

膵神経内分泌腫瘍における MGMT 遺伝子のメチル化と ストレプトゾシン耐性の関連についての細胞生物学的検証

愛知県がんセンター研究所

分子病態学部 室長 佐久間 圭一朗

愛知県がんセンター研究所

分子病態学部 部長 青木 正博

愛知県がんセンター中央病院

消化器内科部 医長 脇岡 範

1. 研究の背景・目的

膵神経内分泌腫瘍は膵臓の神経内分泌細胞由来の腫瘍である。この5年間で日本における人口10万人あたりの有病患者数は1.2倍に増加し、今後も増加傾向が続くと予想されている。膵神経内分泌腫瘍の治療は切除が第1選択肢だが、切除不能もしくは再発症例に対しては薬物療法が選択される。

ストレプトゾシンは膵神経内分泌腫瘍に対して保険承認されている薬剤のひとつである。薬理的にはアルキル化剤に分類され、DNAのグアニンをアルキル化することで正常なDNA複製を阻害する。一方、細胞内にはアルキル化されたDNAを修復するDNA修復酵素としてMGMT (O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase)などが存在する。理論的に、MGMTの発現が高い腫瘍細胞にはアルキル化剤が効きにくいことが予想され、実際に神経膠腫や一部の消化管神経内分泌腫瘍などでは、MGMTの発現量がアルキル化剤であるテモゾロミドの効果と負の相関関係にある (MGMTの発現量が高いほどテモゾロミドが効きにくい) ことが報告されている。しかし、ストレプトゾシンについて同様のことを調べた報告は未だ見られない。

共同研究者(脇岡)を中心とする研究チームは、「膵神経内分泌腫瘍においてもMGMTの発現量とストレプトゾシンの効果は負の相関関係にある」という作業仮説をたて、臨床検体を用いた検証を開始した。愛知県がんセンター中央病院でストレプトゾシンによる治療を受けた11症例について、MGMTの発現量と治療効果の相関を統計学的に検定したところ、両者に有意な相関を認めた ($P = 0.00091$)。本研究では、臨床検体で観察されたMGMT発現

量とストレプトゾシンの効果の負の相関関係について、細胞株を用いて細胞生物学的な検証をおこない、MGMT の関与をより直接的に証明することを目的とする。

2. 研究の方法

① 膵神経内分泌腫瘍細胞株の MGMT 発現量の評価

膵神経内分泌腫瘍細胞株 BON1 と QGP1 細胞から RNA とタンパクを回収する。RNA から oligo(dT)プライマーを用いて逆転写をおこない、cDNA を作成する。調整した cDNA とタンパクを用いてそれぞれ RT-PCR と western blot をおこない、MGMT の発現量を評価する。ポジティブコントロールとして Jurkat 細胞(ヒト T 細胞株)を使用する。

② MGMT の強制発現あるいはノックダウン

BON1 と QGP1 細胞のうち、MGMT の発現を認めなかったものについては *MGMT* cDNA をレンチウイルスで安定導入する。MGMT の発現を認めたものについては *MGMT* shRNA を導入してノックダウンする。それぞれ安定クローンを樹立する。

③ DNA メチル化の関与の検証

MGMT の発現が失われる機序として、*MGMT* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が知られている。本研究で用いる BON1 と QGP1 細胞のうち *MGMT* の発現を認めなかったものについて、原因がメチル化によるものかを検証する。具体的には、細胞の培地に脱メチル化剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジンを添加し、RNA およびタンパクを回収する。その後、(1)と同様に RT-PCR および western blot をおこない、脱メチル化によって *MGMT* の発現が回復するか評価する。また、クロマチン免疫沈降法によってメチル化 DNA を濃縮し、*MGMT* のプロモーター領域が検出されるか PCR 法で検証する。

