

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791285

研究課題名(和文)細胞修復阻害と腫瘍内酸化を用いた神経芽腫内照射療法の抗腫瘍効果増強

研究課題名(英文)Enhancing anti-tumor effect of I-131 MIBG therapy for neuroblastoma by inhibition of cell recovery

研究代表者

若林 大志 (WAKABAYASHI, HIROSHI)

金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：60622818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：I-131 MIBGは神経芽細胞腫に対する内照射療法の治療製剤として臨床利用されており、腫瘍細胞内へ集積して殺細胞効果を発揮する。本研究は、I-131 MIBG内照射療法の効果増強獲得を目的として、プリンアルカロイドの1種であるカフェインの殺細胞効果とI-131MIBGとの相互作用を検討した。カフェインは濃度依存性にヒト神経芽細胞腫由来細胞株SK-N-SHに対して殺細胞効果を認めた。しかし、カフェインを併用する事で投与タイミングに関わらず神経芽細胞腫に対するI-131 MIBGの摂取率は低下した。I-131 MIBGの腫瘍への集積が抑制される事から抗腫瘍効果の増強は得られにくいと予想された。

研究成果の概要(英文)：I-131 meta-iodobenzylguanidine (MIBG) has been used to treat patients with high-risk neuroblastoma. I-131 MIBG accumulate into tumor cells and has an anti-tumor effect by high-energy beta-irradiation. Caffeine is classified as purine alkaloids, and has anti-tumor effect in tumor cells by inhibition of DNA-repair. This study was performed whether I-131 MIBG interacted with caffeine for human neuroblastoma cell line SK-N-SH. Cells were treated with caffeine at concentrations as high as 40 mM, and the anti-tumor effect of caffeine was concentrate-dependent. However, uptake of I-131 MIBG into neuroblastoma cells treated by caffeine was reduced independently of the load timing. These results suggest that high-dose caffeine has anti-tumor effect, but the anti-tumor effect by combined I-131 MIBG and caffeine will not be enhanced, probably by decreasing uptake of I-131 MIBG.

研究分野：核医学

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：神経芽腫 内用療法 カフェイン

1. 研究開始当初の背景

I-131 metaiodobenzylguanidine(MIBG)は神経芽細胞腫に対する内照射療法の治療製剤として臨床利用されており、腫瘍細胞内へ集積して殺細胞効果を発揮する。I-131 MIBG 療法は多剤併用化学療法、外照射治療が行われても局所再発や遠隔転移を繰り返し予後不良な治療抵抗性を持つ難治性神経芽腫に対して施行される。しかしながら、I-131 MIBG 治療に関しても、難治性神経芽腫には治療効果が乏しい事が多く、決定的な治療法がまだ確立されていないのが現状である。原因として I-131 MIBG 治療を含む内照射療法一般に言えることであるが、腫瘍組織における照射線量が不足しており、放射線線量分布が不均一なことにより治療効果が高まらないと考えられている。より高い治療効果を得るためには、biological response modifier 等による同調が必要であると考えられる。しかしながら、臨床的に有用な方法は確立されていない。

治療効果を得るために、プリンアルカロイドの1種であるカフェインのDNA修復阻害作用による殺細胞効果に着目した。カフェインは細胞周期のG2チェックポイント阻害により抗癌剤からDNA合成阻害を受けた細胞の修復過程を抑制することで抗癌剤の補助剤として臨床でも安全に用いる事が出来る(Anticancer Res.1998;18:657-666)。また、種々の細胞で放射線外照射後のDNA修復を阻害する事も報告されている。ヒト神経芽細胞腫SK-N-MCに対するカフェインの単独使用でもアポトーシスを誘導させる殺細胞効果の可能性が示唆されている(J Korean Med Sci 2002;17:674-678)。本研究でI-131 MIBGとカフェインの相互作用を確認することは臨床に直結できる治療の可能性を確認する上で重要と考えた。

2. 研究の目的

I-131 MIBG 内照射療法の効果増強獲得を目的として、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SHに対してプリンアルカロイドの1種であるカフェインの殺細胞効果とI-131 MIBGとの相互作用の詳細を検討する。

3. 研究の方法

(1) カフェインの殺細胞作用

ヒト神経芽細胞腫由来細胞株SK-N-SHを37℃, 5%CO<sub>2</sub>条件下で培養し、この細胞を24ウェル細胞培養用マルチウェルプレートに1ウェル辺り1×10<sup>5</sup>cells/ml播いた。

カフェイン無負荷をcontrolとして、カフェインを0.1mM、1mM、10mM、20mM、40mMで負荷し各々カフェイン投与後3、6、24、48時間後に細胞数を測定した。

(2) カフェイン負荷に伴うI-131 MIBG 摂取阻害効果

ヒト神経芽細胞腫由来細胞株SK-N-SHを37℃, 5%CO<sub>2</sub>条件下で培養し、この細胞を24ウェル細胞培養用マルチウェルプレートに1ウェル辺り1×10<sup>5</sup>cells/ml播いたものをcontrolとした。約3.7kBq/μlのI-131 MIBGを1μl投与した1時間後に細胞数を測定した。

約3.7kBq/μlのI-131 MIBGを1μl投与したものをcontrolとし、一方でカフェイン1mMをI-131 MIBG投与の1時間前、同時、1時間、6時間、24時間後に加えてI-131 MIBG 摂取率を測定した。

それぞれ1時間インキュベーションした後に、I-131 MIBGを含んだ培養液を取り除き、Na<sup>+</sup>-PBSで細胞を2回洗浄した。1000μlの0.1N NaOHで細胞を溶解し、そのうちの700μlをガンマカウンタで測定した。

(3) 検定の有意水準は0.05とした。

4. 研究成果

(1) カフェインの殺細胞作用

ヒト神経芽細胞腫由来細胞株SK-N-SHはカフェイン負荷後(0.1mM、1mM、10mM、20mM、40mM)、全実験群において分散分析で有意に差を認めた(P<.0001)。

Dunnett法を用いてコントロール群と多群間比較を行うと3時間後では40mM(P<.0001)、6時間後で20mM(P<.0001)と40mM(P<.0001)、24時間後で10mM(P=.0001)、20mM(P<.0001)、40mM(P<.0001)、48時間後で10mM(P<.0001)、20mM(P<.0001)、40mM(P<.0001)を負荷した群でコントロール群と比較して有意に細胞数の低下を認めた。

図1はコントロール群と比較し細胞数が有意に低下した実験群を示す。

図1 コントロール群との比較

	0.1mM	1mM	10mM	20mM	40mM
3時間後					低下
6時間後				低下	低下
24時間後			低下	低下	低下
48時間後			低下	低下	低下

上記結果からヒト神経芽細胞腫由来細胞株SK-N-SHに対してカフェインが濃度依存性に殺細胞効果を持つ事が確認できた。

ヒト神経芽細胞腫SK-N-MCに対して高濃度のカフェインが、アポトーシスを誘導するという報告もある。今回の実験でもヒト神経芽細胞腫SK-N-SHに対して、同様の機序で殺細胞効果が誘導されている事が予測された。

(2) カフェイン負荷に伴うI-131 MIBG 摂取阻害効果

I-131 MIBG投与前後の細胞数確認  
約3.7kBq/μlのI-131 MIBGを1μl投与した1時間後に投与群、非投与群の間で細胞数に

有意な差は認めなかった。

この結果から I-131 MIBG を 1 $\mu$ l 投与した後に摂取率を測定する事で、I-131 MIBG とカフェインの相互作用を確認する事ができると考えられた。

#### I-131 MIBG 摂取阻害効果の確認

I-131 MIBG 負荷の 1 時間前、同時、1 時間、6 時間、24 時間後にカフェインを加えて I-131 MIBG 摂取率を測定すると、全負荷群でそれぞれ有意にカフェインによって I-131 MIBG 摂取率低下が確認された ( $P=0.0004$ ,  $P<.0001$ ,  $P=0.002$ ,  $P=0.02$ ,  $P=0.001$ )。

図 2 はカフェイン負荷に伴う I-131 MIBG の摂取率(平均値)を示す。

図 2 カフェイン負荷に伴う I-131 MIBG の摂取率

	負荷なし	負荷あり
1 時間前	0.52%	0.42%
同時	0.77%	0.55%
1 時間後	0.68%	0.53%
6 時間後	0.62%	0.51%
24 時間後	0.58%	0.51%

上記結果から、カフェインの併用により I-131 MIBG の摂取率が投与タイミングに関わらず低下することが示唆された。

これまで、EANM の I-131 MIBG 治療ガイドラインでカフェインは詳細機序不明だが I-131 MIBG の取り込みを低下させると記載があった (EJNMI, 2008;35: 1039-1047)。しかし、具体的にどのタイミングで摂取率が低下したかを示した詳細なデータは示されておらず、今回の検討で I-131 MIBG 治療前後においてカフェインの摂取は控える必要があることを確認できた。

(3) 今後の研究課題として、カフェインに関しては、PET 製剤を用いて体内の薬物動態をイメージングすることで I-131 MIBG との関係性を検討する必要があると考えられた。また、I-131 MIBG を含めた内照射療法でカフェインの併用を考える際は殺細胞効果だけでなくラジオアイソトープの取り込み低下に関して考える必要があると考えられた。

しかしながら、神経芽腫細胞に関しては、I-131 MIBG の腫瘍細胞への集積が抑制される事から抗腫瘍効果の増強は難しいと予想された。

#### 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)

[学会発表](計 5 件)

萱野大樹、稲木 杏吏、若林 大志、赤谷 憲一、福岡 誠、絹谷 清剛

RI療法今後の展開「I-131 MIBG」

#### 第53回日本核医学総会

2013.11.10 福岡国際会議場(福岡)

若林 大志、萱野 大樹、稲木 杏吏、滝 淳一、福岡 誠、絹谷 清剛、小林 正和、柴 和弘

神経芽腫内照射療法におけるカフェイン併用抗腫瘍効果の基礎的検討 第53回日本核医学総会

2013.11.9 福岡国際会議場(福岡)

若林 大志、萱野 大樹、稲木 杏吏、滝 淳一、福岡 誠、絹谷 清剛、小林 正和、柴 和弘

神経芽腫のI-131 MIBG療法におけるカフェイン併用抗腫瘍効果の基礎的検討

第77回日本核医学会中部地方会

2013.6.29 金沢大学医学類(金沢)

萱野大樹、若林 大志、稲木 杏吏、虎谷 文音、福岡 誠、絹谷 清剛

神経芽腫に対するI-131 MIBG治療の急性期副作用

第77回日本核医学会中部地方会

2013.6.29 金沢大学医学類(金沢)

Hiroshi Wakabayashi, Junichi Taki,

Anri Inaki, Ayane Nakamura, Daiki Kayano, Makoto Fukuoka, Shinro Matsuo, Kenichi Nakajima, Seigo Kinuya.

The prognostic value of hormonal response after initial low-dose I-131 MIBG therapy in patients with malignant pheocytoma and paraganglioma

EANM congress 2012

2012.10.28 Milano Congressi (Italy)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

若林 大志 (WAKABAYASHI, Hiroshi)  
金沢大学・大学病院・助教

研究者番号：60622818

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし