

氏 名	宮 田 と も
(ふりがな)	(みやた とも)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 26 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	The roles of platelet-derived growth factors and their receptors in brain radiation necrosis (脳放射線壊死における血小板由来増殖因子とそのレセプターの役割)
論文審査委員	(主) 教授 鳴 海 善 文 教授 梶 本 宜 永 教授 廣 瀬 善 信

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《はじめに》

脳腫瘍への局所高線量放射線治療により、脳腫瘍患者の予後は改善してきた一方で、脳腫瘍や頭頸部癌に対する放射線治療の副作用である遅発性脳放射線壊死(RN)の頻度が高まっている。広範な浮腫を引き起こす RN は深刻な問題となりうるが、その病態は、依然として、完全には解明されていない。

我々はこれまでに、症候性脳放射線壊死手術摘出標本を用い、RN の発生機序に hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、及び vascular endothelial growth factor (VEGF) が関与していることを報告してきた。更に、血管新生、血管拡張、微小出血、組織間浮腫で特徴づけられる壊死層周囲(perinecrotic area, PN)に reactive astrocyte や macrophage だけでなく microglia や lymphocyte も集簇し、macrophage や microglia が、IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  や NF $\kappa$ B 等の炎症性 cytokine を分泌し、RN に関与していることも示した。

このように、RN の病態に血管新生と炎症が強く関与していると我々は考えているが、その病態解明は未だ不十分と言わざるを得ない。

血小板由来増殖因子 (Platelet derived growth factors (PDGFs))は VEGF と分子構造が類似し、創傷治癒や血管新生に関与することが報告されている。臨床的にも抗 VEGF 抗体による治療では、難渋する例もあることから、VEGF 以外で血管新生作用を有する PDGFs 及びその受容体 (PDGFRs) が RN に関与する可能性を探るため、壊死巣除去術標本を用いた病理組織学的検討を行った。

## 《対象と方法》

### 症例

2006 年から 2013 年に我々の施設で壊死巣除去術を施行し、病理組織学的に RN と診断した 19 症例中、7 症例 (18~78 歳、男性 4 人、女性 3 人) を対象とした。頭頸部癌 2 例、膠芽腫 4 例、転移性脳腫瘍 1 例であった。放射線治療から RN と診断するまでの期間は、平均 16.5 か月であった。頭頸部癌の 2 例は、照射野に含まれていた側頭葉内の壊死性病変であり、腫瘍成分の頭蓋内進展の可能性は否定的で、純粋な RN の標本であると考えられる。

### 組織学的、免疫組織学的検討

組織標本は、ホルマリン固定の後、パラフィン包埋を行い永久標本とした。Hematoxylin & Eosin (H&E)染色で壊死層中心(NC)を確認し、同じサンプルを用いて免疫組織染色を行った。サンプルは脱パラフィン後、圧力鍋を用いて熱処理をすることで、抗原を賦活した。PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C、PDGF-D、PDGFR- $\alpha$ 、PDGFR- $\beta$ の抗体を使用し、全てのサンプルに ABC キットのプロトコールを用いた。

### 蛍光免疫染色

蛍光二重染色においても、同じサンプルを使用した。PDGF-C 或は PDGF-D と GFAP、CD68、hGLUT5、または、CD45 の組み合わせ、PDGFR- $\alpha$ 或は PDGFR- $\beta$ と GFAP、CD68、hGLUT5、CD45、または CD31 の組み合わせとした。GFAP、CD68、hGLUT5、CD45、CD31 は、それぞれ astrocytes、monocytes、microglia、lymphocytes、そして血管内皮細胞に対応している。一次抗体である CD68、hGLUT5、GFAP は 24 時間反応させ、PDGF-A、-B、-C、-D、PDGFR- $\alpha$ 、- $\beta$ は 48 時間反応させた。二次抗体には、Alexa Fluor 488 もしくは Alexa Fluor 546 を使用した。検鏡は LSM 510 laser scanning confocal microscope で観察した。

#### 統計学的検討

PDGFs の免疫組織染色を行ったサンプルを用い、NC と PN を顕微鏡下(200 倍)に確認し、ランダムに 5 視野撮影した。各視野で確認できる全ての細胞に対して PDGF 陽性細胞が占める割合を計測し、各 isoform の発現頻度を比較した。計測は 2 名の観察者で行い、1 名の観察者は患者背景に関する情報を提供されていない。PDGF 陽性細胞の割合を各 isoform 間で比較し、Steel-Dwass test (JMP pro 10, SAS Institute, USA)で解析した。

#### 《結 果》

##### PDGFs の発現

検討した 7 症例全てにおいて同様の結果であった。H&E 染色では、NC、PN、血管新生および微小出血が観察できた。PDGFs 陽性細胞は全て PN に集簇しており、形態学的に PDGF-A と-B は monocyte と血管内皮で陽性を示した。PDGF-C と-D は monocyte、血管内皮だけでなく、reactive astrocyte で陽性を示した。また、PDGFs の陽性像は UB(undamaged brain)では観察できなかった。

