

令和 4 年 3 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04299

研究課題名(和文) 脳内広範囲薬剤送達技術を用いたChemical Surgery確立に向けた基礎研究

研究課題名(英文) Basic Research for Development of Chemical Surgery

研究代表者

齋藤 竜太 (Saito, Ryuta)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10400243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳内広範囲薬剤送達技術の基礎研究として(1)投与薬剤の代謝経路解明：RI標識した塩酸ニムスチンによる薬物動態、質量分析による薬剤の局所分布可視化、(2)生体内での薬剤動態の可視化：MRI撮像技術の開発、(3)最適投薬剤形の選択に関する知見の総括・ACNU剤形の決定：剤形による投与後局所での薬剤拡散・薬剤クリアランスの違いを総括し、ACNUの剤形を確定した、(4)新規超音波送達システムを用いる際の超音波が脳に与える影響の解明：新規超音波システムの音場特性評価として水中における超音波の伝搬を測定しデータの集積を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CEDは拡散を利用した従来の脳内局所投与とは異なり、陽圧をかけ、脳構造に機械的な損傷を加えることなく脳組織間隙に広範囲で高濃度の薬剤分布が得られる新規薬剤投与方法である。薬剤の脳内分布は注入量と速度によりある程度制御可能で、薬剤による全身合併症はほとんど無視できるレベルにとどまるとされている。近年の分子生物学の発展により、遺伝子治療を初めとする核酸医薬、分子標的薬の投与にも局所投与は必要になると考えられ、病変局所に広く投薬できる手法の開発は新たな医療開発の可能性を秘めている。特に血液脳関門による薬剤送達困難のため、アンメットメディカルニーズが高い中枢神経疾患の治療においては重要な分野となっている。

研究成果の概要(英文)：Basic research of local convection-enhanced delivery (CED) was performed and following data were acquired. 1)Detection of local distribution and analysis of route of clearance after CED of ACNU. Mass spectrometric analysis demonstrated the robust distribution of ACNU after CED in the brain parenchyma. Radiolabeled ACNU enabled the detection of systemic clearance route after CED. 2)Establishment of MRI detection method to monitor the drug distribution without using contrast enhancing agent. We succeeded to monitor the drug distribution using T2-map based MRI. 3)The effect of pharmaceutical preparation on CED was summarized. The appropriate preparation of ACNU was defined. 4)Aiming at evaluating the effect of ultrasound on brain tissue with our newly developed ultrasound facilitated drug delivery system, acoustic characteristic of the device was analyzed by accumulation of the data measuring the conduction of ultrasound in the water.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳内薬物代謝経路 ドラックデリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Convection-enhanced delivery (CED)は、薬剤を持続陽圧下に脳細胞間隙に局所注入し高濃度かつ広範囲薬剤分布を得る新規薬剤投与方法であり、血液脳関門をバイパスする効率的な脳実質内薬物送達を実現する画期的技術である。

我々は悪性脳腫瘍治療に対する CED 治療の基礎研究を 2005 年より開始し齧歯・霊長動物を用いた前臨床試験を経て(Sugiyama S et al. J Neurooncol 2007; Sugiyama S et al. Neurol Res 2008; Kikuchi T et al. J Neurosurg 2008; Inoue T et al. Neuro Oncol 2009)、抗腫瘍薬 ACNU の脳内分布を MRI 画像モニタリング下に CED 投与する新規治療法の開発に世界で初めて成功した。東北大学倫理委員会の承認を得て 2008 年再発神経膠腫の臨床応用に至り安全性、有効性の評価を実施した。更に現行治療では未だ予後不良な脳幹部神経膠腫の治療に成功し(Saito R et al. J Neurosurg Pediatr 2011)、2011 年より新たに東北大学倫理委員会の承認を得て脳幹部神経膠腫の治療研究を行い、Phase I 研究を終了し、医師主導治験へ向けた準備を進めている。脳腫瘍臨床研究を進める一方で、投薬技術の改良、安定化も進めてきた。我々は超音波併用装置を開発し薬剤分布容積を拡大させることに成功し、特許を取得した。また、中枢神経系他疾患への応用として、てんかん、脊髄疾患への応用研究を進めてきた。しかし、変性疾患など、幅広く中枢神経疾患に応用するためには解決が必要な問題が存在する。1 つは投薬後の薬剤動態の詳細解明、2 つ目は造影剤を用いない投薬の可視化技術開発、3 つ目は最適投薬剤形の選択、4 つ目は新規超音波送達システムを用いる際の超音波が脳に与える影響の解明である。

2. 研究の目的

(1) 投与薬剤の代謝経路解明

薬剤の局所投与後の動態はまだ解明されていない。脳内薬剤送達は脳組織細胞間隙に薬剤を送る。血管周囲、神経線維周囲は薬剤が比較的浸透しやすい部位として知られている。一方で、脳内異物のクリアランス経路はまだ分かっていないことが多いものの、血管周囲腔を介して頸部リンパ節へ流出する経路が提唱され、また最近では硬膜静脈洞にリンパ管様構造があることが示され注目されている(Nature 523, 337-341, 2015)。細胞間隙に投与された薬剤は一部細胞に取り込まれ抗腫瘍効果をもたらす、一部は局所の血管系に取り込まれて全身循環に入る。しかし、一部は細胞間隙から間質液の流れに乗り、除去されると考えられる。脳腫瘍に対する治療開発の一環として、ラジオアイソトープ(RI)標識抗がん剤(ACNU)を平成 28 年度に入手予定であり、これを用いて、薬剤動態の全容解明を目指す。また、質量分析法を用いて薬剤代謝産物の動態も追跡する。

(2) 生体内での薬剤動態の可視化：MRI 撮像技術の開発

薬剤投与を可視化する MRI 撮像技術の開発を行い薬剤分布、クリアランスの生体でのモニタリング法開発を目指す。当科で開発を進めている脳腫瘍に対する CED による薬剤投与では、MRI 造影剤を投与薬剤に混合することにより、薬剤分布モニタリングを行っている。ただ、MRI 造影剤の毒性も考慮すると正常脳への投与となる他の中枢神経疾患に対する投薬においては、MRI 造影剤を混合することは困難である。したがって、MRI 造影剤を用いない薬剤追跡法の開発が必要であり、この技術開発を目指す。候補となる MRI シークエンスは T2WI, DWI である。T2map, ADC などにより数値的な変化を解析する技術開発を行い、薬剤分布とそのクリアランスを可視化する技術の開発を目指す。

(3) 最適投薬剤形の選択

これまでの研究で申請者らは投薬に注目して投薬剤形の選択法を検討してきた。結果としては投薬時の拡散に関しては、周囲脳組織に親和性が低いほど(脂溶性より水溶性、陽性電荷よりも陰性電荷)薬剤の拡散は良好になることを示してきた。またこの組織親和性を低下させるためにリポソーム、高分子ミセルなどの薬剤担体の有用性を示してきた。しかし、投薬後のクリアランスに関しては、水溶性ほどクリアランスが早くなる可能性も見出しており、拡散からクリアランスまでの全体を考慮した最適剤形に関する知見を得る必要がある。これにより、疾患に応じた剤形選択が可能となる。

(4) 新規超音波送達システムを用いる際の超音波が脳に与える影響の解明

脳内薬剤送達において超音波を併用することで投薬効率を 1.5 - 2 倍以上改善できることを示してきた。新規投薬機器を開発し、特許を取得するとともに論文報告している。脳内投薬機器としては全く新規の方法であり、この機器を実際の脳内投与に用いる際には超音波が脳に与える影響を解明する必要がある。超音波条件と脳損傷の相関を検討する。

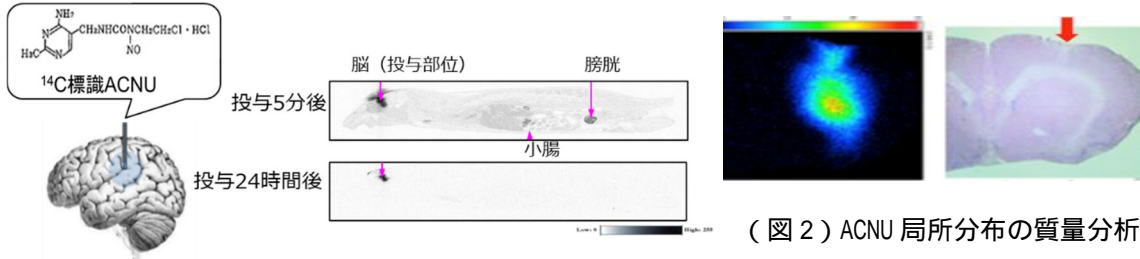
3. 研究の方法

CED・超音波併用投薬法により RI 標識 ACNU を投与し、投与後の薬剤代謝の詳細を解析する。特に間質液の流れに乗って排除される経路に注目して解析する。続いて、この経路に注目して薬剤剤形の違いによる薬剤拡散とクリアランスの全体像を検討し、本投薬に最適の剤形を決定する。同時に薬剤投与に際して、MRI を撮像し、最も薬剤の動態を反映する MRI シークエンスの同定を行う。主に T2WI, DWI を中心として 7 テスラ MRI を用いて詳細に解析し、クリアランス経路の可視化も目指す。続いて、超音波併用薬剤送達システムを用いて脳に超音波が与える影響を検証する。時間的要素、超音波条件的要素を中心に脳に障害を与える条件を検討する。

4. 研究成果

(1) 投与薬剤の代謝経路解明

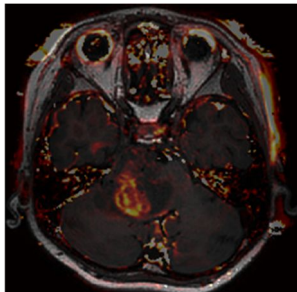
まず、RI 標識した塩酸ニムスチンを作成した(14C 標識 ACNU)。この 14C 標識 ACNU をラット脳内に局所投与し、その代謝をオートラジオグラムにより解析した(図 1)。脳内局所へ投与された薬剤は、投与部位には次第に代謝されながら 96 時間程度留まること、またそれ以外は体内へ分布した後に速やかに尿中、消化管中へ排泄されることが判明した。引き続き、局所での薬剤分布に関して解析した。ラット脳内への局所投与に際して、薬剤 ACNU と色素 evans blue を混合投与し、その直後にラットを安楽死させ、脳切片を作成した。質量分析法を用いて、作成した脳切片上での ACNU の分布を可視化する条件を検討、同定し、可視化に成功した(図 2)。実際の薬剤分布は、混合投与した evans blue 色素の分布とほぼ一致していることが確認できた。



(図 1) 標識 ACNU の代謝解析

(2) 投与薬剤の MRI による可視化

ラット脳内に薬剤投与を実施後に撮影した MRI を検討し、T2WI が最も有効に薬剤拡散を反映する可能性を確認した。これを受けて、臨床研究で薬剤投与を実施した症例において、薬剤局所投与後、MRI にて T2map を撮影し、投与前後で比較することで薬剤分布が可視化できる可能性を確認した。当科で実施した脳幹部神経膠腫症例に対する薬剤局所投与の臨床研究症例において、薬剤投与前後の T2map 画像を撮影し、解析したところ、腫瘍を有する実際の症例においても本法により薬剤分布を可視化できる可能性が示された。



(図 3) MRI T2WI map 画像の投与前後を差分して得られた薬剤分布画像

(3) 最適薬剤剤形の選択

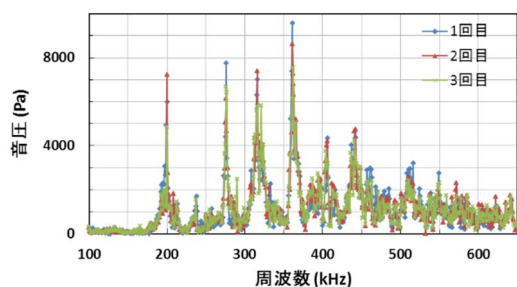
脳内局所薬剤投与に際しては、投与後局所での 1)薬剤拡散、2)投与後局所での薬剤クリアランスが薬剤動態検討における 2 つの大きな要素となる。前者の 1)薬剤拡散においては、投与される脳組織との組織親和性が低いことが重要な条件となることはすでに報告してきたが、組織親和性がある薬剤を投与する際には高分子ミセル、リポソームといった薬剤担体を使用することになる。これらの薬剤担体は、2)のクリアランスにも影響することになり、研究データから得られた知見を総括し、表に示した。

| | | 薬剤拡散 | 局所クリアランス |
|--------|--------|---|-------------------|
| 薬剤そのもの | | 1)中性もしくは陰性荷電 2)水溶性 その他、拡散は各薬剤に依存するため個別検討が必要 | 各薬剤に依存するため個別検討が必要 |
| 薬剤担体 | 高分子ミセル | 良好な拡散 | 数日 |
| | リポソーム | 良好な拡散(中性もしくは陰性荷電) | 数日～数週 |

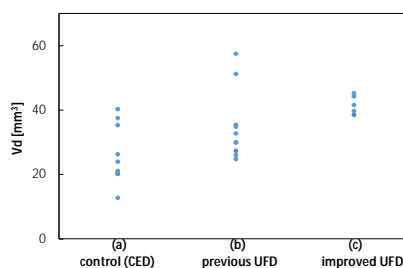
上記表は、薬剤選択に参考となるが、本研究における端緒となった観察は、水溶性薬剤(組織親和性の観点から、拡散には利点)の局所クリアランスが早くなる可能性があることであったが、この仮説は本研究におけるの研究で水溶性薬剤塩酸ニムスチンが 96 時間程度局所にとどまることが示され、否定的となった。結論として薬剤の局所クリアランスは、上記の表に示す如く各薬剤個別の検討が必要であることが判明した。また、治療開発に関して PMDA 相談を実施し、局所薬剤投与に際しては安全性の観点から投与薬剤の投与濃度での pH と浸透圧が重要になること

が指摘され、それぞれに関しても測定した。塩酸ニムスチンにおいては、開発濃度 0.75mg/mL で pH=4.2, 浸透圧 = 380 (mOsm)であった。

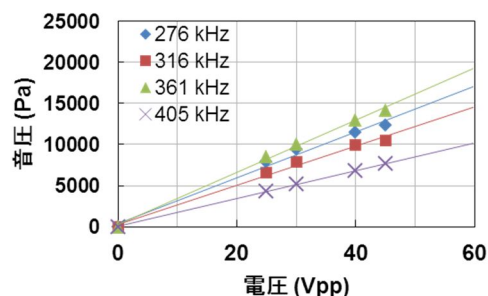
(4) 新規超音波送達システムを用いた薬剤送達の際に超音波が脳に与える影響の解明
 まず、新規超音波システムの音場特性評価として水中における超音波の伝搬を測定しデータの集積を行った。結果として、当科で開発した新規超音波送達システムにおいては、比較的安定した超音波条件が再現されることに加えて、従来のシステムにおいて 60 Vpp の駆動電圧を必要としていたが、新規システムでは 1/3 の電圧 20 Vpp にてこれまでと同様の音圧を確認した。また、超音波のエネルギーとなる音圧は、振動数により異なり、駆動電圧に比例することが確認された。このシステムを用いて、ラット脳内に色素投与研究を実施し、脳内薬剤拡散における最適周波数があるかを検討したところ、300kHz で駆動した際に最も有効な色素拡散が得られることが判明した。この結果を受けて、開発システムの特許申請を実施するとともに、システムの物理的特性を応用物理学会誌に投稿、掲載された。さらにこの条件で、脳への影響を検討したが、開発システムをこの条件で使用する範囲においては超音波による脳損傷は最小限であり、大きな影響は与えていないことが確認された。



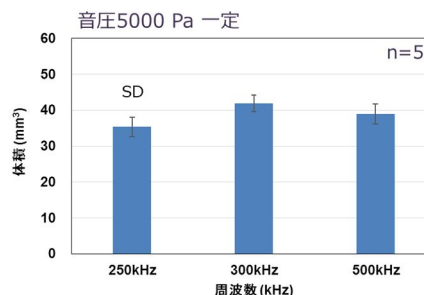
(図4) 新規超音波システムの音場特性評価



(図5) 高効率化と安定性評価

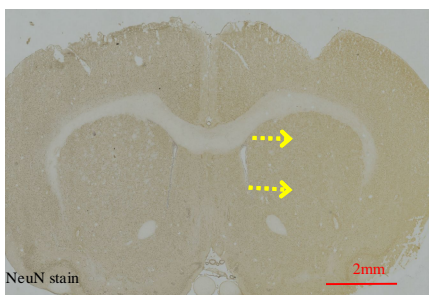


(図6) 電圧・振動数と音圧の関係



300 kHz時に色素容積が最大

(図7) 超音波条件と局所薬剤分布の関係



(図8) NeuN (神経マーカー) 免疫染色による局所毒性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Saito R, Kanamori M, Sonoda Y, Yamashita Y, Nagamatsu K, Murata T, Mugikura S, Kumabe T, Wembacher-Schroder E, Thomson R, Tominaga T. | 4. 巻 2(1) |
| 2. 論文標題 Phase I trial of convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride (ACNU) for brainstem recurrent glioma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neuro Oncol. | 6. 最初と最後の頁 1-9 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/oaajnl/vdaa033 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Endo T, Inoue T, Sugiyama S, Saito R, Tominaga T. | 4. 巻 1;18(4) |
| 2. 論文標題 Regression of Recurrent Spinal Cord High-Grade Glioma After Convection-Enhanced Delivery of Nimustine Hydrochloride: Case Reports and Literature Review | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oper Neurosurg (Hagerstown) | 6. 最初と最後の頁 451-459 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ons/opz172. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|--------------------------|
| 1. 著者名 Inoue Kenji, Sato Aya, Saito Ryuta, Wenting Jia, Okuno Saori, Ohashi Yuji, Kamada Kei, Yoshikawa Akira, Tominaga Teiji | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 Development and evaluation of ultrasound-facilitated drug delivery device | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics | 6. 最初と最後の頁 11UD07-1~5 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7567/JJAP.57.11UD07 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kenji Inoue, Aya Sato, Ryuta Saito, Jia Wenting, Saori Okuno, Yuji Ohashi, Kei Kamada, Akira Yoshikawa, Teiji Tominaga |
| 2. 発表標題 Development and Evaluation of Ultrasound-facilitated Drug Delivery Device |
| 3. 学会等名 2018 ISAF-FMA-AMF-AMEC-PFM Joint Conference (IFAAP 2018)（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|---|---|----|
| 研究 分担者 | 富永 悌二 (Tominaga Teiji) (00217548) | 東北大学・医学系研究科・教授 (11301) | |
| 研究 分担者 | 宇留野 晃 (Urano Akira) (90396474) | 東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授 (11301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|