

マウス膠芽腫モデルおよび膠芽腫細胞株における  
AMPA型グルタミン酸受容体拮抗薬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

西出 拓馬

修了年 2024年

指導教員 吉野 篤緒

中枢神経系悪性腫瘍である膠芽腫は全脳腫瘍の 10%近くを占め、最も悪性度が高い腫瘍のひとつである(1)。膠芽腫に対して、手術による摘出と、術後補助療法として放射線治療および化学療法を組み合わせた併用化学療法と、それに続く維持化学療法が行われているが、生存期間中央値は 20 ヶ月に満たない(2)。そのため、膠芽腫に対する新規治療方法を開発することは急務であり、現在も数々の研究が行われている。膠芽腫に対する術後化学療法として、2005 年に Stupp らがアルキル化剤である temozolomide (TMZ) の有効性を報告した。同報告は、膠芽腫治療の歴史上初めて、放射線治療に化学療法を併用することで有意に生存期間が延長することを示した randomized control study の結果であり、以降、放射線治療と TMZ による術後の放射線化学療法が、膠芽腫の標準治療として世界中で広くおこなわれている(3,4)。しかし現在に至るまで、TMZ を超える治療方法は確立されていない。

膠芽腫の治療成績を向上させるべく、新たな薬剤の開発や効果の検討がおこなわれている一方で、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クリポジショニングも注目されている。ドラックリポジショニングとは、他疾患に対して承認、使用されている既存の薬剤について、新たな薬効を見だし、別の疾患に対する治療薬として適応を拡大することを意味するものである(5)。我々の研究グループも、ドラックリポジショニングとして、様々な薬剤の膠芽腫細胞に対する抗腫瘍効果を検討し、その成果を報告してきた(6-10)。その中で、膠芽腫治療において、単剤あるいは TMZ との併用によりその効果を増強し得る薬剤として、 $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate 型グルタミン酸受容体拮抗薬である perampanel (PER) の可能性に着目した。

新規抗てんかん薬として、PER は現在のてんかん診療の場において広く使用されている。膠芽腫を含む脳腫瘍の患者は、高頻度にてんかんを合併することが知られている。そのため、多くの膠芽腫患者が、治療経過の中で抗てんかん薬を内服しているが、どの薬を第一選択薬とするかの明確な決まりはない。我々は、抗腫瘍効果を併せ持つ抗てんかん薬があれば膠芽腫の治療を考える上で極めて有用であると考え、in vitro の先行研究において PER が膠芽腫細胞に対する細胞増殖抑制効果を示すことを明らかにした。しかし、PER を

膠芽腫の治療薬として臨床応用するためには、現在の標準的治療薬である TMZ との併用効果やその機序、ならびに *in vivo* の実験による抗腫瘍効果を検討する必要がある。そこで我々は、*in vitro* における膠芽腫細胞に対する PER 単剤、TMZ と PER による併用による抗腫瘍効果や、*in vivo* における PER による単剤と併用療法の抗腫瘍効果を明らかにすることを目的に、本研究を行った。

実験には、市販のヒト膠芽腫培養細胞株である U-87MG、および、手術患者検体から新たに樹立した膠芽腫細胞株 0125-GSC を使用した。はじめに、PER 単剤投与による両細胞株に対する抗腫瘍効果を評価するために、細胞増殖抑制試験を行った。細胞増殖抑制試験では、PER を 0 ~ 100  $\mu\text{M}$  の濃度で細胞株に投与し、72 時間後に生存細胞の数を測定した。両細胞株とも、生細胞数は 1  $\mu\text{M}$  から有意に減少した ( $p < 0.01$ )。PER の  $\text{IC}_{50}$  は U-87MG で 78.4  $\mu\text{M}$ 、0125-GSC で 81.8  $\mu\text{M}$  であった。次に、PER が膠芽腫細胞に対する細胞増殖抑制効果を示す機序を検討するために、両細胞株に PER を投与した後の、アポトーシス、細胞周期の停止、ならびにオートファジーに関連するタンパクの発現をウエスタンブロット法で評価した。一次抗体は p53、pp53、p21、Bax、Fas-R、caspase-8、caspase-3、ATG5、LC3 を使用した。結果として上記抗体の発現が増強し、PER の膠芽腫細胞に対する細胞増殖抑制効果を示す機序としてアポトーシス、細胞周期の停止、ならびにオートファジーの誘導による細胞死が関係していることが確認された。続いて、同様の手法により、両細胞株に TMZ と PER を併用して投与した際の細胞増殖抑制効果ならびに細胞増殖抑制効果を示す機序を検討した。生細胞数は両細胞株において、TMZ と PER を併用した際に最も減少し、control、PER 単剤投与、TMZ 単剤投与と比較して有意差が認められた (全て  $p < 0.01$ )。TMZ 単剤投与時と PER 単剤投与時では生細胞数に有意差が認められなかった (U-87MG:  $p = 0.43$ 、0125-GSC:  $p = 0.06$ )。これらの結果から、*in vitro* では TMZ と PER 併用療法が、TMZ および PER 単剤よりも強い細胞増殖抑制効果を示した。また、TMZ と PER を併用することにより、単剤投与よりも強くアポトーシス、細胞周期の停止、オートファジーが誘導された。

