

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390355

研究課題名(和文)腫瘍選択的高LET高RBE粒子線治療による治療抵抗性グリオーマ幹細胞制圧の試み

研究課題名(英文)Tumor-selective high LET and high RBE particles can overcome the radiation-resistant glioma stem cells

研究代表者

宮武 伸一 (Miyatake, Shin-Ichi)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：90209916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫(GBM)株A172とこの細胞株より誘導しGSCで、CD133等のマーカーの変化確認しGSCのstemnessを確認した。この2種類の細胞株にほう素化合物非存在下で等物理線量のX線と中性子線を照射し、colony forming assay, gamma H2A assayでの細胞のダメージを評価した。本系における細胞障害の担い手は窒素中性子捕捉反応により生じる、高LET粒子線である陽子線であり、同一物理線量ではX線より細胞障害活性が高く、DNA double strand break の効率も高いことを示した。すなわち、高LET粒子線はGSCのX線抵抗性を克服することを証明した。

研究成果の概要(英文)：GSLC were induced from GBM cell line A172. The phenotypes of GSLCs were confirmed by stem cell markers. These cells were irradiated with <sup>60</sup>Co gamma rays or reactor neutron beams. Under neutron beam irradiation, high-LET proton particles can be produced. Radiosensitivity was assessed by a CFA, and the DNA double-strand breaks (DSBs) were assessed by gamma-H2AX focus assay. In stem cell culture medium, GSLCs could form neurosphere-like cells and express neural stem cell markers, Sox2 and Musashi, abundantly in comparison with their parental cells. GSLCs were significantly more radioresistant to gamma rays than their parental cells, but neutron beams overcame this resistance. Twenty-four hours after irradiation with gamma rays, there were significantly fewer gamma-H2AX foci in A172 GSLCs than in their parental cultured cells, while there was no apparent difference following neutron beam irradiation. High-LET radiation can overcome the radioresistance of GSLCs.

研究分野：医歯薬学

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：high LET BNCT glioma stem cell 放射線抵抗性 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫が難治である原因はその浸潤的発育と、その腫瘍細胞内にわずかに存在するグリオーマ幹細胞が、放射線治療および化学療法に抵抗性を示すことによる。この腫瘍幹細胞をターゲットとして膠芽腫の根治を目指すために放射線抵抗性の機序を解明したい。

2. 研究の目的

神経膠芽腫が難治である原因はその浸潤的発育と、その腫瘍細胞内にわずかに存在するグリオーマ幹細胞が、放射線治療および化学療法に抵抗性を示すことによる。一方、腫瘍選択的粒子線治療である硼素中性子捕捉療法(BNCT)における殺細胞効果の担い手である <sup>6</sup>Li 粒子は高 LET、高 RBE の粒子線であり、放射線 (X 線) 治療抵抗性を示す腫瘍にも強い抗腫瘍効果を示すことが期待される。一方グリオーマ幹細胞における薬剤抵抗性の機序の一つに、薬剤排出能の亢進が考えられる。本研究ではグリオーマ幹細胞での薬剤排出能の制御による硼素化合物の細胞内集積および分子生物学的手法による新規硼素化合物作成と BNCT による組み合わせにより、グリオーマ幹細胞の治療抵抗性の克服を試みることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

当初はグリオーマ幹細胞を熊本大学、慶応大学から入手し、その特性を解析するところから研究を開始した。しかしながら、熊本大学から入手したグリオーマ幹細胞はその染色体の解析からグリオーマ幹細胞のコンタミネーションからの形質転換を起こしたものであることが判明し、慶應大学から入手したグリオーマ幹細胞は *in vitro*、*in vivo* 双方での増殖が悪く、実験および研究に使用できるものではなかった。

よって、当教室で独自に、stem cell 培養用培地の使用で GBM 株から GSC 株を分化誘導することに成功した。

H24 年度は 1) この分化誘導した GSC 株の stemness の証明、2) 中性子線および X 線照射による GSC 株、GBM 株の放射線感受性の *in vitro* の検討、3) *in vivo* における各腫瘍株での硼素化合物の取り込みの検討を行った。

以下に詳述する。

1) 分化誘導した GSC 株の stemness の証明: GSC 株の stemness を Sox1, Nestin, CD133 等の GSC マーカーを用いて、Western blot, FCM 法により検討した。

