

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16592

研究課題名（和文）神経膠芽腫における低酸素領域と幹細胞ニッチの可視化及び内用放射線治療の開発

研究課題名（英文）Novel internal radiotherapy for refractory malignant brain tumors

研究代表者

大竹 誠（Ohtake, Makoto）

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：70644607

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）：脳腫瘍の中で最も悪性度の高い神経膠芽腫の治療抵抗性の要因として、腫瘍幹細胞の存在や腫瘍内低酸素環境の存在が挙げられる。申請者らはCu-ATSM PETを用いて、神経膠芽腫内における低酸素領域を可視化する方法を報告してきた。またCu-ATSMが高集積する神経膠芽腫内から分離した細胞株をマウス脳内へ移植し、膠芽腫細胞株の樹立に成功した。これらの脳腫瘍モデルを用いて、Cu-ATSMが頭蓋内腫瘍に集積する機序の解明を図るとともに頭蓋内腫瘍に対して内部放射線照射を目的としてCu-ATSMをマウスへ投与し、濃度依存的な抗腫瘍効果を確認した。現在集積機序について多角的に検討を図っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性脳腫瘍において組織内低酸素状態は放射線治療や化学療法の耐性につながる問題を有する。これに対して我々はこれまでに脳腫瘍の低酸素領域をCu-ATSM PETを用いて非侵襲的に同定することに成功してきた。今回の研究ではCu-ATSMを用いた内部放射線治療効果の意義を動物レベルで見出した。将来的にはCu-ATSMを用いて悪性脳腫瘍の治療抵抗領域を標的とした内部照射を行うという独創的な治療法を提唱することを目指す。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma is one of the most lethal brain tumor. Although standard therapy, including surgery plus alkylating chemotherapy with radiotherapy, outcome remains unsatisfactory, thus novel therapeutic approach is crucial. Herein, we established novel internal radiotherapy for malignant gliomas, using ⁶⁴Cu-ATSM. We confirmed survival benefit in Cu-ATSM treated patient derived brain tumor xenograft model.

研究分野：脳神経外科

キーワード：malignant glioma internal radiotherapy Cu-ATSM Brain tumor stem cells

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫(Glioblastoma: GBM)は、現在の標準治療を行っても平均生存期間が 14.6 ヶ月と極めて予後不良な脳腫瘍である(Stupp R et al. *N Engl J Med.* 2005)。GBM の特徴的組織所見である血管新生像、壊死像の背景には、腫瘍内における低酸素環境が存在する。また低酸素領域には GBM 幹細胞が相対的に高頻度分布することが判明している。この腫瘍内低酸素環境及び幹細胞ニッチの存在が、化学療法や放射線治療に対する抵抗性や生命予後に影響を及ぼす可能性が示されている(Jensen RL et al. *J Neurooncol.* 2009)。このことは、低酸素イメージングが治療効果や生命予後予測に寄与し、また治療標的部位の同定に応用できることを示している。近年、組織内低酸素化のイメージングとして、 $[^{62,64}\text{Cu}]$ copper(II)-diacetyl bis(N4-methylthio -semicarbazone) (Cu-ATSM)を用いた Positron Emission Tomography (PET) プロブが開発された。Cu-ATSM プロブは低酸素細胞に有意に滞留性を示す銅キレート錯体であり、Cu-ATSM PET により低酸素領域を鋭敏に描出することが可能となった。申請者の研究グループは Cu-ATSM PET 画像を脳腫瘍手術に応用した臨床研究を継続しており、Cu-ATSM が GBM の造影領域に有意に集積し、低酸素環境を反映する指標である hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)の発現と強く相関することを報告した(Tateishi K et al. *Am J Neuroradiol.* 2013, Tateishi K, Ohtake M et al. *Am J Neuroradiol.* 2014)。さらに、GBM 内の Cu-ATSM 高集積領域において腫瘍幹細胞を含めた治療抵抗因子発現について検討を行い、同領域を標的とした治療法開発を進めてきた (Ohtake M et al. *Sci Rep.* 2017)。一方 Cu-ATSM 高集積と GBM 内の低酸素環境の関連づけを生体レベルで立証することは困難であるため、臨床像を反映する動物モデルの樹立が重要であると考えられてきた。そこで研究者らは Cu-ATSM に対し高集積を呈する GBM 患者から摘出した腫瘍細胞を免疫不全マウスの脳内に移植し、独創的脳腫瘍モデル (YMG7) を樹立することに成功した。この独自に樹立したモデルを通じて Cu-ATSM を用いた新規治療法を開発することを目指した。

2. 研究の目的

Cu-ATSM 高集積を呈するヒト脳腫瘍由来の GBM 幹細胞株を研究材料とすることで、Cu-ATSM の GBM 内への集積機序を *in vivo* で詳細に検討することが理論的に可能となった。また Cu-ATSM を用いた内用放射線治療の効果について実験的に理想的なモデルを用いて検証することが可能となった。そこで本研究では Cu-ATSM 高集積を呈した患者由来 GBM 細胞株を含め、独自に樹立した GBM 細胞株を用いて Cu-ATSM の低酸素イメージングとしての意義を *in vivo* レベルで提唱することを目的に掲げた。また Cu-ATSM を用いて治療抵抗領域を標的とした内部照射治療を行い、神経膠芽腫に対する独創的な治療法を提唱することを目指した。

