

主論文の要旨

**Newly established patient-derived organoid model of
intracranial meningioma**

〔髄膜腫の in vitro 研究に有用な新規オルガノイドモデルの樹立〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

(指導：齋藤 竜太 教授)

山崎 慎太郎

【緒言】

髄膜腫は最も頻度の高い中枢神経原発腫瘍である。The World Health Organization (WHO)の基準では、腫瘍の組織学的特徴によりグレード I、II、III に分類される。およそ 80%が良性(グレード I)に分類され、外科的腫瘍摘出が標準治療とされている。腫瘍の発生部位・摘出度によっては、術後に放射線照射を追加しても再発率が高くなることが知られている。近年、髄膜腫の大規模分子解析研究により、重要な分子異常 (*NF2*, *POLR2A*, *TRAF7*, *KLF4*, *AKT1*, *SMARCB1*, *SMARCE1*, *SMO*) が同定されている。しかし、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ることから、未だその病態の核心を突ききれておらず、治療薬剤の機能的解析も不十分であるために難治性髄膜腫に対する分子標的治療は確立されていない。近年様々ながん腫において、高い樹立効率を示す三次元培養法による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る。患者腫瘍から樹立されたオルガノイドモデルは、従来の細胞株や異種移植マウスモデル等と比べて、元となる腫瘍の性質をより忠実に再現するモデルと考えられている。本研究では、患者腫瘍の特徴を反映した新たな実験プラットフォームとして髄膜腫オルガノイドモデルを樹立し、分子解析・機能解析研究を進めることを目的とした。

【対象および方法】

細胞培養の足場となる細胞外マトリックスとして Matrigel を使用し、悪性髄膜腫細胞株 (HKBMM、IOMM-Lee)、手術摘出した髄膜腫 14 症例 (グレード I: 10 症例、グレード II: 3 症例、グレード III: 1 症例) 及び孤立性線維性腫瘍 (Solitary fibrous tumor: SFT) 2 症例の腫瘍組織サンプル (Table 1) を用いてオルガノイド培養を行った。樹立したオルガノイド組織と患者腫瘍組織のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色及び免疫組織染色 (IHC) を行い組織学的特徴を比較した。更に、上記組織からそれぞれ抽出した DNA 及び RNA を用いて全エクソン解析、コピー数解析、遺伝子発現解析、DNA メチル化解析を行い、分子プロファイルについて比較・検討を行った。公開されている髄膜腫の遺伝子発現データを解析し、異常増殖能と関連する分子異常を探索した。樹立した髄膜腫オルガノイド (グレード I または II) を用いて同定した分子の遺伝子強制発現実験、si-RNA を用いた RNA 干渉実験を行うことにより、増殖能に与える影響を検証した。また、同定した分子に対する阻害剤が高悪性度髄膜腫オルガノイドの増殖に与える効果を検証した。

【結果】

オルガノイド培養法を用いて悪性髄膜腫細胞株を三次元培養すると悪性髄膜腫様の組織学的所見を示すことを確認した (Figure 1A)。同培養条件にて髄膜腫、SFT の腫瘍検体を用いて、摘出直後の組織を培養したところ、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た。樹立したオルガノイドモデルは各々の患者腫瘍と類似した組織学的特徴を示した。IHC では、髄膜腫に特徴的な SSTR2A と SFT に特徴的な

STAT6 はいずれもそれぞれの腫瘍種のオルガノイドモデル、患者腫瘍検体で同様に高発現を示した。また、オルガノイドモデルと患者腫瘍検体の腫瘍増殖能を示す Ki-67 index は同程度であり、オルガノイドモデルの長期培養後もこの結果は維持された (Figure 1B)。更に、オルガノイドモデル及びその患者腫瘍に対して行った遺伝子解析でも、遺伝子変異、コピー数異常については互いに類似したプロファイルを示した (Figure 2)。公開されている RNA-seq データを解析し、グレード II 及び III 髄膜腫はグレード I 髄膜腫と比較し *FOXMI* を有意に高発現しており、*FOXMI* の遺伝子発現量は Ki-67 index の相関係数は最も高いことを明らかにした (Figure 3)。*FOXMI* に着目し、グレード I 髄膜腫オルガノイドモデルに *FOXMI* 強制発現ベクターを導入すると増殖が促進された。また、グレード III 髄膜腫オルガノイドモデル及び細胞株オルガノイドモデルで si-RNA を用いて *FOXMI* のノックダウンを行うと増殖が抑制された (Figure 4)。更に、*FOXMI* 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と、高悪性度髄膜腫オルガノイドの増殖が有意に抑制された (Figure 5)。

【考察】

これまでの髄膜腫研究では、従来の二次元培養による腫瘍細胞株あるいは異種移植動物モデルが実験に用いられてきた。そのほとんどは悪性髄膜腫由来、あるいは遺伝子操作にて不死化した良性髄膜腫由来の細胞株であり、大部分が良性腫瘍である髄膜腫の病態理解には障壁があった。また、髄膜腫では異種移植マウスモデルの樹立率も極めて低いことが知られている。細胞株や異種移植マウスモデルの樹立には多くの時間と資源を必要とする一方で、今回我々が報告した髄膜腫オルガノイドモデルは、わずかな腫瘍検体を元に、2 週間以内で全例の樹立に成功しており、樹立効率の高い有望な実験モデルと考えられる。近年、様々ながん腫で報告されるオルガノイドモデルは、腫瘍組織の主要な特徴を再現できるモデルと考えられており、治療薬剤の効果解析に優れ、RNA 干渉実験や CRISPR-Cas9 による遺伝子編集実験にも利用されている。髄膜腫オルガノイドモデルの報告は本研究が初めてであり、RNA 干渉実験及び薬剤に対する機能的解析にも有用であることが示された。

現在、一部の髄膜腫を対象に AKT1、SMO を標的とした臨床試験 (ClinicalTrials.gov: NCT02523014) が進行中であるが、特定の分子変異を標的とした治療法確立には未だ至っていない。本研究により髄膜腫の増殖に寄与する *FOXMI* が治療標的となり得る可能性を示した。*FOXMI* は細胞周期制御に関わる転写因子であり、膠芽腫、肝癌、乳がん等では高発現した *FOXMI* が β -catenin、cyclin D1、p21、interleukin 8 (IL-8)、vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) 等の発現を増加させ、腫瘍進展を促しているとの報告がある。*FOXMI* に対する阻害剤としては sionomycin A、thiostrepton 等が知られているものの、現在臨床のがん治療に対して認可された *FOXMI* 阻害剤は存在しない。今後、髄膜腫オルガノイドモデルを用いてより詳細な増殖メカニズムを解明することで、*FOXMI* を含む異常分子パスウェイの一部を標的とした治療法の開発につながることを期待される。

【結語】

患者腫瘍の組織学的・分子的特徴を模倣した髄膜腫オルガノイドモデルを高率に樹立した。本モデルを利用して遺伝子強制発現実験、RNA 干渉実験、治療実験を行うことで、高発現した *FOXMI* が髄膜腫の腫瘍増殖に関与しており、新規治療標的となりうることを示した。髄膜腫オルガノイドモデルは、髄膜腫の病態解明と新たな治療戦略の確立に大きく寄与することが期待される。