

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650287

研究課題名(和文) 抗がん剤内包ナノミセルを活用した新規化学粒子線治療技術の開発

研究課題名(英文) Development of a novel charged-particle therapy combined with cisplatin-incorporated polymeric micelles

研究代表者

寺川 貴樹 (Terakawa, Atsuki)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10250854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：陽子線治療とシスプラチンを併用する新規がん治療技術の開発を目的として、マウス腫瘍を用いた基礎研究を実施し、併用治療は単独治療に比べて腫瘍増殖を顕著に抑制することが示された。また、シスプラチン含有ミセル(CDDPミセル)を投与した腫瘍について、腫瘍内薬剤濃度を通常PIXE法で分析し、さらに腫瘍内薬剤濃度分布をサブミリPIXE法により分析した。その結果、薬剤濃度はCDDPミセルの方がより高濃度であり、正常組織では通常のシスプラチン投与とCDDPミセル投与では違いが無かった。よって、CDDPミセルと陽子線治療の併用治療でより優れた治療効果が得られるだけでなく、副作用を軽減する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic experiments were performed using a murine solid tumor to develop a novel combined-treatment between proton therapy and cisplatin. The results showed that the proton therapy combined with cisplatin inhibited tumor growth significantly in comparison to their monotherapies. Elemental analysis of the tumor treated with cisplatin-incorporated polymeric micelles (CDDP-micells) was performed to evaluate both concentration of the drug in the tumor tissue using the conventional PIXE analysis and its spatial distribution in the tumor using the submilli-PIXE analysis. The results showed higher drug concentration for the tumor treated with (CDDP-micells) compared to cisplatin whereas no significant difference in the concentration between CDDP-micells and cisplatin was observed for the normal tissue. This finding suggests that CDDP-micells not only provide superior therapeutic efficacy but also reduce side effects caused by conventional cisplatin when combined with proton therapy.

研究分野：粒子線治療

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：粒子線治療 シスプラチン ナノミセル PIXE分析

### 1. 研究開始当初の背景

近年の癌治療戦略において、必要な時に、必要な部位で、必要な薬物治療を最小限の副作用で達成する高精度ターゲティング治療に対する関心が高まっている。現在、国内で臨床試験が進行中のシスプラチンを内包した高分子ミセル型のドラッグデリバリー (DDS) 製剤は、EPR(Enhanced Permeability Retention)効果を利用して選択的に固形腫瘍へ薬剤を集積させ、従来の全身投与に比べて低副作用・高治療効果を目指している。しかしながら、一般に、薬剤耐性の問題など、抗がん剤単独での完治は困難である。

一方、放射線治療の分野では、従来の X 線に比べて物理学的・生物学的に優れた特徴を持つ粒子線治療が注目されている。しかしながら、陽子線の場合、X 線と同様の低酸素細胞の放射線抵抗性の問題があり、完治のために付与線量の増加が必要で放射線による副作用が問題となる。また、細胞の低酸素状態の影響を受けない炭素線は、加速器、照射装置等が大型化し、コスト面の問題が現状では避けられない。

### 2. 研究の目的

このような背景のもとに、本研究では、X 線に比べて腫瘍への線量集中度が優れ、高い細胞致死効果を持つ粒子線照射と、抗がん剤シスプラチンを腫瘍組織にのみ効率的に伝達して抗腫瘍効果を低副作用で誘発するナノサイズ高機能薬物運搬体 (ドラッグキャリア) を用いる治療技術の開発を目指す。この治療法では、粒子線照射で腫瘍へ線量集中させて正常組織への影響を最小限に留め、ドラッグキャリアで腫瘍組織にのみ高濃度で伝達されるシスプラチンの抗腫瘍効果、およびその放射線増感効果によって、残存する腫瘍細胞を殺傷する戦略である。よって、本研究では、難治癌に対して従来よりも低線量・低副作用で高い治療効果をもたらす新規化学粒子線治療技術を、腫瘍細胞を移植し腫瘍組織が形成された担がんマウスを用いた治療実験により、研究・開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究の治療実験は、研究代表者らが開発した東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター (CYRIC) の小動物用粒子線治療装置を用いて行った。陽子線は同センターの大型サイクロトロンより得られる 80 MeV 陽子線を用いた。また、治療用の陽子線を形成するために、拡大ブラックピーク形成用エネルギー変調フィルター、レンジシフター、ポーラス・コリメーター等の粒子線照射用のビーム形成デバイスを開発した。

治療実験では、C3H/He マウス 10 週齢のオスの後脚にマウス由来 NFSa 線維肉腫細胞  $1 \times 10^6/50 \mu\text{L}$  を移植した。治療条件は、比較対照の無治療コントロール群、陽子線単独治

療群、抗がん剤単独治療群、陽子線と抗がん剤併用治療群を設定した。抗がん剤としては、通常のシスプラチン (CDDP) または、シスプラチンを内包した高分子ミセル型の DDS 製剤 (CDDP ミセル) を使用した。CDDP ミセルは、ナノキャリア社より新規薬剤 NC-6004 の提供を受けた。NC-6004 は直径が数十ナノメートルの高分子ミセルで、その内部が薬物リザーバとして機能 CDDP を封入する。また、NC-6004 は、生体内において CDDP の徐放性を示す。なお、NC-6004 に関しては、現在臨床試験中であるため、ナノキャリア社からの提供条件により、腫瘍組織への集積データのみを取得とする。また、マウス腫瘍モデルとして、マウス骨肉腫細胞 (LM8 細胞) を用いた。したがって、本研究では、CDDP と NC-6004 を用いた場合の抗腫瘍効果の比較は、腫瘍組織内の薬剤濃度がより高い場合に抗腫瘍効果もそれに対応して大きいと判断する。

治療実験は、直径約 10 mm の腫瘍塊の形成を確認し開始した。コントロールと有意な腫瘍増殖遅延効果がある陽子線単回照射 (15 Gy または 30 Gy) または CDDP の腹腔内単回投与 (10 mg/kg) を行った。治療後 1 日毎の腫瘍体積の計測から腫瘍縮小による増殖遅延を評価し、各治療群における抗腫瘍効果を比較した。

生体内薬剤濃度分布の評価技術として、PIXE 元素分析手法を用い、抗がん剤を投与したマウスの腫瘍組織および正常組織内の薬剤濃度分布を評価した。PIXE 法では、内部標準法を用いた従来分析と、サブミリ径のビームスキャンによって組織レベルでの薬物の空間分布を評価するサブミリ PIXE 分析を行った。薬剤の投与では、10 mg/kg または 20 mg/kg の NC-6004 を尾静脈より単回投与した。投与 24 時間後にマウスから腫瘍を摘出し、粉末状のドライアイス中で急速冷凍した。摘出された腫瘍は PIXE 分析のためのサンプル調整までは -80 °C で保存された。サブミリ PIXE 用のサンプルとして、250  $\mu\text{m}$  の厚さ (凍結切片作成時) の腫瘍切片をクライオスタットを用いて作成した。また、内部標準法による元素濃度定量評価のため、腫瘍サンプルを硝酸灰化し、内部標準元素としてインジウム (1000 ppm) を加えて分析した。サブミリ PIXE 分析は、東北大学 高速中性子実験施設のダイナミトロン加速器およびサブミリ PIXE 分析システムを用いて行い、また、定量解析のための通常の PIXE 分析は、日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターのサイクロトロン加速器および真空 PIXE 分析システムを用いて行われた。

### 4. 研究成果

各種治療群の腫瘍体積変化を図 1 に示す。腫瘍体積  $V$  は、腫瘍の 3 直径を  $a$ 、 $b$ 、 $c$  として  $V=(\pi/6)abc$  で近似し評価した。陽子線 15 Gy 単独治療と CDDP 10 mg/kg の単独治療

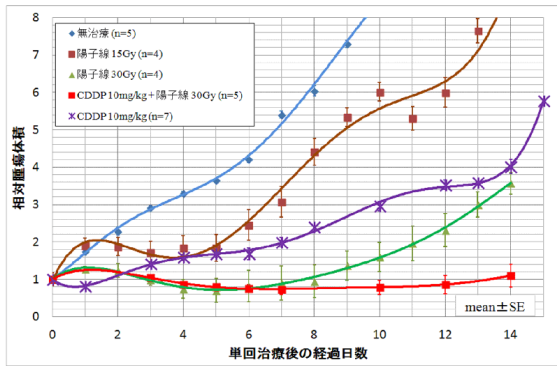


図1 CDDPを併用した陽子線治療および各種単独治療の腫瘍体積変化。治療はいずれも0日に実施された。グラフ脚注のnは使用した腫瘍数を示し、各治療群のデータはそれらの平均値と標準誤差である。

の腫瘍増殖遅延効果は、治療後1週間程度では大きな差はなく、その後はCDDP 10 mg/kgの条件の方が増殖抑制効果が持続する結果となった。陽子線 30 Gy 単独治療では、より大きな増殖遅延効果が得られ、さらに、陽子線 30 Gy 治療とCDDP 10 mg/kgの併用治療条件においては、2週間の経過観察期間内で腫瘍の再増殖はほとんど認められなく、優れた治療効果をもたらされたものと考えられる。

図2に、CDDPまたはNC-6004投与による腫瘍組織と正常組織における白金濃度について、内部標準法によるPIXE分析より評価した結果を示す。NC-6004投与群では、正常組織と腫瘍組織の白金集積に関して、腫瘍組織内により高濃度に集積することが確認された。さらに投与量を10 mg/kgから20 mg/kgにすると、腫瘍内の白金濃度が約2倍に増加するのに対して、正常組織においては顕著な変化は見られなかった。したがって、NC-6004は腫瘍組織に効果的に伝達され薬効をもたらすと同時に、従来のCDDP投与における重篤な副作用を軽減できると考えられる。さらに陽子線治療とNC-6004を併用治療した場合に、さらに高い腫瘍効果を少ない副作用で実現できる可能性も示唆される。

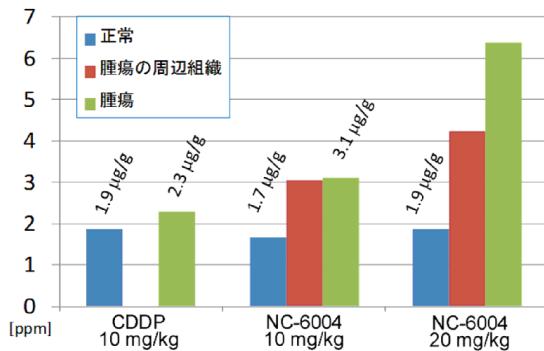


図2 CDDPまたはNC-6004投与による腫瘍組織および腫瘍周辺の正常組織における白金濃度。シスプラチン分子は白金元素を1つ含むため白金濃度がシスプラチン濃度を反映する。

サブミリ PIXE 分析により評価された腫瘍切片内の各種元素の空間分布を図3に示す。CDDPの直接投与により白金が腫瘍組織全体に分布しているのと同様に、ナノ粒子化されたNC-6009投与の場合でも白金は腫瘍組織全体に分布していることが認められた。腫瘍内の白金の濃度分布結果は、NC-6009が腫瘍血管を透過して腫瘍組織に効率的に運搬され、徐放効果により腫瘍組織全体にCDDPが送達された可能性を支持するものと考えられる。

また、白金以外の各種主要元素に関して、LM8株の腫瘍組織では、カリウムがほぼ一般的な分布を示す一方で、カルシウム、亜鉛および鉄が局所的に高集積することが観察された。これらはLM8腫瘍の性質と関連し、LM8腫瘍の治療戦略において有用な情報と成り得る可能性がある。

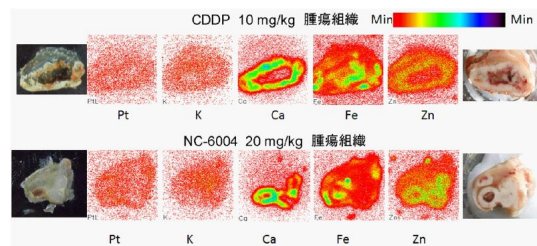


図3 サブミリ PIXE 分析により評価されたCDDPまたはNC-6004投与による腫瘍切片内の各種元素分布。

### 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)

S. Matsuyama, M. Fujisawa, T. Nagaya, K. Ishii, A. Terakawa et al., Improvement of energy stability of the Tohoku Dynamitron accelerator for microbeam and nanobeam application, 査読有, International Journal of PIXE, Vol. 23 Nos. 1&2, (2013), 69-75. DOI: 10.1142/S0129083513400081.

寺川貴樹、石井慶造、松山成男、他、腫瘍血流遮断により誘発されたマウス固形腫瘍内の元素分布、査読無、NMCC共同利用成果報告集 19, (2013年発行), 230-235.

H. Sugai, K. Fujiki, K. Ishii, S. Matsuyama, A. Terakawa, et al., IMPROVEMENT OF THE DETECTION EFFICIENCY OF THE IN-AIR SUBMILLI-PIXE CAMERA FOR BIOLOGICAL APPLICATION, 査読有, International Journal of PIXE, Vol. 22 Nos. 1&2, (2012), 37-43.

DOI: 10.1142/S0129083512400050.

A. TERAKAWA, K. ISHII et al. ,

Preliminary Study of Proton Therapy Combined with Cisplatin, 査読無, CYRIC Annual Report 2010-2011 (2012 年発行), 46-48.

〔学会発表〕(計4件)

松山哲生、石井慶造、寺川貴樹、他、PIXE分析法を用いた生体試料中の3次元元素分布画像取得法の開発、第29回PIXEシンポジウム、2013年11月13日～2013年11月15日、若狭湾エネルギー研究センター

松山哲生、石井慶造、寺川貴樹、他、PIXE分析用トレーサーへの量子ドットの応用に関する研究、日本原子力学会、2013年9月3～5日、八戸工業大学

A. Terakawa et al., Elemental analysis of a murine solid tumor treated with a vascular disrupting agent AVE8062, International conference on particle-induced X-ray emission (PIXE2013), 2013年3月3～8日、ブラジルグラマド市。

PIXE分析法を用いたマウス固形腫瘍内のシスプラチン含有高分子ミセルの集積評価、寺川貴樹、石井慶造、松山成男、他、第18回NMCC共同利用成果発表会、2012年5月11～12日、岩手医科大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺川 貴樹 (TERAKAWA, ATSUKI)  
東北大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：10250854

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：