

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22549

研究課題名(和文)腫瘍血管特異的な放射線治療による新たながん兵糧攻め療法の開発

研究課題名(英文)Development of new cancer therapy by tumor blood vessel-specific radiation therapy

研究代表者

権田 幸祐 (GONDA, Kohsuke)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80375435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管新生阻害剤(Bevacizumab)による抗腫瘍効果を改善する方法の開発を目指した。2019年度はBevacizumab投与と併用する低線量の放射線治療の条件設定を行った。また、金ナノ粒子投与マウスに放射線照射を行い、放射線増感作用による腫瘍縮小効果について検討を行った。2020年度は併用療法の組織学的効果を評価するため、その指標として重要となる「腫瘍血管の形態解析」と「腫瘍血管の機能解析」の評価技術の開発を中心に進めた。そして2021年度は、2020年度に開発した評価技術をBevacizumab等の血管新生阻害剤と放射線治療を併用したマウスの抗腫瘍効果の質的評価に応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全ての固形がんにも有効な治療法として、血管新生阻害剤による腫瘍血管形成阻害を目的とした「兵糧攻め療法」が、半世紀近く前に提案された。しかし、血管新生阻害剤への獲得耐性のため、現在も期待されたほどの効果は示していない。本研究はこのような状況を打破するべく、放射線増感剤の金ナノ粒子を応用し、低線量の放射線治療と血管新生阻害剤による併用療法の開発を目的とした。よって本研究によって新たながん治療法の開発が進み、臨床応用への可能性が広がれば、今後のがん撲滅への波及効果は大きいと確信している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a method for improving the antitumor effect of an angiogenesis inhibitor (bevacizumab). In 2019, conditions for low-dose radiation therapy to be used in combination therapy with bevacizumab administration were examined. In addition, the tumor-bearing mice administered with gold nanoparticles (AuNPs) were irradiated with radiation, and radiosensitization effect of AuNPs on tumor shrinkage was investigated. In 2020, to evaluate the histological effect of combination therapy of angiogenesis inhibitor and radiation therapy, we developed techniques to investigate the "morphological change of tumor blood vessels" and "functional change of tumor blood vessels". In 2021, those evaluation technologies developed in 2020 were applied to the evaluation of the antitumor effect of mice in combination with angiogenesis inhibitors and radiation therapy.

研究分野：医工学

キーワード：腫瘍血管 血管新生 血管新生阻害剤 放射線治療 ナノ粒子 CT イメージング

1. 研究開始当初の背景

本研究では、腫瘍血管の特異的損傷を目的とした低被曝の放射線治療法の開発を行い、概念の提唱から約50年間、広範ながん治療への展開が困難であった血管新生阻害療法を大きく変革させることを目指している。

がんは正常細胞に比べ急速に増殖し、多くの栄養や酸素を必要とする。これらの供給には腫瘍血管が必須である。腫瘍血管は、腫瘍細胞からの血管新生誘導シグナルを受け、正常血管から無秩序かつ急速に作られる。1971年 Folkman らは、がんの増殖が血管新生を伴う事実に基づき、血管成長因子の阻害により腫瘍を兵糧攻めにする治療法(血管新生阻害療法)の概念を提案した。その後の研究により、血管内皮増殖因子(Vascular endothelial growth factor: VEGF)に対する抗体医薬(ベバシズマブ: ヒト化 VEGF 抗体)が開発され(2004年米国承認、2007年国内承認)、様々ながんへの治療応用が始まった。しかし、ベバシズマブ単剤で効果(無増悪生存期間や生存期間)を発揮するのは悪性神経膠腫、卵巣がんのみであり、非小細胞肺癌(非扁平上皮がんを除く)、大腸がん、乳がんでは他の抗がん剤との併用でのみ効果が認められた。また担がんマウスを使った実験から、がん組織にベバシズマブに対する耐性が生じること(獲得耐性)が分ってきた。獲得耐性の要因として、血管新生を誘導する因子は VEGF 以外にも、線維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor: FGF)や胎盤増殖因子(Platelet derived growth factor: PDGF)など、多数存在しており、VEGF 阻害の介入によってこれらの代償経路が優位となり、結果的に腫瘍血管が成長し、腫瘍増殖能が保持されると推測されている。実際、ベバシズマブの投与により、FGF や PDGF の発現が亢進することが臨床的に確認されている。

さらにベバシズマブによる VEGF の中和で新たな血管新生を抑制し、がんの増殖を抑制できたとしても、既存の腫瘍血管は残るため、がん細胞が腫瘍血管を經由し他臓器へ転移する可能性を拭い去ることは難しい。またベバシズマブの薬効発揮には腫瘍内の多量の VEGF への結合(中和)が必要であるため、多量投与が施行される。しかし、この処方、出血、血栓症、消化管穿孔、創傷治療の遅延、血圧上昇などの副作用を引き起こすことも知られている。以上のように、概念の提唱から50年近く経った現在でも、血管新生阻害療法は期待されたほどの効果は示していない。

一方、腫瘍血管が、がんの増殖や転移に必須なことは揺るぎのない事実である。よって血管新生阻害剤による効果を亢進させることができれば、これまでの血管新生阻害療法とは異なるアプローチでがん治療が可能になると考えられる。そこで申請者は、放射線治療効果を増感させる薬剤(金ナノ粒子)を開発し、これを腫瘍へ特異的に送達した後、低線量の放射線によって腫瘍組織を損傷させる技術を確立し、この技術と血管新生阻害剤による治療法を併用した方法の開発を進めた。

2. 研究の目的

血管新生阻害剤と放射線療法の併用による効果的ながん治療法の開発を目的とした。特に放射線療法においては、金ナノ粒子(AuNPs)を応用し、金の放射線増感効果を利用することにより、放射線照射の線量を軽減させた治療法を活用することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 担癌マウスの作製とベバシズマブ治療

血管新生阻害剤としては、ヒト VEGF 抗体のベバシズマブを用いて実験を進めた。ヒト由来のがん細胞10%のウシ胎児血清(FBS)を含むRPMI-1640にて、5% CO₂を含む37℃の条件下で培養した。その後、免疫不全マウスであるBALB/c-nudeマウス(雌)の5~7週齢マウスの皮下に細胞を移植し、担癌マウスを作製した。

後述する(4)の方法で腫瘍サイズの計測を行い、おおよそ150 mm³になった時点でベバシズマブ治療の介入を開始した。本研究では5 mg/kg と3 mg/kg の2種類の濃度で検討を行った(薬剂量/マウス体重)。ベバシズマブを注射用水で2.5 mg/mLに希釈したのち、5 mg/kg もしくは3 mg/kgになるように、麻酔下にて尾静脈から投与した。ベバシズマブ投与は、ベバシズマブ単独治療群と放射線との併用療法群の2条件において投与を行った。

(2) 放射線増感剤影剤としてのAuNPsの合成

近年、ナノテクを応用したがん診断・治療法の開発が盛んに行われている中で、放射線の必要線量を減少させることを目的として、AuNPsを放射線増感物質として利用する研究が注目されている。AuNPsのような高原子番号の金属原子にX線やγ線などの電磁放射線を照射した際、光電効果やコンプトン効果によって金属原子由来の2次電子が発生し、これがナノ粒子周囲の水分子と衝突することでDNA損傷性の活性酸素を生成し、放射線治療効果を高めるとされている。また、発生した活性酸素種の有効範囲はAuNPs表面から2-3 μm程度と見積もられている。AuNPsの放射線増感作用に関し、ナノ粒子の形状や粒径などの条件について種々の検討を行った先行

研究が報告されている。形状に関しては球状、スパイク状、ロッド状で比較され、球状が最も細胞への取り込みが多く、それ故、放射線増感作用が高いと報告されている。さらに球状の中でも、直径 5-50 nm の範囲で粒径比較をした際に直径 15nm 付近の粒子が、最も放射線増感効果があると報告されている。さらに、放射線増感作用を高める照射装置の条件としては、管電圧を 60-140 kVp 程度に設定するのが良いとされている。

本研究では、当研究室で以前に開発した 15nm 径の AuNPs をテトラクロロ金(III)酸四水和物を材料に酸化還元法を用いて合成した。作製した AuNPs の粒径・分散を調べるために透過型電子顕微鏡 (TEM: Transmission electron microscope) にて粒子の状態を観察した。観察試料は調節した粒子コロイド水溶液をコロジオン膜貼り付けメッシュ (200 または 400 メッシュ) に滴下し、室温で乾燥させ作製した。

(3) 放射線治療

多くの先行研究では、目的の線量を 1 回照射のみで実施しているが、本研究では臨床を模倣して分割照射とした。1 回線量は 2Gy と少なくし、この線量で複数回の照射を行った。放射線単独治療群と併用療法群の条件に照射を行った。照射は治療スケジュールが全て終了するまで行われた。

放射線照射装置は、MX-80Labo (mediXtec Japan Corporation) を用いた。照射に用いた線源は、管電圧 80 kVp、管電流 25 mA の X 線で、線源からの距離は 125 mm とし、中心線束上に腫瘍が位置するようにポジショニングし、腫瘍以外は 10mm の厚みの鉛含有ゴムシートの遮蔽版で遮蔽した。

