

悪性脳腫瘍における O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase  
(MGMT) の発現と ACNU 耐性の相関, 及び antisense RNA 療法  
による ACNU 耐性克服の試み

永根 基 雄

①

悪性脳腫瘍における *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の発現と ACNU 耐性の相関, 及び antisense RNA 療法による ACNU 耐性克服の試み

永 根 基 雄

## 目次

	頁
I. はじめに	1
II. 材料・方法	3
1. 細胞及び脳腫瘍組織標本	3
2. 脳腫瘍初代培養細胞の樹立	4
3. MGMT cDNAの合成	4
4. Northern blot法によるMGMT mRNA発現量の解析	4
5. Colony形成能によるACNU耐性試験	4
6. Southern blot法によるgenome DNAの解析	5
7. ACNU耐性株の樹立	5
8. MGMT antisense RNA発現vectorの構築及び遺伝子導入	5
9. <i>in vitro</i> MGMT antisense RNA療法	5
III. 結果	7
1. 脳腫瘍におけるMGMT mRNA発現	7
2. MGMT mRNA発現とACNU耐性の相関	7
3. MGMT mRNA発現とgenetic alterationの関連	10
4. MGMT mRNA発現誘導	10
5. MGMT antisense RNA発現vectorによるACNU耐性の克服	11
1) ZnSO <sub>4</sub> によるMGMT antisense RNAの発現誘導	11
2) MGMT antisense RNA発現によるACNU感受性の変化	12
IV. 考察	16
1. MGMT mRNA発現とACNU耐性の相関	16
2. MGMT mRNA発現の調節と誘導	18
3. MGMT antisense RNAによるACNU耐性克服の試み	19
V. 結語	20
参考文献	21
謝辞	26



## 1. はじめに

神経膠腫(glioma)を中心とする悪性脳腫瘍は近年のめざましい医療進歩にも拘わらず依然治療困難な疾患で、最も悪性度の高い多形性膠芽腫(glioblastoma multiforme)では、1年生存率が45%、5年生存率では僅かに8%に過ぎない<sup>1</sup>。神経膠腫は正常に機能している周囲の脳組織内へ浸潤しながら増殖する性格のため、他臓器癌のような広範切除による腫瘍全摘出という治療切除術が行い難い。そのため、通常の術後には腫瘍細胞は残存し、悪性星細胞腫(malignant astrocytoma)や膠芽腫などの増殖速度の速い悪性神経膠腫では確実に再発をきたしてくる。そこで残存腫瘍細胞の死滅、或いは増殖力の減少を目的とした術後補助療法が必要となってくる。Jelsmaらの報告によると、膠芽腫に対して広範切除術に加え術後放射線治療を併用すると、手術単独療法に比べ6ヶ月生存率及び1年生存率の改善はみられるが、2年生存率では殆ど差がなくなってしまう<sup>2</sup>。一方Walkerらは、放射線単独照射よりニトロソウレア系抗癌剤(chloroethylnitrosourea: CENU)の一つである1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU)を併用した方が中間生存値が延長すると報告している<sup>3</sup>。したがって悪性神経膠腫に対しては、術後の放射線照射のみならず、化学療法を併用した集学的治療が重要となってくる。

現在、悪性神経膠腫に対する化学療法の第一選択剤はCENUsであり、わが国では主として水溶性の1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU)が使用されている<sup>4</sup>。CENUは中枢神経系に存在する血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)の透過性が高く、BBBが比較的保たれている腫瘍辺縁部のviable cellsへの到達性にも優れている。またcell cycle-nonspecificに作用するため、悪性神経膠腫の70%を占めるとされる非増殖相の腫瘍細胞に対しても効果が望める利点がある。更にACNUは放射線感受性の最大となるG<sub>2</sub>M期に腫瘍細胞を集積させる作用もあり、放射線増感効果も期待できる<sup>5</sup>。しかしながら、このような利点を有するACNUを中心とした化学療法を併用しても、実際にはCT上の腫瘍消失率は僅かに5%前後、有効率でも半数にも満たない40%前後、中間生存値として50週前後の治療成績しか得られていないのが現状であり、臨床で、ACNU無効の症例が過半数を占めていると考えられる<sup>6</sup>。また、初期治療の際は良好な反応が見られていても、維持療法でACNUを反復投与する間に再発をきたし、ACNU感受性を失う場合も多く認められる。ACNUはBBB透過性が高く腫瘍への到達性には優れていることから、このような無効例、再発時無効例では腫瘍細胞・組織におけるACNU耐性機構(自然耐性及び獲得耐性)の存在が重要な問題となってくる。

ACNUをはじめとするCENUは、bifunctionalなアルキル化作用によって抗腫瘍効果を發揮する。即ち、先ずCENU分子中のchloroethyl基が、腫瘍細胞核DNA分子中のguanine塩基内にあるO<sup>6</sup>部位に主として結合し、O<sup>6</sup>-alkylguanineを形成する。このO<sup>6</sup>-alkylguanineは、DNA複製の際、guanineに相補的なcytosineではなく、しばしばthymineとmismatchの水素結合をし、C→T transitionをきたすことでDNAにmutationが生じる。しかし、CENUの殺細胞作用としてより重要な反応は、O<sup>6</sup>-alkylguanineが相補的なDNA鎖のcytosineと不可逆的なDNA interstrand-crosslinkを形成する反応で、その結果腫瘍細胞はDNA複製ができなくなり最終的に細胞死に至ると考えられる<sup>7,8</sup>(Fig. 1)。

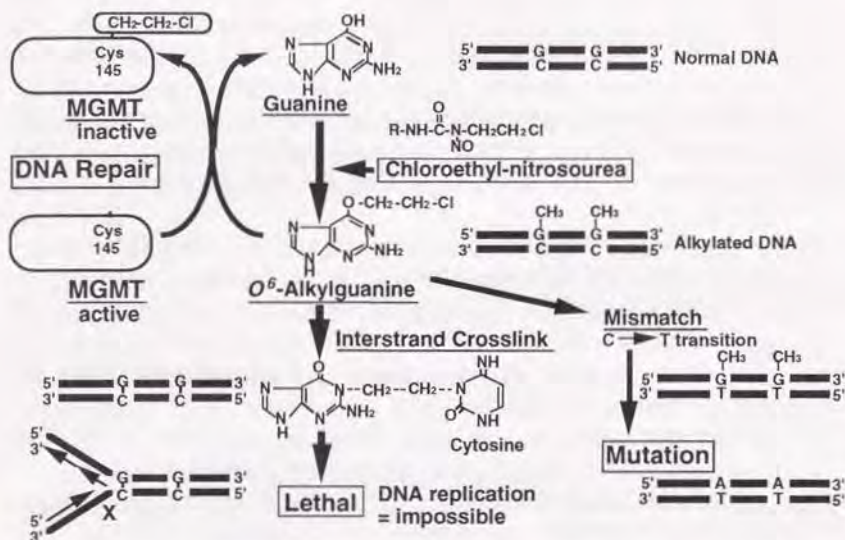


Fig. 1 Mechanisms of guanine alkylation by nitrosoureas leading to DNA-interstrand crosslinks and its repair by *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT).

ところが、細胞にはCENUにより障害を受けたDNAを、正常のDNAに修復してしまう特異なDNA修復酵素が存在することが明らかとなってきた<sup>9,11</sup>。この酵素は *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)と呼ばれ、*O*<sup>6</sup>-alkylguanineの*O*<sup>6</sup>部位に結合するアルキル基を選択的に除去することでDNAを修復し、自らのもつ受容基である codon 145のcysteine残基に除去したアルキル基を不可逆的に受け取り、自身は失活してしまう自殺酵素である<sup>12,13</sup>(Fig. 1)。各臓器癌由来の細胞株において、MGMT活性がACNU耐性と良く相関することがTsujimuraらにより報告され、MGMTがACNU耐性の主因となることが示唆された<sup>14</sup>。このような細胞株の中には、Mer<sup>+</sup>と称されるMGMT活性を欠如する株が20~30%程度存在する<sup>15,16</sup>。MGMT活性は、各臓器間或いは腫瘍細胞間、また各個人の多様性がみられ、Chenらは、各臓器別癌でMGMT活性の平均値を比較すると、悪性神経腫では相対的に低値を示したが、一部には高値を呈した標本や逆にMer<sup>+</sup>の標本も存在したと報告している<sup>17</sup>。悪性神経腫では、他臓器癌と比べACNU感受性を示す腫瘍が多いことが示唆されるが、やはり個々の症例での検討が必要となる。



このような観点より、MGMT活性値をACNU投与以前に測定することは、化学療法を治療・検討する上で有意義な情報になると考えられる。ところが、MGMT活性の測定方法としては、これまでHを含むメチル化DNAを使用する煩雑な方法がとられてきた。しかもこの方法では大量の腫瘍組織・細胞が必要とされるため一般化されにくい面があった<sup>18</sup>。近年、Tanoらによりhuman MGMTのcDNA構造が解明されたことより、mRNAレベルでのMGMT発現量の解析が可能となった<sup>19</sup>。そこで我々は、human glioma細胞株と悪性脳腫瘍摘出標本を用い、より簡便なNorthern blot法によりMGMT mRNA発現量を測定し、それをもとにACNU耐性を測定できる方法を検討した。その結果、MGMT mRNAの発現量はcolony形成能試験で得られた各腫瘍細胞のACNU耐性とよく相関することが示された<sup>20,21</sup>。

MGMTの発現がみられる場合に、ACNU以外の薬剤を選択して術後化学療法を施行する方法は合理的ではあるが、先に記したような悪性脳腫瘍に対する利点を有しているCENUが投与できないことは治療上大いに不利な点となる。加えて3分の2以上の腫瘍は何らかの程度でMer<sup>r</sup>を呈することから<sup>15,17</sup>、MGMT活性を抑制しACNU耐性を克服することは治療成績の向上を図るためにも極めて重要な課題となってくる。

MGMT酵素活性を低下させる方法としては、この酵素のもつ自殺酵素という特殊性に注目した方法、即ちstreptozotocin等DNAにO<sup>6</sup>-alkylguanineを形成する物質、或いはO<sup>6</sup>-benzylguanine等MGMTの基質となる物質を、CENU治療に先立ち前投薬することでMGMTを枯渇させる方法が試みられてきた。しかしこの方法では、MGMTが新たに産生されてくるため、MGMT活性が一過性にしか低下しない点が問題となる<sup>22-27</sup>。そこで我々は、ACNUでMGMTを枯渇させた後、MGMT蛋白の発現を抑制する方法に注目した。蛋白はmRNAがribosomeで翻訳されて合成されてくる。或るmRNAに特異的な相補的配列を持つantisense RNA(或いはoligonucleotide)が存在すれば、本来のmRNAとの間で水素結合により2本鎖が形成され、そのためmRNA上のribosomeの進行が止められ翻訳反応が阻害される<sup>28-32</sup>。そこで今回、MGMT mRNAに特異的なantisense RNA発現vectorを構築し、MGMT mRNAの翻訳を阻害し、MGMT蛋白質合成を抑制するMGMT antisense RNA療法によって、MGMT mRNAの発現亢進が主因と考えられるACNU耐性の克服ができるか否かを検討した。

## II. 材料・方法

### 1. 細胞及び脳腫瘍組織標本

human glioma細胞株として、U-87MG, U-138MG, U-251MG, U-343MG, U-373MG, SF-126, SF-188の7種、rat glioma細胞株としてC6, C6AR (C6-ACNU耐性株), 9L, 9LAR (9L-ACNU耐性株)の4種、mouse glioma細胞株の203GLを使用した。これらの細胞は、10% fetal bovine serum (FBS), glutamine 300μg/ml, 0.14% NaHCO<sub>3</sub>, streptomycin 60μg/mlを加えたEagle's minimal essential medium (MEM)で37℃, 95%空気, 5% CO<sub>2</sub>, 湿度100%の条件下で安定して継代されている。脳腫瘍組織標本は、原発性悪性脳腫瘍として、glioblastoma (Gbl): 同一再発例を含み10例, anaplastic astrocytoma (AAst): 同一再発例を含み9例, astrocytoma (Ast): 1例, oligodendroglioma (Olg): 4例, ependymoma (Epd): 2例,

medulloblastoma (Mdl): 3 例, ganglioglioma (Ggl): 2 例, olfactory neuroblastoma (Nbl): 2 例, primary malignant lymphoma (ML): 1 例の計34例。転移性脳腫瘍として, lung cancer (Lc): 8 例, colon cancer (Col): 3 例, lacrimal gland carcinoma (LG): 2 例, malignant melanoma (Mln): 1 例, osteosarcoma頭蓋内転移・浸潤 (OS): 1 例, Hand-Schüller-Christian病硬膜転移 (HSC): 1 例の計16例。良性脳腫瘍は, meningioma (Mng): 3 例, neurinoma (Nrn): 2 例, pituitary adenoma (PA): 1 例の計6 例。また大型深在性腫瘍摘出に際し, 腫瘍への到達のため手術中に切除された正常脳 (Brain): 2 例。全体として計58例の標本を使用した。これらの標本は手術で摘出後, 直ちに液体窒素により凍結し, 使用直前まで-70℃で保存した。

## 2. 脳腫瘍初代培養細胞の樹立

上記脳腫瘍組織56例のうち, 12例から初代培養細胞を樹立した。腫瘍組織は手術摘出後2時間以内に1mm<sup>3</sup>角以下の小片となるようにミンチングした後, 酵素カクテル (0.05% pronase, 0.02% collagenase II, 0.02% DNase) にて単細胞に分離し, 10% FBS加培地 (MEM) 下で継代培養した。

## 3. MGMT cDNAの合成

Tano等が報告したMGMT cDNA配列に従い, 以下のprimer setを用いてreverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR)法にて266bpのMGMT cDNAを合成した<sup>10</sup>。即ち, sense primer: 5'-GGAATTCACCATCCCGTTTCCAGCAAG-3'及びantisense primer: 5'-GGAATTCATGGGCCAGAAAGCCATTCCTT-3'を使用し, codon 85から172までの領域をPCRで増幅した。精製されたPCR産物をphagemid vector pTZ18Rにsubcloningし, competent cell: JM109内で増幅した後, 目的の266bpのDNA断片を精製した。Northern blot解析或いはSouthern blot解析に際しては, このMGMT cDNAをOligolabeling Kit<sup>®</sup> (Pharmacia)にて[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (sp. act. 2000 Ci/mmol) でラベルし使用した。

## 4. Northern blot法によるMGMT mRNA発現量の解析

各種培養細胞からは, 約1 x 10<sup>7</sup>個のsubconfluentな状態の細胞から, vanadyl-ribonucleoside-complex (VRC)法を使用しtotal RNAを調製した。また, 約1gの腫瘍組織標本からはacid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC)法によりtotal RNAを調製した。次いでoligo-dT cellulose columnを用いてpoly (A)<sup>+</sup> RNAを選別し, 1% agarose-formaldehyde gel上で電気泳動後, nylon membrane (Hybond N<sup>®</sup>)にtransferした。<sup>32</sup>Pで標識した266bpの合成MGMT cDNA probeを用い, Church & Gilbertの方法に準じ, 65℃, 15~20時間5% formamideを含むbufferでhybridizationし, washing bufferで65℃, 10分間washした後, 高感度X線film及び増感紙を使用し-70℃にてautoradiographyを施行した<sup>33</sup>。

## 5. Colony形成能によるACNU耐性試験

各種glioma培養細胞株及び手術標本から樹立した初代培養細胞に対してcolony形成能によるACNU耐性試験を施行した。対数増殖期にある各種培養細胞を適当個 (200~2000



個) 60 mmシャーレに撒き、24時間後に各種濃度のACNUで1時間治療した後、ACNUを含まない培地に戻し1～3週間培養した。50細胞以上のcolonyを数え、未治療の対照群との比でsurvival fractionを算定した。また、1 log killをもたらしACNU濃度をSD<sub>10</sub>値として算出した。

#### 6. Southern blot法によるgenome DNAの解析

human glioma細胞株の内、MGMT発現陽性株2種(SF-188, U-138MG)と発現陰性株3種(SF-126, U-87MG, U-251MG)から genomic DNAを調製した。各々約 $1 \times 10^7$ 個のsubconfluentな状態の細胞からproteinase K処理、RNase処理、phenol抽出、及びethanol沈殿にてDNAを抽出した。20 $\mu$ gの各DNAをEcoRIにて消化後0.9% agarose gel上で電気泳動し、nylon filter (Hybond N)にtransferした。Northern blot解析と同じprobeを用いてChurch法で65°C、15～20時間、10% formamideを含むbufferでhybridizationし、Southern blot解析を行なった。

#### 7. ACNU耐性株の樹立

ACNU耐性株を樹立する目的で、ACNU感受性の形質を持つrat glioma細胞株のC6及び9Lに対して、sublethalな濃度(5 $\mu$ M)のACNUを継代毎に投与し、且つACNU濃度を徐々に高めて培養した。最終的にはACNU 50 $\mu$ Mでも生存可能であり、ACNUを含まない培地で安定してACNU耐性の形質を保つ変異株、C6AR及び9LARを樹立した。

#### 8. MGMT antisense RNA発現vectorの構築及び遺伝子導入

rat MGMT mRNAの開始codonを含む前後計59bの塩基配列に相当する一本鎖DNA、及びそれに相補な配列を持つ59bの1本鎖DNAを化学的に合成し、それらをannealさせ2本鎖の断片とした。各DNA鎖の5'及び3'末端にはvectorとligationする際の制限酵素site (BamHI)を付け加えた。外部からZn<sup>2+</sup>等の金属イオンで発現を誘導することができるhuman metallothionein promoterとSV40のpoly A付加シグナルを持ち、薬剤耐性マーカーであるneomycin遺伝子を組み込んだ発現vector (pSVneoHMT-ter)のcloning site (BamHI)に、2本鎖にした合成DNA断片をantisense方向とsense方向にそれぞれligationし、MGMT antisense並びにsense RNA発現vector (pSVneoHMT-ter-MGMT-ASと-S)を構築した(Fig. 2)。この発現vectorを、rat glioma細胞株のC6株のACNU耐性変異株で、MGMTを高発現しているC6AR細胞に遺伝子導入し、G418 (neomycin)にてvectorを含むcloneを選択した。

#### 9. *in vitro* MGMT antisense RNA療法

MGMT antisense RNA発現vectorを導入したC6AR/AS株、controlとしてsense RNA発現vector (このRNAのコードする部位はMGMT活性を持たない)を導入したC6AR/S株に対して、以下のprotocolによるcolony形成能試験でACNU感受性を検討した。

発現誘導に使用するZn<sup>2+</sup>は、高濃度では細胞傷害性があるため、細胞が安定して増殖しうる濃度の100 $\mu$ Mを使用した。細胞のplate outと同時にZn<sup>2+</sup>を投与し、以降24時間目、48時間目にmedium change及び新たにZn<sup>2+</sup>を100 $\mu$ M投与することでMGMT antisense RNAの



