

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21510

研究課題名(和文)脳放射線壊死が脳腫瘍の増殖・浸潤能に与える影響の解明：放射線治療は再発の温床か？

研究課題名(英文)Cerebral radiation necrosis can accelerate tumor regrowth and invasion

研究代表者

弘田 祐己(Hirota, Yuki)

大阪医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：80707331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫の中でもWHO grade IVに分類される膠芽腫(glioblastoma:GBM)は現在の標準治療を最大限に実施しても治癒させることが困難な高度悪性腫瘍である。今回我々は動物治療実験を通じてX線治療後に照射野内の正常脳組織において生じる慢性的な病理学的変化が、悪性神経膠腫の増殖能、浸潤能、腫瘍血管新生能を亢進させる作用があることを見出し、その詳細な生物学的機序について明らかにした。この研究結果は悪性グリオーマの治療後再発のメカニズムについて新たな知見を提供するものであり、本疾患に対する新規治療法の開発に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is one of incurable malignant brain tumors. Our present study demonstrated that the chronic pathophysiological changes after X-ray irradiation against the tumor may advantage its abilities of proliferation, invasion and angiogenesis, which might be able to promote the tumor recurrence paradoxically. Through examining the biological mechanisms of this phenomenon, we found out several candidates of the therapeutic molecular targets for suppressing the tumor relapse after radiotherapy.

研究分野：脳神経外科

キーワード：グリオーマ 悪性神経膠腫 晩発性放射線脳障害 放射線脳壊死 治療後再発 ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫の中でも WHO grade IV に分類される膠芽腫 (glioblastoma: GBM) は現在の標準治療 (手術 + 放射線 + 化学療法) を最大限に実施しても治癒させることが困難な高度悪性腫瘍であり、その平均生存期間は 15 ヶ月程度と、がんの中で最も治療成績の芳しくない臓器がんの治療成績をも下回っているのが現状である。

X 線の分割照射による放射線治療は GBM に対する標準治療に組み込まれているが、治療後の再発腫瘍が X 線照射野外から発生することはむしろ少なく、再発腫瘍の半数以上は照射野に包含される腫瘍摘出辺縁部の脳組織に生じる。放射線治療に抵抗性を示して再増殖に転じた腫瘍細胞では、放射線治療前には見られなかった新たな遺伝子変異が多数生じていることが報告されており、X 線によって腫瘍細胞のゲノムにランダムに生じた変異が再発腫瘍の heterogeneity や治療抵抗性を生む一因となっているものと推測されている。その一方で腫瘍細胞の形質は腫瘍細胞が置かれた組織環境の変化からも少なからぬ影響を受けることが知られ、これらは主に腫瘍細胞のエピゲノムの変化をもたらすと考えられている。

GBM の治療では 54~60 Gy (2 Gy/27~30 fractions) の X 線を腫瘍細胞が浸潤していると想定される領域 (造影 MRI 等の放射線画像検査で腫瘍本体として認識される病変部辺縁から 4~6cm 離れた脳組織領域) に対し照射するが、これによって正常の脳組織細胞にも同様の X 線被曝が起こるため、放射線治療後には晩発性脳放射線障害と表現される種々の病理学的な変化が脳組織に惹起される。具体的には白質を中心に生じる脱髄、細動脈・毛細血管の凝固壊死、炎症細胞浸潤などが慢性期脳放射線組織障害の主な病理組織像であることから、病態学的には「虚血」と「炎症」が大きく関与した病理変化と考えられる。

つまり再発 GBM は X 線曝露に伴ってこれらの慢性的な病理変化が生じた脳組織において再形成された腫瘍であり、X 線治療を生き抜いた腫瘍細胞たちは初発時とは大きく変化した脳組織環境からの影響により、その細胞形質にも何らかの修飾が加わっていることが予想される。

しかしながら放射線治療後慢性期に脳組織で生じる病理学的変化が悪性腫瘍の再発にどのような関与をしているについては、明確な結論を出している先行研究が存在しない。

2. 研究の目的

X 線治療後に照射野内の正常脳組織において生じる慢性的な病理学的変化が、悪性神経膠腫の細胞形質に与える影響 (細胞生物学的影響) について明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究の目的を達するためには腫瘍細胞内で X 線被曝によって直接的に生じる影響 (X 線によって誘発される遺伝子変異や遺伝子発現変化等) を除外し、X 線治療から数ヶ月が経過した正常脳に生じている組織環境変化から残存腫瘍細胞が受ける間接的な細胞生物学的影響のみを抽出する必要があった。

「ヒト晩発性放射線脳障害モデルラットの作成」

そこで我々は rodent の脳に X 線を照射し、ヒト脳に発生する晩発性放射線脳障害で見られる病理組織像を再現できるモデル動物の作成を行った。具体的には大阪府立大学獣医学部が保有する小動物治療用の X 線照射装置をお借りし、1cm 四方の窓が開いた頭部用鉛遮蔽板を作成して Fisher rat の右大脳半球に対し 25, 35, 45, 55, 65, 80 Gy の X 線を単回で照射を行い、各照射線量群の個体を一ヶ月毎に sacrifice して病理組織学的検討を行った。その結果、ラットの脳に明確な病理組織学的変化 (血管の凝固壊死、脱髄、組織壊死など) を生じさせることができたのは 45 Gy 以上の X 線照射を照射した場合で、照射した全ての個体に確実にそれを誘導するためには 65 Gy 以上の線量が必要との結論に達した。一方、80 Gy を照射した群では大きな融解壊死が照射野内に生じたため、65 Gy の照射がヒトの病態を模した晩発性放射線脳障害が確実に誘発できる条件であるとの結論に達した。

「X 線照射後慢性期のラット大脳へのラット悪性神経膠腫細胞株 (F98) の移植実験」

I) ラット大脳へ腫瘍細胞を移植してから、動物が腫瘍死するまでの生存期間の検討。

Fischer rat の右大脳半球に 65Gy の X 線を照射し、A 群) 照射から 3 ヶ月後にラット悪性神経膠腫細胞株 (F98) を右大脳半球照射野内に定位的に移植、B 群) 照射から 3 ヶ月後にラット悪性神経膠腫細胞株 (F98) を左大脳半球 (非照射半球) に定位的に移植 (A 群と左右対象な位置に移植)、C 群) Sham-irradiation を実施して 3 ヶ月が経過した個体の右大脳半球に F98 を定位的に移植、の 3 群を設定し、各個体が腫瘍移植から腫瘍死するまでの期間について Kaplan-Meier 解析を行い群間の比較を行った。なお死亡時の解剖で脳ヘルニアによる腫瘍死ではないと判断された個体、死亡前に 20%以上の体重減少が見られなかった個体については解析から除外した。

II) 病態学的メカニズムの検討

上述の生存期間を検討したのと同様の 3 群を別に作成し、腫瘍移植から 10 日後に前

例を sacrifice し、腫瘍移植を行った大脳半球について腫瘍本体と腫瘍周辺の脳組織を別々に採取。それらの組織から DNA、RNA、タンパク質をそれぞれ抽出した。

i) 移植腫瘍周囲の脳組織からのタンパク抽出液が F98 細胞の細胞形質に与える影響についての検討 (in vitro)

A 群) X 線照射半球 (右半球) に移植した腫瘍の周囲脳、B 群) X 線非照射半球 (左半球) に移植した腫瘍の周囲脳、C 群) Sham-irradiation 後の右半球に移植した腫瘍の周囲脳、に由来するタンパク質抽出液を、in vitro で F98 細胞の培養液に加え、細胞増殖能に与える影響について検討を行った。

ii) 移植腫瘍周囲の脳組織からのタンパク抽出液が HUVEC の tube formation に与える影響についての検討 (in vitro)

iii) A 群) X 線照射半球 (右半球) に移植した腫瘍の周囲脳、B 群) X 線非照射半球 (左半球) に移植した腫瘍の周囲脳、C 群) Sham-irradiation 後の右半球に移植した腫瘍の周囲脳、に由来するタンパク質抽出液を、in vitro で HUVEC の培養液に加え、tube formation に与える影響について検討を行った。

iv) 移植腫瘍周囲の脳組織における遺伝子発現解析

A 群) X 線照射半球 (右半球) に移植した腫瘍の周囲脳、B 群) X 線非照射半球 (左半球) に移植した腫瘍の周囲脳、C 群) Sham-irradiation 後の右半球に移植した腫瘍の周囲脳、に由来する RNA に対し RNA-seq を用いて組織遺伝子の網羅的な発現解析を実施した。また A 群と B 群については、コントロール群 (C 群) と比較して統計学的に有意な発現変動が認められた遺伝子を対象に Impact Analysis Method (Draghici et al., 2007) を用いて遺伝子パスウェイ解析を行った。

v) 移植腫瘍における遺伝子発現解析

A~C 群の腫瘍に由来する RNA に対し RNA-seq を用いて組織遺伝子の網羅的な発現解析を実施した。また A 群と B 群については、コントロール群 (C 群) と比較して統計学的に有意な発現変動が認められた遺伝子を対象に Impact Analysis Method (Draghici et al., 2007) を用いて遺伝子パスウェイ解析を行った。

vi) 移植腫瘍における腫瘍ゲノムメチル化解析

A~C 群の腫瘍に由来する DNA に対し、Chip-seq を用いたゲノムの網羅的メチル化解析を実施した。

4. 研究成果

I) A 群) 放射線照射半球内に腫瘍を移植、B) 放射線非照射半球内に腫瘍を移植、C 群) Sham-irradiation を行った半球に腫瘍を移植した 3 群を

比較すると、A 群および B 群は C 群 (コントロール) と比較して、個体の生存期間が有意に ($p < 0.05$) 短縮した。一方、A 群と B 群との比較では生存期間に統計学的有意差は認められなかった。

各群から抽出した担腫瘍脳について病理組織学的検討を行ったところ、A 群は他の 2 群と比較して腫瘍辺縁部脳組織への浸潤が顕著であり、統計学的な有意差が認められた。B 群においても浸潤能が亢進している印象があったが、C 群 (コントロール) と比較して有意差は認めなかった。抗 Ki-67 抗体を用いた免疫染色では A 群および B 群は MIB-1 index が C 群 (コントロール) と比較して有意に高く、腫瘍の増殖能の亢進が示唆された。また抗 CD31 抗体ならびに抗 vWF 抗体を用いた免疫染色では A 群は他の 2 群と比較して、腫瘍内の血管密度ならびに血管床面積が有意に高かった。

II)

i) A~C 各群の腫瘍周囲脳組織から抽出したタンパクを、F98 細胞の培養液に加えたとこ、A および B 群では F98 細胞の細胞増殖能および腫瘍遊走能が C 群と比較して有意に ($p < 0.05$) 亢進した。

ii) A~C 各群の腫瘍周囲脳組織から抽出したタンパクを、F98 細胞の培養液に加えたとこ、A 群では HUVEC の管腔形成能が他の 2 群と比較して有意に亢進した ($p < 0.05$)。

iii) A~C 各群の腫瘍周囲脳組織から RNA を抽出し RNA-seq を用いて 17,312 種類の遺伝子転写産物の発現量について定量を行った。A 群 (X 線照射個体の照射半球) を C 群 (コントロール) と比較すると、統計学的な有意差 ($p < 0.01$) を持って 2 倍以上の発現亢進を示す遺伝子が 958 個、1/2 以下の発現抑制を示す遺伝子が 128 個認められた。これらの発現変動遺伝子を対象にパスウェイ解析を行ったところ、ケモカインシグナリング等をはじめとして 10 種類の遺伝子パスウェイが有意な変化が生じていると判定された。また B 群 (X 線照射個体の非照射半球) と C 群 (コントロール) との比較では、統計学的な有意差 ($p < 0.01$) を持って 2 倍以上の発現亢進を示す遺伝子が 38 個、1/2 以下の発現抑制を示す遺伝子が 14 個認められた。B 群でも C 群と比較して生存期間の短縮が認められたためサイトカイン等の液性因子に着目して解析を行ったところ、B 群では C 群と比較して HGF、FGF2、

CXCL12 (SDF-1) などの growth factor の遺伝子発現が mRNA レベルで約 1.4~1.8 倍程度上昇していることが判明した。

以上の結果は X 線照射後の脳組織において生じている慢性炎症反応によって、悪性グリオーマ細胞の増殖能、浸潤能、血管新生能が修飾を受けることを示しており、X 線治療に被曝した正常脳組織における微小環境の変化が放射線治療後の腫瘍再発に無視できない影響を及ぼすことを示している。現在本研究結果を論文として投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件) 投稿準備中

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究ホームページ

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/neu/class/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

弘田 祐己 (Hirota Yuki)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号 : 80707331