

Lenalidomide による  
悪性神経膠腫細胞株への抗腫瘍効果の検討

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系脳神経外科学専攻

花島 裕也

修了年 2020 年

指導教員 小林 一太

## 要約

膠芽腫は高度な増殖能と浸潤能を有する悪性の脳腫瘍である。手術、および temozolomide による化学療法と放射線治療を組み合わせた集学的治療にも関わらず、いまだに予後不良な疾患である。最大限の腫瘍摘出に加え、放射線療法と化学療法による集約的な治療を行ったとしても、全生存期間中央値は 14.6 ヶ月と報告されている (1, 2)。日本脳腫瘍全国集計調査報告によれば、膠芽腫の 5 年生存割合は 10.1~16.0%である(3, 4)。膠芽腫は正常脳組織に浸潤性に広がるため、脳の機能温存の観点から摘出率を上げるのは限界がある。手術で完全に摘出したように見えても周囲の脳組織に浸潤した腫瘍細胞が残存している。また、機能温存の観点から重要構造物の周囲に存在する腫瘍の摘出を断念せざるを得ない場合も多い。これらの残存腫瘍に対して、術後補助療法としての放射線治療と化学療法について検討がなされてきた。

放射線療法の標準治療は、Stupp らの採用した 1 日 1 回照射、1 日線量 2 Gy、6 週間で総線量 60 Gy の局所照射である (1, 2)。治療法の進歩に関しては、定位放射線照射の上乗せ効果について検討が行われているが有効性がないことが示されている (5)。正常な脳・神経組織の耐用線量の観点からこれ以上のエックス線やガンマ線を用いた放射線治療は現状では困難な状態である。

化学療法については第 2 世代のアルキル化剤である temozolomide (TMZ) を使用した化学療法が有用性を示している (1)。TMZ は、経口薬として腸管吸収性に優れ、血液脳関門を通過しやすい特徴を持つ。作用機序としては deoxyribonucleic acid (DNA) のグアニンの 6 位の酸素元素をメチル化することにより DNA 損傷を引き起こし、細胞周期の停止及び apoptosis を誘導することにより細胞増殖抑制作用を示すとされている。TMZ により、全生存期間の延長が得られ、かつ放射線単独治療と比較して血液毒性が数%増える程度の少ない有害事象率と、経口投与であることによる継続治療の容易さがあることから、現在、悪性神経膠腫治療の key drug として使用されている (1)。現在、さらなる予後改善を目指

し、bevacizumab を初めとした腫瘍に関連する変異に着目した分子標的薬 (6, 7) や、がんペプチドワクチンを使用した免疫療法 (8)、など様々な治療が試みられているが十分な効果が得られていない。近年、既存する他の疾患に使用されている既知の薬剤を、薬効や既知の副作用を利用して使用することで新たな薬効を見つけ出し、実用化につなげていこうという drug repositioning と呼ばれる手法が注目されている。

今回実験に使用した lenalidomide は thalidomide 誘導体であり、thalidomide の副作用を減らし抗腫瘍効果を高める目的で開発された薬剤である。現在の臨床では、血液系の腫瘍に対して用いられている。Lenalidomide は多面的な抗腫瘍効果を持つことが報告されており、内容は免疫調整作用、血管新生抑制作用、そして細胞周期の停止効果および apoptosis の誘導である (9)。直接的な抗腫瘍効果は、細胞周期の停止作用と apoptosis の誘導作用で、細胞周期の停止作用は、多発性骨髄腫の細胞モデルを用いて検討されており、p21 タンパク質の発現上昇が関与していると報告されている (9)。また、apoptosis の誘導作用については Quan らが 2011 年に報告しており、マンツル細胞リンパ腫の細胞モデルで内因系経路の Caspase-9、Caspase-3 と、poly [ADP - ribose] polymerase (PARP) の cleave が確認されている (10)。これらの細胞周期の停止や apoptosis 誘導といった直接的な抗腫瘍効果は cereblon という単一のタンパク質に lenalidomide が結合することで作用することが最近の研究で明らかになった (11)。そして抗腫瘍効果の発現のためには cereblon タンパク質の発現が必要であるとされている (12)。

Lenalidomide は血液系の腫瘍に対して thalidomide よりも良好な効果が示され、現在の臨床現場で多く使用されている。Benboubker らは 2014 年に多発性骨髄腫に対する、melphalan と prednisone に thalidomide を加えた MPT 療法と、lenalidomide と dexamethasone 併用による Ld 療法とで有効性の差を検討している (13)。4 年生存率が MPT 療法では 51% であるのに対し、Ld 療法では 59% と有意に延長し、さらに Progression free survival も有意に 4.3 ヶ月延長したと報告した。2018 年には Facon らが初発多発性骨髄腫に対する第 3 相試験の最終報告を行っており、追跡期間 67 ヶ月で MPT 療法の全生存期間中央値 49.1 ヶ月

に対しLd療法では59.1ヶ月と10か月の生存期間延長を報告している(14)。このようにthalidomideで治療困難な患者に対してlenalidomideは使用されてきた(15)。本邦において、lenalidomideは2015年に抗造血器悪性腫瘍剤として認可され、多発性骨髄腫、5番染色体長腕部欠失を伴う骨髄異形成症候群、再発または難治性の成人T細胞性白血病性リンパ腫に適応となっている。

過去の臨床試験において、thalidomideによる悪性神経膠腫に対する有用性を示すには至っていない。一方、lenalidomideによる悪性神経膠腫の治療効果については不明である。Lenalidomideは低分子薬剤であり経口吸収性に優れ、中枢神経系のblood brain barrierを通過でき、中枢神経腫瘍で問題となる腫瘍への薬剤移行も解決できると思われる。そのため、悪性神経膠腫に対するlenalidomideの治療効果が期待される。今回、私は、lenalidomideが悪性神経膠腫細胞株に対して細胞周期の停止やapoptosisの誘導作用といった直接的な抗腫瘍効果があると仮説を立て、本研究を計画した。Lenalidomideの悪性神経膠腫に対する治療効果を検証するために、悪性神経膠腫細胞株を用いて抗腫瘍効果について検討した。

6種類の悪性神経膠腫細胞株(A-172、AM-38、T98G、U-87MG、U-138MG、U-251MG、YH-13)を用いて、lenalidomide処理による細胞増殖抑制実験を行った。0.1、1、10、100  $\mu\text{mol/L}$  ( $\mu\text{M}$ )の各濃度のlenalidomideを含む培養液で72時間培養し、各濃度処理後の生存細胞数をcoulter counterで計測した。Lenalidomideは6種類全ての細胞株で濃度依存的にcell viabilityを低下させ、細胞増殖抑制効果を認めた。

Lenalidomide処理による増殖抑制の内容を評価する目的でlenalidomideの標的タンパク質とされているcereblonタンパク質の発現の程度をWestern blot解析で評価した。6つのglioma細胞株全てにおいてcereblonタンパク質の発現が認められた。Controlとしての $\beta$ -actinタンパク質の発現は一定に調整されていたが、cereblonタンパク質の発現の程度は細胞株によって差を認めた。Cereblonタンパク質の発現の差について、細胞増殖抑制実験によって得られたcell viabilityの結果と比較したが、明らかな相関は認められなかった。

悪性神経膠腫細胞に対する lenalidomide の抗腫瘍作用を検討するために、A-172 と AM-38 を用いて fluorescence-activated cell sorter (FACS) による細胞周期分布解析と apoptosis 誘導解析を行った。また細胞周期停止と apoptosis 誘導について評価する目的で、Western blot によるタンパク質の発現解析、real-time quantitative reverse transcriptional polymerase chain reaction による RNA の発現解析を行った。

FACS を用いた細胞周期分布解析では、A-172 と AM-38 双方の細胞株において lenalidomide 処理により細胞周期の停止を意味する G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞が増加していた。A-172 で、処理後 24 時間の control 群で G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞の割合が 50.7%であったのに対し、lenalidomide 処理群で 54.5%と G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期を呈する細胞が有意に増加していた。AM-38 では、処理後 24 時間の control 群で 46.1%であった G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞の割合は、lenalidomide 処理群で 56.5%であり、こちらも有意に増加していた。また AM-38 では処理後 72 時間の時点でも有意差を認めた。Control 群で 54.1%であった G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞の割合は lenalidomide 処理群で 58.4%であった。同濃度の DMSO で処理した control 群と比較し、lenalidomide 処理群では、A-172、AM-38 の双方において G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期にある細胞の割合が有意に増加していた。