対照は同細胞株を誘導した親株 GBM 株 A172 とした。

2) 中性子線および X 線照射による GSC 株、GBM 株の放射線感受性の *in vitro* の検討: ホウ素非存在下に中性子線を照射すると中

性子 窒素反応により高 LET 陽子線が発生し、細胞を傷害する。この高 LET 粒子線の効果を GSC と GBM 株で比較した。この際 X 線の感受性を対照とすることにより、高 LET 粒子線による GSC 株の感受性が検討できた。

3) *in vivo* における各腫瘍株での硼素化合物の取り込みの検討: ポリアルギニン付加のホウ素化合物 BSH の細胞内へのとりこみを、各 GSC, GBM 株を用いて、蛍光染色、ICP 法により定性的および定量的に評価した。

4. 研究成果

ほう素化合物のアミノ酸修飾による、GSC への集積増強は確認できたが、常時一定量のほう素を安定して GSC, GBM の細胞内に導入することは困難であり、X 線と BNCT での主たる細胞破壊効果の担い手である <sup>6</sup>Li-線を同一の物理線量で比較することは困難であることが判明した。

よって方針を変えて以下の研究により高 LET の陽子線を利用した実験系に変更した。すなわち GBM 細胞株 A172 より、GSC 誘導用の無血清培地で GSC を誘導した。

この細胞株での SOX-2, CD133 等のマーカーの変化を FCM を用いて確認し GSC の stemness を確認した。(図 1) この 2 種類の細胞株にほう素化合物非存在下で等物理線量の X 線と中性子線を照射し、colony forming assay, gamma H2A assay での細胞のダメージを評価した。(図 2)

本系における細胞障害の担い手は窒素中性子捕捉反応により生じる、高 LET 粒子線である陽子線であり、同一物理線量では X 線より細胞障害活性が高く、DNA double strand break の効率も高いことを示した(図 3)。すなわち、高 LET 粒子線は GSC の X 線抵抗性を克服することを証明した。

図 1

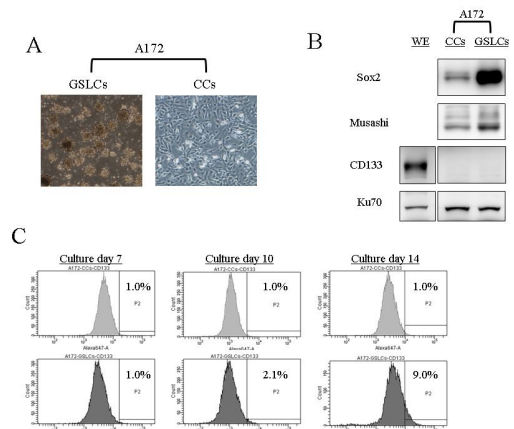


図 2

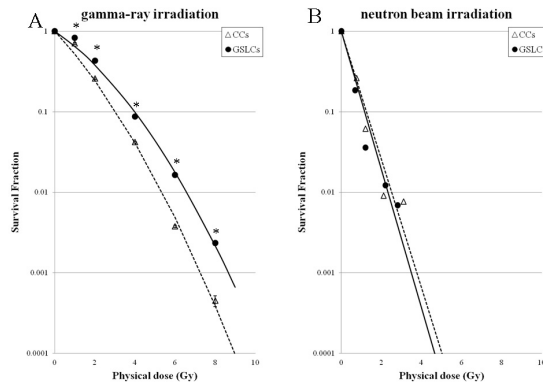
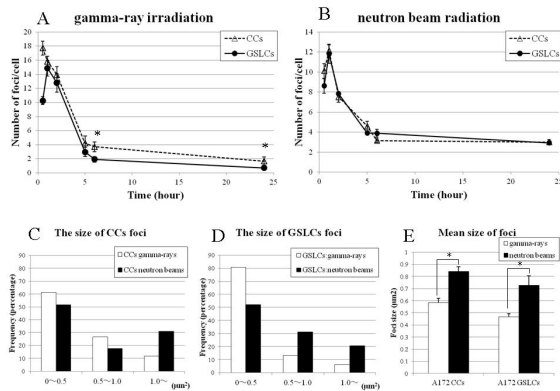


図 3



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 7件)

- 1) High linear-energy-transfer radiation can overcome radioresistance of glioma stem-like cells to low linear-energy-transfer radiation.