最後に、PER の抗腫瘍効果、ならびに、TMZ との併用効果について、*in vivo* の実験を

行って検討した。動物実験として、購入した免疫不全マウス (CAnN.Cg-Foxn1nu/CrlCrj; Charles River Japan, Yokohama, Japan, メス, 7週齢) を 7 日間順化飼育した後に、脳内に U-87MG 細胞を定位的に移植しマウス膠芽腫モデルを作成した。移植は、3 種混合麻酔による全身麻酔下にマウスを脳定位固定装置で頭部を固定し、マイクロインジェクターに取り付けたハミルトンシリンジを bregma から 1mm 前方、2mm 外側に位置する頭蓋骨上に移動させた。マイクロドリルを用いて頭蓋骨に 2mm 径の穴を開けて脳表を確認し、ハミルトンシリンジを用いて脳内 3 mm の深さに腫瘍細胞溶液を移植した。腫瘍細胞溶液は、1 頭あたり  $2 \times 10^5$  個 / 2  $\mu$ l PBS に調整した。移植 7 日後にマウスを無治療群、TMZ (25 mg/kg) 投与群、PER (10 mg/kg) 投与群、TMZ (25 mg/kg) + PER (10 mg/kg) 併用投与群に分け、1 週間ごとに各薬剤を腹腔内注射して治療し生存期間を観察した。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。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、3 種混合麻酔下に頸椎を脱臼させて安楽死させた。無治療群、PER 投与群においては、安楽死させたマウスの脳を摘出し、HE 染色と免疫染色にて腫瘍の形態と存在の評価を行った。免疫染色は Ki-67 に対する一次抗体を使用した。いずれの群でも、HE 染色で脳内に腫瘍を形成していることを確認し、Ki-67 陽性細胞を確認した。各群のマウスの生存期間の中央値は、無治療群が 30.0 日、TMZ 投与群が 34.0 日、PER 単剤投与群が 41.0 日、TMZ + PER 併用投与群が 52.0 日であり、TMZ + PER 併用投与により、無治療群 ( $p < 0.01$ )、PER 単剤治療群 ( $p < 0.01$ )、TMZ 単剤治療群 ( $p < 0.05$ ) と比較し、有意に生存期間が延長することが明らかとなった。

先行研究において、PER が市販のヒト膠芽腫細胞株である A-172、AM-38、T98G、U-138MG、U-251MG、YH-13 に対し、*in vitro* で細胞増殖抑制効果を示すことを既に報告している(9)。同報告では、PER がいずれの細胞株に対しても、臨床の場で抗てんかん薬として使用される際の血中濃度である  $1 \mu$ M から細胞増殖抑制効果を示している(9,11)。この実験結果は、PER が実臨床における用量で膠芽腫に対する細胞増殖抑制効果を示し得ることが示唆されている。そして、先行研究で使用していない U-87MG および 0125-GSC に対しても、同

