

マウス膠芽腫モデルに対する  
標準治療薬と抗ウイルス薬による  
新規併用療法の検討  
(要約)

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

谷澤 元気

修了年 2023 年

指導教員 大島 秀規

## 要約

膠芽腫は中枢神経系の細胞から発生する原発性悪性腫瘍であり、手術による外科的切除およびそれに続く放射線および化学療法により治療される。様々な手術支援装置の開発や化学療法の研究、開発が行われているものの、その予後はいまだに極めて不良である。膠芽腫に対する術後の化学療法剤としては、アルキル化剤である temozolomide (TMZ) が唯一、大規模臨床試験において有効性が明らかにされた薬剤であり、2009 年に同試験の結果が報告されて以降、現在まで標準治療として広く用いられている(1)。TMZ の登場以降、膠芽腫の治療成績のさらなる向上を目指して様々な研究が連綿と行われているが、TMZ に勝る化学療法剤は確立はなされていない(2-5)。近年、本邦で行われた TMZ を併用した放射線化学療法の治療成績は、生存期間中央値 20 ヶ月、無増悪生存期間中央値 10 ヶ月、2 年生存率 38%であり、この結果が現在の本邦における膠芽腫の治療目標として捉えられている(6)。膠芽腫治療におけるより確かな新規治療法を確立すべく、化学療法剤や分子標的薬などの新規薬剤の開発や効果の検証が行われている一方で、別の用途で既に広く使用されている既存の薬剤を用いた新たな治療法を模索するドラッグリポジショニングも注目されている。ドラッグリポジショニングは、薬剤の製造方法が確立されているため、開発期間の短縮や開発にかかるコストの削減が可能であり、高騰する医療費の抑制についても期待がされている(7)。また、既に臨床の場で広く用いられている薬剤を使用するため、安全性が担保されていることも大きな利点である。膠芽腫に対するドラッグリポジショニングとして、抗ウイルス薬である interferon-beta (IFN-β) と ribavirin (RBV) の抗腫瘍効果が報告がされている。IFN-β は抗ウイルス作用をもつサイトカインとして発見され、免疫賦活作用、血管新生抑制作用、増殖抑制やアポトーシスの誘導による抗腫瘍作用など様々な生物学的活性が示されている(8, 9)。RBV は核酸アナログであり、ribonucleic acid および deoxyribonucleic acid ウイルス

感染症に対する抗ウイルス薬として報告され(10)、現在ではinterferon-alpha 2aとの併用投与により、慢性C型肝炎に対する標準治療薬となっている(11)。RBVおよびIFN-βの膠芽腫細胞に対する抗腫瘍効果ならびにその有効性に関しては、我々の研究グループからのものを含め、複数の報告がなされているものの、臨床応用には至っていない(12-18)。そこで我々は、肝炎治療の分野から着想を得て、RBVおよびIFN-βの併用療法に着目し、標準治療薬であるTMZとの併用効果を先行研究において検討し、*in vitro*の実験においてTMZ、RBVおよびIFN-β 3剤併用療法が単剤治療に比べて強い抗腫瘍効果を示すことを報告した(19)。今回、我々は、その研究成果の臨床応用を見据えて、*in vivo*の実験において検証し、各薬剤の併用パターン毎に抗腫瘍効果を比較することで、最適な治療方法を模索することを目的に、本研究を計画した。

今回の研究では、2種類の膠芽腫細胞株、U-87Mおよび0125-GSCを使用した。U-87MGは市販されているヒト膠芽腫培養細胞株であり、基礎研究で広く使用されてきた細胞株である。また、U-87MGは過去の報告において免疫不全マウスの脳内に生着し、腫瘍を形成することが確認されている(20)。0125-GSCは膠芽腫の手術患者検体から樹立された *patient derived xenograft (PDX)* 細胞の細胞株であり、今までに、我々からのものを含め、複数の報告で使用されている(21-26)。各薬剤の投与量は、単剤投与では、TMZ(10 μM)、RBV(10 μM)、IFN-β(10 IU)とし、TMZとRBVの併用投与ではそれぞれTMZ(10 μM)、RBV(10 μM)とし、TMZ、RBVおよびIFN-β 3剤併用投与ではそれぞれTMZ(10 μM)、RBV(10 μM)、IFN-β(10 IU)に設定した。各細胞株にTMZ、RBVおよびIFN-βを投与し、72時間後の生細胞数を測定したところ、いずれの薬剤においても濃度依存的に細胞増殖が抑制された。それぞれの薬剤において50%の細胞増殖抑制が得られる濃度(IC<sub>50</sub>: half maximal inhibitory concentration)を算出したところ、TMZのIC<sub>50</sub>はU-87MGで53.60 μM、0125-GSCで167.21 μM、RBVのIC<sub>50</sub>はU-87MG

