

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03628

研究課題名(和文)代謝標的放射線治療を目指した分子イメージング法の確立

研究課題名(英文)Strategic molecular image aiming metabolism-targeted radiotherapy

研究代表者

河合 辰哉 (Kawai, Tatsuya)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授

研究者番号：70597822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,240,000円

研究成果の概要(和文)：(1) 13C-MRI解析により示された放射線照射による脳腫瘍中の一過性乳酸/ピルビン酸比の上昇について免疫学的検証を行い、6Gy照射6-16時間後に組織中LDHA発現が最大20%上昇し、24時間後に照射前のレベルまで回復することが示された。(2) 皮下移植モデルを用いたEPRi画像の解析を継続し、3Gy-20Gy照射後6時間から24時間後に低酸素領域の拡大とともに、数分のサイクルで変動する酸素化状態(cycling hypoxia)の存在が確認された。腫瘍内pHの低下および低酸素状態と放射線抵抗性の間には密接な関連が知られており、上記の結果は脳腫瘍の放射線治療計画で考慮すべき現象と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内pHの低下および低酸素状態と放射線抵抗性の間には密接な関連が知られている。本研究により、放射線照射前の腫瘍の状態だけでなく、放射線照射後の一過性に生じる腫瘍組織内のpHや低酸素状態が放射線治療の効果に影響を与える可能性が示唆された。この現象は放射線治療の抵抗因子の一つとなり得るが、逆にこれをうまく利用し、照射のタイミングや線量を精密にコントロールすることで治療効果を高めることも可能であると考えられる。したがって、分子イメージングを用いて腫瘍内代謝の変化をモニタリングすることにより、効果の高い放射線治療計画の開発、併用することで治療効果を高めるための代謝制御薬の創出につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：(1) Immunological validation of the transient increase in lactate/pyruvate ratio in brain tumors due to irradiation, as indicated by 13C-MRI analysis, revealed that tissue LDHA expression increased by up to 20% after 6-16 hours of 6 Gy irradiation and subsequently returned to pre-irradiation levels within 24 hours.(2) EPRi images were continuously analyzed using a subcutaneously implanted model, confirming the presence of cycling hypoxia and the expansion of hypoxic regions 6 to 24 hours after 3 Gy to 20 Gy irradiation. Considering the well-established correlation between intratumoral pH decrease, hypoxia, and radioresistance, these findings should be taken into account during radiotherapy planning for brain tumors.

研究分野：放射線医学

キーワード：腫瘍内代謝 Hypoxia 13C-MRI 代謝イメージング 放射線応答

1. 研究開始当初の背景

放射線治療において腫瘍内低酸素領域の存在は治療効果に負の影響を与える大きな因子のひとつとして知られる。特にグリオーマをはじめとする悪性脳腫瘍は解剖学的、病理学的特性上、手術での完全除去が困難であり、術後放射線化学療法の有効性が予後に大きく関わっている。しかしながら、現在のところその有効性は限定的であり、その原因のひとつとして放射線照射後のグリオーマ細胞が細胞内代謝を変化させることで放射線抵抗性を示すことが考えられている（Cancer Lett. 2014;354:132-41）。一方、腫瘍特異的な代謝環境を標的とした治療法が近年注目されており、DNA 傷害を主な作用機序とする放射線治療と組み合わせることにより相乗効果が期待できる。

13C-MRI は、炭素原子核スピンからの信号を捉えることにより、炭素原子を基本骨格とする生体内物質由来の信号を分離検出、画像化することができる。特に近年開発された、偏極した電子からの偏極移行で核スピンの偏極を高める DNP（dynamic nuclear polarization）技術を用いれば 13C 原子核からの共鳴信号を平衡状態の 10000 倍以上に増幅することができるようになり、体外で超偏極状態にした 13C を有する中間代謝産物を生体に注入することで代謝産物の生体内での変化を経時的に観察することが可能である。また、生体にラジカル発生体（OX063）を投与後に、スピンシフト解析を行う EPRI（electron paramagnetic resonance imaging）と呼ばれる手法を用いれば、腫瘍内の酸素分布を計測することができる。

