

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17949

研究課題名（和文）悪性髄膜腫に対する新規薬物療法の開発を目指す基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research aimed at developing new drug therapies for malignant meningioma

研究代表者

佐野町 友美（Sanomachi, Tomomi）

山形大学・医学部・医員

研究者番号：20812465

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）：悪性髄膜腫は予後不良で新規治療法の開発が望まれている。以前我々はマウスモデルにてゲムシタピン（Gem）により高悪性度髄膜腫の長期制御が可能であったこと、更に分子dCK及びhENT1に注目しGem高感受性の機序を明らかにした。悪性髄膜腫は術後補助放射線療法を要する疾患であるが電離放射線（IR）との併用でのGemの腫瘍抑制効果については未検討であった。そこでこれらの相互作用を調べた。Gemは老化を誘導することにより悪性髄膜腫細胞をIRに対して感作させIRによる細胞内の活性酸素種産生を増強し細胞増殖が抑制された。結論として悪性髄膜腫の放射線増感剤候補としてのGemの可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良な疾患である悪性髄膜腫の新規候補薬剤としてゲムシタピン（Gem）高感受性の機序を解明するために分子dCKとhENT1に着目し、dCKとhENT1がGemの感受性を経て髄膜腫患者におけるより強い腫瘍細胞増殖活性並びにより短い予後に寄与していることが明らかとなった。悪性髄膜腫へのGemの有用性を支持すると共にそれら分子が将来的に抗悪性腫瘍薬への反応性予測因子となる可能性が考えられた。また悪性髄膜腫の術後補助放射線療法に着目し未検討であったGemとIRの併用効果を調べた。結果としてGemはIRの効果を高める放射線増感剤となりうることも示唆され、更にGemの臨床応用性を高める結果が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Development of a new treatment method for malignant meningioma, which has a poor prognosis, is desired. Previously, we reported that gemcitabine (Gem) was capable of long-term control of high-grade meningiomas in mouse models. Furthermore, we focused on dCK and hENT1 which are molecules involved in Gem sensitivity, and clarified the mechanism of Gem hypersensitivity in malignant meningiomas. Malignant meningioma is a disease that requires postoperative adjuvant radiation therapy, but the tumor suppressive effect of Gem in combination with ionizing radiation (IR) has not been investigated. Therefore, we investigated these interactions. By inducing aging, Gem sensitized malignant meningioma cells to IR, enhanced intracellular reactive oxygen species production by IR, and suppressed cell proliferation. In conclusion, the possibility of Gem as a radiosensitizer candidate for malignant meningioma was suggested.

研究分野：悪性髄膜腫

キーワード：ゲムシタピン 電離放射線 細胞老化 活性酸素種 放射線増感剤

1. 研究開始当初の背景

髄膜腫の中でGrade Ⅰに分類される悪性髄膜腫(脳腫瘍取り扱い規約第3版追補)は全体の1割弱(国内)から2割(海外)を占めている。悪性髄膜腫に対しては最大限の外科的切除に加え症例に応じて放射線治療が用いられるが、再発後は有効な治療手段がなく予後不良となっている。このような治療抵抗性再発悪性髄膜腫に対しては薬物療法の開発が期待されるが、近年多標的チロシンキナーゼ阻害薬スニチニブの有効性が第Ⅰ相試験で示されたものの単発的な報告に留まっており(1)、前臨床レベルで有効性が示されている薬物自体ほとんど存在せず、未だ萌芽段階で国内・外ともに新規治療薬の開発が望まれていた。このような現況の中、我々は悪性髄膜腫が数ある抗腫瘍薬の中でも代謝拮抗薬ゲムシタピンに対して細胞レベルまたヒト悪性髄膜腫細胞の異種移植により作成した動物モデルレベルにおいても特異的に高い感受性を示し、またゲムシタピンの繰り返し投与により長期的な腫瘍制御が可能であることを見出した(2)。更にゲムシタピンの臨床応用性を促すため悪性髄膜腫がゲムシタピン高感受性になりうる機序と感受性の規定因子についても検討を行った。ゲムシタピンが腫瘍細胞で働くには、ゲムシタピンの細胞内取り込みを行う輸送体のhENT1と活性化律速酵素のdCKの2つの分子が主に関与するため、これら分子に注目してgrade ⅠからⅣの異なる髄膜腫より樹立した細胞株(M-20-UとM-10-S、M-16-N及びHKBMM、IOMM-Lee)を用いてゲムシタピン感受性の機序を検討した。結果として、それら分子の発現は、髄膜腫細胞の悪性度およびゲムシタピンの感受性と正に相関を示し、高悪性度髄膜腫のゲムシタピン高感受性に寄与している可能性が示唆された。また手術検体でも同様にhENT1とdCKの発現量は高悪性度髄膜腫で高かった。高悪性度髄膜腫細胞において、hENT1とdCKの発現抑制およびhENT1の機能抑制はいずれもゲムシタピンへの感受性を低下させ、それら分子が実際にゲムシタピンの感受性に重要な役割を果たしていることが確かめられた。以上より、高悪性度髄膜腫細胞は、hENT1とdCKの発現が高いためゲムシタピンに高い感受性を示すことが明らかになった。更に、病理検体での検討を通じて、hENT1とdCKは高悪性度髄膜腫で高い発現を示すことが明らかになり、高悪性度髄膜腫に対してゲムシタピンが有効である可能性が示唆された。我々の検討によりゲムシタピンの分子機序レベルでの悪性髄膜腫に対する有効性が示唆されたが、次の臨床的な問題点として、悪性髄膜腫は手術後に補助放射線療法を要するが、その際の標準的な全身療法は確立されていないこと(3,4)が挙げられた。また、モデルマウスを用いた悪性髄膜腫治療実験では、ヒトに用いられるレジメンと同様にゲムシタピンの休薬期間を設けると腫瘍の再増大がおきるがゲムシタピン再投与によりその都度腫瘍は縮小するため腫瘍制御自体は長期的に可能であるが、完全な腫瘍制御を目指すためにはゲムシタピンの作用を強化する、あるいは作用点の異なる治療法との併用が必要ではないか?との疑問も挙げられた。また悪性髄膜腫細胞においてゲムシタピンが電離放射線(IR)とどのように相互作用するかは不明なままであった。

そこで以下の点を検討課題とした。

- 1) 悪性髄膜腫細胞株においてゲムシタピンは電離放射線を増感しうるか?
- 2) 1)を満たす場合、悪性髄膜腫細胞株においてゲムシタピンの電離放射線の増感の基礎的なメカニズムは何か?

2. 研究の目的

本研究では上に挙げた2つの課題に取り組むことを通じて「悪性髄膜腫に有効な全身療法」を

世界に先駆けて確立することを目的とした。本研究は我々のオリジナル研究を足がかりとしつつ、さらにオリジナル知見に基づいて研究計画を策定した極めて独自性の高い提案であり、所期の成果を得た場合「悪性髄膜腫の化学療法という未開の分野」にブレイクスルーをもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

(1) In vitroでの電離放射線による悪性髄膜腫細胞の増殖抑制効果がゲムシタピンにより増強しうるかの検討

ヒト悪性髄膜腫細胞株であるIOMM-Lee及びHKBMMを用いて、ある範囲のゲムシタピン濃度(2-3 nM)及び放射線量(1-2 Gy)において放射線とゲムシタピンの併用がそれぞれの治療単独よりも細胞生存率を低下されるかどうかを調べた。

(2) In vivoでの電離放射線による悪性髄膜腫細胞の増殖抑制効果がゲムシタピンにより増強しうるかの検討

皮下及び頭蓋内悪性髄膜腫マウスモデルを用いてゲムシタピンとIRの併用による腫瘍抑制効果を検討した。

(3) ゲムシタピンとIRの併用による悪性髄膜腫細胞での増殖抑制効果の分子的機序の検討

HKBMM およびIOMM-Lee 細胞を用いて、ゲムシタピンの放射線増感作用の機序を検討した。ゲムシタピンの放射線増感作用にはアポトーシス細胞死が関与しているとの報告(4, 5)があり、アポトーシス細胞死に対する両者の併用効果を検討した。

(4) ゲムシタピンと組み合わせ効果を示す薬剤のスクリーニング

我々は以前に、様々な種類のがん細胞を用いて、抗アポトーシス分子Survivinの抑制を介し抗腫瘍薬の感受性を高めるゲムシタピンをはじめとした新規薬剤の報告をしてきた(6-8)。それら薬剤を含め既存情報からゲムシタピンとの組み合わせで有効性が期待される薬剤を選定し、その組み合わせ効果をWST-8アッセイで検討した。

4. 研究成果

(1) In vitro, in vivoでの悪性髄膜腫細胞に対するゲムシタピンとIRの併用による腫瘍抑制効果の検討

In vitroでの悪性髄膜腫細胞に対するゲムシタピンとIRの併用による腫瘍抑制効果の検討
IOMM-Lee及びHKBMM悪性髄膜腫細胞において、ある範囲のゲムシタピン濃度及び放射線量の併用はそれぞれの単独治療よりも細胞生存率を低下させた。更にこの組み合わせはいずれかの治療単独よりもコロニー形成活性を抑制した。