で 68.50  $\mu\text{M}$ 、0125-GSC で 89.78  $\mu\text{M}$ 、IFN- $\beta$  の IC<sub>50</sub> は U-87MG で 290.92 IU、0125-GSC で 140.56 IU であった。また、TMZ と RBV の併用投与、ならびに TMZ、RBV および IFN- $\beta$  3 剤併用投与において、各薬剤の単剤投与と比較して有意に細胞増殖が抑制されることが確認された。しかし、TMZ と RBV の併用投与群と、TMZ、RBV および IFN- $\beta$  3 剤併用投与群の間には有意差が見られなかった。続いて、各薬剤および併用治療の抗腫瘍効果の機序を検討すべく、薬剤投与後の各細胞株におけるアポトーシス関連タンパクの発現をウエスタンブロット法にて解析した。結果として、TMZ、RBV、IFN- $\beta$  の単剤投与により、アポトーシスに関与するタンパクである phosphorylated p53、BCL-2-associated X および Fas receptor の発現が増強した。また、TMZ と RBV の併用投与、ならびに TMZ、RBV および IFN- $\beta$  3 剤併用投与において、各薬剤の単剤投与と比較してアポトーシス関連タンパクである caspase-8、caspase-3 の発現がさらに増強することが確認された。しかし、TMZ と RBV の併用投与群と、TMZ、RBV および IFN- $\beta$  3 剤併用投与群の間には明らかな差が認められなかった。これらの結果を踏まえ、*in vivo* により各薬剤および併用療法の効果を確認した。免疫不全マウスの脳内に U-87MG の細胞を定位的に移植し、マウス脳腫瘍モデルを作成し、8 頭ずつ群分けしたうえで、移植の 1 週間後より各薬剤および併用療法により治療を行い、生存期間を比較した。各群の内訳は、無治療群、TMZ 単剤投与群、RBV 単剤投与群、TMZ+RBV 併用治療群、TMZ+RBV+IFN- $\beta$  3 剤併用治療群とし、薬剤は経腹膜的に全身投与した。薬剤の投与量は、薬剤安全性試験を行なったうえで、TMZ 25 mg/kg、RBV 50 mg/kg、IFN- $\beta$  1.76 $\times$ 10<sup>5</sup> IU とし、25% dimethyl sulfoxide に溶解して使用した。移植後はマウスの体重は連日測定し、移植時の体重の 80% 以下になった段階で、麻酔下に頸椎を脱臼させて安楽死させた。無治療群のマウスの 1 頭目を安楽死させた日をもって全ての群のマウスへの薬剤投与を終了した。各群のマウスの生存期間の中央値は、無治療群で 25.5 日、TMZ 単剤投与群で 31.5 日、RBV 単剤投与群で 30.0

日、TMZ+RBV 併用治療群で 38.0 日、TMZ+RBV+IFN- $\beta$ 3 剤併用治療群で 40.5 日であり、*in vitro* の実験結果と同様に、各薬剤による単剤治療群と比較して、TMZ + RBV 併用治療群および TMZ + RBV+ IFN- $\beta$  3 剤併用治療群において有意な生存期間の延長が得られたが、両群間には有意差が認められなかった。

