悪性グリオーマの集学的治療に向けての生物学

廣 瀬 雄 一

Recent Advances in Biological Research on Malignant Glioma and Their Therapeutic Relevance

by

Yuichi Hirose, M.D.

from

Department of Neurosurgery, Fujita Health University

Despite recent advances in various therapeutic modalities for treating malignant gliomas, these tumors are still hardly curable, and the development of the new therapies is warranted in the field of chemotherapy and radiotherapy. In this context, many therapeutic compounds have been investigated, and, especially, drug treatment using molecular targeting compounds has attracted considerable attention amongst neuro-oncologists. Since previous studies have elucidated that malignant gliomas show an up-regulation of various growth factor receptor-related activities, many clinical studies using compounds targeting those receptors have been conducted. However, the development of effective molecular targeting therapy for malignant gliomas is limited by a relative lack of understanding of the biology of glioma cells. Thus, laboratory investigation including an animal tumor model is indispensable in designing a better therapeutic approach for these tumors. On the other hand, genetic analysis of gliomas has led to the discovery of prognostic markers. Recent clinical studies focusing on genetic markers has revealed the importance of the methylation status of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase promoter and mutational status of isocitrate dehydrogenase 1 as prognostic factors of gliomas, leading to the idea that genetic analysis could help in selecting cases with a favorable treatment response and, possibly, individualization of the treatment. In this text, recent advances in glioma biology are reviewed to help better understand the problems and future prospects in the treatment of these tumors.

(Received June 21, 2010 ; accepted July 1, 2010)

Key words : malignant glioma, MGMT, molecular target therapy, IDH1

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 19 : 880-886, 2010

はじめに

悪性グリオーマは、脳という大量切除が許されない臓器の中で浸潤性に発育するため、手術による根治がほぼ不可能であるともいえる。しかも手術後の残存腫瘍は確実に致命的な病態を招くため、その治療においては外科的切除、放射線治療、化学療法という多方面からのアプローチが必要である。こうした中で近年の医療工学の発

達、悪性グリオーマの切除率の向上に寄与し、それに伴う予後の改善が報告されている。また放射線療法が悪性グリオーマの予後改善に有効であることは従来から示されていたが、テモゾロミド (TMZ) による化学療法はさらに薬物療法が悪性グリオーマの治療において重要な役割を果たしうることを証明した。しかし、こうした治療法の進歩にもかかわらず、悪性グリオーマは決して高い治療効果が約束された腫瘍ではなく、各種治療法のさ

藤田保健衛生大学脳神経外科／〒470-1192 豊明市杣掛町田楽ヶ窪 1-98〔連絡先：廣瀬雄一〕

Address reprint requests to : Yuichi Hirose, M.D., Department of Neurosurgery, Fujita Health University, 1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake-shi, Aichi 470-1192, Japan

Fig. 1 DNA repair by O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT). Expression of MGMT is epigenetically regulated by the methylation status of the CpG island in its promoter. If the CpG island is unmethylated, the *MGMT* gene is translated and the enzyme removes any alkyl adduct (A) from the guanine (G) in genomic DNA. If the CpG island is methylated, the *MGMT* gene is silenced

らなる発展が必要である事態は従来と比べて大きな変化がないといえる。

今後この問題を克服するうえで、期待されるのは薬物療法の発展であり、その中には分子標的治療も含まれる。本稿では悪性グリオーマに関する化学療法耐性因子、分子標的治療の動向、および新しい予後判定因子についての最近の知見を紹介し、現状の問題点や今後の展望についての理解の一助としたい。

化学療法耐性と O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) について

近年、悪性グリオーマに対する化学療法は TMZ が中心的薬剤として使われることが多く、欧米でも多くの臨床試験は TMZ を用いた化学療法を基礎として行われている。TMZ は DNA メチル化剤として分類され、DNA 中のグアニンの O⁶位にメチル基を付加することが最も大きな細胞障害に関与する効果である⁷⁾。これに対して従来グリオーマに対する化学療法の中心的薬剤であったニトロソウレア製剤 (ACNU, MCNU) は、DNA 中のグアニンの O⁶位にクロロエチル基を付加し、このクロロエチル基を介して反対側のシトシン残基との間に DNA 2 本鎖間架橋が形成されて DNA 障害を惹起するとされている。TMZ もニトロソウレア製剤も、DNA 中のグアニ

ン O⁶位をメチル化あるいはエチル化しなければ DNA 障害を起こすことはないので、O⁶位がメチル化あるいはエチル化されたグアニンからメチル基あるいはエチル基を除去する機能を有する細胞においては、DNA アルキル化剤の効果は期待できない。このような作用（一種の DNA 修復機能）をもつ酵素が O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) であり、TMZ が広く使われるようになる以前から悪性グリオーマの化学療法耐性因子として知られていた (Fig. 1)³⁾。MGMT は DNA 中の O⁶アルキル化グアニンからメチル基やエチル基を自己の活性中心部のシステイン残基へと取り込み、その後ユビキチンと呼ばれる蛋白分解系により分解されるため、大量の化学療法剤を投与すれば一時的には DNA 損傷は形成されるが、細胞内では短時間で生成されるため、MGMT 発現細胞では TMZ やニトロソウレア製剤による恒久的な DNA 損傷は形成されない。しかし、一般的にグリオーマは正常細胞と比較して MGMT の発現量が低く、これには DNA メチル化という転写制御機構が関与している。

MGMT 遺伝子は、そのプロモーター領域中にシトシン (C) とグアニン (G) の繰り返し配列が数千塩基対に渡って長く続く領域がある。このような領域はあたかも DNA 中に島状に存在することから CpG island と呼ばれる。CpG island をもつ遺伝子は、その中の C がメチル化

されると転写（発現）が抑制されることが多く、MGMT も同様にプロモーターのメチル化により発現が制御される（このように、DNA 配列自体の異常でなく後天的な機序により発現が変化することを epigenetic な形質変化と呼ぶ）。MGMT は DNA アルキル化剤を無効にする酵素であるため、グリオーマにおける MGMT プロモーターのメチル化と薬剤反応性との間には関係があるのではないかということは容易に予想されるが、Hegi ら⁴⁾が TMZ を用いて治療した初発膠芽腫において、MGMT プロモーターメチル化のある症例では治療反応性が良好であることを報告して以来、MGMT は有力な化学療法耐性因子として注目されてきた。特に MGMT プロモーターメチル化は、メチル化配列特異的 PCR (methylation-specific PCR: MS-PCR) という方法で比較的容易に再現性の高い解析結果が得られるため、多くの研究グループによって悪性グリオーマにおける治療効果あるいは予後との関連性が解析された。多くの研究結果は Hegi らの報告を確認するものであったが、最近発表された臨床研究においては、MGMT プロモーターメチル化のある腫瘍は使用する化学療法剤の種類にかかわらず予後良好であり、また放射線治療に関しても同様に予後良好であるとの結果が得られた¹⁵⁾。すなわち DNA メチル化とは無関係な DNA 損傷型治療においても MGMT の発現が予後と関係することが示されたわけである。したがって、臨床的には MGMT プロモーターメチル化は、治療反応性を反映する因子 (predictive factor) というよりも、腫瘍そのものの性格に基づいた予後を反映した因子 (prognostic factor) であるとの考えが有力になりつつある。実際、悪性グリオーマにおいて MGMT の阻害薬と TMZ を併用した治療に関する臨床研究からは、MGMT の阻害は骨髄抑制のような正常細胞に対する毒性の増強が認められただけで腫瘍に対する治療効果の増強は認められなかったとの結果が得られている¹¹⁾。TMZ 抵抗性は MGMT 以外の多くの因子に基づいたものであり、悪性グリオーマの治療は MGMT の不活化のみでは成功しないことが強く示唆される。

グリオーマにおける分子標的治療

DNA アルキル化剤を中心とする化学療法剤は、悪性グリオーマの治療のうえで一定の役割は果たしてきたものの、TMZ が導入された現在でも化学療法による予後延長はせいぜい数カ月である。放射線療法と化学療法の併用では腫瘍を根治できないことは、脳以外の各臓器の悪性腫瘍においても問題であることが多く、DNA 損傷型の薬

物による治療効果には限界があることは解決不可能な課題ではないかとの考えが強くなった。こうした中で腫瘍細胞学の発達とともに注目されるようになったのが、いわゆる分子標的治療 (molecular target therapy) である。