そこで、放射線照射前あるいは照射中に 13C-MRI あるいは EPRI 等の分子イメージング手法により腫瘍内の代謝環境を正確に把握し、これに応じた適切な治療ができれば効果を最大限に高めることができると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、同所移植脳腫瘍モデルマウスを用いて、EPRI による酸素イメージング、DNP 技術を併用した 13C-MRI による代謝画像による画像解析を行い、培養細胞や腫瘍検体のみからは得ることができない、より実環境下での放射線治療中の経時的な腫瘍内代謝変化を解明し、これに立脚した治療法、すなわち腫瘍固有のエネルギー代謝を標的とした metabolism-targeted radiotherapy の確立を目指す。

3. 研究の方法

①DNP-MRI による代謝画像と EPRI による酸素イメージングを用いた、放射線照射前後の脳腫瘍組織における糖代謝と低酸素との関係の詳細な解析

生理的条件に近い腫瘍環境を用意するために、脳定位手術によりグリオーマ細胞株あるいはがん幹細胞をマウス脳内に移植し、同所移植モデルを作成する。次に EPRI および DNP 技術を併用した 13C-MRI を用いて、腫瘍中の酸素分布およびピルビン酸-乳酸変換速度の経時変化を画像化する。これらに対比することで、糖代謝が治療により酸素依存性/非依存性にどのように変化しているのかを経時的に解析する。

②放射線照射前後での組織学的検討および遺伝子発現解析による、代謝画像および酸素イメージング解析の検証。

放射線照射前、および前年度の画像解析から予測された照射後のタイミングで腫瘍組織を採取し、凍結組織標本を作製、pimonidazole 染色、HIF1 α 染色および CD31 染色を行い、照射による低酸素領域とその関連遺伝子の発現分布の変化を組織中の血管分布と関連づけて解析する。並行して、別に採取した腫瘍組織から RNA を分離し、マイクロアレイ解析を行う。これにより腫瘍組織内のよりグローバルな遺伝子発現変化をとらえ、腫瘍内代謝環境に関連する遺伝子を抽出する。有意に変化の見られた遺伝子のうち重要と考えられるものを抽出し、その発現について定量 PCR、Western blot 法、免疫組織学を用いて転写、翻訳、局在レベルでの変化を検証する。

③分子イメージングを指標とした、放射線照射中の代謝変化に基づいた薬剤併用放射線療法の有効性の検証

上記①および②の結果に基づき、治療効果を得られると思われた照射線量、照射間隔およびターゲット分子を決定し、脳腫瘍マウスモデルに対して代謝阻害薬等の薬剤を併用した放射線治療を行い、複数の条件で有効性に関して検討を重ねる。必要であれば培養細胞を用いた *in vitro* 実験も行い条件決定の参考とする。同様にターゲット分子の候補が見つければ、放射線増感剤としての可能性について探っていく。治療期間中は定期的に 13C-MRI、EPRI による画像解析を行い、抗腫瘍効果と併せた評価を行うことにより、最大の治療効果を得るための画像取得法を決定し、治療における分子イメージングの貢献度、有用性について最終評価を行う。

4. 研究成果

1. 13C-MRIにより取得した13C-ピルビン酸／乳酸画像およびメタボローム解析の検証

Warburg効果により酸素化条件でも腫瘍内では嫌氣的糖代謝が亢進しているとされているが、放射線照射による代謝変化については確立された知見がない。前年度までに遂行された13C-MRI、メタボローム解析により6Gyの放射線照射によって腫瘍内乳酸酸／ピルビン酸比が一過性に上昇することが示唆されていた（図1）。

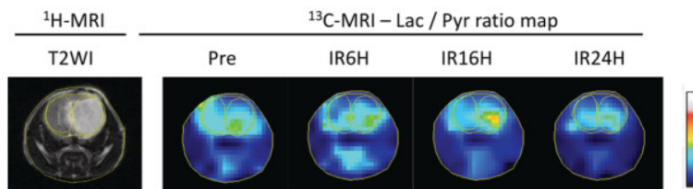


図1 脳腫瘍モデルマウスの13C-MRI画像
脳グリオーマGBM1腫瘍の放射線照射後16時間後に腫瘍内乳酸酸／ピルビン酸比が一過性に上昇している（前年度までの結果）。

この画像的变化の信憑性を検証するため、実際に脳腫瘍組織よりタンパクを抽出し乳酸脱水素酵素A (LDHA)、炭酸脱水素 (CA9)、monocarboxylate transporter (MCT1、MCT4) のタンパク質量および解析を中心に免疫学的実験を行った。この結果、腫瘍組織中のLDHA発現が有意に(20%)上昇、24時間後には照射前のレベルまで回復することが示された(図2)。この現象は腫瘍サイズ、腫瘍の系統に依存する傾向が見られた。CA9やMCT1、MCT4の発現量には有意な変化は認められなかった。

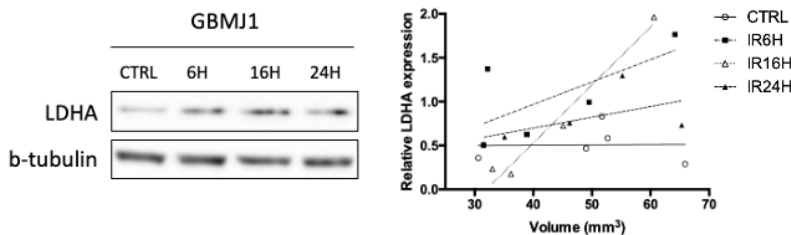


図2 照射後の腫瘍内一過性LDHA上昇
Western blotを用いたタンパク発現解析では、脳グリオーマGBM1腫瘍の放射線照射後6、16時間後に腫瘍サイズに依存して腫瘍内LDHAの上昇を認める。

なお、spheroidと呼ばれる小腫瘍塊をシャーレ上で培養し同一条件で照射を行ったが、このような傾向は見られず、生体内で腫瘍塊を形成した生理的条件でのみ生じる現象と考えられた。

次に、放射線照射後に腫瘍内で変化する遺伝子のうち、13C-MRIで画像化が可能な代謝関連遺伝子を網羅的に検索するために行ったマイクロアレイ解析では、照射後に多くの遺伝子の発現変容が見られた(図3)。

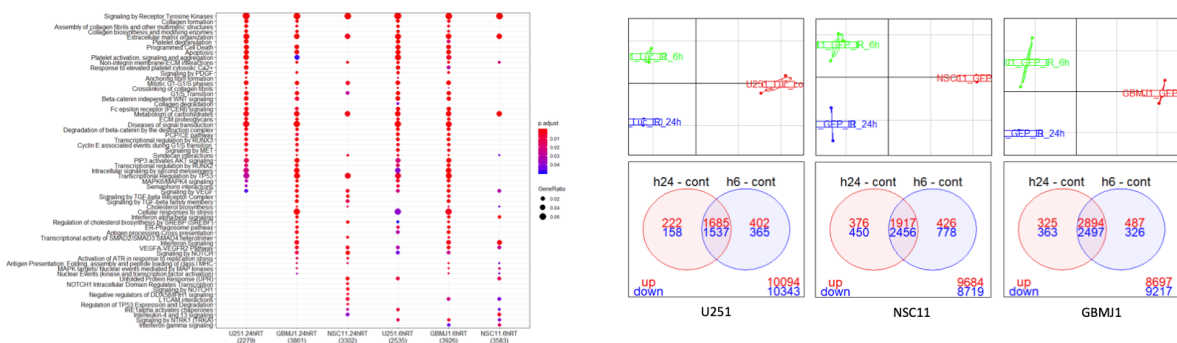


図3 マイクロアレイ解析による照射後の腫瘍内遺伝子発現の変容
複数の細胞株において放射線照射後に数多くの遺伝子発現に変化が見られる。

この中には前述のLDHAの変動（発現上昇）も含まれており、タンパク質量の変化と矛盾しないものであったが、その他の解糖系を主体とする糖代謝関連遺伝子には有意な変化が見られなかった（図4左）。しかしながら、細胞死の調節因子として知られるSIRT2遺伝子、癌抑制遺伝子として機能することが知られる転写因子KLF4の発現量が変化していることが示唆された（図4右）。これらの調節因子はいずれもLDHAの発現を上流で制御しているとの報告も見られ、腫瘍内代謝の観点からもこれら遺伝子の放射線耐性との関連を研究する上で有用な知見と考えられた。

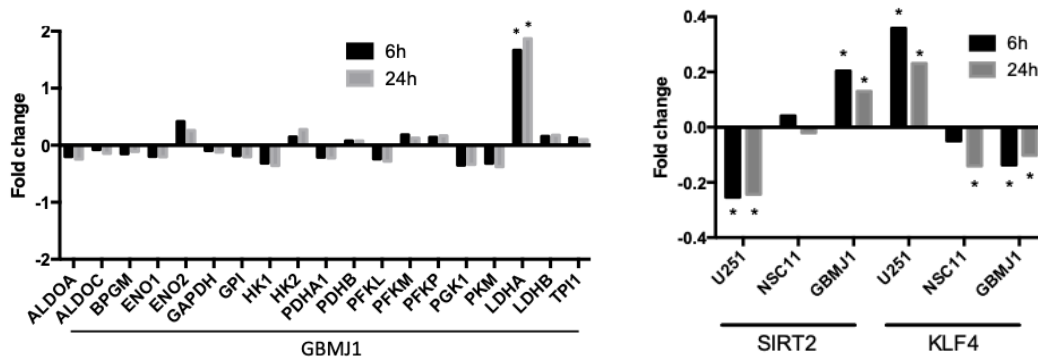


図4 放射線照射後における糖代謝関連遺伝子の発現の変化

腫瘍塊より抽出した total RNA を用いたマイクロアレイ解析では、放射線照射後 6 時間後に LDHA 発現の上昇が示唆される（左）。複数の細胞株において LDHA を制御している可能性のある SIRT、KLF4 の発現に変化が示唆される（右）。

しかしながら、免疫学的手法によるタンパクレベルでの解析ではKLF4、SIRTの発現量に明確な変化をとらえることはできなかった。

腫瘍内微小環境のpH低下は腫瘍内代謝の変化、局所腫瘍免疫の抑制をもたらし、結果として放射線抵抗性を高めることが知られている。したがって、上記の知見は脳腫瘍の放射線治療計画で考慮すべき重要な現象であると考えられた。この結果を学術集会（第143回日本医学放射線学会中部地方会）で報告しまとめ学術雑誌に投稿し、掲載された（NMR Biomed. 2021 May 3:e4514）。

2. EPRIを用いた酸素マッピング画像による照射後の酸素分布変動解析

研究分担者である松尾（岐阜大学放射線科）らで行った¹³C-MRIおよびEPRI（electron paramagnetic resonance imaging）を用いた我々のこれまでの研究（Oncotarget. 2018;9:25089）では、放射線照射後の乳酸／ピルビン酸比は腫瘍内の酸素分圧と密接な関係があることが示されたが（図5）、照射後の腫瘍内低酸素領域の短期間での変化についてはまとまった知見はない。

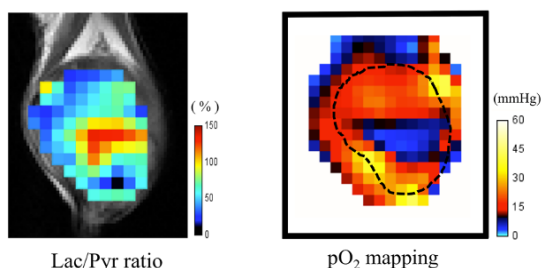


図5 腫瘍内の酸素分圧と乳酸／ピルビン酸比
皮下腫瘍モデルを用いた¹³C-MRIによる乳酸／ピルビン酸比画像およびEPRIによる酸素分圧画像（左）。低酸素領域ではピルビン酸から乳酸への転換が亢進している。

コロナウイルス感染症蔓延と人的要因により脳腫瘍モデルの作成、画像取得が困難となったため、松尾らとともに皮下腫瘍（異所性移植）モデルで遂行されたEPRIデータを使用して酸素マッピング画像を作成、放射線照射後の酸素分布変動解析について解析を行った。この結果、3Gy、10Gy、20Gy照射後30分から18時間にかけて腫瘍内の低酸素領域が線量依存性に拡大し、24時間後に回復することが示

された (図6)。これは13C-MRIで示されたLDHAの変化と類似した経時的变化であり、両者の関連を示唆するものと考えられた。

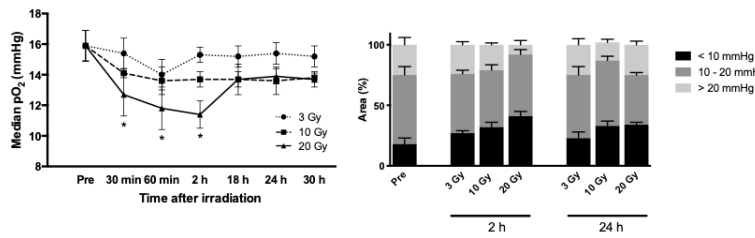


図6 照射後の腫瘍内一過性低酸素

皮下腫瘍モデルを用いた EPRI では、放射線照射後 30 分後より線量依存性に酸素分圧の低下 (左) および低酸素領域の拡大 (右) を認め、いずれも 24 時間後に不完全な回復が見られる。

さらに、これに加えて酸素化状態と低酸素状態が数分のサイクルで変動する、いわゆるcycling hypoxia領域にもその程度、範囲に照射後の変化が認められ、その増加、拡大が酸素化された領域の減少とともに確認された (図7)。

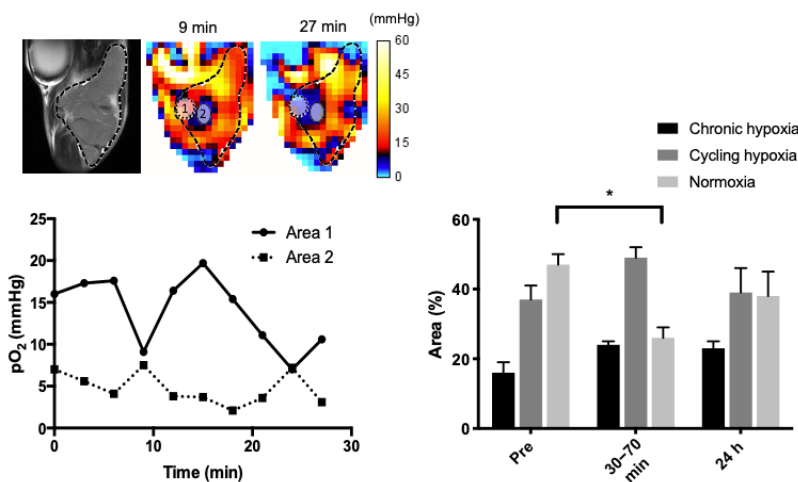


図7 照射後の cycling hypoxia 領域の変化

皮下腫瘍モデル用いた EPRI (左上) では、照射の有無にかかわらず酸素化状態、低酸素状態が数分おきに繰り返される領域が認められる (左下実線)。10 Gy 照射後 30-70 分後には酸素化された領域は著明に減少し、慢性的低酸素領域 (10 mmHg) および cycling hypoxia 領域の増加が見られる。照射 24 時間後では酸素化が回復するが不完全である。

Cycling hypoxia領域の意義については様々な議論があるが、放射線治療の観点からは、放射線感受性の低いtumor stem-like cellの高い存在確率が疑われており、治療戦略を研究する上で重要な領域と考えており、この点の考察を含めて研究結果を学術誌 (NMR Biomed. 2022;35:e4783) に投稿、掲載された。

3. まとめ

腫瘍内pHの低下および低酸素状態と放射線抵抗性の間には密接な関連が知られている。本研究により、放射線照射後に腫瘍内酸素環境および代謝環境が数十分から数時間の間にダイナミックに変化していることが検証された。一般に、脳腫瘍を含めたほとんどの放射線治療では分割照射が行われるが、多くの場合この間隔は通常一定である。しかし、本研究で示されたLDHAの発現、酸素化の変動など、放射線照射後に一過性に生じ、かつ放射線治療の効果に影響を与える可能性のある要因を考慮すると、必ずしも現状の照射プロトコルが放射線感受性という観点では全ての腫瘍に最適とは言えないと考えられる。しかし、放射線治療の抵抗因子の一つとなりうるこの現象を逆にうまく利用し、照射のタイミングや線量を精密にコントロールする、あるいは適切なタイミングで代謝モジュレータとなる薬剤を用いることで治療効果を高めることも可能であると考えられる。したがって、本研究で得られた知見から、分子イメージングを用いて腫瘍内代謝の変化をモニタリングすることにより、効果の高い放射線治療計画の開発や放射線増感剤としての代謝制御薬剤の創出につながると期待される。

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 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kawai Tatsuya, Brender Jeffrey R., Lee Jennifer A., Kramp Tamalee, Kishimoto Shun, Krishna Murali C., Tofilon Philip, Camphausen Kevin A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Detection of metabolic change in glioblastoma cells after radiotherapy using hyperpolarized ¹³ C MRI	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NMR in Biomedicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/nbm.4514	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 該当する
1. 著者名 Kondo Takuhito, Shibamoto Yuta, Kawai Tatsuya, Sugie Chikao, Wang Zhen, Nakamura Koichi, Murai Taro, Manabe Yoshihiko, Nakashima Masahiro, Matsuo Masayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of a combined treatment regimen consisting of Hsp90 inhibitor DS-2248 and radiation in vitro and in a tumor mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2767 ~ 2776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/tcr-21-71	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 該当する
1. 著者名 Kawai Tatsuya, Matsuo Masayuki, Takakusagi Yoichi, Saito Keita, Hyodo Fuminori, Devasahayam Nallathamby, Matsumoto Shingo, Kishimoto Shun, Yasui Hironobu, Yamamoto Kazutoshi, Krishna Murali C.	4. 巻 35
2. 論文標題 Continuous monitoring of postirradiation reoxygenation and cycling hypoxia using electron paramagnetic resonance imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NMR in Biomedicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/nbm.4783	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 該当する
1. 著者名 Takano Seiya, Shibamoto Yuta, Wang Zhen, Kondo Takuhito, Hashimoto Shingo, Kawai Tatsuya, Hiwatashi Akio	4. 巻 64
2. 論文標題 Optimal timing of a H2AX analysis to predict cellular lethal damage in cultured tumor cell lines after exposure to diagnostic and therapeutic radiation doses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 317 ~ 327
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrac096	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河合辰哉
2. 発表標題 13C-MRIを用いた腫瘍内代謝の評価
3. 学会等名 日本医学放射線学会中部地方会
4. 発表年 2020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	兵藤 文紀 (Hyodo Fuminori) (10380693)	岐阜大学・高等研究院・准教授 (13701)	
研究分担者	松尾 政之 (Matsuo Masayuki) (40377669)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	

	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
研究協力者	大嶋 野歩 (Oshima Nobu) (70571454)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	
研究協力者	キャンプハウゼン ケビン (Camphausen Kevin A)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	クリシュナ ムラリ (Krishna Murali C)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	National Cancer Institute			