

BRAF 変異高悪性度神経膠腫の薬剤耐性機構獲得機序の解明

横浜市立大学大学院医学研究科脳神経外科学講座 博士後期課程 3年

大島 聡人

(研究目的)

神経膠腫は最も頻度の高い原発性脳腫瘍のひとつであり、遺伝子異常を標的とした新たな治療法の開発が近年進んでいるものの、現時点では治療成績の向上につながる画期的な治療法の確立には至っていない。一部の高悪性度神経膠腫 (high-grade glioma, HGG) にはBRAFV600E変異が高率に存在することが知られている。BRAFV600E変異を伴うHGGは10-20代の若年に多く発生し、通常の膠芽腫 (glioblastoma, GBM) と比較して非常に高率に髄液播種をきたし、また予後は6ヶ月未満と極めて不良であるなど、分子生物学的な病態解明と治療法の開発が急務である。BRAFV600E変異HGGに対してはBRAFやその下流のMEKを標的とした分子標的薬による治療が報告されているが、薬剤耐性化の問題が指摘されており、また耐性化の原因については未だ不明な点が多い。

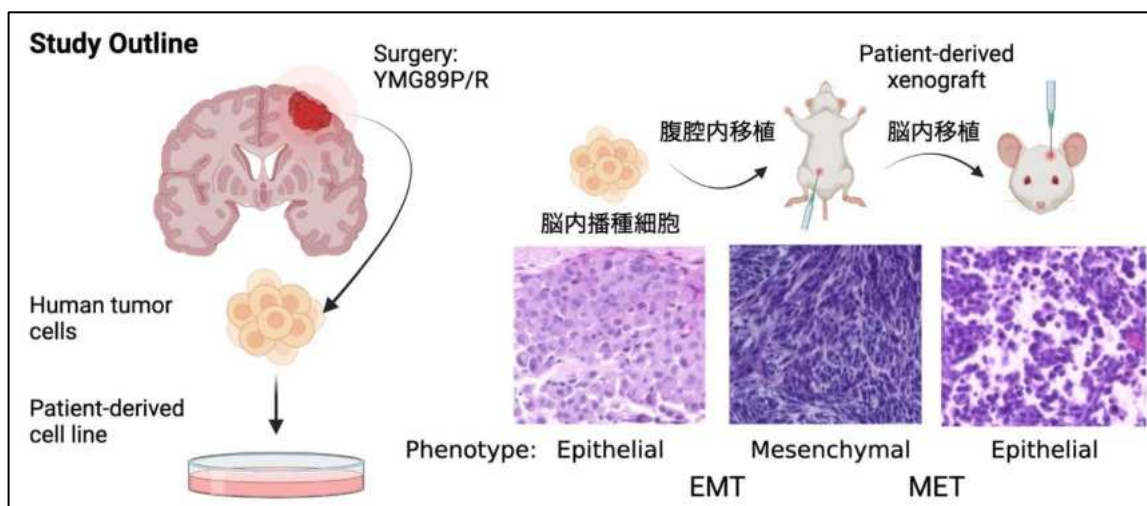
最近の研究により本腫瘍はepithelioid-likeとGBM-likeの組織が混在したヘテロな腫瘍であるとされたため、最新のWHO 2021脳腫瘍基準では分類から外れるなど診断上の混乱をもたらしている。我々は、BRAFV600E変異HGGが治療抵抗性を示す原因として、この腫瘍内不均一性に着目した。予備実験の結果から、腫瘍内不均一性の背景には組織可塑性の高さと、それを誘導する腫瘍微小環境が存在していると仮説を立てた。本研究では、世界に先駆けて樹立したBRAFV600E変異HGGペアモデルを通じて、分子標的治療後の腫瘍微小環境と腫瘍細胞の可塑性を通じた薬剤耐性機構獲得機序の解明を目指している。

(研究方法)

当施設にてBRAFV600E変異HGG症例を2例経験した。1例 (YM62)は分子標的治療に不応、もう1例 (YM89)は分子標的治療に当初は著効も数回の治療後に耐性をきたした。手術時に採取した腫瘍検体(primary, P)及び再発時髄液中より採取した播種性病変(recurrence, R)から細胞株の樹立を図り、いずれも安定株が得られた。またこれらの細胞株からPDXモデルを樹立した。これらのモデルは、①患者腫瘍同様に、髄膜播種を主体とした腫瘍形成を呈する表現型の再現、②BRAFV600Eを始めとした遺伝子異常を有する遺伝型の再現、③in vitro, in vivoでの分子標的治療反応性/抵抗性の再現などを確認しており、臨床像を忠実に再現するモデルである (Sasame J et al. 2022)。

この実験過程において、BRAFV600E変異HGGの表現型が容易に変化する興味深い現象を観察した。脳内に播種した患者由来BRAFV600E変異HGG細胞塊 (epithelial phenotype) を mouseの腹腔内に移植すると、mesenchymal phenotypeに表現型が変化した。更に、この腹腔内腫瘍を脳内に再移植するとepithelial phenotypeを呈することが病理組織学的に観察された。すなわち、上皮間葉転換 (EMT; epithelial-mesenchymal transition) および間葉上皮転換 (MET; mesenchymal-epithelial transition) が誘導された結果と考えられ

る。重要なことに、これまで世界有数のPDXモデルを作成してきた当研究室の実績から、周囲組織によって組織像が変化する現象は一般的なGBMでは観察されないことを確認している。この結果から、BRAFV600E変異HGGの組織可塑性の高さは、髄液播種の病態や分子標的薬に対する耐性機構獲得に寄与している可能性があり、腫瘍微小環境によって腫瘍細胞の遺伝子発現が変化することで誘導されていると仮説を立てた。



本研究期間内に以下の実験を実施した。

実験1. YMG89Pの培養細胞では浮遊細胞と接着細胞が混在することから、この現象がEMTを反映していると仮説を立てた。浮遊細胞と接着細胞を分離して、Western blot (WB) 法により上皮系マーカー・間葉系マーカーの発現を評価することで、仮説を検証した。

実験2. YMG89の初発・再発の腫瘍細胞について、EMT関連蛋白質の発現の評価をWB法で行った。また、初発・再発の各々に対してBRAF阻害薬 (dabrafenib) 治療を24時間行い、WB法でEMT関連蛋白質の発現の変化を評価した。

実験3. YMG89Pの培養細胞にdabrafenibを7ヶ月間にわたって長期治療を施した細胞を樹立した (YMG89P-Dab7mo)。(なお、この細胞株ではMEK, BRAF治療抵抗性に変化しており、YMG89Pを模倣した細胞であることが既報で示されている。) これらの細胞株に発現しているEMT関連蛋白質をWB法で評価した。

実験4. BRAF阻害薬naïveの患者検体株 (YMG89P) からPDX mouseを作成し、このPDX mouseにvehicle治療とBRAF阻害薬 (dabrafenib) 治療を継続的に行った後、安楽死させた。両群の病理組織像をHE染色および免疫染色で評価し、さらにそれぞれの組織に発現しているEMT関連の蛋白質をWB法で評価した。

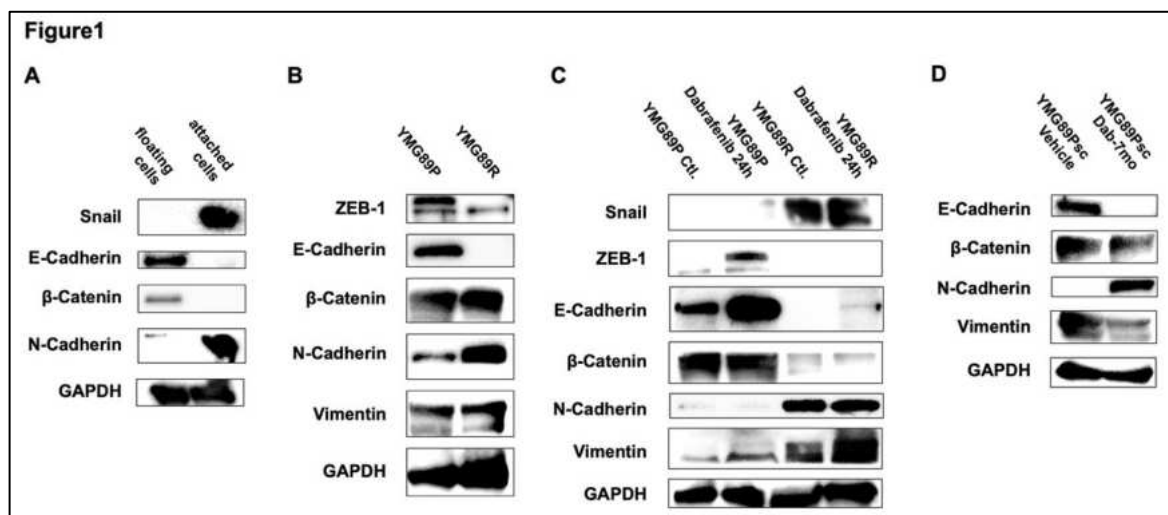
(結果)

結果1. 浮遊細胞は上皮系、接着細胞は間葉系マーカーの発現が上昇しており、仮説が裏付けられた (Figure 1A)。

結果2. YMG89では、初発時にはepithelial type、再発時にはmesenchymal typeを示すマーカーの亢進が認められ、再発時にはEMTが生じていることが示唆された (Figure 1B)。一方で、YMG89P, 89R細胞をdabrafenibで24時間治療した細胞では、明らかなEMTの誘導は生じていなかった (Figure 1C)。この結果から、dabrafenibの治療によって短期的にはEMT

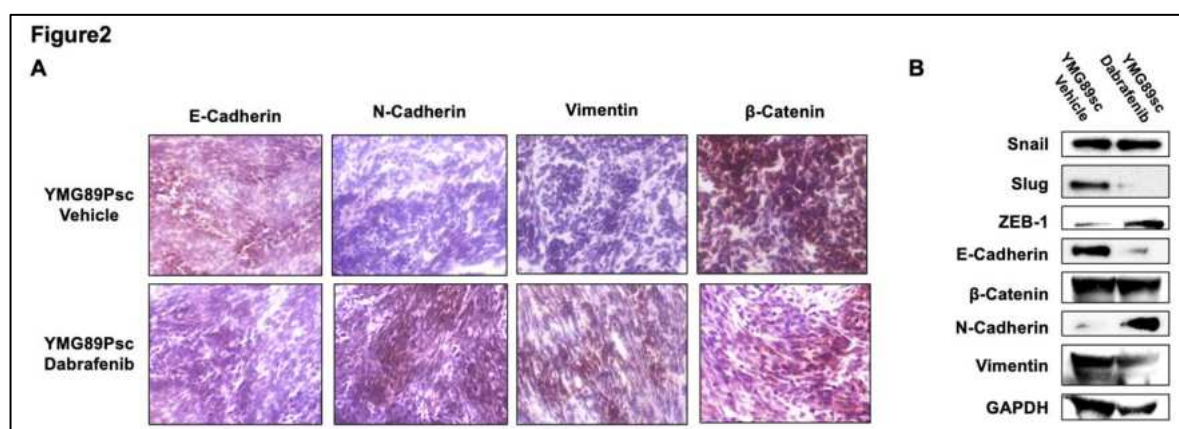
は誘導されない可能性が示された。

結果3. YMG89P-Dab7mo細胞では、上皮系マーカーが減弱し、間葉系マーカーが亢進していることから、YMG89R同様にEMTを生じていると考えられる結果を得た (Figure 1D)。実験1の結果と合わせると、dabrafenib治療によって短時間ではEMTは誘導されないが、長期間の暴露によって再発時同様のphenotypeを示すようになることが示唆された。



結果4.

病理組織像 (Figure 2A) : Vehicle治療群 (対照群) の組織像はepithelial type、dabrafenib治療群 (治療群) の組織像はmesenchymal typeであった。それぞれの組織を上皮系マーカー、間葉系マーカーの免疫組織染色で評価した。組織像の表現系を裏付けるように、対照群ではE-cadherinが細胞膜に集積している一方、治療群ではN-cadherin, vimentinがそれぞれ細胞膜と細胞質に集積していることが確認された。さらに、β-cateninは、対照群では細胞膜下に強い染色を示していたが、治療群では細胞質や核内に集積していた。このことから、治療群ではβ-catenin が細胞膜から遊離し、細胞質および核内に局在していたことは、EMTプログラムを司る遺伝子の発現が誘導されていることが示唆された。



蛋白発現 (Figure 2B) : WB法の結果、E-cadherin, N-cadherinは免疫組織化学染色と合致する結果であり、dabrafenib治療によってEMTが誘導された可能性が示唆された。β-

cateninについては、IHCで細胞内局在の変化は捉えられたが、蛋白発現の総量は変化していない結果であった。EMT誘導に関わる転写因子としては、ZEB-1の発現が増加していることから、この転写因子が本実験系のEMTを誘導するkey moleculeである可能性が示唆された。一方で、snailは両群で変化がなく、またslugは治療群発現が低下しているなど、その他の転写因子については一貫した結果は得られなかった。

(成果・考察)

申請者が所属する研究グループは、患者腫瘍検体から樹立したヒト由来脳腫瘍マウスモデル(PDX モデル)を活用したトランスレーショナル研究を通じて、BRAFV600E変異HGGの分子標的治療剤に対する薬剤抵抗性機序を解明するとともに、耐性を克服する標的分子(HSP90)を見出した(Sasame J, et al. Clin Cancer Res. 2022)。しかしながら、本腫瘍が高率に髄液播種を来す病態機序や、見出した治療候補薬剤HSP90阻害剤が髄液播種後の病態をどのように制御するかなど、本腫瘍の制御において重要な未解決課題が残されている。

今回の研究成果によって新たに解明された内容は以下に集約される。

- YMG89細胞は上皮系を示す浮遊細胞と間葉系を示す接着細胞が混在する腫瘍であり、BRAF阻害薬の長期間の治療によってEMTが誘導されることが、in vitro, in vivo実験の結果から示された。このことは、YMG89細胞が再発時に髄液播種を伴い制御困難となった現象を反映している可能性がある。
- EMTを誘導する因子として数多くのもが知られているが、今回の実験で調査した限りでは、ZEB-1が候補因子の一つと考えられた。

これらの結果は、BRAF変異高悪性度神経膠腫の薬剤耐性機序として組織可塑性が関わっているという仮説を支持するものである。今後は、この研究結果を基盤として、ZEB-1を抑制することによってEMTの制御と髄液播種や薬剤耐性化の抑制につながるかの検証、ならびに我々が見出したHSP90阻害剤が腫瘍細胞の可塑性をも制御し得るかを検証していく。

(倫理的配慮)

本研究は横浜市立大学における人を対象とする生命科学・医学系研究倫理委員会：タイトル；脳腫瘍のバイオマーカーの探索と標的治療開発に向けた遺伝子解析及びヒト由来脳腫瘍細胞株を用いた前臨床研究，B220203057，更新承認日令和4年2月3日、タイトル；脳脊髄腫瘍に対する病態解明、治療法の検証、及び予後因子の解明に関する後ろ向き前向き研究(IRB no. B190700012, 承認日令和元年7月18日)、及び横浜市立大学動物実験委員会承認(IRB no. FA21-025, 承認日令和3年5月17日)、遺伝子組換え生物等の第二種使用等拡散防止措置(no. F-D-21-30, 承認日令和3年3月31日)に基づいて実施した。