本研究で行なった TMZ、RBV、IFN- $\beta$  各薬剤における細胞増殖抑制効果の検討では、TMZ、RBV、IFN- $\beta$  の 3 剤全てが市販の膠芽腫細胞株および PDX 細胞株の両者に対して抗腫瘍効果を示すことが確認された。これらの結果は、既存の報告の内容とも合致するとともに(19)、PDX 細胞でも同様の結果が得られることが明らかになった。本研究の結果では、TMZ、RBV、IFN- $\beta$  の 3 剤全てが 0125-GSC において細胞増殖抑制効果を示したが、0125-GSC における TMZ の IC<sub>50</sub> が、U-87MG と比較して高値であった。U-87MG は市販の膠芽腫細胞株であり、古くに樹立されて以来、長らく基礎研究の材料として使用されてきた細胞株である。そのため、継代や凍結保存などが重なり、膠芽腫としての本来の生物学的特徴を失っている可能性が指摘されている。0125-GSC を含む PDX 細胞株はこれらの問題点を有さず、より本来の膠芽腫細胞に近い状態であると考えられる(27-31)。そのため、市販の細胞株 U-87MG と PDX 細胞株 0125-GSC の IC<sub>50</sub> 値に乖離が見られたことは、市販の細胞株において TMZ に対する治療抵抗性が減弱している可能性を示唆しており、PDX 細胞株を用いた検討の重要性を強調するものであると考えられた。なお、RBV および IFN- $\beta$  に関しては、市販の膠芽腫細胞株ならびに PDX 細胞株の両者において同等の抗腫瘍効果が確認された。次に、TMZ + RBV 併用療法および TMZ + RBV + IFN- $\beta$  3 剤併用療法により、*in vitro* および *in vivo* の両者において、各薬剤を使用した単剤治療よりも有意な細胞増殖抑制効果を示すことが明らかになった。そして、その機序として、内因性アポトーシスの誘導および外因性アポトーシスの誘導の両者が関係していることが確認された(32-36)。しかし、TMZ + RBV + IFN- $\beta$

3 剤併用療法と TMZ + RBV 併用療法の間には有意な差が認められなかった。膠芽腫に対する TMZ + IFN- $\beta$  併用療法の効果を検証した第 II 相臨床試験では、TMZ + IFN- $\beta$  併用療法において、好中球やリンパ球などの血球減少症が重篤な合併症として指摘されており(6)、今回 TMZ + RBV 併用療法と TMZ + RBV + IFN- $\beta$  3 剤併用療法の間で生存期間の延長を得られなかった理由の一つとして、IFN- $\beta$  を加えることによって生じた薬剤毒性の可能性が考えられる。また、本研究では各薬剤の抗腫瘍効果の機序として、アポトーシスの誘導を中心に解析を行なったが、RBV の抗腫瘍効果の機序としては、細胞周期の休止期への誘導や enhancer of zeste homolog 2 を標的とした分化促進なども報告されており(17, 37, 38)、各々において抗腫瘍効果が確認されている薬剤の併用が相乗効果を示さない原因として、これらの機序が薬剤間で相殺されている可能性も考えられる。

これらの結果を踏まえて、今後の臨床応用を考えるうえでは、TMZ + RBV + IFN- $\beta$  3 剤併用療法よりも、TMZ + RBV 併用療法を主眼に置いたさらなる知見の蓄積を行うことが重要になると考えられた。また、本研究では、市販の細胞株である U-87MG を用いた動物実験を行なっているが、今後、PDX 細胞を用いた動物実験についても検討する必要がある。さらに、TMZ + RBV 併用療法を臨床応用するにあたり、臨床で使用する最適な用法用量を設定するための研究結果を蓄積する必要がある。並行して、TMZ + RBV + IFN- $\beta$  3 剤併用療法に関しては、既存の基礎研究で使用されたものに捉われず、様々な用法用量を設定したうえで研究を重ね、引き続きその可能性を模索する必要があると考えられた。

## 引用文献

1. 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. *Lancet Oncol.* 2009;10(5):459-66.
2. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol.* 2007;25(30):4722-9.
3. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4733-40.
4. Sipos EP, Tyler B, Piantadosi S, Burger PC, Brem H. Optimizing interstitial delivery of BCNU from controlled release polymers for the treatment of brain tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1997;39(5):383-9.
5. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jääskeläinen J, Ram Z. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2003;5(2):79-88.
6. Wakabayashi T, Natsume A, Mizusawa J, et al. JCOG0911 INTEGRA study: a randomized screening phase II trial of interferon $\beta$  plus temozolomide in comparison with temozolomide alone for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurooncol* 2018;138(3): 627-36.
7. Nakada M. Drug repositioning in Neuro-Oncology. *Progress in Neuro-Oncology.* 2017;23(3):1-8.
8. Saito R, Mizuno M, Hatano M, Kumabe T, Yoshimoto T, Yoshida J. Two different mechanisms of apoptosis resistance observed in interferon-beta induced apoptosis of human glioma cells. *J Neurooncol.* 2004;67(3):273-80.
9. Yoshino A, Katayama Y, Yokoyama T, Watanabe T, Ogino A, Ota T, Komine C, Fukushima T, Kusama K. Therapeutic implications of interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 in diffusely infiltrating astrocytomas (DIA): response to interferon(IFN)-beta in glioblastoma cells and prognostic value for DIA. *J Neurooncol.* 2005;74(3):249-60.

10. Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science*. 1972;177(4050):705-6.
11. Kohli A, Shaffer A, Sherman A, Kottilil S. Treatment of hepatitis C: a systematic review. *JAMA*. 2014;312(6):631-40.
12. Ogino A, Sano E, Ochiai Y, et al: Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines. *Oncol Lett*. 2014;8(6):2469-74.
13. Ochiai Y, Sano E, Okamoto Y, et al. Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines: Follow-up study. *Oncol Rep*. 2018;39(2):537-44.
14. Yoshino A, Ogino A, Yachi K, et al. Effect of IFN-beta on human glioma cell lines with temozolomide resistance. *Int J Oncol*. 2009;35(3):139-48.
15. Yoshino A, Tashiro S, Ogino A, et al. Gene expression profiles predicting the response to IFN- $\beta$  and a combination of temozolomide and IFN- $\beta$  in malignant gliomas. *Int J Oncol*. 2011;39(3):529-42.
16. Yamamuro S, Sano E, Okamoto Y, et al. Antitumorigenic effect of interferon- $\beta$  by inhibition of undifferentiated glioblastoma cells. *Int J Oncol*. 2015;47(5):1647-54.
17. Volpin F, Casaos J, Sesen J, et al. Use of an anti-viral drug, Ribavirin, as an anti-glioblastoma therapeutic. *Oncogene*. 2017;36(21):3037-47.
18. Natsume A, Wakabayashi T, Ishii D, Maruta H, Masazumi F, Shimato S, Ito M, Yoshida J. A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61(4):653-9.
19. Ochiai Y, Sumi K, Sano E, et al. Antitumor effects of ribavirin in combination with TMZ and IFN- $\beta$  in malignant glioma cells. *Oncol Lett*. 2020;20(5):178.
20. Yamamuro S, Takahashi M, Satomi K, et al. Lomustine and nimustine exert efficient antitumor effects against glioblastoma models with acquired temozolomide resistance. *Cancer Sci*. 2021;112(11):4736-47.
21. Yamamuro S, Okamoto Y, Sano E, et al. Characterization of glioma stem-like cells from human glioblastomas. *Int J Oncol*. 2015;47(1):91-6.



22. Natsume A, Ito M, Katsushima K, et al. Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res.* 2013;73(14):4559-70.
23. Yuki K, Natsume A, Yokoyama H et al. Induction of oligodendrogenesis in glioblastoma-initiating cells by IFN-mediated activation of STAT3 signaling. *Cancer Lett.* 2009;284(1):71-9.
24. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105–11.
25. Son MJ, Woolard K, Nam DH, Lee J, Fine HA. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell.* 2009;4(5):440–52.
26. Ozawa Y, Yamamuro S, Sano E, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 is Highly Expressed in Glioma Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;524(3):723-9.
27. Lee J, Kotliarova S, Kotilarov Y et al. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell.* 2006;9(5):391-403.
28. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-8.
29. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
30. Maishi N, Hida K. Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. *Cancer Sci.* 2017;108(10):1921-26.
31. Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99(Pt B):186-96.
32. Jin S, Levine AJ. The p53 functional circuit. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 23):4139-40.
33. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-32.
34. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293-9.
35. Muller M, Wilder S, Bannasch D, et al. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA

- damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 1998;188(11):2033-45.
36. Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, et al. Wild-type human p53 and temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol.* 1995;15(6):3032-40.
  37. Huq S, Kannapadi NV, Casaos J et al. Preclinical efficacy of ribavirin in SHH and group 3 medulloblastoma. *J Neurosurg Pediatr.* 2021;27(4):482-488.
  38. Casaos J, Huq S, Lott T et al. Ribavirin as a potential therapeutic for atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Oncotarget.* 2018;9(8):8054-67.