

髄膜腫の新たな実験モデルを世界で初めて樹立！ ～患者腫瘍由来のオルガノイドモデルを用いた病態解析により 新たな治療法の確立へ～

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・門松健治）・脳神経外科（教授・齋藤竜太）の山崎慎太郎（やまざきしんたろう）大学院生、大岡史治（おおおかふみはる）講師、夏目敦至（なつめあつし）准教授らの研究グループは髄膜腫の腫瘍検体を用いて、新たな実験モデルである髄膜腫オルガノイドモデルの樹立に成功しました。

髄膜腫は、最も高頻度に発生する原発性脳腫瘍です。現在の標準治療は手術と放射線照射であり多くは経過良好であるものの、良性であっても取り切れない場合や悪性の場合は再発を繰り返し生命を脅かします。近年の研究により、髄膜腫の増殖に関わっている可能性のある重要な分子異常が同定されていますが、そのメカニズムはわかっておらず有効な分子標的治療薬は見つかっていません。髄膜腫では細胞株や動物モデル等の研究用モデルの作成が困難であることが大きな原因の一つとなり、詳細に病態を解明する研究を行うことが困難でした。近年、様々ながん腫で三次元の組織培養技術を用いたオルガノイドモデルが有望な研究モデルとして注目されています。この培養技術を用いて、培養を行ったすべての症例から髄膜腫のオルガノイドモデルを樹立することができ、世界で初めて報告しました。

増殖が早い悪性髄膜腫では、*FOXM1* 遺伝子が異常高発現していることに注目し、髄膜腫オルガノイドモデルを用いて、*FOXM1* の発現量が腫瘍の増殖に及ぼす影響を検証しました。オルガノイドモデルを用いて *FOXM1* 遺伝子を強制発現もしくはノックダウンすると増殖能が変化することを同定し、*FOXM1* 阻害剤と放射線治療を併用すると髄膜腫オルガノイドの増殖が抑制されることから、*FOXM1* が新規治療標的となる可能性を示しました。今後、本実験モデルを用いることで、髄膜腫の詳細な病態の解明と髄膜腫に対する新たな治療戦略の開発につながる可能性があります。

この研究成果は、「Neuro-Oncology」のオンライン版に掲載されました（2021年7月2日）。

ポイント

○髄膜腫（※1）は最も高頻度に見られる原発性脳腫瘍です。手術が標準治療ですが、取り切れなかった場合は、放射線治療は行われるものの薬物治療は確立しておらず治療が難しいことも多いです。髄膜腫の実験モデルは限られており、治療標的分子を同定する機能解析研究を進めることが困難です。

○新たな培養法として注目されている3次元組織培養技術であるオルガノイド（※2）培養法を用いて、手術摘出した髄膜腫腫瘍検体のオルガノイドモデルを樹立することに成功しました。樹立したオルガノイドモデルは腫瘍の組織学的及び遺伝的特徴を忠実に反映していることを確認しました。

○これまでに悪性髄膜腫の増殖に関与していると考えられていた *FOXM1*（※3）遺伝子の発現異常に注目し、オルガノイドモデルを用いた in-vitro 実験を行いました。*FOXM1* の過剰発現にて腫瘍増殖能が亢進し、逆に *FOXM1* の発現をノックダウンすると腫瘍増殖能が抑制されることを確認しました。また、*FOXM1* 阻害剤は放射線照射との併用により悪性髄膜腫オルガノイドの増殖を抑制し、高発現した *FOXM1* が悪性髄膜腫の新規治療標的となる可能性を示しました。

1. 背景

髄膜腫は、最も高頻度に見られる原発性脳腫瘍です。良性腫瘍が多く、多くの症例では手術のみで予後良好ですが、良性であっても手術で取り切れなかった場合や悪性の場合は、手術後に放射線治療が行われるものの、有効な薬物療法は見つかっておらず再発を繰り返し生命を脅かします。近年、髄膜腫の大規模な分子解析研究により、重要な分子異常が同定されていますが、これらの分子異常を標的とした薬物療法の開発研究は進んでいません。髄膜腫では細胞株や動物モデル等の研究モデルの樹立が困難であり、未だその病態の核心を突ききれていないことが、薬物療法の開発が進まない大きな原因になっています。近年様々ながん腫で三次元培養技術を利用したオルガノイドモデルが有望な研究モデルとして注目されています。オルガノイドモデルはこれまでに細胞株等の樹立が難しかった腫瘍でも高い成功率を示すことも報告されています。本研究では、髄膜腫の摘出腫瘍検体を用いて、病態解析に有用な新たな実験モデルとして髄膜腫オルガノイドモデルを樹立することを目的としました。