周術期患者の喉の渇きに対する看護師の認識とケアの実態

横浜市立大学大学院 周麻酔期看護学分野 博士前期課程
花城 真理子

I. 研究目的

周術期患者の 75.0%～89.6%(Pierotti et al, 2018 ; Aroni et al, 2012)が術後 24 時間以内に喉の渇きを訴えるとされ、その割合は術後の痛みや嘔気・嘔吐と同様に、周術期患者の訴えとして高い頻度である。術後の喉の渇きの要因は、年齢、性別、ホルモン分泌の変化、不安、麻酔や術中使用薬剤など様々である(Conchon et al,2015)。そのため、喉の渇きは単に補液による循環血液量の補正だけで改善することが難しい現象と言える。

周術期患者は痛みや苦痛により喉の渇きを医療者に訴えづらい(Silva et al, 2016)。よって周術期患者の喉の渇きを早期に改善するためには、周術期ケアに関わる看護師が患者の喉の渇きを認識すること、および周術期の継続した観察やケアが必要となる。そのためには、外科系病棟看護師と手術室看護師のケアの視点やその共有、連携が必要だと考える。

しかし、これまで外科系病棟看護師と手術室看護師が周術期患者の喉の渇きをどのように認識し、ケアを行い、互いに情報共有しているかは明らかとなっていない。よって本研究は周術期に関わる看護師を対象として周術期患者の喉の渇きに対する認識とケアの実態を明らかにすることを目的とした。

II. 研究方法

1. 研究デザイン、研究対象者および研究期間

自記式質問紙を用いた横断的調査研究であり、A 学附属病院 2 施設の集中治療領域を含む外科系病棟看護師と手術室看護師を研究対象者とした（以下より対象者である看護師は Ns と示す。また、外科系病棟 Ns のうち、集中治療系病棟 Ns を除く病棟看護師を一般病棟 Ns とする。）

2. 調査内容および分析方法

先行研究を参考に無記名自記式質問紙を作成した。調査項目は、1)対象者の背景、2)周術期の観察項目、3)周術期患者の喉の渇きを認識するタイミング、4)喉の渇きに関する看護師の情報共有、5)喉の渇きの評価、6)ケアの実態(種類と頻度)とした。分析は単純集計し記述統計量を算出した。なお本研究では患者の主観である喉の渇きを看護師が第三者として客観的に認識することを調査内容とした。

3. 倫理的配慮

本研究は、横浜市立大学 人を対象とする生命科学・医学系研究倫理委員会の承認(承認番号：F220900001)を得た。

III. 結果

1. 対象者の背景

研究協力の得られた対象者 741 名にアンケートを配布し、有効回答の得られた 432 名を分析対象とした(有効回答率 58.3%)。分析対象者数の内訳は、外科系病棟 Ns 389 名(一般病棟 Ns 298

名、集中治療系病棟 Ns 91 名)、手術室 Ns 43 名であった。

2. 周術期患者の喉の渇きに対する看護師の認識

1) 看護師が普段から観察している術後観察項目 (図表なし)

いずれの所属の Ns も「術後の痛み」、「出血」、「嘔気・嘔吐」、「不穏・せん妄」は「いつも観察する」が 80%以上であった。一方、喉の渇きを「いつも観察する」頻度は低かった。

2) 看護師が周術期患者の喉の渇きを認識するタイミング (図 1)

いずれの所属の Ns も「患者からの訴えがあった時」に患者の喉の渇きを認識していた。集中治療系病棟 Ns の認識 (図 1c)はすべての項目において 65%を超えていた。

3) 患者の喉の渇きに関する看護師の情報共有 (図 2)

患者の喉の渇きに関する情報共有は術前よりも術後に行われていた。術後、手術室 Ns は病棟 Ns に対して情報共有したと回答した割合が高かったが、病棟 Ns は手術室 Ns と情報共有していないと回答した割合が高かった。

4) 患者の喉の渇きの評価 (図表なし)

患者の喉の渇きを「尺度やスケールを使って評価したことがある」者はいなかった。

3. 周術期患者の喉の渇きに対するケアの実態

1) 術前の患者の喉の渇きに対するケアの実態 (表 1)

術前のケアを行った群の病棟 Ns は 38.3%であった。行ったケアは「水での含嗽を行ってもらった」が最多だった。手術室 Ns は 11.6%であり、行ったケアは「濡らしたガーゼを口に当てた」が最多だった。両者ともケア選択の理由は「患者の意向があったから」が最多だった。ケアを行わなかった群の病棟 Ns は 56.7%、手術室 Ns は 81.4%であり、理由は「飲水禁止の指示があるから」が多かった。

2) 術後の患者の喉の渇きに対するケアの実態 (表 2)

術後のケアを行った群の病棟 Ns は 70.9%であり、ケアは「水で含嗽を行ってもらった」、理由は「患者の意向があったから」が多かった。手術室 Ns は 18.6%であり、ケアは「濡らしたガーゼを口に当てた」、理由は「効果があると思うから」が多かった。集中治療系病棟 Ns は 96.6%であり、「濡らしたスポンジブラシでの口腔内清拭を行った」、理由は「患者の意向があったから」が最多だった。ケアを行わなかった群の病棟 Ns は 29.1%、手術室 Ns は 81.4%であり、理由は「飲水禁止の指示があるから」が最も多かった。集中治療系病棟 Ns は 3.4%であり、理由はその他の自由記載で「患者から訴えがなかった」であった。

IV. 成果・考察

1. 看護師が認識する周術期患者の喉の渇き

1) 看護師が術後観察している項目と喉の渇き

看護師は術後「術後の痛み」、「出血」、「不穏・せん妄」、「嘔気・嘔吐」を主に観察しており、「喉の渇き」は他の観察項目より観察頻度が低いことが明らかとなった。この結果は、Pavani ら (2016)が、看護師は患者の喉の渇きを過小評価していると述べた結果と同様であった。「術後の痛み」、「不穏・せん妄」、「嘔気・嘔吐(PONV)」は近年予防や治療法が確立されてきているため、観察している頻度が高かったと考えられた。しかし「喉の渇き」のケアに関するエビデンスは整

理されておらず(Nascimento et al, 2020)、明確な改善方法が示されていない。よって術後観察する頻度が低く、評価する項目として考えられていないのではないかと推察された。

2) 看護師が患者の喉の渇きを認識するタイミングと所属ごとの特徴 (図 1)

いずれの所属の看護師も、唇の渇きや舌の渇き、口呼吸の様子や皮膚状態などの身体所見よりも、患者の訴えによって喉の渇きを認識している割合が最も高かった。先行研究では、麻酔科医や病棟 Ns が患者の喉の渇きを、患者から直接訴えられるまで認識しない(Pavani et al, 2016; Silva et al, 2016)ことが示されており、本研究結果も同様であった。よって患者の喉の渇きの改善のためには、患者が訴えやすいよう意図的に聞く必要があると考えられた。

看護師が周術期患者の喉の渇きを認識するタイミングに関しては、集中治療系病棟 Ns がいずれの項目も 65%以上と他の所属の看護師より割合が高かった。つまりこの結果は、集中治療系病棟では、患者のケア頻度が高く、看護師のアセスメント頻度も高いことを示唆している。よってアセスメント頻度が喉の渇きを認識する割合に影響している可能性が考えられた。

3) 喉の渇きに関する情報共有 (図 2)

病棟間の情報共有について手術室看護師を対象とした先行研究では「手術室と病棟ではリスク認識の違いがあり共有できていないことがジレンマ」(乾ら, 2020)と示されている。喉の渇きに対して尺度やツールを使って評価していなかったという本研究の結果からも、情報共有の際に喉の渇きを共通認識できていない可能性が考えられた。

「術後、病棟内」で喉の渇きに関する情報を共有している割合が、病棟 Ns、集中治療系病棟 Ns 共に高かった。術後は病棟内で継続して患者を看る必要があるため、患者からの訴えや行っているケアを病棟内で共有してケアを行っている可能性が考えられた。

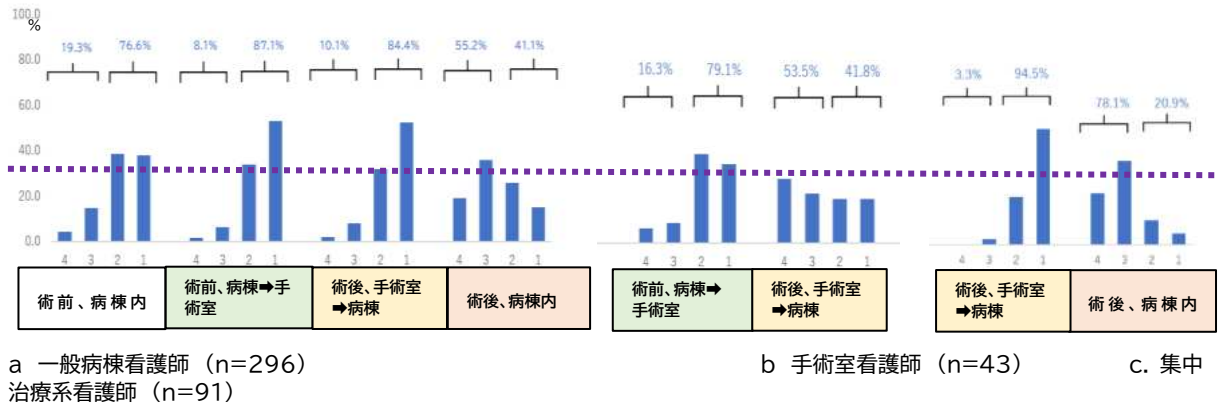
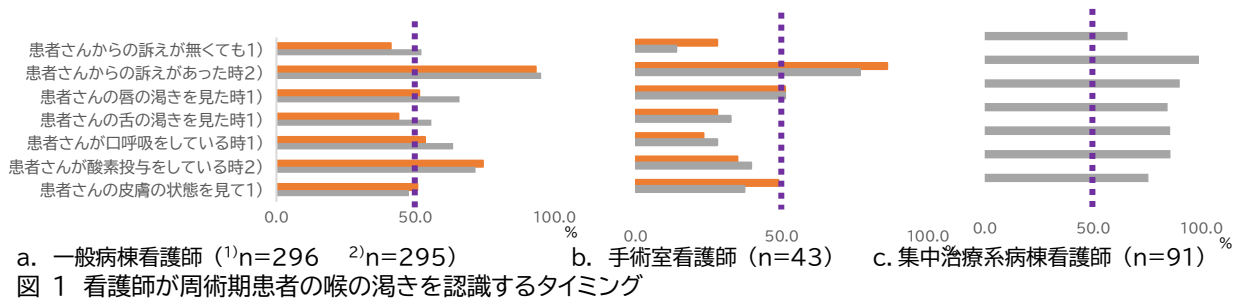
2. 看護師が行う周術期患者の喉の渇きに対するケアの実態 (表 1、表 2)

術前は、病棟 Ns と手術室 Ns 共に、ケアを行った看護師よりケアを行わなかった看護師の割合が高く、その理由は「飲水禁止の指示があるから」であった。この結果から、本研究対象者は医師から「飲水禁止の指示」に従い喉の渇きに対するケアを行っていなかったことが考えられた。しかしその一方で、術前患者の喉の渇きに対して、飲水以外の方法で喉の渇きを改善するケアを行っている看護師がいることが、本研究で初めて明らかとなった。この結果から周術期患者の喉の渇きは術前から生じていること、患者は看護師に対してケアを求めていることが示唆された。

術後は、病棟 Ns の 70.9%、集中治療系 Ns の 96.6%、手術室 Ns の 18.6%が患者の喉の渇きに対してケアを行っていた。またケア選択理由は、いずれの所属の看護師も「患者の意向」、「効果があると思うから」が多かった。Pavani ら(2016)は、看護師は経験的に喉の渇きに対するケアを行っていたと示している。本研究対象者は平均 12.1±10.4 年の看護師経験があり、先行研究で効果があると思われている「レモン水噴霧」や「生食噴霧」よりも、経験に基づいたケアを行っていた。よって、本研究対象者は看護師として働く経験の中でケア方法を見出し、先輩から教わるなど、患者にとっての効果を考えてケアを行っていることが推測された。

V. 研究の限界と今後の課題

本研究は大学病院で行ったものであり、一般化には限界がある。今回の結果をもとに今後はより広い範囲で調査を行い、国内の喉の渇きに対するケアの実態を明らかにしていく必要がある。



4: いつも共有する 3: ときどき共有する 2: あまり共有しない 1: 全く共有しない

図 2 患者の喉の渇きに関する看護師の情報共有

※棒グラフの上部に<情報共有する群>、<情報共有しない群>の%を表記。

表1 術前の患者の喉の渇きにするケアの実態

a. 術前のケアを行った群

<ケアの有無>	病棟 N=298, 手術室 N=43, n(%)	
	病棟	手術室
ケアを行った	114 (38.3)	5 (11.6)
<ケアの種類> ※複数選択可項目	病棟 n=132	手術室 n=5
濡らせたガーゼを口に当てた	20 (15.2)	4 (80.0)
濡らしたスポンジブラシでの口腔内清拭を行った	14 (10.6)	0 (0.0)
水での含嗽を行ってもらった	116 (87.9)	0 (0.0)
洗口液での含嗽を行ってもらった	8 (6.1)	0 (0.0)
口腔用湿潤スプレーを使用した	3 (2.3)	0 (0.0)
口唇に保護剤 (ワセリンなど) を塗った	16 (12.1)	1 (20.0)
その他	6 (4.5)	1 (20.0)
<ケア選択の理由> ※複数選択可項目	病棟 n=132	手術室 n=5
患者さんの意向があったから	81 (61.4)	2 (40.0)
学生の時に学校で教わったから	1 (0.8)	0 (0.0)
先輩から教わったから	29 (22.0)	1 (20.0)
病棟のルールだから	6 (4.5)	0 (0.0)
文献などで見たことがあるから	3 (2.3)	0 (0.0)
効果があると思うから	69 (52.3)	3 (60.0)
なんとなく	6 (4.5)	0 (0.0)
その他	3 (2.3)	1 (20.0)

b. 術前のケアを行わなかった群

<ケアの有無>	病棟 N=298, 手術室 N=43, n(%)	
	病棟	手術室
ケアを行わなかった	169 (56.7)	35 (81.4)
<ケアを行わなかった理由> ※複数選択可項目	病棟 n=165	手術室 n=26
飲水禁止の指示があるから	54 (32.7)	10 (38.5)
病棟のルールだから	0 (0.0)	0 (0.0)
ケアをしてはいけないと教わったから	0 (0.0)	0 (0.0)
なんとなく	6 (3.6)	2 (7.7)
どのように行えばいいか、わからないから	13 (7.9)	6 (23.1)
必要ないと思うから	7 (4.2)	2 (7.7)
誤嚥の可能性があるから	5 (3.0)	3 (11.5)
行っても効果がないと思うから	0 (0.0)	1 (3.8)
他の業務で忙しいから	7 (4.2)	3 (11.5)
その他	19 (11.5)	6 (23.1)

表2 術後の患者の喉の渇きに対するケアの実態

a. 術後のケアを行った群

<ケアの有無>	病棟 N=298, 手術室 N=43, 集中治療系病棟 N=91, n(%)		
	病棟	手術室	集中治療系
ケアを行った	200 (70.9)	8 (18.6)	86 (96.6)
<ケアの種類> ※複数選択可項目	病棟 n=205	手術室 n=8	集中治療系 n=89
濡らせたガーゼを口に当てた	80 (39.0)	7 (87.5)	36 (40.4)
濡らしたスポンジブラシでの口腔内清拭を行った	51 (24.9)	0 (0.0)	84 (94.4)
水での含嗽を行ってもらった	189 (92.2)	0 (0.0)	82 (92.1)
洗口液での含嗽を行ってもらった	9 (4.4)	0 (0.0)	3 (3.4)
口腔用湿潤スプレーを使用した	3 (1.5)	0 (0.0)	10 (11.2)
口唇に保護剤 (ワセリンなど) を塗った	25 (12.2)	2 (25.0)	35 (39.3)
口腔内に生食を噴霧した	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
口腔内にレモン水を噴霧した	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
医師に飲水できるか確認した	39 (19.0)	2 (25.0)	33 (37.1)
その他	6 (2.9)	1 (12.5)	7 (7.9)
<ケア選択の理由> ※複数選択可項目	病棟 n=213	手術室 n=7	集中治療系 n=89
患者さんの意向があったから	165 (77.5)	— ¹⁾	79 (88.8)
学生の時に学校で教わったから	3 (1.4)	1 (14.3)	2 (2.2)
先輩から教わったから	55 (25.8)	2 (28.6)	28 (31.5)
病棟のルールだから	5 (2.3)	2 (28.6)	3 (3.4)
文献などで見たことがあるから	4 (1.9)	1 (14.3)	2 (2.2)
効果があると思うから	97 (45.5)	3 (42.9)	51 (57.3)
なんとなく	10 (4.7)	1 (14.3)	3 (3.4)
その他	4 (1.9)	2 (28.6)	5 (5.6)

b. 術後のケアを行わなかった群

<ケアの有無>	病棟 N=298, 手術室 N=43, 集中治療系病棟 N=91, n(%)		
	病棟	手術室	集中治療系
ケアを行わなかった	82 (29.1)	35 (81.4)	3 (3.4)
<ケアを行わなかった理由> ※複数選択可項目	病棟 n=94	手術室 n=36	集中治療系 n=3
飲水禁止の指示があるから	39 (41.5)	10 (27.8)	0 (0.0)
病棟のルールだから	1 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)
ケアをしてはいけないと教わったから	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
なんとなく	3 (3.2)	2 (5.6)	0 (0.0)
どのように行えばいいか、わからないから	7 (7.4)	5 (13.9)	0 (0.0)
必要ないと思うから	4 (4.3)	2 (5.6)	0 (0.0)
誤嚥の可能性があるから	20 (21.3)	6 (16.7)	0 (0.0)
行っても効果がないと思うから	0 (0.0)	2 (5.6)	0 (0.0)
他の業務で忙しいから	9 (9.6)	3 (8.3)	0 (0.0)
その他	7 (7.4)	5 (13.9)	3 (1.8)

肝外胆管癌モデルマウスの樹立と新規治療法の開発

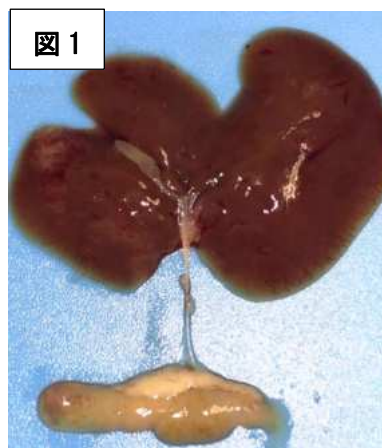
横浜市立大学附属病院 消化器外科 指導診療医
豊田 純哉

(研究目的)

本研究の目的は、**精密な肝外胆管癌マウスモデルを構築し、新規治療法を開発すること**である。

新規治療法の開発には、動物モデルの利用が不可欠である。マウスの肝外胆管は非常に短く

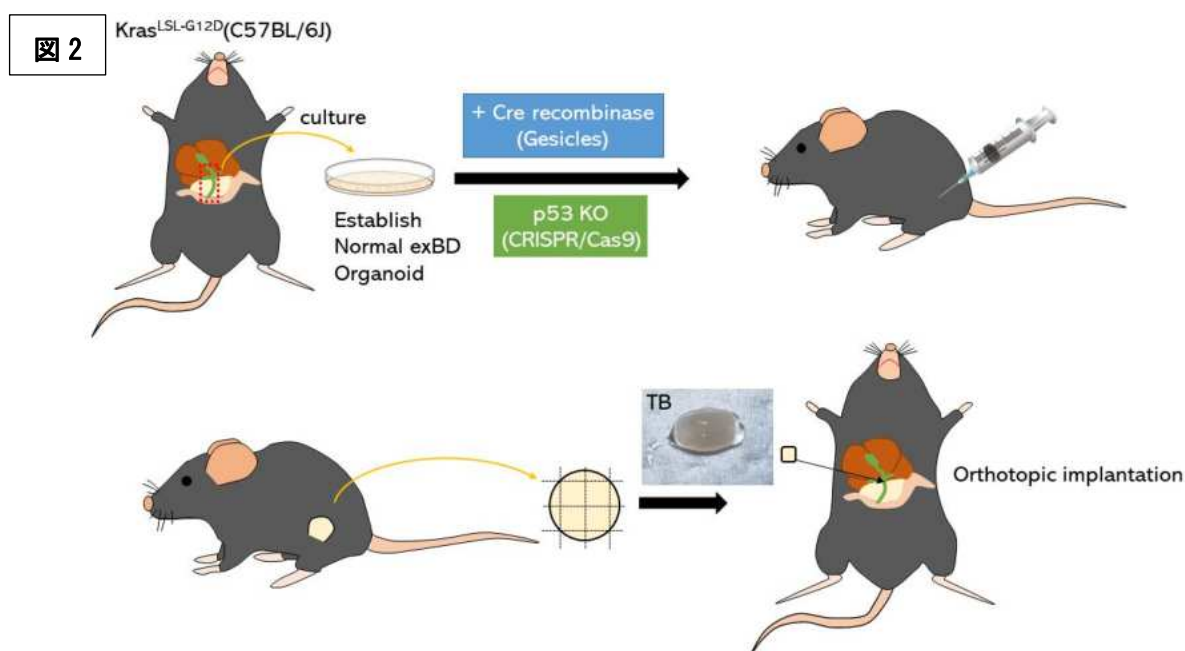
(図1)、厳密に肝外胆管にのみ腫瘍が発生しているモデルはこれまでに報告されていない。本研究では、本学附属病院・がんゲノム診断科の加藤真吾先生が開発したImplantation of organoid-derived Tumor Bud (IoTB) (Oncogenesis. 2021; 10(4))を利用し、厳密に肝外胆管に腫瘍が生じるモデルを構築する。更に、網羅的遺伝子発現解析を行い、治療標的となる下流シグナル系を明らかにし、肝外胆管癌における新規治療の開発を目指す。



(研究方法)

1). IoTB 法を用いた肝外胆管マウスモデルの構築

本学附属病院・がんゲノム診断科の加藤真吾先生と共同で樹立した肝外胆管癌オルガノイド株を野生型マウスの皮下に移植し、皮下腫瘍の形成を確認する。増大した皮下腫瘍を摘出し、小さく刻んだ腫瘍片を別の野生型マウスに同所 (肝外胆管) に移植する (IoTB 法)。この手法を用いて、肝外胆管マウスモデルを構築する (図2)。移植後の胆管閉塞を予防するために、プラスチックステントを経乳頭的に挿入する。挿入するステントの形状や性質の検討を行う。



2). 網羅的遺伝子発現解析による薬剤標的シグナル系の探索

3)で治療標的とした単一免疫細胞を用いて RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析を行う。Bioinformatics 解析を用いて活性化する下流シグナル系を明らかにし、遺伝子変異や病変部位の違いでの発現の相違を分析する。

(結果)

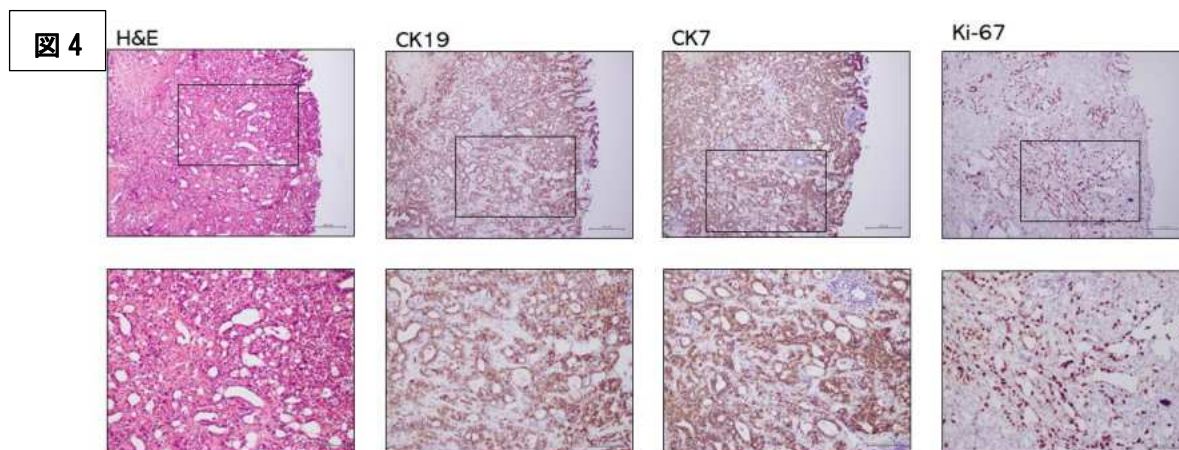
① 肝外胆管癌オルガノイドの皮下腫瘍形成

Kras^{LSL-G12D}を有するマウス肝外胆管から樹立した肝外胆管癌オルガノイドにCRISPR/Cas9を用いて、p53ノックアウトを導入し作成した、KrasG12D変異 + p53 ノックアウト肝外胆管癌オルガノイドを野生型マウス (C57BL/6J) にマトリゲルと共に皮下注射を行い、腫瘍形成能を評価した。

当教室で樹立したKrasG12D変異+ p53ノックアウト肝外胆管癌オルガノイドの3株のいずれにおいても皮下注射後6週間で腫瘍形成を認めた。一方でKrasG12D変異のみを有する肝外胆管癌オルガノイドからは腫瘍形成能を認めなかった (図3)。



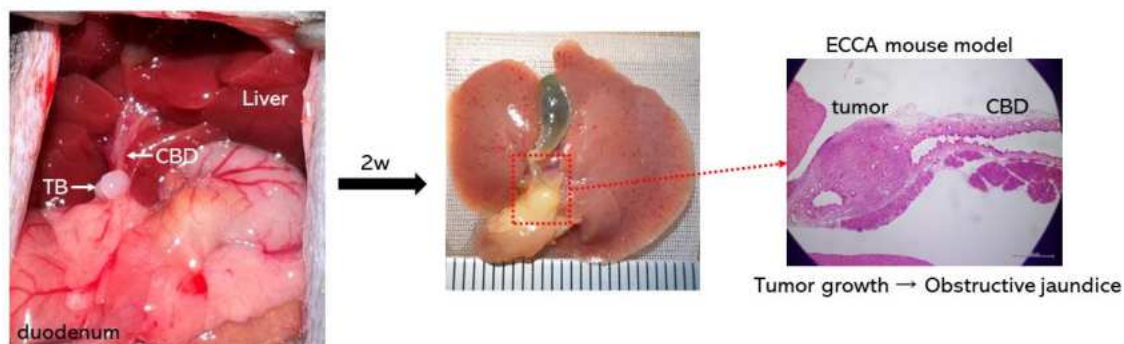
皮下腫瘍をHE染色すると腺癌を呈しており、免疫染色では胆道上皮マーカーであるCK19, CK7やKi-67が染色された (図4)。



② 腫瘍片の同種同所移植（IoTB法）による肝外胆管癌モデルマウスの構築

同腫瘍から5mm角の腫瘍片（Tumor bud）を作製し、野生型マウス（C57BL/6J）の肝外胆管へ同所移植を行った（IoTB法）術後2週間で腫瘍片は胆管に浸潤し、粘膜面まで腺癌に置換され、肝外胆管癌の病理像を呈することを確認した（図5）。しかし、腫瘍による閉塞性黄疸を来し、IoTB後2-3週間で死亡してしまうため、胆道ドレナージが必要であった。そこでIoTB施行時にプラスチックステントによる胆嚢空腸バイパスを作製する事により、生存期間が延長し、動物実験を施行可能なマウス肝外胆管モデルを作成することに成功した。

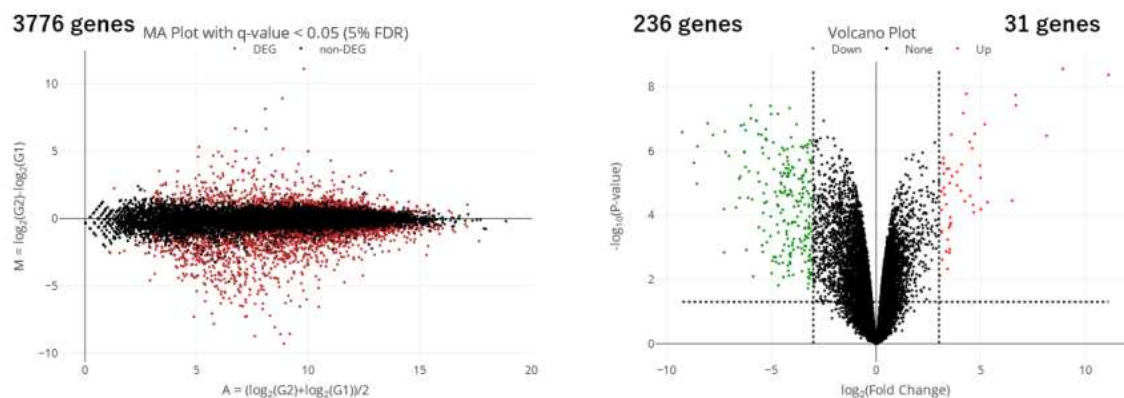
図 5



③ 網羅的遺伝子発現解析による薬剤標的シグナル系の探索

マウス肝外胆管オルガノイドとマウス肝外胆管癌オルガノイド（KrasG12D変異 + p53 ノックアウト）をそれぞれRNAシーケンスを行い、遺伝子発現を比較した。現在、治療標的となる可能性のある経路を探索中である。

図 6 Digital Gene Expression (KrasG12D + p53 KO vs Wild type)



（成果・考察）

新規治療法の開発には、動物モデルの利用が不可欠である。胆管癌のマウスモデルは遺伝子改変モデル、化学発癌モデルやがん移植モデルの報告があるが、既報では肝内胆管癌のものが多い¹。肝外胆管癌マウスモデルはNakagawaらの報告している遺伝子改変マウスモデルのみである²。しかし、同モデルはKras、TGFβR2、E-cadherinの3つの遺伝子変異を誘導した遺伝子改変マウスモデルであり、個体数の確保までの時間・コスト効率が悪く

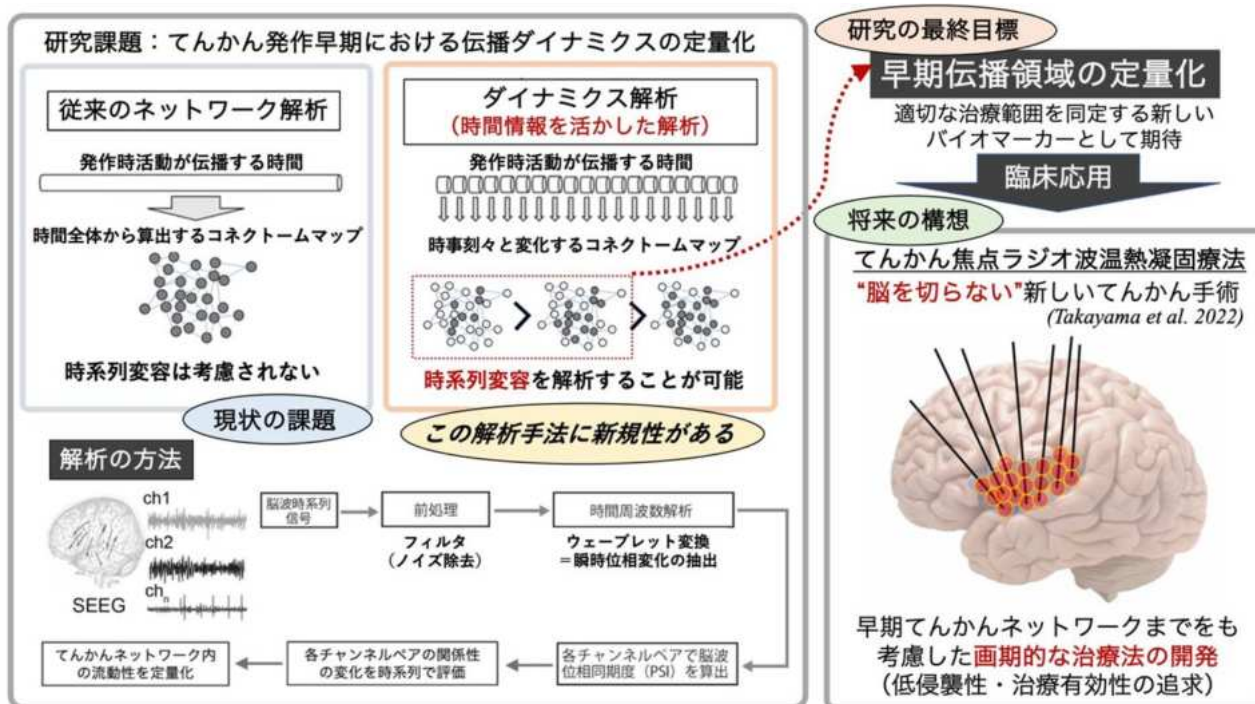
(自前作成した場合、一般的に作成期間に1年半程度、コストは過剰発現マウスで約100万円、ノックアウトマウスでは約1000万円が目安である)、新規治療法の開発には不适当である。また厳密に肝外胆管にのみ腫瘍が発生しているがん移植モデルはこれまでに報告されていない。本研究では、研究協力者である横浜市立大学附属病院がんゲノム診断科の加藤真吾が開発した腫瘍片同所移植法 (Implantation of organoid-derived tumor bud (IoTb) 法)³ を利用し、厳密に肝外胆管に腫瘍が生じるがん移植モデルを構築した。また同モデルはマウス肝外胆管癌オルガノイド株から作成した腫瘍片を用いた同種同所移植モデルであり、患者由来がんモデルと異なり、より生理的な状況下での腫瘍微小環境を分析することが可能である。今後は同モデルを用いて、治療標的となる経路に対する薬剤投与実験や報告が少ない肝外胆管癌の腫瘍微小環境の解析を行う方針である。

- 1 Loeuillard E, Fischbach SR, Gores GJ et al. Animal models of cholangiocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019; 1865 (5): 982-992.
- 2 Nakagawa H, Suzuki N, Hirata Y et al. Biliary epithelial injury-induced regenerative response by IL-33 promotes cholangiocarcinogenesis from peribiliary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114 (19): E3806-E3815.
- 3 Kato S, Fushimi K, Yabuki Y et al. Precision modeling of gall bladder cancer patients in mice based on orthotopic implantation of organoid-derived tumor buds. *Oncogenesis* 2021; 10 (4): 33.

非線形ダイナミクス解析を用いたヒトてんかんネットワークの時系列変容の解明～定位的頭蓋内脳波記録を用いた検討～

横浜市立大学附属病院 脳神経外科
高山 裕太郎

(研究目的)



てんかんは「てんかん発作を引き起こす持続性素因を特徴とする脳の障害」と定義される。薬剤抵抗性てんかんに対しは外科治療が有用な選択肢である。てんかん外科治療では、てんかん焦点の正確な同定が重要であり、その過程における頭蓋内脳波記録の有用性が知られている。これまでの頭蓋内脳波記録の有用性と限界を検証する研究の成果により、発作制御のためには発作起始領域だけでなく、定位的頭蓋内脳波 (SEEG) を用いた早期伝播ネットワークの解明が重要であることが示唆された。また、SEEG の技術を基盤として提唱・開発を進めてきたラジオ波てんかん焦点温熱凝固療法は、脳の深部であっても、脳を切らずに正確かつ安全に治療できる新しい手術として評価されている。本治療の安全性と有効性を向上させるために、早期伝播ネットワークを考慮した治療プランニングは必須であり、発作早期の神経伝播ダイナミクスの可視化は、将来のてんかん外科治療にとって重要な臨床的課題である。この課題を解決するためにネットワーク内流動性 (Network Flexibility: NF) に着目した。ネットワーク構造は内部のノード間の接続性が流動的に移り変わり続けていることによって安定化するという考え方がある。この流動性をNFと呼ぶ。本研究では NF を解析する

ことで、神経伝播のダイナミクスを可視化し、てんかんネットワーク内において発作時早期に伝播する脳領域（早期伝播領域）を定量化することが目的である。本研究で試みるてんかん発作早期における神経伝播ダイナミクスの可視化は、今までにない全く新たな視点であり、非常に特色のある研究になると思われる。ミリ秒単位で変調するてんかんネットワークのダイナミクスを可視化は、高い S/N 比を有し、時間・空間分解能に優れる頭蓋内脳波記録を用いて初めて可能となる。特に、てんかんネットワークの存在を前提に電極を留置する SEEG を利用する点が本研究の強みである。その成果を、ラジオ波てんかん焦点温熱凝固療法の治療計画に応用することで、早期てんかんネットワークまでをも考慮した低侵襲かつ有効性の高い画期的な治療法の完成を目指している。

（研究方法）

（1）てんかんネットワークのダイナミクスの定量化

SEEGによって得られる頭蓋内脳波データを短い時間データにエポック化し、それぞれのデータから2電極間の関係性を算出し、全電極間の関係性を示すネットワークマトリクスを作成する。マトリクスから定量化されるNFの経時データを算出することで、脳内てんかんネットワークダイナミクスの情報を得る。具体的には、薬剤抵抗性てんかん患者を対象にSEEGを施行し、得られた発作時の頭蓋内脳波データを解析対象として、2電極における脳波の頂点（山と谷）のタイミングの一致度（位相同期度：PSI）を計算することで2電極間の関係性が算出する。この計算を5000ペア程度繰り返すことで、全電極間のネットワーク内流動性(NF)が評価する。この解析により早期てんかんネットワークが定量化され、最終的に早期伝播領域の決定に至る。

（2）ラジオ波てんかん焦点温熱凝固療法の開発

てんかんネットワークのダイナミクスの定量化に加えて、この解析を実装するための新規治療であるラジオ波てんかん焦点温熱凝固療法の開発を進める。具体的にはその標的選択や凝固体積、侵襲性を抑えるための工夫について後方視的に考察することで治療手法の最適化を図る。

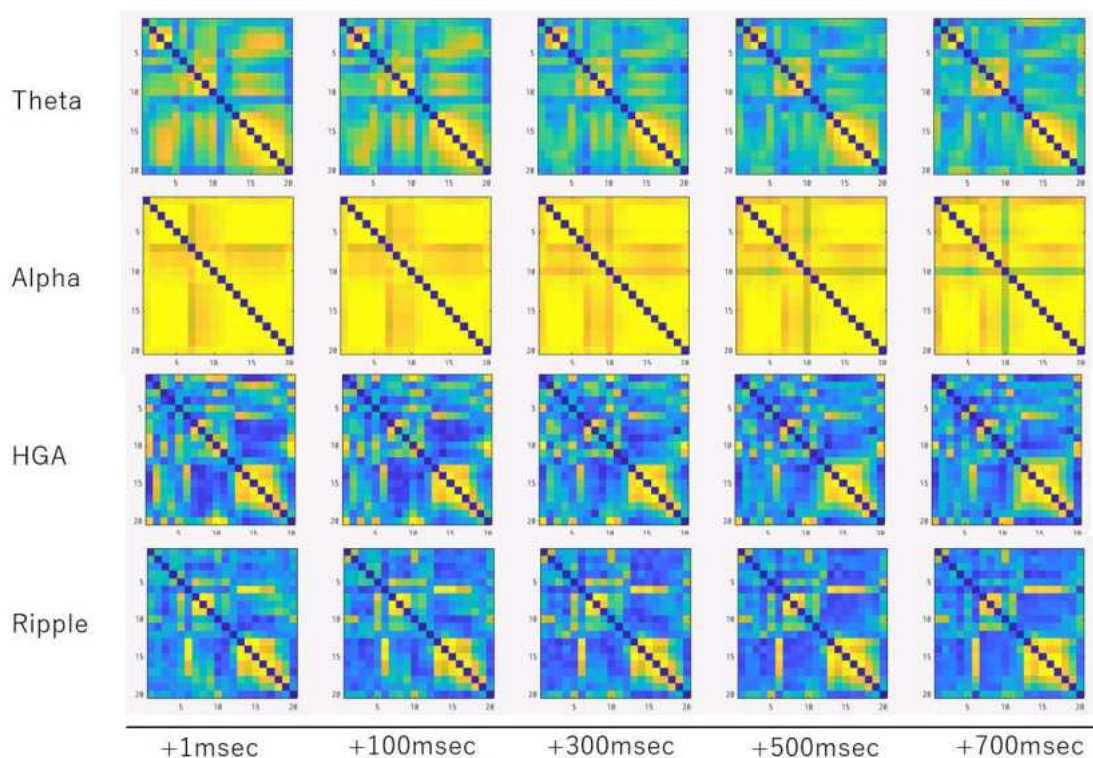
（結 果）

（1）てんかんネットワークのダイナミクスの定量化

現時点でPSIを計算するアルゴリズムが研究成果として完成しており、SEEGを行ったサンプルにおいて、アルゴリズムの検証を開始している。下図はその一例であり、記録開始（1msec）から700msecまでのPSIを20ch x 20chのペアで調べたものである。Theta（4-8Hz）、Alpha（8-13Hz）、HGA（61-80Hz）、ripple（81-200Hz）のそれぞれの周波数帯域で経時的な変化を算出した。PSIの強さはパワー値としてカラーマップで表示した。全体的にAlpha帯域でのPSIが高いことがわかるが、その他の周波数帯域では電極ペアによってPSIの高いペアと低いペアが存在することがわかった。現時点ではpreliminaryな解析としてアルゴリズムが問題なく使用できるかを調べた段階であるが、今後この解析手法を用いて、発作時早期のPSIを全てのチャンネル間で調べて、ペ

ア同士の関係性の時系列変化を算出する段階へ移行する予定である。

図 1 : PSI解析 (予備的検討) の一例



(2) ラジオ波てんかん焦点温熱凝固療法の開発

100日以上経過観察期間が得られたラジオ波てんかん焦点温熱凝固療法を行なった患者についてその発作予後と凝固体積との関連性について調査を行なった。手術時年齢は中央値5歳(2-11歳)、術後追跡期間は中央値462日(188-722日)であった。全例で両側性の強直発作が毎日見られ、島弁蓋部にMRI異常および糖代謝低下(左4例、右1例)を認めた。SEEGの結果から発作焦点として疑われた領域を標的とするRFTCが行われた。RFTCは直径5mmの球モデルで計画し、レクセルフレーム下で実施した。刺入軸数は中央値13(6-14)、凝固病変数は中央値31(20-48)であった。標的体積に対する治療体積の割合を示す凝固効率の中央値は70.2%(40.8-91.7%)であった。術後100日の時点では全例で発作が消失、最終経過観察時では3例で発作が消失していた。発作再発例では糖代謝低領域が広い症例を含んでおり、凝固効率も低い傾向があった。(表1)

表 1

Case No.	Number of trajectory	Number of coagulation lesion	RFTC entry type	Follow-up period (Days)	Seizure outcome at 100 days after RFTC	Seizure outcome at last follow-up	Permanent complication	Coagulation efficiency (Resulting volume/Target volume)
1	11	31	2 small craniotomy	680	Seizure free	Seizure free	None	70.2%
2	13	20	1 small craniotomy	722	Seizure free	Seizure free	None	91.7%
3	13	48	1 small craniotomy	462	Seizure free	Seizure free	None	75.8%
④ LAE class IV	14	39	1 small craniotomy +1 burrhole	431	Seizure free	Recurrence (113 days after RFTC)	None	61.0%
⑤ → Second surgery (Open craniotomy)	6	21	3 twist drill+1 burrhole	188	Seizure free	Recurrence (113 days after RFTC)	None	40.8%

(成果・考察) 等

神経伝播のネットワーク解析には、グラフ理論がよく用いられるが、この手法を用いて得られるコネクトームマップは時間の概念を含んでいないため、脳内ネットワーク可視化において重要なミリ秒レベルの情報が欠落する。そのためミリ秒単位で変化する発作時のてんかんネットワークを扱うことは難しい。この課題を克服するためには、時間情報を活かした状態でネットワーク内の神経伝播ダイナミクスを定量化する必要がある。今回完成したアルゴリズムを用いて、発作開始期の頭蓋内脳波サンプルを用いて周波数帯域ごとのPSIを計算すると特定の電極ペア同士で発作時に同期性が高まる結果が示唆された。これは、てんかん発作開始前はネットワーク内流動性(NF)が高く、神経ネットワーク全体の安定性が保たれているが、発作開始と同時にNFが低下し、神経ネットワークの安定性が破綻するために、発作起始領域で生じた活動が伝播しやすい環境が形成される、とする我々の仮説を裏付ける所見である可能性がある。今後の追加解析を通じて原著論文の発表を目指している。ラジオ波てんかん焦点温熱凝固療法については現時点で経験症例がまだ少ないものの、凝固体積比率(凝固効率)が高い方が治療成績は良い傾向にあり、ネットワーク解析の結果と合わせて最も効率が良い低侵襲治療を実現することを目指す。

本研究課題は横浜学術教育振興財団 2022年度の研究助成の支援を受けて遂行いたしました。この場をお借りして財団の関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

<参考文献>

1. Takayama, Y., Ikegaya, N., Iijima, K., Kimura, Y., Muraoka, N., Kaneko, Y., Yamamoto, T., Iwasaki, M. Is intracranial electroencephalography useful for planning resective surgery in intractable epilepsy with ulegyria? *J Neurosurg.* 133, 1576-1581. (2019).
2. Takayama, Y., Ikegaya, N., Iijima, K., Kimura, Y., Yokosako, S., Muraoka, N., Kosugi, K., Kaneko, Y., Yamamoto, T., Iwasaki, M. Single-Institutional Experience of Chronic Intracranial Electroencephalography Based on the Combined Usage of Subdural and Depth Electrodes. *Brain Sci.* 11, 307. (2021).
3. Takayama, Y., Kimura, Y., Iijima, K., Yokosako, S., Kosugi, K., Yamamoto, K., Shimizu-Motohashi, Y., Kaneko, Y., Yamamoto, T., Iwasaki, M. Volume-Based Radiofrequency Thermocoagulation for Pediatric Insulo-Opercular Epilepsy: A Feasibility Study. *Oper Neurosurg (Hagerstown)*, 23, 241-249. (2022).