

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10911

研究課題名(和文) 分子標的時代における放射線壊死の病態解明と新規診断・新規治療への挑戦

研究課題名(英文) Novel diagnostic examination and treatment of radiation necrosis based on molecular pathological mechanism

研究代表者

古瀬 元雅 (Furuse, Motomasa)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70340560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いて放射線壊死のモデルを作成し、分子機構解明を行った。照射7カ月後で放射線壊死は最盛期となり、mRNAおよびmiRNAのマイクロアレイ解析にて多くの炎症・免疫反応に関わるgene pathwayで有意な発現変動を認めた。放射線壊死の診断に関しては、システムティックレビューを行い、既存の画像診断の診断精度を検討した。原疾患がグリオーマと放射線壊死では診断精度が異なり、形態、代謝、血流をより反映するよう画像検査を複合的に診断することが診断精度向上につながる事が判明した。放射線壊死に対するペバシズマブ治療では、5mg/kgの3回投与でも一定の治療効果が期待でき、さらに検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法、分子標的治療、免疫療法および新規放射線治療などががん治療の研究が進む一方で、生じうる合併症を克服する取り組みも重要である。脳腫瘍治療において放射線治療は不可欠であり、その有害事象の改善なくして放射線治療の進歩はないと考える。放射線壊死の予防、診断、治療を可能とするためにはその病態メカニズムを明らかにすることが必要である。放射線壊死の動物モデルの作成は困難であり、多くの施設で試みられているが確実な方法がない。また診断方法においてもどの画像診断が有用かも十分明らかになっておらず、治療においてはエビデンスのある治療はない。本研究の成果はこれらの問題点に対して解決の一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：Radiation necrosis was made in rat by linear accelerator and was more obvious 7 months after irradiation. In microarray analysis for mRNA and miRNA, differential expression was frequently observed in gene pathway for inflammatory and immune system. Systematic review of radiological diagnosis for radiation necrosis was performed to elucidate the diagnostic accuracy of radiological examinations to distinguish radiation necrosis and tumor progression. The diagnostic odds ratio of radiological examinations were different between glioma and metastatic brain tumor. Combined multiparametric imaging including lesional metabolism and blood flow could enhance diagnostic accuracy, compared with a single imaging study. In treatment of radiation necrosis, three cycles of 5mg/kg bevacizumab could have a treatment effects of reducing perilesional edema.

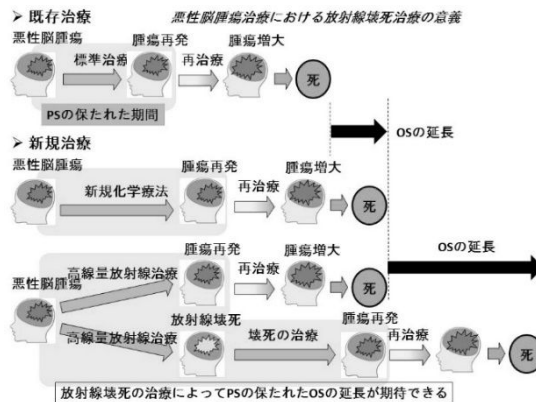
研究分野：脳神経外科学

キーワード：放射線壊死 血管新生 炎症 放射線画像診断 ペバシズマブ

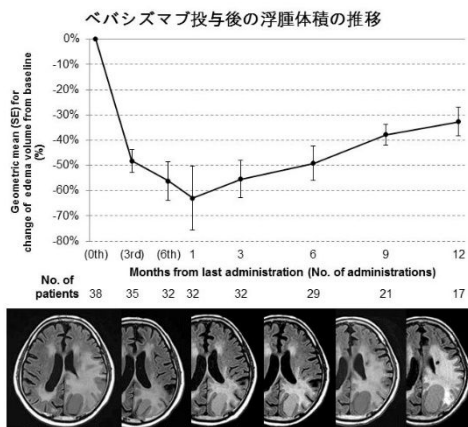
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍治療における放射線治療の役割は今なお重要である。脳血液関門の影響により、中枢神経系へ薬剤がデリバリーされないため、他臓器がんと比べ承認されている抗がん剤はかなり少ない。神経膠芽腫においても、テモゾロミドは放射線治療との併用が望ましく、単独で腫瘍を制御することは困難である。放射線治療では、定位照射、強度変調照射および粒子線など、局所に高線量を照射し、悪性脳腫瘍を制御することが試みられている。しかし、現時点では、高線量照射を行うと一定の確率で遅発性放射線障害である放射線壊死が生じることが報告されている。遅発性に生じる放射線壊死はしばしば患者のADL、QOLを低下させる。たとえ無増悪生存期間を延長したとしても、performance statusの低下した期間を延ばすことになれば、患者自身がそのメリットをどれだけ感じる事が出来るかは疑問である。新規化学療法の開発、新規放射線治療の開発と並んで、放射線壊死を治療することは、悪性脳腫瘍の予後を改善する重要な研究テーマである。

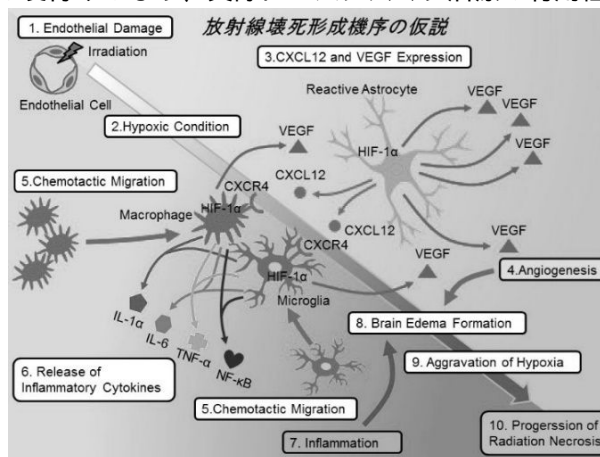


近年、放射線壊死の新規治療薬として血管新生阻害薬であるベバシズマブが注目を集めている。ベバシズマブは血管内皮増殖因子 (VEGF) のモノクローナル抗体であり、放射線壊死に合併する難治性の浮腫を改善する。2007年に米国でその有効性が報告されて以降、我々も自験例においてベバシズマブにより脳浮腫が軽減し、患者の performance status が改善することを報告した。その効果の普遍性を確認すべく、国内において多施設共同臨床試験を行った。ベバシズマブの投与後、早期に放射線壊死に伴う浮腫の軽減を認めた。しかし、その効果は永続的ではなく、約半年で浮腫の再燃を認めた。ベバシズマブによる浮腫の軽減は低酸素状態を悪化させるサイクルを遮断し、病態の進行予防に有用である。しかし、どの程度の投与量や投与回数でどの程度治療効果が持続するかは明らかとはなっていない。また、浮腫を軽減する効果はある意味では対処療法であり、放射線壊死に対する根本的な治療ではない。ベバシズマブ治療のさらなる至適投与方法を検討するとともに、放射線壊死を予防する一次治療を模索する必要があると考える。



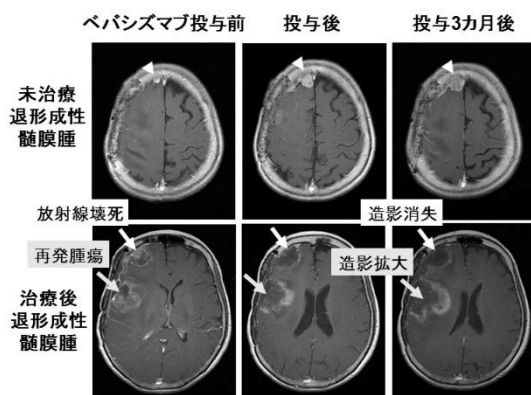
2. 研究の目的

今までの我々の臨床検体を用いた放射線壊死の病理学的検討では、壊死巣周辺に新生血管の増生を認め、VEGF の発現を認めた。このような分子生物学的病態解明は、放射線壊死の治療においても molecular target therapy 導入の裏付けとなり、実際にベバシズマブ治療の有用性が広く認識されることとなった。同時に HIF-1 の発現も認めており、VEGF 発現の key molecule である可能性が示唆される。その他 VEGF family である PDGF/PDGFR の関与や chemokine である CXCL12/CXCR4 の関与も認めた。血管新生と炎症に関与する分子の発現を認めているが、これらがどのように相互作用しているのかは不明である。関係性を明らかにするためには動物モデルによる放射線壊死形成の過程を観察する必要がある。早期に発現する key molecule を同定することが出来れば、分子標的薬による放射線壊死の予防的治療が可能となることが期待される。



