

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659718

研究課題名(和文)革新的膀胱温存療法：「硼素膀胱局所動注＋中性子照射」による癌細胞選択的破壊

研究課題名(英文) Novel bladder preservation therapy: BNCT-BOAI-Radiation, which selectively target cancer cells with very few complications

研究代表者

東 治人 (Azuma, Haruhito)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：40231914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：“マウス膀胱癌モデル”、および、“マウス balloon occluded arterial infusion モデル”の作成。膀胱癌細胞の核内に選択的に集積、移行するべく特殊加工した膀胱癌細胞親和性硼素化合物の作成：硼素化合物(BSH)を、transferrin、および、polyethylene glycolでcoatingしたliposome内に包埋し、さらに核移行シグナル(NLS)を付加した“BSH-TF-PEG-liposome”を作成した。膀胱癌細胞表面抗原(UBC)に対する抗体を硼素化合物表面に付加した、より膀胱癌細胞に親和性の強い硼素化合物を開発中である。

研究成果の概要(英文)：We have developed the following mouse models, 1) six different mouse bladder cancer models (T24, ACHN, UMUC3, OMC-BT1, OMC-BT2, OMC-BT3) and 2) mouse balloon occluded arterial infusion model. We have been working on producing the new Boron-10 delivery system, which can be accumulated selectively in the tumor cells, especially in bladder cancer cells, using several special techniques, such as coating technique with transferrin and polyethylene glycol, liposome-delivery technique, and coating technique with antibodies, which has a special affinity to urothelial cancer antigen.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 泌尿器科学

キーワード：浸潤性膀胱癌 硼素中性子補足療法 BNCT 硼素 標的粒子線治療 硼素化合物 膀胱温存療法 加速器BNCT

1. 研究開始当初の背景

これまでの国内外における膀胱温存療法の現状：浸潤性膀胱癌における膀胱全摘術の治療予後は5年生存率60%以下であり、新規膀胱温存療法の開発は必須である。これまで、多数の研究グループが浸潤性膀胱癌に対する膀胱温存療法として、抗癌剤と放射線照射を併用した集学的治療を施行してきたが、いかなる治療法においても5年生存率は60%に満たず、また5年膀胱温存生存率は50%以下であった。

我々が開発した新膀胱温存療法「バルーン塞栓動脈内抗癌剤投与法 (BOAI) によるシスプラチン投与 + 放射線照射併用集学的治療」の治療成績とその問題点：上記の現状を踏まえ、我々は15年前から、膀胱周囲組織を高濃度のシスプラチンと低酸素状態に曝露させ、さらに放射線照射を加えることによって極めて高い殺細胞効果を発現する「バルーン塞栓動脈内抗癌剤投与法による集学的治療」を開発し、多数の症例を膀胱摘除することなく完全寛解に誘導してきた (T3以下の限局性尿路上皮癌では5年膀胱温存生存率)。しかし、腫瘍の組織型が尿路上皮癌以外の症例、および、腫瘍が膀胱外に伸展する症例では治療効果が悪く、また、発症頻度は4%以下と低いが、難治性の下肢末梢神経障害の発症を認めることが大きな問題点である (Azuma, et, al. Am. J. Clin. Oncol, 2008, 2009, Int J. Oncol, 2010, 2011)。

膀胱癌転移症例に対する新規治療法開発の必要性：肺、リンパ節などを含めた膀胱癌転移症例の予後は極めて悪く、その原因としてゲムシタピンやタキサン系薬剤などの新規抗癌剤を併用しても一時的にはレスポンスを認めるが次第に薬剤抵抗性を獲得し、また、骨髄機能や肝機能障害などのため長期継続が困難であることが挙げられる。現状では転移症例には治療法がないといっても過言ではない状況であり、一日も早く新規治療法が開発が望まれる。

2. 研究の目的

「BOAI法を用いた膀胱局所高濃度硼素化合物投与と中性子照射併用による新膀胱温存療法の開発と臨床応用」 1) “Two-stepによる安全、確実な癌選択的標的細胞治療システム” - 「BNCT」の原理：硼

素化合物は、それ自体は無毒であり、抗癌剤のような副作用を殆ど認めない。また、中性子線においても同様で、細胞内に硼素化合物を取り込んでいる細胞を破壊するが、中性子線自体が単独で照射されても、X線照射などと異なり、それ自体による障害を殆どきたさない。すなわち、硼素中性子捕捉療法 (BNCT) とは、癌細胞選択的に硼素化合物を投与することを1stステップ、そして、中性子照射を2ndステップとする2ステップ癌選択的治療システムによって安全に、しかもより確実に正常細胞を障害することなく癌細胞を選択的に破壊する画期的な癌標的治療である。細胞破壊メカニズムの詳細を右図に示す。硼素(^{10}B)を取り込んだ腫瘍細胞に中性子を照射すると取り込まれた硼素原子核は中性子を捕獲し核分裂を起こす。この $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ 核反応により放出された荷電粒子、 α 粒子(ヘリウム原子核)とLi反跳核(リチウム原子核)は、組織内でそれぞれ約 $9\mu\text{m}$ 、及び約 $5\mu\text{m}$ の距離範囲で細胞を破壊する(この飛行は細胞の1個分の大きさに相当する)ため、周囲の細胞に影響を与えることなく硼素が取り込まれた細胞のみを選択的に破壊することが可能となる。すなわち、硼素化合物を癌細胞に選択的に集積できれば正常細胞を温存しつつ癌細胞を破壊し、機能を保持したまま治癒を期待しうる。

2) 膀胱癌細胞-核親和性硼素化合物の開発：BNCTの成否は中性子束の深部への到達と、 ^{10}B 原子を効率よく腫瘍内、それも腫瘍の核内に導入できるか否かによっている。すなわち、腫瘍細胞、特に核内に選択的に取り込まれる腫瘍細胞核親和性硼素化合物の作成がBNCT治療の重要な鍵である。富澤らは、表面を transferrin、および Polyethylene glycol (PEG) で coating した直径 50micrometer の liposome を作成し、その内部に BSH を含有させた、BSH-transferrin-PEG-liposome を作成した。Transferrin は血清中に存在する鉄の担体糖蛋白として認識されており、その受容体は生体内に広く分布しているが、癌組織では特に高発現しているが、Transferrin で表面を coating した liposome は、癌細胞に選択的に取り込まれることになる。また、PEG を付加したのは表面を PEG で修飾することにより、網内系への取り込みを抑え、静脈中に高濃度の

liposomeを保つためである。これらの修飾を加えた liposome-硼素化合物は、投与後、内系への取り込みが少なく、静脈中に高濃度の liposomeを保ちつつ、腫瘍細胞に選択的に取り込まれ、BNCT 治療効率を画期的に向上させる。しかも、ポリアルニン付加、および核移行シグナル (NLS) を付加した BPA-transferrin-PEG-NLを開発することによって、膀胱癌細胞の核内に (腫瘍細胞核内に膀胱癌細胞の核内に (腫瘍細胞核内に取り込まれることにより殺細胞効果は 100 倍となる) 効率よく選択的に取り込ませることを可能にした。また、これに加えて、膀胱癌細胞表面抗原である urinary bladder cancer antigen (UBC) に対する抗体を硼素化合物表面に付加することによって、より、膀胱癌細胞に親和性の強い硼素化合物を現在開発中である

3) バルーン塞栓動脈内抗癌剤投与法 (BOAI) による-硼素化合物投与 : BNCT は十分量の硼素化合物が、均一にかつ正常細胞と高いコントラストをもって腫瘍細胞に集積できれば確実に腫瘍を破壊し、かつ正常細胞は温存され、機能を保持したまま治癒を期待しうる。そこで我々は、膀胱周囲組織を極めて高濃度の硼素化合物に曝露する“BOAI 法”による硼素化合物投与を考案した。BOAI 法は、2つの血流塞栓用バルーンが付属したカテーテルを用いて、膀胱動脈領域の血流を阻血しつつ、硼素化合物の動脈内注入を施行する“膀胱周囲組織選択的硼素化合物投与法”である。具体的手法は、両側の大腿動脈アプローチにより2本のバルーン付カテーテルを左右それぞれの内腸骨動脈に挿入し、標的血管である膀胱動脈を遠位、近位の各バルーン間に挟みこむ位置でバルーンを固定する (CO₂を注入)。この状態で、バルーン間の side hole から硼素化合物を動脈内注入することにより、膀胱、および膀胱周囲組織は、局所的に極めて高濃度の硼素化合物に曝露されることとなる。また、これに加えて、血流塞栓用バルーンによる阻血効果 (低酸素状態) が腫瘍細胞に障害を与え、併用する BNCT との相乗効果により殺細胞効果を向上させる画期的な治療方法である。

「BOAI 法を用いた転移症例に対する新規治療法の開発」 硼素化合物は、それ自体は無毒であり、全身投与を行っても抗癌剤の

ような副作用を殆ど認めない。また、中性子線においても同様で、細胞内に硼素化合物を取り込んでいる細胞を破壊するが、中性子線自体が単独で照射されても、X 線照射などと異なり、それ自体による障害を殆どきたさないため、全身に投与された硼素化合物が選択的に癌細胞に取り込まれれば、中性子を照射することによって転移巣においても正常細胞を障害することなく癌細胞を選択的に破壊することが可能となる。すなわち、癌細胞選択的に取り込まれる硼素化合物を全身に投与し、転移巣局所に中性子を照射することによって、正常細胞を障害することなく癌細胞を選択的に破壊する画期的な転移巣標的治療が可能となる。本治療は X 線や抗癌剤に比較してそれぞれの副作用が少ないため継続的に複数回の治療が施行可能であり、臨床的に画期的である (高齢者でも可能である)

3. 研究方法

A 「膀胱癌細胞特異的親和性を持つ硼素化合物の開発と癌細胞核内移行の確認」 1) 核移行シグナル “NLS” を付加した硼素化合物を、TF、および、PEG で coating した liposome 内に包埋する。2) UBC 抗体付加によって膀胱癌特異的硼素化合物を開発する。3) 細胞内導入効率の高いバイオナノカプセル (BNC) に BSH-NLS を封入する。4) BNC-BSH-NLS 表面に UBC 抗体を付加することによって膀胱癌特異的硼素化合物を開発する。

B 「In vitroにおける、膀胱癌細胞親和性硼素化合物の癌細胞選択的核内移行と BNCT 治療効果の確認」 1) 組織型の異なる膀胱癌細胞株 T24 (尿路上皮癌) および、UMUC3 (腺癌) と、非癌細胞株 CRL-2096 にそれぞれ膀胱癌細胞親和性硼素化合物を加えて培養し、癌細胞と非癌細胞、および、組織型の異なる癌細胞における細胞内硼素化合物導入率の相違を測定する (KUR-BSH 定量システムにて測定)。2) 上記癌細胞と非癌細胞にそれぞれ膀胱癌細胞親和性硼素化合物を加えて培養し、中性子を照射することによって癌細胞と非癌細胞における BNCT 治療による殺細胞効果の違いを確認する。また、これまでの膀胱温存療法 (BOAI 抗癌剤動注 + 放射線) に抵抗性であった adenocarcinoma 膀胱癌における治療効果を検討する。

C「マウス膀胱癌モデルを用いた *in vivo* における BOAI-BNCT 療法の膀胱癌選択的治療効果の確認」 1) マウス膀胱癌モデルを用いて通常静脈投与に比較して、バルーン塞栓動注法 (BOAI 法) による膀胱癌細胞への硼素化合物の取りこみ増加、および、BNCT 治療による殺細胞効果の向上を確認する。2) マウス膀胱癌 BOAI モデルを用いて組織型の異なる膀胱癌 (尿路上皮癌、および、腺癌) に対する BNCT 治療効果を検討し、これまでの大阪医大式膀胱温存療法で治療効果が得られなかった腺癌に対する BOAI-BNCT の治療効果を確認する。

D「ヒト浸潤性膀胱癌に対する、BOAI-BNCT 膀胱温存療法の治療効果の検討」 1) 試験デザイン 目的: 膀胱全摘群を対照群として本治療法の有用性と安全性を検討する (一次評価項目、OS)。 2) BOAI 法による硼素化合物投与: 血流塞栓用バルーン付カテーテルを用いて膀胱、および、膀胱周囲組織に選択的に極めて高濃度の硼素化合物を投与する。 3) 膀胱癌細胞特異的親和性を持つ硼素化合物の癌細胞核内移行の確認: 膀胱癌組織、および、正常粘膜を TUR-BT にて採取し、免疫組織染色および、ICP-AES を用いてそれぞれの組織における BSH 濃度、さらには投与後の時間経過による BSH 蓄積量を測定し、癌細胞親和性を確認する。 4) 中性子照射: 現時点では原子炉 (日本原子力研究開発機構研究 4 号炉「JRR4」) を利用するが、将来的には加速器 BNCT を院内に設置することにより原子炉を脱却し、病院内 BNCT を実現させる。 5) 治療効果の判定: 治療終了後第 8 週の時点で、TUR-Bt を再度実施し、骨盤部の MRI、CT などの画像診断とともに RECIST 規準に基づき治療の奏効率を評価する。

E「ヒト膀胱癌転移症例に対する、BNCT 療法の治療効果の検討」 1) 試験デザイン 目的: 抗癌剤治療に抵抗性の膀胱癌転移症例を対象として本治療法の有用性と安全性を検討する (一次評価項目、OS)。 2) 硼素化合物投与: 肺、および、肝臓の転移巣に対する血管にスーパーセレクトカテーテルを用いて高濃度の硼素化合物を動脈内投与する。 3) 中性子照射: 原子炉 (日本原子力研究開発機構研究 4 号炉「JRR4」) を利用する。 5) 治療効果の判定: 治療終了後第 8 週の時点で、転移巣に相当する部位の MRI、および、CT を

施行し、RECIST 規準に基づき治療の奏効率を評価する。また、既存の抗癌剤治療と、全生存率、膀胱温存生存率を比較検討する。

4. 研究成果

“マウス膀胱癌モデル”、および、“マウス balloon occluded arterial infusion モデル”の作成: BALB/C nunuマウスに T24, ACHN, UMUC3, OMC-BT1、OMC-BT2、OMC-BT3 の 6 種類の膀胱癌細胞株を膀胱粘膜下移植し、マウス膀胱癌モデルを確立した。また、このマウス膀胱癌モデルの大動脈から総腸骨動脈にかけて抗がん剤を動脈内投与するマウス膀胱癌 BOAI モデルを作成した。

膀胱癌細胞の核内に選択的に集積、移行するべく特殊加工した膀胱癌細胞親和性硼素化合物の作成: 硼素化合物 (BSH) を、腫瘍に高発現する transferrin (TF: 腫瘍細胞に選択的に取り込ませるため)、および、polyethylene glycol (PEG: 網内系への取り込みを抑え、静脈中に高濃度の liposome を保つため) で coating した liposome 内に包埋し、さらに核移行シグナル (NLS) を付加した “BSH-TF-PEG-liposome” を作成した。膀胱癌細胞表面抗原である urinary bladder cancer antigen (UBC) に対する抗体を硼素化合物表面に付加することによって、より膀胱癌細胞に親和性の強い硼素化合物を開発中である。

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 11 件)

1. Juri H, Matsuki M, Itou Y, Inada Y, Nakai G, Azuma H, Narumi Y. Initial Experience With Adaptive Iterative Dose Reduction 3D to Reduce Radiation Dose in Computed Tomographic Urography. J Comput Assist Tomogr 37(1):52-57,2013.01

2. Teruo Inamoto, Takanobu Ubai, Takeshi Nishida, Yutaka Fujisue, Yoji Katsuoka, Haruhito Azuma. Comparable effect with minimal morbidity of low-dose Tokyo 172 strain compared with regular dose Connaught strain as an intravesical bacillus Calmette-Guérin prophylaxis in nonmuscle invasive bladder cancer: Results of a randomized prospective comparison. Urology Annals 5(1):7-12,2013.02

3. Haruhito Azuma, Teruo Inamoto, Kiyoshi Takahara, Hayahito Nomi, Hiroshi Uehara, Kazumasa Komura, Koichiro Minami, Junko Kouno, Yatsugu Kotake, Hirokazu Abe, Shizuko Takagi, Kazuhiro Yamamoto, Yoshihumi Narumi, Satoshi Kiyama. Effect of a novel bladder preservation therapy, BOAI-CDDP-radiation (OMC-regimen). INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY. 243(1):79-87.2013 Jul.doi: 10.3892/ijo. 2013.1923.
4. Haruhito Azuma, Teruo Inamoto, Kiyoshi Takahara, Hayahito Nomi, Hajime Hirano, Hiroshi Uehara, Kazumasa Komura, Koichiro Minami, Junko Kouno, Yatsugu Kotake, Hirokazu Abe, Shizuko Takagi, Naokazu Ibuki, Kazuhiro Yamamoto, Yoshihumi Narumi, Satoshi Kiyama. A great option for elderly patients with locally invasive bladder cancer, BOAI-CDDP-radiation (OMC regimen). Int.Oncol. 43:1087-1094.2013 .08.DOI: 10.3892/ijo.2013.2058
5. Takahara K, Inamoto T, Komura K, Watsuji T, Azuma H. Post-operative urothelial recurrence in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma managed by radical nephroureterectomy with an ipsilateral bladder cuff: Minimal prognostic impact in comparison with non-urothelial recurrence and other clinical indicators. Oncol Lett. 6(4):1015-1020.2013.10. DOI: 10.3892/ol.2013.1485
6. Nozawa M, Nonomura N, Ueda T, Nishimura K, Kanayama HO, Miki T, Nakatani T, Tomita Y, Azuma H, Yoshioka T, Tsujihata M, Uemura H. Adverse Event Profile and Dose Modification of Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma in Real-world Japanese Clinical Practice. Jpn J Clin Oncol. 43(11):1132-8. 2013 .11. DOI: 10.1093/jjco/hyt121.
7. Komura K, Inamoto T, Takai T, Uchimoto T, Saito K, Tanda N, Kono J, Minami K, Uehara H, Fujisue Y, Takahara K, Hirano H, Nomi H, Watsuji T, Kiyama S, Azuma H. Single session of high-intensity focused ultrasound for localized prostate cancer: treatment outcomes and potential effect as a primary therapy. World J Urol. 2013.11.23. DOI 10.1007/s00345-013-1215-z.
8. Teruo Inamoto, Kazumasa Komura, Toshikazu Watsuji, Haruhito Azuma. Specific body mass index cut-off value in relation to survival of patients with upper urinary tract urothelial carcinomas. Int J Clin Oncol 17(3):256-262,2012.06
9. Kiyoshi Takahara, Naokazu Ibuki, Teruo Inamoto, Hayahito Nomi, Takanobu Ubai, Haruhito Azuma. Predictors of Success for Stone Fragmentation and Stone-Free Rate After Extracorporeal Shockwave Lithotripsy in the Treatment of Upper Urinary Tract Stones. Urology Journal 9(3):549-552,2012.08
10. Teruo Inamoto, Haruhito Azuma. Immunotherapy of Genitourinary Malignancies. Journal of Oncology Volume 2012
11. Kazumasa Komura, Teruo Inamoto, Hiroshi Masuda, Toshikazu Watsuji, Haruhito Azuma. Experience with high-intensity focused ultrasound therapy for management of organ-confined prostate cancer: critical evaluation of oncologic outcomes. Acta BioMedica. 83(3):189-196.2012.12.
- 〔学会発表〕(計 3件)
1. 第 15 回 関西泌尿器科研究会「泌尿器科 癌診療の私たちの工夫」東 治人. リーガロイ ヤルホテル(大阪) 2012/7/7
2. 第 62 回日本泌尿器科学会大分地方会 イブニングセミナー「泌尿器癌診療における私たちの工夫」東 治人. レンブラントホテル 大分(大分) 2012/6/2
3. 第 3 回 CT Urography 研究会「尿路上皮癌の診断と治療：浸潤性膀胱癌」東 治人. ヒルトンプラザウエスト(大阪) 2012/6/23
6. 研究組織
- (1)研究代表者
東 治人 (Azuma Haruhito)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：40231914
- (2)研究分担者
鈴木 実 (Suzuki Minoru)
京都大学・原子炉実験所・准教授
研究者番号：00319724
- 稲元 輝生 (Inamoto Teruo)
大阪医科大学・医学部・診療准教授
研究者番号：20330087
- 小野 公二 (Ono Kouzi)
京都大学・原子炉実験所・教授
研究者番号：90122407
- 宮武 伸一 (Miyatake Shinichi)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：90209916
- 右梅 貴信 (Ubai Tkanobu)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：90388265