

悪性脳腫瘍に対する培養細胞株の樹立および精密医療への応用の試み



新潟大学脳研究所 腫瘍病態学分野 准教授

新潟大学医歯学総合病院 ゲノム医療部 がんゲノム医療センター長

粟田 学

はじめに

悪性脳腫瘍は稀少腫瘍であり、治療が確立していないものが多く、治療開発が急務である。2019年がんゲノムパネル検査の保険収載とともにがんゲノム医療が日本国内で実現し、悪性脳腫瘍に対しても精密医療が期待されたが、脳腫瘍の場合には薬剤が血液脳関門を通過しないと腫瘍に到達しないという特殊性から他の癌種と比べると、精密医療の治療開発が遅れている。そこで、我々は脳腫瘍培養細胞株を樹立し、培養細胞に治療を施すことにより最適な治療が選択できると考えており、10年前より研究を進めて来た。本稿ではそれらの試みについて解説し、今後の展望についても述べたい。

精密医療の重要性を認識した一例

初期治療中に脊髄播種を来たして両下肢麻痺となった*BRAF* V600E変異を有する稀なepithelioid glioblastomaの症例に対して、*BRAF* V600E変異を有する難治性進行性悪性黒色腫に対して保険収載をされていたダブラフェニブ（*BRAF*阻害剤）、トラメチニブ（*MEK*阻害剤）を用いたところ、著効した。がんゲノムパネル検査が保険収載される以前の症例であり、精密医療の重要性を認識させられる一例となった。また、標準治療（テモゾロミド併用放射線治療）抵抗性の膠芽腫症例には今まで間違った治療を行って来たことを痛感させられた。剖検時に*BRAF* V600E変異を有する膠芽腫細胞株（NGT 41株）を樹立し、培養細胞および皮下腫瘍、頭蓋内腫瘍モデルにて標的治療の有効性を検証した（図1）¹⁾。その後、横浜市立大学立石らとの共同研究で、*BRAF* V600E変異を有する膠芽腫に対する分子標的療法の耐性機構およびHSP90阻害剤の併用による耐性克服を報

告した²⁾。本研究を通して、精密医療の大切さ、可能性を身に染みて感じると同時に、先日、ダブラフェニブ、トラメチニブの保険適応拡大がなされ、ついに*BRAF* V600E変異を有する悪性神経膠腫に対して標的治療が可能となった。その後、当ラボでは一例一例手術した悪性脳腫瘍患者の摘出腫瘍組織から培養細胞株を樹立し、脳腫瘍における精密医療の実現を目指した取り組みを行っている。

TP53変異を有する脈絡叢癌に対する標的治療開発

脈絡叢癌は極めて稀かつ予後不良な小児脳腫瘍であり、その治療法は確立されていない。ICE（ifosfamide, cisplatin, etoposide）療法とサルベージ手術を組み合わせた長期生存例は少数例報告されているが³⁾、ICE療法および放射線治療無効例の予後は極めて不良である。脈絡叢癌は高率に*TP53*変異を伴い、それが予後不良因子であることが知られている⁴⁾。4歳男児、脈絡叢癌症例より培養細胞株NGT131株の樹立に成功した。脈絡叢癌の細胞株は極めて希少であり、エジプト小児癌病院エル・ナガールらとの共同研究で同グループが樹立されたCCHE-45細胞株およびNGT131株の2細胞株を用いてマルチオミクス解析を行った（図2）。その結果、いずれの培養細胞株にも*TP53*変異を認め、共通してNotch経路の異常活性化が起きていることが判明した⁵⁾。しかしながら、脈絡叢癌細胞株に対してNotch阻害剤は無効であり⁵⁾、現在P53を標的とした治療開発を検討中である。このように、もとの腫瘍を模倣するモデルを確立すると治療候補の有効性を無限に検証できる。また、*TP53*は様々な癌種で高率に変異を認める癌抑制遺伝子であるが、脈絡叢癌培養細胞株は*TP53*変異を有する癌の治療開発にも一役を担う。