2. 研究成果

細胞培養の足場となる細胞外マトリックスとしてマトリゲルを使用して、髄膜腫 14 症例、孤立性線維性腫瘍 (Solitary fibrous tumor: SFT) 2 症例に対して手術摘出直後の腫瘍検体を 3 次元培養したところ、全症例で長期間培養可能なオルガノイドモデルを樹立できました。樹立したオルガノイドモデルはその元となる腫瘍の性質を反映していることを確認するためにそれぞれ、ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫組織化学染色（図 1）を行い組織学的特徴を維持していることを確認しました。また遺伝子学的特徴の検証のために遺伝子変異解析、遺伝子発現解析、DNA メチル化解析（図 2 ※4）を行いました。分子プロファイリングも維持できており、樹立したオルガノイ

ドモデルは患者腫瘍の特徴を忠実に反映した実験モデルと考えることができました。

これまでの報告で *FOXM1* 遺伝子は悪性髄膜腫において発現が亢進している遺伝子の一つであり、髄膜腫の増殖に重要な遺伝子である可能性が示唆されていましたが、その検証実験と治療標的としての有用性の評価は行われておりませんでした。*FOXM1* 遺伝子に着目し、元々 *FOXM1* の発現が少ない良性髄膜腫由来のオルガノイドモデルに *FOXM1* 強制発現ベクターを導入し *FOXM1* の発現を増加させると腫瘍の増殖が促進されました。逆に、*FOXM1* を高発現している悪性髄膜腫由来のオルガノイドモデル

で si-RNA を用いて *FOXM1* のノックダウンを行うと腫瘍増殖が抑制されました。更に、*FOXM1* 阻害剤である thiostrepton と悪性髄膜腫の標準治療である放射線照射を組み合わせることにより、悪性髄膜腫オルガノイドモデルの増殖が有意に抑制されることが明らかになりました（図 3）。

本研究では、これまで報告のない髄膜腫オルガノイドモデルの樹立に成功し、この実験モデルを用いることで、高発現した *FOXM1* が髄膜腫の腫瘍増殖促進に影響しており、新たな治療標的となる可能性を示しました。

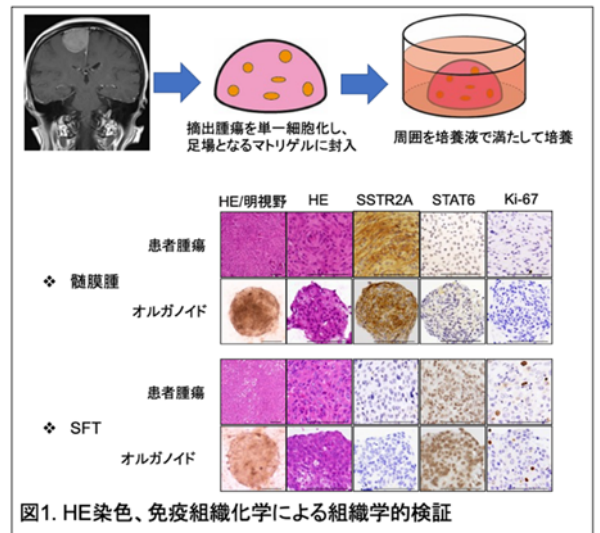


図1. HE染色、免疫組織化学による組織学的検証

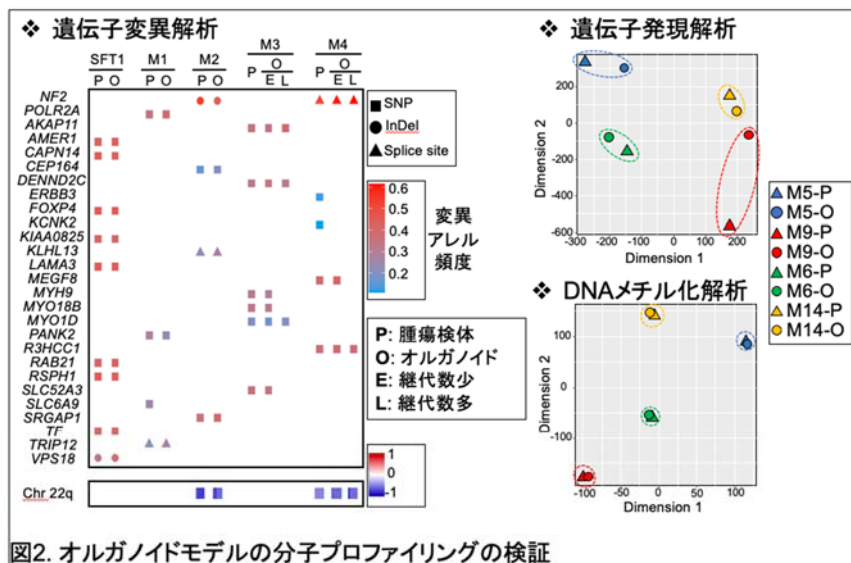


図2. オルガノイドモデルの分子プロファイリングの検証

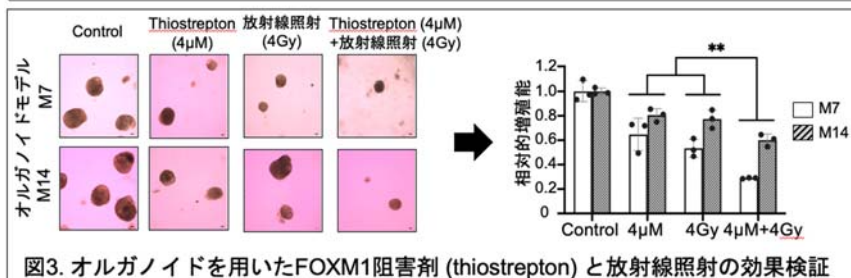


図3. オルガノイドを用いた *FOXM1* 阻害剤 (thiostrepton) と放射線照射の効果検証

3. 今後の展開

本研究で示された *FOXM1* 阻害剤の治療効果について、髄膜腫オルガノイドモデルを用いて更に詳細な腫瘍増殖抑制メカニズムの解明を目指します。また、髄膜腫において高発現した *FOXM1* が

誘導する分子異常を同定することで、新たな治療戦略の確立を目標とします。

4. 用語説明

※1. 髄膜腫（ずいまくしゅ）

脳の周りを覆う硬膜という膜から発生する腫瘍で最も発生頻度の高い原発性脳腫瘍です。腫瘍が増大することで脳や神経、血管を圧迫して様々な症状を呈します。悪性度は WHO 分類で形態学的な特徴により、緩徐な増大を示し良性のグレード I からより増殖能が高いグレード II、III に分類されます。腫瘍の発生部位によっては手術摘出が非常に困難となり合併症の危険性が高まり、更にグレード II、III の髄膜腫では外科的切除や放射線照射を行なっても再発を繰り返し予後不良の経過を辿ることが多くなります。

※2. オルガノイド

足場となる細胞外環境の存在下での三次元細胞培養技術を用いて樹立される組織様構造です。元となる正常組織や腫瘍の主な特徴を忠実に再現できるシステムと考えられています。オルガノイド培養法を用いることで、従来の二次元培養法では培養が困難であった正常組織や良性腫瘍由来の細胞を元にした培養が可能となります。ゲノム編集技術を用いた病態メカニズムの解析や、個別化医療の薬剤スクリーニング等に用いられています。

※3. *FOXM1*

Forkhead box M1 (*FOXM1*) は転写因子 FOXM1 をコードする遺伝子です。転写因子 FOXM1 は細胞周期の進行に関わる重要な遺伝子の発現を調整していると考えられています。*FOXM1* は髄膜腫以外の様々ながん腫でも異常高発現していることが報告されており、腫瘍増殖に関わる重要な遺伝子として注目されています。

※4. 遺伝子変異解析、遺伝子発現解析、DNA メチル化解析

近年脳腫瘍の分類には遺伝子変異、遺伝子発現異常、DNA メチル化パターン等の分子プロファイリングが重要であることが言われています。遺伝子変異については、遺伝子のうち RNA に転写されるエクソン領域における遺伝子変異を解析する全エクソン解析がよく行われます。遺伝子発現解析については転写された RNA の領域やコピー数を解析します。DNA メチル化についてはそれぞれの遺伝子領域のメチル化値を算出し、比較解析を行います。

5. 発表雑誌

掲雑誌名：Neuro-Oncology

論文タイトル：Newly Established Patient-derived Organoid Model of Intracranial Meningioma

著者：Shintaro Yamazaki^{1,6}, Fumiharu Ohka^{1,6*}, Masaki Hirano^{1,2}, Yukihiro Shiraki³, Kazuya Motomura¹, Kuniaki Tanahashi¹, Takashi Tsujiuchi⁴, Ayako Motomura⁴, Kosuke Aoki¹, Keiko Shinjo⁵, Yoshiteru Murofushi⁵, Yotaro Kitano¹, Sachi Maeda¹, Akira Kato¹, Hiroyuki Shimizu¹, Junya Yamaguchi¹, Alimu Adilijiang¹, Toshihiko Wakabayashi¹, Ryuta Saito¹, Atsushi Enomoto³,

Yutaka Kondo⁵, and Atsushi Natsume^{1*}.

所属 : 1. Department of Neurosurgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

2. Division of Molecular Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan.

3. Department of Pathology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

4. Department of Neurosurgery, Daido hospital, Nagoya, Japan

5. Division of Cancer Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

6. These authors equally contributed to this work.

DOI :

<https://academic.oup.com/neuro-oncology/advance-article/doi/10.1093/neuonc/noab155/6313216>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Neu_Onc_210702en.pdf