

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) TERT を標的とした新規阻害剤の悪性脳腫瘍に対する臨床応用を目指した研究  
(英語) Investigation of an anti-tumor effect of a novel TERT-targeting inhibitor against malignant brain tumors and its development for clinical application

研究開発担当者 (日本語) 市村 幸一, 国立がん研究センター研究所 脳腫瘍連携研究分野 分野長  
所属 役職 氏名： (英語) Koichi Ichimura, Chief, Division of Brain Tumor Translational Research, National Cancer Center Research Institute

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 脳腫瘍細胞を使ったエリブリンの抗腫瘍効果の検討  
開発課題名： (英語) Preclinical study on the anti-tumor effect of eribulin against glioblastoma cells

研究開発分担者 (日本語) 増富 健吉, 国立がん研究センター研究所 がん幹細胞研究分野 分野長  
所属 役職 氏名： (英語) Kenkichi Masutomi, Chief, Division of Cancer Stem Cell, National Cancer Center Research Institute

分担研究 (日本語) 臨床検体の収集と管理、医師主導治験の準備と統括  
開発課題名： (英語) Collection and management of patients' tumor materials, preparation for an investigator-initiated clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 成田 善孝, 国立がん研究センター中央病院 脳脊髄腫瘍科科長  
所属 役職 氏名： (英語) Yoshitaka Narita, Head of Department of Neurosurgery and Neuro-oncology, National Cancer Center Hospital

分担研究 (日本語) エリブリンの膠芽腫に対する適応拡大を目的とした医師主導治験の準備と統括

開発課題名: (英語) Preparation for an investigator-initiated clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 田村 研治, 国立がん研究センター中央病院 乳腺・腫瘍内科 科長

所属 役職 氏名: (英語) Kenji Tamura, Head of Department of Breast and Medical Oncology, National Cancer Center Hospital

  

分担研究 (日本語) エリブリンの脳腫瘍モデルに対する薬物動態の検討

開発課題名: (英語) Pharmacokinetic study of eribulin in the mouse brain tumor model

研究開発分担者 (日本語) 濱田 哲暢, 国立がん研究センター研究所 臨床薬理部門 部門長

所属 役職 氏名: (英語) Akinobu Hamada, Chief, Division of Molecular Imaging & Pharmacokinetics, National Cancer Center Research Institute

  

分担研究 (日本語) 臨床検体の収集と管理、医師主導治験の準備と統括

開発課題名: (英語) Collection and management of patients' tumor materials, preparation for an investigator-initiated clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 西川 亮, 埼玉医科大学国際医療センター 脳脊髄腫瘍科 教授

所属 役職 氏名: (英語) Ryo Nishikawa, Professor, Department of Neuro-oncology/Neurosurgery, Saitama Medical University International Medical Center

  

分担研究 (日本語) 膠芽腫の幹細胞株樹立、臨床検体の収集と管理、医師主導治験

開発課題名: (英語) Establishment of glioblastoma stem cell lines, collection and management of patients' tumor materials, preparation for an investigator-initiated clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 武笠 晃丈, 東京大学医学部脳神経外科 講師

所属 役職 氏名: (英語) Akitake Mukasa, Lecturer, Department of Neurosurgery, The University of Tokyo

## II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

本研究は TERT を標的とした新規阻害剤としてのエリブリンの膠芽腫に対する抗腫瘍効果と薬物動態を非臨床試験において検証し、エリブリンの膠芽腫に対する医師主導治験に導出することを目的とする。

### ① 脳腫瘍細胞を使ったエリブリンの抗腫瘍効果の検討

現在までに 7 株の膠芽腫細胞株および 2 株の卵巣がん細胞株に対してエリブリンに対する薬剤感受性を WST アッセイにより調べた。TERT プロモーターは 3 株で野生型であり、6 株に変異を認めた。TERT 変異を持つ細胞では IC50 は 0.21~3.08 nM とエリブリンに高感受性を持つことが示された。TERT 野生型の 2 つの細胞ではそれぞれ 16.5nM、>100nM と感受性が低く、エリブリンに対する感受性が TERT 変異と相関することが示された。

