

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390401

研究課題名（和文） レチノイン酸ミセルを用いた CED 法による膠芽腫新規治療法の開発研究

課題名（英文） Convection-enhanced delivery of micellar retinoic acid as a new treatment strategy for malignant glioma

研究代表者

隈部 俊宏（KUMABE TOSHIHIRO）

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10250747

研究成果の概要（和文）：

新規脳内薬剤送達技術である Convection-enhanced delivery (CED) 法により、新規薬剤担体であるミセル化薬剤を投与する悪性脳腫瘍新規治療法の開発を実施した。第3世代レチノイン酸 Am80 が脳腫瘍細胞に対してテモゾロミドと相乗的に作用し抗腫瘍効果を高めることを証明した。また、脳腫瘍頭蓋内移植モデルを用いた検討で、この薬剤の相乗効果は *in vivo* でも認められることを示した。すでに報告しているガドリニウムミセル製剤を用いた薬剤送達モニタリング法と合わせて、これら一連の研究で Am80 ミセルの CED 投与という新規治療法に向けた基礎を構築出来た。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the efficacy of intracerebral administration of polymeric micellar synthetic retinoid (Am80) by convection-enhanced delivery (CED) combined with systemic administration of temozolomide in a U87MG intracranial xenograft model. As a result, CED of micellar Am80 provided significantly longer survival ($P<0.05$). Combination of CED of micellar Am80 and systemic treatment of temozolomide provided significantly longer survival than the single treatment ($P<0.005$, $P<0.005$). Consequently, Temozolomide combined with CED administration of Am80 may be a promising strategy for the treatment of malignant gliomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	6,500,000	1,950,000	8,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：脳腫瘍、分化誘導療法、ドラッグデリバリー、薬剤担体

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は原発脳腫瘍の約 30% を占める疾患であり、脳実質内をび慢性に浸潤する特徴をもつ。中でも神経膠腫の約 30% を占める膠

芽腫はきわめて悪性であり、手術療法、放射線療法、化学療法を組み合わせた治療が試みても、5年生存率は7%と著しく不良であった。近年、経口アルキル化剤である

temozolomide が初発膠芽腫患者における生存期間延長効果が第3相試験によって初めて確認され、現在の膠芽腫の標準的治療は temozolomide 内服と放射線治療併用となった。しかしながら、これによる患者の生存期間中央値は 14.6 カ月で、従来の放射線療法単独療法と比較しても約 2 カ月の延長効果に限られている。したがって膠芽腫の治療成績は未だ満足できるものではなく、更なる治療開発が必要と考えられる。

悪性神経膠腫に対する薬物治療の障壁として、血液脳関門を介した薬剤通過性の問題が挙げられる。血液脳関門は親水性物質をほとんど透過しないと考えられている。さらに、通常細胞膜を通過できる疎水性の薬物も血液脳関門に多数発現している p-糖タンパクの働きで血液側に薬物が排出される。また、たとえ治療薬剤の血液脳関門の透過性が得られたとしても、中枢神経系腫瘍に効果的な薬剤濃度を確保するためには血液脳関門を通過する量をみこした多量投与になり、薬剤による全身への副作用を起してしまう可能性が高い。そのために、薬剤投与量が制限され、高い治療効果を得ることが困難である。従って中枢神経系腫瘍に対する薬物治療は他の固形癌以上に困難とされている。新規中枢神経系局所投薬技術である Convection-enhanced delivery (CED) 法は脳構造に機械的な損傷を与えることなく脳組織間隙に広範囲で高濃度の薬剤分布を可能にする技術である。CED 法により血液脳関門を介さずに高濃度の薬剤が局所投与可能になるため、薬剤による全身性副作用を軽減することが期待できる。

本研究では第3世代レチノイン酸 Am80 を新規薬剤担体である高分子ミセルに内包したミセル化 Am80 を CED 法により脳腫瘍内に投与し、さらにテモゾロミドを用いた全身化学療法を併用する新規治療法の開発をめざした。ここで、CED 法に高分子ミセルを用いる利点は 1) 10~100nm の範囲で粒子径を設定できること、2) 薬剤放出速度の調節が広い範囲で可能な事、3) 疎水性の強い薬剤封入に適することであった。

