

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2021
課題番号：17K17735
研究課題名(和文)再発膠芽腫の新規治療法：EUrd-CED法のラット脳幹部腫瘍モデルでの検討

研究課題名(英文)New therapy for recurrent glioblastoma, EUrd-CED

研究代表者

塚本 佳広 (Tsukamoto, Yoshihiro)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：90648891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はテモゾロミドに耐性を持ったヒト由来の脳腫瘍細胞株、動物モデルに対して新規に同定されたEUrdの局所投与(Convection enhanced delivery therapy, CED)の有効性の検討である。テモゾロミド耐性脳腫瘍細胞株を2系統樹立することができた。それぞれの細胞株で細胞実験が十分に可能であることを証明し、またNGT41という細胞株では免疫不全マウスにほぼ確実に脳腫瘍モデルを作成することが可能であった。ここまでの研究から免疫不全動物でのTMZ耐性脳腫瘍モデルが作成できることを確認し、今後EUrdを用いたCEDの治療実験を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は集学的な治療が行われる。治療初期は腫瘍の縮小などの効果が見られるが、徐々に治療耐性化することが問題である。本研究ではテモゾロミド耐性細胞への新規治療の研究である。ここまでの期間で、新規治療の研究に不可欠なヒト由来の脳腫瘍細胞株と免疫不全マウスへの移植モデルを確立した。またNGT41という細胞株でのモデルは、実際の患者さんと同様の薬剤を投与し、同様の治療経過を取ることも実証した。このようなマウスモデルは悪性神経膠腫などの悪性脳腫瘍への新規治療薬開発の為に大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study examined the efficacy of Convection enhanced delivery therapy (CED) with EUrd, a newly identified therapeutic agent, for human-derived tumor cell lines and animal xenograft models resistant to temozolomide. Two temozolomide-resistant brain tumor cell lines were established. Each cell line proved to be sufficiently capable of cell experimentation, and the NGT41 cell line could almost certainly generate brain tumor models in immunocompromised mice. In the future, we plan to proceed with CED treatment experiments using EUrd.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioma EUrd Glioblastoma

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Glioblastoma は脳に発生する高悪性度の脳腫瘍であり、temozolomide(TMZ)を中心とした化学療法と放射線治療が行われるが、その耐性獲得による再発が治療の問題点であった。申請者らは患者由来の Glioma initiating cells(GIC)を TMZ 含有培地での培養を行うことで TMZ 耐性 GIC を作成し、化合物スクリーニングを行い、EUrd が TMZ 耐性 GIC 株に対する治療効果を認めることを発見した。また、近年 ACNU などの抗がん剤を直接脳腫瘍に投与する治療、Convection enhanced delivery, CED が開発され臨床試験が行われている。EUrd は水溶性の化合物であり、ACNU-CED と同様に腫瘍内への直接投与により局所治療に応用可能と考えられ、動物モデルを用いた治療開発を進めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト由来の TMZ 耐性脳腫瘍幹細胞株を樹立し、動物モデルを用いて EUrd の局所投与 (EUrd-convection enhanced delivery system(EUrd-CED)を樹立することである。

3. 研究の方法

TMZ 耐性 GBM initiating cell の樹立。

当科での摘出組織を用いて、腫瘍細胞株を樹立し、TMZ 存在下での培養を行い、TMZ 耐性株として樹立する。

ラット脳幹部腫瘍モデルの樹立

作成した TMZ 耐性 GIC 株を免疫不全ラット脳に移植して腫瘍形成モデルを作成する。

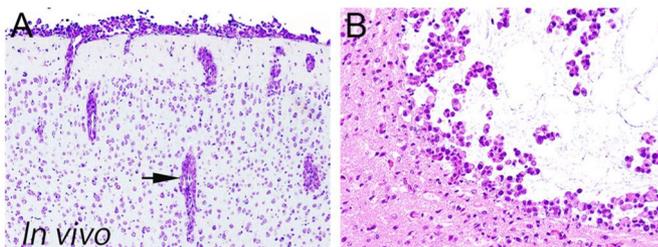
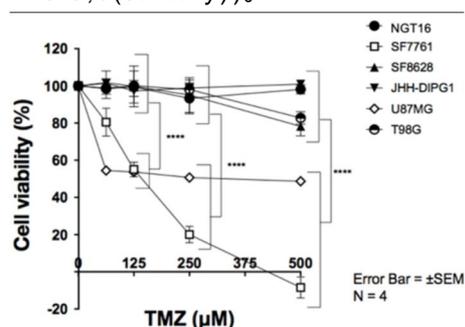
EUrd-CED 治療モデルの樹立

ラット脳幹部腫瘍モデルに CED 治療用ポンプを移植して治療モデルを作成する。

4. 研究成果

当科で摘出した悪性神経膠腫組織を用いて、腫瘍細胞株(NGT16, NGT41 など)を樹立することができた。NGT16 は脳幹部神経膠腫の摘出組織から樹立した。NGT16 は H3.1K27M mutant をサンガーシーケンスで確認し、Methylation specific PCR で MGMT promoter un-methylation が確認された。MGMT は TMZ 耐性の主な因子であり、NGT16 は TMZ 500 μ M の存在下でもほぼ殺傷効果がないことが確認された。NGT16 はすでに TMZ 耐性を獲得した腫瘍と考えられた(Fig.1)。また NGT16 からは ACVR1 の変異が確認された。この結果は今後脳幹部神経膠腫の治療標的として ACVR1 の阻害剤が有用である可能性が示唆された。ヌードマウスに移植実験を行ったが NGT16 は腫瘍形成を認めなかった。この NGT16 の研究成果は論文として発表した(Abe H, Natsumeda M, Okada M, Tsukamoto Y, et al. MGMT Expression Contributes to Temozolomide Resistance in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas. Front Oncol. 2020;9(January))。

NGT41 は Epithelioid glioblastoma の症例の剖検時の組織から細胞株を樹立した。実際の症例では照射と TMZ 治療の効果は限定的であったが、BRAFV600E 変異が検出されたことにより、Dabrafenib と Trametinib での治療を行い画像上の腫瘍縮小などの治療効果を認めた。樹立した細胞株である NGT41 は BRAFV600E 変異、TERT promoter (C250T) 変異、CDKN2A/2B 共欠失を踏襲されていた。実際の治療時に TMZ、アバスタチン、放射線照射が行われており、樹立した NGT41 細胞株も in vitro の検索では TMZ には強い耐性を示した。しかし、BRAFV600E 変異への治療薬 (BRAF, MEK 阻害薬、Dabrafenib, Trametinib) を用いることで、in vitro での治療効果を認めた。また皮下腫瘍マウスモデルを作成し、同様に Dabrafenib と Trametinib での治療効果を in vivo で認めた。またこの NGT41 はマウス脳内移植が可能な細胞株で且つ、TMZ 耐性腫瘍細胞株である(Fig.2)。脳移植モデルでも Dabrafenib と Trametinib での治療効果は有意差を持って証明されており、実臨床をモデルで再現することが可能な非常に有力な脳腫瘍マウスモデルを樹立することができた。この研究結果は論文として発表した(Kanemaru Y, Natsumeda M, Okada M, Tsukamoto Y, et al. Dramatic response of BRAF V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor: establishment and xenograft of a cell line to predict clinical



efficacy. Acta Neuropathol Commun. 2019;7(1):119.)

ここまでの研究から NGT41 という安定した細胞株を樹立することができた。今後ラット腫瘍モデルの作成を行い、Eurd-CED での治療実験につなげていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe Hideaki, Natsumeda Manabu, Okada Masayasu, Watanabe Jun, Tsukamoto Yoshihiro, Kanemaru Yu, Yoshimura Junichi, Oishi Makoto, Hashizume Rintaro, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 MGMT Expression Contributes to Temozolomide Resistance in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2019.01568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanemaru Yu, Natsumeda Manabu, Okada Masayasu, Saito Rie, Kobayashi Daiki, Eda Takeyoshi, Watanabe Jun, Saito Shoji, Tsukamoto Yoshihiro, Oishi Makoto, Saito Hirotake, Nagahashi Masayuki, Sasaki Takahiro, Hashizume Rintaro, Aoyama Hidefumi, Wakai Toshifumi, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Dramatic response of BRAF V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor: establishment and xenograft of a cell line to predict clinical efficacy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-019-0774-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe H, Natsumeda M, Kanemaru Y, Watanabe J, Tsukamoto Y, Okada M, Yoshimura J, Oishi M, Fujii Y.	4. 巻 58
2. 論文標題 MGMT Expression Contributes to Temozolomide Resistance in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas and MGMT Silencing to Temozolomide Sensitivity in IDH-Mutant Gliomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir	6. 最初と最後の頁 290-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.ra.2018-0044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Natsumeda Manabu, Tsukamoto Yoshihiro, Okada Masayasu, Oishi Makoto, Ahsan Sama, Tateishi Kensuke, Rodriguez Fausto J, Takahashi Hitoshi, Hovestadt Volker, Suva Mario L, Taylor Michael D, Eberhart Charles G, Kakita Akiyoshi et al.	4. 巻 80
2. 論文標題 GLI3 Is Associated With Neuronal Differentiation in SHH-Activated and WNT-Activated Medulloblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 129 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa141	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚本佳広、吉村淳一、棗田学、大石誠、岡本浩一郎、藤井幸彦
2. 発表標題 集学的治療を行った H3.1 K27M mutation を有する Diffuse Intrinsic Pontine Glioma の一例
3. 学会等名 日本小児神経外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本佳広、棗田学、岡田正康、江田岳誉、吉村淳一、岡本浩一郎、大石誠、藤井幸彦
2. 発表標題 小児悪性神経膠腫における Bevacizumab の治療効果に関する後方視的検討
3. 学会等名 日本脳腫瘍学会学術総会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------