

Ribavirin の悪性神経膠腫細胞株に対する抗腫瘍効果と、
Temozolomide および Interferon-beta との併用についての
検討（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

落合 祐之

修了年 2016 年

指導教員 吉野 篤緒

背景：膠芽腫 (glioblastoma) は、全脳腫瘍の 10.8%を占め、成人における中枢神経系原発性腫瘍の中で、最も多く発生する腫瘍である¹。Glioblastoma の治療には手術、放射線治療、化学療法を組み合わせた集学的治療が行われている。2005 年に Stupp らが初発 glioblastoma を対象に、放射線治療単独群と放射線治療に第二世代のアルキル化剤である temozolomide (TMZ) を併用した群との第Ⅲ相無作為比較試験を報告した。その結果は、放射線治療に TMZ を併用した群の生存期間中央値は 14.6 ヶ月であり、放射線単独治療群の 12.1 ヶ月と比較して、有意な生存期間の延長が示された²。以来、glioblastoma では、外科的切除に加えて TMZ 併用放射線療法が世界的な標準治療として行なわれている。TMZ は DNA のグアニンの O⁶ 位にメチル基を付加し、O⁶-メチル化グアニンを形成する。メチル化グアニンは DNA 複製時にシトシンではなくチミンと塩基対を形成し、DNA 障害を引き起こされ抗腫瘍効果を発揮すると言われている³。また、O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) は TMZ により付加されたメチル基を除去し、遺伝子を修復する酵素であり、TMZ の効果を減弱する⁴。MGMT が発現している glioblastoma は TMZ に耐性を示し、その割合は 45 ~ 75%であるとの報告もある⁴⁻⁷。現在、TMZ 耐性の glioblastoma に対する治療が生存期間延長に対する大きな課題となっている。Interferon-beta (IFN-β) は type I IFNs に分類され、抗ウイルス作用をもつサイトカインとして発見された。その後、免疫賦活作用、血管新生抑制作用、増殖抑制やアポトーシスの誘導による抗腫瘍作用など様々な生物学的活性が示されてきた⁸。近年、glioblastoma の治療において、IFN-βを TMZ と併用することにより、抗腫瘍効果が増強するという報告がなされている。その機序としては IFN-βが p53 を介して MGMT の発現を減弱させると考えられている⁹。本邦において、TMZ と IFN-β の併用療法による臨床効果を評価する多施設共同第 I 相試験である a multicenter phase

I trial of interferon-beta and temozolomide combination therapy for high-grade gliomas (INTEGRA Study) が行われた。同試験では、生存期間の中央値が 17.1 ヶ月、1 年の無増悪率は 50%と良好であり、現在第 II 相無作為比較試験が進行中である¹⁰。

Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) は、核酸アナログであり、RNA および DNA ウィルス感染症に対する抗ウィルス薬として、1972 年に Sidwell らが初めて報告した¹¹。現在、Ribavirin は Interferon-alpha2a との併用投与により、慢性 C 型肝炎に対する標準治療薬となっている¹²。この Ribavirin が乳癌や急性骨髄性白血病において inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) や the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) を阻害し、抗腫瘍効果を示すという報告が散見されている¹³⁻¹⁵。また、ごく最近当教室からも悪性神経膠腫細胞株に対して Ribavirin が抗腫瘍効果を認めることを報告した¹⁶。しかし、その作用機序は明らかではない。そこで、本研究では Ribavirin の悪性神経膠腫細胞株に対する抗腫瘍効果の作用機序を検討し、さらに TMZ と IFN-β と Ribavirin を併用することで、抗腫瘍効果が増強されるかを検討した。

方法：Ribavirin の悪性神経膠腫細胞株に対する抗腫瘍効果について検討した。7 種類の悪性神経膠腫細胞株 (A-172、AM-38、T98G、U-87 MG、U-138MG、U-251MG、YH-13) を使用し、Ribavirin の増殖抑制試験を行った。次に、2 種類の悪性神経膠腫細胞株 (U-87MG、U-138MG) を使用し、Ribavirin の悪性神経膠腫細胞株に対する抗腫瘍効果の作用機序を検討した。はじめに、Flow cytometry にて Ribavirin によるアポトーシス、細胞周期への影響を解析した。さらに、ウエスタンブロット法にて Ribavirin による p53 と phosphorylated p53 のタンパク発現の変化及び、p53 pathway の下流シグナルのタンパク発現の変化を観察した。p53 を活性化する因子の一つとして DNA

double-strand breaks (DSBs) があり、DSBs によりリン酸化 H2AX (γ H2AX) が誘導されると言われている^{17,18}。そこで、蛍光抗体法を用いて Ribavirin による γ H2AX の誘導を観察した。また、DSBs は Ataxia telangiectasia mutated (ATM) により感知され、自己リン酸化を引き起こすと考えられている¹⁹。そこで、ウエスタンブロット法にて Ribavirin による ATM 及び phosphorylated ATM のタンパク発現の変化を観察した。次に、TMZ + IFN- β + Ribavirin の 3 剤併用により治療効果が増強されるかを検討した。7 種類の悪性神経膠腫細胞株 (A-172、AM-38、T98G、U-87MG、U-138-MG、U-251MG、YH-13) を使用し、Ribavirin 単剤と TMZ + IFN- β + Ribavirin の 3 剤併用との増殖抑制効果の比較を行った。また、現在の標準治療薬である TMZ 単剤、INTEGRA study で注目されている TMZ + IFN- β の 2 剤併用及び Ribavirin + TMZ + IFN- β との細胞増殖抑制効果の比較を行った。そして、3 剤併用の治療効果が相乗効果であるかの評価を 2 種類の悪性神経膠腫細胞株 (A-172、U-251MG) を使用し、Chou Talalay method を用いて Combination Index (CI) を算出し行った。

