

氏名	しょう ぎょうとう 邵 暁東
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	2021年9月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程)医科学専攻
学位論文題目	悪性神経膠腫に対する対流強化薬剤送達技術によるニムスチン塩酸塩局所投与治療の開発:基礎特性の研究
論文審査委員	主査 教授 富永 悌二 教授 大和田 祐二 教授 新妻 邦泰

論文内容要旨

学籍番号: B7MD5508

氏名: 邵 暁東

本文:

背景: 成人原発性脳腫瘍の中で神経膠腫は最も頻度が高く治療抵抗性である。その中で最も予後不良な膠芽腫では、最大限の手術摘出、化学療法および局所放射線療法による集学的治療をおこなっても生存期間中央値は約12~15ヶ月である。治療抵抗性の原因の一つとして、血液脳関門による化学療法剤の脳実質内への到達が治療効果を得るには依然不十分であることが挙げられる。対流強化薬剤送達(convection-enhanced delivery: CED)法はこの問題を克服するために開発された脳実質内への薬剤局所送達方法で、脳腫瘍、パーキンソン病、てんかんを含む機能的神経系疾患などの多くの中枢神経系疾患に対する治療応用がされている。このCED法は、マイクロカテーテルの先端に持続的な陽圧をかけることで、周囲脳組織に対流を形成し、脳実質内に薬剤を広く分布させる方法で、血液脳関門、血液腫瘍関門をバイパスすることが可能である。このようにCED法は有望な薬剤送達法であるが、今後の臨床応用を考える場合、有効な薬剤の選択、脳実質内での薬剤の分布範囲、局所送達によって引き起こされる腫瘍内微小環境の変化について明らかにする必要がある。そこで本研究では、CED法を用いてニトロソウレア系の化学療法剤の一つであるニムスチン塩酸塩(Nimustine Hydrochloride: ACNU)をCED法で脳実質内へ局所送達した際の、薬剤の局所分布・体内動態、およびそれにより惹起される免疫応答を中心とした腫瘍微小環境の変化について明らかにすることを目的として検討をおこなった。

方法: ACNUをCED法で局所送達した際の脳内薬剤分布・体内薬剤動態を評価した。脳内局所薬剤分布は、ACNUとエバンスブルーを混合しCED法で脳内送達を施行し、直後に①質量分析イメージング(mass spectrometry imaging: MSI)法によるACNUの代謝産物である塩酸モクソニジンC₉H₁₄N₅OCl[M+H]⁺分子についての拡がり評価、②肉眼所見からエバンスブルーの拡がり評価し、両者を比較した。体内動態は、¹⁴C標識ACNU送達下でのラジオアイソトープイメージング法にて解析した。ACNUをCED法で脳実質内へ局所送達することで免疫反応が惹起されるという仮説を立て、in vitro, in vivoで検討した。微小環境に与える因子として、アポトーシス誘導や細胞生存の双方に働くFasタンパク質、微小環境内での腫瘍免疫を抑制するTransforming growth factor-beta1(TGF-beta1)に着目し、ACNUがヒト膠芽腫細胞株のFasタンパク質の発現、TGF-beta1の産生に与える影響をin vitroで評価した。さらにラット膠肉腫細胞株9Lによる脳内腫瘍移植モデルにACNUをCED法で局所送達した際の腫瘍内へのCD4/CD8陽性リンパ球浸潤を組織学的に解析した。

(書式 1 2)

結果：ラット脳実質内へ CED 法で ACNU 局所送達をおこない、MSI 法で薬剤分布を評価した結果、良好な ACNU 分布が得られた。これは親水性染料であるエバンスブルーと同等の分布であった。ラジオアイソトープを用いた ACNU 動態解析では、ACNU を CED 法で局所送達した直後から腸や膀胱にラジオアイソトープの集積が確認され、短時間で消失した。一方で、脳実質内には 24 時間後まで ACNU の局在が確認された。in vitro で腫瘍細胞に ACNU を曝露すると、腫瘍細胞の Fas タンパク質発現は低下し、TGF-beta1 分泌は低下した。脳内腫瘍モデルに対し CED 法で ACNU を腫瘍内に送達すると、腫瘍内への CD4・CD8 陽性リンパ球の浸潤がそれぞれ誘導された。

結論：ACNU を CED 法にてラット脳実質内へ局所送達すると、ACNU は脳実質内に良好に拡散し、かつ局所のクリアランスは比較的遅いことを確認した。さらに ACNU は腫瘍微小環境に影響を与え、CED 法での ACNU 局所送達後に腫瘍内に CD4 陽性・CD8 陽性リンパ球浸潤がそれぞれ誘導された。本研究結果から、ACNU は CED 法による脳実質内への局所送達における有望な薬剤となる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

博士論文題目 悪性神経膠腫に対する対流強化薬剤送達技術によるニムスチン塩酸塩局所投与治療の
開発：基礎特性の研究

所属専攻・分野名 医科学 専攻 神経外科学 分野

学籍番号 B7MD5508 氏名 邵 暁東

成人原発性脳腫瘍の一つである神経膠腫は治療抵抗性である。この原因の一つとして、化学療法剤の脳への到達を妨げる血液脳関門の存在が挙げられる。対流強化薬剤送達（convection-enhanced delivery: CED）法はこの問題を克服するために開発された脳実質内への薬剤送達法で、マイクロカテーテル先端に持続的な陽圧をかけ対流を形成させることで、血液脳関門をバイパスし薬剤を広く分布させることができる。

本法を神経膠腫治療に臨床応用するには、脳内や全身の薬物動態、腫瘍内微小環境の変化について基礎データが不足している。本研究では、CED法を用いて、化学療法剤の一つであるニムスチン塩酸塩（ACNU）を脳実質内へ局所送達した際の薬剤の局所分布・体内動態、免疫応答を中心とした腫瘍微小環境の変化を明らかにすることを目的とした。

CED法によるACNU局所送達後の脳内動態は、ACNUと親水性であるエバンスブルー混合液をCED法で脳内に送達し、①ACNUの代謝産物である塩酸モクソニジン分子の拡がり質量分析イメージング（mass spectrometry imaging: MSI）法で評価、②光学画像からエバンスブルーの拡がり評価し、両者を比較した。全身の体内動態は、¹⁴C標識ACNU送達後のラジオアイソトープイメージング法で評価した。CED法によるACNU腫瘍内送達による免疫反応については、①細胞生存に重要なFasタンパク質、微小環境内での腫瘍免疫を抑制するTransforming growth factor- β 1（TGF- β 1）に着目し、ヒト膠芽腫細胞株を用いてACNUがFasタンパク質発現、TGF- β 1分泌に与える影響について*in vitro*で評価し、②脳内腫瘍移植モデルにACNUをCED法で局所送達した際の腫瘍内へのCD4/CD8陽性リンパ球浸潤を*in vivo*で評価した。

ラット脳実質内へCED法でACNU局所送達直後のMSI法の評価では広範なACNU分布が得られ、エバンスブルーと同等の分布が得られた。¹⁴C標識ACNUを用いた動態解析ではACNUをCED法で局所送達した直後から腸や膀胱にACNUが検出され短時間で消失したが、脳実質内には24時間後までACNUが検出された。腫瘍細胞をACNUに曝露すると、腫瘍細胞のFasタンパク質発現やTGF- β 1分泌は低下した。脳内腫瘍モデルに対しCED法でACNUを腫瘍内に送達すると腫瘍内へのCD4・CD8陽性リンパ球の浸潤が誘導された。

本研究では、CED法によるACNU局所送達で、脳内への長時間で広範な送達得られ、腫瘍内にCD4陽性・CD8陽性リンパ球浸潤が誘導されることを明らかにした。以上よりCED法によるACNU局所送達が神経膠腫に対する有効な治療となる可能性が示唆された。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。