

令和元年6月28日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04909

研究課題名(和文) 神経系腫瘍幹細胞を標的とした重粒子線と抗VEGF抗体併用の有効性

研究課題名(英文) Effective combination of heavy ion beams and anti-VEGF antibody by targeting neural tumor stem cells

研究代表者

長谷川 正俊 (Hasegawa, Masatoshi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50251111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：難治性神経系腫瘍に対する放射線，特に重粒子線，抗VEGF抗体の抗腫瘍効果，併用効果について幹細胞を含めて検討を行った．in vitroのグリオーマ細胞からのVEGF分泌は照射後の残存細胞でも同様で，抗VEGF抗体による細胞生存率への有意な影響も認めなかった．in vivoの上皮芽腫では抗VEGF抗体単独投与による有意な増殖遅延は認めなかったが，炭素線では増殖遅延を認めた．対照群は小型のCD133弱陽性，Nestin陽性の細胞が主体だったが，縮小した腫瘍では，大型のCD133強陽性，Nestin強陽性の細胞の残存を認めた．抗VEGF抗体と炭素線の併用効果についてはさらに詳細な検討が必要であった．

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性の神経系脳腫瘍の治療抵抗性を再確認した上で、最近注目されている高LETの重粒子線(炭素イオン線)治療、分子標的治療のひとつである抗VEGF抗体(ベバシズマブ)、そしてこれらの併用療法について、その有用性を培養細胞レベルとマウスの組織レベルで検討したが、現状の臨床とほぼ同様の結果で、併用療法の有意な有用性を明確にすることはできなかった。神経系腫瘍幹細胞の関与とそれを標的とした治療の有用性についても検討したが、臨床における有用性を積極的に示唆することまではできず、この難治性腫瘍に対する研究と対策の更なる促進が必要なことが示された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the efficacy of the combination of X-ray or high-LET carbon ion beams and anti-VEGF antibody for high grade neural or glial tumors, in vitro and in vivo studies were performed. In vitro study: VEGF was constantly secreted from glioma cells (U251) and radiation had a little influence on the secretion of VEGF by residual glioma cells even after 1-4 Gy irradiation. Glioma cell proliferation was not suppressed by anti-VEGF antibody (bevacizumab) alone. In vivo study: tumor growth delay was induced by carbon ion beam irradiation, but not evident by anti-VEGF antibody (bevacizumab) alone. Residual tumor cells after carbon ion irradiation were relatively larger than no-treated cells and intensely CD133-positive.

研究分野：放射線医学、放射線腫瘍学

キーワード：神経系腫瘍 幹細胞 CD133 Nestin 抗VEGF抗体 重粒子線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性神経膠腫は難治性で、特に膠芽腫においては、現在、最も有効な治療とされている標準治療(手術で可能な限り摘出後、アルキル化剤のテモゾロミド併用の放射線治療)を実施しても、生存期間の中央値が2年未満と非常に予後不良である。近年、抗血管内皮細胞増殖因子(抗 VEGF)抗体の膠芽腫に対する有効性(無増悪生存期間の延長)が報告され保険適応となっているが、主要な臨床試験では有意な全生存期間の延長は認めていない。作用機序でも、血管系、間葉系への関与、種々の遺伝子発現を介する抗腫瘍効果、腫瘍からの VEGF 分泌の制御による抗腫瘍効果等の可能性が示唆されているが、詳細はまだ明らかでない。

(2) 高線エネルギー付与(高 LET)の炭素イオン線に代表される重粒子線治療は、多くの難治性悪性腫瘍に対して有用とされているが、神経膠腫に対しては、標準的に使用されている X 線治療と比較して有効性はまだ明らかになっていない。

(3) 多くの悪性腫瘍の治療抵抗性には癌幹細胞の関与が示唆されるようになり、神経系腫瘍、特に悪性神経膠腫においてもいわゆるグリオーマ幹細胞を標的とした治療法の確立が注目され、いろいろな検討が試みられているが、実際の臨床ではまだほとんど成果が上がっていない。

2. 研究の目的

(1) まず *in vitro* において、悪性神経膠腫細胞からの VEGF 分泌状況を確認すること、そしてそれに対する放射線の影響、抗 VEGF 抗体の影響等も明らかにすること、さらに抗 VEGF 抗体単独での *in vitro* における細胞生存への影響についても検討を行うことである。

