

## 神経膠腫におけるc-myc, CD133, MGMTの発現と 予後との関連についての検討

角田 翔, 中村 翔, 櫻田 香\*, 松田憲一朗\*,  
佐藤慎哉\*, 嘉山孝正\*.\*\*

山形大学医学部医学科

\*山形大学大学院医学系研究科脳神経外科

\*\*国立がん研究センター

### 要 旨

**【背景】** 神経膠腫は成人脳腫瘍で最も頻度の高い疾患であるが、その治療成績はいまだ極めて不良である。近年、DNA修復酵素の1つO-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の遺伝子プロモーター領域のメチル化が膠芽腫 (glioblastoma: GBM) の治療感受性、治療予後に相関があることが報告されている。また神経幹細胞マーカーCD133は腫瘍幹細胞マーカーとしても利用されており、CD133陽性腫瘍幹細胞ではMGMTが高発現し化学療法の抵抗性に寄与していると報告されている。さらに近年、代表的ながん遺伝子の一つであるc-mycが細胞増殖や腫瘍形成に深く関与するだけでなく幹細胞の幹細胞性維持にも重要な役割を担っているとの報告がなされている。そこで今回我々は、神経膠腫の腫瘍幹細胞と治療抵抗性に関与すると考えられるc-myc、CD133、およびMGMTの3分子に注目し、これらのタンパク質発現と予後との関連を検討した。

**【対象・方法】** 山形大学脳神経外科にて摘出術を行った41例（男性28例、女性13例、平均年齢54.3歳）の神経膠腫を対象とした。WHO分類ではLow grade glioma (LGG) 8例、High grade glioma (HGG) 33例である。腫瘍摘出標本から細胞溶解液を作成し、Western blotにて各タンパク質の発現を検討した。1) LGGとHGGにおける各タンパク質発現の比較、2) c-mycとCD133間、CD133とMGMT間タンパク質発現の相関、3) c-myc, CD133, MGMTタンパク質の発現それぞれと全生存期間 (overall survival: OS) との関係を検討した。

**【結果】** 1) HGGではLGGに比べ3種のタンパク質とも発現が高い傾向が見られたが統計学的有意差はみられなかった。2) CD133とMGMTの発現の間には統計学的に有意な相関を認めた。3) CD133, MGMTの発現が高いほどOSが短くなる傾向は見られたが、統計学的に有意な相関は認められなかった。

**【結論】** 今回、神経膠腫におけるc-myc, CD133, MGMTタンパク質の発現の関係とOSとの相関について検討した。CD133とMGMTの発現の間には統計学的に相関が認められたが、その他の因子について相関は認められなかった。

キーワード : 神経膠腫、腫瘍幹細胞、c-myc, CD133, MGMT, 全生存期間

## I. 緒 言

神経膠腫は全脳腫瘍の約4分の1を占める代表的な悪性脳腫瘍である。病理組織所見と臨床悪性度(予後)の両者を併せた総合的な悪性度の分類としてWHO分類が最も一般的に用いられており、グレードIからIVまでの4段階に分けられている。グレードI・IIはlow grade glioma (LGG)、グレードIII・IVはhigh grade glioma (HGG)と称される。最も悪性度の高いgrade IVのglioblastoma (GBM)の平均余命はわずか15ヶ月足らずであり、5年生存率は10%に満たない極めて予後不良な疾患である。GBMに対する現在の世界的標準治療は経口アルキル化剤テモゾロミドによる化学療法と局所放射線療法の併用である。2005年Stuppらによりテモゾロミド併用放射線療法による生存期間延長効果が報告され、その付随研究としてDNA修復酵素MGMT遺伝子のプロモーター領域がメチル化されていることが予後良好因子であることが示された<sup>1)</sup>。

