

悪性神経膠腫細胞株に対する
抗てんかん薬の抗腫瘍効果の検討
(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

八木 千裕

修了年 2022 年

指導教員 吉野 篤緒

要約

悪性神経膠腫は成人に最も多く発生する原発性脳腫瘍であり、強い増殖能と浸潤能を有する。最も悪性度が高い膠芽腫は、外科的手術による最大限の腫瘍切除および temozolomide による化学療法と放射線療法の標準治療に加え、その他の補助療法を組み合わせた集学的な治療にも関わらず、約 70%は 1 年以内に再発を認め、生存期間中央値は 14.6 カ月、5 年生存率は 5%未満と非常に予後不良である(1)。世界中で新たな治療法を模索する研究が行われているが、未だ革新的な治療法は発見されておらず、予後不良な膠芽腫に対する有効な治療法の確立が望まれる。

膠芽腫細胞は興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を過剰分泌し、グルタミン酸受容体のシグナル活性化を促して痙攣を助長すると同時に、腫瘍の増大や浸潤を促進する(2)。膠芽腫症例で初発症状がてんかん発作である割合は 14%と報告されており(3)、診断時にてんかん発作を認めなくても経過中に 40%～60%が発作をきたす(4)。腫瘍の治療と共にてんかん発作のコントロールは重要であり、臨床では抗てんかん薬を内服している患者は多い。抗てんかん作用に加えて抗腫瘍効果を有する抗てんかん薬を併用できれば治療に非常に有益である。

抗腫瘍効果が報告されている抗てんかん薬は、sodium valproate、levetiracetam、carbamazepine、talampanel および perampanel がある。Sodium valproate は histone deacetylase (HDAC) 阻害作用があり、ヒストンのアセチル化を亢進させて様々な増殖抑制遺伝子やアポトーシス関連遺伝子の転写や発現を促進することで抗腫瘍作用を担う(5)。また、細胞周期や増殖・分化、アポトーシスを調整する glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) の阻害作用を有しており、グリオーマ細胞から産生される GSK3 β を阻害して細胞増殖抑制、temozolomide 感受性の亢進、放射線感受性の亢進、浸潤抑制を示す(6)。Levetiracetam はアポトーシス経路を活性化することにより temozolomide 耐性の原因である O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の発現を抑制し、temozolomide の感受性を高めることが報告され

ている(7)。また内因性抗酸化作用を増強することで、放射線化学療法による正常脳のダメージを軽減させる神経保護効果がある(8)。Carbamazepine は sodium valproate と同じく HDAC 阻害作用による抗腫瘍効果が報告されている(9)。Talampanel は初発膠芽腫に対する第II相臨床試験で、術後放射線化学療法を受けた群と比較して talampanel を加えた群では、全生存期間が 14.6 か月から 20.3 か月に延長した(10)。Perampanel は膠芽腫細胞株に対する細胞増殖抑制効果が報告されているが、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導ではなくグルコース取り込み低下による細胞代謝の低下によるとの報告もあれば(11)、アポトーシスが起こったとの報告もあり(12)、一定の見解は得られていない。また、perampanel による悪性神経膠腫株に対する抗腫瘍効果で細胞の遊走能や浸潤能について評価した報告はない。

膠芽腫は高い細胞浸潤能を示し、正常組織との境界が不明瞭であるため、手術において組織学的レベルでの全切除は不可能である。また原発部位とは異なる部位に腫瘍が出現することも多いが、画像上で連続性がなくても、顕微鏡レベルでは神経線維に沿って腫瘍細胞の進展を認める(13, 14)。膠芽腫が予後不良である原因は、高い増殖能と高い浸潤能にあり、浸潤能を抑えることは、膠芽腫の治療を考えるうえで重要である。