(2) 次に *in vivo* において、難治性の悪性神経膠腫に対する有効な治療法の確立へ発展させることを目指して、放射線、特に高 LET の重粒子線治療と抗 VEGF 抗体の悪性神経膠腫に対する抗腫瘍効果を検討し、さらにこれらの併用効果について、グリオーマ幹細胞への関与を含めて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* における神経膠細胞の VEGF 分泌に対する X 線照射、抗 VEGF 抗体の影響：

in vitro でグリオーマ培養細胞(U-251 MG)について、VEGF 分泌の時間経過：X 線照射(150 kV, Hitachi)を行い、1, 2, 4Gy 照射後の day1 ~ day3 に上清を回収し、VEGF 濃度を ELISA で測定して、腫瘍細胞から分泌される VEGF 濃度の検討、mRNA の検討を行った。次に抗 VEGF 抗体(Ab00715-10.3, ABA)による腫瘍細胞の増殖抑制(生存率への影響)について検討した。

(2) *in vivo* における神経系腫瘍に対する重粒子線、抗 VEGF 抗体の影響：

p53 野生型の上衣芽腫および p53 変異型の膠芽腫をヌードマウス皮下に移植して、実験を行った。特に上衣芽腫については以下のような検討を行い、膠芽腫についての同様の検討の一部を実施した。：抗 VEGF 抗体 Bevacizumab (Chugai) 20mg/kg、：炭素イオン線(290MeV/u, 6 cm-SOBP, 放射線医学総合研究所), 2Gy, 16Gy の 1 回照射、：及び の併用を行ない、以下の検討を行った。1) 週 1 回腫瘍径を測定し、換算腫瘍体積を算出して治療後の増殖遅延(6週間まで)を検討、2) 照射から、6時間、48時間、6週間後に腫瘍を摘出して、フォルマリン固定、パラフィン包埋切片を作成し、H.E.染色、および CD133, CD44, Nestin, p53, Ki-67, GFAP 等の免疫組織化学を実施、3) 照射後6時間、48時間、6週間後の組織から(RNA 安定液内で一時保存後) DNA アレイ解析用に RNA を抽出。

4. 研究成果

(1) *in vitro*：X 線照射後の VEGF 濃度、mRNA の変化では、1)グリオーマ細胞(U-251 MG)は恒常的に VEGF を分泌していることが示され(図 1, 2)、2)放射線照射後でも、残存細胞における VEGF 分泌能力にはほとんど影響が無く(図 3, 4)、3)(VEGF の)mRNA の定量でも転写量に X 線照射の影響はほとんど認めず(図 5)、4)抗 VEGF 抗体による有意な増殖抑制、細胞生存率への影響は認められなかった(図 6)。

(2) *in vivo*：上衣芽腫において、抗 VEGF 抗体単独投与後では腫瘍間で変動の差が大きく、有意な増殖遅延は認められなかった(図 7)。炭素イオン線単独では、16Gy 照射後には顕著な増殖遅延を認め、2Gy 照射後では軽度の増殖遅延を認めた。非治療対照群の腫瘍は比較的小型の CD133 弱陽性、Nestin 陽性の細胞が主体であったが、有意に縮小した腫瘍では、比較的大型の CD133 強陽性、Nestin 強陽性の細胞の残存が認められた(図 8)。ただし、再増大した腫瘍では、対照群同様、比較的小型の CD133 弱陽性、Nestin 陽性の細胞が主体であった。抗 VEGF 抗体と炭素イオン線 2Gy の併用による炭素イオン線の効果の増強については、相加効果の可能性も一応

示唆されたが有意な結果とは言えず，さらに詳細な検討が必要と思われた．

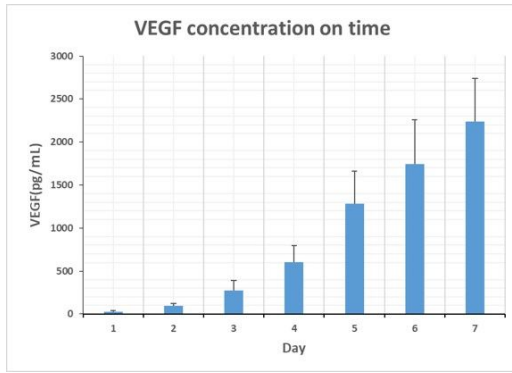


図 1 . VEGF 濃度の時間推移

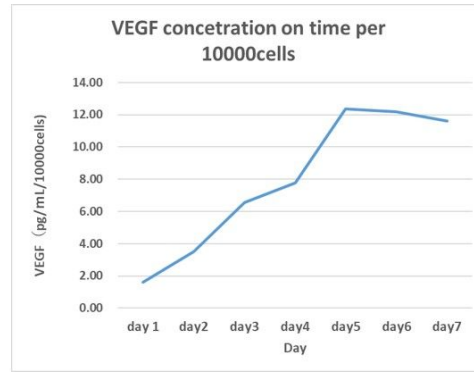


図 2 . VEGF 濃度の時間推移/細胞 10^4 個

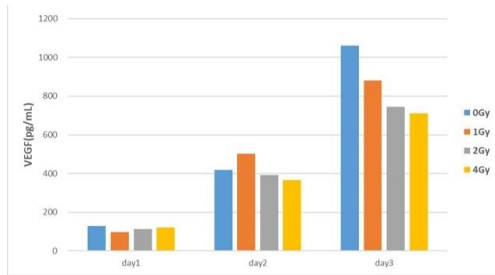


図 3 . 0-4Gy 後 1-3 日の VEGF 濃度

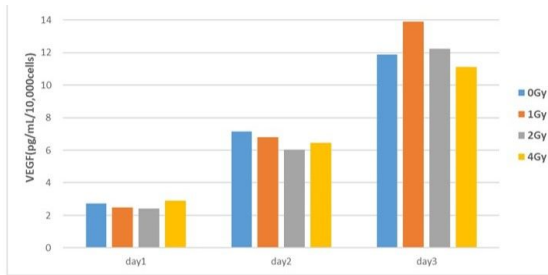


図 4 . 0-4Gy 後 1-3 日の VEGF 濃度/細胞 10^4 個

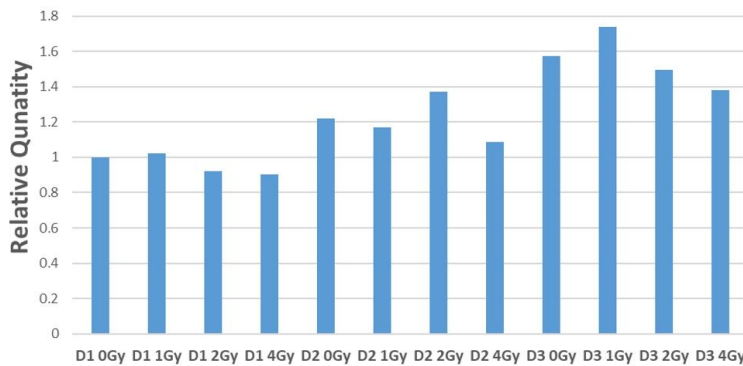


図 5 . 0-4Gy 照射後 1-3 日の VEGF mRNA

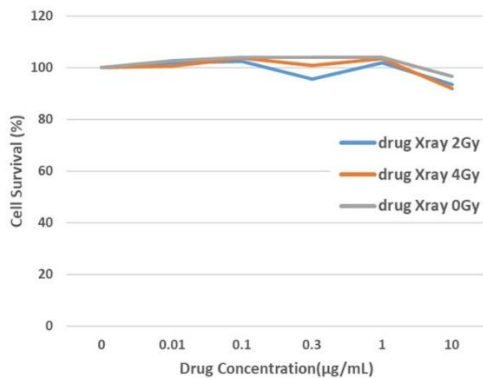


図 6 . 抗 VEGF および 0-4Gy 後の細胞生存率

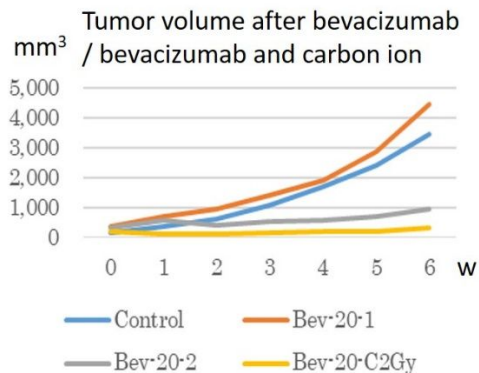


図 7 . 抗 VEGF 抗体/炭素イオン線後の体積

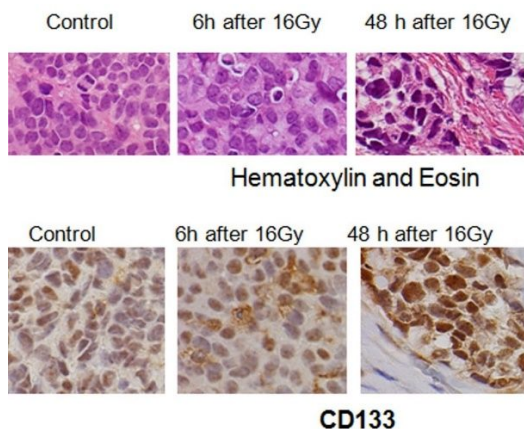


図8 . 炭素イオン線 16Gy 照射後の H.E. 染色 , 抗 CD133 染色

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Nakagawa Y, Kajihara A, Takahashi A, Murata AS, Matsubayashi M, Ito SS, Ota I, Nakagawa T, Hasegawa M, Kirita T, Ohnishi T, Mori E. BRCA2 protects mammalian cells from heat shock. *Int J Hyperthermia*. 2018 Sep;34(6):795-801.

Yoshimine T, Fujitani N, Ikeguchi T, Iwami H, Matsuda R, Tamamoto T, Morimoto Y, Hasegawa M. Is the linear-quadratic model appropriate for stereotactic irradiation of metastatic brain tumors? *J. Nara Med. Ass*. 2018; 69(1,2,3):9-15.

Tanaka N, Torimoto K, Asakawa I, Miyake M, Anai S, Nakai Y, Fujii T, Hasegawa M, Fujimoto K. Comparison of chronological changes in urinary function in patients who underwent low-dose-rate brachytherapy for prostate cancer-A randomized controlled trial of alpha-1 adrenoceptor antagonist alone versus combination with cyclooxygenase-2 inhibitor. *Brachytherapy*. 2018 May-Jun;17(3):537-543.

Matsui TK, Matsubayashi M, Sakaguchi YM, Hayashi RK, Zheng C, Sugie K, Hasegawa M, Nakagawa T, Mori E. Six-month cultured cerebral organoids from human ES cells contain matured neural cells. *Neurosci Lett*. 2018 Mar 23;670:75-82.

Inoue K, Hontsu S, Miura S, Asakawa I, Tamamoto T, Yoshimine T, Kimura H, Hasegawa M. Feasibility and efficacy of definitive radiotherapy of 66 Gy with concurrent carboplatin-paclitaxel chemotherapy for stage non-small cell lung cancer. *J Nara Med Ass*. 2018; 69(1,2,3):9-15.

Nakahara R, Ishii K, Wakai N, Kawamorita R, Okada W, Kishimoto S, Kubo K, Nakajima T, Hasegawa M. Dosimetric Comparison between Bone and Target Matching Considering Interfractional Prostate Motion in Volumetric Modulated Arc Therapy. *Int J Med Phys Clin Eng Radiat Oncol*. 2018 Feb;7(1).

Tanaka N, Asakawa I, Nakai Y, Miyake M, Anai S, Fujii T, Hasegawa M, Konishi N, Fujimoto K. Comparison of PSA value at last follow-up of patients who underwent low-dose rate brachytherapy and intensity-modulated radiation therapy for prostate cancer. *BMC Cancer*. 2017 Aug 25;17(1):573.

Yamaguchi M, Suzuki R, Oguchi M, Asano N, Amaki J, Akiba T, Maeda T, Itasaka S, Kubota N, Saito Y, Kobayashi Y, Itami J, Ueda K, Miyazaki K, Ii N, Tomita N, Sekiguchi N, Takizawa J, Saito B, Murayama T, Ando T, Wada H, Hyo R, Ejima Y, Hasegawa M,

Katayama N. Treatments and Outcomes of Patients With Extranodal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Diagnosed Between 2000 and 2013: A Cooperative Study in Japan. *J Clin Oncol.* 2017 Jan;35(1):32-39.

Takahashi A, Mori E, Nakagawa Y, Kajihara A, Kirita T, Pittman DL, Hasegawa M, Ohnishi T. Homologous recombination preferentially repairs heat-induced DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Int J Hyperthermia.* 2016 Nov 13:1-7.

Mori E, Davis AJ, Hasegawa M, Chen DJ. Lysines 3241 and 3260 of DNA-PKcs are important for genomic stability and radioresistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Aug 19;477(2):235-40.

Kondo N, Sakurai Y, Hirota Y, Tanaka H, Watanabe T, Nakagawa Y, Narabayashi M, Kinashi Y, Miyatake S, Hasegawa M, Suzuki M, Masunaga S, Ohnishi T, Ono K. DNA damage induced by boron neutron capture therapy is partially repaired by DNA ligase IV. *Radiat Environ Biophys.* 2016 Mar;55(1):89-94.

Akatori T, Sho M, Kinoshita S, Nagai M, Nishiwada S, Tanaka T, Tamamoto T, Ohbayashi C, Hasegawa M, Kichikawa K, Nakajima Y. Prognostic Significance of Muscle Attenuation in Pancreatic Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *World J Surg.* 2015 Dec;39(12):2975-82.

Wakai N, Sumida I, Otani Y, Suzuki O, Seo Y, Isohashi F, Yoshioka Y, Hasegawa M, Ogawa K. Optimization of leaf margins for lung stereotactic body radiotherapy using a flattening filter-free beam. *Med Phys.* 2015 May;42(5):2125-31.

Sho M, Akatori T, Tanaka T, Kinoshita S, Nagai M, Tamamoto T, Ohbayashi C, Hasegawa M, Kichikawa K, Nakajima Y. Importance of resectability status in neoadjuvant treatment for pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2015 Jul;22(7):563-70.

〔学会発表〕(計 3 件)

Hasegawa M, Fujitani N, Miura S, Yamaki K, Shimoda E, Inoue K, Wakai N, Ohno T, Wakatsuki M, Murakami T: Effect of Heavy Ion Beams on Cancer Stem-like Cells in Human Ependymoblastoma. The 7th International Society of Radiation Neurobiology Conference (ISRN 2017), Yuzawa, Niigata, Japan, 2017.2.

Hasegawa M, Fujitani N, Wakai N, Inoue K, Shimoda E, Inoue M, Matsui Y, Asakawa I, Takeda M, Wakatsuki M, Murakami T: Growth Arrest and Cancer Stem Cell Marker Expression Following High-Dose X-ray or Carbon Ion Beam Irradiation. ASTRO 57th Annual meeting, San Antonio, 2015.11.

Hasegawa M, Fujitani N, Shimoda E, Inoue K, Wakai N, Morimoto M, Asakawa I, Tamamoto T, Wakatsuki M: Cancer Stem Cell Markers and Growth Fractions in Human Brain Tumor Following Heavy Ion Irradiation. ICRR 2015, Kyoto, 2015.5.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大野達也

ローマ字氏名：(Tatsuya Ohno)

所属研究機関名：群馬大学
部局名：重粒子線医学推進機構
職名：教授
研究者番号（8桁）：10344061

研究分担者氏名：若月 優
ローマ字氏名：(Masaru Wakatsuki)
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：40399449

研究分担者氏名：下田絵美子
ローマ字氏名：(Emiko Shimoda)
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：附属病院
職名：研究員
研究者番号（8桁）：00596950

研究分担者氏名：井上和也
ローマ字氏名：(Kazuya Inoue)
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：附属病院
職名：研究員
研究者番号（8桁）：20596952

研究分担者氏名：若井展英
ローマ字氏名：(Nobuhide Wakai)
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：50745338

研究分担者氏名：三浦幸子
ローマ字氏名：(Sachiko Miura)
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：60597095

研究分担者氏名：八巻香織
ローマ字氏名：(Kaori Yamaki)
所属研究機関名：奈良県立医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：50789881

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森 英一朗
ローマ字氏名：(Eiichiro Mori)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。