悪性腫瘍細胞は正常細胞よりも速い増殖をするために、細胞内シグナル伝達系に異常をもっている。多くの場合、何らかの細胞成長因子 (cell growth factor) に基づく細胞分裂促進情報の亢進が認められており、自己分泌 (autocrine) または傍分泌 (paracrine; 近傍にある細胞から因子が分泌される) によって過剰な成長因子が作用する場合や、成長因子受容体 (receptor) に変異が生じて成長因子の結合なしに活性が自動亢進している場合がある。したがって、これまでに数々の細胞成長因子受容体に対して多くの分子標的薬の開発がなされてきた。細胞成長因子受容体の多くは細胞膜貫通型のチロシンキナーゼであるため、キナーゼ阻害能をもった薬物の開発に力が注がれてきたが、その一方では細胞成長因子そのものを中和する目的で開発された薬剤もあり、成長因子に対する抗体薬剤もその中に含まれる。分子標的薬の開発は白血病、肺癌、乳癌、大腸癌の治療において発達し、例えば慢性骨髄性白血病における bcr-abl (フィラデルフィア染色体上に配列される異常キナーゼ) や血小板由来成長因子受容体 (PDGFR) を阻害する imatinib や、肺癌における上皮成長因子受容体 (EGFR) 標的薬 gefitinib と erlotinib、乳癌における HER2 標的薬 trastuzumab、大腸癌における血管内皮由来成長因子 (VEGF) を標的とした bevacizumab が代表的なものである。

これらの分子標的薬が各種悪性腫瘍に対して一定の効果を示すことが明らかになると、次いで悪性グリオーマ治療への応用も検討された (Fig. 2)。その中で最初に注目されたのは EGFR である。EGFR は phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)-Akt 系の細胞内情報伝達系の調節に関与し、この経路は細胞保護的 (抗アポトーシス) 作用をもつため、EGFR のチロシンキナーゼとしての活性を阻害することが、グリオーマの治療法の開発につながるのではないかと考えられた。しかし EGFR 阻害剤 (gefitinib, erlotinib) の多施設共同臨床研究において、これらの分子標的薬は期待どおりの結果は示さず、有効症例は非常に限られたものであった¹²⁾¹³⁾。その中で腫瘍の遺伝子解析可能であった症例を抽出し、EGFR および Akt の負の制御因子である PTEN に関する解析を行ったところ、EGFRvIII (常時活性型の変異型) を発現し、かつ PTEN に変異を認めなかった症例が EGFR 阻害剤に対して良好な治療反応を示し、EGFR の増幅は治療効果と相関しないという結果が得られた⁹⁾。しかし、こうした

Fig. 2 Schematic illustration of target therapy against malignant gliomas. Kinase inhibitors are designed to inhibit membrane-bound growth factor receptor tyrosine kinases (gefinitib and erlotinib for EGFR, and imatinib for PDGFR). Bevacizumab (anti-VEGF monoclonal antibody) is designed to inhibit angiogenesis, which is associated with tumor progression.

特徴をもつグリオーマは少数であり、分子標的治療の難しさを浮き彫りにすることになった。また、EGFRとともに悪性グリオーマにおいて発現上昇することが知られているPDGFRに対する阻害剤imatinibについても臨床試験が行われたが有効性は認められなかった¹⁴⁾。

次いで注目を集めたのが、抗VEGF単クローン抗体であるbevacizumabである。これは悪性グリオーマにおいて血管新生(angiogenesis)を抑制することで抗腫瘍効果を図ろうという考えによるものであるが、悪性グリオーマ細胞自体には高いVEGFR発現はなく、あくまでも腫瘍に対する「兵糧攻め」のごとき考えによるものである。臨床試験の結果として、bevacizumabによる治療効果は画像検査上の造影剤増強域の縮小、脳浮腫の縮小といった効果、およびこれらに見合った臨床症状の改善というかたちで比較的早期に現れることが示された。ただし、bevacizumab治療の問題点も指摘され、腫瘍の再進行は避けられないこと、その際には腫瘍の浸潤域(T2高信号域)の拡大が著明であること、増強域の増大を示さずに臨床症状の悪化がみられることが示された⁸⁾。すなわち前述のとおり、bevacizumabの効果は腫瘍が細胞そのものに対する効果ではなく、腫瘍血管に伴う病態の一時的な改善にとどまることが示唆されたといえる。一方、実験的に