Western blot 解析では、A-172 において p53 タンパク質の発現は lenalidomide 処理後 24 時間まで一定で変化が見られなかった。リン酸化 p53 タンパク質と p21 タンパク質は処理後 4 時間をピークにして p-p53 タンパク質は処理後 24 時間まで、p21 タンパク質は処理後 8 時間まで発現増加が見られた。AM-38 においては lenalidomide 処理後、p53 タンパク質は 8 時間まで一定であったが、処理後 24 時間で増加を示した。p-p53 タンパク質の発現は処理後 8 時間で増加があり、処理後 24 時間で処理直後と同程度の発現に戻っていた。p-p53 タンパク質の発現増加の後の処理から 24 時間の時点で p21 タンパク質は発現増加が見られた。双方の p53 タンパク質のリン酸化の増加と p21 発現の増加が確認された。messenger RNA 発現解析では 10 μM の lenalidomide 処理後 3 時間で total RNA の抽出を行い評価した。p53、p21 の発現は control 群と比較して有意に増加していた。Lenalidomide は悪性神経膠腫細胞の細胞周期を停止させる効果があることが示唆された。

一方、apoptosis 誘導解析では外因系経路である Caspase-8 タンパク質の発現は lenalidomide 処理によって変化せず、cleavage の状態も変化しなかった。また、内因系経路である Bax の発現増加、Caspase-9、Caspase-3 の cleavage が確認されたが、最終的な apoptosis の実行を行う cleaved PARP は Western blot において確認されなかった。FACS による apoptosis 誘導解析は annexin V と PI の二重染色を用いて行った。Control 群とともに 0.1、1、10、100  $\mu\text{M}$  のそれぞれの濃度での lenalidomide 処理を行い、24、48、72 時間まで A-172、AM-38 の細胞株で apoptosis 誘導の状態を評価したが、いずれの時点、濃度においても lenalidomide 処理による早期および後期ともに apoptosis 細胞の割合は増加しなかった。この結果は、血液腫瘍に対する lenalidomide の抗腫瘍効果のメカニズムと異なっている可能性が示唆された。

悪性神経膠腫細胞株において、lenalidomide は細胞周期を停止させることによる抗腫瘍効果を持つことが示された。Lenalidomide は悪性神経膠腫に対する新たな治療戦略になり得ることが示唆された。

## 引用文献

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al.: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine* 352: 987-996, 2005.
2. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al.: Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology* 10: 459-466, 2009.
3. Brain Tumor Registry of Japan (2005-2008). *Neurologia medico-chirurgica* 57: 9-102, 2017.
4. Narita Y and Shibui S: Trends and outcomes in the treatment of gliomas based on data during 2001-2004 from the Brain Tumor Registry of Japan. *Neurologia medico-chirurgica* 55: 286-295, 2015.
5. Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, et al.: Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 60: 853-860, 2004.
6. Brandes AA, Gil-Gil M, Saran F, et al.: A Randomized Phase II Trial (TAMIGA) Evaluating the Efficacy and Safety of Continuous Bevacizumab Through Multiple Lines of Treatment for Recurrent Glioblastoma. *The Oncologist* 24: 521-528, 2019.
7. Chinot OL, de La Motte Rouge T, Moore N, et al.: AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Advances in Therapy* 28: 334-340, 2011.
8. Terasaki M, Shibui S, Narita Y, et al.: Phase I trial of a personalized peptide vaccine for patients positive for human leukocyte antigen--A24 with recurrent or progressive glioblastoma multiforme. *Journal of Clinical Oncology* 29: 337-344, 2011.

9. Hideshima T, Chauhan D, Shima Y, et al.: Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood* 96: 2943-2950, 2000.
10. Qian Z, Zhang L, Cai Z, et al.: Lenalidomide synergizes with dexamethasone to induce growth arrest and apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo. *Leukemia Research* 35: 380-386, 2011.
11. Lopez-Girona A, Mendy D, Ito T, et al.: Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide. *Leukemia* 26: 2326-2335, 2012.
12. Fecteau JF, Corral LG, Ghia EM, et al.: Lenalidomide inhibits the proliferation of CLL cells via a cereblon/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism independent of functional p53. *Blood* 124: 1637-1644, 2014.
13. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, et al.: Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *The New England Journal of Medicine* 371: 906-917, 2014.
14. Facon T, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, et al.: Final analysis of survival outcomes in the phase 3 FIRST trial of up-front treatment for multiple myeloma. *Blood* 131: 301-310, 2018.
15. Bartlett JB, Dredge K and Dalglish AG: The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nature Reviews Cancer* 4: 314, 2004.