めるTMZ耐性株においてはMMRを介する経路でのTMZ耐性解除は困難と考えられ、強固なTMZ耐性を獲得した腫瘍をターゲットとして治療効果改善を狙うよりは、より低悪性度の段階での化学療法の最適化が望ましいと考えられた。

【結語】

本研究により悪性グリオーマに対する長期間のTMZ暴露によりMMR機能異常による高度なTMZ耐性が誘導されることが示された。MMR機能異常によるTMZ耐性は強固であり、より耐性が弱い段階での化学療法の最適化が望ましいと考えられた。

論文審査結果の要旨

原発性脳腫瘍の代表である膠芽腫は浸潤性発育を特徴とし予後不良であるため、薬物療法の改善が大きな課題となっている。この点に関連し、審査会では、現在の中心的治療薬であるテモゾロミド(TMZ)耐性機序について発表が行われた。

研究ではヒトグリオーマ細胞U87MGに対してTMZを六ヶ月間処理することで薬剤耐性株を複数分離した。分離クローンではいずれもDNAミスマッチ修復(MMR)蛋白であるMSH6とMSH2の発現が著しく低下していた。この結果より、MMR異常がTMZ耐性に強く関与していることが提案された。

これに対して、MMR異常が生じる機序やMMR以外の耐性機序、TMZ以外の抗癌剤への影響等について質問が提起され、TMZ耐性獲得の過程とMMR異常が治療に与える影響が議論された。また、本研究の臨床的意義として、TMZ反復投与の過程で複数の耐性機序が誘導されうることで、MMR機能異常による耐性は細胞周期チェックポイント阻害剤抵抗性であることを示した点が挙げられ、耐性機序に合わせた治療の選択や、MMR機能が正常な段階での化学療法の強化を検討すべきことが議論された。一方、MMR異常によるTMZ耐性を克服する方策に関しては今後の課題とされた。

本研究は化学療法剤への耐性機序の解明を通じて脳腫瘍の診療発展に貢献するものと評価され、学位論文として十分な質を持つものと評価された。