

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：15401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591612  
 研究課題名（和文） グリオーマにおける EGFR 阻害剤の耐性克服  
 研究課題名（英文） Overcoming resistant to EGFR inhibitor in glioma  
 研究代表者  
 山崎 文之 (YAMASAKI FUMIYUKI)  
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
 研究者番号：60444692

## 研究成果の概要（和文）：

PEA-15 は astrocytoma がの悪性度が上昇するにつれ発現が低下し、予後不良因子であった。Erlotinib の自然耐性、獲得耐性を、gemcitabine により p-Akt を低下させることで克服可能であることを証明した。

Proton MR spectroscopy による lactate の検出が脳幹 glioma の予後不良因子であることを明らかにした。高い b 値の拡散強調画像で測定すると、膠芽腫の拡散係数はリンパ腫と比較して有意に高く、両者の鑑別が可能であった。膠芽腫に対して bevacizumab 投与時に生じる pseudo-response について、高い b 値を用いた拡散強調画像が鑑別に有用であることを発見した。

## 研究成果の概要（英文）：

PEA-15 expression level, that is the downstream molecule of EGFR signal pathway, was inversely associated with WHO grade and may serve as an important prognostic factor for high-grade astrocytomas. High PEA-15 expression level displayed a significant correlation with longer overall survival (OS) in high-grade astrocytomas ( $P = 0.0024$ ).

Gemcitabine increased the cytotoxic effect of erlotinib by downregulating p-Akt in EGFR-overexpressing cells with either intrinsic or acquired erlotinib resistance.

The study of advanced MR imaging about brain tumors revealed that the MRS detection of lactate is a prognostic factor in patients with diffuse intrinsic pontine glioma. Calculating the ADC value is useful for distinguishing lymphoma from glioblastoma. The lowest degree of overlapping and a better inverse correspondence with tumor cellularity were obtained with ADCMIN at b-4000s/mm<sup>2</sup> at 3 T MRI. High b-value DWI reflects cell density more accurately than regular b-value DWI. In patients with recurrent glioma, high b-value diffusion-weighted criteria are useful for the differentiation between pseudo- and true responses to treatment with bevacizumab.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脳腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：(1) glioma (2) EGFR (3) PEA-15 (4) erlotinib

(5) diffusion-weighted imaging (6) gemcitabine (7) bevacizumab (8) pseudo-response

### 1. 研究開始当初の背景

glioma において、EGFR、VEGF を標的とした分子標的治療が期待されており、感受性、耐性、耐性克服の研究が重要である。

### 2. 研究の目的

glioma の発生において EGFR (epidermal growth factor receptor、上皮成長因子) の高発現は高率に認められ、グリオーマ治療の重要な分子標的である。しかし臨床において EGFR 阻害剤は効果が限られ、グリオーマ細胞株の多くは erlotinib に自然耐性を示す。一方、細胞周期を調節する cyclin D、p16、CDK4、retinoblastoma (RB) で構成される経路は、ほぼすべての悪性グリオーマで異常が起きていることが知られている。本研究期間中にグリオーマ細胞株と erlotinib の獲得耐性株を用いて、erlotinib 投与前後における cyclin D/CDK4/p16--RB 経路の蛋白の発現量、リン酸化状態と局在の変化について解明する。またこの cyclin D/CDK4/p16--RB 経路の遺伝子変異、エピジェネティクスな変化、リン酸化部位の変化が erlotinib の感受性に与える影響を明らかにする。さらに、erlotinib 自然耐性グリオーマ細胞株と、erlotinib 獲得耐性株における共通点と相違点について検討して、EGFR 阻害剤の耐性克服を目指す。また、EGFR と同様に glioma において重要な VEGF の分子標的治療の開発を目指す。