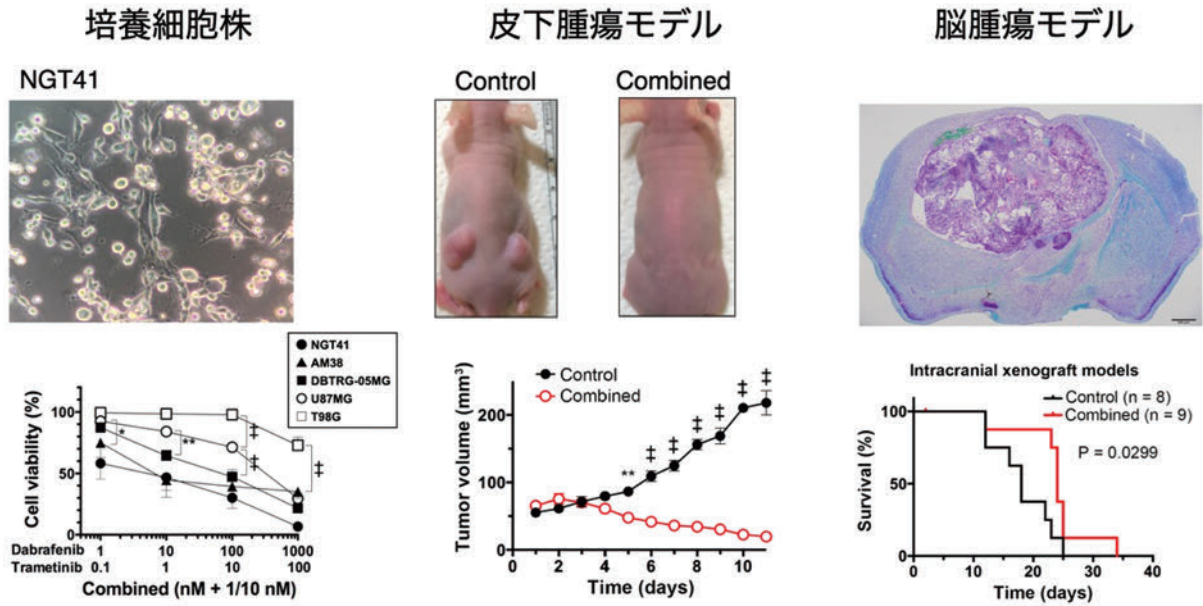


図1 *BRAF* V600E 変異を有する NGT41 株に対して BRAF 阻害剤・MEK 阻害剤併用療法の有効性を証明した。文献1より引用。一部改変

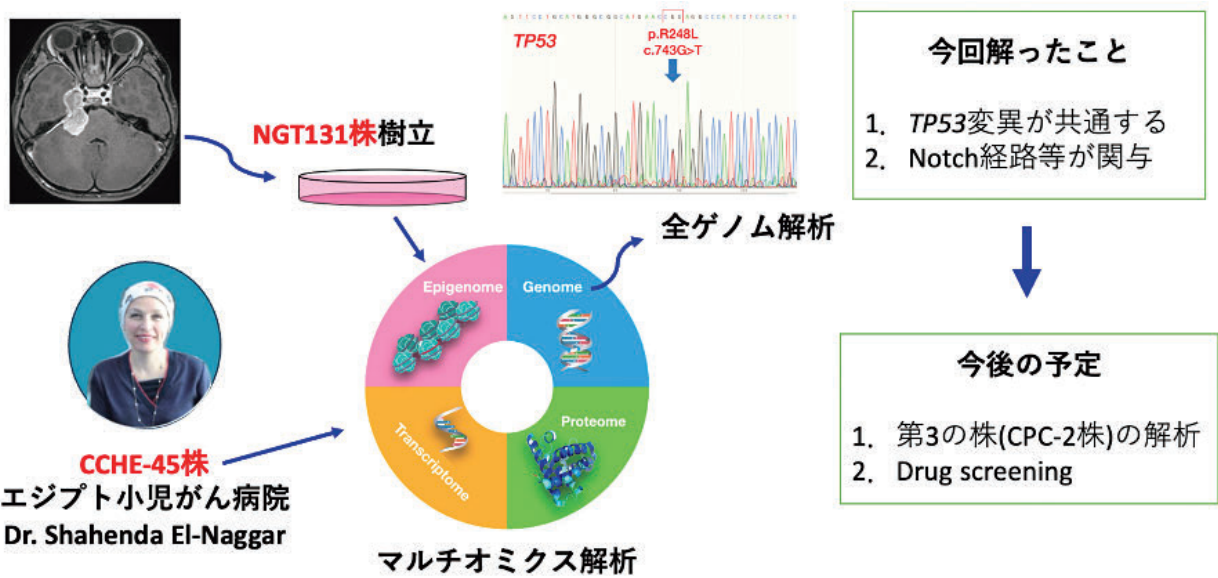


図2 *TP53* 変異を有する脈絡叢癌細胞株におけるマルチオミクス解析を行ったエジプト小児がん病院との共同研究の概要。文献5より引用。一部改変

髄芽腫における化学療法感受性マーカー Schlafen11 (SLFN11) の同定

髄芽腫は代表的な小児悪性脳腫瘍である。全脳全脊髄照射および多剤併用化学療法により予後は飛躍的に改善したが、未だに予後不良な分子群が存在する。髄芽腫における化学療法感受性マーカーとして、Schlafen11 (SLFN11) を見出した。SLFN11はDNA/RNAヘリカーゼと推定され、DNA障害型抗がん剤による複製ストレス下で複

製を永続的に抑制し、化学療法剤の効果を高める効果があるとされる。当ラボでは、まずバイオインフォマティクスを用いて髄芽腫の予後良好である分子亜群であるWNT群およびSHH群の一部でSLFN11が高発現していることを突き止めた。次に、国内外より99例の髄芽腫サンプルを集め、SLFN11免疫染色を行うことで蛋白レベルでもWNT群およびSHH群の一部でSLFN11が高発現していることを証明した。さらにSLFN11を高

発現或いは低発現する髄芽腫細胞株を用いて、SLFN11を過剰発現またはノックアウトすることで、SLFN11発現とシスプラチンへの感受性が強く相関することを見出した。また、マウス頭蓋内腫瘍移植モデルを用いて、SLFN11を過剰発現させてシスプラチンを投与すると、髄芽腫のサイズは抑制され、マウスの生存を有意に延長することが確認された(図3)⁶⁾。さらに、SLFN11の発現はそのプロモーター領域のメチル化の程度と逆相関し、HDAC阻害剤との併用によりSLFN11低発現株でSLFN11が活性化され、シスプラチンとの相乗効果を立証し⁶⁾、SLFN11低発現の化学療法抵抗性の髄芽腫に対する治療開発に結びつく新発見を見出した。

融合遺伝子を有する悪性脳腫瘍の治療開発

融合遺伝子は2つの異なる遺伝子が一体となることで新たに形成された遺伝子である。通常DNAの配列ではなく、腫瘍RNAから逆転写PCRを行うことで初めて同定されるため(図4)、脳腫瘍における融合遺伝子の存在は比較的最近まで同定されなかった⁷⁾。しかも、融合遺伝子の多くは治療標的となり得ることが解っており、脳腫瘍領域でも*NTRK1/2/3*融合遺伝子に対するNTRK

阻害剤エヌトレクチニブおよびラロトレクチニブが保険収載されている。当ラボでは今まで*ZFTA::RELA*融合遺伝子を有する上衣腫細胞株(NGT118)、*KIAA1549::BRAF*融合遺伝子を有する悪性毛様細胞性星細胞腫株(NGT245)、*NAB2::STAT6*融合遺伝子を有する髄膜孤立性線維性腫瘍(NGT272)を樹立した。これらの融合遺伝子を有する脳腫瘍細胞株は極めて稀少であり、現在、CRISPR/Casシステムを用いて遺伝子のノックアウトを行うことで融合遺伝子の機能解明を図っている。

当ラボで樹立した脳腫瘍培養細胞株の名前の由来

当ラボで樹立した培養細胞株は、当初NU(Niigata Universityの略)と名付けていた。初期の頃にNU16という*HIST1H3B* K27M変異および*ACVRI* G328E変異を有する稀少な脳幹グリオーマ細胞株の樹立に成功し、Northwestern University 橋詰倫太郎先生との共同研究にてALK2阻害剤の有効性について検証を行っていた⁸⁾。橋詰ラボで樹立された培養細胞株はNorthwestern University Hospitalの略でNUHと命名されていた。橋詰先生より、「NUとNUHでは紛らわしいから新潟大学の細胞株の名前を変更して貰えない

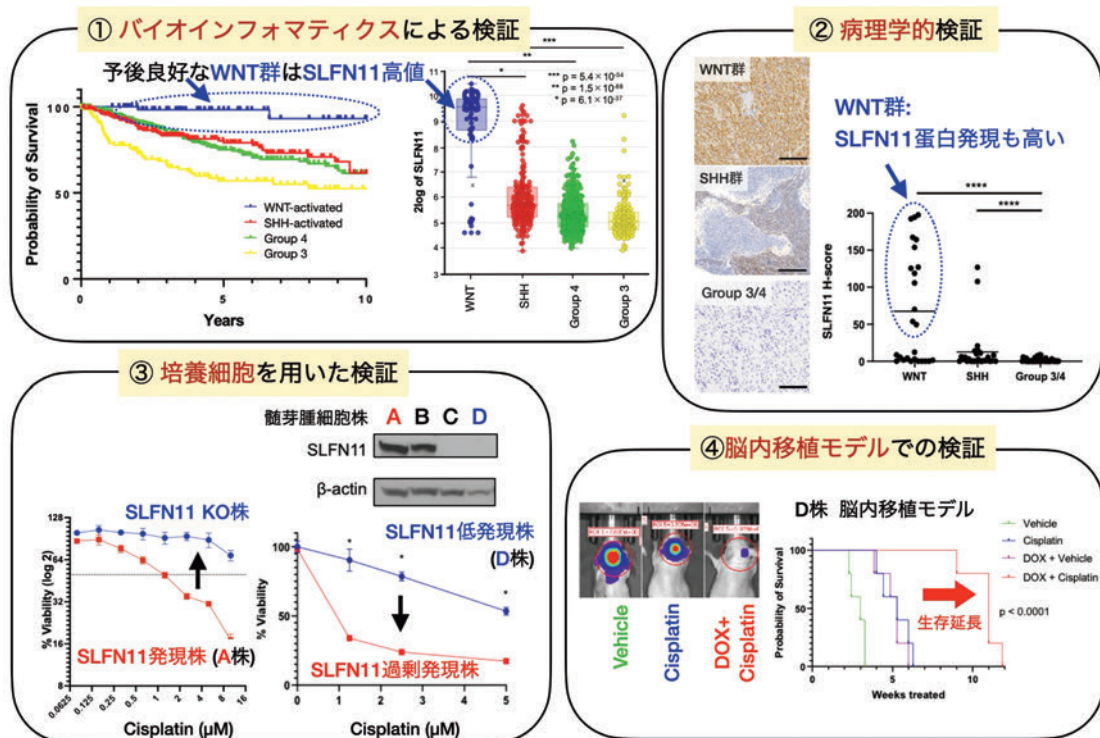


図3 髄芽腫における化学療法感受性マーカーSLFN11を見出した研究の概要。文献6より引用。一部改変

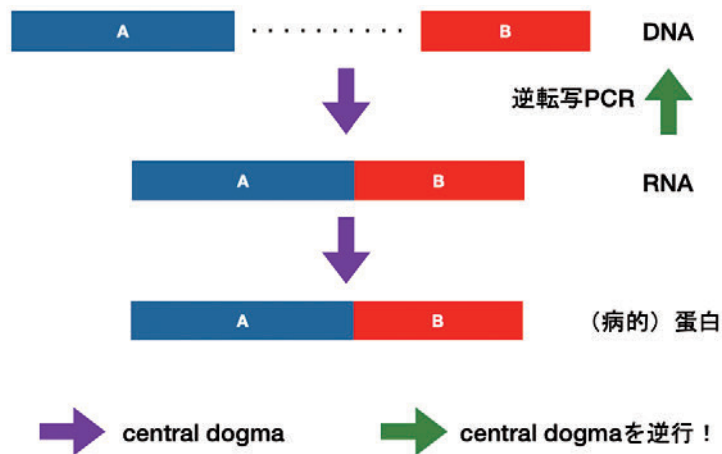


図4 融合遺伝子の同定法。RNA を逆転写し、cDNA に戻してから融合遺伝子の配列を確認する。

か」との相談を受けた。そこで、当時結成されたばかりの NGT48 にあやかり、当ラボの培養細胞株も NGT と名付けることとした。NGT48 が世界的に有名になれば、必然的に当ラボの培養細胞株も有名になるはずであったが、後に NGT48 スキャンダルに見舞われて悪名高くなってしまったことは記憶に新しい。

今後の展望

本稿で説明したような培養細胞株を用いた治療研究は、一時的に行えば良いのではないかとくろんでいた。なぜならば、2019年以降、ゲノム医療が実現すれば、脳腫瘍での有効性を示さなくても他癌腫での有効性が示された多くの分子標的薬が悪性脳腫瘍にも応用されるようになると思っていたからである。しかし、いざゲノム医療時代に突入してみると、脳腫瘍に関しては他癌腫と比べても分子標的薬、免疫療法を含めた治療開発が進まない現状、また、標的薬に対する耐性の獲得による早期の治療断念など、多くの課題が山積していることに気付かされた。これらの課題に立ち向かうためにはやはり稀少脳腫瘍に対して培養細胞株というモデルの確立は治療開発における大きな武器であることを確信しており、現在の研究の継続の重要性について認識を深める結果となった。

培養細胞株の欠点としては、未だ樹立困難の脳腫瘍が存在することであり、培養細胞条件を変更するだけでは限界がある。共同研究をしている横浜市立大学立石グループは、培養細胞が樹立しにくいとされる乏突起膠腫や中枢神経系原発リンパ

腫などには、手術で採取した腫瘍細胞を直接免疫抑制マウスの脳内に打ち込む patient derived xenograft (PDX) を樹立し、これらの腫瘍の橋渡研究に活路を見出した^{9), 10)}。稀少脳腫瘍のモデルを確立するためには PDX モデルも大変有用と考えられ、従来からある遺伝子改変マウスモデルと合わせて脳腫瘍克服には重要な武器となる。

謝辞

今までご指導頂きました Johns Hopkins 大学病理学分野 Charles Eberhart 教授、ラボの支援をして下さった脳神経外科藤井幸彦前教授、大石誠教授、共同研究を行ってきた国内外の多くの先生方およびラボメンバーの皆様がこの場をお借りして深謝致します。

文献

- 1) Kanemaru Y, Natsumeda M, Okada M, et al : Dramatic response of BRAF V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor : establishment and xenograft of a cell line to predict clinical efficacy. *Acta Neuropathol Commun* 2019 ; 7 : 119.
- 2) Sasame J, Ikegaya N, Kawazu M, et al : HSP90 inhibition overcomes resistance to molecular targeted therapy in BRAF^{V600E} mutant glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2022 ; 28 : 2425-2439.
- 3) Lafay-Cousin L, Mabbott DJ, Halliday W, et al : Use of ifosfamide, carboplatin, and etoposide chemotherapy in choroid plexus carcinoma. *J Neurosurg Ped* 2010 ; 5 : 615-621.

- 4) Tabori U, Baskin B, Levitt S, et al : TP53 alterations determine clinical subgroups and survival of patients with choroid plexus tumors. J Clin Oncol 2019 ; 28 : 1995-2001.
- 5) Hesham D, On H, Alshahaby N, et al : Multi-omics analyses of choroid plexus carcinoma cell lines reveal potential targetable pathways and alterations. J Neurooncol 2024 ; 166 : 27-38.
- 6) Nakata S, Murai J, Okada M, et al : Epigenetic upregulation of Schlafen11 renders WNT-and SHH-activated medulloblastomas sensitive to cisplatin. Neuro Oncol 2023 ; 25 : 899-912.
- 7) Yoshihara K, Wang Q, Torres-Garcia W, et al : The landscape of therapeutic relevance of cancer-associated transcript fusions. Oncogene 2014 ; 34 : 4845-4854.
- 8) Abe H, Natsumeda M, Okada M, et al : MGMT expression contributes to temozolomide resistance in H3K27M-mutant diffuse midline gliomas. Front Oncol 2020 ; 9 : 1568.
- 9) Tateishi K, Nakamura T, Juratli TA, et al : PI3K/AKT/mTOR pathway alterations promote malignant progression and xenograft formation in oligodendroglial tumors. Clin Cancer Res 2019 ; 25 : 4375-4387.
- 10) Tateishi K, Miyake Y, Kawazu M, et al : A Hyperactive RelA/p65-Hexokinase 2 signaling axis drives primary central nervous system lymphoma. Cancer Res 2020 ; 80 : 5330-5343.

新潟県医師会協力テレビ放送

新潟県医師会では県内の放送局と協力し、病気予防・健康相談・検診案内など、県民向けの健康情報を提供しております。是非ご覧ください。待合室などでもご利用ください。

■NST News タッチ「医師に聞く」コーナー

放送時間：18：09～19：00

(敬称略)

放送日	テーマ	出演者
4月29日 (水・祝)	RSV 母子免疫ワクチン	新潟大学教育研究院医歯学系医学系列 小児科学分野 教授 齋藤 昭彦
5月27日(水)	ピロリ菌	新潟県労働衛生医学協会 プラーカ健康増進センター 成澤 林太郎
6月24日(水)	気管支喘息の治療法等	新潟大学教育研究院医歯学系医学系列 呼吸器・感染症内科学分野 准教授 小屋 俊之
7月29日(水)	生理痛は我慢しないで	うえだクリニック院長 新潟県医師会副会長 上田 昌博

*放送日、内容は予告なく変更になる場合がございます。予めご了承ください。