放射線壊死の診断は MRI では困難なことも多く、われわれはアミノ酸 PET の有用性を報告してきた。しかしアミノ酸 PET は保険収載されておらず、多くの施設で簡便に行うことが困難である。我々は自験例にて髄膜腫、特に悪性髄膜腫の放射線壊死合併症例において、ベバシズマブ治療後変化より再発腫瘍と放射線壊死を鑑別できる可能性を認め報告した。ベバシズマブの治療後の MRI 変化を詳細に解析することで、

PET を行わずとも他の腫瘍に対しても放射線壊死を再発腫瘍と鑑別診断できる可能性がある。転移性脳腫瘍や悪性神経膠腫においても放射線壊死の診断が可能か否か、可能であれば MRI のどの parameter が放射線壊死に特異的かを明らかにする。ペバシズマブの治療効果については投与方法を変更し、検討する。当施設ではペバシズマブの放射線壊死への適応外使用は倫理委員会にて臨床試験として承認されている。臨床試験の症例を積み重ねて、適切な投与回数、投与量、また浮腫が再燃した際のペバシズマブの再治療の有効性などを検討し、ペバシズマブの至適投与方法を明らかにする。



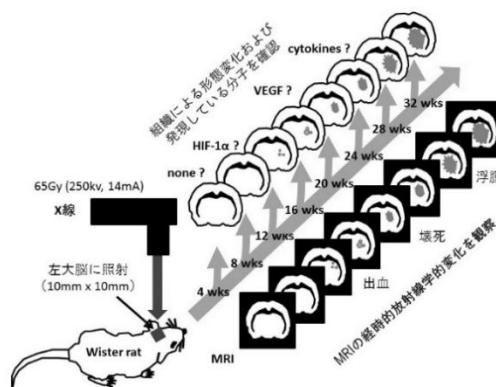
ペバシズマブ投与前、治療後髄膜腫は放射線壊死と再発腫瘍の区別がつかなかったが、ペバシズマブの投与後変化にて両者の鑑別が可能となった。

### 3. 研究の方法

本研究では3つの柱となるテーマを主体に基礎研究および臨床研究を行う。

#### (1) 動物モデルを用いた放射線壊死の分子機構の解明

Wister rat (Male, 8-10wks) の左大脳半球に X 線を用いて上下方向の 1 門照射を行う。照射は大阪府立大学獣医臨床センターのラジオフレックス 350 を用いて行う。照射範囲は 10mm x 10mm で、単回照射とし、照射線量は 65Gy (250kv, 14mA) とする。照射後 8 カ月までの間、1 カ月毎に rat を sacrifice し、組織を採取・病理標本を作製する。まずは HE 染色を行い、形態的病理変化を観察する。形態変化が出現している時期より HIF-1、VEGF、PDGF、PDGFR、CXCL12、CXCR4、IL-1、IL-6、TNF-、NF- B の免疫染色を行い、そのメカニズムを解明する。また、一部のラットは同時期に MRI 撮影を行い、放射線学的変化と病理学的変化の相関を観察する。



放射線壊死初期および最盛期において RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行う。増加している遺伝子を pathway 解析し、それぞれの時期における炎症や血管新生の病態形成への寄与を検討する。これらの解析を経て key molecule と思われる分子および遺伝子を同定する。

#### (2) ペバシズマブ治療前後の画像解析による放射線壊死新規診断法の検討

当施設の研究倫理委員会承認されている脳放射線壊死に対するペバシズマブ治療の臨床試験に登録された放射線壊死症例のペバシズマブ投与前および投与後早期の MRI 画像の解析を行う。解析するシークエンスは T2 強調像、FLAIR 像、拡散強調画像、造影 T1 強調像を用いる。また、可能な症例では同時期にメチオニン PET の撮影を追加して行う。PET の代替えとなる MRI の放射線壊死診断への可能性を検討する。

#### (3) 脳放射線壊死に対するペバシズマブの至適投与方法の検討

我々は今まで 5mg/kg の投与量を計 6 回投与する試みを行ってきた。今回は同量を 3 回投与で終了し、その後の浮腫の再燃までの期間を観察する。浮腫再燃を放射線壊死再発とし、再燃時に再度 3 回投与を行い、6 回投与を分割することでさらなる浮腫抑制効果の持続が得られるかを検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 動物モデルを用いた放射線壊死の分子機構の解明

1 ヶ月毎に 3 匹の Wister rat を sacrifice し、放射線壊死の形成を病理学的に確認したところ、照射後 5 カ月では 1 匹、6 カ月では 2 匹、7 カ月以降は全例で放射線壊死の形成を認められた。Kaplan-Meier 法にて放射線壊死の出現時期を検討すると、中央値 6.0 カ月 (95%CI, 5.5-6.7 カ月) であった。HE 染色では、壊死中心部に拡張した毛細血管を認め、その周辺には反応性のアストロサイトを認めた (図 1)。免疫染色では、HIF-1 および VEGF の発現を認めた (図 2)。

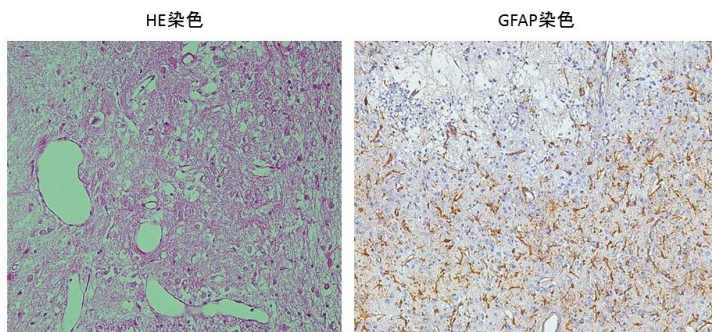


図1 壊死部に拡張した毛細血管と周囲にアストロサイトの増生を認めた



照射 7 カ月後の放射線壊死最盛期の組織を用いてマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイに spot されている、延べ 36,685 個の遺伝子のうち放射線壊死初期(照射 2 カ月後)と比較して BRN 最盛期(照射 7 カ月後)において有意な発現変動 ( $P < 0.01$ ) を示す遺伝子を 779 個 (2.1%) 認めた。これらの遺伝子に対して pathway 解析を施行した。NCBI の database に登録されている 20,717 の gene pathway のうち、Z-score が +1.0 以上を示し gene pathway に統計学的に有意な変化が生じていると判断されるものが 29 種類 (0.13%) 検出された。さらに miRNA のマイクロアレイ解析を行うと 17 種類の miRNA の有意な発現変動を認めた。network 解析を行うと炎症・免疫反応に関わるものが最も多かった。

また、今までの放射線壊死形成メカニズムの報告のレビューを行って投稿した(文献 1)。

## (2) ベバシズマブ治療前後の画像解析による放射線壊死新規診断法の検討

まず、放射線壊死に対する既存の画像検査においてどの検査が最も精度が高いか調べるためにシステマティックレビューを行った。放射線画像検査を CT や MRI を用いた汎用性の高い画像診断 (RQ1) と SPECT や PET などの核医学的画像診断 (RQ2) に分けてレビューを行った(文献 2)。データベースとして Pubmed、Cochrane Library、医中誌をもちいて 2015 年までに出版された論文を調べた。

RQ1 に対して 188 の論文が検出された。レビューから孫引きした論文を加え、症例報告、アブストラクト、重複、不適切な内容、データ抽出できないものを除外した結果最終的に 20 の論文が残り、メタアナリシスを行った。RQ2 では、データベースから 239、孫引きから 16 の論文を検出し、前述の適切ではない論文を除外したところ、最終的に 26 の論文がメタアナリシスに含まれた(図 3)。

