

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10879

研究課題名（和文）再発悪性神経膠腫に対する定位的光線力学療法 第1相臨床試験

研究課題名（英文）Stereotactic interstitial photodynamic therapy of recurrent malignant glioma: phase I study

研究代表者

黒岩 敏彦 (Kuroiwa, Toshihiko)

大阪医科薬科大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：30178115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：照射計画ソフトの開発の遅れから5-ALA PDT臨床試験は開始することができなかつた。しかし、5-ALA PDTに必要な基礎研究を継続した。その結果、治療抵抗性であるグリオーマ幹細胞に対する5-ALA PDTの有効性を2つの側面から証明することができた。第一は、低酸素環境下のグリオーマ幹細胞に対する5-ALA PDTの有効性の証明である。第二は、より治療抵抗性が強い間葉系のグリオーマ幹細胞においても5-ALA PDTが有効であることを示した。一方、光照射においては、一重項酸素モデルと細胞死を誘導する一重項酸素閾値を用いた悪性脳腫瘍に対する5-ALA PDTの臨床シミュレーション手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠腫は、免疫療法や免疫療法が進歩した現在でも難治性の悪性腫瘍である。5-ALA PDTは、低侵襲な次世代治療として期待されており、活性酸素を介しているため、その照射計画は複雑になる。本研究では、その困難さにより臨床試験には到達できなかったが、一重項酸素モデルと一重項酸素閾値を使用した悪性脳腫瘍に対する5-ALA PDTの照射シミュレーション手法を開発した。また、最も治療抵抗性が強いとされる間葉系や低酸素環境下での腫瘍幹細胞においても5-ALA PDTが有効であることを示した。これらの結果は、5-ALA PDTの臨床応用に必要な基礎的基盤を築くことができたことを示している。

研究成果の概要（英文）：Due to delays in the development of the irradiation planning system, the phase 1 clinical trial for 5-ALA PDT could not be initiated. However, basic research necessary for 5-ALA PDT continued, and we were able to demonstrate its efficacy on glioma stem cells refractory to treatment from two aspects. First, we proved its efficacy on glioma stem cells under hypoxic conditions. Second, we demonstrated its efficacy even on more treatment-resistant mesenchymal glioma stem cells. Meanwhile, a clinical simulation method for 5-ALA PDT in malignant brain tumors was developed using a singlet oxygen model and a singlet oxygen threshold for inducing cell death under light irradiation.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性神経膠腫 光線力学療法 5-aminolevulinic acid 腫瘍幹細胞 一重項酸素

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、悪性神経膠腫の再発時における治療オプションの限られた現状を改善するため、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いた光線力学療法 (PDT) に着目したものである。悪性神経膠腫の再発時には、放射線治療や化学療法などの治療オプションがあるが、これらの治療法は効果が限定的であり、腫瘍細胞の治療抵抗性も高いため、再発後の生命予後を改善することは困難である。一方、5-ALA は安全に投与可能で、5-ALA による蛍光ガイド下切除術は、切除率の向上と生命予後の改善効果から、既に標準的治療となってきた。

そこで、本研究では、難治性の再発悪性神経膠腫に 5-ALA による光線力学療法 (5-ALA PDT) を行うことで、患者の QOL を維持しつつ生命予後を改善する可能性を検討するものである。Stummer らの先行研究により、5-ALA の PDT を光ファイバーによる組織内照射で行うと治療成績の向上と長期生存例が存在したことから、次世代の治療法として大きな期待ができる。

## 2. 研究の目的

治療抵抗性である再発の悪性神経膠腫は、治療の選択肢が少なく予後不良である。5 アミノレブリン酸を用いた光線力学療法 (5-ALA PDT) は、低侵襲かつ繰り返し治療が可能であることから、患者の QOL を維持しつつ生命予後を改善できる可能性がある。

本研究は、再発悪性神経膠腫に対して光ファイバーを定位的に誘導し、5 アミノレブリン酸を用いた光線力学療法の臨床試験を行うものである。将来の医師主導型臨床試験を見据えた、安全性の検証を目的とした第 1 相臨床試験を開始することが第一の目的である。

一方、5-ALA PDT のためには、治療計画システムの開発や治療抵抗性の腫瘍幹細胞に対して治療を有効にするために条件などの基礎研究も必要である。5-ALA PDT には多因子、すなわちプロトポルフィリン IX (PpIX) の組織内濃度、組織内励起光量、活性酸素の発生効率に関連することから治療計画システムは複雑なものとなる。しかし、これらの多因子を考慮した治療計画システムは存在しない。第 1 相臨床試験までの準備期間として、治療計画システムの確立、腫瘍幹細胞の治療抵抗性の克服などの基礎研究を行うことが第二の目的である。

## 3. 研究の方法

### 1) 5-ALA PDT システムの構築

5-ALA PDT システムの構築には、4 要素すなわち、レーザーファイバー、レーザー装置、プランニングソフト、定位的手術装置が必要である。定位的手術機器は、既設の CRW 社製を用いる。また、レーザー照射装置 (630 nm 最大出力 4W, Modulight 社) およびプランニングソフト (@target 1.19 software (BrainLAB AG)) は、無償供与の予定である。レーザーファイバー (CD403, CeramOptec GmbH, Bonn, Germany) のみ、本研究で購入する。レーザーファイバーは、シリンドリカルタイプの拡散放射ができるものである。

### 2) ALA iPDT の施行

上記セットアップをドイツの Stummer らの研究グループと共同で開発し、5-ALA PDT を開始する。この際に、副作用、神経学的な後遺症、出血、梗塞などについてモニターする。

### 3) 活性酸素発生効率を考慮に入れた 5-ALA PDT 照射計画システムの開発

5-ALA PDT には多因子、すなわち PpIX の組織内濃度、組織内励起光量、活性酸素の発生効率に関連する。大阪大学 粟津研究室と提携してこれらの多因子を考慮に入れた治療計画システムを構築する。

### 4) 腫瘍幹細胞の ALA PDT の治療抵抗性の評価と克服

腫瘍幹細胞の ALA PDT における種々の glioma 幹細胞の治療抵抗性について評価する。また、腫瘍幹細胞は低酸素環境下に存在するので、低酸素環境下での治療抵抗性についても評価する。

## 4. 研究成果

5-ALA PDT システムは、Stummer らのグループでの開発遅延により現時点でも開発が完了していない。このため日本における本研究の第 1 相臨床試験は行うことができなかった。一方、5-ALA PDT 照射計画システムに必要な基礎研究は完了した。5-ALA PDT における光物理過程の計算シミュレーションのための、治療結果を理解するための定量的ツールを開発した。すなわち、一重項

酸素モデルと細胞死を誘導する酸素閾値を用いた悪性脳腫瘍に対する 5-ALA PDT の臨床シミュレーション法を開発した。本手法では、これまでの研究で測定されている光増感剤のフォトブリーチング係数と一重項酸素の量子収率を用いて一重項酸素の発生量を算出するものである。MRI 画像を用いたシミュレーションの結果、円筒形光拡散体の挿入位置と光フルエンスのレベルを特定する必要性が示された。数値脳腫瘍モデルを用いた詳細な解析により、5-ALA PDT の治療成績は、フォトブリーチングと閾値の組み合わせに依存することが示された。これらの結果は、治療前計画や治療モニタリングを含む個々の医療処置において、5-ALA PDT の治療結果のシミュレーションが大いに役立つことを示した。この成果は、Izumoto A, Nishimura T, Hazama H, Ikeda N, Kajimoto Y, Awazu K. Singlet oxygen model evaluation of interstitial photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for malignant brain tumor. *J Biomed Opt.* 2019;25(06):1. doi:10.1117/1.JBO.25.6.063803 に報告した。

また、励起光が組織内への到達を予測するためには、組織の各波長における吸収や拡散の情報が重要である。膠芽腫、髄膜腫、乏突起膠腫、転移を含むヒト脳腫瘍組織について、脳神経外科医により「強蛍光」、「弱蛍光」、「無蛍光」に分類された蛍光の光学特性を測定した。組織の光学的特性は、二重積分球と逆モンテカルロ法を用いて 350 から 1000nm の範囲で測定した。生体外測定の原因から、420nm 付近の光学特性は組織中のヘモグロビン含有量に影響される可能性があった。強蛍光の悪性神経膠腫と無蛍光の悪性神経膠腫領域の光学特性の間に有意差はなかった。強蛍光の脳腫瘍組織と無蛍光の脳腫瘍組織の切片を H.E. で染色した。強蛍光領域と無蛍光領域の細胞密度は、それぞれ  $31 \pm 9 \times 10^2/\text{mm}^2$  と  $12 \pm 4 \times 10^2/\text{mm}^2$  と有意な差があった。また、蛍光強度が高いほど細胞密度が高かった。細胞密度の差は散乱係数を変化させたが、減少散乱係数の有意差にはつながらず、拡散蛍光の伝播には影響しなかった。この成果は、Honda N, Ishii K, Kajimoto Y, Kuroiwa T. Determination of optical properties of human brain tumor tissues from 350 to 1000 nm to investigate the cause of false negatives in fluorescence-guided resection with 5-aminolevulinic acid. *J Biomed Opt.* 2018;23(07):1. doi:10.1117/1.JBO.23.7.075006 に報告した

一方、腫瘍幹細胞は、一般に分化した腫瘍細胞よりも化学療法や放射線療法に対して抵抗性が強い。したがって、これらの細胞は腫瘍の再発や転移の傾向を強める傾向がある。5-ALA を介した 5-ALA PDT の神経膠腫幹細胞 (GSC) に対する有効性を検討した。結果としては、5-ALA PDT は間葉系 GSC を含むすべての GSC 株に対して有効であった。間葉系 GSC 株は高い PpIX 発現を示した。生き残った間葉系 GSC は、幹細胞マーカー発現と腫瘍形成能が低かった。間葉系 GSC の PpIX 産生能の高さはコロニー形成能の高さと関連しており、5-ALA PDT は PpIX 蓄積量の多い間葉系 GSC に対してより有効であった。本研究では、5-ALA PDT は、間葉系 GSC を含む GSC を標的とすることにより、悪性神経膠腫に対して臨床的に有効であることを示すものである。この成果は、Omura N, Nonoguchi N, Fujishiro T, et al. Ablation efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on human glioma stem cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2023;41(September 2022):103119. doi:10.1016/j.pdpdt.2022.103119 に報告した。

低酸素環境が 5-ALA PDT に対する GSC の感受性に及ぼす低酸素環境の影響を調べることを目的とした。低酸素下 GSC は、正常酸素下 GSC と比較して、Pp をヘムに変換する鉄合成に必要な FECH (フェロケラターゼ) の mRNA レベルが高かった。フローサイトメトリーにより、低酸素下 GSC における Pp の蓄積は ALA とのインキュベーションにより減少することが明らかになった。しかしながら、低酸素下 GSC は正常酸素下 GSC よりも 5-ALA PDT に対する感受性の低下が少なかった。この結果は、低酸素環境下の GSC は、正常酸素環境下に比べ、FECH の遺伝子発現が増加しているため、細胞内 Pp の蓄積量が少なく、低濃度の Pp を蓄積しているにもかかわらず、ALA-PDT に対する感受性の低下は少なかった。5-ALA PDT は、酸素濃度 5% の低酸素状態で存在する低酸素下 GSC に対する有効な治療法となる可能性がある。

この成果は、Ihata T, Nonoguchi N, Fujishiro T, et al. The effect of hypoxia on photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in malignant gliomas. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2022;40:103056. doi:10.1016/j.pdpdt.2022.103056 に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Honda Norihiro, Katsunori Ishii, Yoshinaga Kajimoto, Toshihiko Kuroiwa, Kunio Awazu	4. 巻 23
2. 論文標題 Determination of Optical Properties of Human Brain Tumor Tissues From 350 to 1000 Nm to Investigate the Cause of False Negatives in Fluorescence-Guided Resection With 5-aminolevulinic Acid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biomed Opt.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/1.JBO.23.7.075006.	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 Izumoto Atsuki, Nishimura Takahiro, Hazama Hisanao, Ikeda Naokado, Kajimoto Yoshinaga, Awazu Kunio	4. 巻 25
2. 論文標題 Singlet oxygen model evaluation of interstitial photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for malignant brain tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/1.JBO.25.6.063803	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 Omura Naoki, Nonoguchi Naosuke, Fujishiro Takahiro, Park Yangtae, Ikeda Naokado, Kajimoto Yoshinaga, Hosomi Ryota, Yagi Ryokichi, Hiramatsu Ryo, Furuse Motomasa, Kawabata Shinji, Fukunaga Kenji, Kuroiwa Toshihiko, Nakano Ichiro, Wanibuchi Masahiko	4. 巻 41
2. 論文標題 Ablation efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on human glioma stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 103119 ~ 103119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2022.103119	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 Ihata Tomohiro, Nonoguchi Naosuke, Fujishiro Takahiro, Omura Naoki, Kawabata Shinji, Kajimoto Yoshinaga, Wanibuchi Masahiko	4. 巻 40
2. 論文標題 The effect of hypoxia on photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in malignant gliomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 103056 ~ 103056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2022.103056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	梶本 宜永  (Kajimoto Yoshinaga)  (30224413)	大阪医科薬科大学・医学部・教授    (34401)	

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
---------	---------