

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17966

研究課題名(和文) 難治性髄芽腫に対する分子標的治療開発の試み

研究課題名(英文) Trial of advanced molecular targeted therapy for refractory medulloblastoma.

研究代表者

中川 智義 (Nakagawa, Tomoyoshi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60837946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：希少な難治性小児悪性脳腫瘍である髄芽腫は、近年、分子遺伝学的背景によっていくつかの悪性度の異なるサブタイプに分類できることが明らかとなってきました。我々はこの点に着目し、本邦における髄芽腫のサブタイプ別発生頻度を検討したり、臨床検体を用いた腫瘍細胞培養モデル作成、腫瘍細胞抗原性確認、動物移植実験を行う等の研究を行いました。その結果、髄芽腫の中でも最も悪性度の高いgroup3と呼ばれるサブタイプでは、他のサブタイプよりも細胞培養モデルの樹立に成功しやすい可能性や、動物移植モデル作成に成功しやすい可能性等が示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで髄芽腫の腫瘍細胞初代培養モデルを作成することは比較的困難とされてきましたが、悪性度の高いGroup3と呼ばれるサブタイプの腫瘍では比較的成功率が高い可能性が示され、細胞培養モデルを用いた他の基礎研究に応用できる可能性が示唆されました。さらに、培養に成功しなかったとしても、臨床検体から腫瘍細胞を単離し、抗原抗体反応とフローサイトメーターを用いて細胞に特定の抗原が発現しているかを確認する手法が有効であることを確認しました。これらの研究成果は、髄芽腫をはじめとした難治性がんに対する抗体療法やCAR-T療法の開発を目的とした研究に応用できる可能性があり、意義のある成果だと考えられます。

研究成果の概要(英文)：Medulloblastoma, a rare and intractable malignant pediatric brain tumor, has recently been found to be classified into several subtypes with different degrees of malignancy based on molecular genetic background. We have focused our attention on this point and conducted studies on the frequency of occurrence of each subtype of medulloblastoma in Japan, as well as on the creation of tumor cell culture models using clinical specimens, confirmation of tumor cell antigenicity, and animal transplantation experiments. As a result, it was suggested that the most malignant subtype of medulloblastoma, group 3, may be more likely than other subtypes to be successfully established in cell culture models and to be successfully transplanted into animal models.

研究分野：小児脳腫瘍

キーワード：medulloblastoma brain tumor PDX CAR-T therapy

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児の悪性脳腫瘍の一つである髄芽腫は、近年の大規模な遺伝学的解析により 4 つのサブグループ (WNT、SHH、group 3、group 4) に分類でき、その発症機序の違いによる治療効果や予後の違いが存在することが明らかとなってきている。中でも、多くを占める group 3 および group 4 では播種例や再発例が多く、また、化学放射線療法の効果も限定的で、WNT や SHH に比して著しく予後不良であることが多い。髄芽腫のこういった播種や再発に関する機序は完全には明らかではなく、セカンドラインの治療法も未だ確立されていない。本研究では、更なる髄芽腫治療成績の向上に寄与するために、group 3・group 4 に相当する髄芽腫細胞の解析や動物実験モデルを確立することなどを目的とした。また、髄芽腫等難治性悪性脳腫瘍に対する新規の治療法として、キメラ抗原受容体 T 細胞療法 (CAR-T 療法) と呼ばれ主に血液腫瘍の分野で実用化されている免疫学的治療法を応用する試みが近年欧米でみられており、基礎研究レベルでは髄芽腫や他の希少な悪性脳腫瘍に対する CAR-T 療法の開発、とくに治療標的となりうる新規抗原を同定する試みが積極的に行われている。我々はこの点にも着目し、髄芽腫に加え他の希少かつ難治の小児悪性脳腫瘍 (膠芽腫・上衣腫) についても併せて腫瘍細胞の解析研究を行い、悪性脳腫瘍細胞の抗原性などを key とした新規治療法の開発に繋げられる基礎研究を目標として、研究を行うこととした。