Hirota Y, Masunaga SI, Kondo N, Kawabata S, Hirakawa H, Yajima H, Fujimori A, Ono K, Kuroiwa T, Miyatake SI.

J Radiat Res. 2014 Jan 1;55(1):75-83.

- 2) The roles of Platelet-Derived Growth Factors and their receptors in brain radiation necrosis.

Miyata T, Toho T, Nonoguchi N, Furuse M, Kuwabara H, Yoritsune E, Kawabata S, Kuroiwa T, and Miyatake S. Radiation Oncology 2014 Feb 11;9:51.

- 3) Boron neutron capture therapy with bevacizumab may prolong the survival of recurrent malignant glioma patients: four cases.

Miyatake SI, Kawabata S, Hiramatsu R, Furuse M, Kuroiwa T, Suzuki M.

Radiat Oncol. 2014 Jan 6;9(1):6.

- 4) Bevacizumab treatment of symptomatic pseudoprogression after boron neutron capture therapy for recurrent malignant gliomas. Report of 2 cases. Miyatake SI, Furuse M, Kawabata S, Maruyama T, Kumabe T, Kuroiwa T, Ono K.

Neuro Oncol. 2013 Jun;15(6):650-5

- 5) Symptomatic Radiation Necrosis Diagnosed by Amino Acid PET Motomasa Furuse, Naosuke Nonoguchi, Shinji Kawabata, Erina Yoritsune, Masatsugu Takahashi, Taisuke Inomata, Toshihiko Kuroiwa and Shin-Ichi Miyatake

Bevacizumab Treatment for

Jpn J Clin Oncol. 2013 Mar;43(3):337-41.

- 6) Boron neutron capture therapy for recurrent high-grade meningiomas.

Kawabata S, Hiramatsu R, Kuroiwa T, Ono K, Miyatake SI.

J Neurosurg. 2013 Oct;119(4):837-44.

- 7) Identification of early and distinct glioblastoma response patterns treated

by boron neutron capture therapy not predicted by standard radiographic assessment using functional diffusion map.

Hiramatsu R, Kawabata S, Furuse M, Miyatake S, Kuroiwa T.

Radiat Oncol. 2013 Aug 1;8(1):192

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 宮武伸一、他 16 名：「症候性脳放射線壊死の核医学的診断とベバシズマブの静脈内投与による治療」薬事承認を目指した多施設共同研究、第 3 項先進医療 JASTRO 2013 2013 年 10 月 20 日、青森
- 2) 宮武伸一：症候性脳放射線壊死に対する診断と治療 第 72 回日本医学放射線学会総会 教育講演、2013 年 4 月 12 日、横浜
- 3) 宮武伸一：悪性脳腫瘍に対するホウ素中性子捕捉療法の現状と未来第 31 回日本脳腫瘍学会 2013 年 12 月 9 日、宮崎
- 4) 宮武伸一、他 16 名：薬事承認を目指した多施設共同研究、第 3 項先進医療「症候性脳放射線壊死の核医学的診断とベバシズマブの静脈内投与による治療」日本脳神経外科学会 第 72 回学術総会シンポジウム 2013 年 10 月 18 日、横浜
- 5) Miyatake S: Bevacizumab for progressive radiation necrosis with the nuclear medicine diagnosis: institutional results and ongoing nation-wide clinical trial SNO meeting 2013 年 11 月 23 日, San Fransisco

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮武 伸一 (MIYATAKE Shin-Ichi )  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：9 0 2 0 9 9 1 6

### (2) 研究分担者

川端 信司 (KAWABATA Shinji )  
大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20340549

道上 宏之 (MICHIE Hiroyuki )  
岡山大学・医歯薬総合研究科・助教  
研究者番号：20572499

黒岩 敏彦 (KUROIWA Toshihiko )  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30178115

梶本 宜永 (KAJIMOTO Yoshinaga)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：30224413

切畑 光統 (KIRIHATA Mitsunori)

大阪府立大学・21世紀科学研究機構・教授

研究者番号：60128767

増永 慎一郎 (MASUNAGA Shin-Ichirou)

京都大学・原子炉実験所・教授

研究者番号：80238914

小野 公二 (ONO Koji)

京都大学・原子炉実験所・教授

研究者番号：90122407