④ ストレプトゾシンの効果判定

②で作成した、MGMT 発現量を遺伝学的手法で操作した細胞に対してストレプトゾシンを投与する。濃度を複数設定し、生存細胞数を MTT アッセイやトリパンブルー染色によって経時的に評価する。この結果から、MGMT 発現量とストレプトゾシンの効果に相関があるかを統計学的に判定する。

3. 研究結果

① 膵神経内分泌腫瘍細胞株の MGMT 発現量の評価

膵神経内分泌腫瘍細胞株 BON1 と QGP1 細胞から cDNA とタンパクを調整し、MGMT の発現量を RT-PCR 法(図 1A) と western blot 法(図 1B) で評価した。BON1 細胞には mRNA、タンパクどちらの発現も認めず、QGP1 細胞には両者の発現を認めた。

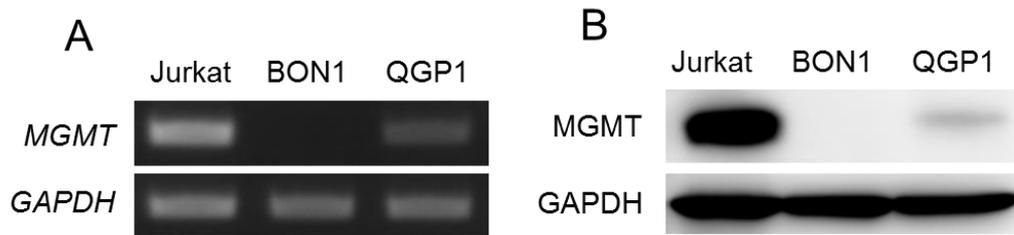


図 1. BON1 と QGP1 細胞の MGMT の発現量を RT-PCR 法(A) と western blot 法(B) で評価した。

② MGMT の強制発現あるいはノックダウン

①の結果から、BON1 細胞には *MGMT* cDNA を、QGP1 細胞には *MGMT* shRNA を導入し、限界希釈法によりシングルセルクローニングをおこなった。Western blot 法によって、図 2 に示す通り、それぞれの細胞から安定株を複数樹立した。

Western blot

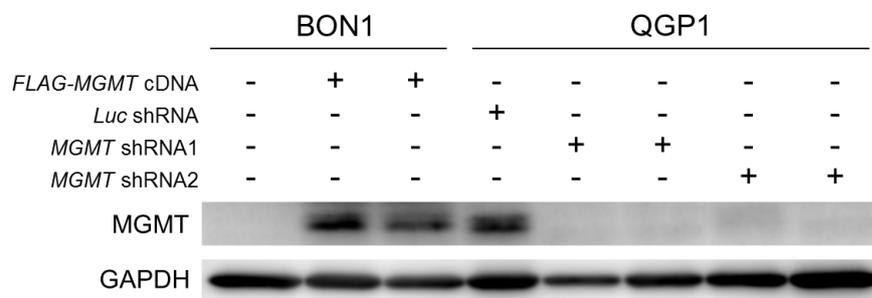


図 2. シングルセルクローニングにより樹立した亜株の western blot 解析

③ DNA メチル化の関与の検証

BON1 細胞で *MGMT* mRNA の発現を認めない原因に *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が関与しているかを調べた。BON1 細胞を DNA 脱メチル化剤の 5-Aza-2'-deoxycytidine で処理したところ、プロモーター領域がメチル化されていることで知られる *LCN2* の発現が濃度依存的に回復した一方、*MGMT* の発現量に著変を認めなかった(図 3)。この結果は、BON1 細胞においては *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が生じていない可能性を示唆するが、正確な判定にはより細かい実験が必要である。