グリオーマ脳内移植モデルを用いた研究により、bevacizumabは腫瘍の浸潤を促進するという結果が示されており、その際にはmatrix metalloproteinaseなどの細胞外物質分解酵素の発現も上昇することが示されている。しかもbevacizumabの長期投与はかえって血管造成を促進するという実験データもあり²⁾、まだ解決すべき問題のある治療法と考えられる。一方、これまで標的とされてきた分子が主に細胞成長因子関係の蛋白であったのに対し、細胞内で腫瘍の生存や治療抵抗性にかかわっているAktキナーゼ⁶⁾を標的とする研究も行われており、分子標的治療は今後の発展が期待される分野である。

グリオーマにおける治療反応性マーカー

中枢神経系に限らず、各種の悪性腫瘍においてさまざまな治療反応性マーカーや予後判定マーカーの存在が示されるようになると、より重要性の高いマーカーの検索が求められるようになる。膨大な遺伝子の変異を検索する作業を通して、2008年にJohn Hopkins大学の研究グループから、グリオーマではイソクエン酸脱水酵素(isocitrate dehydrogenase, 以下IDHと略する)に変異を示す例が多いこと報告され、しかもこの変異が予後との

Fig. 3 Hypothetical pathway of gliomagenesis. Mutations in the *IDH1* gene proceed to genetic aberrations which characterize tumor types (p53 mutation and gain of chromosome 7q for astrocytomas, and 1p/19q loss for oligodendrogliomas). Most of the tumors with *IDH1* mutations progress to glioblastoma with better prognosis (secondary glioblastoma), whereas those tumors without *IDH1* mutations progress quickly to glioblastoma with an aggressive nature (primary or *de novo* glioblastoma).

相関を強くもつことが示された¹⁰⁾. IDH は解糖系で働く酵素であるが、細胞質内で働く IDH1 と、ミトコンドリア内でのクエン酸回路 (またはクレブス回路) で働く IDH2 がある. いずれもイソクエン酸からオキサロコハク酸を経て α -ケトグルタル酸を生成する過程で働く酵素であるが、特に IDH1 遺伝子の異常がグリオーマにおいて高率に発見された. 膠芽腫においては、IDH1 に変異をもつ腫瘍は変異をもたない腫瘍と比べて生命予後が良好であることも同時に発表されたが、この結果は諸研究グループにより確認され¹⁾¹⁶⁾, IDH1 変異の予後マーカーとしての意義はすでに確立しているといっても差し支えない. これまでに報告されたグリオーマにおける IDH1 変異についての知見をまとめると、①変異の hot spot (132 番目のアルギニン部位) がある、②星細胞腫でも乏突起膠腫でも高分化型 (low grade) 腫瘍で高率に変異がみられる、③一次的に発生する膠芽腫 (primary glioblastoma または *de novo* glioblastoma) においては変異がまれである、④化学療法や放射線治療に対する反応性との相関は不明である、といった点が挙げられる¹⁶⁾. また、IDH1 変異は、前述の MGMT プロモーターメチル化や、第 1 染色体 p 腕・第 19 染色体 q 腕の共欠失 (1p/19q loss) といった他の予後マーカーと重複する症例が多いものの、これら 3 つのマーカーは独立したものとして考えられている. MGMT が必ずしも化学療法感受性を規定する因子でないことはすでに述べたが、1p/19q loss も

染色体転座による異常であって、この異常が直接的に治療感受性を説明する生物学的根拠は示されていない. 同様に IDH1 変異も、なぜ悪性グリオーマにおける予後因子としての重要性をもつのかは説明されておらず、「グリオーマの中の予後が比較的良好な群を特徴づける因子」として考えられる. Low grade 腫瘍、およびこれから進行した腫瘍で高率に IDH1 変異が認められることから、IDH1 変異はアストロサイト系、オリゴデンドロサイト系に共通した腫瘍形成初期の異常と考えられており、前者における第 7 染色体 q 腕の DNA コピー数増加 (+7q) や後者における 1p/19q loss といった特徴的な異常⁵⁾がその後に続くものと考えられている. したがって現在では図のようなグリオーマの腫瘍発生・進行経路が提唱されている (Fig. 3). 近年の欧米でのグリオーマの臨床研究では、研究対象腫瘍を病理診断だけでなく MGMT プロモーターメチル化や 1p/19q loss の有無で腫瘍を分類することが多く、遺伝学的マーカーの意義が強調される結果になっている. 現時点では IDH1 変異は上述の各遺伝学的マーカーよりも重要な意義をもつことも示唆されている.

おわりに

近年の悪性グリオーマ治療に関する研究報告の中から、臨床上的の病態理解に有用と思われるものを紹介した.

