

氏 名（本 籍）	山 田 哲 也	（愛知県）
学 位 の 種 類	博 士（医学）	
学 位 授 与 番 号	甲第 1129 号	
学 位 授 与 日 付	令和 2 年 3 月 25 日	
学 位 授 与 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当	
学 位 論 文 題 目	Riluzole enhances the anti-tumor effects of temozolomide via suppression of MGMT expression in glioblastoma	
審 査 委 員	（主査）教授	竹内 保
	（副査）教授	山口 瞬
		教授 中川 敏幸

論 文 内 容 の 要 旨

膠芽腫は最も急速に進行する中枢神経原発悪性腫瘍の一つである。外科的切除，放射線治療および化学療法が現在の標準治療であるが，未だ膠芽腫患者の予後は不良である。血液脳関門を通過するアルキル化剤であるテモゾロミド（TMZ）が本疾患に対するほぼ唯一の化学療法剤であるが，DNA 修復酵素である O⁶-メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼ（MGMT）による薬剤耐性が問題となっており，MGMT 陽性膠芽腫に対する有効性の高い治療法の開発が急務である。

リルゾールは代謝型グルタミン酸受容体 1（mGluR1）の選択的拮抗薬であり，米国 FDA により承認された筋萎縮性側索硬化症（ALS）の治療薬である。グルタミン酸は興奮性神経伝達物質の一つであり，膠芽腫細胞の増殖，浸潤において重要な役割を果たしている。リルゾールの単独療法が，悪性腫瘍細胞の生存プロセスで中心的役割を担う PI3K/AKT/mTOR 経路の抑制を介して膠芽腫の進行を抑制することが過去に報告されているものの，膠芽腫における TMZ とリルゾールの併用療法の有効性を検討した報告はない。

今回、我々は，MGMT 陽性膠芽腫に対する TMZ とリルゾールの併用療法の有効性を *in vitro* および *in vivo* で検討し，リルゾールが膠芽腫の MGMT 発現に与える影響を評価した。

【対象と方法】

細胞生存率アッセイでは，3 種類の膠芽腫細胞株 T98G（ヒト，MGMT 陽性），U87MG（ヒト，MGMT 陰性），および GL261（マウス，MGMT 陽性）を TMZ 単独療法，リルゾール単独療法，および TMZ とリルゾールの併用療法に曝露した。3 種類の膠芽腫細胞株の増殖において，TMZ へのリルゾール追加の効果を評価するために，アイソボログラム解析を実施した。次に，T98G 細胞株を使用し，リルゾールが MGMT 発現に与える影響を，定量リアルタイム RT-PCR 解析を用いて評価した。最後に，C57BL/6J マウスと GL261 マウス膠芽腫細胞株を使用し，MGMT 陽性膠芽腫の同種同所性マウスモデルを作製し，TMZ とリルゾールの併用療法の有効性を評価した。

【結果】

リルゾールの単独療法は，3 種類の細胞株において，いずれも有意な時間及び濃度依存性の増殖阻害効果を示した。また TMZ とリルゾールの併用療法は，MGMT 陽性膠芽腫細胞株である T98G および GL261 においては有意な併用効果を示したものの，MGMT 陰性膠芽腫細胞株である U87MG においては有意な併用効果を示さなかった。アイソボログラム解析では，TMZ とリルゾールの併用効果は，MGMT 陽性膠芽腫細胞株である T98G および GL261 においては相乗性を示したものの，MGMT 陰性膠芽腫細胞株

である U87MG においては相加性あるいは拮抗性を示した。定量リアルタイム RT-PCR 解析では、リルゾールは用量依存性に MGMT mRNA の発現を抑制した。また、TMZ へのリルゾールの追加は、TMZ への曝露によって亢進された MGMT mRNA の発現を有意に抑制した ($p<0.01$)。さらに、頭蓋内 MGMT 陽性膠芽腫マウスモデルにおいて、TMZ とリルゾールの併用療法は腫瘍増殖を有意に抑制した ($p<0.05$)。

【考察】

従来の TMZ 単独療法へのリルゾールの追加の有効性を評価した。本研究から、次に示す新たな知見が得られた。

細胞生存率アッセイの結果から、TMZ とリルゾールの併用療法の抗腫瘍効果は MGMT 陽性細胞において有意に増強されることが確認された。またアイソボログラム解析の結果から、TMZ とリルゾールの併用療法は MGMT 陽性細胞において相乗性を有することが示唆された。これらの結果は、MGMT 陽性細胞において、TMZ へのリルゾールの追加が TMZ の抗腫瘍効果を相乗的に増強することを示している。

MGMT 陽性膠芽腫細胞を使用したリアルタイム RT-PCR 解析の結果から、リルゾールが、TMZ への曝露によって亢進された MGMT mRNA の発現を有意に抑制することが確認された。この結果は、TMZ へのリルゾールの追加は、TMZ 誘導性の MGMT 亢進を抑制することにより、TMZ の抗腫瘍効果を増強している可能性がある。

MGMT 陽性マウス膠芽腫細胞を使用した同種同所性マウスモデルによる動物実験の結果から、TMZ 単独療法群では腫瘍体積が有意に抑制されず、TMZ とリルゾールの併用療法群では腫瘍体積が有意に抑制されることが確認された。この結果は、従来の TMZ 単独療法へのリルゾールの追加は TMZ の抗腫瘍効果を増強し、腫瘍体積の増大を抑制することを示している。

【結論】

MGMT 陽性膠芽腫に対する TMZ 単独療法が、MGMT 発現の亢進を介して薬剤耐性を誘導することが確認された。リルゾールは TMZ 曝露による MGMT 発現亢進を抑制し、*in vitro* および *in vivo* で、MGMT 陽性膠芽腫に対する TMZ の抗腫瘍効果を増強した。これらの結果は、TMZ とリルゾールの併用療法が MGMT 陽性膠芽腫患者への効果的な治療選択肢となり得ることを示している。

論文審査の結果の要旨

申請者 山田 哲也は、MGMT 陽性膠芽腫に対する TMZ とリルゾールの併用療法の有効性を検討し、リルゾールが、TMZ 曝露による MGMT 発現亢進を抑制し、*in vitro* および同種同所性マウスモデルで、MGMT 陽性膠芽腫に対する TMZ の抗腫瘍効果を増強することを見出した。これらの結果は、TMZ とリルゾールの併用療法が MGMT 陽性膠芽腫患者への効果的な治療選択肢となり得ることを示しており、膠芽腫治療の発展に少なからず寄与すると認める。

[主論文公表誌]

Tetsuya Yamada, Shohei Tsuji, Shinsuke Nakamura, Yusuke Egashira, Masamitsu Shimazawa, Noriyuki Nakayama, Hirohito Yano, Toru Iwama, Hideaki Hara : Riluzole enhances the anti-tumor effects of temozolomide via suppression of MGMT expression in glioblastoma
Journal of Neurosurgery (in press)