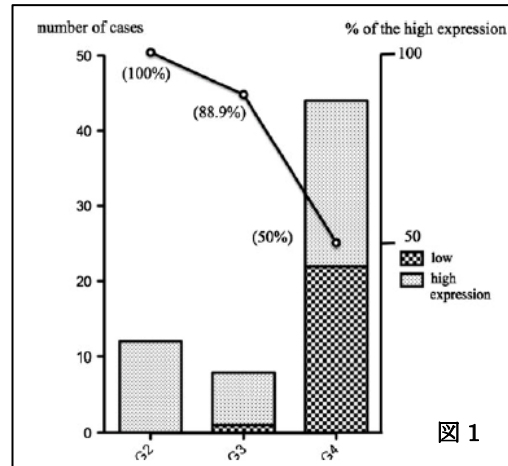
### 3. 研究の方法

EGFR 自然耐性株、獲得耐性株（研究者がこれまでの研究で作成）を用いて EGFR の耐性克服を行った。いくつかの抗がん剤との併用効果を検討し、gemcitabine が EGFR 阻害剤の erlotinib と併用したときの効果が高いことを突き止め、自然耐性株、獲得耐性株の耐性克服と蛋白の発現を検討した。さらに、画像診断、術前診断、治療効果判定に advanced MR imaging を導入し、拡散強調画像、灌流画像、proto MR spectroscopy の有用性を検討した。

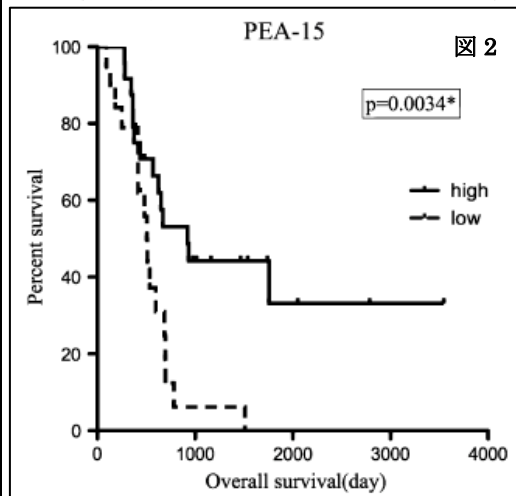
### 4. 研究成果

上皮成長因子レセプター (EGFR) のシグナル伝達経路に着目し、正常の astrocyte において豊富に発現し、さらに EGFR のシグナル伝達経路の下流に位置する astrocytic phosphoprotein の PEA-15 について検討した。PEA-15 はアポトーシスを抑制する一方で、ERK1/2 を細胞質に留めて増殖活性を抑制す

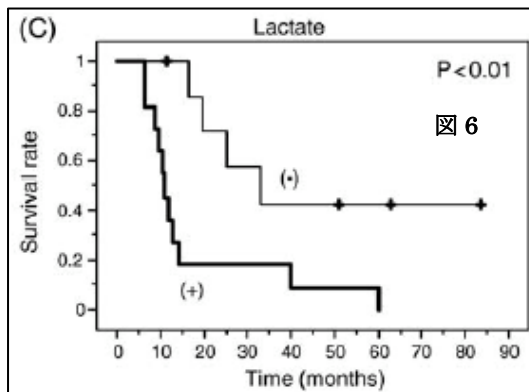
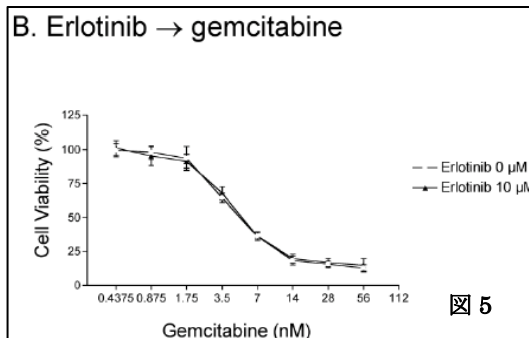
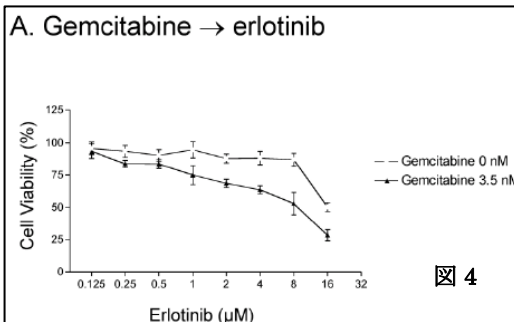
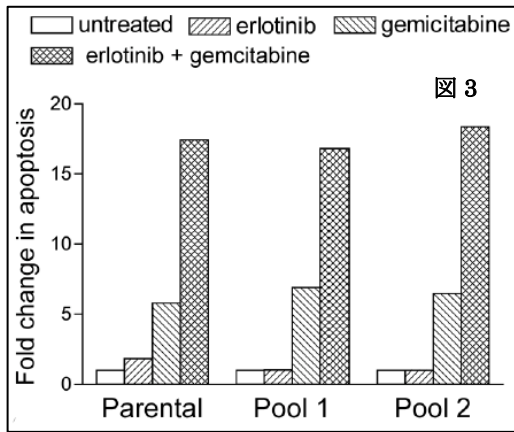
るが、PEA-15 の発現を glioma において詳細に検討し、diffuse astrocytoma (WHO grade II)、anaplastic astrocytoma (WHO grade III)、glioblastoma (WHO grade IV) と悪性度が上昇するにつれて、PEA-15 の発現が低下することを証明した (図 1)。



さらに、PEA-15 の低下が悪性 glioma において予後不良因子であることを明らかにした (図 2)。

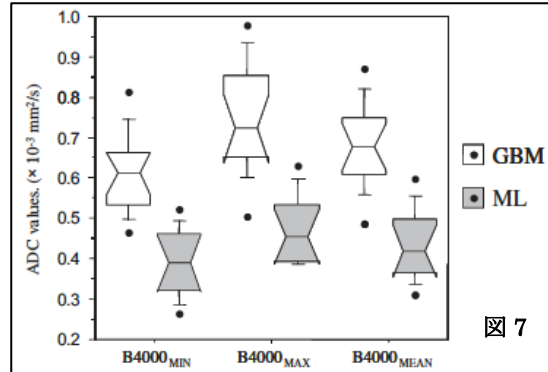


また、EGFR を標的とした分子標的薬の erlotinib について検討し、erlotinib の獲得耐性株を EGFR が過剰発現した A-431 細胞株にて作成し、EGFR が高発現しているにも関わらず erlotinib に対して自然耐性を示す BT-549、MDA-MB-468 について、erlotinib の耐性原因となっている p-Akt が gemcitabine により発現が低下することで、自然耐性、獲得耐性ともに克服可能であることを証明した (図 3)。さらに、これらの自然耐性株、獲得耐性株に投与する際に、erlotinib を gemcitabine 投与前に投与しても耐性は克服できず (図 4)、erlotinib を gemcitabine 投与後に投与することで耐性が克服できることを明らかにした (図 5)。



また glioma 患者において、脳幹に発生した glioma の予後予測因子を詳細に検討した。そして、single proton MR spectroscopy による lactate の検出が脳幹 glioma の予後不良因子であること (図 6) や conventional MR imaging が予後予測因子にならないことを明らかにした。

また、glioma の中で最も悪性度の高い glioblastoma において、b 値を 4000 に設定した拡散強調画像で拡散係数(apparent diffusion coefficient)を測定すると、glioblastoma における ADC は malignant lymphoma の ADC と比較して有意に高く、両者の鑑別が可能となり、治療方針の決定の上で極めて有用であることを明らかにした (図 7)。



さらに、b 値 1000 と比較した場合に、より正確に細胞密度と相関することを明らかにし、高い b 値での拡散強調画像の有用性を明確にした。また、通常の ADC 値での検討で、glioblastoma の予後が ADC と逆相関することや、髄芽腫が上皮腫と比較して有意に低い ADC を示すこと、脳室内腫瘍の鑑別診断における有用性について報告した。さらに、glioblastoma に対して分子標的薬の bevacizumab を用いた時に生じる pseudo-response について、高い b 値を用いた拡散強調画像が pseudo-response と true-response の鑑別に有用で、MacDonald criteria、RANO criteria よりも正確に病状を捉えることが可能であることを発見した (図 8)。

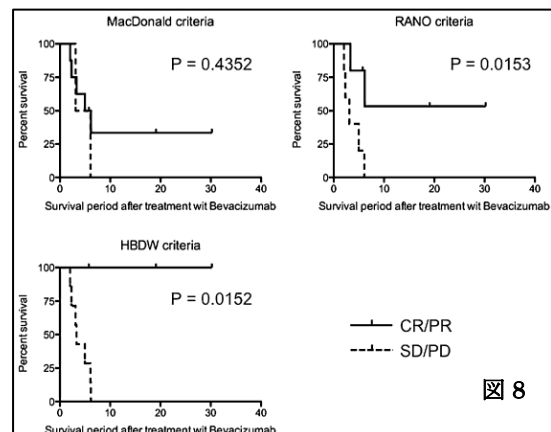


図 8

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件)

1. Watanabe Y, Yamasaki F, Nakamura K, Kajiwara Y, Takayasu T, Hirose T, Amatya VJ, • Sugiyama K, Kobayashi M, Kurisu K. Desmoplastic/nodular medulloblastoma associated with anhidrotic ectodermal dysplasia. *Int Canc Conf J*, 2013, in press. (査読有)
2. Watanabe Y, Yamasaki F, Kajiwara Y, Takayasu T, Nosaka R, Akiyama Y, Sugiyama K, Kurisu K. Preoperative histological grading of meningiomas using apparent diffusion coefficient at 3T MRI. *Eur J Radiol*, 2013, in press. (査読有)
3. 山崎文之、渡邊陽祐、高安武志、野坂亮、穂山雄次、齋藤太一、杉山一彦、栗栖薫。磁気共鳴スペクトロスコピーによる lactate の検出はびまん性内性橋グリオーマの予後不良因子である。 *広島医学*, 2013, in press (査読有)
4. 高安武志, 杉山一彦, 飯田幸治, 山崎文之, 梶原佳則, 西本武史, 渡邊陽祐, 香川幸太, 栗栖薫, 廣川裕。メチオニン PET による再発脳腫瘍の術前評価とその手術支援への応用。 *広島医学*, 65:159-160, 2012. (査読有)
5. 渡邊陽祐, 山崎文之, 梶原佳則, 齋藤太一, 西本武史, 杉山一彦, 栗栖薫。星細胞系腫瘍における phosphoprotein enriched in astrocytes 15 kDa (PEA-15) の発現。 *広島医学*, 65:78-83, 2012. (査読有)
6. 島田さやか, 上野弘貴, 山崎文之, 杉山一彦, 安富浩子, 関根真悠, 大下智彦, 倉重毅志, 中村毅, 西原広史, 山脇健盛, 栗栖薫, 松本昌泰。ステロイド療法が奏功した中枢神経原発リンパ腫様肉芽腫症の 1 例 *Brain and Nerve*, 64(1): 85-87, 2012. (査読有)
7. 山崎文之、渡邊陽祐、高安武志、野坂亮、梶原佳則、花谷亮典、富永篤、杉山一彦、栗栖薫。大脳のびまん性血流低下を示した cerebellar mutism の 1 例。 *Brain and Nerve*, 64: 1431-1433, 2012. (査読有)
8. 山崎文之、中村和洋、杉山一彦、小林正夫、栗栖薫。脳腫瘍を含む小児がんに対するステロイド使用の現状：全国アンケートの集計結果。 *脳神経外科*, 40: 607-616, 2012. (査読有)
9. Watanabe Y, Yamasaki F, Nakamura K, Kajiwara Y, Takayasu T, Nosaka R, Sugiyama K, Kobayashi M, Kurisu K. Evaluation of cerebellar mutism by arterial spin-labeling perfusion magnetic resonance imaging in a patient with atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT): a case report. *Childs Nerv Syst*, 28(8): 1257-1260, 2012. (査読有)
10. Saito T, Yamasaki F, Kajiwara Y, Abe N, Akiyama Y, Kakuda T, Takeshima Y, Sugiyama K, Okada Y, Kurisu K. Role of perfusion-weighted imaging at 3T in the histopathological differentiation between astrocytic and oligodendroglial tumors. *Eur J Radiol*, 81(8): 1863-1869, 2012. (査読有)
