

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791341

研究課題名 (和文) CED 技術を用いた局所免疫誘導による悪性神経膠腫治療法の開発

研究課題名 (英文) Development of systemic antitumor effect against malignant glioma by local convection-enhanced delivery

研究代表者

齋藤 竜太 (SAITO RYUTA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10400243

研究成果の概要 (和文)：中枢神経系への新規薬剤送達技術である convection-enhanced delivery (CED)を用いた局所治療により全身性免疫を誘導する方法を探ることを目的に研究を開始した。まず、化学療法剤 ACNU を局所投与した際に生じる組織変化の検討を行い、局所毒性が無視できる低容量で ACNU を脳内へ CED 法を用いて投与した後、一過性に血液-脳関門の透過性が亢進することを発見した。この発見を受けて、まず全身性化学療法との併用を試みた。ラット脳腫瘍モデルを用いた研究で、ACNU 投与後 7-12 日にドキソルビシンリポソームの全身投与を行うと腫瘍モデルの生存が延長することが示された。続いて、局所に免疫関連タンパク OX-40 をコードするアデノウイルスを CED 法を用いて局所投与し、免疫を誘導する方法での抗腫瘍効果を確認した。

研究成果の概要 (英文)：This study was started with the aim to develop systemic immunity by locally delivering agents with novel drug delivery system, i.e. convection-enhanced delivery. First, we analyzed the changes in brain tissue that received CED of chemotherapeutic agent; ACNU. Transient opening of the Blood-brain barrier was noted with the delivery of ACNU at safety dose. With this finding, we tried to combine systemic chemotherapy using liposomal doxorubicin with CED of ACNU to treat rodent brain tumor model. Prolonged survival of the model was noted with this treatment. Consequently, we tested the ability of local CED delivery of adenovirus encoding OX-40 protein to induce systemic immunity. With this strategy antitumor efficacy was observed using rodent brain tumor model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：脳腫瘍, 化学療法, 免疫療法, ドラッグデリバリー, 免疫遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景
膠芽腫を代表として悪性神経膠腫の治療成績は、現時点でのあらゆる治療手段を用いて

も絶対的に不良である。悪性神経膠腫は脳実質に広く浸潤する性格を持つ腫瘍であり、手術のみによる治癒は不可能とされ放射線療

法, 化学療法, 免疫療法, またこれらの併用による治療効果の向上が期待されている。これまで, 悪性神経膠腫の治療としては手術とそれに続く放射線照射が標準治療とされてきた。しかし, 経口投与可能なアルキル化剤である **Temozolomide** が承認され, 広く臨床の現場でその有効性が確認され, 化学療法が標準治療の一角を担うようになった。それでも尚, 悪性神経膠腫の治療成績は満足できるものではなく, 多くの症例が再発腫瘍により不幸な転帰をとっている。この理由の一つとして以前より化学療法剤の全身投与時の薬剤到達性の問題点が指摘されている。つまり全身投薬では局所での有効濃度に達する前に全身性の副作用が強くなってしまいう問題点であり, また局所投薬においても薬剤の拡散に問題が存在するため有効な投薬とならない点である。そこで, 開発された局所投薬技術に **Convection-enhanced delivery 法 (CED 法)** がある。本法は薬剤を陽圧下に脳組織間隙に局所注入し高濃度かつ広範囲の薬剤分布が得られる新規薬剤投与方法である。我々は, 本法を用いた局所化学療法の開発を目指して研究を進めてきており, これまでに **TNF-alpha related apoptosis inducing ligand (Saito R et al, Cancer Res, 164: 6858-6862, 2004)**, **liposomal topotecan (Saito R et al, Neuro Oncol. 8:205-214, 2006)**, **liposomal CPT-11 (Noble CO, Saito R et al, Cancer Res. 66: 2801-2806, 2006)**, **liposomal doxorubicin (Kikuchi T, Saito R, et al, J Neurosurg. In press)**, **micellar doxorubicin** などの有効性を示してきた。さらにこの研究を **translational research** として臨床現場へ応用することを目的に従来本邦で広く悪性脳腫瘍の治療に用いられてきた **ACNU (ニドラン)** を **CED 法** によって投与する有効性を動物実験にて証明し (**Sugiyama S, et al, J Neurooncol, 82:41-47, 2007**), さらにカニクイザルでの臨床前、安全性試験を経て東北大学病院倫理委員会の承認を得た上で再発悪性神経膠腫に対する臨床研究を進めている。

