

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09401

研究課題名（和文）TERTを標的とした悪性髄膜腫の新規治療法開発

研究課題名（英文）Development of TERT-targeting novel therapy of malignant meningioma

研究代表者

高橋 雅道（TAKAHASHI, Masamichi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：10436454

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）：悪性髄膜腫は外科的摘出術のみでの根治はほぼ不可能である一方で未だ悪性髄膜腫に有効な化学療法、分子標的療法が存在しない。近年我々はエリブリンによるTERT遺伝子変異を持つ膠芽腫に対する医師主導治験を展開した。悪性髄膜腫ではTERT遺伝子変異が高率に認められるため、本研究では悪性髄膜腫へのエリブリンの治療効果を解析し臨床応用へ結びつけることを目標とした。悪性髄膜腫細胞株に対しエリブリンによる殺細胞効果の評価を行い、マウス悪性髄膜腫モデルにて抗腫瘍効果を評価したところ、エリブリンは腫瘍抑制効果および生存期間の延長を示した。以上からエリブリンは悪性髄膜腫に対する有望な薬剤であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未だ有効な化学療法、分子標的療法が存在しない悪性髄膜腫に対し、今回の研究ではTERT遺伝子異常によるRdRP活性に着目してエリブリンがこの難治性腫瘍に対する治療薬候補として有望であることを証明した。従来は手術と放射線治療しか治療方法としての選択肢がなかったこの難治性腫瘍に対して、前臨床研究により新規治療法開発の理論的基盤を構築することが出来た意義は大きいと考えられる。今後は、希少疾患である悪性髄膜腫に対して多施設共同臨床試験の実施によりこの薬剤の有効性が検証されることが望まれる。

研究成果の概要（英文）：Malignant meningioma is impossible to cure by surgical resection alone, while there are still no effective molecular targeting therapies for this tumor. Recently, we have developed an investigator-initiated clinical trial of eribulin for glioblastoma with TERT mutations. As TERT mutations are highly prevalent in malignant meningiomas, the aim of this study was to analyze the therapeutic efficacy of eribulin in malignant meningiomas and to translate the results into clinical application. The cytotoxicity effect of eribulin on malignant meningioma cell lines was evaluated, and the anti-tumor effect was assessed in mouse tumor models, where eribulin showed effectiveness in tumor growth suppression and prolongation of survival of mouse models. These results suggest that eribulin is a promising agent for the treatment of malignant meningiomas.

研究分野：脳神経外科

キーワード：髄膜腫 TERT エリブリン

1. 研究開始当初の背景

最新の日本脳腫瘍統計および全国がん登録によれば、髄膜腫は原発性脳腫瘍の中で最も発生数が多く原発性脳腫瘍の約 20%を占め、年間発生数は約 2000 人～2500 人程度と推算される (Committee of Brain Tumor Registry of Japan, Neurol Med Chir (Tokyo). 2017)。そのほとんどは外科的切除によって治癒する WHO Grade I の良性腫瘍である一方で、約 15%は WHO Grade II または III に分類される悪性髄膜腫である。悪性髄膜腫は初回の外科的摘出術のみでの根治はほぼ不可能であり、繰り返す再発に対して複数回の手術と放射線治療を組み合わせた複合的治療が必要である。しかし、近年の遺伝子解析により *NF2*、*TERT*、*PIK3CA*、*CDKN2A/B/C*、*AKT1*、*SMO*、*TRAF7* など多数の遺伝子変異が報告され、特に *TERT* 遺伝子異常は悪性髄膜腫に高率に認められる一方で、未だ悪性髄膜腫に有効な化学療法、分子標的療法が存在しない。度重なる外科的摘出術と放射線治療には限界があり患者は徐々に神経機能の減衰を経て最終的に死に至るため、悪性髄膜腫に対する有効な化学療法、分子標的療法の開発は急務である。

2. 研究の目的

近年我々はテロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) 遺伝子変異が持つ RNA 依存型 RNA ポリメラーゼ活性 (RdRP 活性) を強力に阻害するエリブリンという抗がん剤を用いて、*TERT* 遺伝子変異を持つ膠芽腫に対する医師主導治験を展開した。悪性髄膜腫では *TERT* 遺伝子変異が高率に認められるため、本研究では悪性髄膜腫へのエリブリンの治療効果と効果発現機序を解析して臨床応用へ結びつけることを目標とした。

3. 研究の方法

まず悪性髄膜腫細胞株の入手と細胞株の遺伝子変異解析、およびエリブリンを用いた殺細胞効果の解析を行った。入手した細胞株における *TERT* 遺伝子発現解析、RdRP 活性測定、エリブリン感受性試験などを行う事で基本的な細胞特性を明らかにした。次に、髄膜腫細胞株を用いた安定したマウス皮下腫瘍モデル、脳腫瘍モデルを作成した。悪性髄膜腫マウス脳腫瘍モデルへのエリブリンを用いた生存実験・解析実験を行い、エリブリン治療による効果発現のメカニズム解明を目標として、腫瘍細胞の病理学的検討、遺伝子発現解析、RdRP 活性測定を行い、これらの成果を英文論文として発表した。

4. 研究成果

IOMM-Lee, HKBMM の 2 種類の悪性髄膜腫細胞株を用いて研究を行った。IOMM-Lee 細胞と HKBMM 細胞について WST assay を行ったところ、極めて低濃度のエリブリンが用量依存的に両細胞株の増殖を抑制することが示された (図 1)。エリブリンが微小管阻害を介して有糸分裂を阻害することを示したこれまでの知見に基づき、エリブリン処理下での細胞周期の状態をフローサイトメトリーで評価すると両細胞株において、用量依存的に G2/M 期細胞の集積が観察された。さらに、細胞周期相分布の変化は、エリブリン暴露の直後に検出された。従って、エリブリンは少量のエリブリンで速やかに細胞周期の停止を誘導し、悪性髄膜腫細胞株の細胞増殖を阻止すると考えられた。

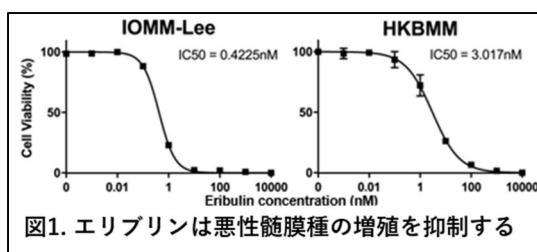


図1. エリブリンは悪性髄膜腫の増殖を抑制する

続いて悪性髄膜腫細胞に対するエリブリンの機能的影響を調べるため、エリブリン暴露下でのチューブリン発現を immunoblotting で測定し、微小管阻害剤としてのエリブリンの役割を評価したところ、IOMM-Lee 細胞を 100 nmol/L のエリブリンで処理するとチューブリン発現は低下したが、10 nmol/L エリブリンでは低下しなかった。さらに *TERT* 阻害、テロメラーゼ阻害、およびエリブリン曝露が IOMM-Lee 細胞生存能の抑制に及ぼす影響を評価した。*TERT* siRNA で処理すると、IOMM-Lee 細胞の *TERT* mRNA レベルと細胞増殖率が低下した (図 2)。次に、テロメラーゼ機能不全を引き起こす 6-チオ-2-デオキシグアノシン (6-Thio-dG) で処理した IOMM-Lee 細胞の細胞生存率を、エリブリンの存在下または非存在下で評価したところ、6-Thio-dG 単独で IOMM-Lee 細胞の細胞増殖の有意な抑制を示した。

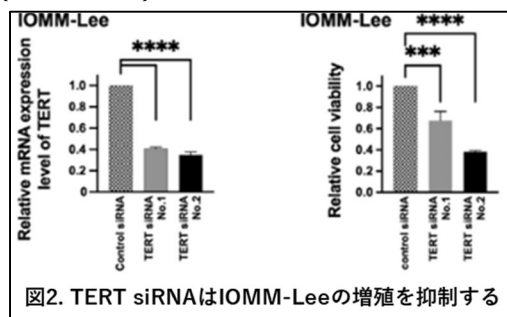


図2. *TERT* siRNAはIOMM-Leeの増殖を抑制する

エリブリンによる細胞死を定量的に評価するために、vital dye exclusion assay を用いた。その結果、IOMM-Lee 細胞および HKBMM 細胞において、エリブリンの用量および時間依存的な細胞毒性作用が示された (図 3)。両細胞株で腫瘍細胞に細胞毒性を示したエリブリンの濃度は IC50 値より高かったが、それでもかなり低かった。細胞死がアポト

ーシスによって引き起こされたかどうかを決定するために、Z-VAD-FMK (カスパーゼ阻害剤) 前処理の効果を測定したところ、暴露後に死亡率の有意な減少を示した。その他、アポトーシスに関するいくつかの特徴的タンパク質の挙動を観察するとタンパク質の切断が阻害され、悪性髄膜腫細胞におけるエリブリンによるアポトーシス誘導の分子メカニズムを理解するためエリブリン処理した細胞溶解液を用いてDNA損傷応答、小胞体ストレス応答(ERSR)および細胞膜局在性デスレセプターを介したシグナル伝達に焦点を当てたところ、エリブリン処理後、DNA損傷応答シグナル活性化のマーカであるp53の発現亢進と、細胞膜のデスレセプターであるDR5のアップレギュレーションがIOMM-Lee細胞とHKBMM細胞の両方で確認された。しかしこれらの分子の発現上昇の程度は、エリブリンの投与量とは相関せず、逆にERSR活性化のマーカであるBipの発現は検出されなかった。これらの結果を総合すると、エリブリンによって誘導された悪性髄膜腫細胞のアポトーシスはDNA損傷応答と細胞膜のデスレセプターによって制御される複雑な分子メカニズムが存在することが示唆された。

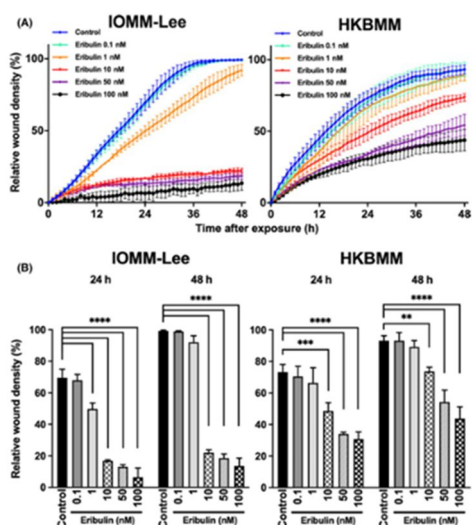


図3. エリブリンは容量依存性に悪性髄膜種細胞に対して細胞毒性を示した

最後に、悪性髄膜腫マウスモデルにおけるエリブリンの抗腫瘍効果を立証するために、*in vivo* 実験を行った。事前にIOMM-LeeとHKBMM細胞をヌードマウスの左脇腹に皮下移植し安定して生着することを確認した後に、皮下腫瘍モデルでのエリブリンの有効性を試験するためIOMM-Lee異種移植マウスの皮下に生理食塩水または3つの異なる用量のエリブリン(0.125、0.25、0.5mg/kg)を週3回腹腔内注射したところ、エリブリンが用量依存的に皮下腫瘍の増殖を有意に抑制することを確認した。その後、悪性髄膜腫細胞株によるマウス脳腫瘍モデルを作成するため硬膜下1mmに定位的に注入した(2.5×10⁵細胞)。安定な同所性悪性髄膜腫マウスモデルの作成に成功し、病理学的にもヒト悪性髄膜腫と類似した表現型を示した。これにより対照群(生理食塩水投与; n=8)、エリブリン2サイクル投与群(n=8)、エリブリン継続投与群(n=8)の3群間で全生存期間を解析した。その結果、IOMM-Lee、HKBMMの両者においてエリブリンの長期投与は全生存期間を有意に延長した(図4)。

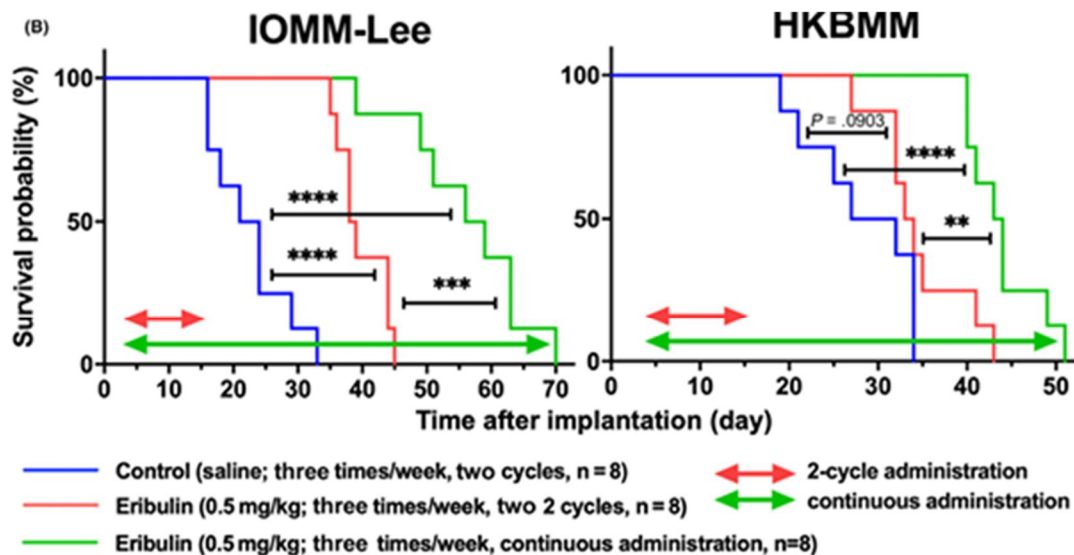


図4. エリブリンはマウス悪性髄膜種脳腫瘍モデルの生存期間を延長した

以上から本研究によりエリブリンは悪性髄膜腫に対する新しい治療法として有望であると考えられた。今後はこれらの成果を基に臨床試験への応用を視野に入れてさらに研究を進展させることが重要と考えられた。

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 1件）

1. 著者名 Nakano Tomoyuki, Fujimoto Kenji, Tomiyama Arata, Takahashi Masamichi, Achiha Takamune, Arita Hideyuki, Kawauchi Daisuke, Yasukawa Mami, Masutomi Kenkichi, Kondo Akihideo, Narita Yoshitaka, Maehara Taketoshi, Ichimura Koichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Eribulin prolongs survival in an orthotopic xenograft mouse model of malignant meningioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 697 ~ 708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 中野智行、藤本健二、富山新太、高橋雅道、阿知波孝宗、有田英之、河内大輔、安川麻美、増富健吉、近藤聡英、成田善孝、前原健寿、市村幸一
2. 発表標題 エリブリンは悪性髄膜腫マウスモデルの生存期間を延長する
3. 学会等名 第60回ニューロ・オンコロジーの会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野智行、藤本健二、富山新太、高橋雅道、阿知波孝宗、有田英之、河内大輔、安川麻美、増富健吉、近藤聡英、成田善孝、前原健寿、市村幸一
2. 発表標題 エリブリンは悪性髄膜腫マウスモデルの生存期間を延長する
3. 学会等名 第41回東京脳腫瘍治療懇話会
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
---------	---------