11. Doskaliyev A, Yamasaki F (Corresponding author), Ohtaki M, Kajiwara Y, Takeshima Y, Watanabe Y, Takayasu T, Amatya VJ, Akiyama Y, Sugiyama K, Kurisu K. Lymphomas and glioblastomas: Differences in the apparent diffusion coefficient evaluated with high b-value diffusion-weighted magnetic resonance imaging at 3T. *Eur J Radiol*. 81: 339-344, 2012. (査読有)
12. Yamasaki F, Kurisu K, Aoki T, Yamanaka M, Kajiwara Y, Watanabe Y, Takayasu T, Akiyama Y, Sugiyama K. Advantages of high b-value diffusion-weighted imaging to diagnose pseudo-responses in patients with recurrent glioma after bevacizumab treatment. *Eur J Radiol*, 81: 2805-2810, 2012. (査読有)
13. 山口智、杉山一彦、江口国輝、山崎文之、武田正明、光原崇文、栗栖薫。脊髄血管芽腫の手術。 *脳神経外科速報*, 21: 838-845, 2011. (査読有)
14. 杉山一彦、山崎文之、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、栗栖薫。髄芽腫臨床を理解するための 12 項目。 *脳神経外科ジャーナル*, 20(5): 363-371, 2011. (査読有)
15. 山崎文之、杉山一彦、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、岐浦禎展、栗栖薫、河本昌志、濱田宏、仁井内浩、上田友佳、吉村安希子、穂山雄次、森重水貴、橋詰顕。図説 言語野近傍の手術—覚醒下手術と言語 mapping— *広島医学*, 64: 431-432, 2011. (査読有)
16. 山崎文之、杉山一彦、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、権丈雅浩、栗栖薫。テモゾロミド点滴静注剤と脳神経外科領域での制吐療法。 *脳神経外科速報*, 21: 1134-1141, 2011. (査読有)
17. Bartholomeusz C, Yamasaki F, Saso H, Kurisu K, Hortobagyi GN, Ueno NT. Gemcitabine Overcomes Erlotinib Resistance in EGFR-Overexpressing Cancer Cells through Downregulation of Akt. *J Cancer*, 2: 435-442, 2011. (査読有)
18. Yamasaki F, Kurisu K, Kajiwara Y, Watanabe Y, Takayasu T, Akiyama Y, Saito T, Hanaya R, Sugiyama K. MR spectroscopic detection of lactate is predictive of a poor prognosis in patients with diffuse intrinsic pontine glioma. *Neuro-oncology*, 13: 791-801, 2011. (査読有)
19. Watanabe Y, Yamasaki F, Kajiwara Y, Saito T, Nishimoto T, Bartholomeusz C, Ueno NT, Sugiyama K, Kurisu K. Expression of phosphoprotein enriched in astrocytes 15 kDa (PEA-15) in astrocytic tumors: a novel approach of correlating malignancy grade and prognosis. *J Neurooncol*, 100(3): 449-457, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 31 件)

1. 山崎文之、富永篤、渡邊陽祐、木下康之、高安武志、碓井智、野坂亮、斎藤太一、杉山一彦、栗栖薫：Germinoma の診断におけるadvanced MR imaging の有用性の検討。第23回日本間脳下垂体腫瘍学会，鹿児島，2013/3/15-3/16。（シンポジウム）
2. 山崎文之：小児脳腫瘍の化学療法とテモゾロミド。広島 Glioma セミナー 2013，広島。3/1，2013。（講演）
3. 山崎文之、斎藤太一、渡邊陽祐、高安武志、野坂亮、山口智、岐浦禎展、江口国輝、富永篤、杉山一彦、栗栖薫：Tumefactive lesionの画像診断 教育セミナー。第35回日本脳神経CI学会総会，広島。2/22-2/23，2013。（教育セミナーシンポジウム）
4. 山崎文之、富永篤、渡邊陽祐、木下康之、高安武志、碓井智、野坂亮、斎藤太一、杉山一彦、栗栖薫：Germinoma の診断におけるadvanced MR imaging の有用性の検討。第42回日本神経放射線学会，小倉。2/15-2/16，2013（口演）
5. 山崎文之、渡邊陽祐，高安武志，野坂亮，富永篤，栗栖薫，中村和洋，小林正夫，杉山一彦：Embryonal tumor に対する放射線治療後の脳海綿状血管腫の発生。第54回日本小児・血液がん学会，横浜。11/30-12/2，2012。（口演）
6. 山崎文之：小児脳腫瘍と転移性脳腫瘍へ子どもの脳にできたがんと脳に転移したがん。第30回日本脳腫瘍学会，市民公開講座，広島。11/25，2012（講演）
7. 山崎文之、杉山一彦、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、栗栖薫、青木友和、山中正美：Bevacizumab投与後のpseudo-responseの評価方法。第50回日本癌治療学会，横浜。10/25-10/27，2012。（ポスター）
8. 山崎文之：肺癌脳転移の脳出血リスクと bevacizumab。中外eセミナー，広島。10/18，2012。（講演）
9. 山崎文之、渡邊陽祐，高安武志，野坂亮，富永篤，栗栖薫，杉山一彦：Embryonal tumor に対する放射線治療後の脳海綿状血管腫の発生。第71回脳神経外科学会総会，大阪。10/17-19，2012（ポスター）
10. 山崎文之、杉山一彦、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、栗栖薫、青木友和、山中正美：Bevacizumab投与後のpseudo-responseの評価方法。第40回日本磁気共鳴医学会，京都。9/6-9/8，2012（口演）
11. 山崎文之、渡邊陽祐，高安武志，野坂亮，杉山一彦、栗栖薫：術前にCNS悪性リンパ腫との鑑別が困難であったglioblastomaの2例。第30回日本脳腫瘍病理学会，名古屋。5/24-5/26，2012（口演）
12. Yamasaki F，Kajiwara Y，Watanabe Y，Takayasu T，Nosaka R，Sugiyama K，Kurusu K：Lymphomas, Glioblastomas and Metastatic Tumors: Differences in the Apparent Diffusion Coefficient Evaluated with High b-Value Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging at 3 Tesla. 50<sup>th</sup> Annual meeting of American Society for Neuro-radiology (New-York, USA, 4/21-4/26, 2012) (Poster)
13. 山崎文之、杉山一彦、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、栗栖薫、青木友和、山中正美：Bevacizumab投与後のpseudo-responseの評価方法。第34回日本CI学会総会，横浜。3/2-3/3，2012（シンポジウム）
14. 山崎文之、杉山一彦、富永篤、梶原佳則、木下康之、渡邊陽祐、碓井智、高安武志、栗栖薫：Germinoma の診断におけるadvanced MR imaging の有用性の検討。第53回日本小児・血液がん学会，群馬。11/25-27，2011（口演）
15. 山崎文之、杉山一彦、栗栖薫、中村和洋、小林正夫：小児がんに対するステロイド適正使用と副作用対策～全国アンケートの集計結果～。第53回日本小児・血液がん学会，群馬。11/25-27，2011（ポスター）
16. 山崎文之、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、杉山一彦、栗栖薫：Temozolomide点滴静注用剤のgliomaに対する効果とtemozolomide投与時の支持療法。第49回日本癌治療学会，名古屋。10/27-10/29，2011。（口演）
17. 山崎文之、杉山一彦、青木友和、山中正美、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、栗栖薫：Bevacizumab投与後のpseudo-responseの評価方法。第70回日本脳神経外科学会総会，横浜。10/12-10/14，2011。（シンポジウム）
18. 山崎文之、Aidos Doskaliyev、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、杉山一彦、栗栖薫：頭蓋内悪性リンパ腫と膠芽腫の鑑別～高いb値による拡散係数計測の有用性～。第39回日本磁気共鳴医学会，小倉。9/29-10/1，2011。（口演）
19. 山崎文之：Advanced MR imagingによる腫瘍性病変の鑑別診断。第42回広島神経医学研究会，広島。7/20，2011。（講演）
20. Yamasaki F，Kajiwara Y，Watanabe Y，Sugiyama K，Kurusu K：Advantages of High b-Value Diffusion-Weighted Imaging to Diagnose Pseudo-Response in Patients with Recurrent Glioblastoma after Bevacizumab Treatment: Case Report. 49<sup>th</sup> American Society of Neuroradiology, Seattle, USA. 6/4-6/9, 2011. (Poster)
21. 山崎文之、杉山一彦、富永篤、梶原佳則、木下康之、渡邊陽祐、碓井智、高安武志、栗栖薫、武島幸男、ヴィシュワ・アマティア、廣瀬隆則：当院における脳幹グリオーマの病理診断の経験。第29回日本脳腫瘍病理学会，東京。5/20-5/21，2011。（口演）
22. 山崎文之、杉山一彦、梶原佳則、渡邊陽祐，高安武志，栗栖薫、穂山雄次、安倍伸和、高羽順子、大瀧慈：膠芽腫の全生存期間と拡散係数。第40回日本神経放射線学会，品川。2/24-2/26，2011。（口演）
23. 山崎文之、ムハマド・オマール、富永篤、迫口哲彦、木下康之、碓井智、有田和徳、栗栖薫：PROPELLER拡散強調画像による拡散係数を用い

- た傍鞍部腫瘍の術前鑑別診断と下垂体腺腫の硬さの術前評価. 第33回日本脳神経CI学会総会, 鳥取. 2/5-2/6, 2011. (口演)
24. 山崎文之、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、杉山一彦、栗栖薫: 橋部神経膠腫の治療成績と画像所見の検討. 第26回日本小児がん学会学術集会, 大阪. 12/17-12/19, 2010. (口演)
25. 山崎文之、ドスカリエフ・アイドス、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、杉山一彦、栗栖薫: 頭蓋内悪性リンパ腫と膠芽腫の鑑別～高いb値による拡散係数計測の有用性～. 第28回日本脳腫瘍学会, 軽井沢. 11/28-11/30, 2010. (口演)
26. 山崎文之: 広島大学病院におけるテモダール点滴静注用剤の使用経験. TMZ(temozolomide) Forum in Hiroshima 2010, 広島. 11/19, 2010.(講演)
27. 山崎文之、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、杉山一彦、栗栖薫: 脳幹部グリオーマ23例の治療成績の検討. 第48回日本癌治療学会, 京都. 10/28-10/30, 2010. (シンポジウム)
28. 山崎文之、梶原佳則、渡邊陽祐、高安武志、山口智、岐浦禎展、江口国輝、富永 篤、杉山一彦、栗栖薫: Tumefactive lesionの画像診断. 第69回日本脳神経外科学会総会, 福岡. 10/27-10/29, 2010. (口演)
29. 山崎文之、富永篤、迫口哲彦、木下康之、穂山雄次、杉山一彦、有田和徳、栗栖薫: PROPELLER拡散強調画像による拡散係数を用いた下垂体腺腫の硬さの術前評価. 第38回日本磁気共鳴医学会, 筑波. 9/30-10/2, 2010. (口演)
30. 山崎文之、杉山一彦、栗栖薫、上野直人. EGF R受容体キナーゼ阻害剤(erlotinib)治療に対する耐性獲得機序とグリオーマ治療における問題点. 第11回日本分子脳神経外科学会, 仙台. 8/27-28, 2010. (シンポジウム)
31. Yamasaki F, Kajiwara Y, Saito T, Watanabe Y, Sugiyama K, Kurusu K: MR spectroscopic detection of lactate is predictive of a poor prognosis in patients with brainstem glioma. 48<sup>th</sup> American Society of Neuroradiology, Boston, USA. 5/15-21, 2010. (Symposium)

[その他]

ホームページ等

[http://www.hiroshima-u.ac.jp/hosp/noushinkeigeka/p\\_5c63c1.html](http://www.hiroshima-u.ac.jp/hosp/noushinkeigeka/p_5c63c1.html)

[http://home.hiroshima-u.ac.jp/nouge/research\\_details2.html](http://home.hiroshima-u.ac.jp/nouge/research_details2.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山崎 文之 (Fumiyuki Yamasaki)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号：60444692

### (2)研究分担者

栗栖 薫 (Kaoru Kurisu)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授  
研究者番号：70201473

杉山 一彦 (Kazuhiko Sugiyama)  
広島大学・病院・教授  
研究者番号：30243554