

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08957

研究課題名(和文) 神経膠芽腫の放射線治療抵抗性因子の同定とその克服を目指した個別化治療の構築

研究課題名(英文) Identification of radio-resistance factors for glioblastoma and construction of personalized treatment aimed at overcoming them

研究代表者

井内 俊彦 (Iuchi, Toshihiko)

千葉県がんセンター(研究所)・脳神経外科・部長

研究者番号：80370881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫における放射線治療前後の遺伝子発現変化をエンリッチメント解析で検証した。放射線治療により、DNA修復関連遺伝子の発現は寧ろ低下していた。一方、IFN α /IFN β など炎症関連遺伝子の発現亢進に加えNF κ Bを介したTNF α の発現亢進が確認され、また、IL6/JAK/STAT3の発現亢進を確認した。これらの結果から、放射線治療によって N κ Bの活性誘導とそれに伴うmicroglia からの TNF α の発現亢進、さらに IL6/JAK/STAT3発現亢進が腫瘍幹細胞の前神経系から間葉系への分化を誘導し、放射線治療耐性の一躍を担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療に対する治療抵抗性は、これまでDNA修復の観点から主に研究されてきた。今回の検討で、これとは別に放射線被曝後にマイクログリアの誘導を介して腫瘍幹細胞の分化誘導を前神経系から間葉系に変化させることも、放射線耐性の獲得とその後の治療抵抗性に関与していることが示唆され、その課程に於いて NF κ Bの活性化が重要な役割を担っていることが判明した。この様に、単に DNAが修復されることのみならず、腫瘍の微小環境の変化が放射線耐性に関与していることが判明して事により、今後治療抵抗性克服の標的分子として、NF κ Bをはじめとしたいくつかの分子を同定することができた。

研究成果の概要(英文)：The changes in gene expression levels before and after radiotherapy in glioblastoma were verified by enrichment analysis. The expression of DNA repair-related genes was rather reduced by radiation therapy. On the other hand, in addition to the upregulation of inflammatory genes such as IFN α / IFN β , upregulation of TNF α via NF κ B was confirmed, and upregulation of IL6 / JAK / STAT3 was also observed. From these results, radiation therapy induces the activity of N κ B and the accompanying increase in TNF α expression from microglia, and the increased expression of IL6 / JAK / STAT3 induces the differentiation of tumor stem cells from the anterior nervous system to the mesenchymal system. It was suggested that such changes in the induction of tumor stem cell differentiation play a certain role in radiation resistance.

研究分野：脳神経外科

キーワード：神経膠芽腫 放射線耐性 細胞周期チェックポイント NF κ B microglia 間葉系分化誘導

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫は原発性脳腫瘍で最も頻度が高く、最も予後不良な腫瘍である。本腫瘍に対して有効な薬剤は少なく、唯一科学的に有効性が確認されたテモゾロミド(TMZ)も罹患患者の生命予後中央期間をわずか2ヶ月延長したに過ぎない。一方、放射線治療は以前より有効性が報告されており、その効果は确实だが治癒的ではなく、照射後殆どの症例で再発する。照射線量の増大を行うと腫瘍制御は改善するが、IMRTの手法を用いても放射線障害のリスクが増大することも判明している。一方で、これまで様々な分子標的薬が臨床試験で検討されたがいずれもその効果は否定されている。この様な中で既存の治療法を問題を克服する新たな治療法の出現が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経膠芽腫に対して行われている有効な治療法、特に放射線治療に対する腫瘍の耐性機序を明らかにすることで、放射線治療の有効性を高め治癒の誘導に貢献する新たな創薬の礎を築くことである。

3. 研究の方法

対象

千葉県がんセンター倫理診査委員会の承認の元行われた、neo-adjuvant chemo-radiation therapy に参加した初発神経膠芽腫を対象とした。この第一相臨床試験では、生検術で腫瘍診断を行った後 IMRT による放射線治療(72Gy/12fx./16days)を行い、放射線終了後10日以内に腫瘍摘出を行う。従って、生検時に採取された組織と、放射線治療後に摘出された摘出標本のサンプルセットが得られる。これらの標本は、採取後直ちに-80℃で保存し研究に使用した。

RNAseq

放射線化学療法前後のペアサンプルから、RNAを抽出キットを用いてRNAを抽出した。RNAの品質を確認したうえで、RNAseqで網羅的に遺伝子発現を解析した。

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

RNAseqで得られた情報を用いて、GSEAを用いてエンリッチメント解析を行った。解析にはHallmark遺伝子セットを用い、False Discovery Rate (FDR)<25%を有意な遺伝子発現変化と定義し有意に遺伝子発現変化をきたした遺伝子セットを抽出した。

細胞の分化誘導関連遺伝子発現変化の評価

治療前後の神経系分化に関与する遺伝子群として、DLL3/PDGFRA/SOX8/OLIG2/FERMT1/KLRC3/GABBR1/NCAM1/SCG3/SRRM2/GALNT13/NDRG2/RASL10A/CSD2/SNAP91/ATP6V1G2、間葉系分化に関与する遺伝子群として SERPINE1/RILP/PLA2G5/FOSL2/LIF/TAGLN/TMP1/MYL9/PDPN/FAM20C/ANGPTL4/SPOCD1/COL4A1/COL4A2/CH3L1の遺伝子発現量変化を評価し、2倍以上の変化を示した場合有意な遺伝子変化と定義し、どのような遺伝子が発現変化していたかを検証した。

4. 研究成果

対象症例

臨床試験に登録された9症例のうち、初期の6症例を対象候補とした。

RNAseq

6 例中 1 例で、生検時の RNA の質が解析に適さないと評価されたため、これを除いた 5 症例 10 サンプルを対象として RNAseq 解析を行った。

Gene Set Enrichment Analyses

Gene Set Enrichment Analyses(GSEA)の結果、8 遺伝子セット(G2M checkpoint/E2F targets/MYC targets V1/MYC targets V2/

Mitotic spindle/WNT b catenin signaling/ Unfolded protein response/hedgehog signaling)で放射線化学療法による FDR<25%の遺伝子発現低下を、13 遺伝子セット

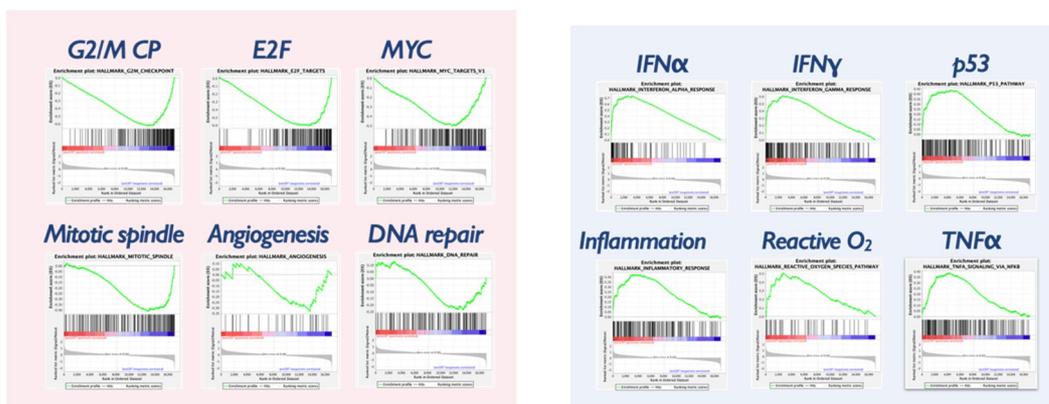
(IFN α /IFN γ /P53pathway/Inflammation/ Reactive oxygen species pathway/KRAS signaling/TNF α signaling via NF κ B/Bile Acid metabolism/Xenobiotic metabolism/ Apoptosis/Heme metabolism/Myogenesis/ Complement)で発現亢進を認めた。これらのうち代表的な遺伝子セットのグラフを図 1 に示す。

遺伝子発現が低下した遺伝子セット(図 1A)をみると、G2/M チェックポイント関連の遺伝子セットが含まれていたが、DNA 修復関連の遺伝子セットも含まれていた。

図 1 Results of GSEA

A: down-regulated gene sets by CRT

B: up-regulated gene sets by CRT



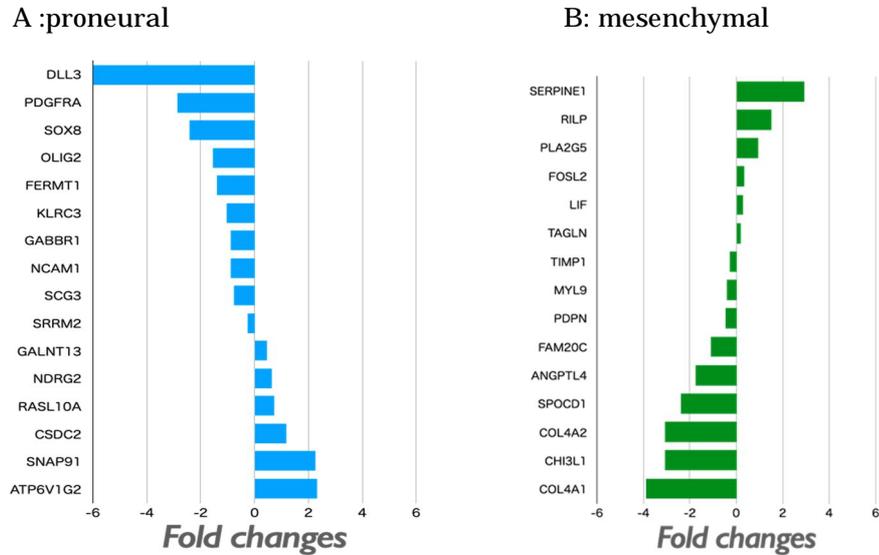
一方、遺伝子発現が低下した遺伝子セット(図 1B)をみると、IFN / など炎症関連遺伝子群に加えて NF κ B を介した TNF の発現が亢進しており、また、IL6/JAK/STAT3 関連の遺伝子群の発現も亢進していた。

分化誘導関連遺伝子の発現変化

Proneural ・ mesenchymal な分化誘導に関連する遺伝子の発現変化を図 2 に示す。

図に示されたように、proneural な分化を誘導する代表的な遺伝子である DLL3 ・ PDGFRA ・ SOX8 といった遺伝子群が 2 倍以上の発現低下を示したのに対し、mesenchymal な分化誘導に関わる SERPINE1 の発現は 2 倍以上亢進しているのを確認した。

図2 分化誘導に関連する遺伝子の発現変

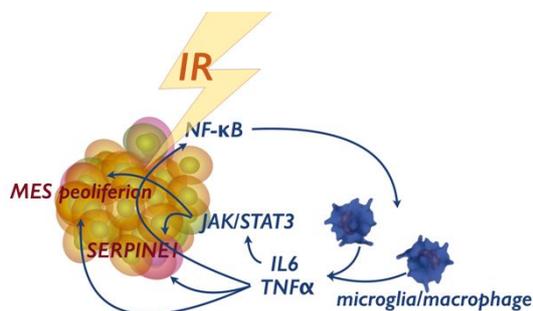


5. 考察

放射線治療後の腫瘍の耐性機序としては、これまで細胞周期チェックポイントにおける細胞分裂の停止と、その間における DNA 修復がその主体をなしていると考えられてきた。今回の検討で、確かに細胞周期は G2/M チェックポイントで停止していることが示唆されたが、DNA 修復遺伝子群の発現は照射前と比較しむしろ低い値を示した。その原因として1つには、サンプルを得た時期を挙げることができる。今回の解析は患者由来組織を元に行っているため、放射線治療後組織採取までに1日~10日の時間を有した。DNA 修復は障害後比較的早期に行われることも報告されており、この時期には既にそれが終了してしまっていた可能性も考える必要があった。実際、apoptosis 遺伝子セットの発現はこの時点でも更新しており、遺伝子修復から修復できなかった細胞の除去に時間的に推移していた可能性が示唆された。ただ、その場合、なぜ DNA 修復が終了した後も G2/M で細胞周期を停めているのか疑問が残るが、今後の検討課題と思われた。

一方、今回の検討で、放射線照射後の腫瘍微小環境の変化が放射線耐性に深く関わっている可能性が明らかになった。今後、より多くの症例で検証を行っていく必要が残っているが、今回の結果から、放射線照射によって腫瘍細胞において NFkB の発現が亢進し、これが炎症性細胞特に microglia の腫瘍への集簇を誘導すると同時に、microglia からの IL6 や TNF の発現を誘導していたと考えられる。これらは正の feedback で NFkB の発現を助長すると同時に、JAK/STAT3 系を介して SERPINE1 の発現を誘導し、その結果腫瘍幹細胞における前神経系分化を停止すると同時に間葉系分化が誘導され、放射線耐性を獲得していく機序が働いていることが示唆された。(図3)

図 3



実際、neo-adjuvant therapy 後に再発した症例の組織像を確認すると、生検時ならびに放射線治療直後の摘出時には典型的な神経膠芽腫であったものが、再発時には神経肉腫に変改していることも確認され、上記仮説を支持するものと思われた。今後、これらの経路を抑えることが、放射線耐性克服に繋がる可能性が示唆された。

6. まとめ

放射線化学療法前後の遺伝子発現変化を、エンリッチメント解析で検証した。DNA repair 関連の遺伝子群の発現が低下していた一方、NFkBを介したTNFaの発現や、IL6/JAK/STAT3関連の遺伝子群の発現が有意に亢進していた。これらの結果から、放射線治療によって NFkBの活性誘導とそれに伴うmicroglia からの TNFaの発現亢進、さらに IL6/JAK/STAT3発現亢進が腫瘍幹細胞の前神経系から間葉系への分化を誘導し、放射線治療耐性の一躍を担っている可能性が示唆され、これに関与する分子が、放射線耐性克服に向けた新たな治療標的となり得ることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 井内俊彦、新行内雅斗、原竜介	4. 巻 28
2. 論文標題 分子標的薬時代における転移性脳腫瘍に対する治療戦略	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経外科ジャーナル	6. 最初と最後の頁 715-723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7887/jcns.28.715	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamoda H, Kinoshita H, Yonemoto T, Iuchi T, Tsukanishi T, Hagiwara Y, Ohtori S, Yamazaki M, Ishii T	4. 巻 4
2. 論文標題 Factors Linked to Prognosis in Patients with Leptomeningeal Metastasis Diagnosed by Spinal Magnetic Resonance Imaging.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Spine Surg Relat Res	6. 最初と最後の頁 64-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22603/ssrr.2019-0064.	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 Hirono S, Hasegawa Y, Sakaida T, Uchino Y, Hatano K, Iuchi T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Feasibility study of finalizing the extended adjuvant temozolomide based on methionine positron emission tomography (Met-PET) findings in patients with glioblastoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 17794
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54398-2.	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 Takami H, Fukuoka K, Fukushima S, , Iuchi T, et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 Integrated clinical, histopathological, and molecular data analysis of 190 central nervous system germ cell tumors from the iGCT Consortium.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuro Oncol	6. 最初と最後の頁 1565-1577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuonc/noz139.	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 Arita H, Matsushita Y, Machida R, Iuchi T, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 TERT promoter mutation confers favorable prognosis regardless of 1p/19q status in adult diffuse gliomas with IDH1/2 mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01078-2.	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 井内俊彦 堺田司 瀬戸口大毅 細野純二 長谷川裕三	4. 巻 32
2. 論文標題 悪性神経膠腫に対する光線力学療法の初期治療経験	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光アライアンス	6. 最初と最後の頁 6-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Toshihiko Iuchi, Ryusuke Hara, Kazuo Hatano, Takahiro Sugiyama, Gentaro Togasaki, Taiki Setoguchi, Yuzo Hasegawa, Makiko Itami, Tsukasa Sakaida
2. 発表標題 Concurrent and adjuvant effect of bevacizumab on hypofractionated tailor-made IMRT for glioblastomas
3. 学会等名 ESTRO (European Society for Therapeutic Radiation Oncology) 38 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiko Iuchi, Ryusuke Hara, Hajime Kageyama, Kazuo Hatano, Takahiro Sugiyama, Gentaro Togasaki, Taiki Setoguchi, Hasegawa Yuzo, Tsukasa Sakaida, Makiko Itami
2. 発表標題 Changes of gene expression profiles in glioblastomas before and immediately after hypo-fractionated IMRT with concurrent temozolomide
3. 学会等名 ASTRO (American Society for Radiation Oncology) annual meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiko Iuchi, Masato Shingyoji, Hironori Ashinuma, Satoko Mizuno, Yasushi Yoshida, Junji Hosono, Taiki Setoguchi, Yuzo Hasegawa, Tsukasa Sakaida
2. 発表標題 Effect and safety of immune checkpoint inhibitors for brain metastases from non-small cell lung cancer
3. 学会等名 ESMO(European Society for Medical Oncology) 2019 Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井内俊彦 原竜介 杉山孝弘 瀬戸口大樹 長谷川祐三 齋藤真 伊丹真紀子 堺田司
2. 発表標題 神経膠芽腫に対するネオアジュバントTMZ/IMRTに関する第1相安全性試験
3. 学会等名 第28回日本定位放射線治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井内俊彦 原竜介 影山肇 杉山孝弘 東ヶ崎徹太郎 樋口晃士 細野純仁 瀬戸口大毅 長谷川裕三 堺田司 伊丹真紀子
2. 発表標題 寡分割IMRT/TMZ治療前後の神経膠芽腫腫瘍組織における遺伝子発現変化
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井内俊彦 原竜介 影山肇 杉山孝弘 東ヶ崎徹太郎 樋口晃士 細野純仁 瀬戸口大毅 長谷川祐三 堺田司 伊丹真紀子
2. 発表標題 神経膠芽腫腫瘍組織における寡分割IMRT/TMZ治療前後の遺伝子発現変化
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井内俊彦, 原竜介, 杉山孝弘, 東ヶ崎巖太郎, 樋口晃士, 細野純仁, 瀬戸口大樹, 長谷川祐三, 伊丹真紀子, 堺田司
2. 発表標題 神経膠芽腫に対する寡分割テラレーメイドIMRT治療に対するペバシズマブの併用ならにびアジュバント効果
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井内俊彦 原竜介 影山肇 杉山孝弘 東ヶ崎巖太郎 細野純仁 瀬戸口大樹 長谷川祐三 堺田司 伊丹真紀子
2. 発表標題 放射線化学療法による神経膠芽腫の微小環境変化
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井内俊彦 堺田司 細野純仁 瀬戸口大毅 長谷川祐三
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対する光線力学療法の初期治療経験～効果と課題～
3. 学会等名 LASER WEEK in KOCHI 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 太田富雄・編集：松谷雅生・野崎和彦 分担執筆：井内俊彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 金芳堂	5. 総ページ数 2,881
3. 書名 脳神経外科学第13版	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------