In vivoでの悪性髄膜腫細胞に対するゲムシタピンとIRの併用による腫瘍抑制効果の検討

皮下及び頭蓋内悪性髄膜腫マウスモデルでゲムシタピンとIRの併用効果を検討した。
IOMM-Lee、HKBMM皮下腫瘍モデルのいずれにおいてもどちらか一方の治療よりも併用療法で腫瘍の成長抑制が見られた。更に頭蓋内髄膜腫モデルではゲムシタピンとIRの併用は有意差を持ってマウスの生存期間を延長した (P=0.0018 vs IR処置群, P=0.0064 vs ゲムシタピン処置群)。

(2) In vitro, in vivoでの悪性髄膜腫細胞に対するゲムシタピンとIRの併用による腫瘍抑制機序の検討

In vitro, in vivoでの悪性髄膜腫細胞に対するゲムシタピンとIRの併用による腫瘍抑制効果の増強が解ったので、次にその機序を検討した。既報告よりゲムシタピンの放射線増感作用にはア

ポトース細胞死が関与していることが判明していたため、髄膜腫細胞でのアポトース細胞死に対する両者の併用効果を検討したが、両者の併用により細胞死やアポトースは誘導されなかった。しかし、細胞形態の観察により、細胞の肥大化、扁平化、多核化といった細胞老化の特徴が誘導され、また老化細胞のマーカーであるSA-β-galやDNA損傷マーカーであるH2AXの遺伝子発現が増加していることが判明した。老化を誘導するメカニズムとして活性酸素種（ROS）の増加は原因の一つと報告され(9, 10)、その関与について検討した。In vitroにおいてゲムシタピンはIRによる細胞内のROS産生を増強し、この組み合わせによって誘導される細胞増殖抑制/老化とともに、これらがN-アセチルシステインによって抑制されたことからこれらの組み合わせにおけるROSの極めて重要な役割が示唆された。またin vivoにおいてもゲムシタピンとIRの併用はIOMM-LEE及びHKBMMマウスモデルにおいてSA-β-gal活性を増強させ、in vivoでの細胞老化マーカーであるKi-67の標識指数をそれぞれの治療単独よりも低下させた。

(3) ゲムシタピンの作用を強める候補薬剤のスクリーニング

以前の研究において、いくつかの試薬の小規模な探索的スクリーニングの結果、ゲムシタピンの効果を高める候補薬剤をいくつか同定していたが、追加検討にてゲムシタピンとの併用で効果を増強する薬剤を見出すことは困難であった。今回の研究でゲムシタピンとIRの併用で細胞老化が誘導される点に着目し、数種の老化防止薬の中から特に、Bcl-2タンパク質を阻害する老化防止薬Navitoclaxに注目した。In vitroにてNavitoclaxはゲムシタピンとIRと併用することで細胞抑制効果を示し、これらの併用効果を更に高めた。またin vivoにおいてcleaved caspase 3陽性のアポトースが増加を示し、老化細胞のアポトース細胞死を強力に誘導することを見出した。

<引用文献>

1. Kaley TJ, Wen P, Schiff D, Ligon K, Haidar S, Karimi S, et al. Phase II trial of sunitinib for recurrent and progressive atypical and anaplastic meningioma. *Neuro Oncol.* 2015;17(1):116-21.
2. Takeda H, Okada M, Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Sanomachi T, et al. Antitumor activity of gemcitabine against high-grade meningioma in vitro and in vivo. *Oncotarget.* 2017;8(53):90996-1008.
3. Le Rhun E, Taillibert S, Chamberlain MC. Systemic therapy for recurrent meningioma. *Expert Rev Neurother.* 2016;16(8):889-901.
4. Paldor I, Awad M, Sufaro YZ, Kaye AH, Shoshan Y. Review of controversies in management of non-benign meningioma. *J Clin Neurosci.* 2016;31:37-46.
5. Pauwels B, Vermorken JB, Wouters A, Ides J, Van Laere S, Lambrechts HA, et al. The role of apoptotic cell death in the radiosensitising effect of gemcitabine. *Br J Cancer.* 2009;101(4):628-36.
6. Suzuki S, Yamamoto M, Sanomachi T, Togashi K, Sugai A, Seino S, et al. Brexpiprazole, a Serotonin-Dopamine Activity Modulator, Can Sensitize Glioma Stem Cells to Osimertinib, a Third-Generation EGFR-TKI, via Survivin Reduction. *Cancers (Basel).* 2019;11(7).
7. Sanomachi T, Suzuki S, Togashi K, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C, et al. Brexpiprazole Reduces Survivin and Reverses EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Lung and Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.* 2019;39(9):4817-28.

8. Sanomachi T, Suzuki S, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Togashi K, et al. Olanzapine, an Atypical Antipsychotic, Inhibits Survivin Expression and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents. *Anticancer Res.* 2017;37(11):6177-88.
9. Song Y, Baba T, Mukaida N. Gemcitabine induces cell senescence in human pancreatic cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;477(3):515-9.
10. Li M, You L, Xue J, Lu Y. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review. *Front Pharmacol.* 2018;9:522.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 TOGASHI KEITA, OKADA MASASHI, SUZUKI SHUHEI, SANOMACHI TOMOMI, SEINO SHIZUKA, YAMAMOTO MASASHIRO, YAMASHITA HIDETOSHI, KITANAKA CHIFUMI	4. 巻 40
2. 論文標題 Inhibition of Retinoblastoma Cell Growth by CEP1347 Through Activation of the P53 Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4961 ~ 4968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14499	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 -
1. 著者名 Kuramoto Kenta, Yamamoto Masahiro, Suzuki Shuhei, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Seino Shizuka, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 287
2. 論文標題 Verteporfin inhibits oxidative phosphorylation and induces cell death specifically in glioma stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 2023 ~ 2036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15187	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 -
1. 著者名 Suzuki Shuhei, Okada Masashi, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Seino Shizuka, Sato Atsushi, Yamamoto Masahiro, Kitanaka Chifumi	4. 巻 295
2. 論文標題 Therapeutic targeting of pancreatic cancer stem cells by dexamethasone modulation of the MKP-1/JNK axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 18328 ~ 18342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.015223	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 -
1. 著者名 Suzuki Shuhei, Yamamoto Masahiro, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Sugai Asuka, Seino Shizuka, Okada Masashi, Yoshioka Takashi, Kitanaka Chifumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Doxazosin, a Classic Alpha 1-Adrenoceptor Antagonist, Overcomes Osimertinib Resistance in Cancer Cells via the Upregulation of Autophagy as Drug Repurposing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 273 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8080273	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 -

1. 著者名 Yamamoto Masahiro, Sanomachi Tomomi, Suzuki Shuhei, Uchida Hiroyuki, Yonezawa Hajime, Higa Nayuta, Takajo Tomoko, Yamada Yuki, Sugai Asuka, Togashi Keita, Seino Shizuka, Okada Masashi, Sonoda Yukihiro, Hirano Hirofumi, Yoshimoto Koji, Kitanaka Chifumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Roles for hENT1 and dCK in gemcitabine sensitivity and malignancy of meningioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 945 ~ 954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/noab015	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 -

1. 著者名 SUZUKI SHUHEI, YAMAMOTO MASAHIRO, SANOMACHI TOMOMI, TOGASHI KEITA, SEINO SHIZUKA, SUGAI ASUKA, YOSHIOKA TAKASHI, OKADA MASASHI, KITANAKA CHIFUMI	4. 巻 41
2. 論文標題 Lurasidone Sensitizes Cancer Cells to Osimertinib by Inducing Autophagy and Reduction of Survivin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4321 ~ 4331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15237	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 -

1. 著者名 Yamamoto Masahiro, Sanomachi Tomomi, Suzuki Shuhei, Togashi Keita, Sugai Asuka, Seino Shizuka, Sato Atsushi, Okada Masashi, Kitanaka Chifumi	4. 巻 3
2. 論文標題 Gemcitabine radiosensitization primes irradiated malignant meningioma cells for senolytic elimination by navitoclax	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/oaajnl/vdab148	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 -

1. 著者名 Kuramoto Kenta, Yamamoto Masahiro, Suzuki Shuhei, Togashi Keita, Sanomachi Tomomi, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of the Lipid Droplet? Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Axis Suppresses Cancer Stem Cell Properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 99 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes12010099	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 -

1. 著者名 Suzuki Shuhei, Yamamoto Masahiro, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Sugai Asuka, Seino Shizuka, Yoshioka Takashi, Okada Masashi, Kitanaka Chifumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Dexamethasone Sensitizes Cancer Stem Cells to Gemcitabine and 5-Fluorouracil by Increasing Reactive Oxygen Species Production through NRF2 Reduction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 885 ~ 885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11090885	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tomomi Sanomachi
2. 発表標題 Spironolactone reduces survivin expression and chemosensitizes cancer cells to non-DNA-damaging anticancer drugs
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------