

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462244

研究課題名(和文) ICG-Liposomeを用いた脳腫瘍の新規免疫療法

研究課題名(英文) Photo-immune therapy with liposomally formulated phospholipid-conjugated indocyanine green for glioblastoma

研究代表者

岩立 康男 (IWADATE, Yasuo)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70272309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ICG-リポソームを光感受性物質として設計開発し、近赤外線照射によって熱誘導と活性酸素を産生することを確認した。

今回の一連の研究から、ラット脳腫瘍モデルの静脈内に投与した場合に脳腫瘍局所に1週間以上集積、近赤外光照射による熱産生、脳腫瘍の増大抑制効果、脳腫瘍ラットの生存期間延長、組織学的に広範な壊死が存在、TUNEL法によるアポトーシス細胞の出現、脳腫瘍へのCD8+Tリンパ球の集積、ヌードラットにおいて上記治療効果がみられないこと、などを明らかにした。これらの結果から、本システムが非常に強く脳腫瘍局所での特異的免疫反応を惹起することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We developed a clinically translatable nanoparticle that is liposomally formulated phospholipid-conjugated indocyanine green (LP-iDOPE) which accumulates in tumor tissues. This is near infrared (NIR) fluorescent liposomes for optical imaging and nanoparticle drug carrier as well as a photosensitizer which releases heat and singlet oxygen to kill cancer cells. A significant tumor growth retardation and a significant survival prolongation were observed in a rat glioma model. Histopathological examination showed inductions of both apoptosis and necrosis, and also accumulations of CD8 T-cell and macrophage/microglia. This efficacy was not observed in immunocompromised nude rats, and a mild hyperthermia alone at 45 degree did not show any therapeutic effects. These results collectively showed that the new nanoparticle LP-iDOPE combined with NIR irradiation can efficiently induce tumor-specific immune reaction, and is a promising therapeutic agent for malignant gliomas.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 グリオーマ 光線力学療法 抗腫瘍免疫 ICG リポソーム CD8 温熱療法

## 1. 研究開始当初の背景

グリオーマの最悪性型である膠芽腫は、重要な機能を担う脳に浸潤性に発育し、また放射線・化学療法に抵抗性であることから、極めて治療を得ることが難しい難治性腫瘍である。特に腫瘍細胞と正常神経細胞が混在する浸潤域の治療を考えると、現行の可及的切除術と放射線治療を主体とした治療戦略は強い中枢神経毒性につながる可能性が高い。また、本腫瘍は40歳代～50歳代の社会的活動性の高い時期に好発するため、社会的損失が大きい。特に神経機能の温存しながら根治を目指すためには、他の癌とは異なる治療戦略が求められる。腫瘍特異的免疫監視機構を強化する免疫学的治療が理論的に優れた方法と考えられる。

一方で、脳は免疫学的寛容の場として知られ、抗原提示が不十分であると同時に、免疫担当細胞の集積を得づらい組織である。したがって、皮下ワクチンなどによって腫瘍特異的な細胞障害性Tリンパ球が誘導されても、十分な治療効果を得ることが困難であった。一方我々は、これまでに脳腫瘍局所で有効な抗原提示をもたらすことが腫瘍拒絶に重要であることを示してきた。今回、脳腫瘍へ特異的な集積を示す Indocyanine green (ICG)-リポソームを開発し、その静脈内投与と脳腫瘍への近赤外線照射を組み合わせることで、活性酸素による効率的な細胞死を起こすと同時に、腫瘍局所の温熱作用が得られることを見出した。本研究では、本治療により脳腫瘍局所で有効な抗原提示をもたらす、免疫機構を動員した腫瘍拒絶を得ることを目指す。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、このICG-リポソームが静脈内投与で脳腫瘍内へ特異的に集積し、局所において強力な細胞死と抗原提示を誘導し、かつ効率よく腫瘍特異的Tリンパ球をリクルートできることを証明することにある。

(2) 最終的なエンドポイントは、脳腫瘍モデルラットの生存期間延長であり、同時に安全性を確認し、将来的な臨床応用につなげることを目指して研究を行う。

## 3. 研究の方法

世界的に用いられている標準的脳腫瘍モデルであるFisher rat-9L gliosarcomaの系を用いる。治療はICG-リポソームを静脈内に投与した後、種々のスケジュールで近赤外線(NIR)照射を行い、治療効果を種々の方法で判定する。

(1) このラット脳腫瘍モデルを作製した後ICG-リポソームとNIR照射による治療を開始し、治療率、生存期間、およ

び7テスラ動物専用MRIによる腫瘍体積の経時的変化を検討する。無治療群、ICG-リポソーム単独群、光NIR射単独群との比較を行う。

- (2) 各群の生存期間をKaplan-Meier法にて算出し、生存曲線を作成する。
- (3) 治療後のラットから脳を摘出し、HE染色、TUNEL染色を行い、治療効果を病理組織学的な面から比較検討するとともに、細胞死の機序がネクローシスかアポトーシスかを確認する。CD4 Tリンパ球、CD8 Tリンパ球浸潤の有無やマイクログリア・マクロファージの浸潤(RM4抗体)、などの状態を免疫組織学的に比較する。
- (4) 腫瘍特異的細胞障害性Tリンパ球の誘導を各群でLDH cytotoxicity assayにて定量的に評価するとともに、皮下ワクチンの場合と比較する。
- (5) 免疫不全ヌードラットを用いて、同様な治療実験を行い、治療効果がどのように変化するかを検討する。
- (6) 加温用マイクロプローベを脳腫瘍内に挿入し、温熱単独での治療効果を確認する。野生型動物と同様に、MRIによる経時的脳腫瘍体積測定、生存期間の他、組織学的検索、免疫組織化学も併せて行う。
- (7) 安全性の確認：治療後ラットの神経学的評価とMRIによって神経変性の有無の確認、脳浮腫の評価を行う。一部の動物では、摘出脳の病理組織学的検討もを行い本治療に伴う神経毒性の程度を検証する。また、各臓器を摘出し、組織学的に壊死などの副作用が存在しないことを確認する。

## 4. 研究成果

(1) 新規ナノ粒子の脳腫瘍への集積：ICG-Liposome投与24時間後に、脳を摘出し、近赤外線蛍光イメージによる評価を行った。脳腫瘍には高い集積が確認されたが、正常脳への集積は見られなかった。24時間後では、肝臓、腎臓、脾臓にも高い集積を認めしたが、1週間後の計測では、腫瘍組織にのみ集積が見られ、他の健常臓器では集積が見られなかった。この脳腫瘍組織への特異的な高集積は enhanced permeability and retention (EPR) 効果によるものと考えられる。

(2) 9L gliosarcomaによるラット脳腫瘍モデルを作製し、ICG-リポソームを投与した後24時間後と48時間後にNIR照射を各10分間ずつ行った。day3、day7、day14、day21に7テスラ動物専用MRI(放射線医学総合研究所)を用いて腫瘍生着の確認、腫瘍体積の経時的変化を測定した。未治療コントロ

ール群とICG-リポソーム投与単独群では腫瘍移植4週目の腫瘍体積がそれぞれ $0.65\text{cm}^3$ と $0.69\text{cm}^3$ であったのに対し、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群では $0.056\text{cm}^3$ と有意な増殖遅延を認めた ( $p<0.0001$ )。この治療実験中はday3、day7、day14、day21、day28、day35 さらに生存全期間を通してMRI撮像を行い腫瘍退縮あるいは消失を一個体の経時的変化として捉え、in vivo の脳腫瘍成長曲線を作成した。

(3) Kaplan-Meier 法による生存曲線を作製した。未治療コントロール群とICG-リポソーム投与単独群では生存期間中央値はそれぞれ、 $31.6\pm 3.1$ 日と $35.3\pm 3.3$ 日であったのに対し、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群では $59.3\pm 2.9$ 日と有意な生存期間の延長を認めた ( $p=0.024$ 、 $p=0.031$ )。

(4) HE標本では、未治療コントロール群において旺盛な腫瘍増殖が確認され、壊死像は全く認めなかった。ICG-リポソーム投与単独群でもほぼ同様であり、壊死像は認められなかった。一方、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群では広範な壊死像が確認され、その中に島状に腫瘍細胞塊が残存していた。TUNEL染色でも、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群でのみアポトーシス細胞を認めた。免疫組織化学では、壊死とアポトーシスの混在する標本において、腫瘍全体にCD8 T リンパ球浸潤を認めた。CD4 T リンパ球浸潤はほとんど認められなかった。マイクログリア・マクロファージ染色(RM4抗体陽性細胞)は、ICG-リポソームとNIR照射を併用した治療群において、腫瘍周囲の正常脳に認められ、一部腫瘍内辺縁部への浸潤が認められた。ICG-リポソーム投与単独、あるいはNER照射単独の場合は腫瘍周囲にわずかながらRM4抗体陽性細胞を認めた。

(5) 免疫不全ヌードラットを用いて、同様の治療実験を行ったが、MRIによる腫瘍増大抑制効果は認められなかった。生存期間も未治療コントロールと全く同様であった。

(6) アドメテック社のマイクロ加温針を腫瘍局所に挿入してICG-リポソームとNIR照射で得られる最高加温領域の45 の温熱単独効果を得た。MRIでの腫瘍増殖抑制効果は見られず、T2強調画像での広範な壊死を示唆する高信号域は認められなかった。また、組織学的検討、免疫組織化学でも未治療コントロールとの差異は存在しなかった。

(7) 治療後に、適宜MRIのT2強調画像を撮像し脳浮腫の有無を確認したが、腫瘍増大に伴わない脳浮腫は認められなかった。また、経過中、担癌ラットの行動異常なども認められなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

- Iwadate Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioglastoma progression. *Oncol Let.* 11:1615-1620. 2016. (査読有)
- Iwadate Y, Shinozaki N, Matsutani T, Uchino Y, Saeki N. Molecular imaging of 1p/19q deletion in oligodendroglial tumours with  $^{11}\text{C}$ -methionine positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* pii: jnnp-2015-311516. doi: 10.1136/jnnp-2015-311516. 2016.(査読有)
- Iwadate Y, Matsutani T, Hirono S, Ikegami S, Shinozaki N, Saeki N. IDH1 mutation is prognostic for diffuse astrocytoma but not low-grade oligodendrogliomas in patients not treated with early radiotherapy. *J Neurooncol.* 124, 493-500, 2015. (査読有)
- Suganami A, Iwadate Y, Shibata S, Yamashita M, Tanaka T, Shinozaki N, Aoki I, Saeki N, Shirasawa H, Okamoto Y, Tamura Y. Liposomally formulated phospholipid-conjugated indocyanine green for intra-operative brain tumor detection and resection. *Int J Pharmaceutics.* 496:401-6. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.001. 2015. (査読有)
- Iwadate Y, Fukuda K, Matsutani T, Saeki N. Intrinsic protective mechanisms of neuron-glia network against glioma invasion. *J Clin Neurosci.* 26:19-25. doi: 10.1016/j.jocn.2015.07.024. 2015.(査読有)
- Adachi-Hayama M, Adachi A, Shinozaki N, Matsutani T, Hiwasa T, Takiguchi M, Saeki N, Iwadate Y. Circulating anti-filamin C autoantibody as a potential serum biomarker for low-grade gliomas. *BMC Cancer.* 14(1):452, 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

- 篠崎夏樹、岩立康男、内野福生、吉川京燦、佐伯直勝.  $^{11}\text{C}$ -methionine PETとglioma予後予測因子の相関について. 第74回日本脳神経外科学会学術総会. 2015年10月16日(ロイトン札幌、北海道、札幌)
- 篠崎夏樹、岩立康男、内野福生、吉川京燦、佐伯直勝.  $^{11}\text{C}$ -methionine PETとglioma予後予測因子の相関. 第33回日本脳腫瘍学会学術総会. 2015年12月7日(京都国際会館、京都府、京都市)
- 篠崎夏樹、岩立康男、内野福生、吉川京燦、佐伯直勝.  $^{11}\text{C}$ -methionine PETによるgliomaの術前診断. 第73回日本脳神経外科学会学術総会. 2014年10月17日(新高輪プリンスホテル、品川区、東京都)
- 柴田さやか、田村 裕、菅波晃子、岩立康男、篠崎夏樹. LP-iDOPEと2つの異なる近赤外光光源による光線力学療法のラットグリオーマモデルにおける

評価. 第73回日本癌学会学術総会.  
2014年9月25日(パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県)  
篠崎夏樹、岩立康男、田村 裕、池上史郎、柴田さやか、菅波晃子、青木伊知男、佐伯直勝. 近赤外蛍光色素結合型脂質(LP-iDOPE)を用いたラットグリオーマモデルの光線力学療法. 第32回日本脳腫瘍学会学術集会. 2014年12月1日(シェラトングランデ・トウキョウベイ、浦安市、千葉県)  
篠崎夏樹、岩立康男、田村 裕、菅波晃子、柴田さやか、青木伊知男、佐伯直勝. インドシアニングリーンを組み込んだ新たなナノ粒子によるラットグリオーマモデルの光線力学療法. 第72回日本脳神経外科学会総会. 2013年10月4日(パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県)

〔図書〕(計1件)

Taniguchi H, Kohira N, Ohnishi T, Kawahira H, von und zu Fraunberg M, Jaaskelainen JE, Hauta-Kasari M, Iwadate Y, Haneishi H. Improving convenience and reliability of 5-ALA-induced fluorescent imaging for brain tumor surgery. MICCAI 2015, Part III, LNCS 9351, Frangi A (Eds). 2015: 209-17.(査読有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩立 康男 (IWADATE, Yasuo)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 70272309

(2)研究分担者

田村 裕 (TAMURA, Yutaka)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号: 50263174