発現を誘導し維持した。各種濃度でのACNU治療はplate outの24時間後から次の24時間持続的に行った。また、細胞内に元来存在するMGMT活性を低下させる目的で、低濃度(10 $\mu$ M)のACNUをday 0に投与するACNU前治療を行った。

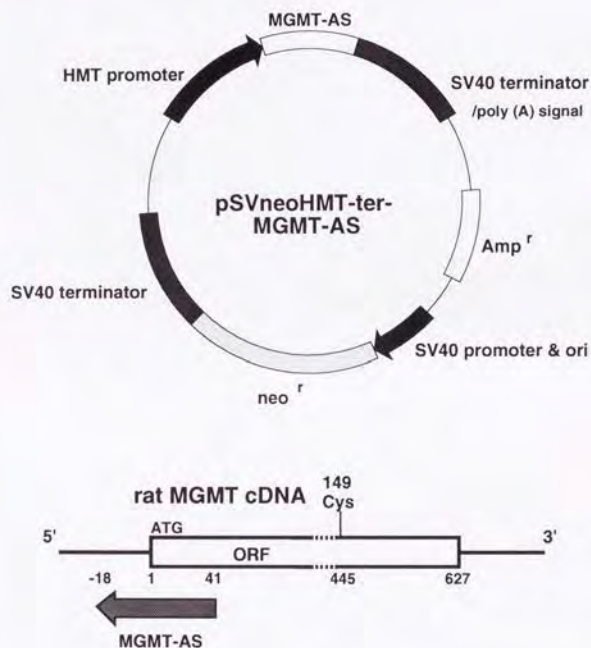


Fig. 2 Construction of the rat MGMT antisense mRNA expression vector, pSVneoHMT-ter-MGMT-AS.

### III. 結果

#### 1. 脳腫瘍におけるMGMT mRNA発現

Northern blot解析の結果, human glioma細胞株ではSF-188で0.95 kbのサイズにMGMT mRNAの著明な発現が認められた. また, U-138MGでも強い発現がみられた. 一方, 他の5種の細胞株では明らかなMGMTの発現は検出できなかった(Fig. 3). 脳腫瘍組織標本では, 約80%の腫瘍でMGMTの発現が認められ, 細胞株に比べMGMT発現率が高い傾向を示した. この点はWiestlerらの報告と一致する傾向であり, 腫瘍組織内のheterogeneityや, 悪性細胞の株化継代培養の際にMGMT発現が失われた可能性が考えられる<sup>34</sup>. 組織別にみると, 症例数は少ないがlow grade astrocytomaやoligodendrogliomaではMGMT mRNAの発現が低く, malignant gliomaでは中等度に発現がみられる傾向にあった. また, colon cancer, lung cancer等からの転移性脳腫瘍や, neurinoma, meningioma等の良性脳腫瘍ではMGMT mRNAが高発現の症例が多くみられた(Fig. 4). しかし, 個々の組織で発現量は異なり, interindividual variationが存在すると考えられる. 同一症例再発例は2例しかなく, 内1例はその間にACNUを投与していたが, とともに再発後にMGMT mRNA発現増加はみられなかった.

#### 2. MGMT mRNA発現とACNU耐性の相関

各種glioma細胞株及び初代培養細胞を用いてACNUに対するcolony形成能試験を施行した結果,  $SD_{10}$ 値が $50\mu\text{M}$ 以上の耐性群と $40\mu\text{M}$ 以下の感受性群に大別された. 更に耐性群のなかで $SD_{10}$ 値が $80\mu\text{M}$ 以上の強耐性を示す群が認められた(Fig. 5 a, b).

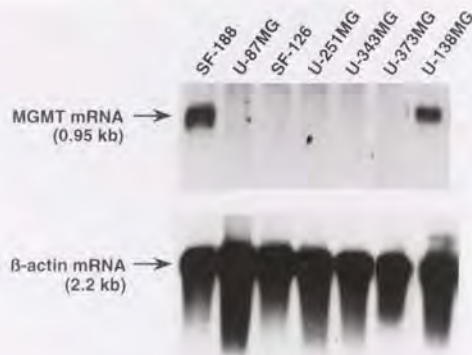


Fig. 3 Expression of MGMT mRNA in 7 human glioma cell lines. Comparable RNA loading was confirmed using human  $\beta$ -actin probe in all cell lines.



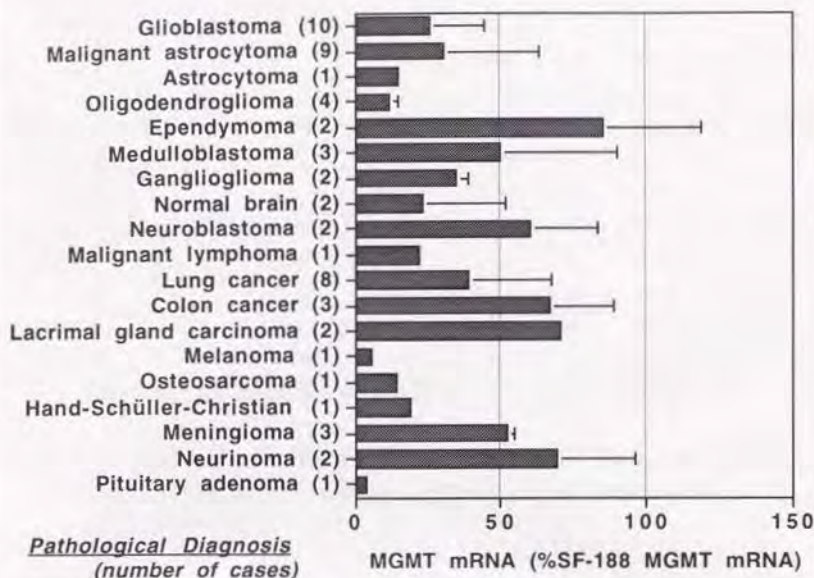


Fig. 4 MGMT mRNA expression in brain tumors in comparison with that of SF-188 cells. Horizontal bars indicate standard deviation of the mean for each tumor.

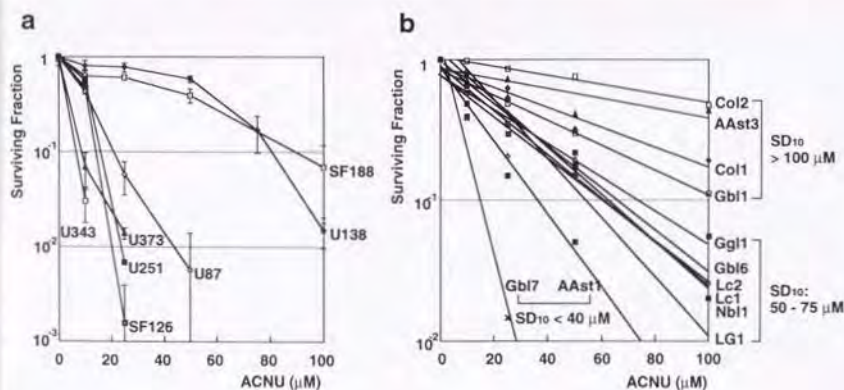


Fig. 5 Colony forming efficiency assay with ACNU treatment. a) Seven human glioma cell lines. Horizontal bars are standard deviations for three independent experiments. b) Primary culture cells from 12 malignant brain tumors.

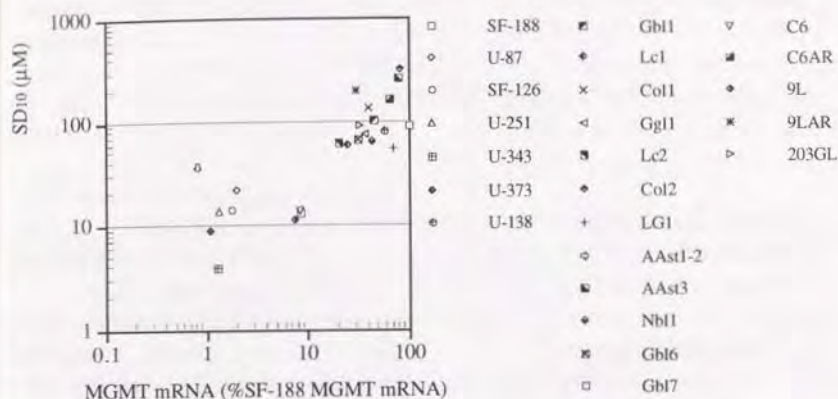


Fig. 6 Correlation between MGMT mRNA expression and lethal sensitivity to ACNU in 7 human and 5 murine glioma cell lines, and primary culture cells derived from 12 malignant brain tumors.

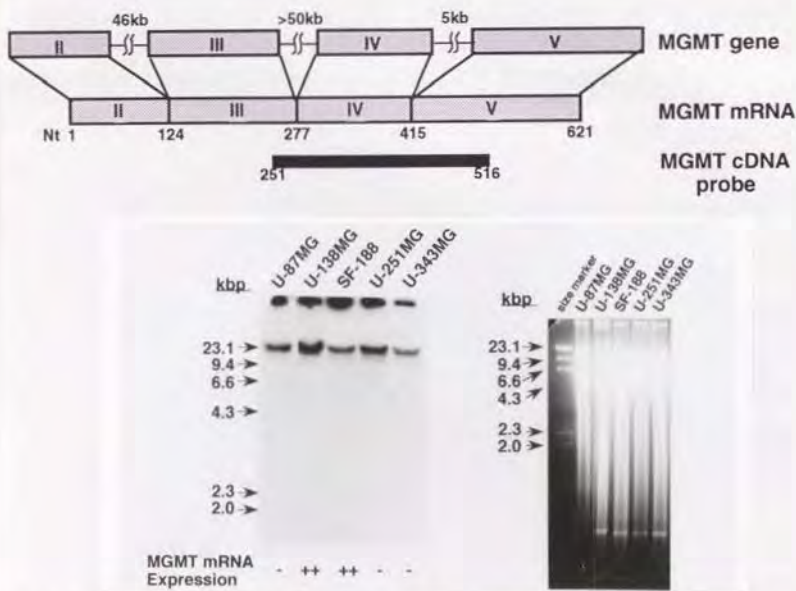


Fig. 7 Southern blot analysis for MGMT gene in 5 human glioma cell lines using 266bp human MGMT cDNA probe. Genomic DNAs were digested with *EcoRI*.



MGMT mRNA発現量と腫瘍細胞のACNU感受性との関連性を検討するため、横軸にMGMT mRNA発現量(対SF-188株MGMT mRNA量)、縦軸に $SD_{10}$ 値をプロットした(Fig. 6)。この図より、両者の間には正の相関関係が認められ( $r=0.825$ ,  $p<0.0001$ , Pearson相関分析)、MGMT mRNAの発現量は、MGMT活性と同様に細胞のACNU耐性を反映すると考えられた。

### 3. MGMT mRNA発現とgenetic alterationの関連

以上のような細胞間或いは組織間におけるMGMT mRNA発現量の違いが、遺伝子上の変化によるものかを検討するため、human glioma細胞株を用いてSouthern blot解析を行った。その結果、MGMT mRNAを発現しているU-138MG株では軽度増幅がみられた他は、いずれの細胞株でもほぼ同等の23kbpのシグナルが検出された(Fig. 7)。また、MGMT遺伝子のpromoter領域の1kbp DNA断片をprobeとして用いたhybridizationでは各細胞間に差は認められなかった(data not shown)。即ち、MGMT mRNA発現が認められない株でも、調べた領域内でMGMT geneの欠失・転位は認められず、また最も発現の強いSF-188でも顕著な遺伝子増幅は認められなかった。故にMGMT mRNA発現は主として転写或いは転写後に制御されている可能性が示唆された。

### 4. MGMT mRNA発現誘導

sublethal doseのACNUを持続投与して樹立したrat gliomaのACNU耐性株、C6AR及び9LARでは、MGMT mRNAの発現が親株のC6、9Lと比べ定常的に亢進しており、ACNU耐性の獲得にMGMTの発現が関与していることが示唆された(Fig. 8)。

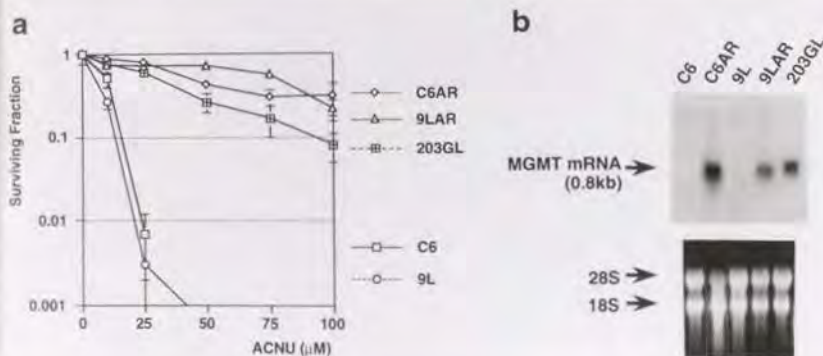


Fig. 8 Induction of MGMT mRNA in rat glioma cell lines after acquisition of ACNU resistance. a) Colony forming efficiency assay with ACNU treatment in rat glioma cell lines. b) MGMT mRNA expression. Ethidium bromide staining shows comparable RNA loading in all cell lines.

## 5. MGMT antisense RNA発現vectorによるACNU耐性の克服

### 1) $\text{ZnSO}_4$ によるMGMT antisense RNAの発現誘導

細胞外より投与する $\text{Zn}^{2+}$ によりMGMT antisense RNA発現が実際に誘導されることを確認するため、各transfectant cloneに $\text{Zn}^{2+}$ を150~160 $\mu\text{M}$ 投与し、 $\text{Zn}^{2+}$ 投与前と投与後6時間でmRNAを抽出し、Northern blot法にて目的のMGMT antisense RNAの発現誘導を比較した(Fig. 9)。殆どのcloneで $\text{Zn}^{2+}$ 投与前の状態では発現はみられなかったが、 $\text{Zn}^{2+}$ 投与後には多数のcloneで約0.4kb (poly A tailを含む長さ)の目的のMGMT antisense RNAの発現が誘導された。また、MGMT sense RNA発現vectorを導入したclone (S2)では、同じサイズのMGMT sense RNAが誘導された(Fig. 9)。

これらのcloneの内、antisense RNAの発現誘導が著明にみられたAS28株を使用し、各種濃度の $\text{Zn}^{2+}$ を投与し、6時間後のMGMT antisense RNAの発現を比較した(Fig. 10a)。 $\text{Zn}^{2+}$  100 $\mu\text{M}$ で発現の誘導が認められ、 $\text{Zn}^{2+}$ の濃度が高くなるとともに発現量は多くなり、 $\text{Zn}^{2+}$ 濃度に対する正の濃度依存性が認められた。一方、内因性のMGMT mRNAの発現量は $\text{Zn}^{2+}$ 濃度により変化しなかった。

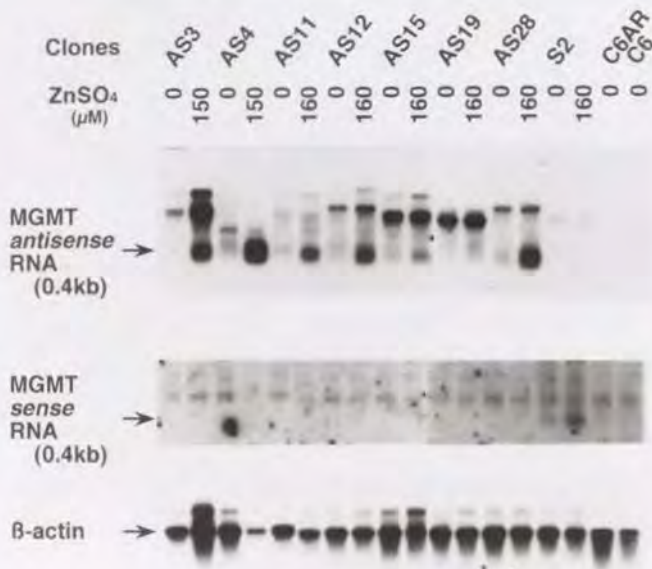


Fig. 9 Induction of MGMT antisense RNA expression by  $\text{ZnSO}_4$  in C6AR cells transfected with pSVneoHMTter-MGMT-AS.



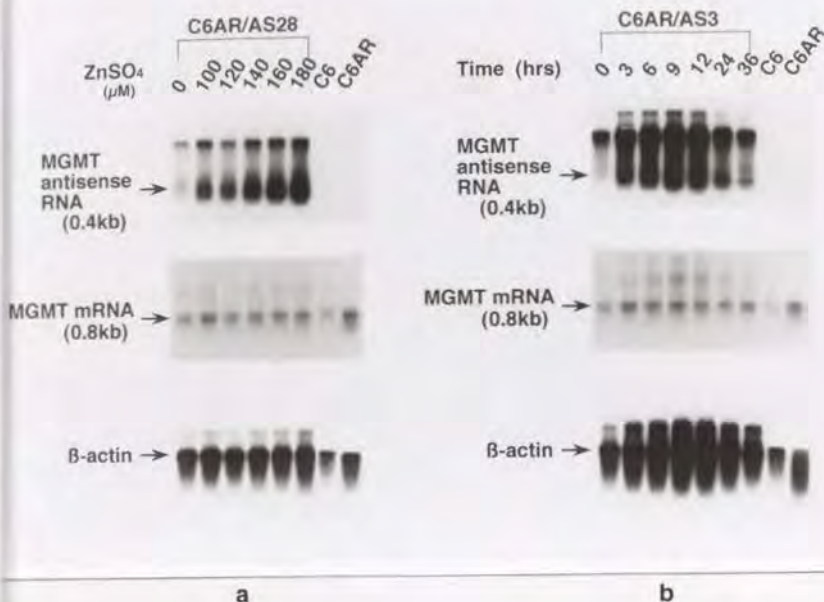


Fig. 10 ZnSO<sub>4</sub>-dependent expression of MGMT antisense RNA in C6AR/AS28 cells.

Expression of MGMT antisense RNA after treatment with ZnSO<sub>4</sub> 150μM in the C6AR/AS3 cells.

同様に発現誘導がみられたAS3株でZn<sup>2+</sup> 150μMを投与後、経時的にMGMT antisense RNAの発現量を検討すると、投与3時間後には発現が誘導され、12時間後に最大となり、以降24時間後、更に36時間後には徐々に減少した(Fig. 10b)。従って、Zn<sup>2+</sup>による antisense RNAの発現誘導は時間依存性であることが判明した。

## 2) MGMT antisense RNA発現によるACNU感受性の変化

方法に記したprotocolによるcolony形成能試験により、本療法の効果を検討した。

まず、Zn<sup>2+</sup>を投与しないACNUの単独治療では、親株(C6AR)、antisense株(AS4, AS28)及びsense株(S2, S6)ともに、ACNUの耐性はほぼ同程度であり、transfectionによる影響は無視することができるものと考えられた。発現誘導しない状態でMGMT antisense RNAの弱い発現がみられるAS4株では、ACNU耐性度は軽度低下した(Fig. 11a)。各株をACNU 10μMで前処理後、ACNU治療した場合は、ACNU単独治療群と耐性度はほぼ同様で、10μMのACNUの前処理では耐性改善効果は認められなかった(Fig. 11b)。

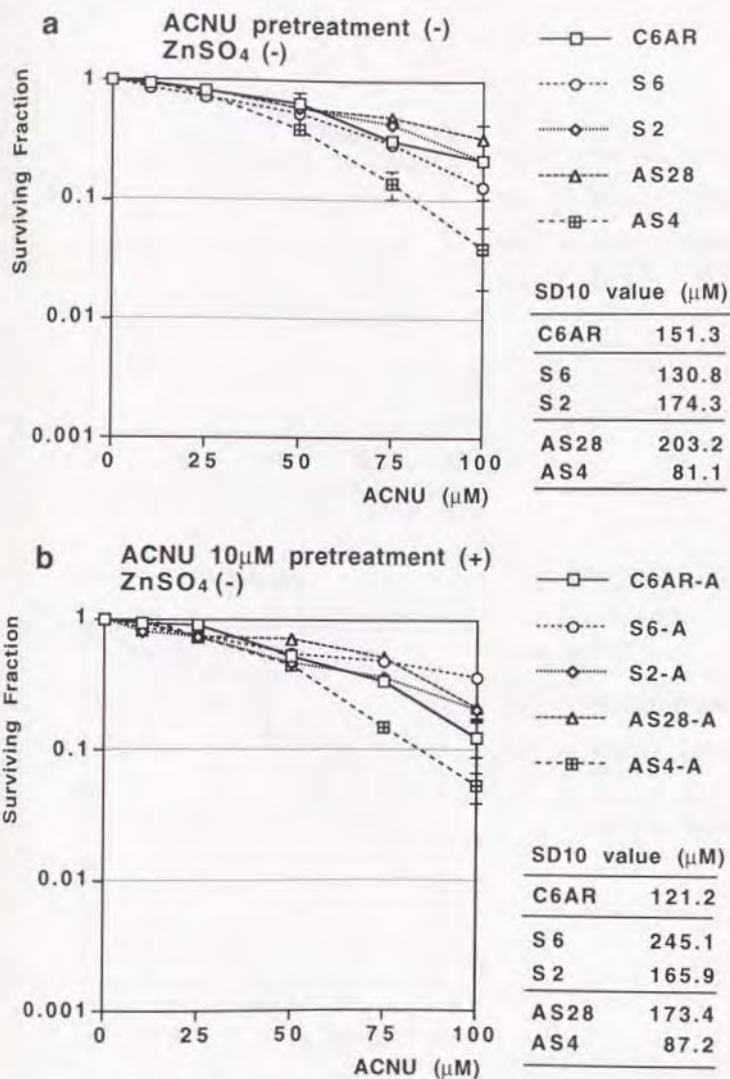


Fig. 11 Colony forming efficiency assay with ACNU treatment in C6AR and its transfectants, C6AR/Sense- (S2, S6) and C6AR/Antisense (AS4, AS28) cells. SD<sub>10</sub> values of each clone are shown below. a) Without, or b) with ACNU pretreatment. Vertical bars indicate standard deviation.

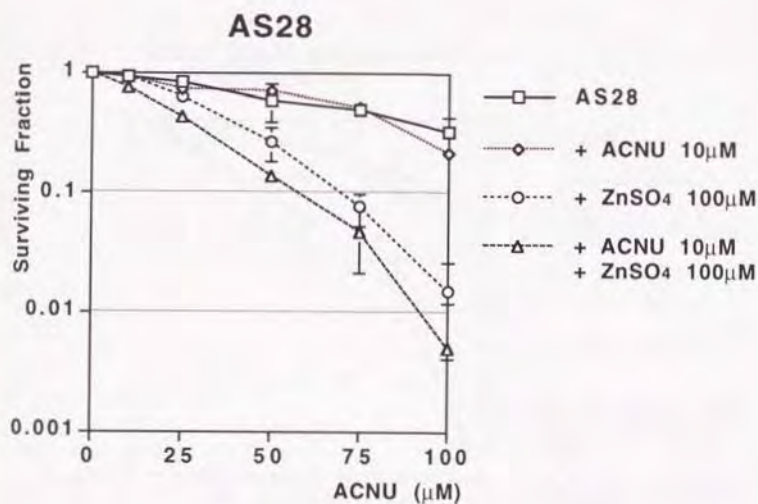
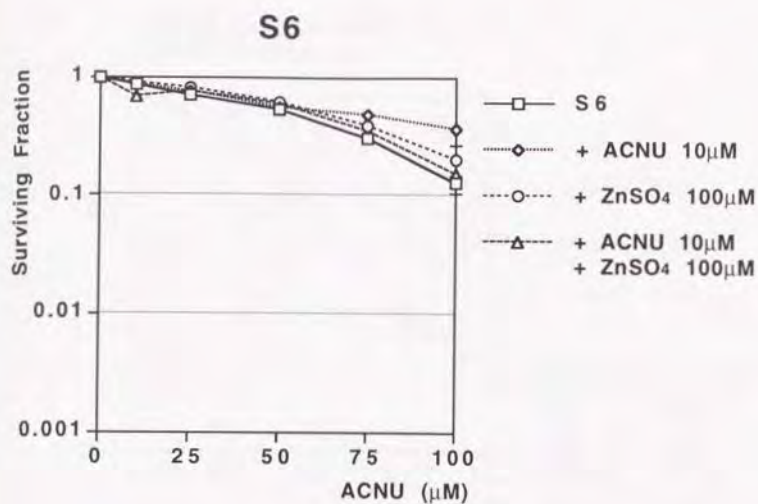


Fig. 12 Colony forming efficiency assay with ACNU treatment in C6AR/Sense- (S6) and C6AR/Antisense (AS28) MGMT transfectants.



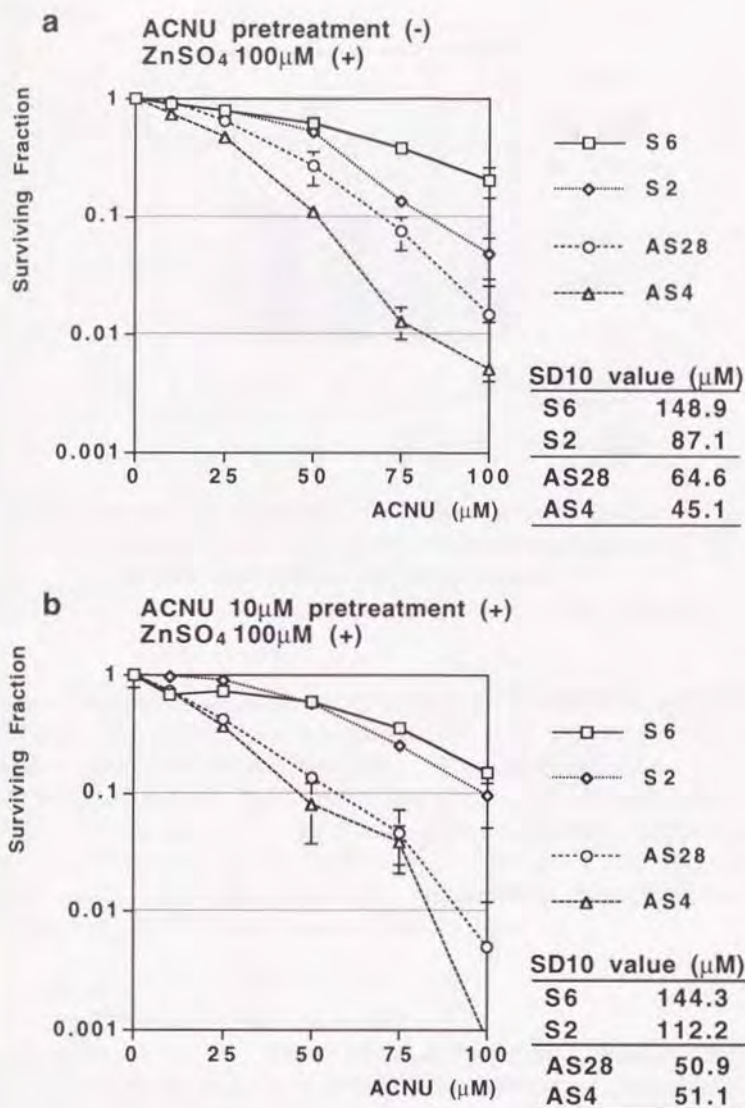


Fig. 13 Colony forming efficiency assay with ACNU treatment in C6AR/S and C6AR/AS cells after induction of MGMT antisense RNA. a) Without, or b) with ACNU pretreatment.

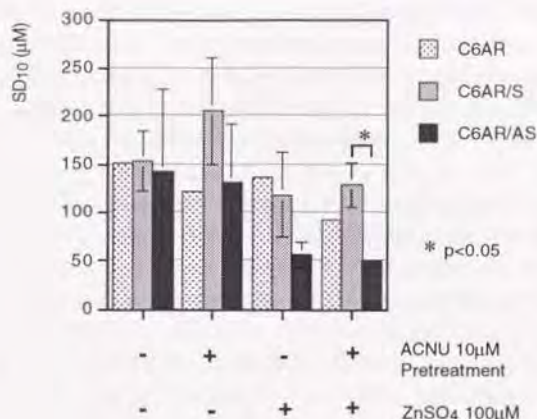


Fig. 14 Comparison of  $SD_{10}$  values for ACNU resistance in C6AR, C6AR/S (S2, S6), and C6AR/AS (AS4, AS28) cells with or without ACNU pretreatment and  $ZnSO_4$ . Vertical bars indicate standard deviation of the mean for each group.

sense株(S6)とantisense株(AS28)において、未処理或いは各種処理後のACNU耐性をそれぞれ比較すると、S6株ではいずれも強度耐性を示したが、AS28株では、 $Zn^{2+}$ により antisense RNAを発現誘導すると耐性が減弱し、更にACNU前処理を加えると、より感受性の増強がみられた(Fig. 12)。この結果をsense株群(S2, S6)とantisense株群(AS28, AS4)で比較すると、Fig. 13a, bの如く、 $Zn^{2+}$ でantisense RNAの発現を誘導しただけの場合でも、各antisense株の方がsense株に比べACNU感受性となる傾向がみられた。更にACNU前処理を加えると、ACNU感受性の差は増強し、antisense群の $SD_{10}$ 値は対照のsense群に比べ39.8%と有意に減少した( $p < 0.05$ , unpaired t-test)(Fig. 14)。

#### IV. 考察

##### 1. MGMT mRNA発現とACNU耐性の相関

今回の結果が示すように、human及びrat glioma細胞株に加え、悪性脳腫瘍組織標本においても、ACNU耐性度を示す $SD_{10}$ 値と細胞或いは組織のMGMT mRNA発現量との間には明らかな相関関係が認められた。これまでに、ACNU耐性度とMGMT活性の相関性について報告されてきており<sup>8,14,16,35</sup>、我々の結果から、MGMT蛋白の合成量は、Northern blot法によって検出されるMGMT mRNA発現量に直接的に依存していることが示された。



一般に、細胞の薬剤耐性機構としては、1) 細胞内薬剤蓄積量の減少(p-glycoprotein等)、2) 細胞内薬剤分布の変化(Golgi体機能、mitochondria膜電位の変化、multidrug-resistance associated protein (MRP)等)、3) 細胞内解毒機構の亢進、4) 薬剤標的の量的或いは質的变化(Topoisoemerase I, II等)、5) 薬剤活性化の抑制或いは不活性化の促進、6) DNA修復機構、7) 細胞の分化成長或いは細胞死に関与する遺伝子産物の変化、などが挙げられる。このうち、アルキル化剤系抗癌剤の耐性機構としては、thiolを多く含む解毒酵素のreduced glutathione (GSH)、glutathione S-transferase- $\pi$  (GST- $\pi$ )、主として重金属の解毒に関与しSH基に富むmetallothioneinによる抱合解毒；DNA修復酵素のN-methylpurine-DNA glycosylase, endonuclease, exonuclease；或いは細胞内薬剤貯蓄の減少等の関与も報告されている<sup>35-40</sup>。しかしCENUに関しては、殺細胞効果の主要な機序がO<sup>6</sup>-alkylguanineから惹起されるDNA interstrand-crosslinkの形成にある点から、guanine残基のO<sup>6</sup>部位に付加したアルキル基に特異的に作用し、ワンステップでDNAを修復してしまうMGMTの関与が極めて重要であることが予想される。今回の我々の結果は、実際にMGMTの発現がACNU耐性の主因となること示唆したものと考えられる。更に、MGMT mRNAの発現レベルでACNU耐性との相関がみられたことから、煩雑で、大量の試料を必要とするこれまでの活性測定法と比べ、我々のNorthern blot法によるMGMT mRNA発現測定法は、細胞及び腫瘍組織のACNU耐性検出法としてより有用な方法と考えられる。

MGMT mRNA発現量を測定した悪性脳腫瘍症例で、手術後の治療内容及び経過を検討すると、MGMT mRNAが高発現していたglioblastoma, anaplastic astrocytoma, ependymoma, 肺癌脳転移の5例(Gbl1, AAst3, AAst6, Epd2, Lc5)では、ACNUを含む補助療法にも拘わらず腫瘍の再発或いは残存腫瘍の増大が認められた。内1例(Epd2)では、初回手術後ACNU単独維持療法を施行したが、急激な腫瘍再発をきたし、再手術の際の腫瘍MGMT mRNA発現量は極めて高値を示した。一方、MGMT mRNAの発現が僅かであったglioblastoma, anaplastic astrocytoma, oligodendrogliomaの6例(Gbl3, AAst1-2, AAst8, Olg2, Olg3, Olg4)ではACNUを含む併用療法が奏効した。原発性悪性脳腫瘍では、殆どの症例で手術後にACNUを含む多剤化学療法及び放射線療法を併用しており、ACNU単独の治療効果を判定することは困難ではあるが、このように患者脳腫瘍のMGMT mRNA発現量がACNU療法の効果を反映する臨床例も認められた。逆に、頸動注を含むACNU療法を施行したglioblastomaの1例(Gbl7)では、腫瘍が増大し再手術を必要としたが、摘出腫瘍のMGMT mRNA発現は低値を示した。しかしこの腫瘍の初代培養細胞は、ACNUに対するSD<sub>50</sub>値が13.3 $\mu$ MとACNU感受性を示していた。一般にgliomaは組織多様性を示し、特に再発glioblastomaではその傾向が強い。この症例では検査した摘出腫瘍部分がACNU耐性を示すviableな腫瘍細胞領域でなかった可能性も考えられる。また、この再発腫瘍ではmetallothioneinの発現が亢進しており(data not shown)、ACNU耐性にMGMT以外の機構が関与していた可能性も否定できない。このように組織多様性を示す腫瘍では、異なる部位でのサンプリングも重要である。

腫瘍標本摘出以前にACNUを投与されていたケースで、MGMTの発現亢進が著明であったものは5例中1例(Epd2)と少なく、ACNU治療により、MGMT mRNAの発現が誘導されてくる再発腫瘍は必ずしも多くはなかった。



## 2. MGMT mRNA発現の調節と誘導

MGMTの発現制御に関しては、human glioma細胞株を用いたSouthern blot解析の結果から、MGMT mRNA発現の欠如はMGMT遺伝子の欠失や転位、再配列によるものではなく、発現の調節は転写或いは転写後のRNA processingの段階で行われていることが示唆された。即ち、MGMT mRNA発現に必要な特異的な転写因子、または転写抑制因子の存在、或いはそれらの因子の結合するMGMT promoter領域やenhancer領域のDNAの点突然変異などの関与が考えられる。

最近、MGMT遺伝子或いはそのpromoter領域におけるCpG methylationの関与が多施設より報告されている<sup>41-43</sup>。即ち、Mer<sup>+</sup>(MGMT活性+)の細胞では、この領域のCpG methylationが陽性で、Mer<sup>-</sup>の細胞では陰性であるとするものである。一方、von Wronskiらは、human rhabdomyosarcoma細胞株を用いて、否定的な結果を示している<sup>44</sup>。今後更に検討を要する問題点と考えられる。

rat glioma細胞株のC6及び9LはACNU感受性の形質をもち、MGMT mRNAの発現は殆ど認められない。これらC6、9Lは薬剤投与によりACNUを含め各種薬剤耐性株を樹立することができることが知られている<sup>45,46</sup>。我々は、これらの細胞株に致死量以下の低濃度ACNUを段階的に濃度を高くしながら投与することで、各々のACNU耐性株、即ち、C6AR及び9LARを樹立した。特に、C6ARは、培地にACNUを含まない状態でも安定に継代され、増殖速度も親株のC6と同様であり、且つ定常的にACNU耐性を示す。これらC6AR、9LARでは、MGMT mRNAの発現は明らかに亢進していた(Fig. 8)。即ち、ACNU耐性獲得に伴い、MGMT mRNA発現の亢進が認められた。一方、C6AR、9LARでは、他の薬剤耐性関連遺伝子であるGST- $\pi$ やmetallothionein mRNAの発現量は、それぞれ親株とほぼ同様で低かった(data not shown)。C6-ACNU耐性株においては、細胞内の解毒酵素であるGST- $\pi$ の発現亢進は認められなかったとする松本らの報告もあり、C6株においては、MGMT発現の誘導がACNU耐性の主因をなすことが示唆された<sup>47</sup>。9LAR株では、ACNU耐性度に比しMGMT mRNA発現は中等度であり、他の耐性機序の誘導が関与している可能性も否定はできない。

rat liverやrat hepatoma細胞株においては、 $\gamma$ 線を照射するとMGMTの発現が一過性に誘導され、mRNAの発現レベルで変化が生じてくる<sup>48,49</sup>。その他、alkylation, hydrogen peroxide, ultraviolet, CDDP, bleomycin, heat等のDNA損傷物質によってもMGMTの発現が誘導されることが報告されている<sup>49,50</sup>。また、*E. coli*のもつMGMTの相同遺伝子である*ada* geneでは、アルキル化剤の投与によって、*ada* geneの転写が促進し発現が誘導されるが、同じ作用をもつ*ogt* geneは発現誘導は認められない<sup>11</sup>。

我々の結果から、rat glioma細胞株では、ACNU反復投与を比較的長期に継続することにより、DNA損傷修復酵素であるMGMT mRNA発現の亢進を伴うACNU耐性の獲得が認められた。そこで、ACNU単回投与による一過性のMGMT発現誘導も、ratのliverやhepatoma細胞で $\gamma$ 線照射やCDDP投与により誘導されたのと同様に認められるのか、また、human MGMT遺伝子のpromoter領域にはheat shock element (HSE) も存在するので<sup>51</sup>、heat shockによっても同様の発現誘導がみられるか、human及びrat glioma細胞株を用いて現在検討中である。