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

3. 研究の方法

-1. ヒト由来 GBM 幹細胞株の樹立と腫瘍検体に対する組織・遺伝学的検討

樹立した GBM 幹細胞株(YMG7)に加え、これまでに 150 例の GBM を含めた神経膠腫症例を対象に初代培養細胞株及び patient derived xenograft (PDX) model の樹立を試みた。中でも特に YMG21, YMG45, YMG87 は自己複製力に富み、かつ PDX モデルを比較的短時間に樹立可能であることが判明した。すべての症例に対し *MGMT* メチル化、*IDH1* 変異, *TERT* 変異などの遺伝子プロファイリングを行うとともに PDX モデルから抽出した DNA に対しても同様のアプローチで検討を行った。また患者検体、PDX モデルを用いて HE 染色, Ki-67, GFAP, oligo-2 などの免疫染色とともに HIF-1, VEGF などの発現を免疫組織学的に検討した。

-2. Cu-ATSM 内部照射の効果検討

YMG7 由来脳腫瘍モデル及び YMG45, YMG87 などを用いて Cu-ATSM 内用放射線治療による抗腫瘍効果を検討した。脳腫瘍モデルに対し Cu-ATSM を濃度別に尾静脈投与した後濃度依存的な抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

-1. ヒト由来 GBM 幹細胞株の樹立と腫瘍検体に対する組織・遺伝学的検討

樹立したすべての PDX モデルの組織学的特徴は Ki67 陽性率を含め非常に高いレベルで患者腫瘍検体と類似しており、腫瘍表現型を反映する高い再現性を有したモデルであることを確認した。遺伝学的検討として *IDH* や *TERT* といった予後への影響が報告されている遺伝子異常は患者検体と 100%一致することを確認した。同様に *MGMT* メチル化は判定を行ったが、大部分は一致するものの、再現性が得られないケースも存在した。こちらは定性的な検討を行ったことで判定が不一致となった可能性が高いと推察した。PDX 内の HIF-1, VEGF 発現は不均一に発現している例がほとんどであり、腫瘍内のヘテロ環境が強く示唆された。

-2. Cu-ATSM 内部照射の効果検討

⁶⁴Cu-ATSM を用いた内部放射線治療効果を検証するため、YMG7, YMG45 などの移植マウスに対して Cu-ATSM を投与したところ濃度依存的な抗腫瘍効果が生じていることを確認した。抗腫瘍効果機序については免疫組織学的, western blotting 法を用いて検討を行った。現在これらの研究成果について論文執筆を図っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Umemura Masanari, Islam Md. Rafikul, Fukumura Hidenobu, Sato Itaru, Kawabata Yusuke, Matsuo Kousuke, Nakakaji Rina, Nagasako Akane, Ohtake Makoto, Takayuki Fujita, Yokoyama Utako, Nakayama Tomohiro, Eguchi Haruki, Ishikawa Yoshihiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Simultaneous hyperthermia-chemotherapy effect by arterial injection of Fe(Salen) for femur tumor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 356 ~ 365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13851	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 Akimoto Taisuke, Umemura Masanari, Nagasako Akane, Ohtake Makoto, Fujita Takayuki, Yokoyama Utako, Eguchi Haruki, Yamamoto Tetsuya, Ishikawa Yoshihiro	4. 巻 109
2. 論文標題 Alternating magnetic field enhances cytotoxicity of Compound C	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3483 ~ 3493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13781	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 Tanaka Takahiro, Murata Hidetoshi, Miyazaki Ryohei, Sato Mitsuru, Ohtake Makoto, Tateishi Kensuke, Kim Pyo, Yamamoto Tetsuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Human Recombinant Erythropoietin Improves Motor Function in Rats With Spinal Cord Compression-Induced Cervical Myelopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0214351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1371/journal.pone.0214351	査読の有無 無
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 Toriihara Akira, Ohtake Makoto, Tateishi Kensuke, Hino-Shishikura Ayako, Yoneyama Tomohiro, Kitazume Yoshio, Inoue Tomio, Kawahara Nobutaka, Tateishi Ukihide	4. 巻 32
2. 論文標題 Prognostic implications of 62Cu-diacetyl-bis (N4-methylthiosemicarbazone) PET/CT in patients with glioma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 264 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-018-1241-4	査読の有無 無
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 Tsuchiya Junichi, Yoneyama Tomohiro, Ohtake Makoto, Tateishi Kensuke, Bae Hyeyeol, Kishino Mitsuhiro, Tateishi Ukihide	4. 巻 41
2. 論文標題 Redox Reaction and Clinical Outcome of Primary Diffuse Large B-cell Lymphoma of the Central Nervous System: Prognostic Role of Metabolic and Textural Parameters of 62Cu-diacetyl-bis (N4-methylthiosemicarbazone) PET/computed Tomography in a Small Patient Cohort	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucl Med Commun	6. 最初と最後の頁 567-574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MNM.0000000000001197.	査読の有無 無
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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 立石健祐 大竹誠 佐藤充 池谷直樹 末永潤 村田英俊 山本哲哉.
2. 発表標題 皮質脊髄路描出に影響を及ぼす因子解析と皮質MEP検出度の検証.
3. 学会等名 第49回 日本臨床神経整理学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立石健祐, 大竹誠, 鳥居原彰, 宍倉彩子, 中村大志, 村田英俊, 山本哲哉, 立石宇貴秀, 井上登美夫:
2. 発表標題 悪性脳腫瘍に対するCu-ATSM PETの臨床的・基礎的意義の検討.
3. 学会等名 第41 回日本脳神経CI学会学術総会 (シンポジウム)
4. 発表年 2018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
---------	---------------------------	-----------------------	----