

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：2007～2009  
課題番号：19591449  
研究課題名 (和文) 放射線と血流遮断剤で腫瘍内の抗癌剤 AUC を増大する新規放射線化学療法の開発  
研究課題名 (英文) A novel chemoradiotherapy prolonging intratumoral retention of anticancer drugs by interrupting tumor blood flow  
研究代表者  
堀 勝義 (HORI KATSUYOSHI)  
東北大学・加齢医学研究所・准教授  
研究者番号：00143032

研究成果の概要 (和文)：腫瘍への薬剤移行量は、照射で誘導される腫瘍血流の増量と透過性亢進により、著しく高まった。血流遮断による薬剤の腫瘍内停留時間の延長は最大で 2 倍だった。低分子薬剤は、腫瘍循環を完全に止めても、拡散によって腫瘍から流出したからである。本研究の最大の成果は、血流遮断のタイミングが治療効果の決定要因であり、照射後の腫瘍血流増量がピークに達する時点で遮断を行うと、副作用の助長なく顕著な再発防止と有意の延命効果が得られることを見出したことである。

研究成果の概要 (英文)：Drug delivery to tumor tissues was markedly enhanced by an increase in tumor blood flow accompanied with enhanced vascular permeability after irradiation. The increase in drug retention time in the tumor tissues was double at the maximum. Low molecular weight drugs (less than 4000) were washed out from the tumor tissue by diffusion even in the condition of complete tumor blood flow interruption. The most important finding obtained in the present study was that the timing of tumor blood flow interruption is a determinant influencing the efficacy of radiotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線療法、抗癌剤、腫瘍血流遮断、治療効果増強

## 1. 研究開始当初の背景

平成 17-18 年度の基盤研究 (課題番号

17591242)で、放射線照射 (治療線量の範囲内) 後数日以内に、腫瘍微小循環が著しく活性化することを明らかにした。すなわち、照射に

より、腫瘍血流量が照射前の2~2.5倍に増加し、それと連動して腫瘍血管の透過性が亢進し、腫瘍組織への物質の移行量が著明に増大した。しかし、腫瘍循環の活性化は、同時に、腫瘍組織からの物質のクリアランスも著しく促進した。

我々はまた、腫瘍血管破断薬であるコンブレタスタチン化合物 (Cderiv) を静脈内投与すると、増量した腫瘍血流を、照射後のどの時点からでも完全に遮断できることを見出した。そして、その結果、生き残った癌組織への栄養供給が阻害され、照射野からの癌の再発とリンパ節への転移が抑制されることを示した。

以上のように、放射線照射後に腫瘍循環パラメータがいずれも、照射後の腫瘍循環の活性化を示したこと、そして、腫瘍血流を遮断することによって、その腫瘍循環の活性化を完全に阻止できるようになったことが、本研究着想の背景であった。

## 2. 研究の目的

一般に、腫瘍内には血流の低下、もしくは停止した部位が多数観察される。そのような部位の組織は酸素濃度が低いため、放射線に抵抗性であると考えられており、また、化学療法ではその部位への抗癌剤の到達量が低くならざるを得ない。

「研究の背景」で述べた、放射線照射後に血流量が著しく増加し、腫瘍微小循環が活性化されるという現象は、その時点で抗癌剤を投与すれば腫瘍組織への到達量が増加するということを意味する。

しかし、腫瘍循環機能の改善は、同時に、到達した抗癌剤が腫瘍からより速く消失する原因にもなる。この対策として、Cderivで腫瘍血流を遮断して抗癌剤のクリアランス

を下げれば、有効濃度をより長く維持できる可能性がある。

本研究の目的は、照射後に増量する腫瘍血流で、抗癌剤を腫瘍組織に行きわたらせた後、腫瘍血流を遮断することで、AUCを高める(抗癌剤の腫瘍内濃度と腫瘍内停留時間を同時に高めることによる)新しい放射線化学療法を開発することであった。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物、癌細胞、および麻酔条件

実験動物には220 - 250 gの雄Donryuラットを用いた。Donryuラットの業者による生産は2009年3月をもって打切りとなったため、以後は、自家繁殖を行ない、実験を継続した。癌細胞はDonryuラットへの生着率100%の吉田腹水肉腫LY80と佐藤肺癌とを用い、ラット透明窓内あるいは皮下に移植した。

全ての実験は麻酔条件下(25 mg/kgペントバルビタールと1%エトレン吸入麻酔の併用)で行った。

### (2) X線照射

X線照射には実験用X線照射装置(日立MBR-1520R)を用いた。照射条件は、電圧150 kV、管電流20 mAであり、厚さ0.1 mm Cu + 0.5 mm Alのフィルターを用いた。照射野は4 cm × 7 cmに絞り、さらに照射目的以外の部分は鉛板で覆った。1回の照射線量は5Gyあるいは10Gyであり、1Gy/minの線量率で照射した。

### (3) 蛍光物質

物質の移行性を解析するためのトレーサーとして、フルオレスチン、FITC (fluorescein isothiocyanate)でラベルしたデキストラン(分子量4,000)、アルブミン(分子量約70,000)、サイズ48 nmのナノミセル(ミセルを構成するブロックコポリマーの分子量は14,900)、そして、自家蛍光を有する抗癌剤のダウノマイシンを用いた。

### (4) 物質の腫瘍組織への移行性と組織からのクリアランスの測定

ラット皮下透明窓と生体顕微鏡とを組み合わせた生体計測システムを用い、生体観察と同時に、物質の腫瘍内移行をリアルタイムで捉え、組織内濃度の推移を定量解析した。具体的には、透明窓に実験腫瘍を移植し、腫瘍血管ネットワークが樹立した段階で、顕微鏡下に様々な蛍光物質を静脈内投与した。それらの物質が腫瘍血管から組織に移行し、組織内濃度がピークに達し、次いで組織から減衰していく様子をビデオに記録した。このビデオの経時的な映像をデジタル変換し、蛍光強度を画像解析した。蛍光強度が組織内濃度を反映したものであることは別の実験で確かめている。コンピュータ上で血管を外した腫瘍組織に数点の関心領域を設け、蛍光強度を経時的に計測した。指数関数的に減衰していく蛍光強度から、物質の組織内濃度の半減期を求めた。蛍光強度の最大値とそれに達するまでの時間を物質移行性の指標とし、蛍光強度の半減期を、組織からの物質流出性の指標とした。

#### (5) 腫瘍血流量遮断剤

腫瘍血流量を選択的に遮断する薬剤として、コンブレタスタチン誘導体 (Cderiv) を用いた。CderivはOhsumiらの方法に従って新たに合成し、10 mg/kgの用量で使用した。

#### (6) 腫瘍血流遮断による物質の腫瘍組織内停留の延長

腫瘍組織内停留時間が腫瘍血流遮断によってどう変化するかの実験には、トレーサーとして、分子量4,000のFITCデキストランを用いた。はじめにFITCデキストランを静脈内投与し、組織内濃度の半減期を求めた。2時間で蛍光はほぼバックグラウンドに戻ることを確認し、2回目のFITCデキストランを投与した。蛍光がピークに達した時に、Cderivで腫瘍血流遮断を行い、同様に半減期を求めた。

#### (7) 実験治療

実験治療は、 $2 \times 10^6$ 個のLY80細胞をDonryuラットに皮下移植し、11~12日後、腫瘍の長径が約2 cmに達した時に開始した。処置後、腫瘍サイズは毎日計測し、同時にリンパ節転移の有無を確認した。

#### (8) 照射後腫瘍血流遮断のタイミング

照射後の腫瘍血流遮断に最適なタイミングがあるかどうかを見るために、照射後2時間、48時間に腫瘍血流遮断を行い、治療効果の差を比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種蛍光物質の腫瘍組織内動態

図1と図2は、FITCデキストラン、およびFITCアルブミンを静脈内投与した時の腫瘍組織内濃度の推移の典型例である。

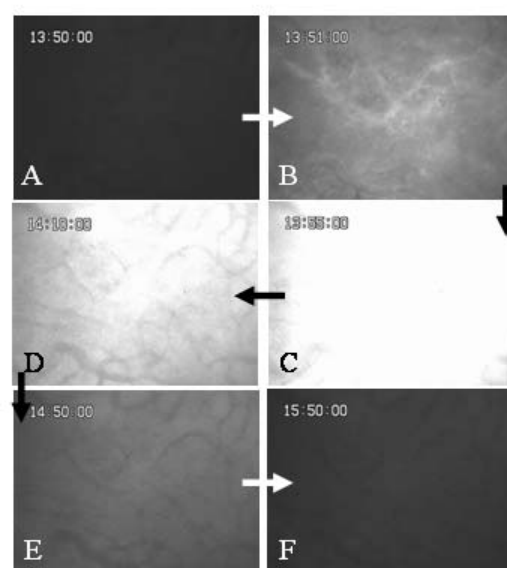


図1. FITCデキストラン (分子量4,000) の腫瘍組織内動態の経時変化. 腫瘍はLY80. 矢印は時間の方向  
AはFITCデキストラン投与前. B, C, D, E, Fは投与1分後、5分後、30分後、60分後、120分後. 分子量4,000のFITCデキストランは、2時間でほぼ組織から抜ける.

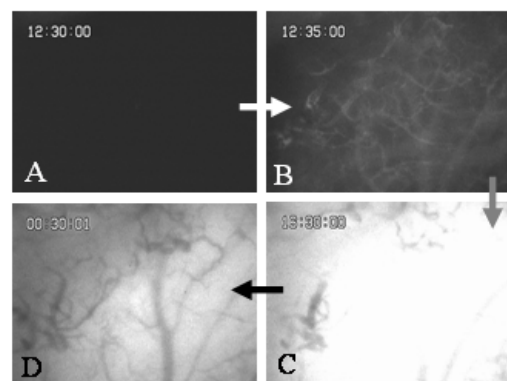


図2. FITCアルブミン (分子量70,000) の腫瘍組織内動態の経時変化. 腫瘍はLY80. 矢印は時間の方向

AはFITCアルブミン投与前. B, C, Dは投与5分後、4時間後、12時間後. FITCアルブミンは12時間経過後もかなりの量が残存している.

図3 Aは腫瘍組織(腫瘍血管は除く)におけるフルオレスチン、FITCデキストランの組織内濃度の時間変化を、図3 BはFITCアルブミン、FITCミセルの組織内濃度の時間変化を定量した結果である.

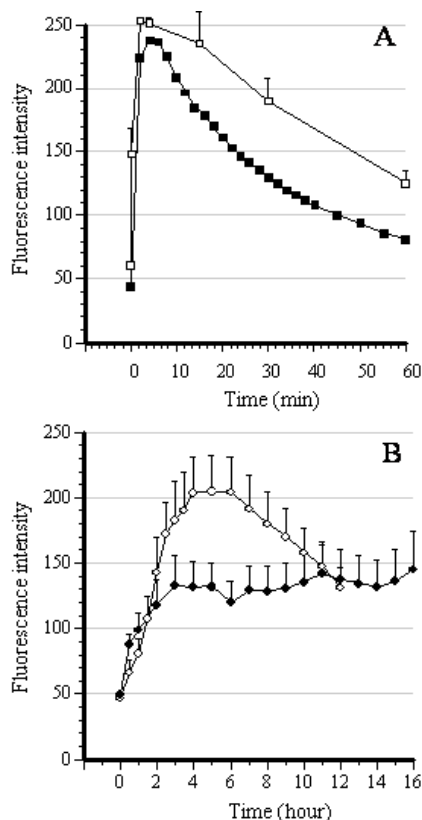


図3. 各種蛍光物質の腫瘍組織内濃度の変化. 腫瘍はLY80. □, フルオレスチン (n=4); ■, FITC デキストラン (n=1); ○, FITC アルブミン (n=5); ●, FITC ミセル (n=5). ゼロ時間に蛍光物質を静脈内投与.

フルオレスチン、FITCデキストラン、FITCアルブミン、FITCミセルの濃度がピークに達する時間はそれぞれ3分、7分、3.5時間、12時間以上であり、フルオレスチン、FITCデキストラン、FITCアルブミンの組織からの半減期は、それぞれ30分、28分、8.9時間であった。ミセルは24時間後も蓄積傾向があり、定

量できなかった。また、ダウノマイシンの血中半減期は3分以内であり、組織への移行量は非常に少なかった。

高分子の組織内濃度はゆっくりとピークに達し、また腫瘍組織からのクリアランスも遅い。したがって、組織に移行した物質のクリアランスを腫瘍血流遮断で低下させる必要があるのは低分子の抗癌剤であると結論できる。

### (2) X線照射による腫瘍組織への物質移行、および組織からのクリアランスの変化

X線照射後の腫瘍血流の増量に伴い、物質の移行性がどのように変化するのかの解析には、分子量4,000のFITCデキストランを用いた。FITCデキストランの腫瘍組織内濃度がピークに達する時間は、照射前には7分であったが、照射3日後には4分、4日後には3分に短縮した。また、腫瘍血管から組織に移行したFITCデキストランの半減期は、照射前は28分であったが、照射3日後、4日後には、それぞれ22分、17分に短縮した。

この結果は、照射3-4日後に、腫瘍循環が著しく活性化し、物質移動の速度が速くなっていることを示している。

### (3) 腫瘍血流遮断による物質のクリアランスの変化

腫瘍血流遮断の前と後との半減期の比率は $155.7 \pm 33.8\%$  (n = 8) (比率の最小値と最大値は118.2と204.9%) であった。腫瘍血流遮断により、FITCデキストランの腫瘍組織内停留時間は有意に延長した(P < 0.001)。

### (4) 照射後の腫瘍血流遮断のタイミングによる治療効果の差

Cderivは放射線照射後のどの時点からでも増量する腫瘍血流を完全に同じパターンで遮断でき、その血流遮断により腫瘍組織への物質移行がシャットアウトされることを以前の研究で確かめた。

図4 Aは10Gy一回照射の2時間後に、10 mg/kgのCderivを静脈内投与した場合の治療効果である。照射後の腫瘍血流遮断は、著明な再増殖抑制効果を示している。しかし、治療2週間後、ゆっくりではあるが再増殖を開始

した。また、治療18日後の時点では、6頭中2頭にリンパ節転移が触知されなかったが、その後その2頭にも転移が生じた。

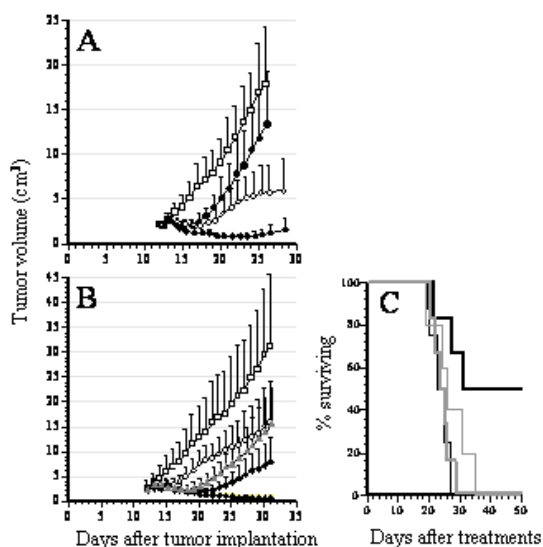


図4. 照射と腫瘍血流遮断との組合せによる治療効果.

A, 10Gy照射と10 mg/kg Cderivとの組合せ. □, 0.9% NaCl群; ●, Cderiv; ○, 10Gy照射2時間後0.9%NaCl投与群; ◆, 10Gy照射2時間後Cderiv投与群. 全群共にn = 6. 10Gy照射2時間後Cderiv群は、著しい再増殖抑制効果を示したが、その後、全例再増殖. BとC, 5Gy照射と10 mg/kg Cderivとの組合せ. □, 0.9% NaCl群 (n = 4); ○, 5Gy照射群 (n = 5); ▲, Cderiv投与48時間後5Gy照射群 (n = 6); ◆, 5Gy照射48時間後Cderivを投与群 (n = 6). 照射後血流遮断の群では再発と治癒に分かれ、半数が完全治癒. Cの太い黒の実線が5Gy照射48時間後Cderiv投与群であり、太い灰色の実線がCderiv投与48時間後5Gy照射群. 前者に生存延長効果あり (P = 0.0161).

図4Bと4Cは、5Gy一回照射の48時間後に10 mg/kgのCderivを静脈内投与した場合と、逆の順序、すなわち10 mg/kgのCderiv投与48時間後に5Gy照射をした場合との効果の比較である。照射48時間後の腫瘍血流遮断では、6頭中3頭が、治療終了50日後も照射野からの再発とリンパ節転移が起こらず、完全に治癒した。このリンパ節転移抑制効果は、前者の順序の治療によって腫瘍が強力な破壊を受け、原発部にもはや転移を起こす力を持った癌細胞が残っていないことの結果であると

理解できる。この結果から、治療効果増強には、照射と血流遮断の順序が重要であることが明らかになった。

また、図4Aと図4Bを比べると、照射線量が半分であるにもかかわらず、図4Bの治療で半数のラットが完全治癒した。両者の違いは血流遮断のタイミングにある。照射48時間後の遮断に大きな効果があったのは、血流の増量が最大値に近づきつつある時点での遮断に、より大きな破壊力があったことを示している。

照射3日後に腫瘍血流遮断を行った場合の強い治療効果は佐藤肺癌においても確かめられた。

結論として、腫瘍内に長く留める努力が必要な薬剤は、腫瘍からの消失が速い低分子薬剤である。本研究で、腫瘍血流遮断により、薬剤の腫瘍組織内濃度 × 停留時間の延長に成功した。しかし、腫瘍循環を完全に遮断しても、低分子流出速度は遅くなるものの、流出を止めることはできなかった。これは、低分子薬剤の場合、物質移動の駆動力は対流よりも拡散が優勢であるためと考えられる。

本研究で得たもう一つの成果は、照射後、腫瘍循環の活性化がピークに達する時点で腫瘍血流遮断を行うことが、著しい治療効果につながることを見出したことである。これは抗癌剤使用の場合とは違って副作用を増加させることがないため、治療法の開発としては理想的な展開である。今後、より臨床に近づけたトランスレーショナルリサーチと、さらに詳細な解析を行う必要がある。

## 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4件)

- (1) 堀勝義: 放射線療法後の腫瘍血流遮断による癌の再発防止. 放射線生物研究. 45 巻 2010 (印刷中). (査読あり)
- (2) Hori K, Nishihara M, Shiraiishi K, Yokoyama M: The combretastatin derivative (Cderiv), a vascular disrupting agent, enables polymeric nanomicelles to accumulate in microtumors. J Pharm Sci 99: 2914-2925, 2010. (査読あり)
- (3) Hori K, Nishihara M, Yokoyama M: Vital

microscopic analysis of polymeric micelle extravasation from tumor vessels: macromolecular delivery according to tumor vascular growth stage. J Pharm Sci 99: 549-562, 2010. (査読あり)

- (4) Hori K, Furumoto S, Kubota K: Tumor blood flow interruption after radiotherapy strongly inhibits tumor regrowth. Cancer Sci 99: 1485-1491, 2008. (査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 堀勝義: 腫瘍血流遮断と癌治療. 第 12 回 癌治療増感シンポジウム (2010 年 2 月 14 日)、奈良
- (2) 白石貢一、箕輪卓也、米谷芳枝、堀勝義、横山昌幸: 血流遮断薬による変性領域形成と高分子ミセル集積挙動のMRIによる観察. 第 25 回日本DDS学会. 2009 年 7 月 3 日、東京
- (3) 白石貢一、川野久美、箕輪卓也、米谷芳枝、堀勝義、横山昌幸: 腫瘍血流遮断薬投与による高分子ミセルMRI造影剤の腫瘍への集積挙動. 第 4 回日本分子イメージング学会. 2009 年 5 月 14 日、東京
- (4) 堀勝義、西原正通、白石貢一、横山昌幸: 腫瘍血管破断薬による微小腫瘍でのEPR効果促進. 第 25 回日本DDS学会. 2009 年 7 月 4 日、東京
- (5) 堀勝義、西原正通、横山昌幸: 高分子ミセルの腫瘍変性領域への集積. 第 24 回日本DDS学会. 2008 年 6 月 30 日、東京
- (6) 堀勝義: 腫瘍血流制御のがん治療における意義. 第 26 回腫瘍循環病態研究会. 2008 年 2 月 8 日、仙台
- (7) Hori K, Furumoto S: Augmentation of radiation therapy efficacy using tumor blood flow interception: an experimental study. 第 66 回日本癌学会学術総会. 2007 年 10 月 4 日、横浜
- (8) 堀勝義, DDSにおける腫瘍血流制御の意義. 第 23 回日本DDS学会 (2007 年 6 月 14 日), 熊本
- (9) Furumoto S, Hori K, Honda Y, et al: Assessment of tumor hypoxia induced by vascular targeting therapy. SNM' 54<sup>th</sup> Annual Meeting (June 4, 2007), Washington DC, USA

[図書] (計 0 件)

[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 :

## 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
堀 勝義 (HORI KATSUYOSHI)  
東北大学・加齢医学研究所・准教授  
研究者番号 : 00143032
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
なし