様に 1  $\mu$ M から細胞増殖抑制効果を示したことは、多様性に富む膠芽腫の治療を考える上でも有効な薬剤であることを示唆している。本実験で、PER が膠芽腫細胞に対して細胞増殖抑制効果を示す機序は、アポトーシス、細胞周期の停止、オートファジーを誘導することが示唆された。一方で、我々が行った A-172、AM-38、T98G、U-138MG、U-251MG、YH-13 を用いた先行研究では、PER 投与によるアポトーシスの誘導が認められたものの、細胞周期に対する影響は認められなかった(9)。そのため、本研究において PER の投与により p21 のタンパク発現が増強したが、実際に細胞周期の分布に影響を及ぼすほどの効果までは得られていない可能性が考えられた。本研究では、TMZ と PER の併用による膠芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果として、併用投与による細胞増殖抑制効果ならびにアポトーシス関連タンパク発現についても検討を行った。両薬剤を併用して投与することで、各薬剤を単剤で投与した際と比べて有意に細胞増殖が抑制された (U87-MG :  $p < 0.05$ , 0125-GSC :  $p < 0.01$ )。また、併用投与により、単剤投与時と比較し、より強くアポトーシスならびにオートファジーが誘導されることが分かった。また、TMZ と PER による併用治療は *in vivo* において有意に生存期間を延長させることが明らかとなった。PER が *in vivo* で抗腫瘍効果を発揮した理由のひとつとして、AMPA 型グルタミン酸受容体の性質が関係していると考えられる。神経膠腫患者の脳内にはシナプス間隙にグルタミン酸が過剰に存在しており、この過剰なグルタミン酸は、神経細胞の AMPA 型グルタミン酸受容体を活性化しててんかんの発生を促進するのみならず、神経膠腫細胞の AMPA 型グルタミン酸受容体からカルシウムイオンを伴って神経膠腫細胞内に取り込まれることで、神経膠腫細胞の増殖を促進していると考えられている(12,13)。そのため、AMPA 型グルタミン酸受容体の拮抗薬である PER は、脳内で周囲に神経細胞がある環境、すなわち、*in vitro* よりも *in vivo*、あるいは実臨床における生体において、より強い抗腫瘍効果を発揮するのではないかと期待される。本研究は、PER と TMZ による併用療法の抗腫瘍効果を *in vivo* の実験を含めて明らかにした初めてのものであり、膠芽腫の治療成績を向上させる可能性のみならず、ドラックリポジショニングとしての側面からも重要な知見となり得ると考えられた。

## 引用文献

1. Ostrom QT, Price M, Neff C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015-2019. *Neuro Oncol.* 2022 Oct 5; 24(Suppl 5): v1-v95.
2. 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: 627–636.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987-996.
4. 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):459-466
5. Nakada M. Drug repositioning in Neuro-Oncology. *Progress in Neuro-Oncology.* 2017;23(3):1-8.
6. Ogino A, Sano E, Ochiai Y, et al. Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines. *Oncol Lett.* 2014 Dec;8(6):2469-2474.
7. Ochiai Y, Sano E, Okamoto Y, et al. Efficacy of ribavirin against malignant glioma cell lines: Follow-up study. *Oncol Rep.* 2018 Feb; 39(2): 537–544.
8. Yamamuro S, Sano E, Okamoto Y, et al. Antitumorigenic effect of interferon- $\beta$  by inhibition of undifferentiated glioblastoma cells. *Int J Oncol.* 2015 Nov;47(5):1647-1654.
9. Tatsuoka T, Sano E, Hanashima Y, et al. Anti-tumor effects of perampanel in malignant glioma cells. *Oncol Lett.* 2022 Oct 7;24(6):421.
10. Yagi C, Tatsuoka J, Sano E, et al. Anti-tumor effects of anti-epileptic drugs in malignant glioma cells. *Oncol Rep.* 2022 Dec;48(6):216.
11. Izumoto S, Miyauchi M, Tasaki T, et al. Seizures and Tumor Progression in Glioma Patients with Uncontrollable Epilepsy Treated with Perampanel. *Anticancer Res.* 2018 Jul;38(7):4361-4366.

12. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, et al. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc- and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*. 2011 Mar 8;19(3):387-400.
13. Huberfeld G, Vecht C. Seizures and gliomas—towards a single therapeutic approach. *Nat Rev Neurol*. 2016 Apr;12(4):204-216.