

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20792

研究課題名（和文）びまん性正中神経膠腫における腫瘍微小環境の検討と新規腫瘍溶解ウイルスの開発

研究課題名（英文）A novel oncolytic virus therapy targeting tumor microenvironment of diffuse midline glioma

研究代表者

富田 祐介 (Tomita, Yusuke)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90963033

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：H3.3K27M変異を持つマウスDiffuse midline glioma (DMG)細胞株を試験管内で安定して培養することができた。DMG細胞株におけるH3.3K27M変異の存在はサンガーシーケンシングで確認できた。マウスES細胞から脳幹と同様の特徴を持つ脳オルガノイドへと分化誘導することができた。DMG細胞株を脳オルガノイドと共培養すると、DMG細胞株が脳オルガノイド全体に接着して増殖能は亢進し、一部のDMG細胞は内部に浸潤した。DMG細胞の単独培養条件下においては腫瘍溶解ヘルペスウイルスの投与を行うことで有意な細胞障害性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DMGは放射線療法が一時的な効果を示すのみで現時点で有効な治療法がない難治性の腫瘍である。DMGの治療が難しい理由として摘出が難しいこと、血液脳関門があり薬剤が腫瘍に到達できないことが挙げられる。腫瘍溶解ヘルペスウイルスは腫瘍内投与することで腫瘍細胞でのみ増幅して細胞障害性を示すことができる特徴がある。今回の実験で試験管内におけるDMGへの有効性は確認ができた。今後、さらに共培養条件下において腫瘍溶解ウイルスの有効性を確認し、さらに有効性を向上させる併用治療の開発ができれば臨床応用に向けて大きく先進すると期待される。

研究成果の概要（英文）：We could stably maintain the murine diffuse midline glioma (DMG) cell lines that had H3.3K27M mutation in vitro. DMG cells mainly proliferated to form spheroid cell clusters, but some DMG cell lines easily differentiated to the adhesive cells. H3.3K27M mutant protein was indirectly confirmed with Green Fluorescent Protein (GFP) tagged to H3.3K27M structure. Also, H3.3K27M sequence was validated by Sanger sequencing. We could induced differentiation from the murine embryonal stem cells to brainstem organoid under the specific conditions. Co-culture with DMG cells and brainstem organoid made DMG cells more proliferative around the organoid. Oncolytic herpes virus had the cytotoxic effect in vitro against the DMG cells.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：びまん性正中神経膠腫 変異ヒストン蛋白 脳オルガノイド 腫瘍溶解ヘルペスウイルス

1. 研究開始当初の背景

① DMG の疫学

DMG は主に小児の脳幹に発生する悪性腫瘍である。有効な薬物療法はなく、我々の過去 15 年における DMG1523 例の解析でも年齢調整死亡率は低減していないことから新規治療の開発が急務である (参考文献 1)

自然発生マウス DMG モデル

筆者らはヒストン変異 (H3.3K27M) を含む複数遺伝子を生後マウスに導入することでマウス脳内に高い浸潤能と増殖能をもつ腫瘍を自然発生させた。これを初代継代培養することで in vitro での評価系に応用することも可能である。また、H3.3K27M を導入することで epithelial-mesenchymal-transition (EMT) 関連遺伝子の発現が亢進することが確認された。

脳腫瘍に対する腫瘍溶解ヘルペスウイルス療法

oHSV 療法は腫瘍細胞特異的に細胞死を誘導する。2015 年に米国 FDA に承認となり、成人悪性神経膠腫である膠芽腫に対して日本国内外で臨床試験が行われている (参考文献 2)。

2. 研究の目的

H3.3K27M を持つ DMG 細胞に対して in vitro, in vivo の環境下で oHSV による治療を行い発現型・表現型変化を評価する。これにより oHSV の DMG への有効性を示し臨床試験へつなげる。

3. 研究の方法

① H3.3K27M を発現するマウス DMG モデルの樹立

マウス脳幹内に GFP タグを付けた H3.3K27M を PDGFA、p53 欠失と共に導入して (参考文献 3)、腫瘍を自然発生させる (図 1A)。

H3.3K27M を発現するマウス DMG 細胞株の樹立

Flow cytometry を行い、GFP 陽性細胞のみを抽出して一次培養を行う (図 1B)。

DMG 細胞株の ex vivo 環境における正常組織への浸潤性についての検討

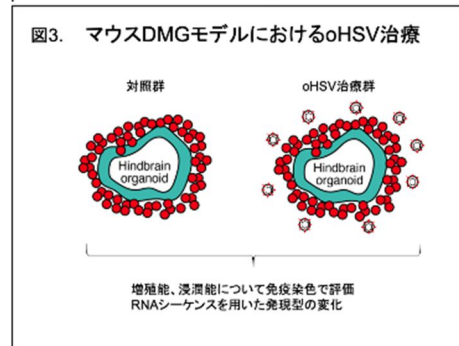
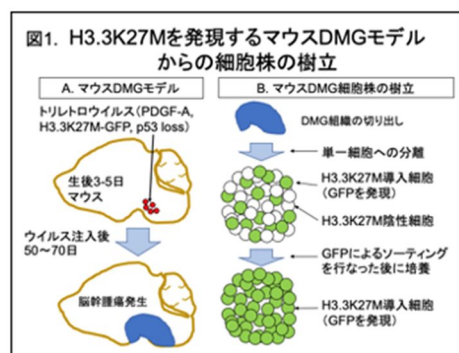
マウス ES 細胞から PDGFA/Olig2/Nestin を発現する脳オルガノイドへと分化誘導させた後に、マウス DMG 細胞株との共培養を行い浸潤能や増殖能について評価する (図 2)。

oHSV が DMG 細胞株の増殖能および浸潤性に与える影響についての検討

上述の実験モデルにおいて oHSV を共培養時に培養液に投与して浸潤能について GFP 蛍光を参考に経時的な観察を行う。増殖能については抗 Ki-67 抗体を、浸潤能について抗 GFP 抗体を用いた蛍光染色で評価する。浸潤する腫瘍組織については single cell RNA シーケンスを行い oHSV 抵抗性を示す要因の検索も行う (図 3)。

oHSV のマウス DMG モデルにおける治療効果についての検討

マウス DMG 細胞株を免疫保持マウスの脳幹に局注し、画像検査で腫瘍形成が確認された時点で oHSV を腫瘍内投与し、生存期間および組織学的解析を行う。



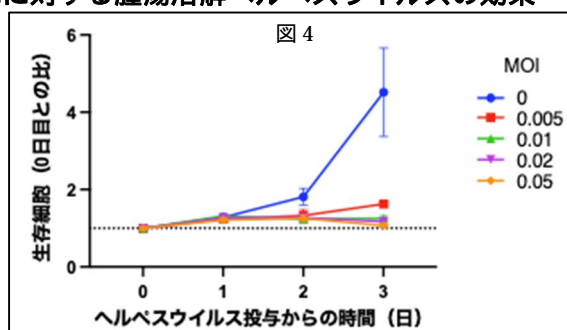
#### 4. 研究成果

##### ① H3.3K27Mを発現するマウス DMG 細胞株の試験管内培養

H3.3K27M 変異を持つマウス DMG 細胞株を試験管内で安定して培養することができた。多くの DMG 細胞株は球状の形態を持って増殖したが一部の DMG 細胞株では接着細胞へと容易に分化するものもあり培養条件の検索に苦慮した。DMG 細胞における H3.3K27M 変異の存在はサンガーシーケンスでも確認できた。

##### H3.3K27Mを発現するマウス DMG 細胞に対する腫瘍溶解ヘルペスウイルスの効果

3 種類の DMG 細胞株を試験管内で単独培養を行った。腫瘍溶解ヘルペスウイルスである RAMBO は悪性神経膠腫細胞株に対する治療効果が確認されていることから（参考文献 4）これを用いて DMG 細胞株に対する治療効果を検証した。4 つの多重感染度（multiplicity of infection: MOI）を用いて検討した結果、MOI 0.005 でいずれの細胞株においても有意に DMG 細胞の増殖を抑えることができた（図 4）。



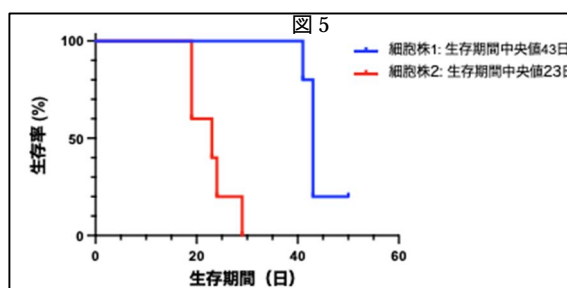
##### DMG 細胞株の ex vivo 環境における正常組織への浸潤性

マウス ES 細胞から一定の順序で培養条件を変えていくことで同様の特徴を持つ脳オルガノイドへと分化誘導することができた。DMG 細胞株を脳オルガノイドと共培養すると、DMG 細胞株が脳オルガノイド全体に接着して増殖能は亢進した。共培養を行うことで一部の DMG 細胞がオルガノイド内に浸潤することを確認した。

今後、DMG の浸潤を確認する最適な共培養条件の検討を行なっていく。その上で共培養下での DMG 細胞の増殖能の変化や腫瘍溶解ヘルペスウイルスの治療効果を検討していく。また、ヒト DMG 細胞株を用いた試験管内実験、マウス DMG モデルを用いた治療実験も計画していく予定である。

##### oHSV のマウス DMG モデル確立

2 種類の DMG 細胞株を用いてマウス DMG モデルの作成を行った。マウスは免疫保持マウス (C57BL/6) を使用した。生後 4-6 週マウスの脳幹部に定位的に投与することで浸潤性をもつ腫瘍を形成することが確認できた。生存期間中央値は 2 つのモデルでそれぞれ 43 日、23 日であり腫瘍は全てのマウスにおいて安定して形成された(図 5)。



今後、腫瘍溶解ヘルペスウイルスを用いた治療実験に応用していく予定である。

1. Tomita Y et al., Neurooncol Adv, 2021
2. Friedman GK et al., N Engl J Med, 2021
3. Tomita Y et al., Glia, 2022
4. Tomita Y et al., Mol Cancer Ther, 2019

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomita Y, Shimazu Y, Somasundaram A, Tanaka Y, Takata N, Ishi Y, Gadd S, Hashizume R, Angione A, Pinero G, Hambardzumyan D, Brat DJ, Hoeman CM, Becher OJ	4. 巻 70(9)
2. 論文標題 A novel mouse model of diffuse midline glioma initiated in neonatal oligodendrocyte progenitor cells highlights cell-of-origin dependent effects of H3K27M	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 1681-1698
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.24189.	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 該当する
1. 著者名 Tomita Y, Hibler EA, Suruga Y, Ishida J, Fujii K, Satomi K, Ichimura K, Hirotsune N, Date I, Tanaka Y, Otani Y	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Age is a major determinant for poor prognosis in patients with pilocytic astrocytoma: a SEER population study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Medicine	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） 10.1007/s10238-022-00882-5.	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 該当する
1. 著者名 小野原大介、久保田穰、富田祐介、河野龍義	4. 巻 40(11)
2. 論文標題 若手研究者の画期的成果が集い交流を深めたUJA論文賞2022	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1750-1752
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Suruga Y, Satomi K, Otani Y, Fujii K, Ishida J, Uneda A, Tsuboi N, Makino K, Hirano S, Kemmotsu N, Imoto R, Mizuta R, Tomita Y, Yasuhara T, Washio K, Yanai H, Matsushita Y, Hibiya Y, Yoshida A, Capper D, Ichimura K, Date I	4. 巻 160(1)
2. 論文標題 The utility of DNA methylation analysis in elderly patients with pilocytic astrocytoma morphology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 179-189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-022-04131-3.	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 該当する

1. 著者名 Hattori Y, Kurozumi K, Otani Y, Uneda A, Tsuboi N, Makino K, Hirano S, Fujii K, Tomita Y, Oka T, Matsumoto Y, Shimazu Y, Michiue H, Kumon H, Date I	4. 巻 17(8)
2. 論文標題 Combination of Ad-SGE-REIC and bevacizumab modulates glioma progression by suppressing tumor invasion and angiogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0273242.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0273242.	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 富田祐介, Oren J Becher
2. 発表標題 びまん性正中グリオーマモデルにおけるCDK4/6阻害薬とMEK阻害薬の併用効果
3. 学会等名 第36回中国四国脳腫瘍研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 駿河和城、富田祐介、里見介史、大谷理浩、田中仁啓、家護谷泰仁、水田 亮、井本良二、劔持直也、平野秀一郎、牧野圭悟、坪井伸成、石田穰治、藤井謙太郎、安原隆雄、鷲尾佳奈、柳生広之、市村幸一、伊達 勲
2. 発表標題 大規模データ及びゲノムワイドメチル化解析による毛様細胞性星細胞腫の予後因子の検討
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会(現地・Web併催)
4. 発表年 2022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
---------	---------