未解決な点が多いこの分野の診療の発展, 進歩を期待するとともに, 読者の方々の理解の役に立てば幸いである。

文 献

- 1) Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von Deimling A: Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* **116**: 597-602, 2008.
- 2) de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, Piao Y, Eterovic K, Ji Y, Conrad CA: Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro Oncol* **12**: 233-242, 2010.
- 3) Gerson SL: MGMT: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* **4**: 296-307, 2004.
- 4) Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JEC, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross G, Janzer RC, Stupp R: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **352**: 997-1003, 2005.
- 5) Hirose Y, Aldape KD, Chang S, Lamborn K, Berger MS, Feuerstein BG: Grade II astrocytomas are subgrouped by chromosome aberrations. *Cancer Genet Cytogenet* **142**: 1-7, 2003.
- 6) Hirose Y, Katayama M, Mirzoeva OK, Berger MS, Pieper RO: Akt activation suppresses Chk2-mediated, methylating agent-induced G2 arrest and protects from temozolomide-induced mitotic catastrophe and cellular senescence. *Cancer Res* **65**: 4861-4869, 2005.
- 7) 廣瀬雄一, 佐野公俊: DNA メチル化剤 temozolomide の分子薬理学. *No Shinkei Geka* **35**: 117-129, 2007.
- 8) Lucio-Eterovic AK, Piao Y, de Groot JF: Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin Cancer Res* **15**: 4589-4599, 2009.
- 9) Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, Lu KV, Yoshimoto K, Huang JH, Chute DJ, Riggs BL, Horvath S, Liau LM, Cavenee WK, Rao PN, Beroukhi R, Peck TC, Lee JC, Sellers WR, Stokoe D, Prados M, Cloughesy TF, Sawyers CL, Mischel PS: Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* **353**: 2012-2024, 2005.
- 10) Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW: An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**: 1807-1812, 2008.
- 11) Quinn JA, Jiang SX, Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Rich JN, Gururangan S, Friedman AH, Bigner DD, Sampson JH, McLendon RE, Herndon JE 2nd, Walker A, Friedman HS: Phase II trial of temozolomide plus O⁶-benzylguanine in adults with recurrent, temozolomide-resistant malignant glioma. *J Clin Oncol* **27**: 1262-1267, 2009.
- 12) Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancy JE, McLendon RE, Kao JC, Stenzel TT, Ahmed Rasheed BK, Tourt-Uhlig SE, Herndon JE 2nd, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS: Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* **22**: 133-142, 2004.
- 13) van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, Kouwenhoven MC, Kros JM, Carpentier AF, Clement PM, Frenay M, Campone M, Baurain JF, Armand JP, Taphoorn MJ, Tosoni A, Kletzl H, Klughammer B, Lacombe D, Gorlia T: Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol* **27**: 1268-1274, 2009.
- 14) Wen PY, Yung WK, Lamborn KR, Dahia PL, Wang Y, Peng B, Abrey LE, Raizer J, Cloughesy TF, Fink K, Gilbert M, Chang S, Junck L, Schiff D, Lieberman F, Fine HA, Mehta M, Robins HI, DeAngelis LM, Groves MD, Puduvalli VK, Levin V, Conrad C, Maher EA, Aldape K, Hayes M, Letvak L, Egorin MJ, Capdeville R, Kaplan R, Murgo AJ, Stiles C, Prados MD: Phase I / II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08. *Clin Cancer Res* **12**: 4899-4907, 2006.
- 15) Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppen S, Ketter R, Meyer-mann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M: NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* **27**: 5874-5880, 2009.
- 16) Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD: IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**: 765-773, 2009.

要 旨

悪性グリオーマの集学的治療に向けての生物学

廣瀬 雄一

近年の医療技術の著しい進歩にもかかわらず、悪性グリオーマの治療には多くの課題が残されている。浸潤性に発育するグリオーマを切除術によって根治することは困難であり、今後期待されるのは放射線治療や薬物治療であるが、特に後者に関しては分子標的薬の導入が関心をもたれており、海外で各種の臨床導入試験が行われている。一方、遺伝学的解析の発達により予後良好な症例を選択できることが知られるようになり、悪性グリオーマに対する補助療法にも個別化が図られる可能性も挙げられている。本稿では近年の臨床研究に基づくものも含めて悪性グリオーマの細胞生物学についての知見を紹介し、今後の治療を展望する。

脳外誌 19 : 880-886, 2010