

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870560

研究課題名(和文) 低酸素PETを用いた脳腫瘍の遺伝子解析と腫瘍幹細胞をターゲットとした治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapies targeting tumor stem cells, and the genetic analysis of brain tumor using hypoxia PET.

研究代表者

初井 泰朋 (YASUTOMO, MOMII)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：20534192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素PETを行い、膠芽腫の組織内で低酸素領域と診断された部位とそれ以外の部位より組織を採取した。各腫瘍組織を培養し、HIF-1などの酸化ストレスに関する因子をRT-PCRにて解析した結果、確かに生体内での低酸素による影響がみられた。腫瘍幹細胞移植モデルによる低酸素状態での治療法の検討として、低酸素領域の腫瘍とその他部位における、抗癌剤の反応性を*in vitro*にて比較したが、優位な差は見られなかった。しかしながら、それぞれの部位で遺伝子修復酵素の発現量に相違があり、低酸素ストレス下での抗癌剤の効果に差がある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： The study conducted a hypoxia PET (positron emission tomography) and obtained tissue from a region diagnosed as a hypoxic region in glioblastoma tissue and from other regions. When the study cultured each tumor tissue and analyzed a factor related to oxidant stress such as HIF-1 with RT-PCR, it evidently found an influence by hypoxia *in vivo*.

The study compared responsiveness of anticancer drug between tumor in hypoxic region and other regions, but there was no significant difference. However, it was suggested that there was a difference in expression level of gene repair enzyme at each region and also a possible difference in effectiveness of anticancer drug under hypoxic stress.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：悪性脳腫瘍 メチオニンPET 低酸素PET 腫瘍幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の低酸素ストレス応答として、解糖系の活性化や、血管新生の誘導が起こることなどが知られており、これらの変化は腫瘍の微小環境にみられる特徴とよく一致している。腫瘍細胞は酸素や栄養分が必要であるが、異常な増殖により孤立した腫瘍細胞は十分に酸素も栄養分も届かないにも関わらず生存している。特に固形腫瘍では低酸素状態を呈するために、抗癌剤や放射線の感受性が低く、治療成績の低下、予後の悪化、再発の原因の一つとなっている。低酸素状態では転写因子 hypoxia inducible factor 1(HIF1)が活性化し、VEGF などの血管新生促進因子を誘導し、新たな腫瘍血管の増生を引き起こし腫瘍はさらに増殖増大する。このように悪性腫瘍内の低酸素細胞の存在は生物学的にも臨床的にも大切であることから、低酸素細胞を画像として可視化することは非常に重要である。

現在、悪性腫瘍における positron emission tomography (PET)検査は、さまざまな臓器での腫瘍局在や悪性度の判断に利用されてきている。しかしながら保険適応となっているのは 2-デオキシ 2-<sup>18</sup>F フルオロ D-グルコース(<sup>18</sup>F-FDG)を使用した PET のみである。また <sup>18</sup>F-FDG はエネルギー代謝が活発な部位に集積することから、もともと解糖系が活発な脳や心臓では正常組織にも生理的に集積し、これらの組織周辺に存在する腫瘍の検出は困難である。そこで画像診断への応用を目的とした標識アミノ酸 PET の開発が進み、とくにメチオニンは脳への生理的集積が <sup>18</sup>F-FDG よりも低く、脳腫瘍をより明瞭に描出することができる。一方、以前から低酸素細胞トレーサーである

<sup>18</sup>F-misonidazole(F-MISO)を用いた PET による低酸素イメージング検討が行われてきたが信頼性は高くなかった。最近になり、東北大学において新規低酸素細胞トレーサー <sup>18</sup>F-FRP170 が合成され、同トレーサーを用い

た PET (FRP170 PET) は既に実際の臨床に應用されている。本検査法は F-MISO に比較し、高いイメージコントラストである上に、短い代謝時間、体外排泄時間で非常に安全であることが特徴とされている。脳腫瘍細胞の薬剤抵抗性、放射線抵抗性、再発時の腫瘍原性、全ての統一的な原因になっているものとして、最近、脳腫瘍幹細胞の存在が指摘されている。この腫瘍幹細胞は自身がほとんど増殖することなく、大量の腫瘍細胞を供給することができるという特徴を有している。そのため、既存の抗癌剤を腫瘍細胞集団に処理したとしても、脳腫瘍細胞は死滅するものの、腫瘍幹細胞は生存し続け、その癌幹細胞を基点として再び癌細胞集団を形成し再発を起こしてしまうと考えられる。このような腫瘍幹細胞は主に低酸素部位存在し、低酸素状態が幹細胞維持や制御に重要な役割を果たしていることは周知の事実である。

そこで、本研究は脳腫瘍患者の低酸素部位におけるイメージングと遺伝子発現制御を、臨床検体を用いて、検討し治療の可能性を研究するに至った。

## 2. 研究の目的

膠芽腫に代表される脳腫瘍では著明な血管新生が見られるものの、腫瘍細胞は異常な増殖により孤立した状態で十分に酸素も栄養分も届かないにも関わらず生存している。固形腫瘍では低酸素状態を呈するために、抗癌剤や放射線の感受性が低く、治療成績の低下、予後の悪化、再発の原因となっている。現在低酸素を評価するトレーサーが開発され、腫瘍における低酸素状態を捉えることができるようになった。一方、低酸素部位での腫瘍幹細胞の存在が指摘されている。低酸素で生存する腫瘍幹細胞は治療抵抗性で、その幹細胞を基点として再び腫瘍細胞集団を形成し再発を起こすと推定される。そこで本研究では、低酸素 PET で集積がみられた部位の病理組織学的解析に加え、遺伝子のプロファイリ

ングを非低酸素部位と比較検討する。更には低酸素部位から得られた腫瘍幹細胞を培養し、低酸素ストレス下での反応性について検討を加え、メチオニン PET や低酸素 PET の有用性を評価し、さらに低酸素部位に対する解析をすすめることで、新たな治療の可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

摘出を予定している悪性脳腫瘍の患者で、メチオニン PET 及び低酸素 PET ([18F] FRP-170) 検査を施行し、その分布部位の違いを把握した上で、検体を採取する。標本を各種マーカーにて染色し、組織学的評価を行なう。またレーザーマイクロダイセクションにて遺伝子を回収し、腫瘍や間質を分けて各種遺伝子の発現量の差を検討し、低酸素環境が及ぼす遺伝子発現の変化を定量化する。更には検体の一部から癌幹細胞を培養し、生体内で起きている変化を *in vitro* でとらえることによって、低酸素下にある腫瘍幹細胞をターゲットとした治療法の開発を検討する

### 4. 研究成果

臨床的に悪性神経膠腫と考えられる症例に対して各PETを施行し、術中画像上で低酸素となっている部位とそうでない部位を採取した(図1)。低酸素部位の評価として血管新生因子(HIF-1)及び、腫瘍増殖因子(MGMT)を測定した。いずれも低酸素部位での優位な増加を認めた(図2)。

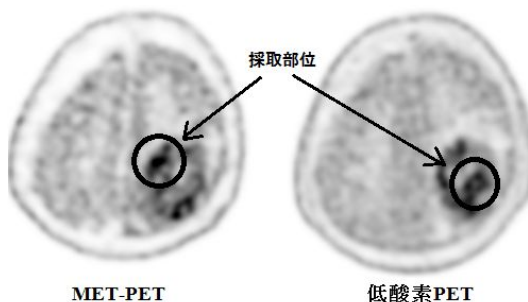
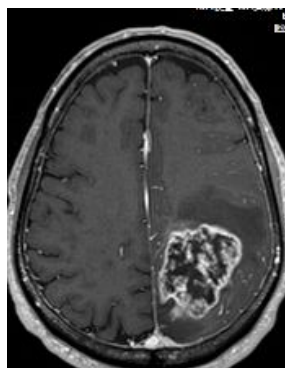


図1 MRIとPET評価

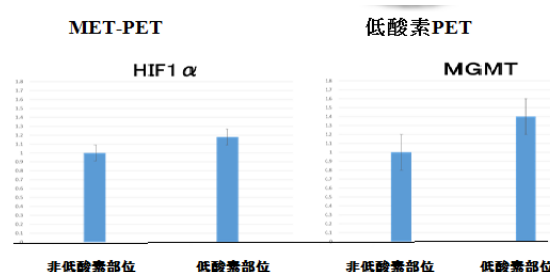


図2 RT-PCR結果

低酸素 PET 高集積域を示す低酸素部位と非低酸素部位の酸素分圧が測定可能であった症例では、いずれも低酸素 PET 検査が低酸素を反映していることが分かった。低酸素部位と非低酸素部位の遺伝子解析では、非低酸素部位に比べ、MGMT 遺伝子の発現が数倍上昇する傾向を示した。各細胞を培養し、培養腫瘍幹細胞に対する、抗がん剤、分子標的薬、シグナル伝達阻害剤の効果を検討したが、培養細胞での優位な差は認められなかった。我々は今回の結果で、画像評価し、手術にて摘出した低酸素部位における転写因子 hypoxia inducible factor 1(HIF1) や VEGF などの血管新生促進因子を測定することで、誘導が亢進していることを確信した。さらに低酸素にさらされている腫瘍部位を画像として可視化することは可能であるこ

とを証明した。低酸素部位で抗癌剤の感受性が低くなる原因として、抗がん剤の腫瘍内の移行低下や脳腫瘍幹細胞の存在が想定されている。今回の結果から実質的な結果は得られなかったものの、生体内では低酸素部位で薬剤耐性遺伝子の発現は関与していることが示唆された。今後さらに症例を増やし検討する予定である。

#### 参考文献

- 1) Nat Neurosci 16:1373, 2013
- 2) Citation: Oncogenesis 2012
- 3) NMCC Annual Report 17: 2010
- 4) Neuro-Oncol. 14: 132-144, 2012.

#### 5. 主な発表論文等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

初井 泰朋 (MOMII YASUTOMO)

大分大学医学部 脳神経外科 助教

研究者番号：20534192

##### (2) 研究分担者

なし