

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300174

研究課題名（和文） 抗癌剤伝達と腫瘍血管新生阻害効果を融合・活用した低侵襲化学  
粒子線治療技術の研究研究課題名（英文） Study of the minimally invasive proton therapy combined with anti-cancer  
drugs and vascular disrupting agents

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、放射線抵抗性の低酸素細胞に対して、腫瘍血管標的薬剤または抗がん剤を用いる化学療法と陽子線治療を機能的に併用することで細胞死を効果的に誘発させ、同時に陽子線の線量や薬剤の投与量を低く抑えることで副作用を低減する治療法の開発を目的とした。腫瘍血管標的薬剤として新規血管遮断剤 AVE8062 を、抗がん剤としてシスプラチンを使用した。マウス固形腫瘍に対する治療実験より、AVE8062 またはシスプラチンを併用した陽子線治療は、単独治療に比べて著しく腫瘍増殖を抑制することが示された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop combined treatments between proton therapy and chemotherapy using a vascular targeting agent or an anti-cancer drug which not only kill radio-resistant hypoxia tumor cells effectively but also reduce side effects. We used the novel vascular disrupting agent AVE8062 as a vascular targeting agent, while cisplatin was used as an anti-cancer drug. The results of the therapeutic experiments on a murine solid tumor showed that the proton therapy combined with AVE8062 or cisplatin inhibited tumor growth significantly in comparison to their monotherapies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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、PET、腫瘍血管標的薬剤

## 1. 研究開始当初の背景

現在、わが国では、団塊世代の高齢化による急激な高齢がん患者の増加や、生活習慣の欧米化に関連するがんの多種化によって、患者負担の少ない優れたがん治療法の開発が急務であり、抗がん剤等の化学療法や放射線

治療の役割・重要性が益々高まっている。

陽子線や炭素線などの荷電粒子ビームは、ブラッグピークと呼ばれる飛程付近で物質への線量付与が最大となる物理的特性があり、放射線治療における理想的な深部線量分布を形成する。放射線の生物学的効果は線エ

エネルギー付与（ Linear energy transfer : LET ）に依存し、LET が高いブラッグピーク領域では大きな細胞致死効果がもたらされる。ところが、陽子線は炭素線に比べLETが低く、腫瘍全体を照射するためにブラッグピーク領域を拡大する治療用の深部線量分布を形成した場合、平均LETが小さくなりその生物学的効果はX線程度に低下する。したがって、陽子線治療においてもX線と同様に低酸素腫瘍細胞の放射線抵抗性が問題となる。炭素線の場合はブラッグピークを拡大しても平均LETは高いため、細胞致死効果が大きく低酸素状態の影響を受けないが、炭素線治療用の加速器や照射設備の大型化・高コスト化等の問題がある。したがって、陽子線治療の増感研究は、正常組織の副作用を最小限に留め高い治療効果をねらう治療戦略として重要である。

一方、腫瘍が成長するためには、細胞増殖に必要な栄養素や酸素を供給する腫瘍血管系の形成・拡大が不可欠となる。腫瘍血管の機能や構造には、正常血管の場合と比べて異常な特徴が数多く知られており、がん治療における明確な標的となり得る。これらの違いを足がかりとして、腫瘍細胞を直接攻撃するのではなく腫瘍血管を標的とする治療戦略が新たながん治療法として注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、放射線抵抗性の低酸素細胞に対して、腫瘍血管標的薬剤または抗がん剤を用いる化学療法と陽子線治療を機能的に併用することで細胞死を効果的に誘発させ、同時に陽子線の線量や薬剤の投与量を低く抑えることで副作用を低減する治療法の開発を目的とした。具体的には、腫瘍血管標的薬剤として腫瘍血管遮断剤 AVE8062 (Combretastatin A4 誘導体) を、抗がん剤としてシスプラチン (CDDP) を併用した陽

子線治療のマウス固形腫瘍モデルによる治療実験を実施し、腫瘍増殖遅延の評価や超高分解能のPET (Positron emission tomography) 診断に基づき治療効果を診断・分析する。

AVE8062 は微小管阻害剤に分類され血管内皮細胞の細胞骨格破壊などに伴って毛細血管の血流遮断を引き起こす。また、その作用は正常血管内皮細胞よりも腫瘍血管内皮細胞との親和性が高いとされている。その結果、腫瘍血管を選択的・不可逆的に急速に遮断し、腫瘍組織内の細胞代謝物の蓄積による細胞毒性効果も加わって、腫瘍細胞を壊死に追い込む。現在、欧米にて AVE8062 の第3相臨床試験が行われているが、AVE8062 単独の治療では、腫瘍の広範囲に壊死が誘発される一方で、血流遮断効果が十分でない領域が発生し腫瘍が再増殖することが明らかとなっている。不十分な血流遮断は新たに低酸素・低栄養素環境を腫瘍内にもたらし、腫瘍細胞はそれらのストレスに適応すべく低酸素誘導因子を発現して、血管新生、解糖系の活性化、さらには脱分化による自己複製能、遊走能、転移能の獲得など、かえって腫瘍を悪性化させる可能性がある。したがって、AVE8062 を含め腫瘍血管遮断剤は他のがん治療法との併用が必要と認識されており、このような観点からも本研究の治療法は、腫瘍血管遮断剤の問題を解決し、その治療的ポテンシャルを最大限活用するアプローチの一つであると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、難治がんの治療を想定し放射線や抗がん剤に抵抗性である NFSa マウス線維肉腫腫瘍モデルを用いて治療実験を実施した。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) の小動物に対応した基礎研

究用陽子線治療装置を用いて行われた。

#### (1) 高精度陽子線モニター開発

高精度な陽子線照射を確実に実施するためには、優れた実時間粒子線モニター装置が必要であり、マイクロパターンガス電子増幅器 (Micro pattern gas detector : MPGD) を用いた2次元ビームモニターを開発し照射システムに組み込んで使用する。

#### (2) AVE8062 併用陽子線治療実験

C3H/He slc マウスの 10~12 週齢の雄の両後脚に NFSa 線維肉腫細胞を移植し、形成された直径約 8 mm の腫瘍に対して陽子線を局所的に照射する。ここで、マウス右後脚の腫瘍のみに陽子線を照射し、さらにその中の一部のマウスに AVE8062 を投与する。これにより腫瘍を、陽子線単独治療群、AVE8062 単独治療群、両者の併用治療群、および無治療のコントロール群に分ける。治療条件は、陽子線 15 または 30 Gy、AVE8062 の 40 mg/kg 腹腔内投与、陽子線 15 Gy と照射 2 時間後の AVE8062 40mg/kg 腹腔投与 (併用治療) とし、いずれも単回治療とした。治療後に経日的に腫瘍体積を測定し腫瘍増殖遅延 (Tumor growth delay : TGD) によって治療

効果を評価する。本研究では、治療群とコントロール群の間で腫瘍が初期体積の 4 倍に達するまでに要する時間差 (日数) を TGD として定義した。

さらに、治療効果を腫瘍の糖代謝の変化から分析するために、CYRIC の 1 mm 以下の空間分解能を持つ小動物用半導体 PET 装置、および糖代謝トレーサー  $^{18}\text{F}$  標識化 Fluoro-Deoxy-Glucose ( $^{18}\text{F}$ FDG) を用いた PET スキャン ( $^{18}\text{F}$ FDG-PET) を治療後のマウスに実施した。

#### (3) シスプラチン併用陽子線治療実験

シスプラチン併用陽子線治療実験におけ

るマウス腫瘍モデル、陽子線照射方法、治療群の分類は、AVE8062 併用陽子線治療実験の場合と同様である。治療条件は、陽子線 15 Gy、CDDP 10 mg/kg 腹腔内投与、陽子線 15 Gy と照射 1 時間前の CDDP 10mg/kg 腹腔投与 (併用治療) であり、いずれも単回治療とした。治療後に経日的に腫瘍体積を測定し TGD によって治療効果を評価した。

さらに、CDDP が腫瘍内部にどのように伝達されているかを評価するために、治療された腫瘍をマウスから摘出し、PIXE (Particle induced X-ray emission) 法により分析した。

### 4. 研究成果

#### (1) マルチパターンガス検出器型粒子線治療用モニター

開発した MPGD 検出器を用いて、陽子線の 2 次元ビーム強度分布、重心位置、照射するビーム量 (投与する線量) を同時に実時間モニタリングすることに成功した。2 次元ビーム強度分布に関しては、イメージングプレートとほぼ同等の情報が実時間で得られた。これにより直径 10mm 程度のマウス腫瘍に対しても高精度で局所的な照射が可能となった。

#### (2) AVE8062 併用陽子線治療における治療効果

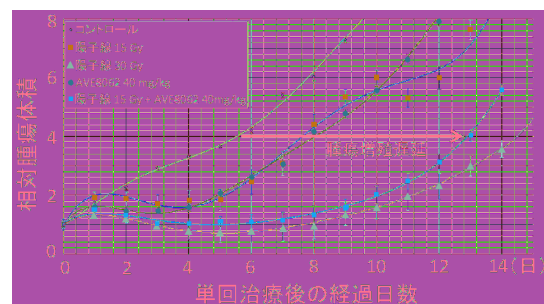


図1 AVE8062 併用陽子線治療群とそれぞれの単独治療群の腫瘍体積変化

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

$V \approx (\pi/6)abc$  で近似し、腫瘍数  $n$  に対する平均値と平均誤差で評価した。陽子線治療単独では、TGD が 15 Gy 付与の場合で  $2.1 \pm 1.1$  日 ( $n=4$ )、30 Gy 付与の場合で  $9.2 \pm 1.1$  日 ( $n=4$ ) であり、線量依存的に TGD が増加した。AVE8062 単独治療では  $2.8 \pm 0.7$  日 ( $n=5$ ) となり陽子線 15 Gy の場合と同様の傾向が見られた。一方、併用治療群では、TGD が単独治療群の場合と比べて著しく増加して  $7.4 \pm 0.7$  日 ( $n=5$ ) となり、陽子線単独 30 Gy に迫る結果が得られた。

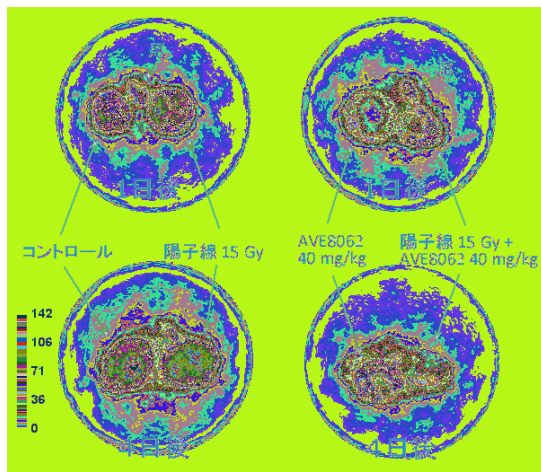


図2 AVE8062 併用陽子線治療群とそれぞれの単独治療群の $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET 腫瘍断層画像

$[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET を治療後のマウスに実施した。PET スキャンのタイミングとして、単回治療の1日後、および縮小している腫瘍が再増殖に転じるか、あるいは増殖抑制がさらに維持されるか治療条件によって傾向が異なる4日後を選択した。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET の結果を図2に示す。陽子線 15 Gy 単独治療の腫瘍内部は、1日後および4日後ともにコントロール群と同様に FDG の高集積状態が確認され、糖代謝の高い状態が続き再増殖に至っていることが示唆された。これに対して AVE8062 治療および併用治療の腫瘍では、急速な血流遮断効果によって腫瘍中心付近の FDG 集積がほとんど無い状態が1日後で確認され、腫瘍内部の広範囲な領域に壊死が

誘発されることが示唆された。しかしながら、腫瘍の辺縁部に FDG 集積が認められ、正常組織との境界領域の腫瘍細胞には AVE8062 の遮断効果を受けない正常血管由来の FDG が部分的に到達・集積しているためと考えられる。一方、4日後では、AVE8062 単独治療の腫瘍では辺縁部組織に FDG の高集積が認められ再増殖が示唆されるのに対して、併用治療の腫瘍では FDG の低集積状態が継続していることが確認された。

これらの実験結果から、併用治療で顕著な増殖遅延効果をもたらされる理由として、AVE8062 単独治療で生き残っている腫瘍辺縁部の細胞に投与前陽子線照射により増殖死を誘発させ、陽子線 15 Gy では死滅させることが困難な低酸素細胞の多くが血流遮断で効果的に壊死するという相加的効果が示唆される。また、併用治療の TGD は、それぞれの単独治療の場合と比較して著しく増大しているため、放射線と薬剤との相互作用による相乗効果の可能性も考えられる。

### (3) CDDP 併用陽子線治療における治療効果

図3に CDDP 併用陽子線治療群とそれぞれの比較対照群の腫瘍体積変化を示す。陽子線 15 Gy 単独治療群 (TGD =  $3.3 \pm 1.3$  日 ( $n=5$ )) および CDDP 10 mg/kg 単独治療群 (TGD =  $6.4 \pm 1.7$  日 ( $n=5$ )) に比べて、それらの併用治療群では TGD =  $11.8 \pm 0.8$  日 ( $n=5$ ) となり、腫瘍増殖が著しく抑制される結果が得られた。

一方 CDDP 投与 6 時間後にマウスから摘出された腫瘍切片に対して、CDDP 分子中の白金元素をマーカーとして 3 MeV 陽子ビームによる PIXE 分析を行った結果、腫瘍内の CDDP 濃度は乾燥状態の腫瘍において  $2.0 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$  であった。また、ビームサイズ  $0.5 \times 0.5 \text{ mm}$  の陽子ビームによるサブミリ

PIXE 分析より、腫瘍切片内の CDDP の濃度分布を測定した。その結果、腫瘍切片内の CDDP はほぼ一様であることが示され (図 4)、CDDP は低分子であるため、腫瘍内の腫瘍血流が乏しい低酸素領域にも CDDP が伝達されている可能性が示唆された。

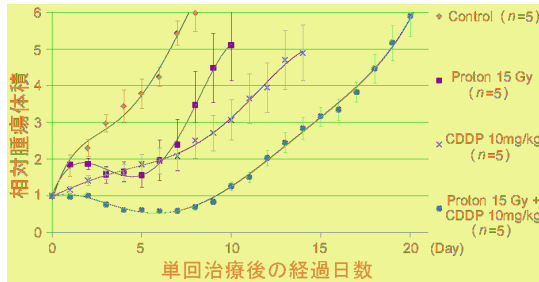


図 3 CDDP 併用治療群とそれぞれの単独治療群の腫瘍体積変化

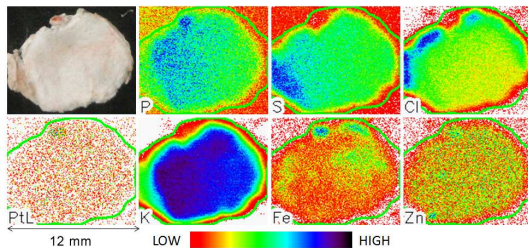


図 4 サブミリ PIXE 分析による主要元素および白金の腫瘍内濃度分布評価

## 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 9 件)

1. A. Terakawa, K. Ishii, H. Yamazaki, S. Matsuyama, Y. Kikuchi, Y. Ito, A. Tagawa, S. Yasunaga, T. Kawamura, Y. Takahashi, Y. Hatori, N. Hamada, K. Fujiki, N. Ito, S. Wada, Y. Funaki and K. Sera, PIXE analysis of a murine solid tumor treated with proton therapy combined with cisplatin, X-RAY Spectrometry, 査読有、巻未定、2011、掲載確定
2. A. TERAKAWA, Y. ITO, K. ISHII, S. MATSUYAMA, Y. KIKUCHI, S. YASUNAGA, A. TAGAWA, T. KAWAMURA, Y. TAKAHASHI, Y. HATORI, N. HAMADA, K. FUJIKI, H. YAMAZAKI, Y. FUNAKI, N. ITO, S. WADA, K. SERA, PIXE ANALYSIS OF A MURINE FIBROSARCOMA TUMOR

FOR PROTON THERAPY COMBINED WITH THE CHEMOTHERAPEUTIC AGENT CISPLATIN, International Journal of PIXE, 査読有、Vol. 20 3&4、2010、85-91

3. A. Esmaili Torshabi, A. Terakawa, K. Ishii, H. Yamazaki, S. Matsuyama, Y. Kikuchi, H. Akiyama, K. Koyata, A. Tagawa, Y. Itoh, S. Yasunaga, Development of an adjustable beam flattening system for modification of passive beam delivery technique in proton therapy, 査読有、Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, A 615, 2010, 138-141

4. A. Terakawa, K. Ishii, H. Yamazaki, Y. Funaki, M. Tashiro, S. Furumoto, S. Matsuyama, Y. Kikuchi, J. Arikawa, T. Togashi, W. Yamashita, H. Akiyama, H. Koyata, K. Nakazawa, Y. Itoh, A. Tagawa, S. Yasunaga, S. Wada, N. Itoh, Therapeutic efficacy of proton therapy combined with tumor blood flow interruption evaluated by high-resolution  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ , European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 査読有、36(2), 2009, S290-S291

5. Atsuki TERAKAWA, Keizo ISHII, Toshiyuki CHIBA, Takuya MIYASHITA, Tatsuya YAMAMOTO, Jun ARIKAWA, Takanori TOGASHI, Wataru YAMASHITA, Hisaki AKIYAMA, Hiroshi KOYATA, Yuzo FUJITA, Azusa ISHIZAKI, Taizo HONDA, Yuuki TOTSUKA, Nobuhiko ITO, Tadashi SANO, Seiichi WADA, Proton Therapy Facilities at CYRIC, Tohoku University, Proceedings of the 16th Pacific Basin Nuclear Conference (16PBNC), Aomori, Japan, Oct. 13-18, 2008, 査読有、2008, P16P1378, 1-6

[学会発表] (計 9 件)

1. A. Terakawa, PIXE analysis of a murine solid tumor treated with proton therapy combined with cisplatin, 12th International Conference on Particle Induced X-ray Emission and its Analytical Applications, 2010年6月28日, Guildford, イギリス
2. A. Terakawa, Therapeutic efficacy of proton therapy combined with tumor blood flow interruption evaluated by high-resolution  $[^{18}\text{F}]\text{FDG-PET}$ , ANNUAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR

MEDICINE, 2009年10月11日, バルセロナ、スペイン

3. 寺川貴樹、陽子線治療の現状、日本原子力学会、2009年9月17日、仙台(招待講演)
4. A. Terakawa, Proton Therapy Facilities at CYRIC, Tohoku University, 16th Pacific Basin Nuclear Conference (16PBN), Aomori, Japan, Oct. 13-18, 2008、2008年10月16日、青森
5. 寺川貴樹、腫瘍血管遮断剤 AVE8062 を併用した陽子線照射の抗腫瘍効果に関する研究、日本原子力学会、2008年9月5日、高知

## 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

酒見 泰寛 (SAKEMI YASUHIRO)  
東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・教授  
研究者番号：90251602

山崎 浩道 (YAMAZAKI HIROMICHI)  
東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・教授  
研究者番号：00166654

田代 学 (TASHIRO MANABU)  
東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・准教授  
研究者番号：00333477

### (3) 研究連携者

( )

研究者番号：