

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18398

研究課題名（和文）中枢神経原発悪性リンパ腫の患者由来細胞株を用いた治療標的の探索

研究課題名（英文）Elucidation of novel therapeutic target using patient-derived primary central nervous system lymphoma xenograft models

研究代表者

三宅 勇平（MIYAKE, Yohei）

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：80837302

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：中枢神経系原発悪性リンパ腫の患者の腫瘍検体を処理し、これを免疫不全マウスに移植することで、23例の患者由来細胞株を樹立した。これらの細胞株は患者腫瘍の特徴を忠実に再現することが確認できた。また実験を通じて、中枢神経系原発悪性リンパ腫では、NF- κ B経路の下流であるRELA/p65の活性化が強い解糖系依存を引き起こし、腫瘍形成に関与していることを示した。そして、RELA/p65を標的とした治療が、効率的かつ網羅的に腫瘍制御効果を持つことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系原発悪性リンパ腫は加齢がリスク因子であり、高齢化社会の日本において増加傾向である。標準治療である化学療法と放射線治療では、半数以上が再発をきたし、また治療関連の副作用により認知機能障害を生じることがしばしばある。よって、本疾患の生物学的特徴に基づいた治療法の開発が望まれている。その観点より本研究結果は、予後不良である本疾患の新規治療開発の基盤となるものであり、今後臨床応用につながっていく可能性がある。近年増加傾向である本疾患に対し、生存予後、機能的予後を改善させる治療を開発することは社会的にも意義のあるものである。

研究成果の概要（英文）：After surgical biopsy, primary central nervous system lymphoma cells were implanted to the immunodeficient mice brain. As a result, 23 patient-derived cell lines were successfully established. We confirm their reproducibility between patient specimens and patient-derived cell lines. Using these cell lines, we found that RELA/p65, the downstream of NF- κ B signaling, induces excessive glycolysis, which drives tumor formation of primary central system lymphoma. In addition, we demonstrated that RELA/p65 targeted therapy has an efficient and comprehensive tumor control effect.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：中枢神経系原発悪性リンパ腫 患者由来細胞株 新規治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系原発悪性リンパ腫(Primary central nervous system lymphoma, PCNSL)は全国脳腫瘍集計で原発性脳腫瘍の約5%を占め、その発生頻度は高齢者を中心に増加傾向にある。標準治療での生存期間中央値3年程度、5年生存割合は30%程度と予後不良である。さらに高齢者においては、治療による認知機能低下をきたしやすくADLが大きく低下することが問題となる。腫瘍形成にはNF- κ B経路が重要な役割を持つことが知られ、その理論に基づく新規標的薬が探索されているが、飛躍的な治療成績向上には結びついていない。その背景には、前臨床試験を行うための実験モデルが皆無であり、詳細な機序や薬剤耐性に関連する機構が解明されていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

患者由来PCNSL細胞株(patient-derived xenograft; PDX model)がこれまで世界的にほぼ存在しなかったため、基礎研究結果に乏しかったが、申請者らの研究グループは患者由来PCNSL細胞株の樹立に取り組んでおりこれまでに世界最多の10種の細胞株の樹立に成功していた。本研究ではこれらのPDX modelを用いることで、NF- κ B経路の活性化がPCNSLの腫瘍形成や薬剤耐性にどのように関連しているかを解明するとともに、NF- κ B経路を標的とした新規標的治療を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新たなPCNSL細胞株の樹立

PCNSL検体を採取処理後、免疫不全マウスの大脳に移植する。局所脳腫瘍症状や全身衰弱が得られた時点で腫瘍片を採取する。得られた腫瘍組織はDNA、RNA抽出、病理組織片として保存するとともに、一部は細胞実験に活用する。また再度マウス脳に移植し継代を図る。

(2) 遺伝子解析

PCNSL細胞株に対して次世代シーケンサーを用いてwhole exome sequencingを行う。血液検体はコントロールとして活用する。高頻度に存在する一塩基バリエーション(SNVs)、コピー数多型(CNVs)を同定する。またこれまでに得られた検体を用いて上記のSNV、CNVの頻度を解析する。これによりどのような遺伝子異常が細胞株樹立(悪性化)に必要なか、またその遺伝子異常はPCNSLのどの程度に存在するか明らかにする。

(3) PCNSL細胞株に対する薬剤感受性評価

NF- κ B経路に関連する様々な薬剤治療後の細胞活性を、CellTiter-Gloを用いて測定する。治療感受性、不応性と上述の遺伝子解析結果の関連性を検討することで治療反応性、耐性機序を探索する。結果をもとに遺伝子変異強制発現、抑制モデルを作成し治療反応性にどのような影響を及ぼすか検討する。

(4) 遺伝子強制発現によるPDX model樹立

NF- κ B経路の上流であるB-cell receptor経路、Toll like receptor経路のkey signalであるCD79B、MYD88をshRNA及び阻害剤を用いて抑制することでPCNSL細胞株増殖に及ぼす影響を*in vivo*、*in vitro*レベルで解析する。

(5) 新規治療標的の開発

NF- κ B経路に関連する分子を抑制することで細胞増殖にどのような影響を及ぼすかを明らかにし、この結果を踏まえて強力な抗腫瘍効果を誘導する薬剤を同定する。標的となる分子を制御する遺伝子発現抑制モデルを用いて同様の細胞増殖抑制効果が得られるか検討する。加えて薬剤投与後の増殖シグナル応答、細胞死メカニズムなどについても生化学的に検証する。

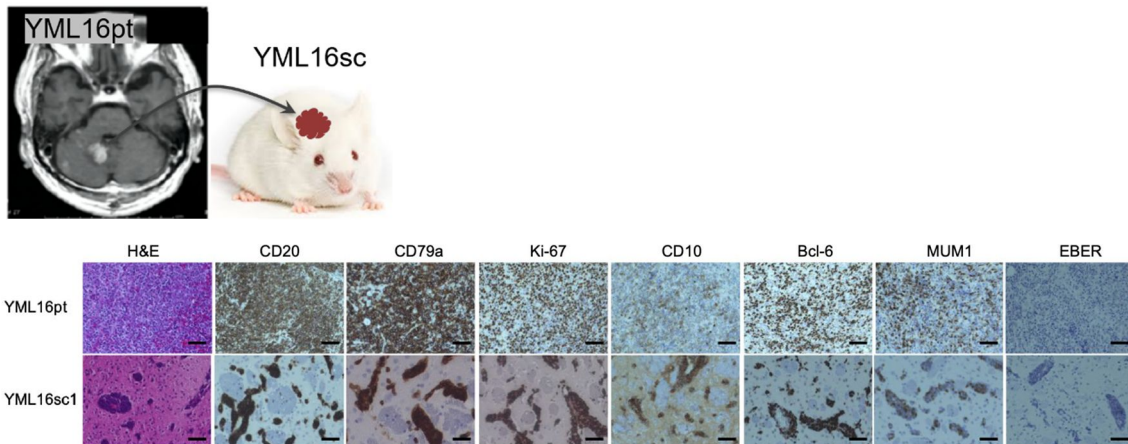
(6) マウス脳腫瘍モデルを用いた検討

*in vitro*にて治療標的候補を見出し、対象となる阻害剤を用いてマウス脳腫瘍モデルに対して生存期間延長効果が生じるか検討を行う。また遺伝子抑制細胞を脳内に移植し、腫瘍形成に及ぼす影響を明らかにする。抗腫瘍効果が観察されればそのメカニズムについて免疫染色等の手法を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト由来PCNSL細胞株の樹立

手術にて得られた検体の細胞化処理を行い、免疫不全マウスの大脳内に定位的に移植することで、現在まで23例のヒト由来PCNSL細胞株の樹立に成功した。病理学的検討、分子遺伝学的解析を通じてPDXモデルは患者腫瘍の遺伝型、表現型を忠実に再現するモデルであることを確認した。

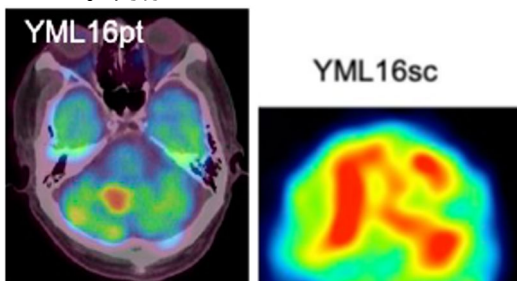


(2) 網羅的遺伝子解析により判明したドライバー遺伝子異常

PCNSL では通常再発時には腫瘍生検を行わないことから、腫瘍内における遺伝子異常に関する動的な変化を評価することは困難であった。そこで患者検体-PDX 間、更には異なる継代数の PDX-PDX 間における遺伝子異常の変化を解析するため、Epstein-Barr ウイルス(EBV)陰性 PCNSL 例に対し全エクソン解析を行った。その結果、患者検体-PDX 間において 90%以上の遺伝子異常が保持されていた。また腫瘍のドライバー遺伝子候補を探求したところ、*MYD88*、*CD79B*、*HIST1H1E* の 3 つの遺伝子変異が検出された。中でも *MYD88 L265P* 変異は全体の 80%、*CD79B* 変異は全体の 60%に認められ、*CD79B* 変異を有する腫瘍にはいずれも *MYD88* 変異が検出された。これらの遺伝子変異は常に PDX 内に保持されていた。重要な点として本解析を通じて *MYD88* や *CD79B* 変異は PCNSL 治療における有力な標的遺伝子異常であると考えられた。

(3) PCNSL は解糖系への強い依存性を示す

当施設症例の FDG-PET 結果を後方視的に検討したところ、正常脳白質と比較して腫瘍部では約 4 倍超の FDG 集積が認められた。解糖系蛋白発現を比較すると、腫瘍部では解糖系関連蛋白である glucose transporter 1 (Glut-1) や hexokinase 2 (HK-2) が正常脳と比較して高発現していた。同様に PDX モデルにおいても FDG 高集積、Glut-1、HK-2 高発現を確認した。



そこで解糖系を阻害することによる抗腫瘍効果を検討するため、解糖系を標的とした阻害剤さらには shRNA を用いて GLUT1、HK2 遺伝子を抑制したところ、細胞、動物モデルで強い抗腫瘍効果が認められた。このことから強い糖代謝は PCNSL の生存に重要な役割を果たしていることが判明した。

我々は、PCNSL で重要と考えられている *MYD88/CD79B* 遺伝子変異に起因する NF- κ B 経路の活性化が上述の解糖系依存を誘導していると仮説を立て、これらの遺伝子をノックダウンした。結果、NF- κ B 経路関連蛋白である RelA/p65 の発現抑制とともに HK-2 の発現低下が認められ、更には細胞活性の減弱を認めた。また動物モデルでも PDX 形成抑制が認められた。また NF- κ B 阻害剤 (IKK 阻害剤)、shRNA での NF- κ B *RELA* 遺伝子抑制にて、HK-2 発現抑制、細胞活性の減弱が生じた。このことから RelA/p65-HK-2 経路が PCNSL の進展に重要な役割を果たすことが示された。

(4) RELA/p65 を標的とした治療の開発

複数の細胞株を用いた Highthroughput screening より、RELA/p65 を標的とした治療が効率的かつ網羅的に抗腫瘍効果を持つことを見出した。現在、対象薬物について、細胞死のメカニズム、マウスモデルでの生存期間延長効果などを検証している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tateishi Kensuke, Miyake Yohei, Kawazu Masahito, et al.	4. 巻 80
2. 論文標題 A Hyperactive RelA/p65-Hexokinase 2 Signaling Axis Drives Primary Central Nervous System Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5330 ~ 5343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-20-2425	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三宅勇平, 立石健祐, 河津正人, 笹目丈, 中村大志, 市村幸一, 山本哲哉.
2. 発表標題 中枢神経原発悪性リンパ腫患者由来細胞株を用いたibrutinib不応・耐性機序の探索.
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yohei Miyake, Masahito Kawazu, Hiroaki Wakimoto, Kensuke Tateishi, Tetsuya Yamamoto.
2. 発表標題 Proteasome inhibition exposes selective vulnerability in central nervous system lymphoma.
3. 学会等名 SNO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅勇平, 中村大志, 河津正人, 笹目丈, 本間博邦, 市村幸一, 脇本浩明, 山本哲哉, 立石健祐.
2. 発表標題 プロテアソーム阻害は中枢神経悪性リンパ腫に対する強力な抗腫瘍効果を発揮する
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅勇平、立石健祐、中村大志、笹目丈、林貴啓、本間博邦、池谷直樹、村田英俊、山本哲哉
2. 発表標題 中枢神経悪性リンパ腫におけるNF- B関連遺伝子異常と臨床、画像所見との対比.
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------