### ② マウスモデルを使ったエリブリンの抗腫瘍効果の検討

これまでに 22 種類の膠芽腫細胞を免疫不全マウスの脳内に移植した結果、12 種類に生着を確認した。これらのうち 6 種類の膠芽腫細胞において脳腫瘍マウスモデルを作成し、エリブリンを投与して生存期間を比較検討している。そのうち 1 細胞株については 5 週間の投与を行った結果、生存中央値がコントロールの 28 日に対して 49 日と有意( $p<0.001$ )に延命効果を認めた。また別の細胞株についても有意な生存期間延長効果が認められた。また F-luc を導入した膠芽腫細胞を用いたマウス脳腫瘍における生体イメージングにより、エリブリンが著名な増殖抑制効果を持つことを示した。

### ③ エリブリンの脳腫瘍モデルに対する薬物動態の検討

エリブリンのマウス脳腫瘍モデルにおける薬物動態を解析するために LC-MS/MS ならびに質量分析イメージング装置を用いて腫瘍部位への薬剤移行率を評価した。その結果エリブリンは正常脳には移行しないものの脳腫瘍には経静脈投与 1 時間後に 139nM、24 時間後 73nM と血液中よりも高い濃度で存在し、質量分析イメージングによっても腫瘍組織内への均一な分布が確認された。膠芽腫の皮下移植腫瘍で同様の実験を行った結果、脳腫瘍と同じく腫瘍組織への高い薬剤移行性が認められ、また投与 24 時間後には血漿中や腎臓・肝臓に比べて高い濃度が保たれていた。

### ④ エリブリンの膠芽腫に対する適応拡大を目的とした医師主導治験の準備

国立がん研究センター研究支援センターの協力を得て、医師主導治験のプロトコールはほぼ完成した。PMDA との対面助言も終了し、製薬会社からは治験薬の提供などの確約を得た。本研究の成果をもとにエリブリンの膠芽腫に対する適応拡大を目的とした医師主導治験を行うための研究費として平成 29 年度 AMED 革新がん「TERT を標的とした再発膠芽腫に対するエリブリンの医師主導治験」（研究代表者：成田善孝）を申請し、採択された。平成 29 年度からは医師主導治験の準備と実施は AMED 成田班に引き継がれる。

### ⑤ 臨床検体の収集と管理

膠芽腫細胞株に対し TERT プロモーター変異、MGMT メチル化、TERT mRNA、IDH 変異、標的シーケンスを用いた点突然変異などについて解析を行い、薬剤感受性との関連を調べている。TERT プロモーター変異は 32 株中 28 株で変異を認めた。TERT mRNA は変異を認める細胞株すべてで正常脳に比べ発現の上昇を認めたが、変異のない膠芽腫幹細胞株では低発現だった。IDH は全て野生型であった。膠芽腫の手術検体に対し同様の解析を行っており、国立がん研究センターの 63 例の脳腫瘍においては TERT プロモーター変異 30 例、IDH 変異 16 例、MGMT 高メチル化を 24 例で認めた。これらの検査は国立がん研究センターで確立された pyrosequencing を用いた迅速なアッセイにより行われ、Sanger

sequencing の結果とも一致した。また TERT アッセイの測定対象となるグリオーマの手術検体を各施設で収集・管理し、TERT 変異・IDH 変異の解析などを行った。

#### ⑥ 膠芽腫の幹細胞株樹立と遺伝子解析

エリブリンの治療効果評価に供するための膠芽腫の幹細胞株を引き続き手術検体より樹立することを試みている。平成 28 年度は新規悪性神経膠腫手術検体 7 例から 10 種の脳腫瘍幹細胞様の細胞株の樹立に成功し、これらの細胞に対し、順次、幹細胞の性質を有することを確認しており、現在のところ持続的に継代可能なことが確認されている。これら脳腫瘍幹細胞の作成に用いた膠芽腫及びその他の神経膠腫の臨床検体（凍結検体・正常患者末梢血）の収集と管理を行うとともに、これらの検体に対し、全例 IDH 遺伝子変異を同定したのに加え、必要に応じて TERT 遺伝子プロモーター変異、染色体 1p19q 欠失、ATRX 遺伝子 loss、H3.3 K27M 遺伝子変異、BRAF V600E 遺伝子変異など遺伝子異常の解析を施行した。

英文

The purpose of the project is to investigate an anti-tumor effect and pharmacokinetics of eribulin as a novel TERT-targeting inhibitor against glioblastomas, and to initiate an investigator-initiated clinical trial of eribulin for recurrent glioblastomas.

