

令和元年6月14日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10332

研究課題名（和文）肝特異性造影剤の排泄分子機構を利用した肝がん放射線照射マージンの可視化

研究課題名（英文）MR Visualization of Treatment Margins Surrounding Liver Cancer in Radiotherapy

研究代表者

山口 雅之（Yamaguchi, Masayuki）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：90450577

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：世界で年間700万人以上の肝がん患者が死亡する中、手術より低侵襲で、効果的な放射線治療に期待が集まっている。肝臓は呼吸運動によって移動しやすいため、MRIを併用し、肝臓の状態を見ながら放射線治療ができると、がんの局所再発や放射線による肝傷害（副作用）のリスクを低減できる。本研究では、患者さんに投与できる酸化鉄製剤を利用して、肝がんとその周囲で放射線が当たった部分が見えるMRI技術を考案した。細胞を使った実験によって、放射線が当たった部分が見える機構を明らかにし、動物実験によって、本当に生体内で肝がんとその周囲で放射線が当たった部分が見えるか、確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線照射によって、本来細胞が持つ、酸化鉄を分解し排泄する機能に異常が生じることを初めて明らかにし、その分解や排泄の速度を調べる手法を考案した点で学術的な意義が大きい。肝がんの放射線治療成績の向上につながる知見が得られた点は、将来の患者利益につながる。また、酸化鉄製剤の新しい使用法を見出した点で、将来、関連領域の創薬につながる可能性もあり、社会的にも意義がある研究と考えられる。

研究成果の概要（英文）：We invented an MRI technique that can clearly visualize liver cancers and surrounding liver tissues in the early period after radiotherapy had started. We utilized clinically-approved iron oxide-based contrast media. This technique may reduce the risk of local recurrence of cancer lesions as well as the risk of radiation-induced liver damage when using with image-guided radiotherapy. In this project, we investigated the mechanism of the visualization from cell-biological point-of-view and also performed preclinical experiments using an ultra-high field MRI system to show the feasibility of the technique in vivo.

研究分野：MRI診断技術の開発

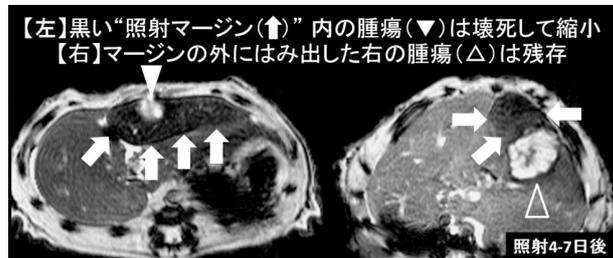
キーワード：核磁気共鳴画像（MRI） 肝がん 放射線治療 画像診断 造影剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界で年間 700 万人を超える肝がん患者が死亡する。肝がん根治を目指した医療技術開発の結果、SBRT (stereotactic body radiotherapy) や粒子線治療では、病変に高線量を集中できるようになり、手術より低侵襲で、効果的な治療法として期待されている。肝臓のように動く臓器では、インビボ画像を使い、計画照射部位と実際の照射部位のずれを描出できれば、局所再発リスクの評価に役立つ。また、放射線による肝組織の傷害を定量化できれば、肝不全発症の予測にも役立つ。

私達は、このような画像技術の開発を通して肝がん放射線治療の最適化に貢献したいと考え、前臨床研究に取り組む中で^{引用文献 1-4}、照射前に肝特異性造影剤 (超常磁性酸化鉄; superparamagnetic iron oxide, 以下 SPIO) を投与し、マクロファージ (肝臓では Kupffer 細胞、以下 KC) を SPIO でラベルした状態で、肝臓に対し高線量の放射線照射を行うと、4 から 7 日後、肝の照射部位 (照射肝組織) が描出されることを見出した。しかも、腫瘍が高信号、照射肝組織が低信号、非照射肝組織がやや低い信号となり、低信号域 (照射マージン) に取り囲まれた腫瘍は壊死、縮小し、治療効果予測が可能であった (図)^{2,3}。マクロファージに集積した SPIO は、翌日には鉄イオンに還元され始め、約 7 日間かけて徐々に細胞外へ排泄され、これに伴い肝の信号は回復する。照射肝組織では KC の鉄排泄が障害され、信号回復が遅れる可能性が高い。私達の方法は、SPIO 由来の鉄排泄の差をコントラスト源として利用し、照射肝組織と非照射肝組織を鑑別する新規画像法であり、高線量放射線治療後の肝がんに対する経過観察に有益と期待される。照射後に SPIO や Gd-EOB-DTPA を投与する従来法では、照射肝組織の血流変化のため腫瘍とのコントラストが付きにくく、照射マージンの描出に適さない。



2. 研究の目的

本法の実用化に向け、放射線照射後にマクロファージの鉄排泄が障害される機構を明らかにすること、及び、低線量照射においても早期から照射マージンを描出できるか検討することを目的とした。

3. 研究の方法

In vitro 実験

マクロファージ細胞 (J774A.1; 倍加時間、17 時間) を $10 \mu\text{g}$ 鉄/mL の濃度で、16 時間 SPIO 標識した (標識率、ほぼ 100%)。低エネルギー X 線装置を用いて 0、2、または 10 Gy の線量で標識細胞に X 線照射を行った。予備実験では、2 Gy では 3 日間、10 Gy では 7 日以上、細胞増殖阻害が確認された。3 日目に、照射した標識細胞を採取し、ホルマリン固定し、1% アガロースゲルに懸濁し、 2×10^6 cells/mL の濃度の細胞ファントムを調製した。3 テスラの MRI 装置を使用して、マルチグラジエントエコー画像と高速スピネコー画像を撮影し、各細胞ファントムの R_2^* と R_2 (緩和率) を測定後、SPIO の細胞内濃度の代理指標として R_2^* と R_2 の差を計算した (R_2')。放射線量に対する R_2' の差を Tukey 検定を使い比較した。また、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を用いて、照射細胞中の鉄含有量を測定した。さらに、プルシアンブルー染色を用いて細胞内鉄分布を評価した。

In vivo 実験

N1-S1 肝細胞癌細胞を 5 匹の雌 Sprague-Dawley ラットの左肝葉に移植した。腫瘍が生着した 1 週間後、 $20 \mu\text{mol}$ 鉄/kg 体重の SPIO を投与し、9.4 テスラ超高磁場 MRI 装置を用いて、肝臓の呼吸同期 T_2^* 強調 MRI および T_2 強調 MRI を撮影した。腫瘍は MRI 上高信号を呈し、楕円体公式を用いて腫瘍体積を推定可能であった。その 4 時間後、腫瘍のある肝左葉のみに 30 Gy の放射線を単回照射した。予備実験において、N1-S1 肝細胞癌細胞は、他の実験腫瘍細胞株よりも放射線抵抗性であり、十分な腫瘍増殖抑制を得るために、30 Gy が必要と判明した。なお、30 Gy 単回照射は、ヒト肝がんの SBRT における生物学的有効線量とほぼ同等と試算された。

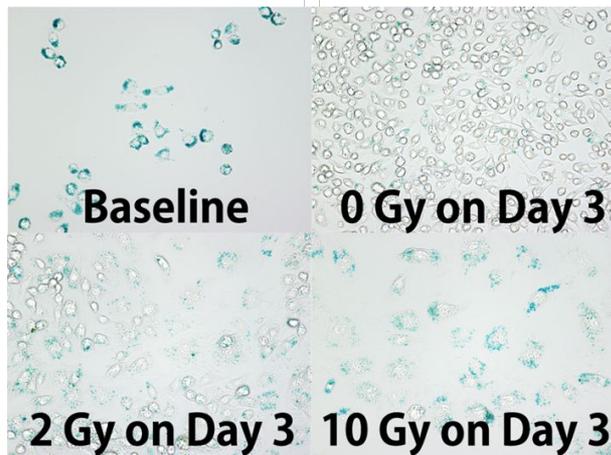
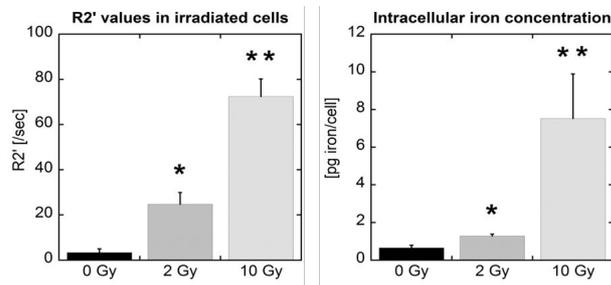
7 日目に、我々は追加の SPIO なしで肝臓に対して同じ MRI 撮影を実施した。この際、マルチグラジエントエコーシーケンスを用いて肝臓の T_2^* 緩和時間を計測した。放射線を照射された肝左葉、対照の肝右葉、肝細胞癌の信号強度を、傍脊椎筋の信号強度で除し、相対的な信号値を計算した。Tukey 検定を使用して、0 日目と 7 日目の肝左葉、右葉の相対的信号値を比較した。また、7 日目の肝左葉、右葉の T_2^* 緩和時間の差を比較した。

4. 研究成果

In vitro 実験の結果、放射線照射によってマクロファージのライソゾームにおける SPIO の分解が遅延し、排泄が遅れることが、初めて細胞生物学的に明らかとなった。このメカニズムは、ライソゾームの酸性度の低下による酸化鉄の化学的分解の遅延では説明が難しく、さらなる研究が必要と考えられた。また、*in vivo* 実験の結果から、SPIO の分解及び排泄遅延現象を臨床応用して、肝臓の放射線照射領域を MRI で可視化し、治療効果の早期予測や放射線肝傷害の早期発見につながると期待される。研究成果は、国内外の研究者に評価され、その結果、国内外の学会において発表の機会を得た。また、査読のある海外専門誌（ランキングによれば当該領域 22 位、上位 25% 以内）においてに掲載が決定し、比較的高いインパクトがあると判断される。

以下、具体的な成果を要約する。

In vitro 実験において、 R_2' 値は 0、2、10 Gy で 3 ± 2 、 24 ± 5 、 72 ± 5 [1/sec] であった(平均値 \pm 標準偏差、 $n = 6$ 、 $P < 0.001$ 、図)。細胞内鉄濃度はそれぞれ、 0.65 ± 0.13 、 1.28 ± 0.00 、および 7.52 ± 2.36 [pg iron / cell] であった($n = 3-6$ 、 $P < 0.001$)。プルシアンブルー染色により、照射細胞は非照射細胞よりも多数の細胞内鉄粒子を含有すると判明した(図)。別の実験において、放射線照射後 3 日までの R_2' 値減少率を観測し、SPIO の分解速度を試算すると、放射線照射により、分解速度が約 40%、正常と比較して低下していた。また、放射線照射によって、マクロファージのライソゾームにおける酸性度の低下は観測されなかった。比較的強い酸性環境下では、SPIO の化学的な分解が進行することが知られているが、この観測結果より、ライソゾームにおける酸性度が低下し、SPIO の分解遅延が生じた可能性は低いと考えられた。



次に、*in vivo* 実験において、放射線照射前の腫瘍容積は、 $166 \pm 27 \text{ mm}^3$ (平均 \pm 標準誤差、 $n = 5$)であった。SPIO 投与後の T_2^* 強調及び T_2 強調 MRI において、肝左葉と右葉の相対的信号値は同等であった。30 Gy 照射後 7 日には、腫瘍は全例で消失した。 T_2^* 強調 MRI において、放射線が照射された肝左葉は低信号領域として検出され、その信号値は、右葉と比較して 50% 以上低下した (0.23 ± 0.03 vs 0.52 ± 0.03 , $p < 0.001$)。 T_2^* 緩和時間は、肝左葉では右葉の約 35% まで短縮した ($3.2 \pm 0.34 \text{ ms}$ vs $9.1 \pm 0.17 \text{ ms}$, $p < 0.05$)。 **SPIO 造影 MRI によって、肝の放射線照射領域(照射マージン)が可視化された。先行研究では、臨床応用の極めて難しい高線量照射においてのみ可視化に成功したのに対し、本研究では、臨床使用と同等の生物学的有効線量によって、同様の可視化に成功した点が特筆すべきである。** SPIO は臨床利用が可能な造影剤である点を併せて考えると、肝臓の放射線照射領域の可視化は、十分に臨床応用可能な技術と考えられる。 **上述の *in vitro* 実験結果と併せて考えると放射線照射領域が低信号化する機構は、肝臓のマクロファージ細胞(KC)において、照射前にライソゾームに蓄積された SPIO を分解する能力低下に関連すると考えられた。** MRI 上、 T_2^* 強調画像で強い低信号が生じ、 T_2^* 緩和時間が短

縮していることから、SPIO の粒子が、1 週間、肝臓の放射線照射領域に存在し続けることが示唆された。正常では、1 週間のうちに SPIO は鉄イオンに分解され、超常磁性を失うため、 T_2^* 強調画像の信号は回復し、 T_2^* 緩和時間は延長する。本研究のサンプルを病理学的に解析し、放射線照射領域のみで、豊富な鉄を含むマクロファージ細胞の存在が多数確認された。

< 引用文献 >

1. Nagai M, Yamaguchi M, Mori K, Furuta T, Ashino H, Kurosawa H, Kasahara H, Minami M, Fujii H. Magnetic resonance-based visualization of thermal ablative margins around hepatic tumors by means of systemic ferucarbotran administration before radiofrequency ablation: animal study to reveal the connection between excess iron deposition and T_2^* -weighted hypointensity in ablative margins. **Invest Radiol** 2015; 50: 376-383. 査読あり
2. 吉田寿宏、山口雅之、南 学、大友 邦、藤井博史 SPIO 造影 MRI の新たな応用に向けて：肝腫瘍に対する放射線治療の安全マージン描出を目指した基礎検討 日本磁気共鳴医学会雑誌 2015;35(Suppl.): 332 日本磁気共鳴医学会学術奨励賞受賞
3. Furuta T, Yamaguchi M, Nakagami R, Akahane M, Minami M, Ohtomo K, Fujii H. Delayed hepatic signal recovery on ferucarbotran-enhanced magnetic resonance images in a rat model with regional liver irradiation. **Magn Reson Mater Phy** 2014; 27:501-508 査読あり
4. Furuta T, Yamaguchi M, Nakagami R, Akahane M, Minami M, Ohtomo K, Moriyama N, Fujii H. Delayed hepatic signal recovery on ferucarbotran-enhanced magnetic resonance images: an experimental study in rat livers with gadolinium chloride-induced Kupffer cell damage. **Magn Reson Mater Phy** 2013; 26: 313-324.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Masayuki Yamaguchi, Kazunobu Ohnuki, Kenji Hotta, Hirofumi Fujii. MR Signal Changes in Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle-Labeled Macrophages in Response to X-Irradiation. **NMR in Biomedicine** 2019 (in press)

Masayuki Yamaguchi, Kazunobu Ohnuki, Kenji Hotta, Hirofumi Fujii. MR Visualization of Macrophages' Damage in Response to X-Irradiation by Detecting Intracellular SPIO Deposition. **Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.** 2019;27:4651

Toshihiro Furuta, Masayuki Yamaguchi, Manabu Minami, Osamu Abe, Hirofumi Fujii. A new technique of SPIO-enhanced MRI: delayed recovery of T_2^* -weighted signal intensity as a novel diagnostic marker for visualization of irradiated liver parenchyma. **Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.** 2017;25:2054

〔学会発表〕(計6件)

Masayuki Yamaguchi, Kazunobu Ohnuki, Kenji Hotta, Hirofumi Fujii. MR Visualization of Macrophages' Damage in Response to X-Irradiation by Detecting Intracellular SPIO Deposition ISMRM 27th Annual Meeting & Exhibition 2019年5月11日~2019年5月16日 Montreal, QC, Canada

Masayuki Yamaguchi, Kazunobu Ohnuki, Kenji Hotta, Hirofumi Fujii. A Novel MRI Technique for the Visualization of Macrophage's Response to X-irradiation. 第78回日本医学放射線学会総会 2019年4月11日~2019年4月14日 神奈川県横浜市

山口雅之 SPIONs 標識マクロファージの X 線照射に対する反応と MRI 信号変化 第22回 NMR マイクロイメージング研究会 2018年8月20日~2018年8月21日 宮城県仙台市

Toshihiro Furuta, Masayuki Yamaguchi, Manabu Minami, Osamu Abe, Hirofumi Fujii. Visualization of irradiated liver parenchyma by observing delayed signal recovery on SPIO-enhanced MRI: an experimental study in a rat hepatoma model. 第45回日本磁気共鳴医学会大会 2017年9月14日~2017年9月16日 栃木県宇都宮市

古田寿宏、山口雅之、南 学、阿部修、藤井博史 新たなクッパー細胞 MR イメージング手法による放射線肝障害領域の描出:ラット肝腫瘍モデルによる実験的検討 第12回日本分子イメージング学会 2017年5月25日~2017年5月26日 神奈川県横浜市

Toshihiro Furuta, Masayuki Yamaguchi, Manabu Minami, Osamu Abe, Hirofumi Fujii. A new technique of SPIO-enhanced MRI: delayed recovery of T2*-weighted signal intensity as a novel diagnostic marker for visualization of irradiated liver parenchyma. ISMRM 25th Annual Meeting & Exhibition 2017年4月22日~2017年4月27日 Honolulu, HI, USA

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

https://www.ncc.go.jp/jp/epoc/division/functional_imaging/kashiwa/index.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 古田寿宏

ローマ字氏名: Toshihiro Furuta

研究協力者氏名: 大貫和信

ローマ字氏名: Kazunobu Ohnuki