

氏 名	辻 優一郎
(ふりがな)	(つじ ゆういちろう)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙博医第8号
学位審査年月日	令和4年1月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	Chronic pathophysiological changes in the normal brain parenchyma caused by radiotherapy accelerate glioma progression (X線照射後慢性期の脳組織環境はグリオーマの進展を促進する)
論文審査委員	(主) 教授 二瓶 圭二 教授 近藤 洋一 教授 小野 富三人

学位論文内容の要旨

《目的》

放射線治療は悪性グリオーマに対する術後の標準治療の一つであるが、X線照射から数ヶ月～数年したのちに、摘出腔周囲から再発を来す。晩発性の脳放射線障害ではCXCL12やVEGFなどのサイトカインの関与が示されており、我々は上記のサイトカインが放射線治療を耐え抜いた腫瘍細胞にも働きかけて、細胞形質を修飾している可能性があると考えた。本研究ではX線照射後慢性期における脳実質組織の微小環境が、グリオーマ細胞に与える影響について検討した。

《方法》

X線照射

Fischer ラット(生後8週)の右大脳半球に局限したX線照射(65Gy)を行った。

実験 A (in vitro)

X線照射3ヶ月後にラット脳を摘出し、左右の大脳半球(IR/Ipsi-brain 群、IR/Contra-brain 群)、sham照射後のコントロール(Sham-IR/Brain 群)の3群を設定して、RNAおよび脳組織タンパクをそれぞれ抽出した。

A-1 F98 グリオーマ細胞における細胞増殖能

F98 グリオーマ細胞に抽出したタンパクを濃度別(1.5, 3.0, 6.0, 12 μ g/ml)に添加して培養を行い、72時間後にWST-8 assayを行うことで、細胞増殖能を評価した。

A-2 HUVEC 細胞における血管新生能

HUVEC 細胞に抽出したタンパクを濃度別(3.0, 6.0 μ g/ml)に添加して培養を行い、3時間後にTube formation assayを行うことで、血管新生能を評価した。

A-3 RNA-sequencing および pathway 解析

抽出したRNAによりRNA-sequencingを行うことで、X線照射後慢性期の脳組織において、有意に発現量が変動している遺伝子を網羅的に検索した。また有意変動遺伝子を基にパスウェイ解析を行った。

A-4 qPCR

qPCRを行い、CXCL12、VEGF-A、TGF β 1、TNF α の発現量を3群間で比較した。

実験 B (in vivo)

B-1 生存解析

X線照射から3ヶ月経過したのち、照射半球および非照射半球にF98グリオーマ細胞を移植し、それぞれIR/Ipsi-tumor、IR/Contra-tumor群と設定した。また、sham照射個体の大脳半球に移植したSham-IR/Tumorの3群を設定し、生存解析を行った。

B-2 脳腫瘍の免疫組織学的評価および浸潤能の評価

形成された腫瘍を摘出し、増殖能、アポトーシス率、腫瘍内血管密度および浸潤能を3群間で比較検討した。

B-3 qPCR

摘出した腫瘍から抽出したRNAを用いて、qPCRを行い、CXCR4、FGF-2、VEGF-A、

EGFR、ERK2 の発現量を 3 群間で比較検討した。

《結 果》

実験 A (in vitro)

A-1 IR/Ipsi-brain 群では、細胞増殖能が有意に亢進した。

A-2 IR/Ipsi-brain 群では、血管新生能が有意に亢進した。

A-3 RNA-sequencing により、IR/Ipsi-brain 群と IR/Contra-brain 群の双方で共通して発現が有意に上昇している遺伝子が 52 個検出された。パスウェイ解析では、Antigen processing and presentation, Cell adhesion molecules (CAMs), Chemokine signaling pathway, Leukocyte transendothelial migration, Cytokine-cytokine receptor interaction といった組織炎症に関与するパスウェイが有意に変動していると判定された。

A-4 qPCR では IR/Ipsi-brain 群、IR/Contra-brain 群ともに Sham-IR/Brain 群と比較して CXCL12、TGFβ1、TNFα の発現が有意に上昇した。VEGFA に関しては、IR/Ipsi-brain 群でのみ発現が有意に上昇していた。