#### 1. Investigation on an anti-tumor effect of eribulin against glioblastoma cells in vitro

Eribulin sensitivity was studied in 7 glioblastoma cells and 2 ovarian cancer cells by using a WST assay. TERT promoter mutations were found in 6 out of 9 cell lines. IC50 was very low (0.21-3.08nM) in TERT promoter-mutated cell lines, indicating high drug sensitivity, while IC50 was relatively high in 2 TERT-wt cell lines, being 16.5nM and >100nM, respectively. These results suggested that the sensitivity against eribulin is dependent on the TERT promoter status.

#### 2. Investigation on an anti-tumor effect of eribulin against glioblastoma xenografts in vivo

A total of 22 glioblastoma cell lines were transplanted into the brain of immune-compromised mice, of which 12 cell lines successfully formed intracerebral brain tumor xenografts. Among them, 6 cell lines were subjected to investigate anti-tumor effect of eribulin. In one of the glioblastoma cell line, 5-weeks administration of eribulin significantly prolonged survival of the brain tumor-harboring mice (median 49 days) compared with the untreated control mice (28 days,  $p < 0.001$ ). A similar survival benefit of eribulin was observed in another cell line. A marked growth inhibitory effect of eribulin was also documented real-time by in vivo imaging using a glioblastoma cell transduced with lentiviral vector expressing Fluc.

#### 3. Pharmacokinetic study of eribulin in a mice brain tumor model

To study pharmacokinetics of eribulin in brain-tumor harboring mice, the concentration and distribution of eribulin in the brain tumor tissue were studied using LC-MS/MS and a molecular imaging. The results showed that eribulin concentration in the brain tumor tissue was 139nM at 1 hour after intravenous injection of eribulin and 73nM at 24 hours after injection, the concentration higher than that in plasma. An even distribution of eribulin in the brain tumor tissue was confirmed

using a molecular imaging. A similar results were observed in a subcutaneously transplanted glioblastoma xenograft, i.e., concentration of eribulin in the tumor tissue being higher than that in plasma, kidney or liver 24 hours after infection.

#### **4. Induction of an investigator-initiated clinical trial**

An investigator-initiated clinical trial of eribulin for recurrent glioblastomas is being planned. With a support from the Center for Research Administration and Support (CRAS) at National Cancer Center Japan, the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) and the pharmaceutical company, a clinical trial protocol is being prepared. Based on the promising early preclinical results, a phase II trial of eribulin in patients with recurrent glioblastoma (ENIGMA trial) has now been successfully approved for support by the research grant from the Practical Research for Innovative Cancer Control Program, Japan Agency for Medical Research and Development (AMED).

#### **5. Collection of glioblastoma samples and their genetic analysis**

For the glioblastoma cell lines used for the preclinical study, analysis for the TERT promoter mutation, MGMT methylation, TERT mRNA expression and IDH mutation, as well as targeted sequencing of selected genes, have been carried out and being compared with their eribulin sensitivity. TERT promoter mutations were observed in 28 out of 32 cell lines. TERT mRNA expression was elevated in all TERT-mutated cell lines, whereas it was low in TERT-wt cells. No IDH mutations were observed. A similar analysis is being performed in clinical glioblastoma specimens. In 63 gliomas operated at National Cancer Center Hospital, TERT promoter mutations were found in 30 cases, IDH mutations in 16 and MGMT methylation in 24. An efficient pyrosequencing assay to study these alteration have been established at National Cancer Center, and the results were in concordance with that of Sanger sequencing. Glioma samples are also being collected and analyzed in 2 other participating centers.

#### **6. Establishment of glioblastoma stem cell culture and their genetic analysis**

To further extend the preclinical study of eribulin, a stem cell culture of patients' glioblastoma tissue is being performed. A total of 10 cell lines from 7 patients were successfully established and their stem cell property confirmed. These cell lines as well as their respective original tumor specimens are being analyzed for IDH mutation, TERT promoter mutation, 1p/19q codeletion, ATRX loss, H3.3 K27M mutation and BRAF V600E mutation.

### **III. 成果の外部への発表**

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 0件)  
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 「TERT を標的とした新規膠芽腫治療の開発」口頭、高橋雅道、三木俊一郎、松下裕子、毎田佳子、安川麻美、福岡講平、松崎真恵、林光博、濱田哲暢、米盛勸、田村研治、武笠晃丈、西川亮、増富健吉、成田善孝、市村幸一、第 34 回日本脳腫瘍学会、2016/12/5、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし