

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 阿部 英明
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 909 号
学位授与の日付 令和2年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 MGMT Expression Contributes to Temozolomide Resistance in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas
(H3K27M 変異型びまん性正中グリオーマにおける MGMT 発現はテモゾロマイド抵抗性に寄与する)
論文審査委員 主査 教授 池内 健
副査 教授 竹林 浩秀
副査 准教授 今井 千速

博士論文の要旨

【背景と目的】

びまん性正中グリオーマ (DMG) は、成人の膠芽腫で第一選択薬となったテモゾロマイド (TMZ) を含む化学療法の効果が得られにくく予後不良な疾患である。

膠芽腫において TMZ 抵抗性に寄与する DNA 修復酵素の一つ O6-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) の発現は、MGMT 遺伝子のプロモーター領域のメチル化によって制御される。多くの DMG ではヒストン H3.3 をコードする H3F3A 遺伝子、もしくは H3.1 をコードする HIST1H3B 遺伝子に K27M 変異が認められ、これらの H3K27M 変異によってもたらされるエピジェネティックな変化により DNA の低メチル化を来することが知られている。多くの DMG では、MGMT 遺伝子プロモーター領域がメチル化されていないことが TMZ 抵抗性に寄与すると説明されてきたが、細胞実験でそれを示した報告はない。ただし H3K27M 変異を有する DMG 細胞株は樹立難しく希少とされている。

申請者は、DMG 細胞株の樹立に成功したため、既存の DMG 細胞株と共に MGMT 発現と TMZ に対する感受性との相関を検証し、その上で新たな DMG の治療法を検討した。

【方法】

再発 DMG の 4 歳女児の摘出生組織をパペイン酵素処理した後に分散培養し、細胞株 NGT16 を樹立した。次に NGT 細胞株及び入手した DMG 細胞株 SF7761, SF8628, JHH-DIPG1 から DNA を抽出し、H3F3A と HIST1H3B K27M 変異の有無を Sanger 法で解析した。これらの DMG 細胞株、さらにはコントロールとして市販の膠芽腫細胞株の U87MG (MGMT 非発現) と T98G (MGMT 発現) から DNA を抽出し、バイサルファイト処理によって MGMT プロモーター領域のメチル化の有無を methylation specific PCR (msPCR) により、MGMT タンパク発現を western blot 法で評価した。各細胞株について、TMZ による細胞生存率 (抗腫瘍効果) を WST-8 assay で評価した。さらに NGT16 細胞の ACVR1 (別名 ALK2) の遺伝子変異の有無と、ALK2 阻害剤 K02288 の抗腫瘍効

果を評価した。

【結果】

再発時 DMG 症例(4 歳児)の摘出組織及 NGT16 の DNA から HIST1H3B K27M 変異を認め、入手した DMG 細胞株 (SF7761, SF8628, JHH-DIPG1) からは H3F3A K27M 変異を検出した。MGMT 遺伝子プロモーター領域の msPCR から、NGT16, SF8628, JHH-DIPG1 では非メチル化のバンド(U)のみ, SF7761 (M>U), T98G (M<U)ではメチル化と非メチル化の両方のバンドが、さらに U87MG では、メチル化バンドのみ(M)を検出した。また western blotting 法では、NGT16, SF8628, JHH-DIPG1, T98G で MGMT 発現を確認し、SF7761 と U87MG では MGMT 発現を確認出来なかった。一方、TMZ の抗腫瘍効果については、TMZ 250 μ M 投与 72 時間後では MGMT 発現がない SF7761 と U87MG で、細胞生存率が 60%以下となり、MGMT を高発現する NGT16, SF8628, JHH-DIPG1, T98G では細胞生存率は 80%以上と TMZ 耐性を示した。

一方、再発時 DMG 症例(4 歳児)の摘出組織及 NGT16 の DNA から、ACVR1 G328E 変異が検出された。ALK2 のシグナル伝達の下流に位置する Smad1/5/9 のリン酸化発現が確認でき、BMP-ALK2 pathway の活性化していた。そのため、NGT16 細胞に ALK2 阻害薬 (K02288) 50 μ M を 72 時間投与したところ、細胞生存率は 75%程度にまで抑制された。

【考察】

樹立した HIST1H3B 遺伝子の H3K27M 変異を持つ NGT16 細胞などを用いた細胞実験から、DMG 細胞株を用いて MGMT 発現の有無と TMZ の効果に相関があることを示せた。今回の検討で H3K27M 変異のある NGT16 について DNA が低メチル化状態であることを確認している。同様に NGT16 では MGMT 遺伝子プロモーター領域も非メチル化状態のため、MGMT が発現し、TMZ 抵抗性となる可能性が示唆された。

MG で確認されている二つの H3F3A H3K27M 変異と HIST1H3B H3K27M には、頻度に差があるが骨形成を担う BMP pathway のうち ACVR1 (ALK2) 受容体をエンコードする ACVR1 遺伝子に点突然変異がありうること知られている。実際 NGT16 でも ACVR1 変異を有し、BMP pathway が活性化しており、ALK2 阻害剤の効果を確認出来た。

今回樹立した NGT16 は、H3K27M 変異を持つ希少な DMG 細胞株であり、今後様々な新規治療法を検討するツールになり得ると考えている。

【結論】

DMG 患者の摘出組織から、希少な HIST1H3B K27M 変異及び ACVR1 (ALK2)変異を有する NGT16 細胞株を樹立し、その上で H3K27M 変異型 DMG 細胞株によって DMG における TMZ 抵抗性に MGMT 発現が関与することを証明した。

審査結果の要旨

びまん性正中グリオーマ (DMG) は、テモゾロマイド (TMZ) を含む化学療法の効果が得られにくい予後不良な疾患である。DMG では、MGMT プロモーター領域がメチル化されないことが TMZ 抵抗性に寄与すると説明されてきた。本研究において、新規の DMG 細胞株の樹立が行われ、MGMT 発現と TMZ に対する感受性との相関が、既存の DMG 細胞株と共に検証された。DMG 症例の摘出組織及び NGT16 において HIST1H3B K27M 変異を認め、入手した DMG 細胞株 (SF7761, SF8628, JHH-DIPG1) からは H3F3A K27M 変異が検出された。MGMT プロモーター領域におけるメチル化特異的 PCR において、NGT16, SF8628, JHH-DIPG1 では非メチル化のバンドのみ, SF7761 (M>U), T98G ではメチル化と非メチル化の両方のバンドが、さらに U87MG では、メチル化バンドのみを検出した。Western blotting 法では、NGT16, SF8628, JHH-DIPG1, T98G で MGMT 発現を確認し、SF7761 と U87MG では MGMT 発現が消失していた。TMZ の抗腫瘍効果については、TMZ 250 μ M 投与

72 時間後では MGMT 発現がない SF7761 と U87MG で細胞生存率が低下し、MGMT を高発現する NGT16, SF8628, JHH-DIPG1, T98G では TMZ 耐性を示した。一方、DMG 症例の DNA から、ACVR1 G328E 変異が検出された。ACVR1 (別名 ALK2) のシグナル伝達の下流に位置する Smad1/5/9 のリン酸化発現を認め、BMP-ALK2 pathway の活性化が示唆された。NGT16 細胞に ALK2 阻害薬 (K02288) を投与したところ、細胞生存率は約 75% にまで抑制された。

DMG 症例由来の新規細胞株を樹立し、MGMT 発現と TMZ に対する感受性との相関を明らかにし、ALK2 のシグナル伝達活性化を新規治療標的として見いだした点に学位論文としての価値を認める。