診断オッズ比が最も高かったのは拡散強調画像、MRS、灌流画像などを複合的に診断した画像検査 (5.9) であり、次いで  $^{18}\text{F}$ -FET-PET (5.2) であった。一方最も診断オッズ比が低かったのは造影 MRI (2.2)、次いで  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET (2.4) であった(表 1)。

表 1 放射線画像検査の診断オッズ比

Radiological Imaging	Number of Studies	Pooled Logarithm of the Diagnostic Odds Ratio	Pooled Sensitivity (95% CI)	Pooled Specificity (95%CI)
Combined Imaging	3	5.9	96% (83 – 99%)	93% (83 – 97%)
$^{18}\text{F}$ -FET-PET	3	5.2	91% (79 – 97%)	95% (61 – 99%)
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI-SPECT	2	4.8	92% (85 – 96%)	91% (84 – 95%)
MRP	8	3.5	85% (73 – 92%)	81% (67 – 90%)
DWI	2	3.4	88% (62 – 97%)	80% (62 – 91%)
$^{11}\text{C}$ -MET-PET	8	3.2	81% (73 – 87%)	81% (74 – 87%)
$^{201}\text{Tl}$ -SPECT	6	3.1	80% (65 – 89%)	84% (75 – 91%)
MRS	9	3.0	83% (70 – 91%)	77% (61 – 87%)
$^{18}\text{F}$ -FDG-PET	9	2.4	81% (67 – 90%)	72% (64 – 79%)
Gd MRI	4	2.2	63% (28 – 89%)	82% (57 – 94%)

また、原疾患をグリオーマと転移性脳腫瘍に分けてサブ解析を行った。グリオーマでは、 $^{18}\text{F}$ -FET-PET (6.8)、複合的画像診断 (5.9) の診断オッズ比が高値であり、造影 MRI (1.7) および  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET (2.3) が低値であった。一方、転移性脳腫瘍では、灌流画像、 $^{201}\text{Tl}$ -SPECT、 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET、造影 MRI、 $^{11}\text{C}$ -MET-PET が解析に含まれたが、診断オッズ比は総じて 3 前後であった。転移性脳腫瘍が原疾患の場合には、どの検査を用いても放射線壊死の診断率はほぼ変わらないが、グリオーマの場合には複合的画像診断や  $^{18}\text{F}$ -FET-PET の診断能力が優れていた。PET が無い

図 2 作成した放射線壊死の免疫染色

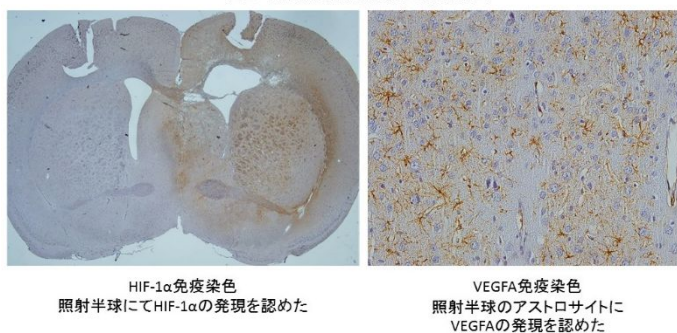
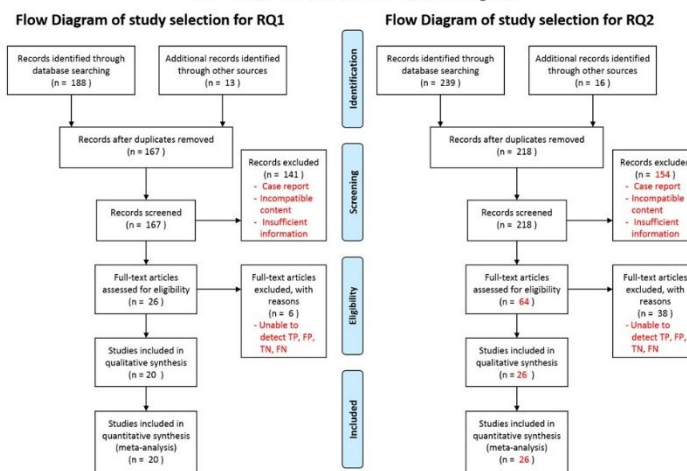


図 3 システマティックレビューの flow diagram



施設でも MRI を用いて拡散強調画像、MRS、灌流画像を行い、データを組み合わせて評価することで高い診断能力が得られることが判明した。

### (3) 脳放射線壊死に対するベバシズマブの至適投与方法の検討

本研究はベバシズマブの適応外使用に該当するため、特定臨床研究法の施行により 2019 年 3 月で患者への投与は終了した。2017 年から 2019 年 3 月までに 11 例の放射線壊死症例に対してベバシズマブを投与した(表 2)。年齢中央値は 65 歳、男性 5 例、女性 6 例であった。原疾患は Grade I から III の髄膜腫が 2 例ずつ、頭頸部癌が 2 例で、膠芽腫、奇形腫、脊索腫が 1 例ずつであった。放射線治療はほとんどが複数の治療を受けていた。ベバシズマブの投与回数は中央値 3 回(1-6 回)であった。投与前の KPS 中央値は 65、投与後は 70 であった。

症例を提示する。75 歳の女性。原疾患は meningothelial meningioma であった。2 度目の手術の後、残存腫瘍に定位放射線治療を 2 回施行している。その後放射線壊死を併発し、右下肢の麻痺が出現した。ベバシズマブ 5mg/kg を隔週毎に計 4 回投与した。投与後の MRI では浮腫の改善を認めたと、麻痺症状の改善は認めなかった(図 4)。3 カ月後浮腫の増大は認めなかったが腫瘍を摘出した。18 カ月後腫瘍の再増大を認めるまで浮腫の増悪は認めなかった。

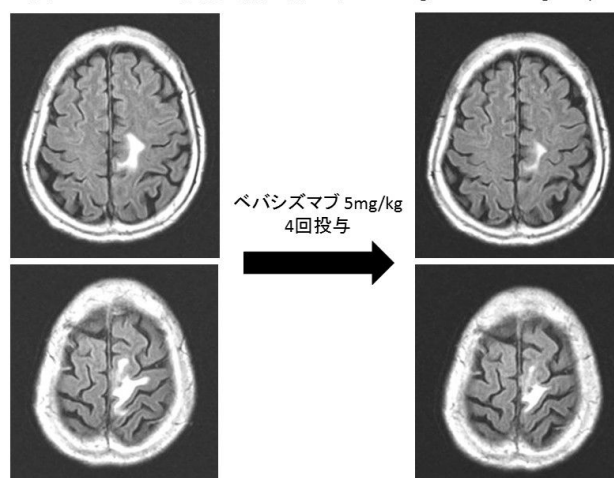
また、2016 年の症例ではあるが、再発難治性中枢神経系原発悪性リンパ腫に対して、抗 PD-1 抗体と樹状細胞ワクチンにて腫瘍をコントロールしつつ、放射線壊死に対してベバシズマブを追加し、良好な経過を辿った一例を報告した(文献 3)。

全症例の解析は今後行う予定である。

表2 放射線壊死に対するベバシズマブ投与症例

(n=11)	n (%)
Age (median, years)	65
Sex	
Male	5 (45.5)
Female	6 (54.5)
Tumor	
G III meningioma	2 (18.2)
G II meningioma	2 (18.2)
G I meningioma	2 (18.2)
Head and neck cancer	2 (18.2)
glioblastoma	1 (9.1)
Immature teratoma	1 (9.1)
chordoma	1 (9.1)
Radiation therapy	
SRS/SRT	6 (54.5)
Carbon	3 (27.3)
BNCT	2 (18.2)
IMRT	2 (18.2)
RT	1 (9.1)
Cycles of bevacizumab (median)	3 (27.3)
Pre KPS (median)	65
Post KPS (median)	70
Adverse event	
hypertension	4 (36.4)

図4 ベバシズマブ投与症例(75歳 女性 meningothelial meningioma)



ベバシズマブの投与にて浮腫の軽減を認めた

### (文献)

1. 古瀬 元雅、野々口 直助、池田 直廉、川端 信司、宮武 伸一、黒岩 敏彦：脳腫瘍治療後放射線壊死。Neuro-Oncology の進歩 25-1, 23-32, 2018
2. Furuse M, Nonoguchi N, Yamada K, Shiga T, Combes JD, Ikeda N, Kawabata S, Kuroiwa T, Miyatake SI: Radiological diagnosis of brain radiation necrosis after cranial irradiation for brain tumor: a systematic review. Radiat Oncol 14: 28, 2019
3. Furuse M, Nonoguchi N, Omura N, Shirahata M, Iwasaki K, Inui T, Kuroiwa T, Kuwabara H, Miyatake SI: Immunotherapy of nivolumab with dendritic cell vaccination is effective against intractable recurrent primary central nervous system lymphoma. A case report. Neurol Medi Chir (Tokyo) 57: 191-197, 2017

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Furuse M, Nonoguchi N, Yamada K, Shiga T, Combes JD, Ikeda N, Kawabata S, Kuroiwa T, Miyatake SI	4. 巻 14
2. 論文標題 Radiological diagnosis of brain radiation necrosis after cranial irradiation for brain tumor: a systematic review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiat Oncol	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13014-019-1228-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shiba H, Takeuchi K, Hiramatsu R, Furuse M, Nonoguchi N, Kawabata S, Kuroiwa T, Kondo N, Sakurai Y, Suzuki M, Ono K, Oue S, Ishikawa E, Michiue H, Miyatake SI	4. 巻 58
2. 論文標題 Boron neutron capture therapy combined with early successive bevacizumab treatments for recurrent malignant gliomas. A pilot study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurol Med Chir (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 487-494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.oa.2018-0111	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 古瀬 元雅、野々口 直助、池田 直廉、川端 信司、宮武 伸一、黒岩 敏彦	4. 巻 25
2. 論文標題 脳腫瘍治療後放射線壊死	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuro-Oncologyの進歩	6. 最初と最後の頁 23-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.11452/neurooncology.25.1_23">https://doi.org/10.11452/neurooncology.25.1_23</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 3. Furuse M, Nonoguchi N, Omura N, Shirahata M, Iwasaki K, Inui T, Kuroiwa T, Kuwabara H, Miyatake SI	4. 巻 57
2. 論文標題 Immunotherapy of nivolumab with dendritic cell vaccination is effective against intractable recurrent primary central nervous system lymphoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurol Medi Chir (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 191-197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.cr.2016-0330	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古瀬 元雅、川端 信司、池田 直廉、野々口 直助、宮武 伸一、黒岩 敏彦
2. 発表標題 Bevacizumab holidayは可能か？ 初発膠芽腫に対するbevacizumab治療
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古瀬 元雅、川端 信司、池田 直廉、野々口 直助、黒岩 敏彦
2. 発表標題 Beverizumab holidayは可能か？ 初発膠芽腫に対するbevacizumab治療
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古瀬 元雅、野々口 直助、山田 恵、志賀 哲、池田 直廉、川端 信司、黒岩 敏彦、宮武 伸一
2. 発表標題 放射線壊死の診断 システマティックレビュー
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第76回学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Motomasa Furuse, Shinji Kawabata, Naokado Ikeda, Naosuke Nonoguchi, Yoji Tamura, Yoshinaga Kajimoto, Shin-Ichi Miyatake, Toshihiko Kuroiwa
2. 発表標題 Impact of bevacizumab in patients with recurrent glioblastoma and poor performance status.
3. 学会等名 22nd Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古瀬 元雅、野々口 直助、川端 信司、黒岩 敏彦、宮武 伸一
2. 発表標題 ペバシズマブは放射線脳壊死に薬事承認されるか？ AVAnecro進捗状況の報告
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古瀬 元雅、野々口 直助、山田 恵、志賀 哲、Jean-Damien Combes, 池田 直廉、川端 信司、鰐淵 昌彦、黒岩 敏彦、宮武 伸一
2. 発表標題 グリオーマの放射線壊死鑑別に有用な画像診断 -systematic reviewのサブ解析より-
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019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	川端 信司  (Kawabata Shinji)  (20340549)	大阪医科大学・医学部・准教授   (34401)	
研究 分担者	野々口 直助  (Nonoguchi Naosuke)  (70388263)	大阪医科大学・医学部・講師   (34401)	