

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02770

研究課題名(和文)高LET放射線と抗VEGF抗体の併用によるグリオーマ幹細胞制御機構の解明

研究課題名(英文)Efficacy of combination of high-LET radiation and anti-VEGF antibody for glioma stem cell control

研究代表者

長谷川 正俊 (Hasegawa, Masatoshi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：In vivo：上衣芽腫(ヒト由来p53野生型)をヌードマウスに移植して以下のような実験群について、腫瘍の増殖遅延、遺伝子発現解析等を実施して検討を行い、X線と高LET放射線の比較、特に抗VEGF抗体併用の意義について検討した。実験群：炭素イオン線：2Gy、4Gy。X線照射群：2Gy、4Gy。抗VEGF抗体群：20mg/kg、40mg/kg。と併用群。と併用群。対照群。
In vitro：ヒト由来の悪性神経膠腫細胞に対する陽子線の生物効果について、生物学的効果比(RBE)、低酸素環境下での陽子線による生存率の評価、特に超高線量率照射の影響等を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫等の悪性神経膠腫は、手術後に、放射線治療(X線)とアルキル化剤(テモゾロミド)を併用するが、予後は不良である。近年、分子標的治療薬の抗VEGF抗体(ベバシズマブ)の併用もしばしば行われているが、その有効性、使用意義等の議論が多い。本研究は悪性神経膠腫に対する低LETのX線、低LETの粒子線である陽子線、高LETの粒子線である炭素イオン線の比較、さらに抗VEGF抗体とX線、重粒子線との併用を検討した研究で、分子標的治療と高LETの粒子線治療を併用する意義についても検討を行ったことが、今後の基礎的、臨床的研究の発展に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the efficacy of the combination of high-LET carbon ion beams and anti-VEGF antibody for high grade gliomas, an ependyoblastoma with wild-type p53 was transplanted to nude mice subcutaneously. Tumors were treated with 1) 2Gy carbon ion, 2) 2Gy X-ray, 3) anti-VEGF antibody (bevacizumab 20mg/kg or 40mg/kg), 4) combination of 2Gy carbon ion beams and bevacizumab, or 5) combination of 2Gy X-ray and bevacizumab. Tumor growth delay and gene expression was evaluated 6 or 48 hours after the treatment.

A glioma cell line (U-251) was utilized to evaluate the RBE of proton beams and effect of ultra-high dose rate proton beam irradiation.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：high-LET anti-VEGF antibody glioma stem cell carbon ion proton RBE

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性神経膠腫の治療抵抗性： 膠芽腫に代表される悪性神経膠腫は非常に難治性である。現在の標準治療は、手術で可及的に摘出およびアルキル化剤のテモゾロミド同時併用の放射線治療であるが、生存期間の中央値2年未満、5年生存率10%程度と未だに非常に予後不良である。抗血管内皮細胞増殖因子(抗VEGF)抗体の膠芽腫に対する有効性(無増悪生存期間の延長)が報告され、本邦では保険適応となって、しばしば使用されているが、全生存期間の延長についてはまだ明らかになっていない。作用機序についても、血管系、間葉系への関与、種々の遺伝子発現を介する抗腫瘍効果、腫瘍からのVEGF分泌の制御による抗腫瘍効果等の可能性が示唆されているが、詳細はまだ明らかでない。

(2) 高LET放射線の有用性と限界： 炭素イオン線に代表される重粒子線治療では、高LET(線エネルギー付与)放射線の、肉腫等の難治性悪性腫瘍に対する有用性が報告されているが、神経膠腫に対する臨床における有用性はまだ明らかでない。低LETの粒子線である陽子線治療も小児脳腫瘍には有害事象軽減の観点から積極的に使用されているが、成人の膠芽腫等に対する有用性はまだ議論の多いところである。ただし、その一方で、基礎研究レベルではin vitroで多くの悪性神経膠腫細胞に対する分子生物学的な研究が行われ、重粒子線治療の有用性を示唆する研究も散見される。in vivoでの研究は少ないが、研究代表者等は、ヒト由来可移植性脳腫瘍モデルを使用して、高LETの炭素イオン線と低LETのX線との比較検討を行ってきた。

(3) グリオーマ幹細胞の治療抵抗性： 悪性腫瘍の治療抵抗性には癌幹細胞が関与する可能性がしばしば報告され、悪性神経膠腫においてもいわゆるグリオーマ幹細胞を標的とした検討が基礎研究レベルでは行われているが、臨床における有用性はまだほとんど明らかになっていない。研究代表者等のこれまでの研究では、ヒト由来脳腫瘍のin vivoモデルにおけるCD133陽性、Nestin陽性細胞の関与が示唆されたが、明確な結論には至っていなかった。また、これまでに実施してきたin vitroの研究でも、グリオーマ培養細胞(U-251MG)を使用した実験において、X線照射後のVEGF濃度、mRNAの変化では、1)グリオーマ細胞は恒常的にVEGFを分泌していることが示唆され、2)照射後でも、残存細胞におけるVEGF分泌能力にはほとんど影響が無く、3)VEGFのmRNAの定量でも転写量にX線照射の影響はほとんど認めず、4)抗VEGF抗体による有意な増殖抑制は認めないことを報告してきた。

2. 研究の目的

治療抵抗性、難治性の悪性神経膠腫に対する有効な治療法の確立に発展可能な基礎データを集積して検討することを目的として、in vivoにおいて、放射線、特に高LETの重粒子線治療と抗VEGF抗体の悪性神経膠腫に対する抗腫瘍効果を検討し、さらにこれらの併用効果について、グリオーマ幹細胞への関与等も含めて分子生物学的に明らかにする。

さらに、in vitroでは、高LETの粒子線の抗腫瘍効果との比較検討の為、低LETの粒子線(陽子線)低LETの光子線(X線)についての検討を行い、陽子線の生物学的効果比(RBE)、照射方法、線量率の影響等について放射線生物学的基礎データを集積して今後の研究に発展させる。

3. 研究の方法

(1) in vivoでは、CD133、CD44、Nestin等の発現しているp53野生型の上衣芽腫(および一部の実験ではp53変異型の膠芽腫：2017年度までの研究において検討)をヌードマウスに移植して、以下のような実験を実施した。なお、実験結果は、データを集積できているp53野生型の上衣芽腫についてまとめた。

p53野生型の上衣芽腫(一部の実験ではp53変異型の膠芽腫)をヌードマウス(BALB/c nu/nu)に移植して、以下の～の6群に分けて実験を開始し、1)、2)の検索を実施した。なお、照射線量は2Gy、1回を基本としたが、一部の実験では4Gyについても検討した。抗VEGF抗体は、20mg/kgを基本としたが、一部の実験では40mg/kgについても検討した。

<実験群>

- ：重粒子線照射(単独)群：炭素イオン線：290 MeV/u、6 cm-SOBP(QST) 2Gy、4Gy
- ：X線照射(単独)群：150kV: 20mA (Hitachi) 2Gy、4Gy
- ：抗VEGF抗体(単独)群：抗VEGF抗体20mg/kg、40mg/kg
- ：重粒子線と抗VEGF抗体(併用)群
- ：X線と抗VEGF抗体(併用)群
- ：対照群

<検索方法>

- 1) 増殖遅延評価：腫瘍径を計測して倍加時間を算出し、増殖遅延を検討した。
- 2) 分子生物学的検討：6時間後、48時間後に腫瘍組織の一部を摘出して、直ちにRNA安定液に浸透して保管後、total RNA抽出、DNAマイクロアレイ解析(GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array)による遺伝子発現解析(階層クラスタリング、Gene Ontology解析、KEGG Pathway解析等)を実施して群間の比較を行った。

(2) *in vitro*では、グリオーマ培養細胞 (U-251 MG) を使用した研究において、高LETの粒子線との比較検討の為に、低LETの粒子線 (陽子線)、低LETの光子線 (X線) の影響について、以下のような検討を行った。

1) 陽子線の生物学的効果比 (RBE) 算出: 既に、VEGF産生、分泌を確認し、X線照射、抗VEGF抗体の影響の評価を行ったヒト悪性神経膠腫株 (U-251 MG) に低LETのX線0~12Gy、陽子線0~10Gyの照射 (ワブラー法) を行い、コロニー形成法で生存率を比較検討して、生存曲線から陽子線の生物学的効果比 (RBE) を算出した。

2) 陽子線のワブラーとスキヤニングの比較: 悪性神経膠腫株 (U-251 MG) に低LETのX線0~12Gy、陽子線 (ワブラー法、スキヤニング法) 0~10Gyの照射を行い、コロニー形成法で生存率、生存曲線を比較検討して、陽子線の生物学的効果比 (RBE) を算出した。

3) 照射条件による影響の評価: 治療用の陽子線照射装置 (Sumitomo) による水平後方からの照射では、フラスコを垂直に静置するので、培地が十分に細胞を覆っていない時間帯が生じることが生存率に与える影響を検討した。

4) 低酸素環境下での線量率の影響の評価: VEGFとの関連が示唆されている低酸素環境下 (5% O₂) での陽子線による生存率について、線量率の影響を評価するために、線量率200 Gy/sと0.1 Gy/sで照射を行い、生存率を検討した。

5) 以上の他にも、分担者の森との共同研究で、粒子線照射研究に応用可能な研究を行った。

4. 研究成果

(1) *in vivo*では、上衣芽腫のヌードマウス移植腫瘍の検討で以下のような成果を得た。

1) 増殖遅延評価: 腫瘍径計測で倍加時間を算出して、増殖遅延を検討; 抗VEGF抗体単独では顕著な増殖遅延を認めず、炭素線、X線では有意な増殖遅延を認めた。抗VEGF抗体併用炭素線では、炭素線単独に比して遅延の増強傾向が示唆されたが有意差は認められなかった (図1)。

2) DNA マイクロアレイ解析: 照射後あるいは薬剤投与後、6、48時間後に摘出した腫瘍の、GeneChip解析では、VEGF抗体単独での遺伝子発現変動は軽微であったが、炭素線、X線では、細胞死、細胞生存、細胞周期、その他に關与する遺伝子発現の顕著な変動が見られ、さらにとではやや異なる傾向も見られた。炭素線と炭素線・抗VEGF抗体併用、X線とX線・抗VEGF抗体併用、それぞれの比較では、わずかな相違は認められたが顕著な変化は認めなかった (図2)。詳細な解析についてはさらに検討中である。

(2) *in vitro*では、グリオーマ培養細胞 (U-251 MG) を使用した研究において、高LETの粒子線との比較検討の為に、低LETの粒子線 (陽子線)、低LETの光子線 (X線) で実施した実験で、以下のような成果を得た。

1) 陽子線の生物学的効果比 (RBE) 算出: ヒト悪性神経膠腫株 (U-251 MG) にX線0~12Gy、陽子線0~10Gyの照射 (ワブラー法) を行い、コロニー形成法で生存率、生存曲線によって算出した陽子線のRBEは、D50、D10、D0における比較において、それぞれ、1.29、1.18、1.19であった (図3)。一般的に陽子線のRBEは1.1とされていることが多いが、*in vitro*の研究では、0.9~1.5程度の報告があり、今回の結果は妥当な範囲と思われた。

2) 陽子線のワブラーとスキヤニングの比較: 悪性神経膠腫株 (U-251 MG) にX線0~12Gy、陽子線 (ワブラー法、スキヤニング法) 0~10Gyの照射を行い、コロニー形成法で生存率、生存曲線によって算出した陽子線のRBEは、D50、D10、D0における比較において、1.18~1.59の範囲で、ワブラーとスキヤニングに有意差を認めなかった。

3) 照射条件による影響の評価: フラスコを垂直に静置するした状態での照射と水平に静置した状態での比較では、細胞の生存率に有意な変化は認めなかった。

4) 低酸素環境下 (5% O₂) での線量率の影響: 低酸素下における陽子線の線量率の影響の評価では、6 Gy以下の照射では線量率200 Gy/sと0.1 Gy/sの照射で生存率に有意な差は見られなかったが、12 Gy以上の照射の比較では、200 Gy/sで照射した場合には、0.1 Gy/sの照射と比較して、生存率の相対的な増加が認められ、超高線量率の陽子線照射が通常の線量率とは異なる生物効果を生じている可能性が示唆された (図4)。ただし、さらに慎重な検討が必要と思われる。

5) 以上の他にも、分担者の森との共同研究で、粒子線照射研究にも応用可能な研究として、新規オルガノイド作製プロトコルの開発 [Front Neurosci 2020]、DNA 損傷修復の評価 [J Biol Chem 2020]、遺伝子発現制御機構の解明 [FASEB J 2021] 等も行い、成果を報告した。

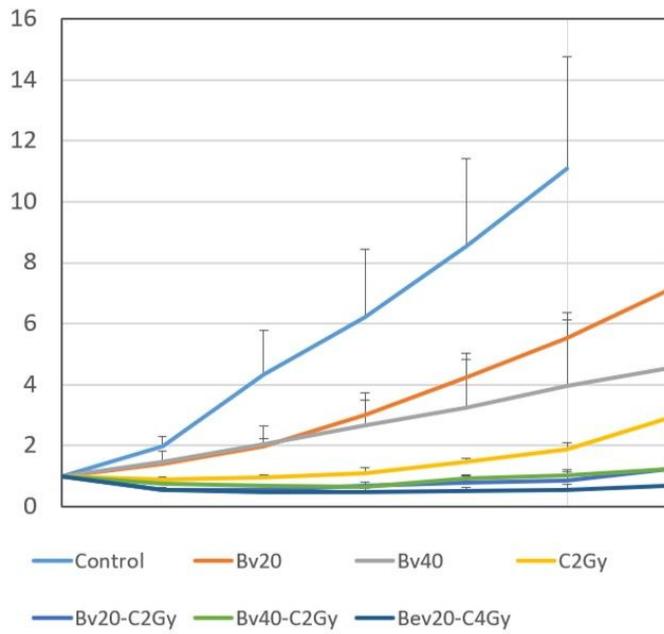


Fig 1 . Growth curves: relative tumor volume (mean + SE).
Bev: bevacizumab. C: carbon ion.

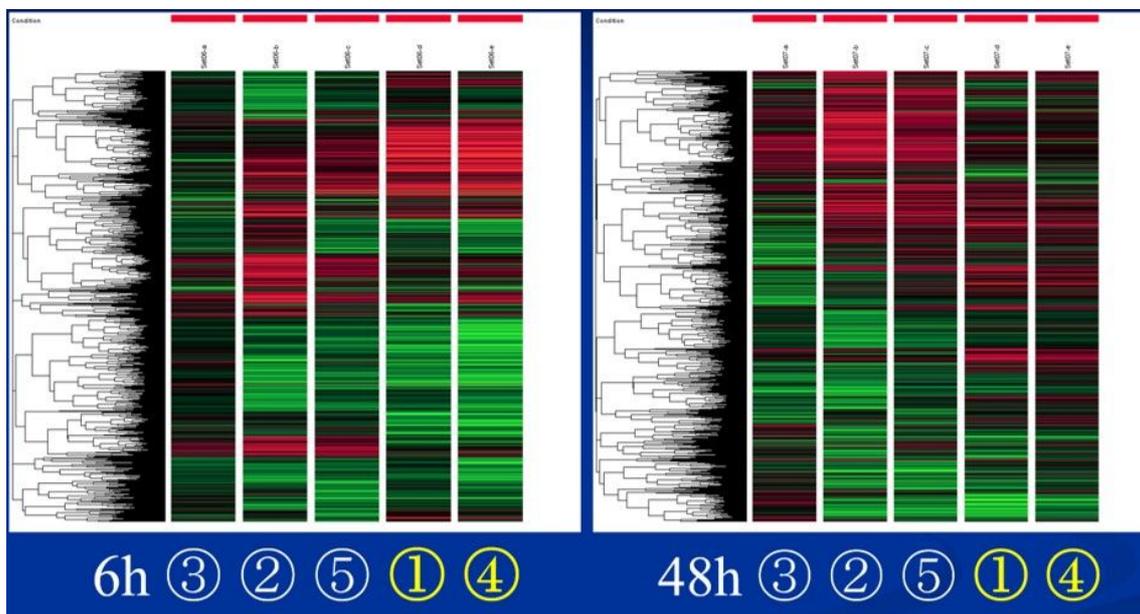
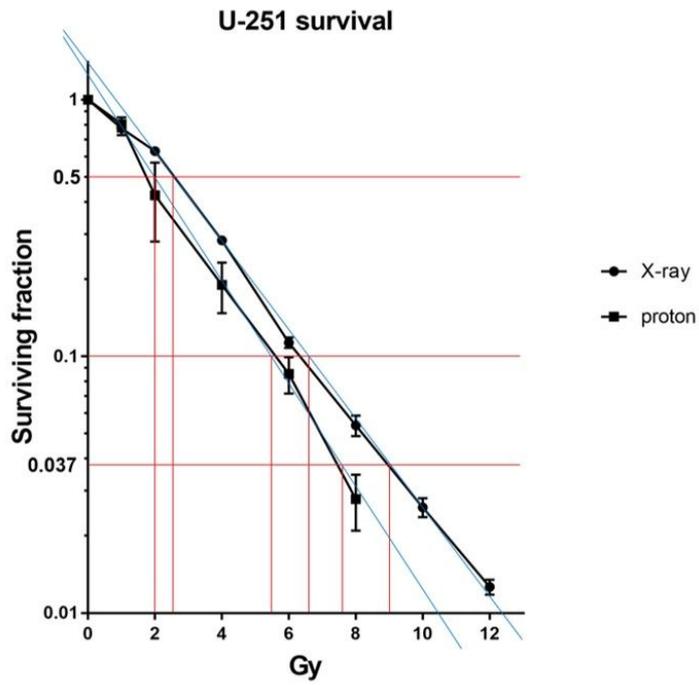
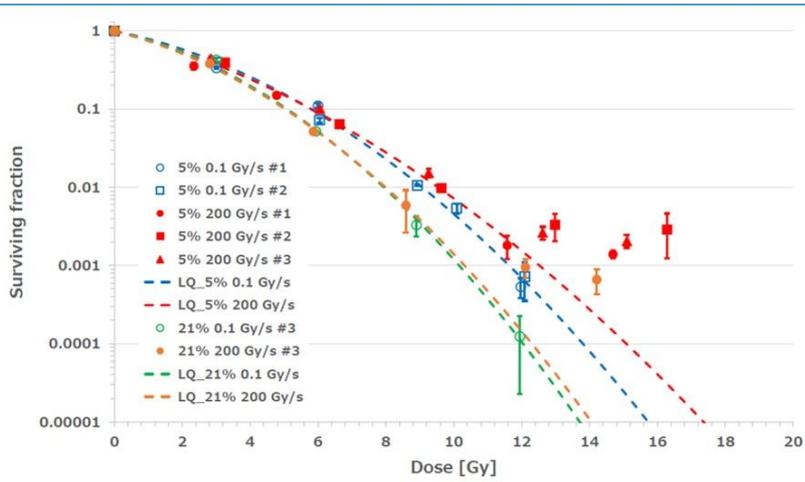


Fig 2 . Hierarchical Clustering (ependyoblastoma).
: carbon ion, : X-ray, : bevacizumab, : + , : +



☒ 3 . Survival curves (U-251). X-ray and proton.



☒ 4 . Survival curves (U-251). Proton (dose rate: 0.1Gy/s or 200Gy/s)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mori Toshio, Nakane Hironobu, Iwamoto Takaaki, Krokidis Marios G., Chatgiliaoglu Chrysostomos, Tanaka Kiyoji, Kaidoh Toshiyuki, Hasegawa Masatoshi, Sugiura Shigeki	4. 巻 80
2. 論文標題 High levels of oxidatively generated DNA damage 8,5'-cyclic-2'-deoxyadenosine accumulate in the brain tissues of xeroderma pigmentosum group A gene-knockout mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 52~58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2019.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Eura N, Matsui TK, Luginbuhl J, Matsubayashi M, Nanaura H, Shiota T, Kinugawa K, Iguchi N, Kiriyama T, Zheng C, Kouno T, Lan YJ, Kongpracha P, Wiriyasermkul P, Sakaguchi YM, Nagata R, Komeda T, Morikawa N, Kitayoshi F, Jong M, Kobashigawa S, Nakanishi M, Hasegawa M, Saito Y, Shiromizu T, Mori E, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Brainstem Organoids From Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.00538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ito Soichiro S., Nakagawa Yosuke, Matsubayashi Masaya, Sakaguchi Yoshihiko M., Kobashigawa Shinko, Matsui Takeshi K., Nanaura Hitoki, Nakanishi Mari, Kitayoshi Fumika, Kikuchi Sotaro, Kajihara Atsuhisa, Tamaki Shigehiro, Sugie Kazuma, Kashino Genro, Takahashi Akihisa, Hasegawa Masatoshi, Mori Eiichiro, Kirita Tadaaki	4. 巻 295
2. 論文標題 Inhibition of the ATR kinase enhances 5-FU sensitivity independently of nonhomologous end-joining and homologous recombination repair pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12946~12961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsubayashi M, Sakaguchi YM, Sahara Y, Nanaura H, Kikuchi S, Asghari A, Bui L, Kobashigawa S, Nakanishi M, Nagata R, Matsui TK, Kashino G, Hasegawa M, Takasawa S, Eriguchi M, Tsuruya K, Nagamori S, Sugie K, Nakagawa T, Takasato M, Umetani M, Mori E.	4. 巻 35
2. 論文標題 27 Hydroxycholesterol regulates human <i>SLC22A12</i> gene expression through estrogen receptor action	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202002077R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川正俊
2. 発表標題 悪性神経膠腫を標的とした重粒子線と抗VEGF抗体併用の有効性
3. 学会等名 放射線医学総合研究所 平成30年度HIMAC共同利用研究成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川正俊
2. 発表標題 悪性神経膠腫を標的とした重粒子線と抗VEGF抗体併用の有効性
3. 学会等名 QST 2020年度HIMAC共同利用研究成果発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小此木 範之 (Okonogi Noriyuki) (00750572)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・医長 (定常) (82502)	
研究分担者	大野 達也 (Ohno Tatsuya) (10344061)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	
研究分担者	若月 優 (Wakatsuki Masaru) (40399449)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・QST病院 治療診断部・部長 (定常) (82502)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三浦 幸子 (Miura Sachiko) (60597095)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	
研究分担者	森 英一朗 (Mori Eiichiro) (70803659)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関