##### PDGFRs の発現

免疫染色で PDGFR- $\alpha$ は PN の血管内皮、monocyte、そして reactive astrocyte に発現していたが、PDGFR- $\beta$ は PN の血管内皮に限らず、UB でも同様に血管内皮に限局して陽性を呈していた。検討した 7 症例において同様の結果であった。

#### PDGF isoform の発現頻度の比較

各 isoform 陽性細胞を比較すると、7 症例全ての症例で、PDGF-A、-B よりも多くの細胞が PDGF-C と -D を産生していた。統計学的に各 isoform の発現頻度を比較すると、PDGF-C と -D は PDGF-A と -B に比べて優位に発現頻度は高かった ( $p < 0.0001$ , Steel-Dwass test)。

#### 蛍光二重染色

PDGF-C と -D 陽性細胞は CD68、GFAP、hGLUT5、CD45 それぞれの陽性細胞の多くと一致していた。また、PDGFR- $\alpha$ は CD31、CD68、GFAP、hGLUT5、CD45 陽性細胞の多くと一致していたが、PDGFR- $\beta$ は血管内皮 (CD31 陽性細胞) のみに限局していた。

#### 《考 察》

PDGFs は、炎症などの幅広い分野で生理活性を担うタンパク質であり、過剰発現することで動脈硬化や腫瘍性疾患などの発症に関与するとの報告がある。ヒト RN における PDGFs の役割を検討する報告はこれまでになく、本研究は、RN における PDGFs 及び PDGFRs の発現を初めて検討したものになる。RN における免疫組織化学により、PDGFs と PDGFR- $\alpha$ は PN に集簇する macrophage、microglia、reactive astrocyte、lymphocyte、血管内皮細胞に発現しており、UB でのそれらの発現は確認されなかった。以上から RN の病態機序において PDGFs 及び PDGFR- $\alpha$ が積極的に関与する可能性が示唆された。

我々は以前の研究において RN の病態における炎症の重要性を示した。すなわち、macrophage や microglia などの mononuclear cell が炎症性 cytokine である IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NF $\kappa$ B を産生していることを明らかにしたしかし、CD45 陽性 lymphocyte は炎

炎症性 cytokine の CXCL12 に対応する receptor—である CXCR4 を発現していたが、CD45 陽性 lymphocyte そのものが炎症性 cytokine を産生しているわけではなかった。本研究では、CD45 陽性 lymphocyte は PDGF-C、-D を産生することで、間接的に RN での血管新生や炎症を誘導し RN の病態に関与していることが示唆された。このように、炎症に強く関与する macrophage、microglia、lymphocyte が PN に集簇し、それらが炎症性 cytokine のみならず PDGF-C、-D を産生しているという事実は、我々がこれまでに報告してきた、RN に炎症に関与しているという仮説を更に補強するものである。

## 《結 論》

血管新生や炎症で重要な役割を果たしている PDGFs、PDGFRs は、原疾患や放射線治療の種類によらず、RN の病態に関わっている可能性がある。PN における PDGF-C、-D、PDGFR- $\alpha$  発現上昇が重要と考えられたことから、それら PDGF-C、-D、或いは PDGFR- $\alpha$  の阻害を行うことが、RN の新規治療法となる可能性がある。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

遅発性脳放射線壊死(RN)は、放射線治療を行った全ての頭頸部癌患者に起こり得る合併症であり、その病態は依然として完全には解明されておらず、global standard な治療法は確立されていない。RN の病態が解明されれば、予防と治療が可能になり ADL や QOL が改善できると考えられる。申請者らはこれまでに、RN の発生機序にさまざまな molecule や chemokine の関与を報告している。RN の更なる病態解明のために、近年様々な生理活性を担っていることが報告された血小板由来増殖因子 (Platelet derived growth factors、PDGFs) とその receptor (PDGFRs) に注目し、retrospective に検討を行った。

まず、壊死巣除去術を施行したヒト検体を用いて免疫組織化学的検討を行い、壊死巣周辺の組織に PDGFs、PDGFRs が発現していることを確認した。次に、二重染色による各 isoforms の比較検討により、PDGF-C、-D が macrophage、microglia、reactive astrocyte、lymphocyte において、PDGFR- $\alpha$  が macrophage、microglia、reactive astrocyte、lymphocyte、血管内皮細胞において、ある程度の特異性を持って発現上昇を示していた。また、この事実結果は、放射線治療を施行するに至った原疾患や放射線治療のモダリティーに関わらず、全ての壊死巣除去術を施行した組織標本で同様であった。以上より、PDGFs 及び PDGFRs、特に PDGF-C、-D、PDGFR- $\alpha$  が RN の病態に関与している可能性が示唆され、同時にこの結果は PDGF-C、-D、或いは PDGFR- $\alpha$  の阻害が RN の新規治療法となる可能性をも示しており、その実験的根拠と成る本研究は極めて重要な意味を有するものである。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 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)

Radiation Oncology 2014 Feb 11;9:51. doi: 10.1186/1748-717X-9-51.

<http://www.ro-journal.com/content/9/1/51>