2. 研究の目的

第3世代レチノイン酸 Am80 の U87MG ヒト膠芽腫細胞に対する抗腫瘍効果の *in vitro* での解析と Am80 内包ミセルを用いたラット正常脳における薬剤毒性の解析及びラット脳腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果の解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* における Am80 の悪性神経膠腫培養細胞に対する抗腫瘍効果の検討。実験方法は、750 個の腫瘍細胞を 96 穴マルチプレートで 24 時間培養し、薬剤を投与した後に更に 24 時間培養して MTS assay を用い

て細胞生存率を検討した。投与する temozolomide は 100 μ M とし、Am80 は 0,50,100,200,500 μ M とした。Temozolomide および Am80 併用投与はどちらも濃度を 100 μ M に設定した。

(2) *in vitro* における Am80 とテモゾロミド併用効果の機序に関する検討。

各薬剤単独で使用した際と、併用した際のアポトーシス関連タンパクの変化に関して Phospho-Akt、phospho-MAPK、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、 β -actin の発現レベルについて、Western-blot 法で検討した。

(3) 正常脳実質に対する Am80 の細胞毒性評価

ラット正常脳に対する毒性を Am80 の濃度を 0.6、1.2、2.4 mg/m² に振り分けて毒性評価を行った。脳内投与を受けたラットを観察するとともに 6 週後に安楽死させて組織学的検討を行った。

(4) ラット脳腫瘍モデルに対して CED 法により注入した Am80 内包ミセルおよび temozolomide の抗腫瘍効果

U87MG 腫瘍細胞を線条体に移植されたラットを無作為に以下のように 6 群に分けた。① CED 法により PBS を局所注入するコントロール群、②腹腔内投与により temozolomide を全身投与する群、③CED 法により Am80 を局所投与する群、④CED 法により Am80 内包ミセルを局所投与する群、⑤尾静脈投与により Am80 内包ミセルの全身投与と腹腔内投与により temozolomide を全身投与する群、⑥CED 法により Am80 内包ミセルを局所投与し、腹腔内投与により temozolomide を全身投与併用する群の計 6 群に分けて解析した。CED 法を用いた薬剤投与量はそれぞれ 20 μ l とし、腫瘍植込み 7 日後に施行した。全身投与として施行した temozolomide 腹腔内投与は、注入濃度が 200mg/m²/day、投与量 90ml/m² になるように濃度調製した。この調製液を腫瘍植込み後 7 日目から腹腔内へ投与開始し、連続 5 日間投与を行った。全身投与として施行した合成レチノイン酸内包ミセルの尾静脈投与は、腫瘍植込み後 7 日目に尾静脈から投与した。

4. 研究成果

(1) *in vitro* において Am80 が悪性神経膠腫培養細胞に対し、抗腫瘍効果を有すること、さらにテモゾロミドとの併用効果を有する事を示した(図 1)。

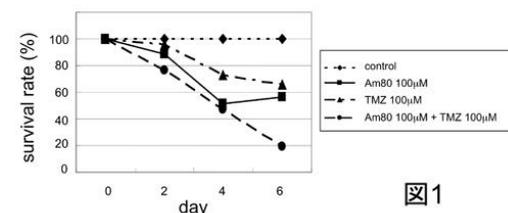


図 1

(2) Am80 とテモゾロミド併用による相乗効果の機序はアポトーシスの増強であることを示した(図 2)。両薬剤を併用することによりリン酸化 Akt, MAPK は減少、活性型 Caspase-3, -9 が増加することがわかる。

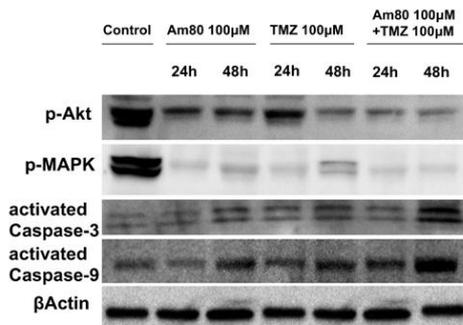


図2

(3) 正常脳に対する Am80 の毒性は低く、2.4 mg/m² の高濃度で用いても許容内であることを示した(図 3)。

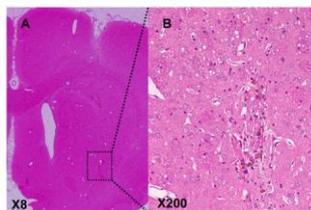


図3

(4) Am80 とテモゾロミドの相乗効果は in vivo でも認められることを示した。

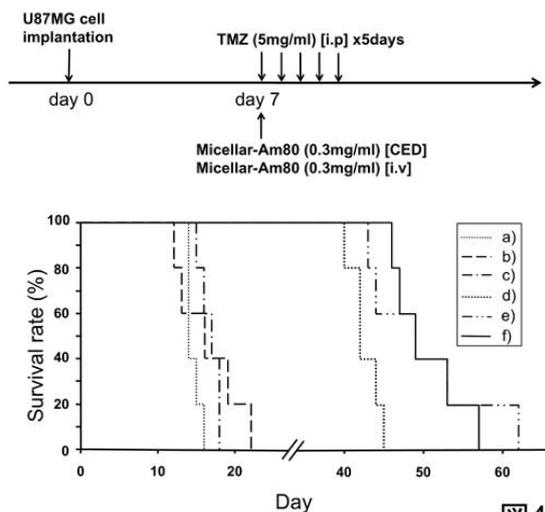


図4

Am80 内包ミセル (2.4mg/m²) および temozolomide(200mg/m²/day)を CED 法、全身投与を用いて単剤、併用投与を施行したラット U87MG ヒト膠芽腫細胞モデルにおける生存曲線。a) コントロール群、b) temozolomide 全身投与群、c) 遊離型 Am80 CED 法投与群、d)ミセル内包 Am80 CED 法投与群、e) ミセル内包 Am80 全身投与 +

temozolomide 全身投与群、f) ミセル内包 Am80 CED 法投与 + temozolomide 全身投与群。

この研究結果は直接的には以下の論文発表につながった。

Tohoku J Exp Med. 2010;221(4):257-64.

Cancer Lett. 2011 Nov 1;310(1):77-83.

また、当科よりすでに報告しているガドリニウムミセル製剤を用いた薬剤送達モニタリング法[Neuro Oncol. 2009 Apr;11(2):151-7.]と合わせて、これら一連の研究で Am80 ミセルの CED 投与という新規治療法に向けた基礎を構築出来た。

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 26 件)

1. Aizawa-Kohama M, Kumabe T, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Sonoda Y, Watanabe M, Tominaga T. Clinicopathological analysis of nine consecutive central nervous system primitive neuroectodermal tumors in a single institute. Brain Tumor Pathol. 2012 Mar 21. [Epub ahead of print] 査読有
2. Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Suzuki H, Kato S, Ishioka C, Tominaga T. IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas. Int J Clin Oncol. 2011 Oct 6. [Epub ahead of print] 査読有
3. Saito R, Kumabe T, Kanamori M, Yamashita Y, Sonoda Y, Higano S, Takahashi S, Tominaga T. Preoperative evaluation of the deep cerebral veins using 3-tesla magnetic resonance imaging. Minim Invasive Neurosurg. 2011 Jun;54(3):105-9. 査読有
4. Nakamura T, Saito R, Sugiyama S, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T. Local convection-enhanced delivery of chemotherapeutic agent transiently opens blood-brain barrier and improves efficacy of systemic chemotherapy in intracranial xenograft tumor model. Cancer Lett. 2011 Nov 1;310(1):77-83. 査読有
5. Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Kumabe T, Tominaga T. New insights into glioma classification based on isocitrate dehydrogenase 1 and 2

- gene status. *Brain Tumor Pathol.* 2011 Jul;28(3):203-8. 査読有
6. Saito R, Kumabe T, Sonoda Y, Kanamori M, Yamashita Y, Watanabe M, Tominaga T. Combination chemotherapy with ifosfamide, cisplatin, and etoposide for medulloblastoma: single-institute experience and differences in efficacy for subgroups of medulloblastoma. *Childs Nerv Syst.* 2011 Sep;27(9):1399-406. 査読有
 7. Saito R, Sonoda Y, Kumabe T, Nagamatsu K, Watanabe M, Tominaga T. Regression of recurrent glioblastoma infiltrating the brainstem after convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride. *J Neurosurg Pediatr.* 2011 May;7(5):522-6. 査読有
 8. Kawaguchi T, Kumabe T, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Watanabe M, Tominaga T. Logarithmic decrease of serum alpha-fetoprotein or human chorionic gonadotropin in response to chemotherapy can distinguish a subgroup with better prognosis among highly malignant intracranial non-germinomatous germ cell tumors. *J Neurooncol.* 2011 Sep;104(3):779-87. 査読有
 9. Osawa S, Kumabe T, Saito R, Sonoda Y, Niizuma H, Watanabe M, Tominaga T. Infratentorial brain metastases of pediatric non-epithelial malignant tumors: three case reports. *Brain Tumor Pathol.* 2011 Apr;28(2):167-74. 査読有
 10. Kanamori M, Kumabe T, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Tominaga T. [The safety of combination chemotherapy with ifosfamide, cisplatin, and etoposide (ICE): single-institution retrospective review of 108 cases]. *No Shinkei Geka.* 2010 Nov;38(11):997-1005. 査読有
 11. Yokosawa M, Sonoda Y, Sugiyama S, Saito R, Yamashita Y, Nishihara M, Satoh T, Kumabe T, Yokoyama M, Tominaga T. Convection-enhanced delivery of a synthetic retinoid Am80, loaded into polymeric micelles, prolongs the survival of rats bearing intracranial glioblastoma xenografts. *Tohoku J Exp Med.* 2010;221(4):257-64. 査読有
 12. Kawaguchi T, Kumabe T, Kanamori M, Nakamura T, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Watanabe M, Tominaga T. Early detection of venous thromboembolism in patients with neuroepithelial tumor: efficacy of screening with serum D-dimer measurements and Doppler ultrasonography. *J Neurooncol. J Neurooncol.* 2011 Feb; 101(3): 495-504. 査読有
 13. Saito R, Kumabe T, Kanamori M, Sonoda Y, Tominaga T. Insulo-opercular gliomas: four different natural progression patterns and implications for surgical indications. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2010;50(4):286-290 査読有
 14. Omodaka S, Saito R, Kumabe T, Kawagishi J, Jokura H, Sonoda Y, Watanabe M, Kayama T, Tominaga T. Melanotic neuroectodermal tumor of the brain recurring 12 years after complete remission: case report. *Brain Tumor Pathol.* 2010 Apr;27(1): 51-7. 2010;50(4): 286-90. 査読有
 15. Sonoda Y, Yokosawa M, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Tominaga T. O(6)-Methylguanine DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression is correlated with progression-free survival in patients with glioblastoma. *Int J Clin Oncol.* 2010 Aug;15(4):352-8. 査読有
 16. Saito R, Kumabe T, Kanamori M, Sonoda Y, Tominaga T. Dissemination limits the survival of patients with anaplastic ependymoma after extensive surgical resection, meticulous follow up, and intensive treatment for recurrence. *Neurosurg Rev.* 2010 Apr;33(2):185-91 査読有
 17. Shibahara I, Kumabe T, Kanamori M, Saito R, Sonoda Y, Watanabe M, Iwata R, Higano S, Takanami K, Takai Y, Tominaga T. Imaging of hypoxic lesions in patients with gliomas by using positron emission tomography with 1-(2-[18F] fluoro-1-[hydroxymethyl]ethoxy)methyl-2-nitroimidazole, a new 18F-labeled 2-nitroimidazole analog. *J Neurosurg.* 2010 Aug;113(2):358-68. 査読有
 18. Sato A, Sakurada K, Kumabe T, Sasajima T, Beppu T, Asano K, Ohkuma H, Ogawa A, Mizoi K, Tominaga T, Kitanaka C, Kayama T; Tohoku Brain Tumor Study Group: Association of stem cell marker CD133 expression with dissemination of glioblastomas.

- Neurosurg Rev 33:175-183, 2010 査読有
19. Sato I, Higuchi A, Yanagisawa T, Mukasa A, Ida K, Sawamura Y, Sugiyama K, Saito N, Kumabe T, Terasaki M, Nishikawa R, Ishida Y, Kamibeppu K: Development of the Japanese version of the Pediatric Quality of Life Inventory Brain Tumor Module. Health Qual Life Outcomes 8:38-38, 2010. 査読有
 20. Akamatsu Y, Kumabe T, Kanamori M, Nagamatsu K, Saito R, Sonoda Y, Sato K, Tominaga T. [Intraoperative neuronavigation system without rigid pin fixation] No Shinkei Geka. 2009 Dec;37(12):1193-9. 査読有
 21. Kanamori M, Kumabe T, Saito R, Yamashita Y, Sonoda Y, Ariga H, Takai Y, Tominaga T. Optimal treatment strategy for intracranial germ cell tumors: a single institution analysis. J Neurosurg Pediatr. 2009 Dec;4(6):506-14. 査読有
 22. Kanamori M, Kumabe T, Sonoda Y, Nishio Y, Watanabe M, Tominaga T: Predictive factors for overall and progression-free survival, and dissemination in oligodendroglial tumors. J Neurooncol 93:219-228, 2009 査読有
 23. Takeuchi Y, Kanamori M, Kumabe T, Saito R, Sonoda Y, Watanabe M, Tominaga T. Collision tumor of anaplastic oligodendroglioma and gangliocytoma: a case report. Brain Tumor Pathol. 2009;26(2):89-93. 査読有
 24. Nakajima T, Kumabe T, Kanamori M, Saito R, Tashiro M, Watanabe M, Tominaga T. Differential diagnosis between radiation necrosis and glioma progression using sequential proton magnetic resonance spectroscopy and methionine positron emission tomography. Neurol Med Chir (Tokyo). 2009 Sep;49(9):394-401. 査読有
 25. Sonoda Y, Kumabe T, Nakamura T, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Suzuki H, Tominaga T. Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients. Cancer Sci. 2009 Oct;100(10):1996-8. 査読有
 26. Saito R, Kumabe T, Inoue T, Takada S, Yamashita Y, Kanamori M, Sonoda Y, Tominaga T. Magnetic resonance imaging for preoperative identification of the lenticulostriate arteries in insular glioma surgery. Technical note. J Neurosurg. 2009 Aug;111(2):278-81. 査読有
[学会発表] (計 10 件)
 1. Saito R, Sonoda Y, Yamashita Y, Kanamori M, Kumabe T, Tominaga T. Safety and Feasibility of MRI guided convection-enhanced delivery of nimustine hydrochloride against recurrent glioma affecting brainstem. 2011Society for Neurooncology Annual Meeting. Orange County, USA, 2011.11.20
 2. 齋藤竜太、園田順彦、山下洋二、金森政之、隈部俊宏、富永悌二. 悪性神経膠腫に対する Convection-enhanced delivery : 現状と展望. 第 70 回日本脳神経外科学術総会. 横浜, 2011.10.12
 3. Saito R, Sonoda Y, Yamashita Y, Kanamori M, Kumabe T, Tominaga T. MRI Guided Convection-Enhanced Delivery of Nimustine Hydrochloride Against Recurrent Glioma Affecting Brain Stem. 8th Annual World Congress of IBMISPS on Brain, Spinal Cord Mapping and Image Guided Therapy. San Francisco, USA, 2011.6.9
 4. Saito R, Nakamura T, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T. Local Application of Chemotherapeutics Transiently Opens Blood-Brain Barrier and Improves Efficacy of Systemic Chemotherapy against Intracranial Xenograft Tumor Model. 2010Society for Neurooncology Annual Meeting. Montreal, Canada, 2010.11.19
 5. Kumabe T, Shibahara I, Kanamori M, Saito R, Sonoda Y, Watanabe M, Iwata R, Higano S, Takunami K, Takai Y, Tominaga T: Imaging of hypoxic lesion in glioma patients by PET with [18F]FRP-170, a new 18F-labeled 2-nitroimidazole analog. 18th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. Travemunde, Germany, 2010/5/19
 6. Kumabe T, Kawaguchi T, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Sonoda Y, Watanabe M, Tominaga T: Logarithmic Decrease of Serum Alpha-Fetoprotein Level in Response to Chemotherapy can Distinguish the Subgroup with better Prognosis Among Highly Malignant Intracranial Non-Germinomatous Germ Cell Tumors. ASNO2010 The 7th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, Seoul, 2010/6/11
 7. Kumabe T: What does awake surgery

bring into the glioma surgery? 2010
Current Trends in the Management of
Malignant Gliomas, Tokyo, 2010/7/31

- 8) 隈部俊宏、富永悌二：神経膠腫における基本手技（シンポジウム：こだわりの手術）。第15回日本脳腫瘍の外科学会，大阪，2010/10/1
- 9) 隈部俊宏、富永悌二：覚醒下手術の準備と実際（ランチョンセミナー：覚醒下手術）。社団法人日本脳神経外科学会第68回学術総会，東京，2009/10/15
- 10) 隈部俊宏、齋藤竜太、金森政之、山下洋二、園田順彦、富永悌二：モニタリングは神経膠腫の長期生存を向上させたか？（シンポジウム）社団法人日本脳神経外科学会第68回学術総会，東京，2009/10/15

〔図書〕（計9件）

- 1) Kumabe T, Saito R, Kanamori M, Sonoda Y, Higano S, Takahashi S, Tominaga T: Visualization of lateral lenticulostriate arteries using 3-tesla magnetic resonance imaging. In: Takahashi S (ed). Neurovascular Imaging. Chapter 9, Springer-Verlag, 2010, pp295-303
- 2) Kumabe T, Kanamori M, Saito R, Nagamatsu K, Sonoda Y, Higano S, Takahashi S, Tominaga T: Ischemic complication associated with resection of opercular gliomas. In: Takahashi S (ed). Neurovascular Imaging. Chapter 10, Springer-Verlag, 2010, pp305-318
- 3) 隈部俊宏、富永悌二：神経膠腫摘出の基本手技。大畑建治編集，脳腫瘍の外科—社会が望む脳腫瘍外科，メディカ出版，2011 pp215-224
- 4) 隈部俊宏*、富永悌二：松果体部腫瘍-Occipital transtentorial approach. ビジュアル脳神経外科 Anatomy & Surgical Approach 4. 脳室・松果体. III. 脳室・松果体の手術/腫瘍. 編集：片山容一・富永悌二・斎藤延人, pp100-111, 株式会社メジカルビュー社, 東京, 2011
- 5) 隈部俊宏：1. 低悪性度グリオーマ. イラストレイテッド脳腫瘍外科学. C-VI 各種脳腫瘍の手術. 1. グリオーマ. pp114-117 編集：河本圭司・本郷一博・栗栖 薫 発行所：株式会社 医学書院 発行：2011年3月15日
- 6) 隈部俊宏、富永悌二：神経膠腫治療成績の変化. 新時代の脳腫瘍学—診断・治療の最前線— V. 脳腫瘍の治療. 概論. 日本臨床 68巻 増刊号 10. pp311-319 発行所：株式会社日本臨床社 発行：2010年12月20日
- 7) 隈部俊宏、富永悌二：脳腫瘍—手術療法— I. 臓器部位別の治療戦略. がん治療

最前線—米国癌学会(ASCO)のトピックスを中心に— Pp1-5 編集：「がん治療レクチャー」編集委員会 発行所：総合医学社 発行：2010年10月28日

- 8) 隈部俊宏、富永悌二：2. 星細胞腫に放射線治療は必要か？II. 腫瘍. EBM脳神経外科疾患の治療 2011-2012. pp114-120 編集：宮本享 新井一 鈴木倫保 渋井壮一郎 中瀬裕之 発行所：中外医学社 発行：2010年10月30日
- 9) 隈部俊宏、渡辺みか：Ependymoblastoma 上衣芽腫. 編集：日本脳腫瘍病理学会 脳腫瘍臨床病理カラーアトラス第3版 pp95, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

隈部 俊宏 (KUMABE TOSHIHIRO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10250747

(2) 研究分担者

園田 順彦 (SONODA YUKIHIKO)
東北大学・病院・講師
研究者番号：90302140
齋藤 竜太 (SAITO RYUTA)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10400243

(3) 連携研究者

()

研究者番号：