実験 B (in vivo)

B-1 IR/Ipsi-tumor 群の生存期間は Sham-IR/Tumor 群より、有意に短かった (20.5 days vs. 22.5 days, p=0.002)。IR/Contra-tumor 群も、Sham-IR/Tumor 群と比較して生存期間が有意に短縮した (20.5 days vs. 22.5 days, p=0.003)。

B-2 IR/Ipsi-tumor 群の腫瘍は Sham-IR/Tumor 群と比較して、Ki-67 index が約 22% 上昇、アポトーシスが約 40% 低下、血管密度が約 40% 増加した。一方、IR/Contra-tumor 群の腫瘍は、Ki-67 index が約 18% 上昇、アポトーシスが約 50% 減少していたが、血管密度には有意差はなかった。また、IR/Ipsi-tumor 群の腫瘍は Sham-IR/Tumor 群より、浸潤能が有意に亢進した。

B-3 CXCR4、b-FGF、ERK2 の 3 遺伝子で IR/Ipsi-tumor 群、IR/Contra-tumor 群ともに Sham-IR/Tumor 群と比較して発現が有意に上昇していることを確認した。一方、EGFR および VEGFA に関しては、IR/Ipsi-tumor 群でのみ発現が有意に上昇していた。

《考 察》

実験 A により、X 線照射後慢性期の脳組織では腫瘍増殖能や血管新生能を亢進させるタンパクの発現上昇が示唆された。また、炎症性サイトカインの発現が増加しており、X 線照射後慢性期の脳組織実質における微小環境の変化 (tumor bed) に関与している可能性が示唆された。実験 B では移植したグリオーマ細胞自体には放射線は当たっていないため、腫瘍細胞で観察された変化 (増殖能、アポトーシス、血管新生、浸潤能) は腫瘍細胞が移植された脳実質組織の微小環境 (tumor bed) の差によるものと推察される。以上から、サイトカインを主体とする液性因子がグリオーマの増殖能、抗アポトーシス能、浸潤能、腫瘍血管新生能といった腫瘍の形質を修飾し、腫瘍細胞の増殖に利する環境に変容している可能性が示唆された。また、IR/Contra-tumor 群で形成された腫瘍も、コントロールと比較して、増殖能と抗アポトーシス能が有意に高まっており、放射線治療による照射後慢性期の組織微小環境 (tumor bed) の変化は、X 線の照射範囲外にも及んでいる可能性が高いと考えられた。

《結 論》

X 線照射後慢性期の脳組織の微小環境はグリオーマ細胞の増殖や浸潤に適した環境へと変容していることが示唆された。

論文審査結果の要旨

放射線照射後の組織環境は一般的に、腫瘍に対して不利な微小環境であると考えられている。一方で、悪性グリオーマは X 線照射から数ヶ月～数年後に摘出腔周囲から再発を来たすという事実がある。初期治療を耐え抜いた腫瘍細胞が再増殖する組織微小環境は、放射線が照射されて数ヶ月が経過した脳組織であり、初発時とは異なっていると考えられる。申請者は、X 線照射後慢性期の脳組織実質における微小環境の変化が、悪性グリオーマ細胞に与える影響について検討し、以下の知見を得た。

1. X 線照射から 3 ヶ月が経過した大脳半球では、炎症性サイトカインの発現が増加しており、微小環境の変化が関与している可能性が示唆された。
2. サイトカインを主体とする液性因子が移植したグリオーマ細胞の増殖能、抗アポトーシス能、浸潤能、腫瘍血管新生能といった腫瘍細胞の形質を修飾している可能性が示唆された。

以上より、X 線照射後慢性期の脳組織の微小環境はグリオーマ細胞の増殖や浸潤に利する環境へと変容している可能性が示唆される結果が示された。今後、グリオーマの再発を防ぐ新規治療法を開発するにあたり、照射後の脳組織における放射線障害による影響に着目した研究も行う必要があると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 14 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Scientific Reports 11(1): 22110, 2021 Nov

doi: 10.1038/s41598-021-01475-0