2. 研究の目的

当施設は関西地方あるいは西日本において比較的小児悪性脳腫瘍の集積する施設である。当施設において利用可能な実際の臨床腫瘍組織検体を用いて、きわめて難治かつ機能的予後も不良な小児悪性脳腫瘍である髄芽腫、膠芽腫、上衣腫等について、遺伝分子的プロファイルに基づいた詳細な分類・評価を行い、さらに、腫瘍細胞としての培養可能性を探索する。さらに、単離した腫瘍細胞を用いて、腫瘍細胞移植による動物実験モデル系 (PDX マウスモデル) 樹立や、腫瘍細胞の表面に発現している腫瘍抗原に関連した検索も試みる。これらの実験を通して、最終的には、本邦臨床症例における髄芽腫分子分類の海外既報への適合性の確認や、新規免疫療法の開発に繋げられるような悪性脳腫瘍細胞の新規抗原の同定等を最終的な目標とする。

3. 研究の方法と得られた結果

髄芽腫臨床検体を用いた検体の分子遺伝学的解析・病理組織学的解析と統合解析

当施設で得られた髄芽腫 1 検体の下記解析を行った。

(i) FISH 法による標的遺伝子検索

C-MYC(8q24)および MYCN(2p24)遺伝子増幅の有無を検索したが、増幅は確認されなかった。

(ii) Sanger シークエンス法による遺伝子変異検索

CTNNB1 変異および TP53 変異は認められなかった。明らかな染色体異常は確認されなかった。

(iii) 免疫組織学的検索

カテニン核内陰性、p53 < 5% であった。

(iv) 病理学的検索

退形成性は目立たず、結節性病変なし、classic type medulloblastoma。臨床的に播種所見は認めなかった。

上記所見を含めた統合解析にて、当該検体を group4 髄芽腫と診断した。

髄芽腫腫瘍細胞の維持培養可能性の検討

膠芽腫等の高悪性度脳腫瘍では、Neuro-sphere 培養と呼ばれる培養法によって維持培養が可能な症例があることが示されている。Neuro-sphere 培養とは、腫瘍細胞を単細胞に単離し、B27 等のサプリメントおよび LIF、EGF、FGF 等の組織因子を加えた無血清培地中で、細胞がクラスターを形成しつつ増殖し、患者検体の腫瘍背景をよく反映した腫瘍細胞として維持培養できる培養法である。Neuro-sphere 培養が可能か否かは症例によって異なるが、一般的には悪性度の高い腫瘍で成功率が高いとされるが、膠芽腫以外の脳腫瘍での培養可能性に関する報告はまだ少ない。今回我々は当該 group4 髄芽腫腫瘍細胞を用いて Neuro-sphere 培養を試みた。その結果、開始 1 か月程度までは腫瘍細胞によるクラスター形成や増殖が確認されたが、以降は増殖の速度が急激に低下し、長期の維持は困難であった。また、DMSO 加培地を用いた凍結保存試験を行ったが、解凍後の細胞活性は乏しく、本標本については現行の手法での長期の継代維持や凍結継代は困難であると考えられた。なお、我々は既に先行実験において group3 髄芽腫の 1 検体について、比較的長期の安定した継代維持や凍結保存が可能な検体を保有していることから、より予後不良であり悪性度が高いと考えられる group3 に比して group4 での腫瘍細胞の維持培養の樹立成功可能性が低い可能性が示唆された。

PDX マウスモデル樹立可能性の検討

患者組織標本由来の腫瘍細胞を免疫不全マウスに移植することにより、疾患/治療モデルとして PDX マウスモデルを樹立できる可能性を検討した。単離した腫瘍細胞を NOG マウス (NOD/scid) の脳内に定位的に注射することによりマウスモデル作成を試みた。具体的には Neuro-sphere 法と同様の手法により単離した腫瘍細胞を 2×10^6 個/2ul PBS の濃度とし、頭蓋骨を部分的に切開

し穿頭したマウスの脳実質内に定位手術装置を用いて移植した（動物実験については当施設の規定に準拠し実施した）。group3 髄芽腫腫瘍組織検体を移植したマウスについては生着が確認されたが、脳実質を圧排する致死的な占拠性病変には成長しなかった。group4 腫瘍組織検体では明らかな生着の確認は困難であった。一方、膠芽腫組織検体を用いた実験ではおおむね3か月程度で致死性のある明らかな占拠性病変が認められた。

