

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19977

研究課題名(和文) 低酸素領域における神経膠芽腫幹細胞挙動解析及び治療関連遺伝子発現の検討

研究課題名(英文) The analysis of expression of treatment-related genes and glioma stem cells in the hypoxic region of glioblastoma.

研究代表者

大竹 誠 (OHTAKE, Makoto)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号：70644607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍の中で最も予後の悪い神経膠芽腫の治療抵抗性の要因として、低酸素環境の関与が挙げられる。申請者は世界に先駆けてCu-ATSM PETを用いた神経膠芽腫内低酸素領域の可視化に成功した。Cu-ATSM PETで同定される低酸素領域に治療抵抗因子の発現が多いことが分かれば、現在の標準治療である正常脳を含めた拡大切除/放射線照射ではなく、低酸素領域をターゲットとしたより安全で標的性を高めた治療が可能となる。本研究ではCu-ATSM PETで同定した低酸素領域の組織を手術で採取し、組織検討と遺伝子解析を行った。さらに、Cu-ATSM高集積領域をターゲットとした治療法についての検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is the most common and most aggressive tumor in adults. One of the factors of treatment resistance is the existence of hypoxic regions located in the tumor. Cu-ATSM (Cu-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)) was developed as a hypoxic tracer in PET. Our previous reports revealed a relationship between Cu-ATSM uptake and hypoxic marker expression. If the treatment resistant factors are mainly existed in the hypoxic regions of glioblastoma, the safe treatment targeted the hypoxic regions such as stereotactic strategy becomes possible. In this study, we took the hypoxic tissue at the surgery, and performed immunopathological examinations and gene analysis. Moreover, we examined the target therapy for Cu-ATSM high uptake regions. Now we follow up the clinical course and examine the relationship of tissue status and clinical outcome.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：神経膠芽腫 低酸素領域 CuATSM 幹細胞 MGMT遺伝子

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫 (Glioblastoma:GB) は原発性悪性脳腫瘍の中でも 5 年生存率が 10%に満たない極めて予後不良な疾患である。標準的治療として外科治療に加え放射線及び Temozolomide (TMZ) を用いた化学療法が挙げられるが平均生存期間は 14.6 ヶ月と非常に悪く、予後の劇的な改善には至っていないのが現状である。GB の特徴的組織所見である壊死像には低酸素環境の関与が注目されており、組織内低酸素領域の存在が治療抵抗性、予後に影響を与えることが示唆されている。

[^{62,64}Cu]copper (II)-diacetyl

bis(N4-methylthio-semicarbazone)

(Cu-ATSM)は低酸素状態にのみ滞留性を示す銅キレート錯体として開発されたプローブである。Cu-ATSM PET は、これまで不明瞭にしか描出することのできなかった低酸素領域を、より鮮明に描出することを可能にした新しい腫瘍内低酸素イメージング法である。我々は Cu-ATSM PET 画像を手術に応用した臨床研究を継続しており、Cu-ATSM が GB の造営領域に有意に集積し、さらには低酸素マーカーである Hypoxia Inducible Factor -1 α (HIF-1 α) 発現領域と高く相関することを見出した (Tateishi K, Ohtake M et al. AJNR Am J Neuroradiol. 2014; 35(2): 278-84)。この研究結果により、我々が用いている Cu-ATSM PET が臨床的にも GB の低酸素領域を正確に同定していることが証明された。

大腸癌における研究にて Cu-ATSM 集積亢進領域に CD133 陽性細胞が高頻度に発現することが報告されている。Cu-ATSM PET 研究により、GB の低酸素領域分布の解析のみならず、低酸素領域内の腫瘍幹細胞 (幹細胞マーカー CD133 陽性細胞の局在検討) の存在や、化学療法抵抗要因とされる O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 発現を検討することで、神経膠芽腫の治療抵抗要因の解明が可能になると思われる。

2. 研究の目的

Cu-ATSM PET を用いて神経膠芽腫腫瘍内の低酸素領域を描出し、術中に低酸素領域の腫瘍組織を採取、治療抵抗因子とされる腫瘍幹細胞の分布と MGMT 発現を解析することで、GB の治療抵抗性メカニズムを解明することを目的とする (図 1)。

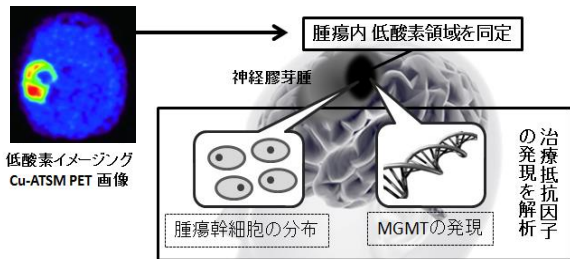


図 1 実験計画

3. 研究の方法

GB 患者において Cu-ATSM PET を用いて低酸素領域を同定し、集積亢進を呈する領域の組織を採取する。比較対象として、非低酸素領域の腫瘍組織も採取し、同様の検討を行う。採取した低酸素領域の組織における CD133 陽性細胞の分布を免疫組織学検査、フローサイトメトリーを用いて解析することで、腫瘍幹細胞との関連性を検討する。化学療法抵抗性について検討するために、Methylation-Specific PCR を用いて MGMT 発現を解析する。さらに、解析結果と無増悪生存期間、全生存期間の関連を検討することで、臨床経過や予後との相関を確認する (図 2)。

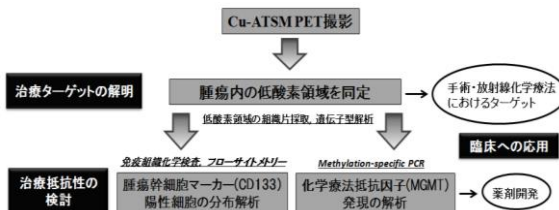


図 2 研究の方向性

(1) GB 症例の抽出

術前造影 MRI で GB が疑われる症例について以下の画像検査を行う。画像診断及び手術の

精度向上を図る為に 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose (FDG) 並びに L-methyl[¹¹C]methionine (MET) の 2 probe を用いた PET を施行し半定量的解析 (Standardized Uptake Value max:SUV max, Tumor normal ratio:T/N) を図る。これらの情報を Neuronavigation 上で統合することで、手術時の正確なサンプリングに活用する。術前に Cu-ATSM PET 撮影を施行し、PET 画像の収集条件として 30 分間の dynamic 収集を行い収集中心時間として 10, 15, 30 分の画像を構成し、SUVmax, T/N をもとに関心領域に抽出する。この関心領域をサンプリングの目標部位とする。

(2) 低酸素領域組織片採取

精度の高いサンプリングを行うための方法として、Neuro-navigation system を用いた定位的サンプリング法を活用する。具体的方法として手術前日に Neuro-navigation の基準画像である T1 造影 MRI 画像を取得し、Neuro-navigation (Stealth station tria plus ver5.0, Medtronic) 上にて PET 画像と統合し、目標病変を MRI 上に統合する。Neuro-navigation 専用の生検キットを用いて、ターゲットとして設定された病変を定位的にサンプリングする。比較検討のため Cu-ATSM 非集積領域の組織片も採取する。

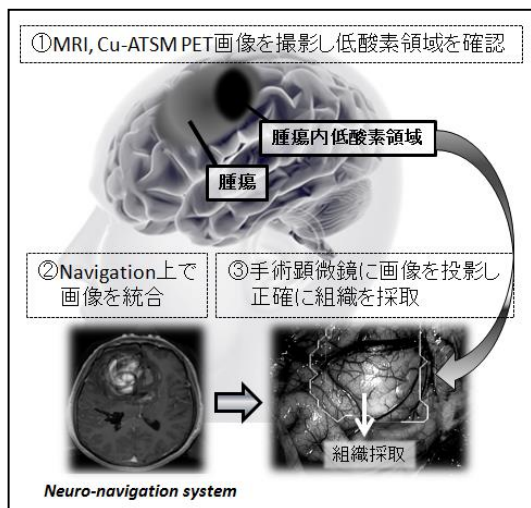


図 3 組織採取方法

(3) CD133, MGMT 発現の検討

免疫組織化学検査

採取された組織検体を paraffin 包埋後 5 μm 厚で薄切切片を作成する。CSA 法による酵素抗体法にて抗原抗体反応の可視化を図る。本研究で用いる一次抗体は低酸素分布の評価に対し HIF-1 α 抗体 (1:50 rabbit anti-HIF-1 α (Santa Cruz Biotechnology))、腫瘍幹細胞マーカーとして CD133 抗体 (1:50 human anti-CD133 (Miltenyi Biotec)) を用いる。Hematoxylin を用いた核染色にて counter 染色を行い顕微鏡にて観察する。

Methylation-Specific PCR を用いた MGMT 遺伝子 promoter 領域のメチル化解析

各領域別の凍結切片を用いて DNA を抽出後 (DNeasy: Qiagen)、bisulfite 処理 (Epitect Bisulfite Kit: Qiagen) を行う。PCR 後電気泳動にて増幅産物の確認を行い、メチル化の有無について解析する。

(4) 低酸素領域を標的とした治療法の検討

Cu-ATSM 集積部位に対する治療法について検討を行う。手術方法や放射線治療 (IMRT) における Cu-ATSM 高集積部位への対応、同領域への薬剤局所注入など、Cu-ATSM 高集積部位をターゲットとした治療方法を具体的に検討する。

(5) 無増悪生存期間、全生存期間関連解析

CD133 陽性細胞発現ならびに MGMT 発現と、無増悪生存期間、全生存期間との関連を Kaplan-Meier 曲線を基に log-rank 法を用いて解析する。更に継続的に MRI 検査を行うことで再発病変を評価する。再発時に再度 Cu-ATSM PET を行うことで、低酸素領域と再発部位の関連性を検討する。

4. 研究成果

(1) ⁶⁴Cu-ATSM PET の毒性検討

平成 27, 28 年度では放射線医学総合研究

所の配給の関係でこれまでの ^{62}Cu -ATSM から ^{64}Cu -ATSM へ急遽変更することとなった。 ^{64}Cu -ATSM の半減期は 12.7 時間であり、従来の ^{62}Cu -ATSM の約 10 分と比較して長い。しかし、その分投与量を少なくすることが可能であり、撮影時間も急を要する必要がなくなる。 ^{62}Cu -ATSM はその半減期の短さから、各施設で合成する必要があり十分な普及が見込めず、放射線医学総合研究所で検討された結果、合成後に配送可能な ^{64}Cu -ATSM を用いることとなった。各施設への配給の簡便さと、より応用がききやすいことが理由である。

一方、本邦では ^{64}Cu -ATSM の臨床応用は行われたことがなく、本大学での検討が本邦初となった。海外での使用例の詳細を確認した上で、本大学倫理委員会で臨床研究承認を得た。さらに、患者さんの同意の下、撮影前後の血液検査を含め、投与後バイタルの変化など、毒性検討も同時に行った。

平成 28 年度は計 4 回の撮影を行った。全例で投与後 1 週間の全身状態悪化はなく、脈拍、血圧、呼吸数、SpO₂ に異常は認めなかった。採血では白血球、赤血球、ヘモグロビン、血小板、肝機能 (GOT, GPT)、腎機能 (BUN, Creatinine)、AMY、 γ GTP、LDH その他多数の項目の検討を行ったが、いずれの項目も投与 1 時間後、翌日ともベースラインから変化は認めなかった。現在撮影後 1 年経過した症例もあるが、特に投与が理由と思われる全身状態の悪化は認めない。

(2) ^{64}Cu -ATSM PET 撮影症例について

術前造影 MRI で GB が疑われる症例でかつ FDG PET と Met PET を施行した症例を抽出し、術前の ^{64}Cu -ATSM PET 撮影を行った。これらの画像情報を Neuronavigation 上で統合し(図 4)、手術時に ^{64}Cu -ATSM 高集積部位と集積を認めない部位からそれぞれ組織の採取を行った。組織はホルマリン固定を行うとともに、All protect tissue reagent 内に保存した。

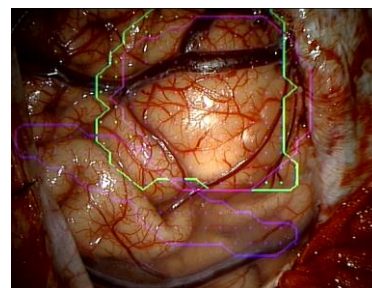


図 4
手術時の
統合画像

手術では全例 ^{64}Cu -ATSM 高集積部位は全摘出を行った。1 例 Anaplastic Oligodendroglioma の診断であったが、その他はすべて GB の診断であった。術後は標準治療であるテモゾロミド+拡大放射線治療を施行し、現在無増悪生存期間、全生存期間を観察中である(2017 年 5 月時点で自然経過での死亡例 1 例)。

なお、1 症例で ^{64}Cu -ATSM PET の可能性を示唆する結果を得ることができた。39 歳男性で小脳の GB 疑いに対して手術予定の方であるが、術前 ^{64}Cu -ATSM PET では、小脳の病変以外にテント上にも複数集積を認めた(図 5)。同病変は T2WI、FDG-PET、Met-PET のいずれも異常を認めていない。現段階では集積の理由は不明であるが、前がん状態としての低酸素化を示している可能性も否定できず、すでに化学療法と放射線療法を加えてはいるが、今後集積部位の他画像における変化についても注目して追跡したいと考えている。

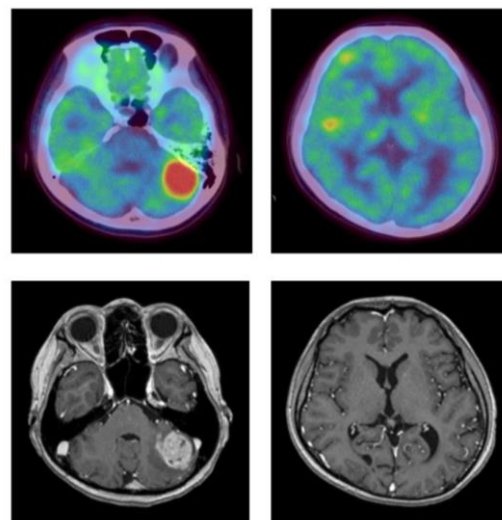


図 5 ^{64}Cu -ATSM PET(上)と造影 MRI(下)
左は小脳病変を示しているが、造影病変と一

致して Cu-ATSM の高集積を認める。右はレントン上の 1 スライスであるが、造影 MRI では異常は認めないが右前頭葉、島回に小さな Cu-ATSM 集積病変を認める。

(3) ^{64}Cu -ATSM 集積部位の免疫組織学的評価 今回の症例では全症例において GB に特徴的な GFAP、p53 が陽性であり、Ki67 陽性細胞は 14-30% と高値であった。HIF-1 α は Cu-ATSM 高集積部位において 3 例で陽性 ($\geq 20\%$) であり、1 例は一部陽性の結果であった。CD133 は 1 例で陽性、3 例は一部のみ陽性であった。Cu-ATSM の集積を認めない部位については、HIF-1 α 陽性は 1 例のみであり、過去の結果とも矛盾しない結論であった。現在メチル化解析を進めている。

(4) Cu-ATSM 集積領域をターゲットとした治療法の検討

本研究は倫理申請書類の変更に伴い平成 27 年度後半に開始時期が遅れてしまったため、平成 29-30 年度に施行する予定であった「Cu-ATSM 集積部位を target とした治療法」についての検討を先行して行った。Cu-ATSM PET の臨床への応用として、生検時もしくは全摘出困難な腫瘍の部分摘出時は術後の治療感受性を考え、治療抵抗性の高い部位の摘出が求められるが、そのターゲットを Cu-ATSM 集積亢進領域にすることが挙げられる。また、Cu-ATSM 集積亢進領域を高線量とする強度変調放射線治療 (IMRT)、同領域をターゲットとした局所化学温熱療法の開発などが挙げられる。

本大学で検討を進めている新規抗がん剤である Fe (Salen) は脳腫瘍局所に注入する薬剤であり局所治療が可能である。Fe (Salen) は、抗がん活性を持ちなおかつ磁性を持つため、交流磁場を印加することで熱を発する特徴を持つ。そのため、Fe (Salen) は 1 剤で「抗がん作用 + 温熱作用」の 2 つの効果を同時に

期待できる。

今回神経膠芽腫細胞株を用いて作成したマウスの臀部腫瘍モデルに対して Fe (Salen) を局所注入し、腫瘍の退縮率を検討した。当初はマウス臀部を Cu-ATSM PET で撮影し、高集積部位に薬剤を注入する予定であったが撮影機器の関係で今回は不可能であったため、腫瘍中心部への注入という形で検討を行った。結果として、Fe (Salen) 群では既存の抗がん剤であるギリアデル (BCNU) と同程度まで腫瘍が縮小し、交流磁場 (AMF) 印加を加えるとより腫瘍が縮小する結果を得ることができた (図 6)。

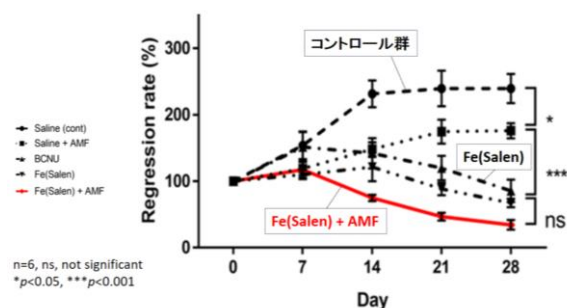


図 6 交流磁場印加による腫瘍退縮率

以上より、Fe (Salen) を用いた局所治療は神経膠芽腫に対する効果を期待できることが判明した。腫瘍内の注入箇所をどこにすべきか検討する上で、治療抵抗因子が集簇している可能性の高い Cu-ATSM 高集積領域が非常に重要である。今後は Cu-ATSM 高集積領域における治療抵抗因子について引き続き検討を続けるとともに、Cu-ATSM 高集積部位を標的とした治療方法の検討を進め、かつ新規薬剤の開発と繋げていきたいと考える。

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 1 件)

Ohtake M, Umemura M, Sato I, Akimoto T, Oda K, Nagasako A, Kim J-H, Fujita T, Yokohama U, Nakayama T, Hoshino U, Ishiba M, Tokura S, Hara M, Muramoto T, Tamada S, Masuda T, Aoki I, Takemura Y, Murata H, Eguchi H, Kawahara N, Ishikawa Y. Hyperthermia and chemotherapy using Fe(Salen) nanoparticles might impact glioblastoma treatment. *Scientific Reports*, 2017, 7, 42783. 査読有

[学会発表] (計4件)

大竹 誠、梅村 将就、秋本 大輔、江口 晴樹、石川 義弘、川原 信隆：神経膠芽腫に対する有機磁性体化合物を用いた化学温熱同時療法。第75回日本脳神経外科学術集会総会，福岡，2016年，9月。

大竹 誠、梅村 将就、佐藤 格、秋本 大輔、江口 晴樹、石川 義弘、川原 信隆：有機磁性体化合物による神経膠芽腫に対する化学温熱同時療法の開発。第74回日本脳神経外科学術集会総会，福岡，2015年，10月。

Ohtake M, Umemura M, Sato I, Oda K, Akimoto T, Nagasako A, Eguchi H, Kawahara N and Ishikawa Y: Simultaneous hyperthermic-chemotherapy using a single anti-cancer compound with intrinsic magnetism in glioblastoma animal model. The 18th European Cancer Congress, Vienna, 2015, 9.

Ohtake M, Umemura M, Sato I, Oda K, Nagasako A, Makino A, Aoyama H, Katsumata M, Eguchi H, Kawahara N and Ishikawa Y: Simultaneous hyperthermic-chemotherapy for glioblastoma using a single anti-cancer compound with intrinsic magnetism. The 106 American Association

for Cancer Research Annual meeting, Philadelphia, 2015, 4.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

特記すべきものなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大竹 誠 (OHTAKE, Makoto)

横浜市立大学・附属病院・指導診療医

研究者番号 70644607

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

川原 信隆 (KAWAHARA, Nobutaka)

村田 英俊 (MURATA, Hidetoshi)

梅村 将就 (UMEMURA, Masanari)