### 3. MGMT antisense RNAによるACNU耐性克服の試み

ACNU耐性に対するantisense RNA療法では、今回構築したMGMT antisense RNA発現vectorを用いると、 $Zn^{2+}$ 投与によりantisense RNAの発現を誘導し、細胞内でのMGMTの*de novo synthesis*を抑制するだけで、軽度のACNU耐性の軽減が認められた。更に、これに低濃度のACNUによる前処理を加えて、細胞内に既に存在していたMGMT分子を動員し枯渇化させると、より一層ACNU増感効果が増強した。この方法で、ACNU感受性を2.5倍に高めることができ、MGMT antisense RNAによるACNU耐性の克服が有効であることが*in vitro*で示された。今後更に、MGMTに対する特異的抗体を作製することで、蛋白合成レベルで検討を加えていく予定である。

CENU耐性の克服法として、先にも記したようにMGMTがDNAを修復すると同時に失活してしまう分子である特性を考慮して、streptozotocin・*O*-benzylguanine等のMGMTの基質を前治療として投与する方法が検討されている<sup>27,32</sup>。これらの誘導体による耐性克服法では、MGMT活性の低下が一過性にしか得られない点が問題となる。Chenらの報告によれば、現在最も抑制効果が高いとされる*O*-benzylguanineを投与しても、培養細胞を用いた*in vitro*の系で、MGMT活性は24時間以内に元の活性レベルに戻ってしまう<sup>32</sup>。従って、CENUの殺細胞効果を一定時間以上期待するには不十分と考えられる。また、繰り返し長期にわたる投与では、細胞や組織への毒性などの影響も問題となる。今回の我々の方法では、前治療薬として10 $\mu$ Mの低濃度ACNUを併用した。この濃度では、ACNU耐性細胞の生存率に殆ど影響はなく、ACNU治療の際の前治療薬としての効果も単独では認められなかったのに対し、MGMT antisense RNAが存在するとACNU耐性は有意に改善された。即ち、細胞内のMGMT *de novo synthesis*を阻害し、MGMT蛋白量を持続的に低下させておくことは、ACNU耐性改善に重要であることが示された。

このような治療の対象となる細胞内には、元来多くのMGMT分子が含まれているため、MGMT antisense RNAによる*de novo synthesis*の阻害だけでMGMT活性を有意に減少させるには、比較的長時間のantisense RNA発現が必要となる可能性が考えられる。そこで、今後更に本法によるACNU増感効果を増強させるための一法として、MGMT antisense RNAに加え、ACNUよりも強力な*O*-benzylguanine等の前投薬を併用したMGMT基質前処理-antisense RNA併用療法も検討していく必要があると考えられる。

MGMT antisense RNAを細胞内で発現させるため、今回の実験系では確実に外部より発現を誘導しえるhuman metallothionein promoterを組み込んだ発現vectorを使用した。このvectorにより目的通りのRNA発現が得られたが、一方で以下の如き問題点が考えられた。

第1に、このvectorでは、細胞傷害性を有する $Zn^{2+}$ 等の金属イオンをRNA発現誘導の際に必要とする点であり、ACNU治療以前に $Zn^{2+}$ による細胞傷害を招く可能性がある。このため、内因性のMGMT mRNAを高発現している細胞に対しては、飽和量の有効なantisense RNAの発現を期待することは困難と考えられる。

第2に、 $Zn^{2+}$ 等の金属イオンは、それ自体がMGMT活性に対する抑制作用を有している点である。しかしこの点に関しては、Scicchitanoらの報告によると、今回使用した100~120 $\mu$ M程度の $Zn^{2+}$ 濃度では、rat liverにおけるMGMT活性では9%の抑制しか認められな



いことや<sup>32</sup>、今回の実験系では同濃度の $Zn^{2+}$ を投与したcontrolの細胞群(親株C6AR及びMGMT sense RNA発現クローン)との比較で評価していること、また実際に同じクローンで $Zn^{2+}$ 投与の有無による生存率の差は僅かに過ぎなかったことなどから、影響は少ないものと考えられる。

第3に、目的とするantisense RNAは59bであるのに対し、このvectorから発現されるRNAのサイズは、mRNAを安定化するために付加されているpoly A tailのため、約300~400bに及ぶ点である。またこのRNA自身が形成する可能性のある高次構造などが、標的となるMGMT mRNAとhybridizeする際に、移動性・特異性・効率にどの程度影響を及ぼすのか、現時点では不明である。この点は、一般のantisense RNA自体でも同様の問題で、将来的に解明されてくれば、新たなantisense RNAのdesignが考えられよう<sup>33</sup>。

以上の観点から、今後細胞内で安定して、ある程度持続的に、且つ大量に発現をきたすことのできるvectorの開発が必須となるが、次に障害となる問題は、如何に腫瘍に対して特異的に且つ効率高く、このような遺伝子発現vectorを導入し得るかという点である。これは癌に対する遺伝子療法全般に関わる問題であるが、現在、脳腫瘍に対しては、Herpes simplex virus, retrovirus, adenovirus等のvirus vectorを用いる方法<sup>34-37</sup>、tumor specific antibodyをliposomeと結合させてspecificityを高める方法<sup>38</sup>、また、tumor或いはtissue specific promoterを組み込んだvectorを用いる方法などが施行されており、今後の成果が待たれるところである。

本療法で長期間、完全にMGMT活性を除去してしまうと、MGMTが本来有する損傷DNAの修復機能が失われてしまい、細胞の突然変異性が増加する危険性が挙げられる。しかし、本法の目的は、治療濃度のACNUに対して感受性となる程度のMGMT活性低下を獲得することであり、また先に述べたように、高発現しているMGMT mRNAを完全にブロックする程のantisense RNAを細胞内で持続的に発現させるのは困難であること、最終的には治療標的となる腫瘍細胞に選択的に投与することが目標であり、2次癌をきたすような危険性は低いと考えられる。

## V. 結語

悪性脳腫瘍に対する化学療法で、第1選択として使用されているACNUにおける耐性の機構として、DNA修復酵素であるMGMTの関与につき述べ、human及びrat glioma細胞株及び悪性脳腫瘍組織標本を用いて、ACNU耐性とMGMT mRNA発現の相関性を示した。また、このMGMT遺伝子の発現調節及び誘導に関わる因子につき検討を加えた。

MGMT発現によるACNU耐性を克服する試みとして、MGMT antisense RNA療法を検討し、耐性改善が得られたことを報告した。本法の問題点と今後の展望につき更に言及した。



# 参考文献

1. The committee of Brain Tumor Registry of Japan: The seventh report from the Brain Tumor Registry of Japan. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 32: 385-547, 1992.
2. Jelsma R, Bucy P: The treatment of glioblastoma multiforme of the brain. *J Neurosurg* 27: 388-400, 1967.
3. Walker M, Green S, Byar D, Alexander E Jr., Batzdorf U, Brooks W, Hunt W, MacCarty C, Mahaley M, Mealey J Jr., Owens G, Ransohoff J II, Robertson J, Shapiro W, Smith K Jr., Wilson C, Strike T: Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 303: 1323-1329, 1980.
4. Takakura K, Abe H, Tanaka R, Kitamura K, Miwa T, Takeuchi K, Yamamoto S, Kageyama N, Handa H, Mogami H, Nishimoto A, Uozumi T, Matsutani M, Nomura K: Effects of ACNU and radiotherapy on malignant glioma. *J Neurosurg* 64: 53-57, 1986.
5. 設楽信行: 脳腫瘍のphase synchronizationに関する基礎的研究. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 17: 55-62, 1977.
6. 松谷雅生: 脳腫瘍(悪性グリオーマ)の化学療法. *最新医学* 46: 1391-1395, 1991.
7. Kohn K: Interstrand cross-linking of DNA by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and other 1-(2-haloethyl)-1-nitrosoureas. *Cancer Res* 37: 1450-1454, 1977.
8. Aida T, Bodell W: Cellular resistance to chloroethylnitrosoureas, nitrogen mustard, and cis-diamminedichloroplatinum (II) in human glial-derived cell lines. *Cancer Res* 47: 1361-1366, 1987.
9. Erickson L, Laurent G, Sharkey N, Kohn K: DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumor cells. *Nature (Lond.)* 288: 727-729, 1980.
10. Yarosh D: The role of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 145: 1-16, 1985.
11. Pegg A: Mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Res* 50: 6119-6129, 1990.
12. Mehta J, Ludlum D, Renard A, Verly W: Repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine in DNA by a chromatin fraction from rat liver: Transfer of the ethyl group to an acceptor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6766-6770, 1981.
13. Robins P, Harris A, Goldsmith I, Lindahl T: Cross-linking of DNA induced by chloroethylnitrosourea is prevented by O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 11: 7743-7758, 1983.
14. Tsujimura T, Zhang Y, Fujio C, Chang H, Watatani M, Ishizaki K, Kitamura H, Ikenaga M: O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase activity and sensitivity of Japanese tumor cell strains to 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 78: 1207-1215, 1987.
15. Pieper R, Futscher B, Dong Q, Elis T, Erickson L: Comparison of O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) mRNA levels in Mer<sup>+</sup> and Mer<sup>-</sup> human tumor cell lines containing

- the MGMT gene by the polymerase chain reaction technique. *Cancer Communications* 2: 13-20, 1990.
16. Citron M, Decker R, Chen S, Schneider S, Graver M, Kleynerman L, Kahn L, White A, Schoenhaus M, Yarosh D: *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in human normal and tumor tissue from brain, lung, and ovary. *Cancer Res* 51: 4131-4134, 1991.
  17. Chen J, Zhang Y, Wang C, Sun Y, Fujimoto J, Ikenaga M: *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase activity in human tumors. *Carcinogenesis* 13: 1503-1507, 1992.
  18. Myrnes B, Norstrand K, Giercksky K, Sjunneskog C, Krokan H: A simplified assay for *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase activity and its application to human neoplastic and non-neoplastic tissue. *Carcinogenesis* 5: 1061-1064, 1984.
  19. Tano K, Shiota S, Collier J, Foote R, Mitra S: Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for *O*<sup>6</sup>-alkylguanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 686-690, 1990.
  20. Nagane M, Asai A, Shibui S, Nomura K, Matsutani M, Kuchino Y: Expression of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea resistance of human brain tumors. *Jpn J Clin Oncol* 22: 143-9, 1992.
  21. 浅井昭雄, Bodell WF, 星野孝夫: ヒト脳腫瘍におけるchloroethylnitrosourea薬剤耐性の評価法. Northern blot 法による*O*<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase mRNA発現量の定量. *脳外誌* 1: 170-172, 1992.
  22. Zlotogorski C, Erickson L: Pretreatment of normal human fibroblasts and human colon carcinoma cells with MNNG allows chloroethylnitrosourea to produce DNA interstrand crosslinks not observed in cells treated with chloroethylnitrosourea alone. *Carcinogenesis (Lond.)* 4: 759-763, 1983.
  23. Dolan M, Morimoto K, Pegg A: Reduction of *O*<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase activity in HeLa cells treated with *O*<sup>6</sup>-alkylguanines. *Cancer Res* 45: 6413-6417, 1985.
  24. Gibson N, Hartley J, Barnes D, Erickson L: Combined effect of streptozotocin and mitozolomide against four human cell lines of the Mer<sup>+</sup> phenotype. *Cancer Res* 46: 4995-4998, 1986.
  25. Dolan M, Moschel R, Pegg A: Depletion of mammalian *O*<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by *O*<sup>6</sup>-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5368-5372, 1990.
  26. Dolan ME, Mitchell RB, Mummert C, Moschel RC, Pegg AE: Effect of *O*<sup>6</sup>-benzylguanine analogues on sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic effects of alkylating agents. *Cancer Res* 51: 3367-72, 1991.
  27. Chen JM, Zhang YP, Moschel RC, Ikenaga M: Depletion of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase and potentiation of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea antitumor activity by *O*<sup>6</sup>-benzylguanine *in vitro*. *Carcinogenesis* 14: 1057-1060, 1993.
  28. Izant JG, Weintraub H: Constitutive and conditional suppression of exogenous and



- endogenous genes by anti-sense RNA. *Science* 229: 345-52, 1985.
29. Melton DA: Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 144-8, 1985.
  30. Neckers L, Whitesell L: Antisense technology: biological utility and practical considerations. *Am J Physiol* 265: 12, 1993.
  31. Yokoyama K, Imamoto F: Transcriptional control of the endogenous MYC protooncogene by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 7363-7, 1987.
  32. Nellen W, Hildebrandt M, Mahal B, Mohrle A, Kroger P, Maniak M, Oberhauser R, Sadiq M: Mechanisms of gene regulation by endogenous and artificially introduced antisense RNA. *Biochem Soc Trans* 20: 750-4, 1992.
  33. 浅井昭雄, 口野嘉幸: Northern blot法. 電気泳動の全て. 医学書院. pp177-183, 1991
  34. Wiestler O, Kleihues P, Pegg AE: *O*<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human brain and brain tumors. *Carcinogenesis* 5: 121-124, 1984
  35. Mineura K, Fushimi S, Kowada M, Isowa G, Ishizaki K, Ikenaga M: Linkage between *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (*O*<sup>6</sup>-MT) activity and cellular resistance to antitumour nitrosoureas in cultured rat brain tumour cell strains. *Acta Neurochir (Wien)* 103: 62-66, 1990.
  36. Chakravarti D, Ibeanu G, Tano K, Mitra S: Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein *N*-methylpurine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 266: 15710-15715, 1991.
  37. O'Connor T, Laval J: Human cDNA expressing a functional DNA glycosylase excising 3-methyladenine and 7-methylguanine. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 1170-1177, 1991.
  38. Laval J: Increase of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase and *N*<sup>7</sup>-methyladenine glycosylase RNA transcripts in rat hepatoma cells treated with DNA-damaging agents. *Biochem Biophys Res Commun* 176: 1086-1092, 1991.
  39. Laval J, Lopes F, Madelmont J, Godeneche D, Meyniel G, Habraken Y, O'Connor T, Boiteux S: Excision of imidazole ring-opened *N*<sup>7</sup>-hydroxyethylguanine from chloroethylnitrosourea-treated DNA by *Escherichia coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *IARC Sci Publ* 105: 412-416, 1991.
  40. Wang Y, Teicher B, Shea T, Holden S, Rosbe K, Al-Achi A, Henner W: Cross-resistance and glutathione-S-transferase- $\pi$  levels among four human melanoma cell lines selected for alkylating agent resistance. *Cancer Res* 49: 6185-6192, 1989.
  41. Wang Y, Kato T, Ayaki H, Ishizaki K, Tano K, Mitra S, Ikenaga M: Correlation between DNA methylation and expression of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene in cultured human tumor cells. *Mutat Res* 273: 221-30, 1992.
  42. Pieper RO, Costello JF, Kroes RA, Futscher BW, Marathi U, Erickson LC: Direct correlation between methylation status and expression of the human *O*<sup>6</sup>-methylguanine DNA



- methytransferase gene. *Cancer Commun* 3: 241-53, 1991.
43. Fritz G, Kaina B: Genomic differences between *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase proficient (Mex<sup>+</sup>) and deficient (Mex<sup>-</sup>) cell lines: possible role of genetic and epigenetic changes in conversion of Mex<sup>+</sup> into Mex<sup>-</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 1184-90, 1992.
44. von Wronski M, Harris LC, Tano K, Mitra S, Bigner DD, Brent TP: Cytosine methylation and suppression of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase expression in human rhabdomyosarcoma cell lines and xenografts. *Oncol Res* 4: 167-74, 1992.
45. Yoshida T, Shimizu K, Ushio Y, Hayakawa T, Mogami H, Sakamoto Y: Enhanced effect of reserpine upon growth-inhibitory action of ACNU on ACNU-resistant C6 glioma. *Br J Cancer* 53: 773-777, 1986.
46. Kokunai T, Tamaki N, Matsumoto S: ACNU-resistant mutants of 9L rat glioma cell line. *J Neurosurg* 63: 583-588, 1985.
47. 松本義人, 笹岡昇, 土田高宏, 藤原敬, 長尾省吾: 生検脳腫瘍・培養ラットグリオーマ細胞およびその薬剤耐性細胞におけるグルタチオン, グルタチオンS-トランスフェラーゼの定量. *脳外* 20: 1069-1074, 1992.
48. Chan CL, Wu Z, Eastman A, Bresnick E: Irradiation-induced expression of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells. *Cancer Res* 52: 1804-9, 1992.
49. Lefebvre P, Laval F: Enhancement of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase activity induced by various treatments in mammalian cells. *Cancer Res* 46: 5701-5, 1986.
50. Fritz G, Kaina B: Stress factors affecting expression of *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase mRNA in rat hepatoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1171: 35-40, 1992.
51. Harris LC, Potter PM, Tano K, Shiota S, Mitra S, Brent TP: Characterization of the promoter region of the human *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Res* 19: 6163-7, 1991.
52. Scicchitano DA, Pegg AE: Inhibition of *O*<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase by metals. *Mutat Res* 192: 207-10, 1987.
53. Hjalte T, Wagner EG: The effect of loop size in antisense and target RNAs on the efficiency of antisense RNA control. *Nucleic Acids Res* 20: 6723-32, 1992.
54. Le Gal La SG, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford PL, Perricaudet M, Mallet J: An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain. *Science* 259: 988-90, 1993.
55. Takamiya Y, Short MP, Moolten FL, Fleet C, Mineta T, Breakefield XO, Martuza RL: An experimental model of retrovirus gene therapy for malignant brain tumors. *J Neurosurg* 79: 104-10, 1993.
56. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM: In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-2, 1992.
57. Geller AI, Keyomarsi K, Bryan J, Pardee AB: An efficient deletion mutant packaging system

for defective herpes simplex virus vectors: potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 8950-4, 1990.

58. 水野正明, 吉田純, 杉田慶一郎, 林豊, 八木國夫: 悪性グリオーマに対するインターフェロン遺伝子療法の開発. 脳外20: 547-51, 1992.



## 謝辞

本研究を進めるにあたり、国立がんセンター中央病院及び同研究所で研究する機会を与えてくださり、また、御指導御助言をくださった東京大学医学部 脳神経外科教室 桐野高明教授、国立がんセンター中央病院 脳神経外科 野村和弘部長、同 渋谷壮一郎医長に深く感謝いたします。

直接御指導御助言くださった国立がんセンター研究所 生物物理部 口野嘉幸部長、東京大学医学部 脳神経外科教室 浅井昭雄講師に深く感謝いたします。

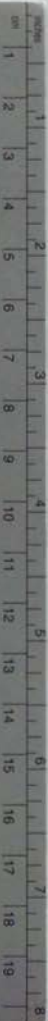
本研究にあたり、細胞培養の分野に携わった大西智子様に厚く感謝いたします。

分子生物学的手法に関して、常に御支援くださった国立がんセンター研究所 生物物理部の皆様に感謝いたします。

最後に、終始支援してくれた妻 由美子に深く感謝します。







# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TMA Kodak

Blue    Cyan    Green    Yellow    Red    Magenta    White    3/Color    Black



## Kodak Gray Scale

**C** **Y** **M**

© Kodak, 2007 TMA Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

