

氏名	津田 恭治		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第	7851	号
学位授与年月	平成 28年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	抗てんかん薬レベチラセタムがグリオーマ細胞に及ぼす効果 —バルプロ酸ナトリウムとの比較—		
主査	筑波大学教授	博士 (医学)	武川 寛樹
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	坂東 裕子
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	溝上 裕士
副査	筑波大学助教	博士 (医学)	水野 智亮

## 論文の内容の要旨

### (目的)

悪性グリオーマのうち最悪性の膠芽腫では5年生存率は10%程度と予後不良である。標準治療は外科的摘出と術後放射線治療と化学療法である。悪性グリオーマは症候性てんかんを生じやすく患者の多くが抗てんかん薬を服用している。抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウム (VPA) にはグリオーマに対する放射線治療や化学療法の効果を増強する作用が多数報告されている。新規抗てんかん薬レベチラセタム (LEV) には標準治療薬テモゾロミド (TMZ) の耐性因子である

O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の発現を抑制し悪性グリオーマの TMZ 感受性を高めると報告されたがそれに続く報告は少ない。本研究では LEV のグリオーマに対する治療効果を検証するため①TMZ 耐性因子の克服②放射線感受性増強の2つに着目し、VPA と比較して検討した。

### (対象と方法)

T98G、U251、A172 のグリオーマ細胞に対し、[実験 1] 各細胞に VPA (0, 1, 3, 6, 12mM), LEV (0, 0.5, 1.5, 3, 6mM) を投与し 72 時間培養後に MTS assay を行った。[実験 2] 各細胞に VPA (6mM), LEV (3mM) を投与し 24 時間後に TMZ (200 $\mu$ M) を投与して 48 時間培養後 MTS assay を行った。[実験 3] 各細胞に VPA (6mM), LEV (3mM) を投与し 72 時間培養後に real-time PCR 法で MGMT の定量評価を行った。[実験 4] T98G に VPA (6mM), LEV (3mM) を投与、U251 と A172 に VPA (3mM), LEV (1.5mM) を投与し、48 時間培養後に  $\gamma$  線照射 (2, 4, 6, 8 Gy) して 2 週間培養後にコロニー数を計測した。[実験 5] 実験 4 と同様に投薬・培養した

後、 $\gamma$ 線照射 (4, 8 Gy) して 24 時間後に TUNEL 染色でアポトーシスを評価した。[実験 6] 実験 4 と同様に投薬・培養した後、カスパーゼ (3,9) 阻害剤を投与し $\gamma$ 線照射 (8 Gy) して 24 時間後に TUNEL 染色でアポトーシスを評価した。

(結果)

[実験 1] U251 の LEV 投与群では有意に細胞数が減少した。[実験 2] T98G の LEV 投与群では TMZ の効果が有意に増強したが、U251・A172 の LEV 投与群では増強しなかった。T98G の VPA 投与群では TMZ の効果は増強しなかったが、U251・A172 の VPA 投与群では増強した。[実験 3] T98G の LEV 投与群では遺伝子レベルで MGMT の発現が有意に抑制された。VPA 投与群では抑制されなかった。[実験 4] 各細胞の LEV 投与群で放射線治療の効果が有意に増強した。VPA 投与群でも放射線治療の効果が有意に増強した。[実験 5] A172 の LEV 投与群では放射線治療後のアポトーシスが有意に増加した。各細胞の VPA 投与群で放射線治療後のアポトーシスが有意に増加した。[実験 6] カスパーゼ 3, 9 阻害剤を投与した群では同薬剤を投与しなかった群と比較して LEV または VPA と放射線治療の併用療法によるアポトーシスの誘導を有意に減少させるか、あるいは減少の傾向がみられた。

(考察)

VPA は HDAC 阻害作用により TMZ 感受性を増強すると考えられている。一方 LEV は MGMT プロモータへの p53 の結合を増加させ MGMT の発現が減少することで TMZ 感受性を高めると想定されている。両者の TMZ 感受性増強効果の機序が異なるため、併用による治療効果の向上が期待できる。LEV の放射線治療への関与として P53 の状態とは無関係に放射線感受性増強効果が認められたが機序は不明な点が多く、今後の検証が必要である。病理診断で MGMT が非メチル化を示す場合には LEV を選択することで TMZ の治療効果を高め患者の予後改善に寄与し得る。

## 審査の結果の要旨

(批評)

T98G、U251、A172 の 3 種のグリオーマ細胞株に対し、抗てんかん薬 LEV の直接的効果と標準治療薬 TMZ との併用療法の有効性、あるいは放射線療法併用との有効性を調べた研究である。LEV は T98G、A172 には効果がなかったが、U251 では直接的抗腫瘍効果を認めた ( $P < 0.01$ )。TMZ の耐性因子である MGMT が高発現している T98G に対しては、LEV の投与は MGMT 発現を抑制することで、結果として TMZ 感受性を高めることを証明した ( $P < 0.01$ ) が、VPA と TMZ の併用では、有効性は認められなかった。また LEV はとくに A172 に関して放射線治療後のアポトーシスを増強させることも示した ( $P < 0.01$ )。これらは重要な所見であり、多くのデータからの解析は高く評価される。予備審査での指摘事項にも真摯に対応しており、全体として良くまとまっている。とくに TMZ に対する耐性因子 MGMT が高発現した腫瘍の場合、TMZ+VPA では効果がみられないが、LEV は MGMT 発現を抑制し、その結果 TMZ+LEV が有効性を示すことはよく解析されている。今後は、LEV による放射線感受性増加の機序についての解明や、作用機序の異なる VPA と LEV の併用効果についての検討が期待された。

平成 28 年 1 月 6 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と

審査様式 2 - 1

判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。