(4) 腫瘍サイズの計測

腫瘍サイズはノギスを用いて計測した。腫瘍の長径、短径、高さを計測し、以下の式に当てはめて算出した。

$$\text{腫瘍サイズ} = 4/3 \pi \times \text{長径}/2 \times \text{短径}/2 \times \text{高さ}/2$$

(5) 腫瘍組織の病理解析

病理解析では、腫瘍血管内皮細胞および腫瘍血管周皮細胞の蛍光免疫染色による同定、および隣接切片のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による腫瘍壊死領域の同定を行い、蛍光免疫染色と HE 染色の両隣接切片の光学顕微鏡観察後、得られた画像データを利用し解析を行った。

具体的には、治療終了後のマウスから腫瘍組織を摘出後、10%ホルマリン液にて 4°C で一晩固定し、翌日、中央部分をカミソリにて半分に切断した。その後、東北大学実験動物病理プラットフォームにて切断面が切り出し面になるようにパラフィン包埋を行った。パラフィン包埋したブロックからミクロトームにて 3 μm の厚さに薄切した。パラフィン切片を脱パラフィン後、0 抗原を賦活化した。PBS 洗浄を 5 分×3 回行った後、1 時間血清を含む PBS にてブロッキングを行った。一次抗体は血管内皮細胞マーカーおよび血管周皮細胞マーカーを用い、4°C で一晩反応させた。PBS 洗浄を 5 分×3 回行った後、遮光条件下で蛍光標識二次抗体を用いて免疫反応を行った。最後に PBS 洗浄を 5 分×3 回行い封入した。さらに、免疫組織化学染色に利用した腫瘍組織切片の隣接切片を、ミクロトームにて 3 μm の厚さで調製した後、脱パラフィン処理とヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、封入した。

(6) 顕微鏡観察

免疫染色した組織切片は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM780, Zeiss) とオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X800, Keyence) で撮影し、蛍光像及び明視野像を取得した。また、画像解析ソフト (BZ-X800 Analyzer, Keyence) を用いて、HE 染色の画像から腫瘍の生存領域を算出した。その後、蛍光画像から血管内皮細胞や血管周皮細胞の染色面積を算出した。

(7) 倫理的配慮

本研究における全てのマウスの実験は、12 時間毎の明暗サイクル環境下にある恒温室内の換気可能なゲージで飼育し、水および食餌を自由に摂取させた。全ての実験は、東北大学研究・安全委員会実験動物専門委員会により承認を受け、国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定に準拠して施行した。

4. 研究成果

(1) 2019 年度

ベバシズマブ投与と併用する低線量の放射線治療の条件設定を行うため、できるだけ低い線量にて、併用療法特異的に腫瘍縮小効果が認められる条件を検討した。その結果、これまでのマウス実験では低線量に相当する 2Gy の複数回照射で併用療法効果を示すデータが獲得された。また金ナノ粒子を担がんマウスに投与し腫瘍に送達させた後、放射線を照射し、腫瘍縮小効果を確認したところ、投与 AuNPs の濃度依存的に放射線増感効果を得ることに成功した。

(2) 2020 年度

「腫瘍血管の形態解析」と「腫瘍血管の機能解析」の方法の開発を中心に進めた。腫瘍血管の形態解析では、高分解能 X 線 CT 装置と造影剤により腫瘍血管全体を 3D で解析した。その後、得られた CT 画像からより詳細な評価を必要とする組織部位を定めて腫瘍を薄切化した。その後、薄切組織に対し、血管内皮マーカーや血管平滑筋マーカーを標的として免疫染色による解析を行い、これを評価することに成功した。

腫瘍血管は血流の方向や流速が一定ではない。また血管構造としては存在するが、実際には血

流が非常に乏しい血管が存在する。そこで腫瘍血管の血流解析では、蛍光レクチン(血管内皮結合蛋白質)を静脈注入して環流血管の内皮細胞に送達させた。その後腫瘍を摘出し組織切片化した後、血管内皮マーカーで蛍光染色した。血管内皮マーカーは血液環流の有無に関わらず、全て血管を染色する。よって全血管の中での環流血管の評価を試み、この方法の開発に成功した。

(3) 2021 年度

2020 年度に開発した評価技術をベバシズマブ等の血管新生阻害剤と放射線治療を併用したマウスの抗腫瘍効果の質的評価に応用した。その結果、血管新生阻害剤が誘導する薬効を向上させる治療法の方向性を見出すことに成功した。

(4) まとめ

全ての固形がんにも有効な治療法として、血管新生阻害剤による腫瘍血管形成阻害を目的とした「兵糧攻め療法」が、半世紀近く前に提案された。しかし、血管新生阻害剤への獲得耐性のため、現在も期待されたほどの効果は示していない。本研究はこのような状況を打破するべく、放射線増感剤の金ナノ粒子を応用し、低線量の放射線治療と血管新生阻害剤による併用療法の開発を目的とした。よって本研究によって新たながん治療法の開発が進み、臨床応用への可能性が広がれば、今後のがん撲滅への波及効果は大きいと確信している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Yukina, Nagatsuka Michi, Akino Keisuke, Yamauchi Noriko, Nakashima Kouichi, Inose Tomoya, Nishidate Chihiro, Sato Keisuke, Gonda Kohsuke, Kobayashi Yoshio	4. 巻 643
2. 論文標題 Development of methods for fabricating nanoparticles composed of magnetite, gold, and silica toward diagnostic imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 128773 ~ 128773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2022.128773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 権田幸祐、高野真由美、北村成史、宇根範和	4. 巻 15
2. 論文標題 血管新生阻害剤による肝細胞がんの腫瘍血管正常化と放射線治療効果の向上	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本分子イメージング学会機関誌	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inose Tomoya, Kitamura Narufumi, Takano-Kasuya Mayumi, Tokunaga Masayuki, Une Norikazu, Kato Chihiro, Tayama Mayu, Kobayashi Yukina, Yamauchi Noriko, Nagao Daisuke, Aimiya Takuji, Furusawa Naoko, Nakano Yasushi, Kobayashi Yoshio, Gonda Kohsuke	4. 巻 203
2. 論文標題 Development of X-ray contrast agents using single nanometer-sized gold nanoparticles and lactoferrin complex and their application in vascular imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 111732 ~ 111732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2021.111732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Une Norikazu, Takano-Kasuya Mayumi, Kitamura Narufumi, Ohta Mineto, Inose Tomoya, Kato Chihiro, Nishimura Ryuichi, Tada Hiroshi, Miyagi Shigehito, Ishida Takanori, Unno Michiaki, Kamei Takashi, Gonda Kohsuke	4. 巻 38
2. 論文標題 The anti-angiogenic agent lenvatinib induces tumor vessel normalization and enhances radiosensitivity in hepatocellular tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12032-021-01503-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 権田幸祐、根岸洋、高野真由美、北村成史、古澤直子、中野寧、多田寛、石田孝宣	4. 巻 第48巻2号
2. 論文標題 蛍光イメージングによる抗体医薬の創薬支援および薬効予測診断	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 癌と化学療法	6. 最初と最後の頁 170-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gonda Kohsuke, Negishi Hiroshi, Takano-Kasuya Mayumi, Kitamura Narufumi, Furusawa Naoko, Nakano Yasushi, Hamada Yoh, Tokunaga Masayuki, Higuchi Hideo, Tada Hiroshi, Ishida Takanori	4. 巻 13
2. 論文標題 Heterogeneous Drug Efficacy of an Antibody-Drug Conjugate Visualized Using Simultaneous Imaging of Its Delivery and Intracellular Damage in Living Tumor Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100764 ~ 100764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Gonda K, Une N, and Kitamura N.
2. 発表標題 The angiogenesis inhibitor lenvatinib induces tumor vessel normalization and enhances radiosensitivity of tumor tissues in mice
3. 学会等名 14th International Symposium on Nanomedicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 権田幸祐、北村成史、石田孝宣、多田寛
2. 発表標題 高輝度蛍光ナノ粒子を用いた病理解析による乳癌内分泌療法の耐性予測
3. 学会等名 第30回バイオイメージング学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 権田幸祐
2. 発表標題 ナノバイオイメージングによる抗がん剤の薬効評価
3. 学会等名 第15回日本分子イメージング学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 権田幸祐
2. 発表標題 血管病態イメージングの感染症研究への展開
3. 学会等名 コロナウイルス感染症とナノメディシ（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 権田幸祐、八木直人
2. 発表標題 金ナノ粒子を用いた腫瘍血管の光イメージング
3. 学会等名 第18回ナノ学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Gonda K, Ohta M, Negishi H, Furusawa N, Nakano Y.
2. 発表標題 Bioimaging of disease state of cancer for drug discovery research.
3. 学会等名 7th China-Japan Nanomedicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gonda K, Yamanashi M, and Takano-Kasuya M.
2. 発表標題 Mechanobiological imaging of lymphatic network change in cancer metastasis.
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity “Cancer from Biology to Acceptance” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gonda K., Yamanashi M., and Takano-Kasuya M.
2. 発表標題 Mechanobiological analyses of lymph network change induced by lymphatic metastasis.
3. 学会等名 13th International Symposium on Nanomedicine. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	北村 成史 (Kitamura Narufumi) (50624912)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究 分担者	高野 真由美 (Takano-Kasuya Mayumi) (60806298)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------