結果 : Ribavirin は 7 種類の悪性神経膠腫細胞株に対し、濃度依存的に細胞増殖抑制効果を認めた。Flow cytometry による解析からは、Ribavirin の投与によりアポトーシスが誘導され、細胞周期にて G0/G1 への cell cycle arrest を誘導することが確認された。また、ウエスタンブロット法による解析にて phosphorylated p53 のタンパク発現の増強を認め、p53 の活性化が確認された。p53 の下流シグナルである p21、Bax、Fas-R、caspase-8、caspase-9、caspase-3 のタンパク発現の増強も認めた。さらに、蛍光抗体法による観察では Ribavirin 投与により γ H2AX のドット状の集積が観察された。そして、ウエスタンブロット法による解析にて ATM 及び phosphorylated ATM のタンパク発現の増強を認めた。Ribavirin 単剤と Ribavirin + TMZ + IFN- β の 3 剤併用との増殖抑制効

果の比較においては、YH-13 を除く 6 種類の悪性神経膠腫細胞株で 3 剤併用することにより増殖抑制効果の増強を認めた。TMZ 単剤、TMZ + IFN- β 及び TMZ + IFN- β + Ribavirin による増殖抑制効果の比較では、T98G、U-87MG、U-138MG、YH-13 の 4 種類の細胞株において、TMZ + IFN- β + Ribavirin の 3 剤併用投与群が、TMZ 単剤投与群と TMZ + IFN- β の 2 剤併用投与群と比較して有意に細胞増殖抑制効果が増強した。また A-172、AM-38、U-251MG の 3 種類では TMZ + IFN- β + Ribavirin の 3 剤併用投与群が TMZ 単剤投与群と比較して有意に細胞増殖抑制効果が増強し、TMZ + IFN- β の 2 剤併用投与群との比較でも、細胞増殖抑制効果が増強する傾向がみられた。Chou Talalay method による CI の算出では A-172 においては 0.68 (CI<1)、U-251MG においては 0.98 (CI<1) であり、3 剤併用での抗腫瘍効果は相乗効果であった。

結論： Ribavirin は悪性神経膠腫細胞株に対し抗腫瘍効果を示した。その機序は、Ribavirin 投与により DSBs を引き起こされ、ATM が自己リン酸化により活性化し、p53 を活性化する。活性化された p53 は p21 を活性化し cell cycle arrest を誘導し、また Bax、caspase-9 を活性化し内因性アポトーシス及び Fas R、caspase-8 を活性化し外因アポトーシスを誘導する。また、Ribavirin を TMZ、IFN- β と併用することで悪性神経膠腫細胞株に対する抗腫瘍効果の相乗効果が得られることが示された。

参考文献

1. Committee of Brain tumor Registry of Japan. Report of brain tumor registry of Japan. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2014;43:9-102.
2. Stupp R, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-96.
3. Fukushima T, et al. Anti-glioma therapy with temozolomide and status of the DNA-repair gene MGMT. *Anticancer Res* 2009;29:4845-54.
4. Hegi ME, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:997-1003.
5. Bello MJ, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene MGMT: association with TP53 G:C to A:T transitions in a series of 469 nervous system tumors. *Mutat Res* 2004;554:23-32.
6. Kamiryo T, et al. Correlation between promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene and prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy. *Neurosurgery* 2004;54:349-57; discussion 57.
7. Nakamura M, et al. Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* 2001;22:1715-9.
8. Yoshino A, et al. Therapeutic implications of interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 in diffusely infiltrating astrocytomas (DIA): response to interferon (IFN)-beta in glioblastoma cells and prognostic value for DIA. *J Neurooncol* 2005;74:249-60.
9. Natsume A, et al. A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61:653-9.
10. Wakabayashi T, et al. A multicenter phase I trial of combination therapy with interferon-beta and temozolomide for high-grade gliomas (INTEGRA study): the final report. *J Neurooncol* 2011;104:573-7.
11. Sidwell RW, et al. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science* 1972;177:705-6.

12. Kohli A, et al. Treatment of hepatitis C: a systematic review. *JAMA* 2014;312:631-40.
13. Kentsis A, et al. Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:18105-10.
14. Borden KL, Culjkovic-Kraljacic B. Ribavirin as an anti-cancer therapy: acute myeloid leukemia and beyond? *Leuk Lymphoma* 2010;51:1805-15.
15. Assouline S, et al. Molecular targeting of the oncogene eIF4E in acute myeloid leukemia (AML): a proof-of-principle clinical trial with ribavirin. *Blood* 2009;114:257-60.
16. Ogino A, et al. Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines. *Oncol Lett* 2014;8:2469-74.
17. Yoshida K, Miki Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci* 2010;101:831-5.
18. Lobrich M, et al. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* 2010;9:662-9.
19. Durocher D, Jackson SP. DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:225-31.