患者由来腫瘍細胞培養モデルを用いた細胞表面の腫瘍抗原性の検討

我々はまず、膠芽腫手術検体から樹立した初代培養株を用いた独自の方法により、膠芽腫細胞表面に発現する特異的抗原を検索し、続いて、脳腫瘍の各臨床検体におけるその発現の有無を比較検討することで、新規の治療標的となりうる腫瘍抗原を探索する試みを行った。髄芽腫細胞自体の培養は前項の通り可能な症例に限られたため、まず膠芽腫において多くの腫瘍抗原候補を得て、これに対する抗体と、髄芽腫や上衣腫等の腫瘍検体を用いて抗原性を確認する手順とした。具体的には、手術検体から作成した膠芽腫細胞初代培養株で免疫した BALB/c マウスのリンパ節から B 細胞を抽出、マウスミエローマ細胞と融合・不死化させモノクローナルに培養することで、膠芽腫細胞に対する抗体産生細胞とモノクローナル抗体の組合せを多数得た。得られた抗体を5例の膠芽腫及び1例の髄芽腫、1例の上衣腫、ならびにてんかん外科手術により得られた非腫瘍性脳細胞と反応させ、フローサイトメトリーを用いて腫瘍細胞に特異的に結合するものを選抜した。その結果、脳腫瘍細胞に結合し非腫瘍性細胞には結合しない1つの抗体を選抜した。この抗体の認識する抗原は、遺伝子解析の結果、汎腫瘍抗原 CD276(B7-H3)であった。

4. 研究成果

希少な難治性小児悪性脳腫瘍である髄芽腫の病態解明および治療法開発のためには、詳細な腫瘍細胞プロファイルの解析・蓄積が必要不可欠である。腫瘍細胞の安定した培養モデルを樹立することはこれに大きく資すると考えられる。その中で、最も悪性度の高いgroup3では、group4に比して、細胞培養モデルの樹立に成功しやすい可能性、また、動物移植モデル(PDXマウスモデル)作成に成功しやすい可能性が示唆された。その一方で、まだまだ希少疾患であるため、症例数自体は少なく、本邦における4型分子分類別の構成比を検討するには及ばなかった。また、表面抗原の検索においては、膠芽腫細胞株にて樹立した抗体ライブラリを使用することで、髄芽腫や上衣腫といった腫瘍にも共通して発現している汎腫瘍抗原 CD276(B7-H3)を同定することができた。さらに、我々の手法は、もし仮に細胞培養モデルの樹立に成功しなかったとしても、手術直後の臨床検体から腫瘍細胞を単離し、抗原抗体反応とフローサイトメーターを用いて細胞に特定の抗原が発現しているかを確認することができるため、今後、細胞培養株の樹立が困難な腫瘍検体の抗原性についても、樹立済みの細胞株に対する抗体ライブラリを用いることで確認可能であることが示唆された。以上のように、我々の研究成果は、髄芽腫をはじめとした難治性がんにおける細胞株や動物実験モデルの樹立、また、新規治療標的となりうる腫瘍抗原の検索、さらにはこれを用いた抗体療法や CAR-T 療法の開発といった新規の研究に応用できる可能性があり、極めて有意義な成果だと考えられる。

本研究内の部分的成果について以下の学会において発表した。

第21回日本分子脳神経外科学会(2021/9/24)口演

患者由来初代培養株を用いた膠芽腫の特異的抗原検索と CAR-T 療法への応用可能性の検討

中川 智義、木嶋 教行、長谷川 加奈、黒田 秀樹、平山 龍一、沖田 典子、香川 尚己、金村 米博、保仙 直毅、貴島 晴彦

第80回日本脳神経外科学会総会(2021/10/29)シンポジウム

膠芽腫の患者由来初代培養株を用いた特異的抗原検索と CAR-T 細胞療法への応用可能性の検討

中川 智義、木嶋 教行、長谷川 加奈、黒田 秀樹、平山 龍一、沖田 典子、香川 尚己、金村 米博、保仙 直毅、貴島 晴彦

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 中川智義、木嶋教行、長谷川加奈、黒田秀樹、平山龍一、沖田典子、香川尚己、金村米博、保仙直毅、貴島晴彦
2. 発表標題 患者由来初代培養株を用いた膠芽腫の特異的抗原検索とCAR-T療法への応用可能性の検討
3. 学会等名 第21回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川智義、木嶋教行、長谷川加奈、黒田秀樹、平山龍一、沖田典子、香川尚己、金村米博、保仙直毅、貴島晴彦
2. 発表標題 膠芽腫の患者由来初代培養株を用いた特異的抗原検索と CAR-T細胞療法への応用可能性の検討
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
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
---------	---------