膠芽腫の遊走や浸潤には、膠芽腫細胞に発現した Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を介した phosphatidylinositol 3-kinase / Akt (PI3K / Akt) 経路や(13, 14)、膜貫通受容体の $\beta 1$ integrin を起点とする focal adhesion kinase (FAK) / Src 経路などが関与している(15)。これらの細胞内シグナル経路の活性化は、細胞骨格の制御に関与する Rac1、RhoA、Cdc42 の活性を上昇させ、細胞形態が変化して運動性が亢進する(16)。また、膠芽腫細胞の遊走や浸潤には上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) プロセスも重要である。EMT 関連分子には E-cadherin、N-cadherin などが存在する(17, 18)。E-cadherin は上皮系マーカーとして知られており、発現が上昇すると細胞間接着性が高まり、細胞の運動性は低下する。一方、N-cadherin は間葉系マーカーの1つで、発現の上昇により、細胞間結合が減弱して細胞が分離しやすくなり、運動性を亢進させる。EMT は FAK / Src や PI3K / Akt などのシグナル経路によって誘導される。さらに膠芽腫細胞は間葉系形態をとり遊走するにあたり、matrix metalloproteinases

(MMPs) を分泌して extracellular matrix (ECM) を破壊し、移動のための通路を作り出す(16)。しかし、遊走能や浸潤能には様々な細胞内シグナル経路が関与しており、明確な機序を解明するには至っていない。

悪性神経膠腫による症候性てんかんに対して、臨床では様々な抗てんかん薬が使用されている。抗てんかん薬における抗腫瘍効果の報告はあるが、どの抗てんかん薬が発作抑制および抗腫瘍効果の点で最も優れた治療選択肢となるのかは未だにわかっていない。悪性神経膠腫が有する高い細胞増殖能と浸潤能は、治療抵抗性と予後不良に起因しているため、細胞増殖や遊走・浸潤の抑制効果が高い抗てんかん薬を採用することは治療に有益となると考えた。そのため、本研究では、臨床でよく使用される作用機序の異なる4種類の抗てんかん薬 perampanel、sodium valproate、levetiracetam、carbamazepine を選択し、それらの治療域血中濃度で悪性神経膠腫細胞を処理した後に細胞増殖能、遊走能、浸潤能の変化を比較検討した。さらに、temozolomide 併用時の抗腫瘍効果を検討することで、どの抗てんかん薬が抗腫瘍効果的に最も優位なのかの検証を行った。

抗てんかん薬の処理濃度は、てんかん診療ガイドライン 2018 に記載された治療域血中濃度 (perampanel: 0.14~1.14 μM 、sodium valproate: 300~600 μM 、levetiracetam: 70~270 μM 、carbamazepine: 17~50 μM) を指標とした(19)。

悪性神経膠腫細胞株に対する抗てんかん薬の抗腫瘍効果を評価するために、6種類の悪性神経膠腫細胞株 (A-172、AM-38、T98G、U-138MG、U-251MG、YH-13) を用いて perampanel: 0、0.01、0.1、1、10 μM 、sodium valproate: 0、1、10、100、1000 μM 、levetiracetam: 0、1、10、100、1000 μM 、carbamazepine: 0、0.5、5、50、500 μM で処理を行い、72 時間培養後に細胞数を計測した ($n = 4$)。Perampanel は治療域血中濃度において6種類全ての悪性神経膠腫細胞株で細胞増殖抑制を認めた。Sodium valproate は AM-38、T98G、U-251MG、YH-13 の4種類の細胞株、levetiracetam では T98G と YH-13 の2種類の細胞株、carbamazepine では T98G、U-138MG、U-251MG の3種類の細胞株で治療域血中濃度における細胞増殖抑制を認めた。以上から細胞増殖抑制効果では perampanel が最も優れていると考えられた。

細胞増殖抑制実験において各種抗てんかん薬の治療域血中濃度で効果を認めやすく、また perampanel を用いた抗腫瘍効果を調査した実験(20)でも使用された T98G と U-251MG を選択し、temozolomide 併用による細胞増殖抑制実験、細胞遊走試験、細胞増殖試験を行った。

Temozolomide 併用時の抗てんかん薬の抗腫瘍効果を評価するために細胞増殖抑制実験を行った。Temozolomide 10 μ M と perampanel: 0, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M, sodium valproate: 0, 1, 10, 100, 1000 μ M, levetiracetam: 0, 1, 10, 100, 1000 μ M, carbamazepine: 0, 0.5, 5, 50, 500 μ M で処理を行い、72 時間培養後に細胞数を計測した (n=4)。Perampanel は T98G で 1 μ M から、U-251MG で 0.1 μ M から temozolomide 併用により細胞増殖抑制効果が増強された。Levetiracetam は T98G において 10 μ M で細胞増殖抑制の増強がみられたが、U-251MG では増強効果は認めなかった。U-251MG では MGMT を発現していないが、T98G は MGMT 発現を有する temozolomide 耐性の細胞株である(21)。Levetiracetam は MGMT 発現を抑制し、temozolomide の感受性を亢進させる作用がある(7)。また、perampanel は temozolomide との相乗効果を認める報告もあり(12)、本研究は、それらの報告と矛盾しない結果であった。

抗てんかん薬処理による悪性神経膠腫細胞株に対する遊走能と浸潤能の変化を検討するために transwell assay を行った。無血清培地で調整した細胞と抗てんかん薬を upper chamber に加え、lower chamber には 10%血清培地を入れて 24 時間培養した。各薬剤の処理濃度は、治療域血中濃度の最大値である perampanel 1 μ M、sodium valproate 600 μ M、levetiracetam 270 μ M、carbamazepine 50 μ M とした。24 時間培養後に upper chamber の底面に移動した細胞を染色し、560 nm で吸光度測定した (n = 5)。細胞遊走試験では、perampanel は T98G および U-251MG において遊走能を有意に抑制したが、sodium valproate、levetiracetam、carbamazepine では遊走能は抑制されなかった。細胞浸潤試験では、すべての抗てんかん薬で有意な浸潤能の抑制は認めなかったが、perampanel は sodium valproate、levetiracetam、carbamazepine と比較して、より浸潤能を抑制する傾向が強かった。

細胞遊走試験で有意な抑制を認め、細胞浸潤試験でも他の抗てんかん薬より抑制傾向

を認めた perampanel に注目し、遊走能や浸潤能に影響する細胞内シグナル経路や EMT に関連する因子の mRNA の発現量の変化を real-time qRT-PCR で評価した。Perampanel 1 μ M 処理 4 時間後の T98G および U-251MG の total RNA を解析した。 *β 1 integrin* の発現量はバラつきが大きく、有意な発現の変化は認めなかった。その下流の経路である *FAK/ Src* や *PI3K/ Akt* では、T98G では *Src* の発現低下、U-251MG では *PI3K* の発現低下を認めた。さらに下流の因子である細胞骨格の再構築に関与する *Rac1*、*RhoA* は両細胞株で発現が低下していたが、*Cdc42* は両細胞株で発現に変化はなかった。EMT 関連分子では、両細胞株で上皮系マーカーである *E-cadherin* の発現が上昇し、間葉系マーカーである *N-cadherin* の発現が低下していた。ECM の分解酵素である *MMP-2* の発現も低下していた。

以上より、悪性神経膠腫細胞株に対して perampanel 処理を行うと、細胞骨格の再構築に影響する *Rac1* や *RhoA* の発現が低下して細胞形態の変化が起こりにくくなる。また *E-cadherin* の発現上昇と *N-cadherin* の発現低下により EMT が抑制され、細胞間の接着性が強固となり、細胞の運動性が低下して遊走能が抑制されたと考えられた。また *MMP-2* の発現低下により ECM 分解作用が減弱して浸潤能が抑制された可能性がある。

また、perampanel による抗腫瘍効果を検討した先行研究では T98G と U-138MG を用いた pre-liminary な RNA-seq による網羅的な mRNA 発現解析が行われた(20)。Perampanel 処理による変動上位 5 遺伝子の 1 つであった腫瘍の遊走や浸潤を促進する *AarF domain containing kinase 5 (ADCK5)*、神経膠腫の遊走を制御する *Lysophosphatidylserines* を産生する *abhydrolase domain containing 16A (ABHD16A)* の mRNA 発現も評価した。本研究では、T98G および U-251MG において perampanel により *ADCK5*、*ABHD16A* の発現は低下した。Perampanel によるこれらの遺伝子への影響がどのような経路で起こるのかは不明であり、その解明が望まれる。

悪性神経膠腫細胞株において、4 種類の抗てんかん薬 perampanel、sodium valproate、levetiracetam、carbamazepine のなかで、perampanel は細胞増殖抑制効果だけでなく、temozolomide 併用時の細胞増殖抑制効果の増強、細胞遊走能の抑制といった抗腫瘍効果を持

つことが明らかになった。悪性神経膠腫に対する治療において、perampanel は他の抗てんかん薬よりも抗腫瘍効果の点で有益に働く可能性が示唆された。

引用文献

1. Delgado-López PD, Corrales-García EM. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. *Clin Transl Oncol*. 2016 Nov;18(11):1062-1071.
2. Lefranc F, Le Rhun E, Kiss R, Weller M. Glioblastoma quo vadis: Will migration and invasiveness reemerge as therapeutic targets? *Cancer Treat Rev*. 2018 Jul;68:145-154.
3. Brain Tumor Registry of Japan (2005-2008). *Neurologia medico-chirurgica*. 2017;57(Suppl 1):9-102.
4. Knudsen-Baas KM, Engeland A, Gilhus NE, Storstein AM, Owe JF. Does the choice of antiepileptic drug affect survival in glioblastoma patients? *J Neurooncol*. 2016 Sep;129(3):461-469.
5. Nakada M. Drug repositioning in Neuro-Oncology. *Progress in Neuro-Oncology*. 2017;23(3):1-8.
6. Chikano Y, Domoto T, Furuta T, Sabit H, Kitano-Tamura A, Pyko IV, Takino T, Sai Y, Hayashi Y, Sato H, Miyamoto K, Nakada M, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3 β sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1, and c-Jun N-terminal kinase-mediated pathway. *Mol Cancer Ther*. 2015 Feb;14(2):564-74.
7. Scicchitano BM, Sorrentino S, Proietti G, Lama G, Dobrowolny G, Catizone A, et al. Levetiracetam enhances the temozolomide effect on glioblastoma stem cell proliferation and apoptosis. *Cancer Cell Int*. 2018;18:136.
8. Ueda Y, Doi T, Takaki M, Nagatomo K, Nakajima A, Willmore LJ. Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: in vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy. *Brain Res*. 2009 Apr 17;1266:1-7.
9. Beutler AS, Li S, Nicol R, Walsh MJ. Carbamazepine is an inhibitor of histone deacetylases. *Life Sci*. 2005 May 13;76(26):3107-15.
10. Grossman SA, Ye X, Chamberlain M, Mikkelsen T, Batchelor T, Desideri S, et al. Talampanel with

- standard radiation and temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma: a multicenter phase II trial. *J Clin Oncol.* 2009;27(25):4155-61.
11. Lange F, Wesslau K, Porath K, Hornschemeyer J, Bergner C, Krause BJ, et al. AMPA receptor antagonist perampanel affects glioblastoma cell growth and glutamate release in vitro. *PLoS One.* 2019;14(2):e0211644.
 12. Salmaggi A, Corno C, Maschio M, Donzelli S, D'Urso A, Perego P, Ciusani E. Synergistic Effect of Perampanel and Temozolomide in Human Glioma Cell Lines. *J Pers Med.* 2021 May 10;11(5):390.
 13. Corsi L, Mescola A, Alessandrini A. Glutamate Receptors and Glioblastoma Multiforme: An Old "Route" for New Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 11;20(7):1796.
 14. Vollmann-Zwerenz A, Leidgens V, Feliciello G, Klein CA, Hau P. Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 12;21(6):1932.
 15. Piao Y, Lu L, de Groot J. AMPA receptors promote perivascular glioma invasion via beta1 integrin-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Neuro Oncol.* 2009 Jun;11(3):260-73.
 16. Zhong J, Paul A, Kellie SJ, O'Neill GM. Mesenchymal migration as a therapeutic target in glioblastoma. *J Oncol.* 2010
 17. Zhu X, Hu B, Hu M, Qian D, Wang B. Human cytomegalovirus infection enhances invasiveness and migration of glioblastoma cells by epithelial-to-mesenchymal transition. *Int J Clin Exp Pathol.* 2020 Oct 1;13(10):2637-2647.
 18. Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, Corazzari M, Caldarola S, Valacca C, Faienza F, Esposito V, Limatola C, Cecconi F, Di Bartolomeo S. Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol.* 2015 Oct;9(8):1612-25.
 19. 日本神経学会. てんかん診療ガイドライン 2018. 医学書院
 20. 龍岡樹里. 悪性神経膠腫細胞株に対する perampanel の抗腫瘍効果の検討. 学位論文. 日本大学. 2021

21. Yoshino A, Ogino A, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Watanabe T, Katayama Y, Okamoto Y, Naruse N, Sano E, Tsumoto K. Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. *Int J Oncol.* 2010 Jun;36(6):1367-77.