論　文　概　要

〇論文題目　　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
ーバルプロ酸ナトリウムとの比較ー

〇指導教員　　人間総合科学研究科　疾患制御医学専攻　　松村 明 教授

（所　属）　　筑波大学大学院人間総合科学研究科　疾患制御医学専攻

（氏　名）　　津田　恭治

目　　的：　悪性グリオーマは浸潤性に発育する脳腫瘍で増殖性が高く、最も悪性の膠芽腫の場合 5 年生存率は 10%程度に過ぎない予後不良の悪性疾患である。現在の標準的治療は最大限の外科的摘出とそれに続く放射線治療と化学療法からなる。また、抗てんかん薬は悪性グリオーマの半数以上に症候性てんかんが生じるためその患者の多くが服用している薬剤である。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や、グリオーマ細胞に対して直接の増殖抑制効果や殺傷効果を有することが報告されている。新規抗てんかん薬レベチラセタム（LEV）には世界的標準治療薬であるテモゾロミド（TMZ）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 感受性を高めるという報告があるがそれに続く報告は少ない。本研究では抗てんかん薬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 つに着目した。既に多くの報告がなされている VPA を比較対照として LEV の効果を検証することで LEV がグリオーマ治療へ与える影響を検討する。

対象と方法：　T98G，U251，A172 のグリオーマ細胞を用いた。［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（200μM）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 時間後に RNA を抽出し、cDNA を作製して 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γ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］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γ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］T98G に VPA（6mM），LEV（3mM）を投与、U251 と A172 に VPA（3mM），LEV（1.5mM）を投与し 48 時間培養後にカスパーゼ（3,9）阻害剤を投与し速やかにγ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］MTS assay において LEV 投与群では U251 に対して統計的に有意に細胞数を減少した。[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 TMZ の効果は増強した。［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 投与群では同様な効果は認めなかった。［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 には HDAC 阻害作用があり細胞内のクロマチン構造を脆弱化して薬剤の DNA への到達を容易にさせることで TMZ への感受性が高まるとされる。一方 LEV は Sin3A/HDAC1 コリプレッサー複合体の集積により MGMT プロモータへの p53 の結合が増加し MGMT の蛋白・mRNA 発現を減少させ、TMZ への感受性を高めるという機序が想定されているがこの領域の報告は少なく未だ確定した概念ではない。しかしながら、LEV と VPA が TMZ 感受性を高める効果の機序が異なると考えられるため、両者を併用した場合に治療効果がさらに高まることが期待される。LEV の放射線治療への関与として P53 の状態に関わらず放射線感受性増加の作用が認められた。機序については不明な点が多い。薬剤の有害事象は VPA よりも LEV の方が有害事象は少ない。けいれん抑制効果は LEV 単独投与で十分期待できる。VPA が投与できない状況では次の選択肢として LEV はグリオーマ治療に貢献できると考えられる。また病理診断で 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。

結　　論：　*in vitro* で LEV はグリオーマ細胞に対する TMZ 感受性・放射線感受性の増加作用を有することが示された。今後は本研究結果の *in vivo* での検証や LEV と VPA の併用による治療効果、放射線感受性増加機序の解明を進めていく必要がある。