

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10325

研究課題名(和文)細胞吸着療法とプラスミン融解療法を組み合わせた悪性グリオーマ根絶療法の開発

研究課題名(英文)Project of malignant glioma cell absorption therapy and plasmin therapy

研究代表者

浅野 研一郎(Asano, Kenichiro)

弘前大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90312496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の浸潤を防止し一カ所に遊走沈着すれば効率的に治療を行える。AG1478包含高濃度プロテオグリカン人工基質を重層し腫瘍を吸着させる。その後フィブリンが主成分の人工基質へプラスミンを投与することで融解排出させれば、放射線治療も行わず悪性グリオーマの治療ができるのではないかと仮説をたてた。

人工基質を融解させるには10.0M程の高濃度のプラスミンが必要。そのため2回目注入(2.0M)を追加することが有効と判断した。そのためin vivoの実験でも14日目と16日目にプラスミンを注入する事で良好な結果が得られた。生存実験でもOS 91日と良好な結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：If we would protect glioma cell invasion and gather one part, we could treat them more effectively. After proteoglycan artificial matrix with molecular target medicine AG1478 were completed, tumor cells were absorbed in artificial matrix. After that we would inject plasmin to artificial matrix composed fibrin mainly and melted out, we would treat malignant glioma completely without radiation therapy. We planned the theory of this new strategy. We found out that the concentration of plasmin would need 10.0M high concentration, and needed the two step injections of 2.0M concentration in 14 and 16 post operation day. And so, this new strategy revealed good result and long survival OS 91 days. However, a couple of dissemination recurrence case and distant recurrence case were seen, so we need to explore of these new recurrence patterns.

研究分野：医歯薬分野

キーワード：悪性グリオーマ 細胞吸着療法 プラスミン融解療法

1. 研究開始当初の背景

悪性グリオーマが予後不良である原因の1つとして、腫瘍細胞の浸潤性の強さあげられる。そこで申請者は、腫瘍細胞の浸潤を防止し、一カ所に遊走沈着させることにより効率的な治療が可能になると考え、以下の経過で研究を進展させてきた。

1) 腫瘍摘出術後、グリオーマ細胞に対して間接的細胞接着因子(N-カドヘリン)増強作用を有する分子標的治療薬(AG1478)を摘出面に塗布し、腫瘍細胞を凝集させることに成功した(高濃度プロテオグリカン人工基質)。

2) ラットの実験的脳腫瘍摘出術摘出後、高濃度プロテオグリカン人工基質を摘出腔壁に重層し、グリオーマ細胞を人工基質へ吸着させる実験モデルを開発した。

3) 腫瘍細胞を吸着させた高濃度プロテオグリカン人工基質に対する局所的放射線照射モデルを開発し、その有効性を証明した。

しかし、申請者が開発したこの治療プロセスにおいて、人工基質の遺残と放射線に起因する肉芽反応が解決すべき問題であった。そこで今回の研究では、放射線を行うことなくフィブリン主成分である高濃度プロテオグリカン人工基質をプラスミンを用いて融解排出させ、効率的に遺残腫瘍を根絶させることは可能かどうか問題意識を持った。

2. 研究の目的

人工基質はフィブリンであり、融解させるにはプラスミンが必要である。従来の実験では人工基質に生体の血管は入りづらく、プラスミノーゲンの血液からの供給はない。よって人工基質相手に融解療法として tPA 製剤の投与は無効と考えられ、プラスミンの直接投与が必要と考える。つまりプラスミンを定位的に人工基質へ直接投与し、融解・排出させる必要がある。

プラスミン融解療法は硝子体黄斑癒着症や特発性黄斑穿孔症、さらには糖尿病性網膜症に伴う症候性硝子体黄斑癒着症に対する硝子体切除術における前処置として実用化されており、本治療により手術回避率も向上し、臨床応用もしやすい分野と考えられる。

よって以上の開発が成功すれば、悪性グリオーマの根治が達成できる可能性がある。この試みは、従来全く検討されていない極めて斬新な着想に基づく研究であり、このプロジェクトが成功すれば、まだプロテオグリカンへの遊走などが調べられていない他の脳腫瘍や各種癌に対しても応用可能となると予想され、脳神経外科領域を超えた新しい研究手法につながる目的がある。

さらにこの治療法の最大の副産物は、悪性グリオーマの手術を含めた初期導入療法において放射線治療を省略できるという最大の利点がある。放射線を使用することは有益性のみならず、副作用も問題であることを認識すべきである。高齢者の場合は認知症の原因ともなるし、長期生存例においては放射線性二次性癌の発症が最大の課題である。さらに初期導入療法において放射線を省略できるため、再発時にやむを得ず使用することも可能である。

3. 研究の方法

平成 27 年度

In vitro の実験系の確立として、腫瘍細胞のコントロールと人工基質のプラスミンによる融解が効率的にできるように成分調整を行う。

- 1) 基底膜を模して作られた ECMatrigel に C6-GFP を入れ 48 時間インキュベートし浸潤モデルを作成する。
- 2) 至適濃度 0.1nmol/ml の AG1478 を ECMatrigel へ投与。抗腫瘍効果と間接的 N-Cad 増強作用により、C6-GFP を凝集させる。

- 3) 高濃度プロテオグリカンとフィブリンブルーで人工基質を作成、C6-GFP を遊走させ人工基質に吸着させる。
- 4) 約 1 週間反応させた後、プラスミンを種々の条件で投与する。
- 5) 至適投与量を求める。
- 6) 培養日数やプラスミンの投与条件を変更し、もっとも効果的に融解させる投与条件を求める。

以上の *in vitro* の実験で、プラスミン投与の至適条件を求め、プラスミンにより効率的に人工基質の融解ができているかどうか *in vivo*(次年度)の実験で検証する。

平成 28 年度

In vivo の実験にてこの方法論が正しいことを確認し、プラスミンの調整とその融解産物により周辺脳組織にダメージが及ばないかどうかを検討する。

- 1) 深麻酔下、ラット右前頭葉へ定位的に C6-GFP 細胞を 10ul (1×10^6 /ml)接種する。
- 2) 2 週間後、深麻酔下、開頭にて脳腫瘍摘出術を行う。なお腫瘍細胞は GFP があるため、蛍光実体顕微鏡下に脳腫瘍摘出術を行うことが可能である。
- 3) 腫瘍摘出後 AG1478 を摘出面に局所投与し、摘出腔に高濃度プロテオグリカン人工基質を注入する。
- 4) 3 週間目、前年度求めた至適投与量を元に定位的にプラスミンを局所投与する。
- 5) 数日後(前年度の反応条件にて求める)再度定位的に穿刺排液・洗浄。4 週間目安楽死させ、脳を摘出する。

以上の *in vivo* の実験より、脳内の高濃度プロテオグリカン人工基質内の腫瘍細胞が効率よく処理されていること、周辺脳組織の浮腫や、周辺脳組織のプラスミンによる障害がないことを確認する。

平成 29 年度

従来人工基質を放射線照射した方法と比較検討し、本プロジェクトの有効性を証明する。さらに生存率向上を確認する。

1) 以下 2 群に分ける。

①高濃度プロテオグリカン人工基質にプラスミンを投与せず放射線照射をする群(コントロール実験群)。

②高濃度プロテオグリカン人工基質を摘出せず、プラスミンを投与する群

以上の 2 群は最終治療より 14 日後安楽死させ、プラスミン融解療法の有効性を確認し、同時に周辺脳組織のプラスミンの影響を検討する(治療動物実験群)。

- 2) 同様の実験を行い、各群の生存日数の観察を行い、生存日数を比較観察する。死亡した症例も標本の摘出を行い、腫瘍の再発様式、周辺浮腫や周辺脳組織のダメージの程度につき病理学的判定を行う。

前年度と同様に標本作製と画像解析を行い定性・定量評価を行う。以上より、腫瘍細胞を吸着した高濃度プロテオグリカン人工基質がプラスミンにより効果的に処理されていることを確認し、本プロジェクトの有効性と生存率向上を確認する。

4. 研究成果

—平成 27 年度—プラスミン融解療法の確立

In Vitro の実験において、プラスミンの人工基質への融解反応性を確認し、本プロジェクトの研究基盤が確実に次年度以降のプロジェクトが可能であることを確認することを最大の目標とした。以下の手順で研究を進めた。

1)基底膜を模して作られた ECMatrigel に C6-GFP を入れ 48 時間インキュベートし浸潤モデルを作成し、ECMatrigel 10nmol G6-GFP 5×10^6 コが至適条件であることを確認。

2)至適濃度 0.1nmol/ml の AG1478 を上記

条件の ECMatrigel へ投与。抗腫瘍効果と間接的 N-Cad 増強作用により、C6-GFP を凝集させる。

3) 約 1 週間反応させた後、プラスミンを種々の条件で投与する。

4) 至適投与量を求めるたが、10.0M の高濃度でも周辺 5mm 付近の人工基質遺残が認められた。培養日数やプラスミンの投与条件を変更し、もっとも効果的に融解させる投与条件を求めたが、やはり血流がないところでは限界があると判断された。定量判定はクレシールバイオレッドにて細胞染色し、脱色後吸光度計にて定量判定する (Fig.1)。

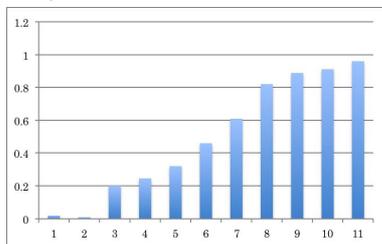


Fig1. 吸光度の濃度をとると、ほぼ 10.0M 付近で定常状態となることわかる。

実験解析として、病理標本を作成し定性評価をしたところ上記と同様周辺遺残が認められた。画像解析ソフトを用いて ECMatrigel に残存する C6-GFP の有無、人工基質に遊走した C6-GFP、融解液中の細胞数を計測し、効果を検討したが、融解物内に生存腫瘍細胞はほとんどないことが確認された。しかし周辺遺残物には生存細胞がみられた。

そのため濃度などを調節し、効果的に融解させる投与条件を求めたが、やはり血流がないところでは限界があると判断された。

そのためセルロプラスミン 2 回注入療法の実験解析と病理標本による検証を行った。その結果 2 回目のセルロプラスミン注入では 2.0M ぐらいの濃度でも融解が見られ、画像解析ソフトを用いても周辺部付近にはほとんど生存細胞が見られないようになった。従って 2 回注入療法では初回 10.0M、

2 回目は 2.0M が至適濃度と考えられた。

-平成 28 年度-動物実験モデルの開発

前年度の実験結果として少々実験治療変更が生じた。本年度は in vivo の実験を中心として行うが、実験手順 1)~4) まで是不変である。ちなみにプラスミンは腫瘍摘出術 14 日後に投与し、投与濃度は 10.0M である。以下変更点を示す。

5) 2 日後(16 日目)再度定位的に穿刺排液・洗浄し、再度 2.0M のセルロプラスミンを投与する。

6) さらに 2 日後(18 日目)定位的に穿刺排液・洗浄する。

7) 4 週間目安楽死させ、脳を摘出し標本作製する。

前年度の至適条件で求めた 10.0M 濃度の一回投与のみでは摘出壁約 5mm で人工基質が遺残し、腫瘍細胞の遺残と強い脳浮腫がみられ、in vitro の実験と in vivo の実験がほぼ平行であることが確認された。そのため 2 回目の 2.0M プラスミン投与にてほぼ遺残人工基質が無くなること示された。また、投与間隔はほぼ 1 日の間隔で良いことが示された。

画像解析ソフトを用い、脳内に腫瘍細胞は残存していないか、また人工基質画残存していないかどうか確認したところ、やはりごく少量の腫瘍細胞の遺残が見られた。腫瘍濃度としても 1.0×10^2 以内と推定された。しかしやや強い脳浮腫が約 8 割の症例に見られた (Fig.2)。

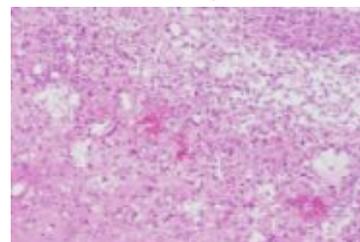


Fig.2 強い脳浮腫とマクロファージの浸潤が見られる。

しかし術後ステロイド療法を併用することにより、ほぼ許容範囲と考えられた。また有害作用としては 1 日おきに全麻下セル

ロプラスミンの注入と洗浄排液を繰り返すため、麻酔によるラットの死亡症例が約12.5%見られた。しかし、もし人の臨床応用する場合、摘出腔内にオンマヤリザーバを留置することで、麻酔処置なしにセルロプラスミンを注入し洗浄廃液できるため、この問題は解決できると考えられた。

-平成 29 年度-長期生存実験

前年度までの in-vitro と in-vivo の実験より以下の如くプロトコルを再決定した。

1) ~3)までは同様。 4)14 日目脳腫瘍摘出術の際に 10.0M プラスミンを局所投与する。5)16 日後(再度定位的に穿刺排液・洗浄後 2.0mM プラスミン注入。6)18 日目定位的に穿刺排液・洗浄する。

以下 2 群で比較した。

①高濃度プロテオグリカン人工基質にプラスミンを投与せず放射線照射をする群(コントロール群)

②プラスミンを投与する群(プラスミン群)

結果としてはプラスミン群の有意性が証明され、長期生存実験でも平均生存 71 日(28~99)と 91 日(31~129)であり有意差がみられた (Fig.3)

この治療成績は人工基質に放射線を投与した実験(科研費基盤 C: 90312496)よりも成績が向上(65 日と 87 日)していることが示された。

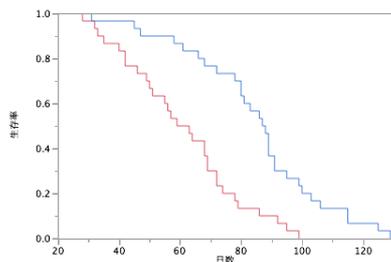


Fig.3 両群カプランマイヤー曲線。赤：コントロール群、青：治療群、双方に統計的有意差が見られている。

課題として局所制御率は非常に良いものの、髄液播種や遠隔転移の再発の問題が浮き彫りとなった (Fig.4)。確実な原因は不明であるが、局所制御は放射線治療を行う事無く制御できているため、治療前早期の

腫瘍動態が関与しているものと推定された。今後この病態の解明と予防治療の開発が急務である。



Fig.4 脊髄背面に肉眼的所見としても髄液播種が見られている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Asano K, Kurose A, Kamataki A, Kato N, Ogawa K, Katayama K, Kakuta K, Fumoto T, Ohkuma H. Importance and accuracy of intraoperative frozen section diagnosis of the resection margin for effective carmustine wafer implantation. Brain Tumor Pathol. 2018 [in press] 査読あり。

2. Kayama T, Sato S, Sakurada K, Mizusawa J, Nishikawa R, Narita Y, Minako Sumi M, Miyakita Y, Kumabe T, Sonoda Y, Arakawa Y, Miyamoto S, Beppu T, Sugiyama K, Nakamura H, Nagane M, Nakasu Y, Hashimoto N, Terasaki M, Matsumura A, Ishikawa E, Wakabayashi T, Iwadate Y, Ohue S, Kobayashi H, Kinoshita M, Asano K, Mukasa A, Tanaka K, Asai A, Nakamura H, Abe T, Muragaki Y, Iwasaki K, Aoki T, Watanabe T, Sasaki H, Izumoto S, Mizoguchi M, Matsuo T, Takeshima H, Hayashi M, Jokura H, Mizowaki T, Shimizu E, Shirato H, Tago M, Katayama H, Fukuda H, Shibui S, Japan Clinical Oncology Group. Effects of Surgery With Salvage Stereotactic Radiosurgery Versus Surgery With Whole-Brain Radiation Therapy in Patients With 1-4 Brain Metastases (JCOG0504): A Phase III, Non-Inferiority, Randomized Controlled Trial. J Clin Oncol. 2018 [in press] 査読あり。

3. Asano K, Katayama K, Kakuta K, Ohkuma H. Prototype screwdriver stopper to avoid intracranial penetration injury. Neurosurg Rev. 2018 Jul;41(3):895-898. 査読あり。

4. Wakabayashi T, Natsume A, Mizusawa J, Katayama H, Fukuda H, Sumi M,

Nishikawa R, Narita Y, Muragaki Y, Maruyama T, Ito T, Beppu T, Nakamura H, Kayama T, Sato S, Nagane M, Mishima K, Nakasu Y, Kurisu K, Yamasaki F, Sugiyama K, Onishi T, Iwadate Y, Terasaki M, Kobayashi H, Matsumura A, Ishikawa E, Sasaki H, Mukasa A, Matsuo T, Hirano H, Kumabe T, Shinoura N, Hashimoto N, Aoki T, Asai A, Abe T, Yoshino A, Arakawa Y, Asano K, Yoshimoto K, Shibui S; Members of Japan Clinical Oncology Group Brain Tumor Study Group (JCOG-BTSG). JCOG0911 INTEGRA study: a randomized screening phase II trial of interferon β plus temozolomide in comparison with temozolomide alone for newly diagnosed glioblastoma. J Neurooncol. 2018 Mar 20. doi: 10.1007/s11060-018-2831-7. [Epub ahead of print] 査読あり.

5. Katayama K, Matsuda N, Kakuta K, Naraoka M, Takemura A, Hasegawa S, Akasaka K, Shimamura N, Itoh K, Asano K, Hiromu K, Ohkuma H. The effect of goreisan on the prevention of chronic subdural hematoma recurrence - multicenter, randomized controlled study. J Neurotrauma. 2018 Feb 14. doi: 10.1089/neu.2017.5407. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29444611. 査読あり.

6. Naraoka M, Matsuda N, Shimamura N, Asano K, Akasaka K, Takemura A, Hasegawa S, Ohkuma H. Long-acting statin for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Cereb Blood Flow Metab. 2017 Jan 1;271678X17724682. doi: 10.1177/0271678X17724682. [Epub ahead of print] 査読あり.

7. Asano K, Katayama K, Kakuta K, Oyama K, Ohkuma H. Assessment of the Accuracy and Errors of Head-Up Display by an Optical Neuro-navigation System in Brain Tumor Surgery. Oper Neurosurg. 13:23-35, 2017 Feb 1;13(1):23-35. 査読あり.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 浅野研一郎、片山耕輔、角田聖英、奈良岡征都、大熊洋揮. 手術支援としての Head Up Display における MRI プロトン密度強調画像利用のこだわり. 第 41 回日本脳神経 CI 学会総会. 平成 30 年 3 月

2. 浅野研一郎、長谷川聖子、片山耕輔、大熊洋揮. 転移性脳腫瘍における脳腫瘍関連てんかんの頻度とリスクファクターについて. 第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会. 平

成 29 年 11 月

3. 浅野研一郎、片山耕輔、角田聖英、大熊洋揮、黒瀬顕. PDT 導入に伴う当院での運用上と看護上の諸問題. 第 38 回日本レーザー医学会総会. 平成 29 年 11 月

4. 浅野研一郎、片山耕輔、角田聖英、大熊洋揮、黒瀬顕. Navigation guide fence post 法を応用した経鼻的経蝶形骨洞の手術のアプローチ法. 第 22 回日本脳腫瘍の外科学会. 平成 29 年 9 月

5. 浅野研一郎、片山耕輔、角田聖英、加藤哲子、黒瀬顕、大熊洋揮. ギリアデル貼付を念頭に置いた術中迅速断端標本の正診率についての検討. 第 35 回日本脳腫瘍病理学会. 平成 29 年 5 月

6. 浅野研一郎、片貝武、片山耕輔、松田尚也、奈良岡征都、大熊洋揮. チタンプレート固定用刺傷防止ドライバーストッパーの試作. 第 26 回脳神経外科手術と機器学会. 平成 29 年 4 月

〔図書〕(計 1 件)

1. 浅野研一郎、黒瀬顕. 脳腫瘍臨床病理カラーアトラス 第 4 版. 医学書院. PP188-189. 平成 29 年 10 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野研一郎 (Asano Kenichiro)
弘前大学大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90312496