癌幹細胞仮説は、がん細胞の中でもごく少数の癌細胞が自己複製能と多分化能といういわゆる幹細胞の性質をもち、その性質を有する癌幹細胞を起源としてがんが発生するのではないかと(造腫瘍能)という仮説である。近年、グリオーマにおいてもグリオーマ幹細胞の存在が証明され、再発や播種に重要な役割を果たしていると考えられている。様々ながん腫においてがん幹細胞の存在が証明され、新たな治療ターゲットとして注目されている。神経幹細胞マーカーCD133はグリオーマ幹細胞マーカーとしても利用されており、CD133発現と予後<sup>2)</sup>や、CD133発現と神経膠芽腫の播種との関連<sup>3)</sup>などに関する報告がなされている。さらにCD133陽性腫瘍幹細胞ではDNA修復酵素の1つO-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)が高発現しており化学療法の抵抗性を示し、更に放射線に対する高い抵抗性を有す

ることが示されている<sup>4), 6)</sup>。

一方c-mycは代表的ながん遺伝子の一つであるが、細胞増殖や悪性転化のみならず幹細胞の幹細胞性維持にも重要な役割を担っているとの報告がなされており、グリオーマ幹細胞の幹細胞性維持にも関与している可能性も示されている<sup>5)</sup>。

今回我々は、再発・播種、及び放射線・化学療法の抵抗性に重要な役割を果たしていると考えられるグリオーマ幹細胞に着目し、グリオーマ幹細胞に高発現していると考えられるc-myc, CD133, MGMTの3種のタンパク質発現とグリオーマ患者の予後との関連を検討した。

## II. 対象と方法

### 1. 研究材料

2006年から2009年の間に山形大学医学部附属病院脳神経外科にて神経膠腫と診断・治療された41例(男性28例、女性13例、平均年齢54.3歳)を対象とした。WHO分類ではLGG 8例、HGG 33例であった。患者の内訳を表1に示す。摘出腫瘍は速やかに凍結保存の後、Laemmli sample bufferに溶解、超音波破碎後、細胞溶解液としてWestern blotに使用した。

### 2. Western blotと発現スコアの算出

細胞溶解液を12%ポリアクリルアミドゲルに電気泳動し分離した後、PVDF膜に転写した。3%ミルク入りTris-buffered saline (TBS)にてブロッキングを行った後、一次抗体を反応させた。一次抗体は、抗c-myc抗体(monoclonal, Cell Signaling Technology)、抗CD133抗体(W6 B3C1, monoclonal, Miltenyi Biotec)、抗MGMT抗体(MT3.1, monoclonal, Neomarker)、抗β-actin抗体(monoclonal, Sigma)を用いた。二次抗体反応後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore)を反応させ発光パターンをライトキャプチャーCS analyzer (ATTO)を用いて検出し、densitometryにてタンパク質の発現を解析した。手術中に腫

表 1. 対象患者の属性 (n=41)

Characteristic		Number of Patients	Percentage
<b>Sex</b>			
	Male	28	68
	Female	13	32
<b>Age, years</b>			
	Mean	54.3	
	Range	3-82	
<b>Karnofsky performance status</b>			
	Median	65	
	Range	30-100	
<b>Localization</b>			
	Frontal	17	41.4
	Temporal	9	21.9
	Parietal	8	19.5
	Occipital	0	0
	Others	7	17
<b>Operation</b>			
	Gross total resection	35	85.3
	Partial removal	6	14.6
	Biopsy	0	
<b>Chemotherapy</b>			
	Yes	35	85.3
	No	6	14.6
<b>Radiation</b>			
	Yes	35	85.3
	No	6	14.6

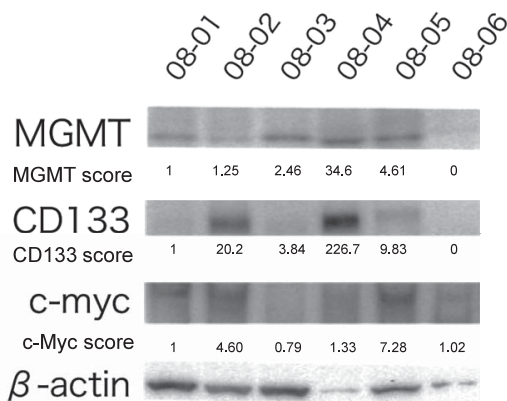


図 1. タンパク質発現スコア解析例

瘍検体に血液などが混入し吸光度計を用いたタンパク質量が困難であったため、glioma細胞株U251の細胞溶解液をタンパク質量のコントロールとして用いた。タンパク質量を統一するため $\beta$ -actinとの比を計算しそれぞれのスコアとした。

### 3. 統計学的検討

統計解析はStatistical Package for the Social Sciences (SPSS, ver. 19, Chicago, IL, USA) を用いた。LGGとHGGにおけるタンパク質スコアの比較にはMann-Whitney検定を行い、p値0.05未満を有意差ありとした。各タンパク質スコア間の相関と各スコアと生存期間 (Overall survival: OS) の相関についてSpearman解析を行った。

表 2. タンパク質発現解析の結果 (n=41)

no.	Age	Sex	Diagnosis	CD133/actin	MGMT/actin	c-myc/actin	Outcome	OS(M)
09-15	3	F	piloicytic astrocytoma G1	3,30	0,10	0,20	Alive	62
09-5	7	M	ependymoma G2	4,61	5,75	0,20	Alive	67
09-6	16	M	oligodendroglioma G2	0,23	2,68	0,02	Alive	66
09-11	46	M	AA	3,04	2,11	0,22	Dead	19
09-19	71	F	GBM	1,22	3,13	0,17	Dead	8
09-21	65	M	GBM	5,47	2,62	0,19	Dead	23
09-22	25	M	AE	6,58	5,25	0,00	Alive	58
09-23	74	M	GBM	3,17	2,81	0,00	Dead	28
09-1	79	M	GBM	4,44	0,16	1,34	Dead	27
09-5	59	F	GBM	1,54	1,36	4,61	Dead	9
09-7	71	F	GBM	0,21	0,89	0,00	Dead	1
09-8	82	F	oligodendroglioma G2	0,33	0,45	2,91	Alive	54
09-12	38	F	oligodendroglioma G2	0,25	0,86	0,25	Alive	52
09-15	31	M	GBM	0,00	0,45	0,14	Dead	29
09-16	96	M	GBM	0,90	0,26	1,47	Dead	3
09-22	40	F	glioma G3	0,22	0,66	0,22	Dead	1
09-1	66	M	GBM	1,00	1,00	1,00	Alive	45
09-2	72	M	GBM	20,11	1,25	4,61	Alive	45
09-5	48	M	GBM	9,83	4,61	0,00	Dead	11
09-6	60	F	AA	0,00	0,00	4,61	Dead	28
09-8	57	M	GBM	0,34	1,92	2,76	Dead	15
09-11	32	M	GBM	0,71	2,33	3,00	Alive	42
09-12	81	M	GBM	2,17	1,64	0,00	Dead	21
09-13	60	M	GBM	1,81	1,18	0,84	Dead	10
09-14	82	M	GBM	3,49	2,69	0,43	Dead	11
09-15	76	M	GBM	1,61	1,37	0,00	Dead	11
09-17	75	M	GBM	0,30	4,45	0,71	Alive	13
09-18	32	F	ganglioglioma G1	0,08	0,40	3,85	Alive	37
09-20	67	M	gliosarcoma G4	0,00	0,00	NA	Dead	6
09-21	20	M	papilloma	7,52	0,84	NA	Alive	36
09-22	66	F	subependymoma	0,00	2,22	NA	Alive	36
09-01	67	M	GBM	0,13	0,15	0,11	Dead	7
09-04	62	F	GBM	0,23	0,24	4,24	Dead	19
09-06	53	F	GBM with areas giant cell	0,08	0,13	0,35	Alive	30
09-07	22	M	AOA	1,05	1,08	0,27	Alive	27
09-08	74	M	GBM	1,19	0,42	0,14	Dead	13
09-10	82	M	GBM	0,95	0,11	0,67	Dead	3
09-11	42	F	AO	0,60	0,42	0,00	Alive	23
09-12	53	M	GBM	0,93	0,49	0,88	Dead	22
09-13	79	M	GBM	3,44	1,84	0,52	Dead	4
09-14	52	F	GBM	0,63	0,88	1,28	Dead	9

AA: anaplastic astrocytoma, AE: anaplastic ependymoma, AO: anaplastic oligodendroglioma, AOA: anaplastic oligoastrocytoma, GBM: glioblastoma multiforme

### III. 結 果

- 1) Low grade gliomaとhigh grade gliomaでのタンパク質発現の比較  
LGGとHGGにおいて、3つ分子の発現スコアに差があるのか比較検討した(図2)。LGGに比べ HGGでは c-myc, CD133, MGMTにおいて発現が多い傾向が見られたが統計学的有意差は見られなかった。
- 2) c-myc, CD133, MGMTの発現の相関の検討  
図3のごとく CD133とMGMTの発現の間には統計学的に有意な相関を認めた。c-mycとCD133の発現には相関は認められなかった。
- 3) c-myc, CD133, MGMTの発現と予後(OS)との相関の検討

### IV. 考 察

図4のごとくc-myc, CD133, MGMTの発現と予後に統計学的な相関は認められなかった。

近年、腫瘍幹細胞仮説が提唱され、新たながん治療ターゲットとして注目を集めている。癌幹細胞仮説は、がん細胞の中でもごく少数の癌細胞が自己複製能と多分化能といういわゆる幹細胞の性質をもち、その性質を有する癌幹細胞を起源としてがんが発生するのではない(造腫瘍能)という仮説である。癌幹細胞は、自己複製能、多分化能、造腫瘍能を有する細胞とされ、腫瘍全体では数%程度の数しか存在しない特別な細胞と考えられている。腫瘍幹細胞は正常幹細胞と類似点があることが示されており、

神経膠腫のc-myc, CD133, MGMT発現と予後

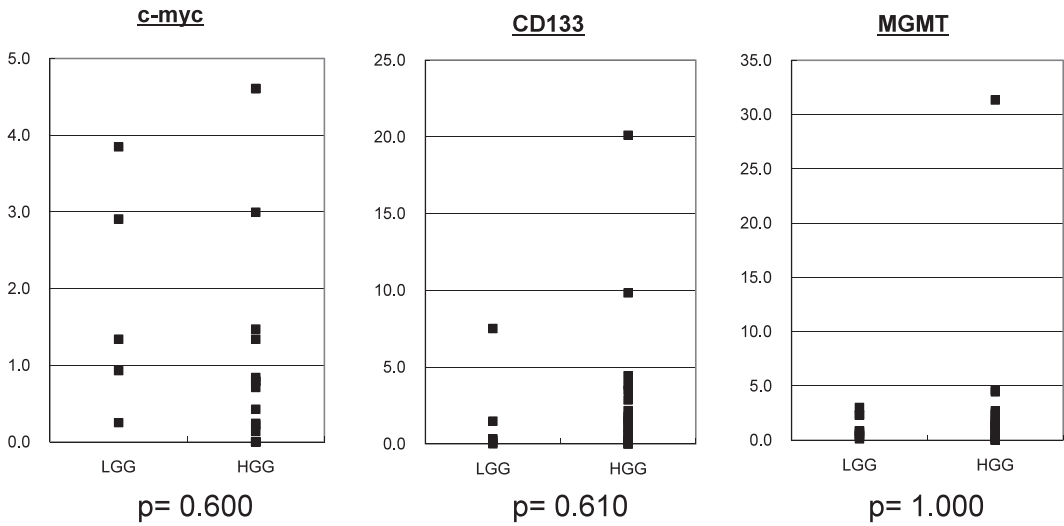


図2. 脳腫瘍グレードとタンパク質発現の関連

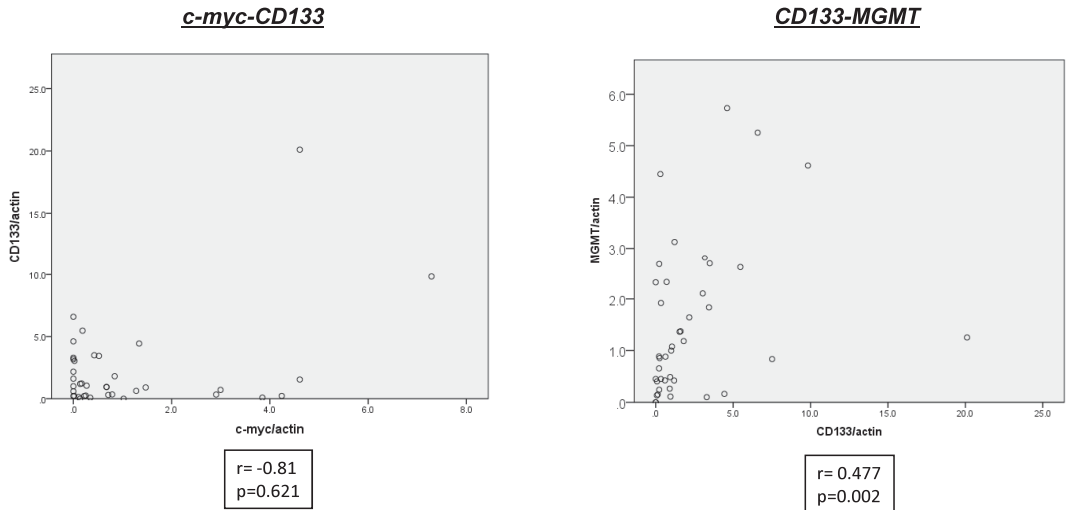


図3. c-mycとCD133, CD133とMGMT発現の関連

神経幹細胞マーカー **CD133**は腫瘍幹細胞マーカーとして用いられている。幹細胞の細胞内分子機構の解明は再生医学分野において重要な課題であるが、また同時に腫瘍幹細胞の細胞内分子機構を推測、理解するためにも非常に重要な課題となっている。その研究の成果としてがん遺伝子**c-myc**が細胞増殖や腫瘍形成に関与するだけでなく、幹細胞および腫瘍幹細胞の幹細胞

性維持にも重要な役割を担っていること<sup>5)</sup>、神経幹細胞、腫瘍幹細胞において**CD133**、**MGMT**が高発現していることが報告されており、化学療法抵抗性に寄与していることも報告されている。またそこで我々は**c-myc**タンパク質の高発現が腫瘍幹細胞を増やすことで**CD133**および**MGMT**の発現も上昇させているのではないかと、更にこのような腫瘍では予後不

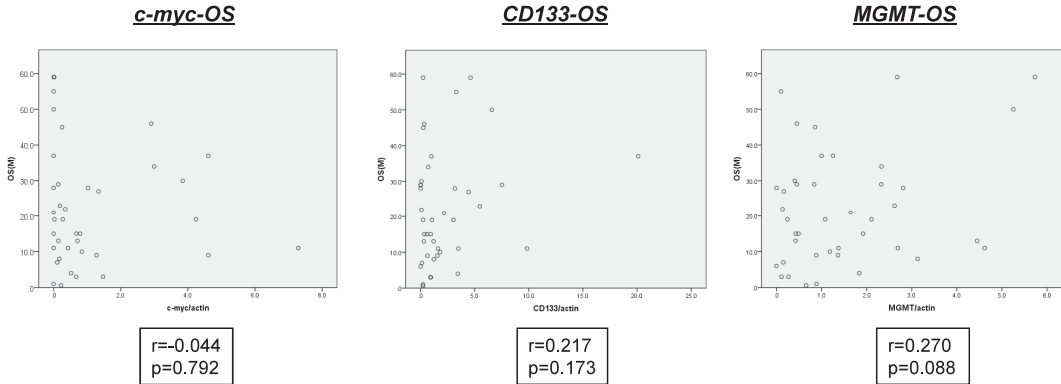


図4. c-myc, CD133, MGMTタンパク質発現と予後の関連

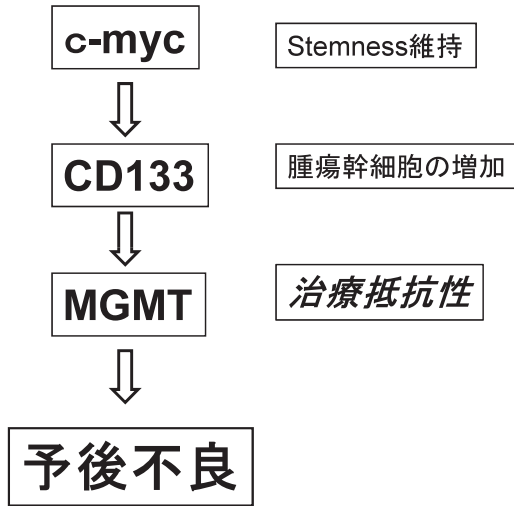


図5. 作業仮説

良ではないかという作業仮説 (図5) を立て検討を行った。

最初にLGGとHGGにて3種のタンパク質発現に差があるのかを検討した。その結果、HGGでは、3種のタンパク質すべてにおいてHGGで発現が高い傾向が認められたが、統計学的には有意差は認められなかった。次に、3つのタンパク質間の発現の相関について検討したが、CD133とMGMTの発現のみに統計学的に有意な相関が認められた。最後にこれらのタンパク質の発現と生存期間の相関について検討

したが、有意な相関は認められなかった。このような結果となった理由としては、まず実験系としてWestern blotは腫瘍以外の成分も含まれた検討になっている可能性があり、Western blot以外の解析方法も用いて検討を行うことが必要と考えている。またさらに重要な点として、神経膠腫において年齢、摘出率、パフォーマンスステータス (performance status) など臨床的な因子が予後因子となっていることが知られており、これらの影響が重なり統計学的な有意差が認められなかった可能性がある。今後症例数を増やして臨床因子を含めた検討、重回帰分析などを行うことが重要と考えている。

膠芽腫の治療反応性、治療予後予測に対するMGMT遺伝子のプロモーター領域のメチル化の重要性は、テモゾロミド+放射線治療が世界的標準治療であることを示したEORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) の報告と同時に発表された<sup>1), 7)</sup>。MGMTプロモーターメチル化の状態が治療反応性や予後に関与する分子機構として、プロモーターのメチル化によりMGMTタンパクの発現を減少し、テモゾロミドなどのアルキル化剤によるDNA損傷が修復されずに抗腫瘍効果を発揮しやすくするものと推測されている。NaganeらはWestern blotを用いて再発グリオーマのテモゾロミド反応性を検討したが、

MGMTタンパク質の発現の少ない症例では、再発後のテモゾロミド治療に対する治療反応性がMGMT発現を認める症例よりも良好であったと報告している<sup>8)</sup>。今回我々もNaganeらの方法に準じてタンパク質発現を解析し、治療予後との関係につき検討を行った。MGMTの治療抵抗性、治療予後予測因子としての関与については広く認められており、現在最もよく用いられるのはメチル化特異的PCRである。しかしながら、MGMTプロモーターメチル化のみがMGMTの働きを制御しているのではなく、メチル化特異的PCR (Methylation specific PCR: MSP)、定量PCRによるmRNA検出、免疫染色、Western blotなどの様々な検査方法を用いて検討がなされている<sup>9)-11)</sup>。Western blotやPCRでは腫瘍以外の細胞成分も含まれてしまう可能性があることが弱点であり、タンパク質発現局在が判定できる免疫染色が優れている。しかし、免疫染色やRT-PCRでは、陽性か否かのカットオフ値をどこにするのかで結果が異なってくる恐れもある。今後の臨床研究の結果を正確に評価するためにもMGMTの発現やプロモーターのメチル化の状態の判定方法の標準化が求められている。

今回、グリオーマのc-myc, CD133, MGMTの3種のタンパク質発現と予後との関連を検討した。c-myc, CD133, MGMTさらにOSとの関係を検討したものは我々が渉猟し得た限り本報が始めてである。今後は症例数を増やすとともにWestern blot以外の解析方法も用いて検討を加えてゆく必要があると考えている。

## 文 献

- Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al.: MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Eng J Med.* 2005; 352: 997-1003
- Zhang M, Song T, Yang L, Chen R, Yang Z, Fang J: Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008; 24: 85
- Sato A, Sakurada K, Kumabe T, Sasajima T, Beppu T, Asano K, et al.: Association of stem cell marker CD133 expression with dissemination of glioblastomas, *Neurosurg Rev.* 2010; 33: 175-183
- Bohl SR, Pircher A, Hilbe W: Cancer stem cells: characteristics and their potential role for new therapeutic strategies. *Onkologie* 2011; 34: 269-274
- Wang J, Wang H, Li Z, Lathia JD, McLendon RE, et al.: c-Myc is required for maintenance of glioma stem cells. *PLoS One* 2008; 3: e3769
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al.: Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5: 67
- Stupp R, Mason WP, van den vent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al.: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Eng J Med.* 2005; 352: 987-996
- Nagane M, Kobayashi K, Ohnishi A, Shimizu S, Shiokawa Y: Prognostic significance of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression in patients with recurrent glioblastoma treated with temozolomide. *Jpn J Clin Oncol.* 2007; 37: 897-906
- Sonoda Y, Yokosawa M, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Kumabe T, et al.: O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma. *Int J Clin Oncol.* 2010; 15: 352-358
- Lotfi M, Afsharnejad S, Razeiee HR, Ghaffarzadegan K, Sharif S, Shamsara J, et al.: Immunohistochemical assessment of MGMT

- expression and p53 mutation in glioblastoma multiforme. *Tumori* 2011; 97: 104-108
11. Capper D, Mittelbronn M, Meyermann R, Schittenhelm J: Pitfalls in the assessment of MGMT expression and in its correlation with survival in diffuse astrocytomas: proposal of a feasible immunohistochemical approach. *Acta Neuropathol*, 2008; 115: 249-259



## **Analysis of c-myc, CD133, and MGMT protein expression in glioma patients**

**Sho Tsunoda, Sho Nakamura, Kaori Sakurada\*, Kenichiro Matsuda\*,  
Shinya Sato\*, Takamasa Kayama\*,\*\***

*Yamagata University School of Medicine*

*\*Department of Neurosurgery, Yamagata University Faculty of Medicine*

*\*\*National Cancer Center*

### **ABSTRACT**

The cancer stem cell (CSC) model of tumor development suggests that the clinical behavior of a tumor is largely determined by a subpopulation of cells that are characterized by their ability to initiate the development of new tumors. Expression of CD133 and MGMT is higher in CSCs than in other cell types. Recently, c-myc has been reported to play an important role in the maintenance of stemness. We studied the protein expression patterns of c-myc, CD133 and MGMT in glioma patients, and their correlation with patient survival time. Protein expression in tumor tissues obtained from 41 patients with glioma (LGG 8, HGG 33) between January 2006 and December 2009 was analyzed by Western blotting. There was no significant difference in the expression of the three proteins between histological grades. Expression of CD133 protein showed a close correlation with the expression of MGMT protein. But there was no correlation between the expressions of any of the three proteins with patient survival time.

**Key words :** glioma, cancer stem cell, c-myc, CD133, MGMT, survival