

## 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 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591610

研究課題名（和文）新しい酵素標的・増感放射線療法 KORTUC の腫瘍幹細胞に対する効果の検証

研究課題名（英文）Identification of the therapeutic effect of new enzyme-targeting radiosensitization treatment, KORTUC for tumor stem cells

研究代表者

小川 恭弘 (OGAWA YASUHIRO)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：90152397

研究成果の概要（和文）：新しい酵素標的・増感放射線療法 KORTUC の効果を、主に乳癌患者に対する非手術乳房温存治療後の治療効果を PET-CT や MRI 等の高精度画像診断手技を駆使して、治療後に経時的に評価した。乳癌の幹細胞である CD44 陽性細胞の免疫組織染色は、当院の病院病理にて、治療前の組織生検検体を用いてルーチンに施行した。その結果、各患者の乳癌組織の CD44 陽性癌細胞の多寡にかかわらず、KORTUC は十分な抗腫瘍効果を有していることが示された。

研究成果の概要（英文）：Using PET-CT and MRI, the therapeutic effects of new enzyme-targeting radiosensitization treatment, KORTUC were evaluated following the treatment for breast cancer patients treated by KORTUC without any surgical procedure. CD44-positive breast cancer cells thought to be breast cancer stem cells were detected by an immunohistochemical method using biopsy specimens obtained prior to the treatment. As a results, it was concluded that KORTUC exerted fully therapeutic effect irrespective of the existence of CD44-positive tumor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線腫瘍学、乳癌、過酸化水素、腫瘍幹細胞、ヒアルロン酸、放射線増感剤

## 1. 研究開始当初の背景

種々の悪性腫瘍（癌・肉腫）に対する放射線治療において、その効果を増強するために種々の放射線増感剤が開発されてきたが、実施診療において使用可能なものは未だ認められていない。これまでの放射線増感剤については、その効果の不確かさとともに末梢神

経障害等の副作用等の問題点があった。放射線治療は、悪性腫瘍の局所治療法として外科的手術に次ぐ方法であり、患者の高齢化ならびに正常臓器・組織の機能・形態の温存という観点から、現在、治療患者数が激増している重要な治療法である。しかしながら、現在汎用されているリニアー・アクセラレータに

よる高エネルギーX線および電子線は低LET (linear energy transfer) 放射線であり、その放射線生物学的効果は重粒子線に比べて低い。そのため、悪性黒色腫や種々の肉腫、多型性神経膠芽腫等の腫瘍にはリニアックによる放射線治療の効果は乏しく、その上、数 cm 以上の種々の局所進行癌についてもそれに含まれる低酸素性腫瘍細胞の多さゆえに放射線抵抗性である。これらに対する放射線治療の効果を改善するためには、数百億円という巨費を投じて重粒子線治療を行なうという方法があり、現在わが国においても放射線医学総合研究所および兵庫県粒子線医療センターにおいて施行されている。しかし、重粒子線治療には費用がかかり過ぎるため、その普及は困難である。そのため、万人に適用可能な、比較的安価でかつ安全な放射線増感剤の開発が今、国民的緊急課題として求められている。

本応募者は、約30年間にわたって種々の悪性腫瘍や正常組織の放射線感受性のメカニズムに関して研究を続けてきたが、その結果、放射線抵抗性の骨肉腫細胞株 HS-0s-1 では、30Gy の1回照射によっても細胞内には活性酸素は認められず、さらにこの細胞内には抗酸化酵素ペルオキシダーゼが多量に存在することを見出した。これに対して、培養液に微量の過酸化水素を添加して放射線照射を行なうと、10Gy の照射によってもこの骨肉腫細胞内には多量の活性酸素の発生が認められ、アポトーシスが進行することを示した。したがって、過酸化水素には強い放射線増感作用があることを明らかにし、この作用メカニズムとしては、細胞内の抗酸化酵素ペルオキシダーゼを分解すると同時に酸素を発生するという、放射線増感として理想的なものであることを示した。これらの基礎的研究を基盤として、術後再発の悪性黒色腫や悪性線維性組織球腫等の表在性の局所進行・放射線抵抗性の悪性腫瘍に対して、過酸化水素水を浸したガーゼをボーラスとして腫瘍表面を覆って放射線治療(電子線照射)を行い、その著明な放射線増感作用を明らかにした。これに続いて、マウス等の動物実験を経て、過酸化水素の易刺激性を緩和するためヒアルロン酸をベースとして用いることにより、過酸化水素の注射局所での分解を遅らせ、刺激を緩和し、腫瘍局所に注射しても安全な局注用の放射線増感剤を世界で初めて考案し、本学医学部倫理委員会の承認を得て、まず、軟部組織の放射線抵抗性の悪性腫瘍ならびに高齢者や手術拒否の乳癌に対して、これを臨床応用しその著明な放射線増感効果を確認した。この新しい局注用の放射線増感剤についてさらに、その効果のメカニズムならびに遺伝子的な背景・関与について解明することにより、さらに安全・確実な、また肝臓癌・

膵臓癌等の深部臓器にも適用可能な放射線増感剤に改良することができる。

## 2. 研究の目的

現在、種々の癌に対する放射線治療は、人口の高齢化および臓器・組織の機能温存の観点から、対象患者数は大きく増加し、今後さらに増加するものと思われる。しかし、現在汎用されているリニアックによる放射線治療効果は、数 cm 以上の腫瘍や悪性黒色腫、種々の肉腫には乏しい。これを解決するには、数百億円という巨費を投じて重粒子線治療を行なうしか方法がなかった。我々は、安全性の高い安価な放射線増感剤を開発することにより、放射線抵抗性の肉腫・癌をリニアックの放射線が効くように増感することを目的とした。今回の研究においては、とくにその中でも、新しい酵素標的・増感放射線療法 KORTUC の腫瘍幹細胞に対する効果の検証を主な目的とした。

## 3. 研究の方法

KORTUC I に続いて、過酸化水素の患部への刺激を軽減し、人体へ注入しても安全でかつ過酸化水素の分解を遅延・抑制させて、腫瘍組織に滞留させ酸素分圧を一定時間保持して放射線増感効果を有効に発揮できるように工夫した局注用の放射線増感剤を開発した<sup>7-9)</sup>。

図1には、この新しい酵素標的・増感放射線療法の概念を示す。この最大量約6 ml を放射線治療の直前に、週2回、腫瘍局所に直視下ないし超音波/CTガイド下に注入した。

十分なインフォームドコンセントを得た上で、本治療を希望した I, II 期乳がん患者39例(I期12例、IIA期23例、IIB期4例)に対して、化学・内分泌療法・KORTUC II を施行した。患者の平均年齢は、約61.1歳であり、70歳以上の高齢者は13例、60歳台10例、50歳台3例、40歳台10例、30歳台1例、20歳台2例であった。

75歳以下の乳癌例には、ザンクトガレン2005のコンセンサスに沿って、標準治療として放射線治療施行前に導入化学療法(EC療法: epirubicin + cyclophosphamide)を行なった。導入化学療法は、II期の15例に施行した(induction chemotherapyとしてEC11例、TC, FEC, TXT+EC各1例、KORTUC後のEC1例)。内分泌療法はエストロゲンレセプタ陽性の36例にKORTUC II治療終了後に施行している。

放射線治療は、Pinnacle<sup>3</sup> を用いて治療計画を行い、Forward planning IMRTにより、リニアック4 MV X線を用いて、主に接線非対向4門照射にて、1日2.75 Gy X週5回で、総線量44 Gyの寡分割照射を行い、X線照射の最後の3回に、1回3 Gyの電子線ブースト

照射を併用した<sup>10-13)</sup>。

増感剤(0.5%過酸化水素+0.83%ヒアルロン酸)の局注は、放射線治療6回目より開始し、超音波ガイド下に週2回(月、木)、放射線治療前に行った。腫瘍内に微細な気泡が均一に分布することを確認した。なお、注射には、24G針を用い、1%キシロカインを少量使用した。また、過酸化水素は、院内製剤での0.5ml入りのバイアルを用いた。

増感剤の局注開始時期は、放射線治療の予定線量の3分の1まで達した時点を基準とし、放射線治療6回目から局注を開始した。これは局注による腫瘍内圧の上昇により、腫瘍細胞のリンパ管・血管への流入増加の可能性が想定されるため、新鮮な腫瘍細胞の脈管への流入を増加させないためである。

また、乳癌組織の生検での病理組織診で、CD44陽性細胞の免疫組織染色を行なった。当科では、当院病院病理のご協力により、治療前の針生検での組織診で、CD44免疫組織染色をルーチンに行っている。ちなみに、CD44陽性の癌細胞は、乳癌幹細胞であるとされ、さらに、CD44はヒアルロン酸のレセプタであることから、ヒアルロン酸を単独で腫瘍内に局注するとCD44陽性の腫瘍幹細胞と結合し、腫瘍幹細胞のリンパ管への流入を促進するとの報告もある。一方、KORTUC IIでは、過酸化水素を用いているため、乳癌幹細胞をも酸素化できることとなり、低酸素状態による乳癌幹細胞のエックス線・電子線抵抗性をも克服できる可能性が高い。これについては、今後、詳細な検討を行う予定である。

また、KORTUC II治療前後での詳細な画像評価を経時的に行った。

#### 4. 研究成果

新しい酵素標的・増感放射線療法 KORTUC の効果を、主に乳癌患者に対する非手術乳房温存治療後の治療効果を PET-CT や MRI 等の高精度画像診断手技を駆使して、治療後に経時的に評価した。乳癌の幹細胞である CD44 陽性細胞の免疫組織染色は、当院の病院病理にて、治療前の組織生検検体を用いてルーチンに施行した。その結果、各患者の乳癌組織の CD44 陽性癌細胞の多寡にかかわらず、KORTUC は十分な抗腫瘍効果を有していることが示された。

#### 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 10 件)

- ① Ogawa Y, Kubota K, Ue H, Tadokoro M, Matsui R, Yamanishi T, Hamada N, Kariya S, Nishioka A, Nakajima H, Tarutani M, Sano S. Safety and effectiveness of a

new enzyme-targeting radiosensitization treatment (KORTUC II) for intratumoral injection for low-LET radioresistant tumors. Int J Oncol 39: 553-560, 2011 査読あり

- ② Tsuzuki A, Ogawa Y, Kubota K, Tokuhiko S, Akima R, Yaogawa S, Itoh zk, Yamada Y, Sasaki T, Onogawa M, Yamanishi T, Kariya S, Nogami M, Nishioka A, Miyamura M. Evaluation of changes in tumor shadows and microcalcifications on mammography following KORTUC II, a new radiosensitization treatment without any surgical procedure for elderly patients with stage I and II breast cancer. Cancers 3: 3496-3505, 2011 査読あり
- ③ Miyatake K, Kubota K, Ogawa Y, Hamada N, Murata Y, Nishioka A. Non-surgical care for locally advanced breast cancer: Radiologically assessed therapeutic outcome of a new enzyme-targeting radiosensitization treatment, Kochi Oxydol-radiation therapy for unresectable carcinomas, type II (KORTUC II) with systemic chemotherapy. Oncol Rep 34: 1161-1168, 2010 査読あり
- ④ Hitomi J, Kubota K, Ogawa Y, Hamada N, Murata Y, Nishioka A. Non-surgical therapy and radiologic assessment of stage I breast cancer treatment with novel enzyme-targeting radiosensitization: Kochi Oxydol-radiation therapy for unresectable carcinomas, type II (KORTUC II). Exp Ther Med 1: 769-775, 2010 査読あり
- ⑤ Tokuhiko S, Ogawa Y, Tsuzuki A, Akima R, Ue H, Kariya S, Nishioka A. Development of a new enzyme-targeting radiosensitizer (KORTUC) containing hydrogen peroxide for intratumoral injection for patients with low linear energy transfer (LET) radioresistant neoplasms. Oncol Lett 1: 1025-1028, 2010 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

- ① Ogawa Y, Kubota K, Tadokoro M, Yamanishi T, Aoyama N, Suzuki Y, Iwasa H, Kariya S, Nogami M, Nishioka A. KORTUC II - A new image-guided, enzyme-targeted, and breast cancer stem cell targeted radiosensitization treatment for patients with stage I and II breast cancers. 53<sup>rd</sup> Annual Meeting

of the American Society for Radiation Oncology, Miami Beach, USA, October 3, 2011

- ② Nishioka A, Ogawa Y, Suzuki Y, Tadokoro M, Kariya S, Hamada N, Kubota K. Safety and efficacy of intraoperative radiotherapy with image-guided enzyme targeting radiosensitization (KORTUC-IORT) for advanced pancreatic cancer. 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society for Radiation Oncology, Miami Beach, USA, October 4, 2011
- ③ Tsuzuki A, Ogawa Y, Kubota K, Nishioka A, Akima R, Tokuhiko S, Yaogawa S, Yamada Y, Sasaki T, Geshi H. Evaluation of changes of tumor shadows and micro-calcifications on mammography following a new radiosensitization treatment (KORTUC II) for aged patients with breast cancer of stages I and II. 52nd Annual Meeting of the American Society for Radiation Oncology, San Diego, USA, November 2, 2010
- ④ Nishioka A, Ogawa Y, Kariya S, Miyatake K, Tadokoro M, Ue H, Matsui R, Hamada N, Kubota K. Safety and efficacy of new enzyme targeting intraoperative radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. 52nd Annual Meeting of the American Society for Radiation Oncology, San Diego, USA, November 3, 2010

[図書] (計1件)

- ① 小川恭弘、他、篠原出版新社、癌の臨床特集 酵素標的・増感放射線療法 KORTUCの基礎と臨床、2011、263-320

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 恭弘 (OGAWA YASUHIRO)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号：90152397

### (2) 連携研究者

西岡 明人 (NISHIOKA AKIHITO)  
教育研究部医療学系・准教授  
研究者番号：70237668

刈谷真爾 (KARIYA SHINJI)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：20314990