

悪性黒色腫細胞に対する  
Temozolomide と Interferon- $\beta$  併用療法における  
抗腫瘍増強効果の検討  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系脳神経外科学専攻

榎田浩太郎

修了年 2018 年

指導教員 吉野篤緒

悪性黒色腫（malignant melanoma）は、神経提細胞由来のメラノサイトから発生する悪性度の高い腫瘍であり、その発生率は増加し続けている。悪性黒色腫は早期発見・早期摘出が原則であるが、進行期悪性黒色腫においては腫瘍の再発や遠隔転移を防ぐために、その後の集学的治療が重要である。現在までに、免疫学的治療・化学療法・放射線治療、またはこれらを組み合わせた集学的治療法が行われてきたが、進行期悪性黒色腫における治療成績は決して満足できるものではない。最近では、分子標的薬を用いた治療が行われてきているが、これらの薬剤さえ効果は一時的なものである。加えてこれらは非常に高価であり、国の医療費を圧迫する。それ故、悪性黒色腫の治療に対してさらなる、新規薬剤の開発や既存薬剤を用いた新規治療法の開発が期待されている。

Temozolomide（3-methyl-4-oxo-3,4-dihydro-imidazo[5,1-d][1,2,3,5] tetrazine-8-carboxamide、TMZ）は、Dacarbazine（DTIC）の後発医薬品として開発された薬剤である。悪性黒色腫と同じ神経提細胞由来の悪性神経膠腫に対しては、標準治療薬としての地位が確立されているが、悪性黒色腫に対しては、本邦においては承認されていない。TMZはDNAのグアニンのO<sup>6</sup>位にメチル基を付加し、O<sup>6</sup>-メチル化グアニンを形成する。メチル化グアニンはDNA複製時にシトシンではなくチミンと塩基対をなし、DNA障害を引き起こすことにより抗腫瘍効果を発揮する。一方、O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase（MGMT）は、アルキル化剤により付加されたメチル基を除去し、遺伝子を修復する酵素であり、このMGMTの発現はアルキル化剤に対する細胞の耐性を決める重要なポイントとなっている。またインターフェロン（IFN）は抗ウイルス効果、免疫賦活作用のほか、新生血管抑制効果、細胞増殖抑制効果やアポトーシス抑制などによる抗腫瘍効果を示すサイトカインとされ、海外において悪性黒色腫に対する薬剤として承認されている。IFN-βはさらにアルキル化剤との併用時に

は、多様な抗腫瘍効果を増強することも知られている。また、オートファジーは細胞が持っている細胞内タンパクを分解するための仕組みである。またアポトーシスとの間にクロストーク存在が報告され、近年このオートファジーによる細胞死の研究が進展している。

悪性黒色腫において、TMZ と IFN- $\alpha$  を併用投与した実験や、TMZ と IFN- $\alpha$  の併用投与により、平均生存期間を延長したという報告がある。しかしながら、TMZ と IFN- $\beta$  の併用投与に関する研究の報告は少ない。そこで本研究では、悪性黒色腫細胞に対する TMZ 単剤ならびに TMZ と IFN- $\beta$  の併用投与による抗腫瘍効果を検討すべく、細胞増殖抑制効果、細胞周期への影響、アポトーシスやオートファジーへの影響等に関して観察を行った。

5 種の悪性黒色腫細胞株 (A-375、CRL-1579、G361、MeWo、SK-MEL-28) を用いて、TMZ 単剤、IFN- $\beta$  単剤、TMZ + IFN- $\beta$  併用投与の細胞増殖抑制試験を行った。また、各悪性黒色腫細胞株の O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 発現量を定量し、O<sup>6</sup>-Benzylguanine (O<sup>6</sup>-BG) による MGMT 阻害下での薬剤投与による増殖抑制試験を行った。これらの結果に基づいて 2 種の悪性黒色腫細胞株 (A375、CRL-1579) を選択し、抗腫瘍効果の機序を flow cytometry (細胞周期の観察、アポトーシスの解析)、Western blotting (細胞周期・アポトーシス・オートファジー関連蛋白の解析)、および qRT-PCR 法 (*p53*、*caspase-3*、*Fas*、*caspase-8 mRNA*) を用いて解析した。

増殖抑制試験では、TMZ は 5 種すべての悪性黒色腫細胞株に対し細胞増殖抑制効果を示した。また、IFN- $\beta$  を併用投与することで、有意な増殖抑制効果の増強が得られた。O<sup>6</sup>-BG 投与によって MGMT 発現を阻害した増殖抑制試験においては、MGMT を発現している A375 細胞に対して、TMZ の抗腫瘍効果が増強した。悪性黒色腫細胞においても MGMT が TMZ の抗腫瘍効果を減弱する要因

となっている可能性が示唆され、MGMT を減弱させることによってさらなる TMZ の抗腫瘍効果が期待できる可能性を示した。

次に抗腫瘍効果の機序に関して、A375 細胞と CRL-1579 細胞を用いて、細胞周期に対する作用、アポトーシスに対する作用、オートファジーに対する作用の研究を進めた。

P53 の活性化により p21 の発現が誘導されると、G0/G1 期で細胞周期の停止が起こり、また G2/M チェックポイントは、TMZ 単剤の抗腫瘍効果において重要な役割を果たすとされている。悪性黒色腫細胞を用いた本研究において、TMZ と IFN- $\beta$  併用投与 8 時間では、G0/G1 期細胞の割合を増加させ、24 時間においては G2/M 期細胞の割合を増加させた。TMZ と IFN- $\beta$  併用投与が、細胞周期調節において重要な役割を果たすタンパクの変化をもたらすとともに、併用による抗腫瘍効果の機構の一つが、細胞周期停止であると考えられた。

細胞周期の G0/G1 arrest に関わるタンパク分子としては p21 が知られている。p21 は癌抑制遺伝子であり、様々なストレス刺激で活性化されて G0/G1 arrest を誘導する。本研究における Western blotting では、A375 および CRL-1579 細胞の両細胞において、TMZ 単剤の投与により p53 ならびに p21 の発現が上昇することが確認された。また、TMZ と IFN- $\beta$  併用でも同様の結果が得られた。さらに A375 細胞を用いた p53 mRNA 発現解析では、TMZ と IFN- $\beta$  併用投与では、4 時間後に増加が観察されており、併用療法の効果を裏付けるものと考えられた。

Western blotting によるアポトーシス関連タンパクの解析では、TMZ 単剤の投与で A375 および CRL-1579 細胞の両者において、p53 およびその下流にある Bax ならびに Fas の発現が上昇し、TMZ による内因系アポトーシス・外因系アポトーシスの両者の活性化が考えられた。TMZ による Fas、pro caspase-8 の活性化が、TMZ・IFN- $\beta$  併用投与時に観察される抗腫瘍増強効果に必要であったとす

る、外因系経路の関与の重要性を報告するものがある。本研究においても、内因系・外因系両経路の活性化を認めたが、Western blotting の結果からは、併用投与時は特に Fas を介した外因系経路の活性化がより増強されている現象が観察された。さらに、併用投与時に A375 細胞では *Fas* mRNA の増加を認め、外因系経路の重要性を示唆する結果であった。

オートファジーは抗腫瘍効果に働く側面のみを有しているわけではなく、逆に腫瘍成長を促進する方向に働くことがあるとも考えられ、複雑な役割を有している。本研究では悪性黒色腫細胞に対して、TMZ 単剤ならびに IFN- $\beta$  との併用投与で、アポトーシスを誘導するだけでなく、オートファジーも誘導すること示した。また、A375 細胞では、TMZ と IFN- $\beta$  との併用投与により、*caspase-8* mRNA が増加した。

本研究では、TMZ は MGMT 発現の有無に関わらず、悪性黒色腫細胞株に対し抗腫瘍効果を認めることが示された。さらに、O<sup>6</sup>-BG による MGMT 不活性化は、MGMT 発現悪性黒色腫細胞株に対する TMZ の抗腫瘍効果を増感させたことを示した。その機序は、G0/G1 期誘導による細胞周期の停止、アポトーシス・オートファジーの誘導が考えられた。また、TMZ と INF- $\beta$  を併用投与することによって、悪性黒色腫細胞株に対する抗腫瘍効果が増強された。特に併用投与では、外因系アポトーシス経路の活性化が強く関与することが示唆された。