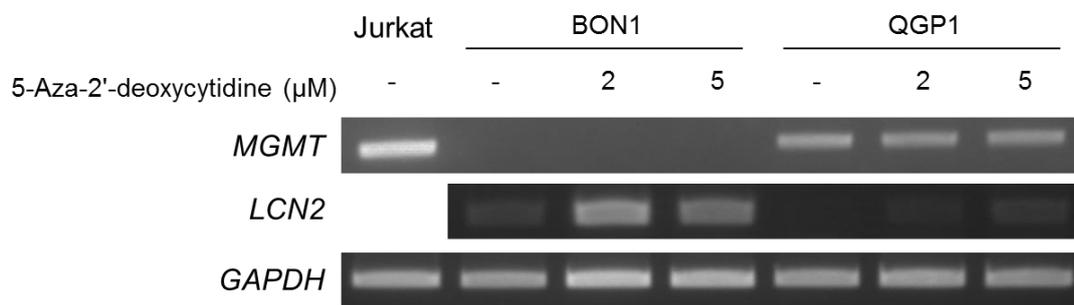


図3. BON1 細胞における *MGMT* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の有無の検討

④ ストレプトゾシンの効果判定

②で樹立した亜株をストレプトゾシンを複数の濃度で添加し、24 時間後、MTT アッセイで細胞数を評価した。BON1 については *MGMT* の強制発現によって有意な MTT 活性の上昇を認めた(図 4A)。一方、QGP1 については *MGMT* のノックダウンによって MTT 活性に著変を認めなかった(図 4B)。

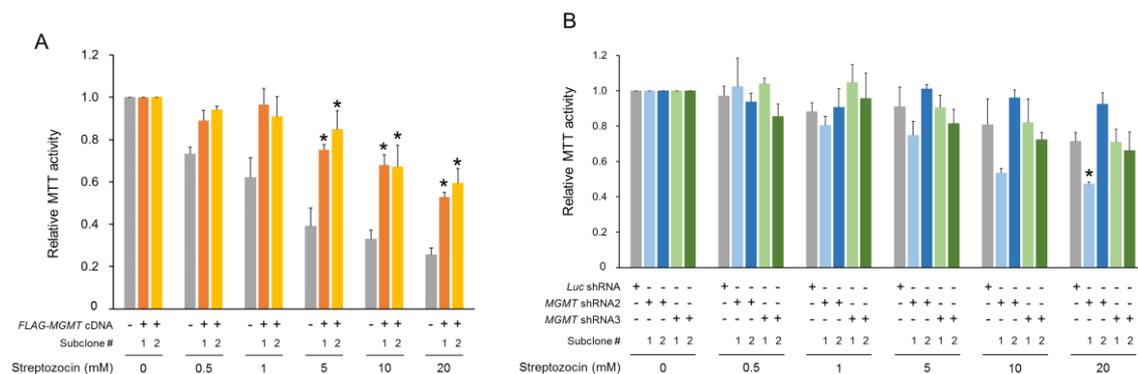


図4. MTT アッセイによるストレプトゾシン感受性の評価

MGMT を強制発現した BON1 細胞(A)またはノックダウンした QGP1 細胞(B)にストレプトゾシンを添加し、24 時間後に MTT アッセイをおこなった。アスタリスク(*)はコントロール細胞と比べて有意($P < 0.05$)な変化を示す。

4. 考察

今回用いた 2 種類の細胞株のうち、BON1 細胞は *MGMT* の発現喪失を認めた。5-Aza-2'-deoxycytidine 添加実験の結果から、発現喪失の機序は DNA メチル化ではない可能性があるものの、膵内分泌腫瘍の細胞株は入手できるものが少ない点で貴重な細胞株で

あるといえる。BON1 細胞への *MGMT* 強制発現は予想された通りのストレプトゾシン耐性をもたらしたことで、本研究は一定の目的を達成することができた。一方で QGP1 細胞を用いた *MGMT* のノックダウンについては期待通りの結果は得られなかった。この原因はいろいろ考えられるが、最も単純なものとして、ノックダウン後に残存する *MGMT* がストレプトゾシン耐性にはなお十分量である可能性が考えられる。

5. 文献

本研究成果は平成 30 年 4 月 12 日時点で専門誌に英語論文投稿中である。