

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20390378

研究課題名(和文)

膠芽腫に対する、薬剤耐性克服を目的とした CED 法と全身投与の併用療法

研究課題名(英文) Convection-enhanced delivery of ACNU with systemic administration of temozolomide

研究代表者

園田 順彦 (SONODA YUKIHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90302140

研究成果の概要(和文)：

膠芽腫の化学療法剤として汎用されているのはニトロソウレアあるいは、テモゾロミドといったアルキル化剤であり、その薬剤耐性にはMGMTというDNA修復酵素が強く関与している。この耐性を克服するには高濃度の薬剤を投与しMGMTを枯渇させることが必要である。本研究ではこれを克服するため、ACNUのCED法による局所投与とTMZの全身投与をおこなった。結果として、両者の併用療法は単剤投与に比較し有意にラット脳腫瘍モデルで生存期間の延長を認めた。引き続きカニクイザル脳内に同様の治療法をおこないその安全性を確認し、同時に脳内への良好な薬剤分布を確認した。

研究成果の概要(英文)：

This study evaluated the efficacy of combined-modality treatments using CED of ACNU with systemic administration of temozolomide. CED of ACNU plus systemic administration of temozolomide significantly enhanced survival rate compared with each treatment alone (versus CED:  $p < 0.001$ , versus systemic temozolomide:  $p < 0.05$ ). Multimodality treatment using CED of ACNU and systemic chemotherapy with temozolomide is a promising strategy for treatment of brain tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	6,700,000	2,010,000	8,710,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科学・脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 MGMT CED法 薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は現時点であらゆる治療をおこなっても予後不良な疾患であり、新規治療法の開発が望まれている。膠芽腫に対する抗腫瘍薬はニトロソウレア系のACNUとTemozolomide(TMZ)が使用されているが、い

ずれもアルキル化剤であり、薬剤耐性遺伝子MGMTの発現によりその効果が減弱されてしまう。理論的には高濃度の薬剤を投与することで、MGMTを消費し薬剤耐性を克服できると考えられるが、高濃度の抗腫瘍薬の投与は骨髄抑制が生ずるため臨床的には困難

とされていた。近年、convection enhanced delivery 法(CED)と呼ばれる脳内への直接薬剤投与方法が開発され注目されている。以前より脳内の局所投与は試みられていたが、脳内に薬剤を直接注入しても脳内への薬剤分布はきわめて注入部位付近にきわめて限局されるとされていた。CED 法は脳内に持続的にポンプを用い陽圧をかけつつ、ゆっくり脳内に薬剤を投与することで脳内に広範囲な薬剤分布を実現した手法である。そこで、脳内に CED法を用い高濃度の ACNU を投与すれば、全身毒性を回避し、優れた抗腫瘍効果を発揮できるのではないかと考えたさらに、ACNU を脳内に CED 法により直接投与し MGMT を消費し、TMZ を全身投与すればより効果が期待できると考えた。

## 2. 研究の目的

ACNU の CED 投与および TMZ の全身投与を行い、その効果を明らかにし、かつ、臨床応用にむけた安全性の確認および薬剤耐性メカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット脳内移植モデルの作製

膠芽腫培養細胞 9L を EMEM 溶液と 10% calf serum 下で培養し、 $5 \times 10^5$  個の細胞数を得たのち、これを回収し 5ul の PBS 溶液に溶解し氷上に保管する。ラットは 200g のオス Fisher rat を準備し、イソフルレンによる吸入麻酔後、定位脳手術装置に固定、皮膚切開をおこない、ブレグマより 3mm 外側、0.5mm 前方に骨窓を開け、硬膜を切開する。細胞注入用針を定位的に右被殻をターゲットし 4.5mm 挿入し、腫瘍細胞をラット脳内に移植する。

### (2) CED 法を用いた ACNU 投与

腫瘍細胞移植後 7 日目に CED 法による ACNU 投与を行う。0.5mg/ml の生理的食塩水に溶解した ACNU を準備する。投与量は 20ul とする。腫瘍細胞を移植したラットを再度、吸入麻酔を行った、定位的装置に固定。移植時と同じ骨窓を用い、注入用カニューレを定位的に挿入する。カテーテルには微量注入用ポンプを連結し注入速度を 0.2ul/min 15 分、0.5ul/min 10 分、0.8ul/min 15 分とし、注入を行った。

### (3) TMZ 全身投与

TMZ350mg/m<sup>2</sup>/day を 5 日間行った。CED 法による ACNU 投与は TMZ 3 日目とした。

### (4) 毒性試験

ラットは毎日、その生存を確認し週 1 回体重を測定した。すべてのラットは移植後 30 日後に安楽死させ、全身毒性、および脳内毒性を組織学的に評価した。

### (5) 生存試験

ラットそれぞれ 10 匹ずつを 1) 無治療のコ

ントロール群、2) ACNU-CED 単独群、3) TMZ 全身投与単独群、4) ACNU-CED、TMZ 併用群にわけ生存試験をおこなった。生存率を Kaplan-Meier 曲線で評価し、log rank 試験で比較した。

### (6) カニクイザルを用いた ACNU-CED

ACNU 1.0mg/ml に 1mM のガドリニウム造影剤を混和溶解した液 300ul を準備した。カニクイザルを定位脳手術装置に固定し、CED 法を用いて注入を行った。注入速度は 0.1ul/min から開始し、10 分毎に速度を増加させ最大 3.0ul/min 分までとした。注入中は薬液の分布を MRI で評価するため 20-40 分毎に撮像を行った。

### (7) MRI 画像評価

0.3 テスラ動物用 MRI 装置を用い T1 強調画像による評価を行った。造影剤の分布容積を解析し、これを ACNU の分布とほぼ一致する考え解析をおこなった。

### (8) カニクイザル毒性試験

カニクイザルは毎日、その生存を確認し週 1 回体重を測定した。すべてのラットは移植後 60 日後に安楽死させ、全身毒性、および脳内毒性を組織学的に評価した。

### (9) ヒト再発膠芽腫患者に対する ACNU-CED と TMZ の併用療法の効果安全性試験

ラット脳腫瘍モデルで効果安全性が確認され、カニクイザルでも安全性が確認されたのち、東北大学病院倫理委員会の承認を得、ヒト再発膠芽腫患者において ACNU-CED と TMZ 全身投与による効果安全性試験を行う。初回投与の ACNU 濃度は 0.25mg/ml, 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml と投与濃度の増量を図り、至適濃度を決定する。

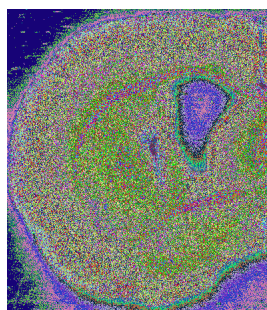
## 4. 研究成果

### (4) 毒性試験

ラットは経過中、明らかな体重減少などの全身毒性を認めなかった。また病理組織学的にも神経脱落などの明らかな所見を認めなかった

図 1 ACNU-CED 後の脳内毒性評価

明らかな毒性は認められない。

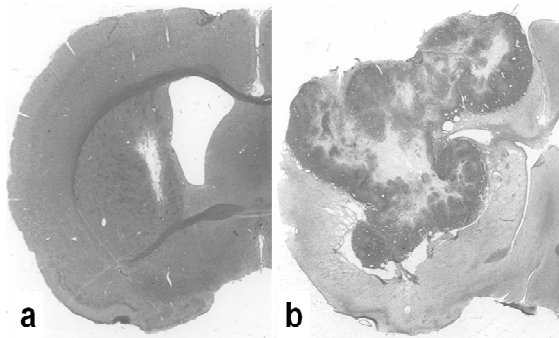


### (5) 生存試験

未治療での対照群は 21 日までにすべて死亡し平均生存期間は 18.9 日であった。

ACNU-CED 単独群は 25 日までにすべて、死亡し平均生存期間は 22.9 日であった。TMZ 単独全身投与併用群 (図 2 a) はすべて 30 日までに死亡し平均生存期間は 23.3 日であった。両群ともに対照群 (図 2 b) に対して有意に生存期間の延長が認められた。一方併用群は 32 日までにすべて死亡し平均生存期間は 29 日であり、対照群や単独投与群と比較しても明らかに生存期間の延長を認めた (vs CED  $P < 0.001$ , vs TMZ  $P < 0.05$ )。

図 2 ACNU-CED と TMZ 全身投与の抗腫瘍効果  
対照群では脳内に巨大な腫瘍を認めるが (図 2 b), 治療群では明らかな腫瘍は認められない (図 2 a)



(7) MRI 画像評価

ACNU の脳内分布をガドリニウムを用いた MRI による画像で評価した。投与量に対するはサル脳内において非常に広範囲であった。投与後 1 日に T2 強調画像で高信号領域が投与部位周囲に出現するが速やかに消失した。

図 3 ガドリニウムによる ACNU-CED の薬剤分布評価

MRI T1 強調画像では脳内に高信号域として薬剤の分布が確認される

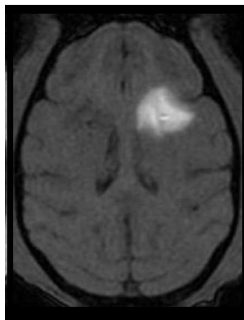
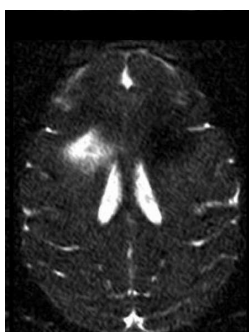


図 4 MRI における画像変化

投与後 1 日で投与部位周囲に T2 高信号領域を認めたが、3 日目には消失した。



(6) カニクイザルを用いた安全性試験  
経過中カニクイザルも体重減少、食欲など明らかな全身毒性は認めなかった。また麻痺、異常行動などの脳内毒性も経過中は認められなかった。

(9) ヒト再発膠芽腫患者に対する ACNU-CED と TMZ の併用療法の効果安全性試験

本研究結果を踏まえ東北大学病院倫理委員会の承認を得て、ヒト再発膠芽腫患者において ACNU-CED と TMZ 全身投与の臨床研究を開始した。濃度を徐々にひきあげていくと 2.0mg/ml で無症状ではあるものの、脳梗塞を一例に認めた。現在至適投与量を設定中である。

図 5 膠芽腫再発患者に対する CED カテーテルの進入ルートを事前にシミュレーションする

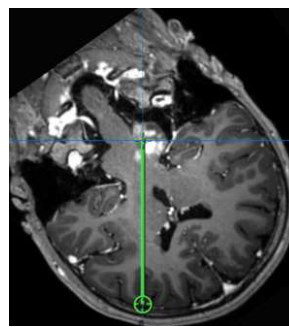
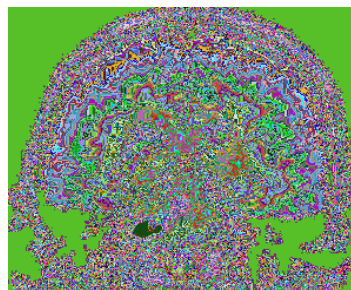


図 6 ガドリニウムによる薬剤分布評価  
MRI でガドリニウムにより高信号に描出される領域が ACNU の薬剤分布にほぼ一致する



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 3 件)

1. Saito R, Sonoda Y, Kumabe T, Nagamatsu K, Watanabe M, Tominaga T. Regression of Recurrent Brain Stem Glioblastoma Infiltrating the Brainstem after Convection-enhanced Delivery of Nimustine Hydrochloride. Case report J Neurosurg in press 2011 (査読有)
2. Sonoda Y, Yokosawa M, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Tominaga T. O(6)-Methylguanine DNA

methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma. Int J Clin Oncol. 2010 4:352-8. (査読有)

3. Sonoda Y, Kumabe T, Watanabe M, Nakazato Y, Inoue T, Kanamori M, Tominaga T. Long-term survivors of glioblastoma: clinical features and molecular analysis. Acta Neurochir (Wien). 2009 151:1349-58. (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 :

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

園田 順彦 (SONODA YUKIHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号 : 90302140

### (2) 研究分担者

山下 洋二 (YAMASHITA YOJI)

宮城県がんセンター研究所・特任研究員  
研究者番号 : 30420045

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :