

|               |                                                                                                                                     |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 頼 經 英 倫 那                                                                                                                           |
| ( ふ り が な )   | ( より つ ね え り な )                                                                                                                    |
| 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   | Inflammation as well as angiogenesis may participate in the pathophysiology of brain radiation necrosis<br>(脳放射線壊死における炎症および血管新生の関与) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主) 教授 鳴 海 善 文<br>教授 廣 瀬 善 信<br>教授 梶 本 宜 永                                                                                          |

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 《緒 言》

放射線治療機器の発達により脳腫瘍への高線量局所放射線治療が可能となり、脳腫瘍患者の予後は改善している。そのため観察期間も延長し、放射線治療の副作用の一つでもある遅発性脳放射線壊死が問題となっている。我々は血管新生及び炎症が脳放射線壊死の病態に関与しているという仮説を立てた。様々な腫瘍の組織型及び様々な放射線治療の modality で治療した脳放射線壊死標本を選択し、血管新生のみならず、炎症に関与する cytokine を含む各種抗体を用いた酵素抗体法による免疫組織染色を行い、さらに各分子を発現している細胞同定のために蛍光二重染色を行った。

## 《対象と方法》

大阪医科大学脳神経外科にて 2006 年から 2009 年に治療を行った脳放射線壊死患者 7 例（男性 3 例、女性 4 例、39～78 歳）を対象とした。全例、定位放射線治療（stereotactic radiosurgery、SRS）を含む X 線外照射治療を受けており、再発症例 5 例についてはホウ素中性子捕捉療法（boron neutron capture therapy、BNCT）を追加されていた。原疾患は頭頸部癌（耳下腺癌）2 例、膠芽腫 4 例、転移性脳腫瘍 1 例である。頭頸部癌症例は、放射線照射野に含まれた側頭葉の放射線壊死の検体であり、頭蓋内に腫瘍進展はなく、腫瘍細胞そのものによる脳放射線壊死への影響は否定的である。HE 染色の他に、VEGF(Vascular endothelial growth factor)、HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ )、CXCL12、CXCR4、GFAP(Glial fibrillary acidic protein)、CD68、hGLUT5(human glucose transporter 5)、CD45、IL(Interleukin)-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )、NF- $\kappa$ B(Nuclear factor-kappa B)の抗体を用い発現の有無を調べた。蛍光二重染色においても酵素抗体法の際と同様のサンプル及び抗体を使用した。

## 《結 果》

全ての症例において壊死巣中心部では細胞構築は認めなかった。また壊死巣と正常脳との境界部分（peri-necrotic area と呼ぶ）では、薄い 1 層の血管内皮で構成される、血管腔の拡張した新生血管が特徴的であり、微小出血や血漿成分の漏出による浮腫を認めた。この組織所見は原疾患の腫瘍型や、用いた放射線治療法の如何によらず普遍的な所見であった。Peri-necrotic area には GFAP 陽性細胞及び CD68/hGLUT5 陽性細胞の 2 種類の細胞が集簇していた。蛍光二重染色の結果、GFAP 陽性細胞は VEGF、CXCL12 を発現しており、一方 CD68/hGLUT5 陽性細胞は HIF-1 $\alpha$ 、CXCR4、IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  を発現していた。

## 《考 察》

以前我々は、抗 VEGF 抗体による治療もしくは脳放射線壊死組織を外科的に切除するこ

とにより病巣周囲の浮腫が改善することを示した。これは細胞に発現している VEGF の抑制、もしくは VEGF を発現した脳放射線壊死組織の除去が浮腫の改善につながることを示しており、脳放射線壊死の病態において VEGF が主な役割を果たしていることを示唆している。HIF-1 $\alpha$  は VEGF の転写調節因子であると同時に、炎症に関与する CXCL12-CXCR4 系の転写調節因子である。今回の実験結果より、脳放射線壊死の発症メカニズムを考えると、その第一のステップは放射線治療による腫瘍周辺脳組織内の血管損傷による虚血であり、これが hGLUT5 陽性の microglia における HIF-1 $\alpha$  の発現に結びつく。この虚血に関与する転写因子が reactive astrocyte からの VEGF 産生を促すことで脆弱な血管の新生を引き起こし、他方では CXCL12-CXCR4 系の activation も引き起こす。Ligand である CXCL12 が reactive astrocyte で発現し、その受容体である CXCR4 を発現したリンパ球、単球及び microglia を遊走させ、peri-necrotic area に集簇させる。さらに microglia から IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  などの pro-inflammatory cytokine が産生されることにより脳放射線壊死巣周囲の浮腫が増悪する。浮腫の増悪は周辺組織の更なる虚血に結びつき、peri-necrotic area の HIF-1 $\alpha$  が増加する。このようにして血管新生と炎症が持続することで、脳放射線壊死の増悪が生じると考えられた。

## 《結 論》

今回の研究で脳放射線壊死における分子機構の一部が示されたが、これらを厳密に証明するためには実験動物により脳放射線壊死モデルを作成し、発症過程の各時期における病態を解析する必要がある。動物モデルが作成できれば、抗 VEGF 薬以外の有効な薬物療法の開発や脳放射線壊死の発症予防に役立つ治療の開発につながるものと考えられる。脳放射線壊死の制御が可能となれば、今後、中枢神経系腫瘍に対する放射線治療の更なる貢献が期待でき、難治性悪性脳腫瘍の克服へつながるものと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

遅発性脳放射線壊死は、脳腫瘍への高線量局所放射線治療によって生じる副作用の一つであり、現在のところ抗 VEGF 抗体を用いた試験的治療が本学を中心に先進医療として実施されているが、それ以外に有効な治療法が確立していない。未だ不明な点が多い脳放射線壊死の病態に、血管新生及び炎症が関与していると想定して本研究は実施されている。脳放射線壊死組織を外科的に切除して得られた病理標本を用いて、免疫組織染色及び蛍光二重染色による検討が行われている。免疫組織染色の結果、壊死巣と正常脳の境界部分には GFAP 陽性細胞及び CD68/hGLUT5 陽性細胞の 2 種類が集簇していた。蛍光二重染色の結果、GFAP 陽性細胞は VEGF 及び CXCL12 を発現しており、一方 CD68/hGLUT5 陽性細胞は HIF-1 $\alpha$ 、CXCR4、IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  を発現していた。この組織所見は原疾患の腫瘍型や、用いた放射線治療法の如何によらず普遍的な所見であった。

本研究結果から、申請者は以下のような脳放射線壊死の病態機序の仮説を提唱している。虚血によって発現が上昇する HIF-1 $\alpha$  は、VEGF の活性化因子であると同時に炎症に関与する CXCL12-CXCR4 系の活性化因子である。本研究では、虚血に関与する転写因子である HIF-1 $\alpha$  の発現上昇は peri-necrotic area において、GFAP 陽性細胞からの VEGF 産生を促し脆弱な血管の新生を引き起こす。さらに HIF-1 $\alpha$  の発現上昇は、CXCL12-CXCR4 系を活性化して CXCR4 を発現した microglia を遊走させ、これにより IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  などの pro-inflammatory cytokine が産生される。これらのメカニズムにより、脳放射線壊死巣周囲の浮腫がさらに増悪する。

本研究は、ヒトの遅発性脳放射線壊死組織における血管新生及び炎症のメカニズムに初めて踏み込んだものである。本研究成果は、抗 VEGF 薬以外の脳放射線壊死に対する有効な薬物療法や、その発症予防の開発に貢献する可能性もあり、極めて重要な意義を持つものである。

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)

Journal of Radiation Research 55(4): 803-811, 2014