

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19844

研究課題名（和文）膠芽腫におけるPETを用いた腫瘍幹細胞高密度領域を同定する研究

研究課題名（英文）Detecting tumor stem cell high density area using PET in glioblastoma

研究代表者

佐藤 雄一（Sato, Yuichi）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：40552724

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,700,000 円

研究成果の概要（和文）：低酸素細胞トレーサFRP170 とアミノ酸代謝トレーサMET が重複して集積する領域は、中間低酸素かつ増殖領域である。手術前にそれぞれの単独集積部、重複集積部を同定する。採取した組織にて、腫瘍幹細胞マーカーであるCD133、nestine、musashi-1の発現量をウエスタンブロット法等にて検出する。両トレーサの重複部は腫瘍幹細胞の割合が他部位に比較して高い事を確認する。予備実験では、腫瘍幹細胞の安定した検出は困難である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、MET・FRP170両トレーサ重複部がそれぞれ単独高集積部よりも腫瘍幹細胞が高密度に存在している事が証明されれば、術前に腫瘍幹細胞領域を同定が可能となる。また腫瘍再発の根幹をなす腫瘍幹細胞の領域を重点的に手術にて可及的に摘出可能となりうる。これにより腫瘍再発を可能な限り遅らせる事で、患者の予後を延長する事が可能となりうるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The area in which the hypoxic cell radiotracer 1-(2-[18F]fluoro-1-[hydroxymethyl]ethoxy)methyl-2-nitroimidazole (FRP170) and the amino acid metabolism tracer L-methyl-11C-methionine (MET) are accumulated in an overlapping manner is an intermediate hypoxia and growth area. We identified each single area before surgery. In the collected tissue, the expression of tumor stem cell markers CD133, nestine and musashi-1 are detected by Western blotting or others. The overlapping part of both tracers confirms that the proportion of tumor stem cells is high compared to other sites. In preliminary experiments, stable detection of tumor stem cells is difficult.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膠芽腫 腫瘍幹細胞 ウエスタンブロット PET MET FRP170

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍組織は正常組織と同様に、腫瘍幹細胞と呼ばれる細胞を起源とする多様な性格を有する細胞の集団で、少数の腫瘍幹細胞と多数の非腫瘍幹細胞から成り立っている事が分かってきている。この腫瘍幹細胞は化学療法、放射線療法に対する抵抗性の原因となっており、特に血管より少し離れた部位に多く存在している事が分かってきている。この事は、腫瘍幹細胞は通常の酸素濃度の環境より低い酸素濃度下環境に存在している可能性があると考えられる。このような腫瘍幹細胞の同定法は、腫瘍幹細胞マーカーによる同定や定量化が主流である。しかし、単独で決定される腫瘍幹細胞マーカーは現在のところ同定されていないため、複数マーカーの組み合わせにより判定している。

一方、悪性神経膠腫内の低酸素環境は、増殖、転移、播腫、血管新生、遺伝子不安定化、抗がん剤耐性や放射線耐性など様々な腫瘍特性に関与している。我々は、膠芽腫内低酸素細胞を新規低酸素トレーサ1-(2-[¹⁸F]fluoro-1-[hydroxymethyl]ethoxy)methyl-2-nitroimidazole (FRP170)を用いたPositron emission tomography (PET)画像で術前に撮像し、術中に、FRP170 高集積部の腫瘍組織を採取し、術後に病理学的に検討した(引用文献)。脳腫瘍を含む様々ながん細胞において低酸素状態にある細胞と増殖細胞はほぼ逆相関関係にあった。しかし、低酸素細胞領域では低酸素勾配が存在しており、FRP170 PETで検出される腫瘍細胞は、中間低酸素環境(intermediate hypoxia)下細胞に存在しており、低酸素でありながら増殖能が維持されていることが判った(引用文献)。

また、腫瘍内低酸素環境下では、抗がん剤耐性や放射線耐性の原因となるDNA 損傷修復能を有する腫瘍幹細胞が存在している事が知られている(文献)。腫瘍幹細胞も高度低酸素環境下では存続できず、中間低酸素環境下に多く存在していることが予想される。

これらを踏まえて、中間低酸素環境領域を示すFRP170 PETと、増殖細胞高密度を示す¹¹C-methionine (MET) PET 高集積部の重複部分には、より多くの腫瘍幹細胞が存在する可能性が高いという仮説に至った。

2. 研究の目的

PET 上で低酸素細胞トレーサ FRP170 とアミノ酸代謝トレーサ MET が重複して集積する領域は、中間低酸素かつ腫瘍増殖領域であり、より多くの腫瘍幹細胞が存在すると推測される。

中間低酸素かつ増殖領域における腫瘍幹細胞の割合は、他部位に比較して高い事を確認する。

3. 研究の方法

術前にFRP170 およびMETの両トレーサの作成とPET撮影、および画像解析を行う。また、術前にMRI撮影を行い、術前FRP170とMET画像とMRI画像を融合してもらい重複画像作成する。

全身麻酔下での手術中にFRP170 とMET の重複部、FRP170 単独高集積部、MET 単独高集積部の3か所の腫瘍組織を採取する。採取した組織を用いて、腫瘍幹細胞マーカーであるCD133、nestine、musashi-1を免疫染色にて、FRP170 とMET の重複部における腫瘍幹細胞がFRP170 単独高集積部やMET 単独高集積部に比較して有意に高密度に存在している事を確認する。

さらに、腫瘍組織に発現しているCD133、nestine、musashi-1 の蛋白量を、ウェスタンブロット法を用いて、免疫染色と同様にFRP170 とMET の重複部における腫瘍幹細胞が他部位に比較して有意に高密度に存在している事を確認する。

免疫染色について。採取した腫瘍組織を液体窒素で固定し、薄切する。これをプレパラートに固定する。過酸化水素水で非特異的反応をブロックする。その後、腫瘍幹細胞マーカーである

CD133、nestine、musashi-1に対する抗体(一次抗体)を添加し、反応させる。一次抗体に対する抗体(二次抗体)を添加し、反応させる。二次抗体には酵素標識をしておき、酵素抗体法にて目的抗原を発色させる。対比とする核はヘマトキシリン染色を行う。

ウエスタンブロット法について。2枚の電極板の間に腫瘍組織から採取した蛋白を流し込み、電気泳動をかけ、蛋白を大きさで分離する。分離された蛋白をメンブレンに転写する。メンブレンに対して、一次抗体は目的とする抗原に対するもの、二次抗体は蛍光標識し一次抗体に対するものを用いて抗原抗体反応を行う。その後、蛍光検出する。

またPCR法での蛋白発現量確認も可能であれば結果の補強のために行う。

4．研究成果

上記に記載したように本研究では、免疫染色やウエスタンブロット法、PCR法にて腫瘍幹細胞が高増殖能かつ低酸素領域に増殖している事を確認する事である。しかしながら、今回は他の膠芽腫組織を用いたウエスタンブロット法による蛋白発現量の確認、特に検出が不安定であったため明確に蛋白を検出出来るような条件検討の予備実験までの結果しか出す事が出来なかった。手術中に採取したFRP170 とMET の重複部、それぞれ単独集積部の組織は使用しなかった。CD133、nestine、musashi-1のいずれの検出も不安定であった(図1)。免疫染色に関しては施行したが、染色の程度が不安定であり有意な結果とはならなかった。

ウエスタンブロット自体の特性で、分子量の小さな蛋白は蛋白分離ゲルへの浸透が容易であるため比較的検出しやすいものの、分子量の大きな蛋白は電気泳動をかけても蛋白分離ゲルへの浸透や浸透後も移動しにくく検出が困難である。特に、nestineは分子量が200kDを超え大きなため、蛋白自体が蛋白分離ゲルに浸透しにくいものであった。蛋白分離ゲルの組成や、電気泳動時間、電気泳動時の電圧等を様々変更しながら試行錯誤したが、安定した結果が得る事は出来なかった。メンブレンへ蛋白を転写後に一次抗体を反応させ、さらに二次抗体を反応させる事で目標蛋白を検出するが、二次抗体は希釈率が低いと背景の非特異的反応が強くなり、目標蛋白だけではなく非特異的にその他の蛋白も検出されてしまい本来の結果なのかどうか判定が出来なくなる。このため希釈率を非常に高くして投与するため、目標蛋白との結合が不十分で蛋白検出が不良となった可能性がある。このような原因にて予備実験における腫瘍幹細胞の蛋白検出率は、良好と言えるものではなかった。

今後は第一にウエスタンブロット法で安定した蛋白発現量検出を出来るようにさらなる条件検討を行う。また免疫染色やPCR法でも条件検討を行い、ウエスタンブロットと同様に安定した結果を出すように進めていく予定である。

今後研究を継続し、METとFRP170 両トレーサ重複部に腫瘍幹細胞が高密度に存在している事が証明されれば、術前に腫瘍幹細胞領域を同定が可能となり、また腫瘍再発や抗がん剤・放射線治療に対する抵抗を示す事で予後に影響を与える因子である腫瘍幹細胞を手術中に可及的に摘出する事が可能となりうる。最終的には患者の予後を延長する事が可能となりうるものと考えられる。また腫瘍幹細胞の同定が可能となれば、腫瘍幹細胞のみの豊富に摘出が可能となる可能性がある。腫瘍幹細胞をターゲットとした新規抗がん剤の抗がん剤や分子標的薬等の薬剤の開発を進める事が出来る可能性あり、将来の膠芽腫治療の進歩への一助となりうる可能性が高いと思われる。

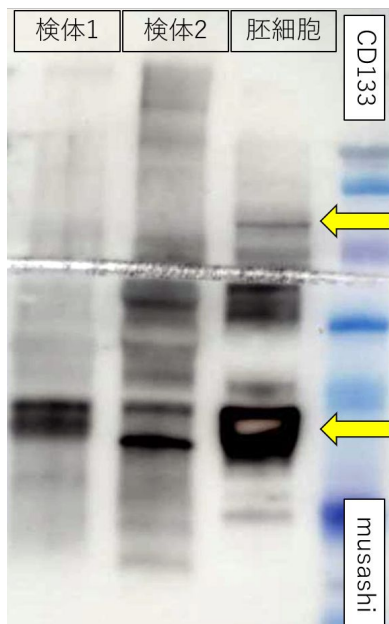


図1：膠芽腫(検体1, 2)とコントロール(胚細胞)におけるウェスタンブロットによるCD133(上段)とmusashi-1(下段)の蛋白検出。musashi-1はいずれの検体でも比較的検出可能(下段矢印)であったが、CD133は胚細胞での検出は可能(上段矢印)だったが、膠芽腫の検体(検体1, 2)では不明瞭であった。

引用文献

Beppu T, et al. Standardized uptake value in high uptake area on positron emission tomography with ^{18}F -FRP170 as a hypoxic cell tracer correlates with intratumoral oxygen pressure in glioblastoma. *Mol Imag Biol.* 16:127-135, 2014.

Beppu T, et al. High-uptake areas on positron emission tomography with the hypoxic radiotracer (^{18}F -FRP170 in glioblastomas include regions retaining proliferative activity under hypoxia. *Ann Nucl Med.* 29:336-341, 2015.

Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res.* 67:8980-4, 2007.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Beppu T, Terasaki K, Sasaki T, Sato Y, et al. MRI and ^{11}C -methyl-L-methionine PET Differentiate Bevacizumab True Responders After Initiating Therapy for Recurrent Glioblastoma. *Clin Nucl Med.* 41:852-857, 2016. 査読なし

〔学会発表〕(計 6 件)

佐藤雄一、Arterial spin labeling はギリアデル留置後の局所再発を予測しうるか、2018年11月、第36回日本脳神経外科学会学術総会

佐藤雄一、Arterial spin labeling はギリアデル留置後の局所再発を予測しうるか、2017年11月、第35回日本脳神経外科学会学術総会

佐藤雄一、Arterial spin labeling はギリアデル留置後の局所再発を予測しうるか、2017年9月、第76回日本脳神経外科学会学術総会

佐藤雄一、Arterial spin labeling、2017年3月、第50回東北脳腫瘍研究会

佐藤雄一、Arterial spin labeling はギリアデル留置後の局所再発を予測しうるか、2016年12月、第34回日本脳腫瘍学会学術総集會

佐藤雄一、Arterial spin labeling はギリアデル留置後の局所再発を予測しうるか、2016年9月、第75回日本脳神経外科学会学術総会

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：別府 高明

ローマ字氏名： Takaaki Beppu

研究協力者氏名：寺崎 一典

ローマ字氏名： Kazunori Terasaki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。