

令和元年6月18日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10750

研究課題名(和文) ICG結合ナノキャリアを用いた脳腫瘍の新規化学療法

研究課題名(英文) Novel chemotherapies for brain tumors using a nano-carrier combined with ICG

研究代表者

岩立 康男 (IWADATE, Yasuo)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70272309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ICG結合型リポソームを設計開発し、これが脳腫瘍に特異的に集積し、近赤外線照射によって発熱作用と活性酸素を産生することを示してきた。本研究では、この分子に抗がん剤を封入してナノキャリアとして用いる治療実験を行った。ICG-リポソームと近赤外線照射を併用した治療群では有意な増殖遅延を認め、この治療効果には、HSP70発現が関与していた。CD8 T細胞の浸潤を強く認め、免疫不全ラットでは治療効果が消失した。一方で、テモゾロマイド封入による増殖遅延効果の増強は確認できなかった。脳腫瘍に対する治療効果は、腫瘍細胞死をいかに有効な獲得免疫誘導に結び付けられるかが鍵となると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は希少疾患であるが、最も悪性度の高い脳腫瘍であり、50歳代に高頻度に発症するため社会的損失の大きい疾患である。血液脳関門(BBB)の存在により、薬剤移行性が不良でありその治療を阻む一因となる。我々は、近赤外蛍光色素であるindocyanine green (ICG) 結合型リポソームをナノキャリアとして用い、種々の抗がん剤をその中に封入し、腫瘍局所に高濃度に分布させることによって効率的に細胞死を誘導し、特異的抗腫瘍免疫が誘導されることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have developed a liposome combined with indocyanine green (ICG) which specifically accumulates in a brain tumor model and generates heat and active oxygen when irradiated with infrared ray. We planned to use this particle as a nanocarrier enclosed with anticancer agents. A significant reduction in tumor progression was observed in the treated tumors, which was accompanied with a high expression of heat shock protein-70. This efficacy was also accompanied with CD-8 T cell accumulation and not observed in the immuno-compromised animals. However, enclosure of temozolomide did not generate an additional efficacy. It is supposed to be important in the treatment of brain tumors how effectively tie the tumor cell death to the induction of acquired immunity.

研究分野：脳神経外科

キーワード：glioma liposome nanocarrier chemotherapy immune response HSP70

## 1. 研究開始当初の背景

グリオーマの最悪性型である膠芽腫は、正常脳組織に浸潤性に発育するため治癒的切除が難しく、高度に難治性の腫瘍である。腫瘍細胞と正常神経細胞が混在する浸潤域の治療では、現行の可及的切除術と放射線治療を主体とした治療戦略は強い中枢神経毒性につながる可能性が高い。また、本腫瘍は40歳代～50歳代の社会的活動性の高い時期に好発するため、社会的損失が大きいことも特徴の一つである。有効性の高い新規の治療戦略が求められている。

我々は、800～810nmの近赤外線照射によって発熱作用と活性酸素産生作用を示す近赤外蛍光色素であるインドシアニングリーン(ICG) にリン脂質を結合させることにより、近赤外線蛍光色素修飾型リポソームとしてICG結合型リポソームを設計開発することに成功した(Suganami, 2012)。このICG-リポソームはナノ粒子としての性格を有しており、腫瘍組織の未成熟血管から20～200nmの粒子が漏出するEnhanced Permeation and Retention (EPR) 効果により、腫瘍組織に選択的に取り込まれ数日間にわたり滞留する。ここに近赤外線照射を行うことによりリポソームが開裂し内容を放出する。正常組織からは速やかに流出するため、このICG-リポソームをナノキャリアとして用い適切なタイミングで近赤外線照射を行うことによって、腫瘍選択性の高い強力な化学療法が可能となる。

一方で、脳は免疫学的寛容の場として知られ、抗原提示が不十分であると同時に、免疫担当細胞の集積を得づらい組織である。我々は、これまでに脳腫瘍局所で有効な抗原提示をもたらすことが腫瘍拒絶に重要であることを示してきた。本研究では、本治療により脳腫瘍局所で強力な細胞死をもたらすことにより、有効な抗原提示をもたらし、免疫機構も動員した腫瘍拒絶が得られる可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、このICG-リポソームが静脈内投与で脳腫瘍内へ特異的に集積し、局所における高濃度な抗がん剤の分布により効率よく細胞死を誘導できること、同時にこれが抗腫瘍免疫の誘導につながることを証明することにある。最終的なエンドポイントは、脳腫瘍モデルラットの生存期間延長であり、同時に安全性を確認し、将来的な臨床応用につなげることを目指す。

(2) 最終的なエンドポイントは、脳腫瘍モデルラットの生存期間延長であり、同時に安全性を確認し、将来的な臨床応用につなげることを目指して研究を行う。

## 3. 研究の方法

標準的脳腫瘍モデルであるFisher rat-9L gliosarcomaの系を用いる。治療は抗がん剤を封入したICG-リポソームを静脈内に投与した後、種々のスケジュールで近赤外線(NIR)照射を行い、治療効果を種々の方法で判定する。

(1) このラット脳腫瘍モデルを作製した後にICG-リポソームとNIR照射による治療を開始し、治癒率、生存期間、および7 Tesla動物専用MRI による腫瘍体積の経時的变化を検討する。無治療群、ICG-リポソーム+光照射群、抗がん剤封入ICG-リポソーム+光照射群との比較を行う。

(2) 各群の生存期間をKaplan-Meier 法にて算出し、生存曲線を作成する。

(3) 治療後のラットから脳を摘出し、HE染色、TUNEL染色を行い、治療効果を病理組織学的な面から比較検討するとともに、細胞死の機序がネクローシスかアポトーシスか、を確認する。CD4 T リンパ球、CD8 T リンパ球浸潤の有無やマイクログリア・マクロファージの浸潤(RM4抗体)、抗腫瘍免疫誘導に係る可能性のあるHeat shock protein-70 (HSP70)などの発現状態を免疫組織学的に比較する。

(4) 免疫不全ヌードラットを用いて、同様な治療実験を行い、治療効果がどのように変化するかを検討する。

(5) 加温用マイクロプローブを脳腫瘍内に挿入し、温熱単独での治療効果を確認する。野生型動物と同様に、MRIによる経時的脳腫瘍体積測定、生存期間の他、組織学的検索、免疫組織化学検査等も併せて行う。

(6) 安全性の確認：治療後ラットの神経学的評価とMRI によって神経変性の有無の確認、脳浮腫の評価を行う。一部の動物では、摘出脳の病理組織学的検討も行い本治療に伴う神経毒

性の程度を検証する。また、各臓器を摘出し、組織学的に壊死などの副作用が存在しないことを確認する。

#### 4. 研究成果

- (1) 新規ナノ粒子の脳腫瘍への集積: ICG-Liposome 投与 24 時間後に、脳を摘出し、近赤外線蛍光イメージによる評価を行った。脳腫瘍には高い集積が確認されたが、正常脳への集積は見られなかった。24 時間後では、肝臓、腎臓、脾臓にも高い集積を認めたが、1 週間後の計測では、腫瘍組織にのみ集積が見られ、他の健常臓器では集積が見られなかった。この脳腫瘍組織への特異的な高集積は enhanced permeability and retention (EPR) 効果によるものと考えられる。
- (2) 9L gliosarcomaによるラット脳腫瘍モデルを作製し、テモゾロマイド封入ICG-リポソームを投与した後24時間後と48時間後にNIR照射を各10分間ずつ行った。day3、day7、day14、day21に7 テスラ動物専用MRI (放射線医学総合研究所) を用いて腫瘍生着の確認、腫瘍体積の経時的変化を測定した。未治療コントロール群と比較して、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群では有意な増殖遅延を認めた ( $p < 0.0001$ )。しかしながら、テモゾロマイド封入による更なる増殖遅延効果の増強は確認できなかった。
- (3) Kaplan-Meier 法による生存曲線を作製した。未治療コントロール群では生存期間中央値は  $31.6 \pm 3.1$  日であったのに対し、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群では  $59.3 \pm 2.9$  日と有意な生存期間の延長を認めた ( $p = 0.024$ )。しかしながら、ICG-リポソームとNIR照射と比較して、テモゾロマイド封入した場合の更なる生存期間の延長効果は認められなかった。
- (4) HE標本では、未治療コントロール群においては壊死像は全く認めなかった。ICG-リポソーム投与単独群でもほぼ同様であり、壊死像は認められなかった。一方、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群では広範な壊死像が確認され、その中に島状に腫瘍細胞塊が残存していた。テモゾロマイド封入ICG-リポソーム投与でも壊死の出現頻度に変化はなく、通常のICG-リポソーム群と違いは認められなかった。TUNEL染色でも、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群でのみアポトーシス細胞を認めた。免疫組織化学検査では、壊死とアポトーシスの混在する標本において、腫瘍全体にCD8 T リンパ球浸潤を認めた。CD4 T リンパ球浸潤はほとんど認められなかった。マイクログリア・マクロファージ染色 (RM4抗体陽性細胞) は、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群において、腫瘍周囲の正常脳に認められ、一部腫瘍内辺縁部への浸潤が認められた。ICG-リポソーム投与単独、あるいはNER照射単独の場合は腫瘍周囲にわずかながらRM4抗体陽性細胞を認めた。ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群では強いHSP70の発現が認められた。一方、未治療群ではHSP70の発現はほとんど認められなかった。
- (5) 免疫不全ヌードラットを用いて、同様の治療実験を行ったが、MRIによる腫瘍増大抑制効果は認められなかった。生存期間も未治療コントロールと全く同様であった。
- (6) アドメテック社のマイクロ加温針を腫瘍局所に挿入してICG-リポソームとNIR照射で得られる最高加温領域の45 °Cにおける温熱単独による治療効果を検討した。MRIでの腫瘍増殖抑制効果は見られず、T2強調画像での広範な壊死を示唆する高信号域は認められなかった。また、組織学的検討、免疫組織化学検査でも未治療コントロールとの差異は存在しなかった。
- (7) 治療後に、適宜MRIのT2強調画像を撮像し脳浮腫の有無を確認したが、腫瘍増大に伴わない脳浮腫は認められなかった。また、経過中、担癌ラットの行動異常なども認められなかった。テモゾロマイド封入ICG-リポソームとNIR照射の場合も、明らかな有害事象は認められなかった。
- (8) まとめ  
我々は、インドシアニングリーン (ICG) 結合型リポソームを設計開発し、これが脳腫瘍に特異的に集積し、近赤外線照射によって発熱作用と活性酸素を産生することを示してきた。本研究では、この分子に抗がん剤を封入してナノキャリアとして用いる治療実験を行った。未治療コントロール群と比較し、ICG-リポソームと近赤外線照射を併用した治療群では有意な増殖遅延を認め、この治療効果には、HSP70発現が関与していた。CD8 T細胞の浸潤を強く認め、免疫不全ラットでは治療効果が消失した。一方で、テモゾロマイド封入による増殖

遅延効果の増強は確認できなかった。脳腫瘍に対する治療効果は、腫瘍細胞死をいかに有効な獲得免疫誘導に結び付けられるかが鍵となると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計9件）

- Shibata S, Shinozaki N, Iwadate Y, et al. Photo-immune therapy with liposomally formulated phospholipid-conjugated indocyanine green induces specific antitumor responses with heat shock protein-70 expression in a glioblastoma model. *Oncotarget* 10: 175-183, 2019. (査読有)
- Iwadate Y, Matsutani T, Hara A, et al. Eighty percent survival rate at 15 years for 1p/19q co-deleted oligodendroglioma treated with upfront chemotherapy irrespective of tumor grade. *J Neurooncol.* 141(1):205-211, 2019. (査読有)
- Takashima Y, Sasaki Y, Iwadate Y, Kajiwaru K, Yamanaka, et al. Target amplicon exome-sequencing identifies promising diagnosis and prognostic markers involved in RTK-RAS and PI3K-AKT signaling as central oncopathways in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* 9(44): 27471-27486, 2018. (査読有)
- Wakabayashi T, Natsume A, Iwadate Y, Shibui S, et al.; Members of Japan Clinical Oncology Group Brain Tumor Study Group (JCOG-BTSG). JCOG0911 INTEGRA study: a randomized screening phase II trial of interferon- $\beta$  plus temozolomide in comparison with temozolomide alone for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurooncol* 138: 627-636, 2018. (査読有)
- Iwadate Y. Plasticity in glioma stem cell phenotype and its therapeutic implication. *Neurol Med Chir.* 58: 61-70, 2018. (査読有)
- Iwadate Y, Suganami A, Tamura Y, Saeki N, et al. The pluripotent stem-cell marker alkaline phosphatase is highly expressed in refractory glioblastoma with DNA hypomethylation. *Neurosurgery* 80:248-256, 2017. (査読有)
- Yoshida Y, Wang H, Hiwasa T, Iwadate Y, et al. Elevation of autoantibody level against PDCD11 in patients with transient ischemic attack. *Oncotarget* 9: 8836-8848, 2017. (査読有)
- Iwadate Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioglastoma progression. *Oncol Let.* 11:1615-1620. 2016. (査読有)
- Iwadate Y, Shinozaki N, Matsutani T, Uchino Y, Saeki N. Molecular imaging of 1p/19q deletion in oligodendroglial tumours with  $^{11}\text{C}$ -methionine positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* pii: jnnp-2015-311516. doi: 10.1136/jnnp-2015-311516. 2016. (査読有)

〔学会発表〕（計1件）

岩立康男、松谷智郎、原 彩佳、篠崎夏樹、菅波晃子、田村 裕. 膠芽腫の悪性転化 低酸素環境によるDNA脱メチル化. 第75回日本脳神経外科学会学術総会. 2016年9月29日（福岡国際会議場、福岡県、福岡市）

## 6. 研究組織

研究分担者：なし

研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

