

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08135

研究課題名(和文) 初発膠芽腫のベバシズマブ治療効果に関する遺伝子と画像評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of genetic and imaging biomarkers for treatment efficacy of Bevacizumab in newly diagnosed glioblastomas

研究代表者

神部 敦司 (KAMBE, Atsushi)

鳥取大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70348283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)： Bevacizumab (BEV)反応性に関する画像所見と遺伝子背景についてStuppレジメンにBEVを加えた初発膠芽腫27例を対象に検討した。Progression free survival が12ヶ月以上の症例をBEV-responder群(n=16)とし、12ヶ月未満の症例をBEV-nonresponder群(n=11)として比較対象を行った。術前のASL画像で、BEV-responder群はnon-responder群と比べて有意にrCBFが上昇していた。免疫組織染色では、BEV-responder群でCOX-2の発現が亢進しており、BEV反応性に関する遺伝子候補となり得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、術前ASL画像で病変部の灌流が上昇している症例ではBEV反応性が良好で、その後の治療成績も良いことが分かった。さらに手術で摘出した組織切片を免疫組織染色で検討したところ、COX-2がBEV反応性に関する遺伝子の一つとして候補に挙がった。

これらの結果は、初発時にBEV治療を追加するかどうかの判断根拠となり得ると思われ、病変部の灌流上昇と病理組織でのCOX-2発現の程度が初発膠芽腫の治療方針を決定する指標の一つになると思われる。今回術前画像や免疫組織染色でBEV反応性に関する因子が示されたことで、初期治療開始前に簡便にBEV治療選択を決定することが出来ると思われる。

研究成果の概要(英文)： We investigated radiological findings and genetic backgrounds related to the treatment response of Bevacizumab (BEV) in 27 glioblastoma patients who received Stupp regimen with BEV therapy. All patients were divided into two groups of BEV responder (n=16, PFS 12 months) and BEV-nonresponder (n=11, PFS<12 months).

In pre-operative ASL imaging, rCBF of BEV responder was significantly increased compared to BEV-nonresponder. In immunohistochemistry, the expression of COX-2 of BEV-responder was increased compared to BEV-nonresponder, which indicates a candidate gene involved in BEV responsiveness.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：Bevacizumab treatment efficacy biomarker glioblastoma

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Bevacizumab (BEV)は血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) に対するモノクローナル抗体で、VEGF を阻害することで血管新生を制御し、抗腫瘍効果を発揮する。海外では再発悪性神経膠腫の治療薬として使用されていたが、国内において、2013 年に世界に先駆けて初発悪性神経膠腫に対しても保険承認された。近年では標準治療薬であるテモゾロミド (Temozolomide: TMZ) との併用で、初発時より VEGF を使用する機会が増えてきている。

BEV は投与後速やかに造影増強効果が減弱し、腫瘍周囲の浮腫の改善がみられる BEV 反応性の症例 (BEV-responder) もあれば、造影増強効果が減弱せずに増強する BEV 不応性の症例 (BEV-nonresponder) も知られているが、BEV 反応性に関する遺伝子背景は解明されていない。また BEV 投与後早期は、BEV 不応性であっても造影増強効果が減弱する (pseudo-response) ことが多く、その画像評価が難しい。そのため、早期に治療効果に結びつく画像評価法を確立することが、BEV 治療継続の有無を判断する上で重要である。

2. 研究の目的

本研究では、最初に、初発膠芽腫患者の治療早期における BEV 反応性に関する画像評価法を確立することを目標とする。さらに、悪性神経膠腫における BEV 反応性に関する遺伝子背景を解明するために、手術で摘出した標本を使用して、BEV 治療選択の判断材料となり得る遺伝子発現変化を簡便な免疫組織染色法 (Immunohistochemistry: IHC) で評価できるか調査する。

3. 研究の方法

(1) 研究対象

当院で 2018 年 4 月から 2020 年 6 月までの間に初発膠芽腫と診断され、標準治療である Stupp regimen (最大限腫瘍摘出後に 6 週間の拡大局所照射 60Gy/30fr とその間における TMZ 連日同時投与) に BEV 治療を追加した 27 症例を対象とした。尚、70 歳以上の高齢患者においては 4 週間 40Gy/20fr への放射線減量を許容した。

治療開始後の全症例の無増悪生存期間 (Progression Free Survival: PFS) の中央値は 12 ヶ月であり、12 ヶ月以上の症例を BEV-responder 群 (n=16) とし、12 ヶ月未満の症例を BEV-nonresponder 群 (n=11) として、両群で比較検討した。

(2) 画像評価方法

MRI は、3 テスラ MRI (Discovery MR750w, GE Healthcare) を用いて撮影した。撮像内容は、T1WI、T2WI、Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR)、Diffusion Weighted Imaging (DWI、b=1000)、Apparent Diffusion Coefficient (ADC)、Susceptibility-Weighted Imaging (SWI)、Gadolinium (Gd) 造影 T1WI、Arterial Spin Labeling (ASL)、Chemical Exchange Saturation Transfer (CEST) を治療開始前、開始後 1 ヶ月以内、その後は 2 ヶ月毎に最大 24 ヶ月まで撮影を行った。

ASL では、病変部位に 5 mm³ の関心領域 (Region Of Interest: ROI) を設定し、画像解析ソフト (SYNAPSE VINCENT software, FUJIFILM) で最大血流量 (maximal Cerebral Blood Flow: CBF_{max}) を測定した。さらに対側の白質に同様に ROI を設定し、CBF_{max} に対側白質 CBF 平均値を除いた後に 100 を乗じたもの (CBF_{max}/averaged contralateral white matter CBF × 100) を relative CBF_{T/N} (rCBF_{T/N}) とした。また CEST においても同様に病変部位に ROI を設定し、SYNAPSE VINCENT で Amide Proton Transfer-Signal Intensity (APT-SI) 値を測定した。rCBF_{T/N} と APT-SI 値を MRI 撮影毎に測定し、その変化を調べた。

(3) 病理学的評価方法

手術で摘出した標本より未染プレパラート (4mm) 切片を作成した。IHC にて、CD34 は Microvessel density (MVD) を 200 倍 5 視野の平均 hot-spot の数で計測した。O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) の発現は、20% 以上の陽性細胞を有する場合は positive と判断した。Ki-67 で maximal MIB-1 index を計測した。Cyclooxygenase-2 (COX-2)、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 の発現は、- (not stained)、1+ (fairly stained)、2+ (strongly stained) の 3 段階で評価した。

4. 研究成果

(1) 臨床的患者背景

両群間における臨床的背景において、平均年齢、性別、入院時 KPS、摘出率や BEV 投与回数に有意差はみられなかった(図1)。また両群間で平均 PFS、生存期間(Overall Survival: OS)を比較してみたところ、BEV-responder 群は PFS(21.8 ヶ月 vs 7.0 ヶ月)だけでなく、OS(28.7 ヶ月 vs 15.6 ヶ月)においても BEV-nonresponder 群と比べて有意に期間延長していた(図2)。

代表症例を提示する。55 歳男性で PFS18 ヶ月に BEV-responder 群と判定した。投与前の MRI 画像において、左基底核を中心にリング状に造影される腫瘍病変を認めた。病変部は、ASL において $rCBF_{T/N}$ は 320.8% と上昇していた。また、CEST においても APT-SI は 4.5% と軽度上昇を認めた(図3)。病理像において、MIB-1 index は最大 60%、MVD は 177.8 と腫瘍組織内にびまん性に微小血管の増生を認めた。COX-2 は 2+、MGMT は+、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 は共に 2+だった(図4)。

(2) 画像評価

次に、投与前の ASL、CEST の MRI 画像を用いて両群間における $rCBF_{T/N}$ と APT-SI 値を比較した。BEV-responder 群において、平均 $rCBF_{T/N}$ は 349.9 で BEV-nonresponder 群(212.4)と比較して有意に低いことが判明した。しかしながら、APT-SI 値は両群間で有意差はみられなかった(図5)。その他のルーチン画像においても、両群間で有意な信号域の差は認めなかった。以上より、治療前の ASL 画像において灌流上昇を認める症例では、BEV 治療に対する反応性が良好であり、BEV 治療を選択する上での有用な画像パラメータになり得ると思われた。

(3) 病理学的評価

手術で摘出した標本より作製した未染プレパラートを使用して、IHC でターゲットとなる遺伝子の発現を調べて、両群間で比較検討した。MGMT の発現の有無による有意差は両群で認められず、MIB-1 index に関しても両群間で有意差を認めなかった。CD34 陽性率による MVD の計測に関しては、BEV-responder 群では比較的 MVD が高い症例が多かったが、BEV-nonresponder 群では MVD の組織切片内でのバラつきが多くて両群間で有意差は得られなかった。VEGF や VEGFR-1、VEGFR-2 といった VEGF レセプターに関しては、両群共にびまん性に強く染色されている症例が殆どで、差は得られなかった。唯一、COX-2 は BEV-responder 群では比較的強く染色されている症例が多く、BEV-nonresponder 群では陰性もしくは淡く染色されている症例が多かった。統計学的にはわずかに有意差が得られなかった($p=0.057$)が、BEV 反応性に関与する遺伝子の候補となり得ると思われた(図6)。

COX-2 は炎症などにより惹起される誘導酵素として知られており、アラキドン酸よりプロスタグランジン E2 (PGE2) を生成する。生成された PGE2 はレセプターを介して腫瘍細胞内で血管新生や細胞増殖を誘導することが知られている。COX-2 は PGE2 を介して VEGF の分泌を促進するだけでなく、COX-2 自体も VEGF によってその発現が亢進するため、両者はお互いに positive feedback を形成しているものと思われる(図7)。

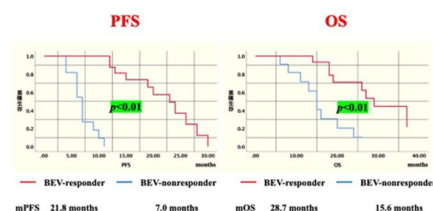
MVD に関しては、同じ組織切片においても density にバラつきが多く、5 箇所 hot spot の平均で数値化したため、あまり差が出なかったものと思われる。VEGF やそのレセプターに関してはほぼ全ての切片においてびまん性に強く染色されており、IHC で発現の差を見るのは困難と思われた。

今回、COX-2 の発現はわずかであるが両群間で有意差を認めなかったが、症例数の蓄積に加えて、IHC での判定方法の変更や real-time RT-PCR などを使用してより詳細な定量化を行えば、有意差が得られるのではないかと思われる。

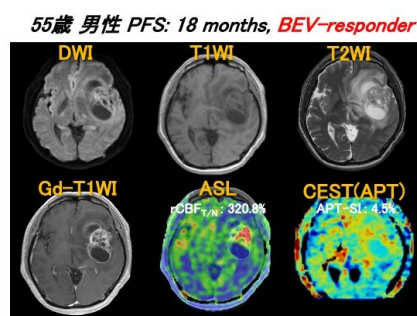
<図1> 臨床的背景

	BEV-responder群	BEV-nonresponder群	p value
症例数	16例	11例	
平均年齢	56歳 (35~84)	63歳 (40~90)	0.422
性別(男/女)	7 / 9	9 / 2	0.109
入院時 KPS ≥ 70%	13/16 (81.3%)	7/11 (63.6%)	0.162
摘出率(%)	STR以上: 8 (56.3%) PR以下: 10 (43.7%)	STR以上: 2 (18.2%) PR以下: 9 (81.8%)	0.125
BEV投与回数	平均28.6回 (16-64)	平均15.6回 (6-31)	0.089

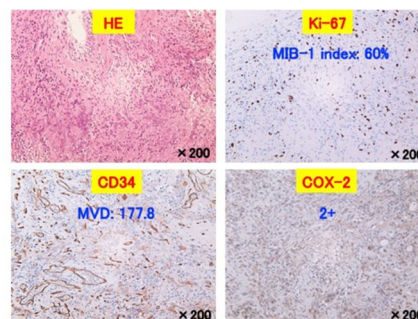
<図2>



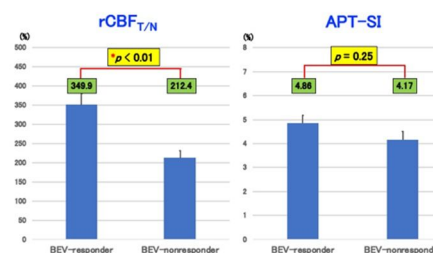
<図3>



<図4>



<図5>



<図6>

BEV-responder群							BEV-nonresponder群								
症例	MGMT	MIB-1	CD34(MVD)	COX-2	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2	症例	MGMT	MIB-1	CD34(MVD)	COX-2	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2
1	+	28%	110	2+	2+	1+	2+	1	+	28%	90	0	1+	2+	2+
2	+	30%	130	2+	2+	2+	1+	2	+	67%	203.8	0	2+	1+	2+
3	-	40%	84.8	1+	1+	2+	2+	3	-	48%	43	1+	2+	2+	1+
4	+	30%	81.4	2+	2+	2+	2+	4	+	70%	95	0	1+	1+	2+
5	-	30%	144.8	2+	2+	2+	2+	5	-	60%	57	0	1+	2+	1+
6	-	80%	28.7	1+	2+	2+	1+	6	+	30%	87.8	1+	2+	2+	2+
7	+	40%	70	1+	2+	1+	2+	7	-	30%	86.5	1+	2+	2+	2+
8	+	88%	38	1+	2+	2+	1+	8	-	28%	45	0	2+	2+	2+
9	+	28%	86.8	2+	2+	1+	2+	9	+	67%	263.3	2+	2+	2+	2+
10	-	70%	130	2+	2+	2+	1+	10	+	85%	177.8	2+	2+	2+	1+
11	-	30%	86.3	2+	2+	2+	2+	11	+	89%	124.8	1+	2+	2+	2+
12	-	18%	64	2+	2+	1+	2+								
13	-	24%	88	2+	2+	2+	1+								
14	+	37%	21.8	2+	2+	2+	2+								
15	+	24%	82	1+	2+	2+	2+								
16	-	30%	180.8	1+	2+	2+	2+								

	MGMT	MIB-1	CD34 (MVD)	COX-2	VEGF	VEGFR-1	VEGFR-2
p-value	0.696	0.422	0.451	0.057	0.673	1.000	1.000

<図7>

<腫瘍細胞における血管新生機序>

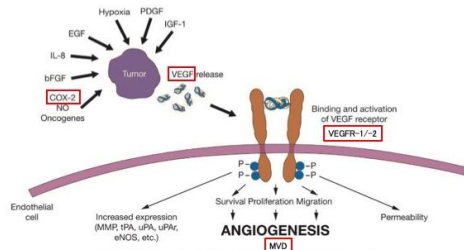


FIGURE 1. Tumor characteristics and environment promote VEGF expression.

Taberner. Mol Cancer Res 5:203-220, 2007

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 0件）

1. 著者名 Kambe Atsushi, Kuwamoto Satoshi, Shimizu Tsuyoshi, Amisaki Hidefumi, Sakamoto Makoto, Inagaki Hirota, Kurosaki Masamichi	4. 巻 41
2. 論文標題 A case of intracranial myxoid mesenchymal tumor with <i><i>EWSR1:CREM</i> fusion in an adult female: Extensive immunohistochemical evaluation</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 315 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12740	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 Amisaki Hidefumi, Kambe Atsushi, Tetsuji Uno, Sakamoto Makoto, Yamasaki Atsushi, Kurosaki Masamichi	4. 巻 Publish Ahead of Print
2. 論文標題 High-Grade Optic Glioma in an Elderly Patient With Neurofibromatosis Type 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Ophthalmology	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) 10.1097/WNO.0000000000001532	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 KAMBE Atsushi, NAKAJIMA Sadao, FUKUSHIMA Kei, MIZUSHIMA Minoru, SAKAMOTO Makoto, HORIE Yasushi, KUROSAKI Masamichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Primary Intracranial Neuroendocrine Tumor of the Skull Base Complicated with Tension Pneumocephalus after Radiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 609 ~ 615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmccrj.cr.2020-0367	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 Kambe Atsushi, Nakada Satoko, Nagao Yuichiro, Uno Tetsuji, Sakamoto Makoto, Shomori Kohei, Tanabe Michiharu, Kondo Shinji, Kurosaki Masamichi	4. 巻 37
2. 論文標題 A dedifferentiated intracranial solitary fibrous tumor with osteosarcoma components: rapid tumor progression and lethal clinical course	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 165 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-020-00374-y	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 Ogura Takafumi, Sakamoto Makoto, Yoshioka Hiroki, Torihashi Koichi, Kambe Atsushi, Kurosaki Masamichi	4. 巻 144
2. 論文標題 Unusual Manifestation of Spinal Epidural Arteriovenous Fistula as Sudden Paraplegia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 60～63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2020.08.104	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 神部 敦司, 高見 飛鳥, 清水 剛, 中島 定男, 鳥橋 孝一, 宇野 哲史, 坂本 誠, 黒崎 雅道	4. 巻 43
2. 論文標題 悪性神経膠腫におけるBecacizumab治療効果に関連した画像的特徴	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CI研究	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) 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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 神部敦司、末吉駿太郎、宮元大央、高見飛鳥、清水剛、細谷朋央、中島定男、鳥橋孝一、宇野哲史、坂本誠、黒崎雅道
2. 発表標題 摘出不十分な初発膠芽腫症例におけるペバシズマブ上乗せ効果の検討
3. 学会等名 第26回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神部敦司、末吉駿太郎、宮元大央、高見飛鳥、清水剛、細谷朋央、中島定男、鳥橋孝一、宇野哲史、坂本誠、黒崎雅道
2. 発表標題 初発膠芽腫におけるBEV反応性に関する画像及び病理学的検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Kambe
2. 発表標題 The Strategy of Malignant Glioma Treatments in Tottori University
3. 学会等名 SUNSHINE 2021 Solo Update On Neurology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神部 敦司, 網崎 秀史, 桑本 雄平, 清水 剛, 中島 定男, 鳥橋 孝一, 宇野 哲史, 坂本 誠, 黒崎 雅道
2. 発表標題 広範に進展した頭蓋内胚細胞腫瘍に対する生検方法と問題点
3. 学会等名 第25回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神部 敦司, 清水 剛, 中島 定男, 鳥橋 孝一, 宇野 哲史, 坂本 誠, 桑本 聡史, 堀江 靖, 山崎 厚志, 黒崎 雅道
2. 発表標題 退形成性星細胞腫の像を呈した成人NF1合併視神経膠腫の1症例
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍病理学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神部 敦司, 高見 飛鳥, 清水 剛, 中島 定男, 鳥橋 孝一, 宇野 哲史, 坂本 誠, 黒崎 雅道
2. 発表標題 悪性神経膠腫におけるペバシズマブ治療効果に関連した画像的特徴
3. 学会等名 第43回日本脳神経CI学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神部 敦司, 網崎 秀史, 桑本 雄平, 清水 剛, 中島 定男, 鳥橋 孝一, 宇野 哲史, 坂本 誠, 黒崎 雅道
2. 発表標題 当院での高齢患者におけるPCNSL初期治療の現状と課題
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神部 敦司, 網崎 秀史, 桑本 雄平, 清水 剛, 中島 定男, 鳥橋 孝一, 宇野 哲史, 坂本 誠, 黒崎 雅道
2. 発表標題 当院での高齢患者におけるPCNSL初期治療成績と今後の課題
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神部 敦司, 桑本 雄平, 細谷 朋央, 中島 定男, 鳥橋 孝一, 宇野 哲史, 坂本 誠, 黒崎 雅道
2. 発表標題 初発膠芽腫におけるBEV反応性に関する病理学的因子の検討
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍病理学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神部 敦司, 桑本 雄平, 細谷 朋央, 中島 定男, 鳥橋 孝一, 宇野 哲史, 坂本 誠, 黒崎 雅道
2. 発表標題 Bevacizumab投与下での悪性神経膠腫再発病変の画像所見と予後予測
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第81回学術総会
4. 発表年 2022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	藤井 進也 (FUJII Shinya) (10379638)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	
研究分担者	黒崎 雅道 (KUROSAKI Masamichi) (20291461)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	
研究分担者	加藤 亜結美 (KATO Asami) (40724810)	鳥取大学・医学部附属病院・助教 (15101)	退職に伴い分担者から外しました。
研究分担者	北尾 慎一郎 (KITAO Shinichiro) (60724804)	鳥取大学・医学部附属病院・助教 (15101)	

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