2. 研究の目的

CED 法 による投薬は局所治療であるが, 脳腫瘍の治療を考えた際に局所コントロールのみでは限界がある。この **CED 法** を用いた局所投薬を全身治療へつなげて行く方法を確立することを目的とした。当初, 局所投薬による全身免疫の誘導を目的としたが, 化学療法剤 **ACNU** の局所投与を解析する中で投与後に血液-脳関門の透過性亢進が発見され, 全身性化学療法との併用を最初に行った。続いて, 局所で免疫誘導を図るタンパクとして **OX-40 ligand** に注目し (本学呼吸器内科ではこの **OX-40 ligand** 発現アデノウイルスベクターを用いた肺癌の免疫遺伝子治療の

研究がなされており (Cancer Res 64:3281-3287, 2004), 同グループよりベクターの供給を受けた), **OX-40 ligand** 発現アデノウイルスベクターを脳腫瘍内へ **CED 法** により投与することで腫瘍免疫を誘導することによる脳腫瘍治療法の開発を行った。

3. 研究の方法

[A]化学療法剤 **ACNU** を脳内・脳腫瘍内へ局所投与した際に生じる組織変化の検討・全身化学療法との併用による治療効果の向上

<A1>局所毒性の確認

正常ラット脳内に **ACNU** 局所投与後に組織障害を生じない最高の薬剤濃度 (Maximum tolerable dose) を確認

<A2>上記濃度で正常ラット脳へ **CED 法** により局所投与した後の血液-脳関門の透過性を定性的・定量的に評価した。正常ラット脳に **ACNU** を **CED** した後, 3 日, 7 日, 12 日, 20 日, 30 日後に尾静脈よりエバンス・ブルーを投与, 脳局所への漏出を定性的, 定量的に評価した。

<A3>ラット腫瘍モデルを用いた **ACNU** 局所投与後の血液-脳関門透過性の検討。ラット脳腫瘍モデルを用いて **ACNU** を **CED** 投与後 7 日目に尾静脈よりドキソルビシンリポソームを投与。腫瘍内への漏出を評価した。

<A4>ラット脳腫瘍モデルを用いた **ACNU** の **CED** とドキソルビシンリポソーム全身投与の併用効果の検討。ラット脳腫瘍モデルを用いて, **ACNU** の **CED** 投与とドキソルビシンリポソームの尾静脈投与を時期を変えて併用し, 抗腫瘍効果の違いを検討した。

[B]免疫関連タンパク **OX-40 ligand** 発現アデノウイルスの **CED** 投与による脳腫瘍免疫の誘導

<B1> **OX-40 ligand** 発現アデノウイルスの複製

<B2> **OX-40 ligand** 発現アデノウイルスの脳腫瘍内局所投与による免疫誘導の評価: 腫瘍へ **OX-40 ligand** 発現アデノウイルス, もしくはコントロールアデノウイルスを **CED 法** により投与し, **CD4**, **CD8** 陽性リンパ球の浸潤を免疫組織化学法により評価した。

<B3> **CED 法** による脳腫瘍内への **OX-40 ligand** 発現アデノウイルス投与による抗腫瘍効果の検討。ラット脳腫瘍モデルを用いて腫瘍へ **OX-40** 発現アデノウイルス, もしくはコントロールアデノウイルスを **CED 法** により投与し, その治療効果をラットの生存試験にて評価した。

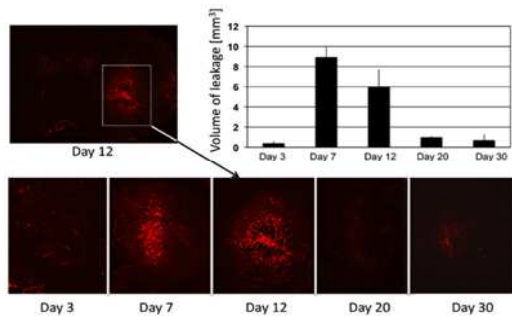
4. 研究成果

<A1>**CED** による化学療法剤 **ACNU** 脳内投与の局所毒性評価:

ラット脳へ **CED** での **ACNU** 投与を行い, 1mg/ml の濃度まで局所毒性なく, 安全に投与できることが確認された。

<A2>血液-脳関門透過性の亢進:

上記安全濃度で ACNU を脳内・脳腫瘍内へ局所投与した際に生じる組織変化の検討を行い、局所毒性が無視できる低濃度で ACNU を脳内へ CED 法を用いて投与した後、7-12 日の間に一時的に脳血液関門が開くことを示した。具体的には ACNU を CED 法を用いて正常ラット脳内へ投与した 3, 7, 12, 30 日後に色素エバンズ・ブルーを尾静脈より注入。直後に脳を摘出し切片を作成。ACNU 注入局所での色素漏出は 7-12 日の間のみ認められ、この時期に血液-脳関門が一時的に破綻していることが判明した(図 1)。



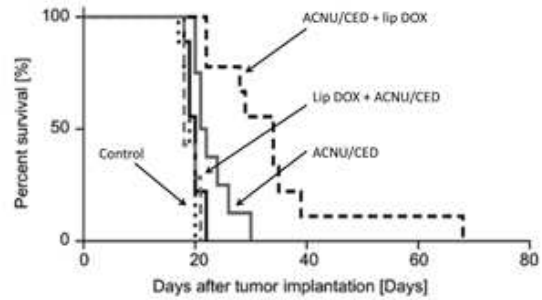
(図 1) ACNU/CED 後の一過性 BBB 透過性亢進

<A3>ラット腫瘍モデルを用いた ACNU 局所投与後の血液-脳関門透過性の検討:

脳腫瘍内では有る程度血液-脳関門の透過性が亢進していたが、ACNU 投与によりさらにこの透過性が亢進し、ACNU の CED 後 7-12 日に尾静脈より投与したドキシソルビシンリポソームが腫瘍内に強く漏出していることを確認した。

<A4>ラット脳腫瘍モデルを用いた ACNU の CED とドキシソルビシン全身投与の併用効果の検討:

上記発見を受けて全身化学療法をこの時期に併用することにより、より強い抗腫瘍効果が得られることを ACNU の CED 投与とドキシソルビシンリポソームの尾静脈投与の併用により証明した。ラット脳腫瘍モデルを用いた研究で、腫瘍内の ACNU を投与した部位にドキシソルビシンがより強く漏出していることが判明し、さらに ACNU/CED とドキシソルビシンリポソームの併用につき様々な時期で検討した結果、ACNU/CED 後の血液-脳関門透過性亢進時期に併用した場合に腫瘍モデルの生存が延長することが示された(図 2) (論文投稿中)。この一時的な脳血液関門の破綻には薬剤分布範囲に誘発される炎症・浮腫が関与していることが判明した。現在引き続き、免疫治療との併用効果を検討している。



(図 2) ACNU/CED 後、血液-脳関門の透過性が亢進する時期に全身性化学療法を併用すると抗腫瘍効果の増強が得られる [現在、論文投稿中]

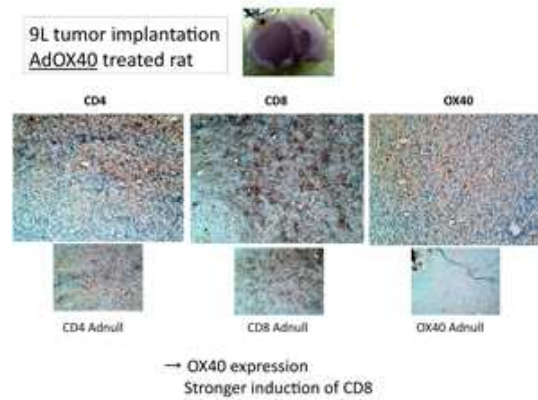
[B]免疫関連タンパク OX-40 ligand 発現アデノウイルスの CED 投与による脳腫瘍免疫の誘導

<B1> OX-40 ligand 発現アデノウイルスの複製

本学呼吸器科よりベクターコンストラクトの提供を受け、ウイルスを作製した。

<B2> OX-40 ligand 発現アデノウイルスの脳腫瘍内局所投与による免疫誘導の評価:

OX-40 ligand 発現アデノウイルスベクターを脳腫瘍内へ直接 CED 法を用いて投与し免疫誘導を免疫組織化学的に評価した(図 3)。コントロールアデノウイルスを投与した腫瘍に比べ、OX-40 ligand 発現アデノウイルスを投与した腫瘍の方が CD4, CD8 陽性リンパ球の浸潤を多く受けていた。

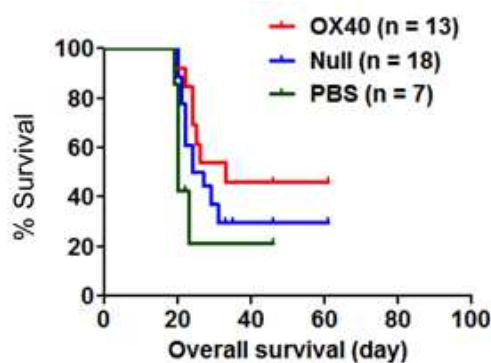


(図 3) OX-40 ligand 発現アデノウイルスを投与した腫瘍は、より強いリンパ球の浸潤を受けていた。

<B3> CED 法による脳腫瘍内への OX-40 ligand 発現アデノウイルス投与による抗腫瘍効果の検討。

ラット脳腫瘍モデルを用いて PBS, コントロールアデノウイルス, OX-40 ligand 発現アデノウイルスを CED 法にて投与し、その抗腫瘍

効果を検討したところOX40 ligand 発現アデノウイルスの抗腫瘍効果が認められた(図4)。



(図4) OX40 発現アデノウイルスベクターによる免疫遺伝子治療の効果

現在は、CED法によるACNU脳腫瘍内投与との併用でさらに有効な免疫治療を目指す研究を進めている。

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15件)

1. Saito R, Sonoda Y, Kumabe T, Nagamatsu K, Watanabe M, Tominaga T. Regression of recurrent glioblastoma infiltrating the brainstem after convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride. *J Neurosurg Pediatr* 7:522-6, 2011 (査読有)
2. Kawaguchi T, Kumabe T, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Watanabe M, Tominaga T. Logarithmic decrease of serum alpha-fetoprotein or human chorionic gonadotropin in response to chemotherapy can distinguish a subgroup with better prognosis among highly malignant intracranial non-germinomatous germ cell tumors. *J Neurooncol*. 2011 Feb 26. [Epub ahead of print] (査読有)
3. Osawa SI, Kumabe T, Saito R, Sonoda Y, Niizuma H, Watanabe M, Tominaga T. Infratentorial brain metastases of pediatric non-epithelial malignant tumors: three case reports. *Brain Tumor Pathol*. 28:167-174, 2011 (査読有)
4. Kanamori M, Kumabe T, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Tominaga T. [The safety of combination chemotherapy with ifosfamide, cisplatin, and etoposide (ICE): single-institution retrospective review of 108 cases]. *No Shinkei Geka* 38:997-1005,

2010 (査読有)

5. Yokosawa M, Sonoda Y, Sugiyama S, Saito R, Yamashita Y, Nishihara M, Satoh T, Kumabe T, Yokoyama M, Tominaga T. Convection-enhanced delivery of a synthetic retinoid Am80, loaded into polymeric micelles, prolongs the survival of rats bearing intracranial glioblastoma xenografts. *Tohoku J Exp Med* 221:257-264, 2010 (査読有)
6. Kawaguchi T, Kumabe T, Kanamori M, Nakamura T, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Watanabe M, Tominaga T. Early detection of venous thromboembolism in patients with neuroepithelial tumor: efficacy of screening with serum D-dimer measurements and Doppler ultrasonography. *J Neurooncol* 101:495-504, 2010 (査読有)
7. Saito R, Kumabe T, Kanamori M, Sonoda Y, Tominaga T. Insulo-opercular gliomas: four different natural progression patterns and implications for surgical indications. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 50:286-290, 2010 (査読有)
8. Omodaka S, Saito R, Kumabe T, Kawagishi J, Jokura H, Sonoda Y, Watanabe M, Kayama T, Tominaga T. Melanotic neuroectodermal tumor of the brain recurring 12 years after complete remission: case report. *Brain Tumor Pathol* 27:51-57, 2010 (査読有)
9. 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* 15:352-358, 2010 (査読有)
10. Saito R, Kumabe T, Kanamori M, Sonoda Y, Tominaga T. Dissemination limits the survival of patients with anaplastic ependymoma after extensive surgical resection, meticulous follow up, and intensive treatment for recurrence. *Neurosurg Rev* 33:185-91, 2010 (査読有)
11. Shibahara I, Kumabe T, Kanamori M, Saito R, Sonoda Y, Watanabe M, Iwata R, Higano S, Takanami K, Takai Y, Tominaga T. Imaging of hypoxic lesions in patients with gliomas by using positron emission tomography with 1-(2-[¹⁸F] fluoro-1-[hydroxymethyl]ethoxy)methyl-2-nitroimidazole, a new ¹⁸F-labeled

2-nitroimidazole analog. J Neurosurg 113:358-368, 2010 (査読有)

12. 齋藤竜太, 園田順彦, 隈部俊宏, 富永悌二, 脳腫瘍の外科療法 Convection-enhanced delivery-原理・現状・展望-, 日本臨床 68 suppl 10, 388-391 (査読無) 2010

13. 齋藤竜太, 園田順彦, 隈部俊宏, 富永悌二. Glioblastoma: 臨床研究と新規治療. 脳神経外科速報 20:559-568, 2010 (査読無)

14. Akamatsu Y, Kumabe T, Kanamori M, Nagamatsu K, Saito R, Sonoda Y, Sato K, Tominaga T. [Intraoperative neuronavigation system without rigid pin fixation]. No Shinkei Geka 37:1193-1199, 2009 (査読有)

15. Kanamori M, Kumabe T, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Ariga H, Takai Y, Tominaga T. Optimal treatment strategy for intracranial germ cell tumors: a single institution analysis. J Neurosurg Pediatr 4:506-514, 2009 (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1) 齋藤竜太, 園田順彦, 隈部俊宏, 富永悌二. Convection-enhanced delivery: 現状と展望. 第 31 回日本脳神経外科コンgres 総会 2011 年 5 月 6-8 日 横浜 パシフィコ横浜 (ランチョンセミナー)

2) 齋藤竜太, 園田順彦, 隈部俊宏, 富永悌二. 脳腫瘍への有効な薬剤送達技術: コンベクション・エンハンスド・デリバリー. 第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会 2010 年 11 月 28-30 日 軽井沢 軽井沢プリンスホテル (指定口演)

3) Ryuta Saito, Taigen Nakamura, Yukihiro Sonoda, Toshihiro Kumabe, and Teiji Tominaga. Local Application of Chemotherapeutics Transiently Opens Blood-Brain Barrier and Improves Efficacy of Systemic Chemotherapy against Intracranial Xenograft Tumor Model. 2010 Society for Neurooncology Annual Meeting 2010 年 11 月 18-21 日 カナダ・モントリオール

4) 齋藤竜太, 園田順彦, 山下洋二, 金森政之, 永松謙一, 隈部俊宏, 富永悌二. Convection-enhanced delivery を用いた悪性神経腫瘍新規治療法の開発: 現状と展望. 第 69 回日本脳神経外科学術総会 2010 年 10 月 27-29 日 福岡 福岡国際会議場

5) 齋藤竜太, 山下洋二, 園田順彦, 隈部俊宏, 富永悌二. 脳腫瘍に対する理想的な投薬を目指して: Convection-enhanced delivery. 第 30 回日本脳神経外科コンgres 総会 2010 年 5 月 7-9 日 横浜 パシフィコ横浜 (ランチョンセミナー)

6) 齋藤竜太. Drug Delivery. 第 43 回東北脳腫瘍研究会 2010 年 4 月 3 日 仙台 東北大学良陵会館

7) 齋藤竜太, 園田順彦, 山下洋二, 金森政之, 永松謙一, 隈部俊宏, 富永悌二. テモゾロミド不応性再発神経腫瘍に対する ACNU 局所投与. 第 28 回脳腫瘍学会学術集会 2009 年 11 月 8-10 日 大阪 全日空ゲートタワーホテル大阪

8) Ryuta Saito, Yukihiro Sonoda, Toshihiro Kumabe, Ken-ichi Funamoto, Toshiyuki Hayase, Teiji Tominaga. Convection-enhanced Delivery of ACNU Under MRI Monitoring Against Recurrent Gliomas- Development of Computational Simulation of Drug Distribution. The Ninth International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration 2009 年 11 月 4-5 日 仙台 仙台メトロポリタンホテル

9) 齋藤竜太, 園田順彦, 山下洋二, 金森政之, 永松謙一, 隈部俊宏, 富永悌二. 再発神経腫瘍に対する MRI モニタリングを併用した Convection-enhanced Delivery 法による ACNU の投与. 日本脳神経外科学会第 68 回学術総会 2009 年 10 月 14-16 日 東京

10) Ryuta Saito, Yukihiro Sonoda, Toshihiro Kumabe, Teiji Tominaga. CED of ACNU. First International Meeting of the Society for CNS Interstitial Delivery of Therapeutics (SCIDOT) 2009 年 9 月 11-12 日 クリーブランド・米国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 竜太 (SAITO RYUTA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10400243