

令和 2 年 6 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10354

研究課題名(和文)肺ラジオ波焼灼術効果判定におけるトリプトファン代謝物質の有効性に関する基礎研究

研究課題名(英文) Basic researches about the efficacy of a tryptophan metabolite in the pulmonary radiofrequency ablation effect measurement

研究代表者

中田 博(Nakada, Hiroshi)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：00363599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺腫瘍に対するラジオ波焼灼療法においては、焼灼後の辺縁部に炎症性変化や出血が混在するため、画像による治療効果判定の難しさが指摘されている。我々は、抗炎症剤(トラニラスト)投与の併用が上記の問題を解決策になるのではないかと仮定し、家兎肺を用いた動物実験を実施した。トラニラスト投与群とプラセボ投与群に分け、免疫組織学的な比較を行った。

トラニラストの薬理作用として線維化抑制、血管透過性・血管新生の抑制効果が知られている。免疫染色の評価では、統計的有意差は無いものの血管内皮増殖因子と腫瘍免疫抑制性サイトカインの産生はトラニラスト群で抑制される傾向が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺腫瘍に対するラジオ波焼灼術の治療法に関しては多くの研究報告がなされているが、本研究のような効果判定に関連した研究報告は少ない。また、通常術後に肺組織を摘出することが困難な患者が治療対象となるため、焼灼後の組織学的所見を詳細に検討した報告も少なく、動物実験を用いた本研究がその代替となり得る。本研究の結果、抗炎症薬が焼灼域周囲の過剰な二次性炎症や出血を抑制する傾向が認められ、治療効果判定の妨げとなるCT検査での高吸収域を早期に縮小させる効果が期待される。これは腫瘍再発の早期発見に寄与し、迅速な追加焼灼術が可能となる点に意義がある。

研究成果の概要(英文)：It has been identified that in radiofrequency ablation therapy for lung tumors, inflammatory changes and hemorrhage are intermingled in the marginal zone after ablation, which makes it difficult to determine the therapeutic effect. We hypothesized that the combined use of anti-inflammatory drug (tranilast) administration would solve the above problems, and conducted animal experiments using rabbit lungs. Immunohistological study was performed by dividing into the tranilast administration group and the placebo administration group.

As the pharmacological action of tranilast, fibrosis-suppressing effect and vascular permeability / angiogenesis-suppressing effect are known.

In the evaluation of immunostaining, although there was no significant difference, vascular endothelial growth factor and tumor immunosuppressive cytokine production tended to be suppressed in the tranilast group.

研究分野：内科系臨床医学放射線科学

キーワード：肺腫瘍 ラジオ波治療 家兎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肺の悪性腫瘍は増加の一途をたどり種々の治療法が試みられているが、必ずしも満足する成績は得られていない。特に低肺機能の患者に関しては、手術療法や放射線療法の適応外とされることも多く、より低侵襲な治療法の確立が求められている。そこで近年、肺悪性腫瘍に対する経皮的ラジオ波焼灼術の応用が注目されている。

肺ラジオ波焼灼術においては、セーフティ・マージンを確保する目的で周囲正常肺実質を含めた焼灼を行うため、焼灼域の凝固壊死周囲には炎症性変化やうっ血性変化(うっ血帯)が混在する。このため、術直後のCT検査では実際の腫瘍よりも拡大した高吸収域が出現する。この高吸収域は緩徐に縮小し長期間残存するため、長期経過観察によるサイズ変化で根治性を判断せざるを得ない場合が多く、腫瘍再発検出の難しさが指摘されている( )。従って、今後肺ラジオ波焼灼術が普及していくためには、治療効果判定の精度を向上させることが不可欠である。

## 2. 研究の目的

我々は、肺ラジオ波焼灼術に抗炎症剤投与を併用することで上記の問題を解決できるのではないかと仮定し、抗炎症薬の効果を実証するための動物実験を企画した。本研究の結果、抗炎症薬が焼灼域周囲の過剰な二次性炎症やうっ血を抑制することが証明されれば、腫瘍再発の早期発見に繋がり、迅速な追加焼灼術を可能とする点で大きな意義がある。

本研究に使用する抗炎症剤は、気管支喘息などのアレルギー疾患や皮膚ケロイド症に対し臨床でも使用されているトラニラストを選択した。トラニラストの薬理作用として、サイトカインやケミカルメディエーターの放出を阻害することで炎症や過度の免疫反応を抑制する。また、血管内皮増殖因子(VEGF)産生抑制による血管透過性・血管新生抑制作用を有する( )。更にサイトカインの一種であるトランスフォーミング増殖因子-1(TGF-1)の産生を抑制し、線維芽細胞増生、コラーゲン合成を抑制する作用も知られている( )。我々はこれまでの研究にて、画像や病理組織での急性期における経時的なサイズ測定にて、過剰な二次性炎症や血管新生を抑制するトラニラストの効果について報告している( )。今回は、トラニラストの投与によりVEGF、TGF- $\beta$ 1の産生がラジオ波焼灼後の肺組織内で実際に抑制されているのを証明するため、免疫組織学的な評価を行った。一方で悪性腫瘍の治療における抗炎症薬投与は、腫瘍免疫を抑制しラジオ波焼灼術の抗腫瘍効果を減弱させる悪影響も危惧される。そこで腫瘍免疫抑制性サイトカインの一種であるIL-10発現の程度を調査し、肺ラジオ波焼灼術における抗炎症薬併用療法の安全性についても評価した。

## 3. 研究の方法

家兎を用いた動物実験(当大学倫理委員会承認2005-064)により経皮的ラジオ波焼灼療法を施行した。

### (1)検体・材料

実験動物は家兎(日本白色種)20羽。ラジオ波発生装置RT2000(Boston Scientific)電極針LeVeen Needle(展開針数8本 展開針径20mm カニユレ径17G)を使用。家兎をトラニラスト投与群(n=10)と比較対照群(n=10)に分類し、各々の摘出時期を2週間、4週間(各n=5)に分ける。トラニラスト群には、焼灼前日よりトラニラスト(300mg・kg body wt<sup>-1</sup>・d<sup>-1</sup>)を屠殺日まで連日経口投与する。一方、比較対象群には、トラニラストと同量のプラセボを連日経口投与する。

## (2) 手技

全身麻酔、鎮痛薬を投与した家兎に対し X 線透視下にて電極針を肺内へ穿刺、10 mm 径で小展開する。大腿部に電極板を貼付。臨床例で施行しているプロトコルに従い、5W よりラジオ波の通電を開始し 1 分おきに 5W 出力を上げる。焼灼部位の水分が枯渇し、インピーダンスが急上昇する口 - ルオフに達した時点を焼灼完了の目安とする。術後 2 週目と 4 週目に安楽死させ、開胸にて焼灼した肺を摘出しホルマリン固定。HE 染色にて熱凝固壊死領域、辺縁の炎症領域（うっ血帯）の形成を確認した後、免疫組織染色（VEGF、TGF - B1、IL-10）を実施した。

## (3) 分析

拡大 200 倍率の顕微鏡下にて辺縁のうっ血帯からランダムに 5 視野を選択し、免疫染色の組織を撮影した。VEGF、TGF - B1、IL-10 陽性細胞領域の面積率を画像解析ソフト（Win ROOF, Mitani,co.）にて計測した。

## (4) 統計処理

各固体の免疫染色陽性領域の平均値を元に、トラニラスト投与群とコントロール（プラセボ投与）群の 2 週後、4 週後について統計的に 2 群間比較を行った。Mann-Whitney U test (GraphPad Prizm 5.01; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)にて p 値が 0.05 以下のとき、統計学的有意差があるものとした。

## 4 . 研究成果

(1)ラジオ波焼灼療法を施行した肺組織には、肉眼所見および HE 染色にて、中心部の凝固壊死と辺縁部のうっ血帯が確認された。このうっ血帯は、焼灼域の辺縁部にあり熱凝固が不完全なため、組織内血管の充血・出血、炎症、浮腫、線維化などの生体反応を生じている領域と考えられる。中心部は完全に熱凝固を生じた領域と考えられ、肉眼的には炭化した組織であった。

図 2 にトラニラスト連日投与群とコントロール（プラセボ投与）群との間にうっ血帯の範囲に肉眼的な相違がみられた例を提示する。トラニラスト連日投与では、焼灼域（\*）周囲の二次性炎症・うっ血（→）領域が抑制されている。

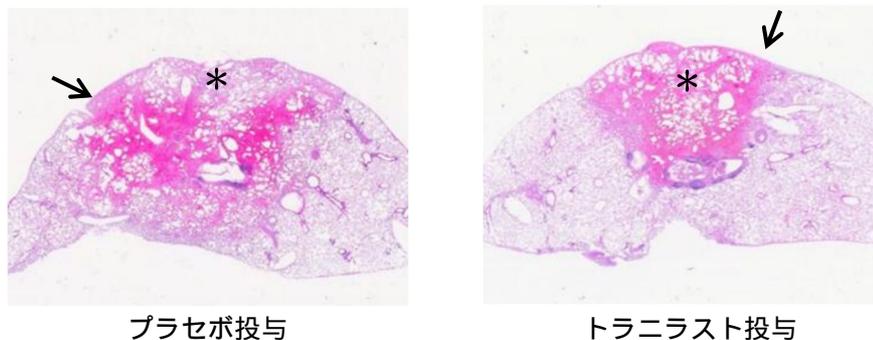


図 2 トラニラスト連日投与例とプラセボ連日投与例の病理組織像  
（ラジオ波焼灼術後 2 週目の家兎摘出肺 HE 染色ルーペ像）

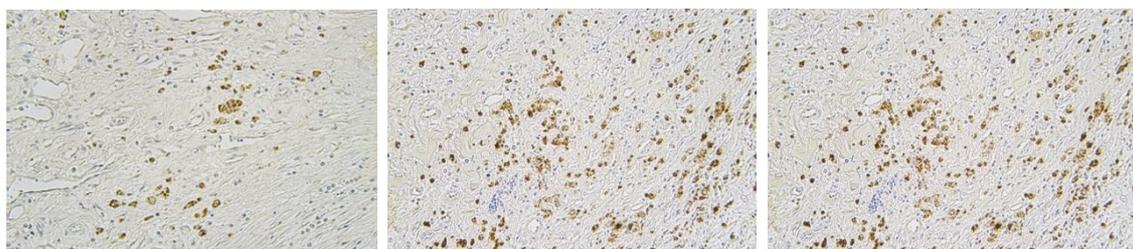


図 3 VEGF 染色（×200） TGF- 1 染色（×200） IL-10 染色（×200）

(2)VEGF 染色 (図 4) では、焼灼後 2 週目 (2W : P=0.0952) と 4 週目 (4W : P=0.6905) の組織に統計的有意差は見られなかった。ただトラニラスト群はコントロール群と比し、血管内皮増殖因子の産生が抑制される傾向にあった。トラニラスト投与にてラジオ波焼灼術後の血管透過性亢進・うっ血が抑制され、治療効果判定の妨げとなる辺縁域の X 線吸収高吸収域を過剰に拡大させない効果が期待される。また、臨床で応用できれば肺癌治療の際に腫瘍の栄養血管となる血管新生が抑制され、腫瘍再発率の低減にも寄与するものと推測される。

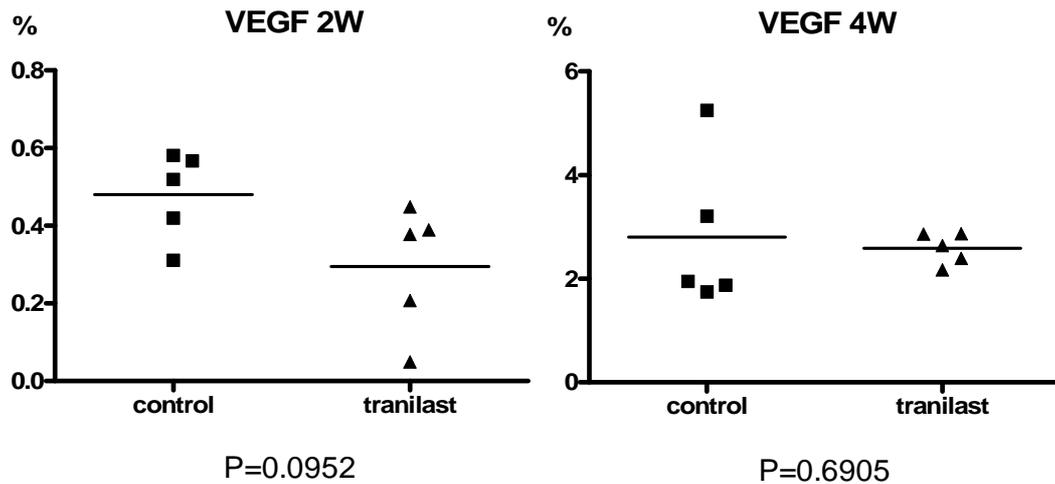


図 4 VEGF 染色 2 週目と 4 週目の陽性面積率の比較

(3)TGF -  $\beta$ 1 染色 (図 5) では、2 週目 (2W : P=0.8413) と 4 週目 (4W : P=1.0000) いずれも両群間に有意差は認められなかった。2 週目ではむしろトラニラスト群が高値を示した。TGF -  $\beta$ 1 は、細胞の分化・遊走・接着にも密接に関与し、個体発生や組織再構築、創傷治癒、炎症・免疫、癌の浸潤・転移などの幅広い領域に重要な役割を担っている。また、腫瘍免疫に対し抑制的に働く制御性 T 細胞 (Treg) の組織浸潤に関与するサイトカインの一種であることが知られている ( )。トラニラストの TGF -  $\beta$ 1 産生抑制作用により、治療効果判定の妨げとなる辺縁域の肉芽形成と腫瘍免疫制御性 T 細胞 (Treg) の浸潤が抑制される効果を期待しているが、今回の実験ではラジオ波焼灼術後の TGF -  $\beta$ 1 産生抑制を実証できなかった。動物愛護の観点から使用検体数を少なくした点とラジオ波焼灼術の手技の個体差が影響した可能性がある。

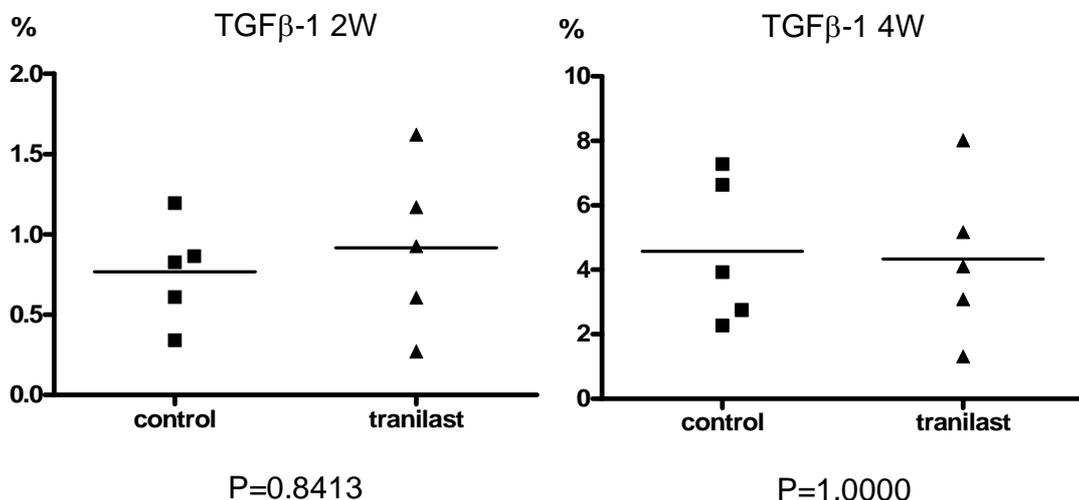


図 5 TGF-  $\beta$ 1 染色 2 週目と 4 週目の陽性面積率の比較

(4)IL-10 染色( 図 6 )では、統計学的有意差は見られないものの焼灼後 2 週目( 2W : P=0.6905 )と 4 週目( 4W : P=0.2222 )の組織にて、トラニラスト群がコントロール群に比し IL-10 の産生が抑制される傾向にあった。IL-10 は、TGF -  $\beta$ 1 と同様に腫瘍免疫に対し抑制的に働く制御性 T 細胞 ( Treg ) の組織浸潤に関与するサイトカインの一種であることが知られている ( )。今回の実験を計画するにあたりトラニラスト投与がラジオ波焼灼術後の腫瘍免疫に対し抑制的に働き、逆に治療効果を妨げてしまうことを危惧していたが、コントロール群に対し非劣勢を示す実験結果が得られた。むしろ腫瘍免疫抑制性サイトカインの放出が抑制される傾向にあり、トラニラストの腫瘍免疫機能への影響は、臨床応用に向けて問題にならない可能性が示唆された。

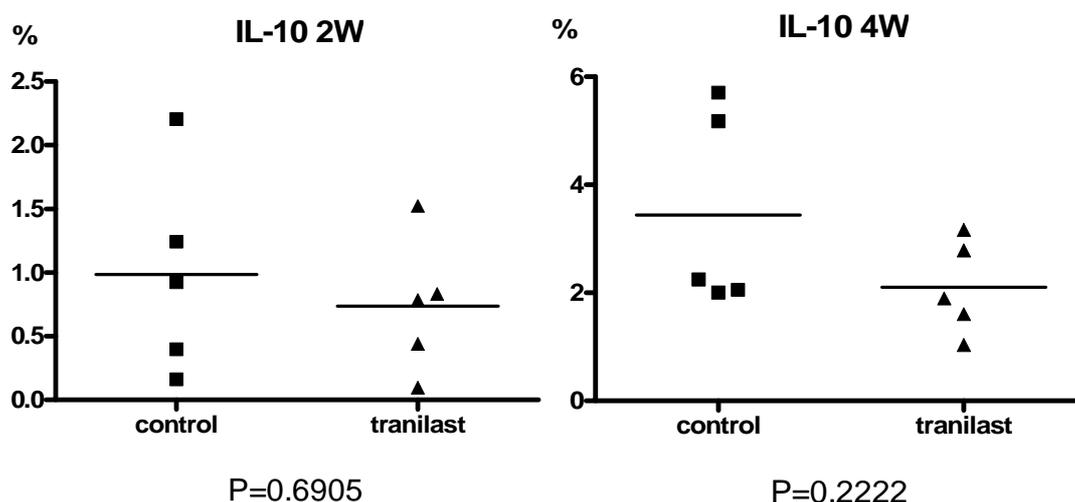


図 6 IL-10 染色 2 週目と 4 週目の陽性面積率の比較

まとめ：肺ラジオ波焼灼術におけるトラニラスト内服併用療法は、焼灼後の血管透過性亢進や、血管新生を抑制し、治療効果判定の妨げとなる焼灼後の辺縁域(うっ血帯)の増生を抑制しうる可能性を示す結果を得た。

#### < 引用文献 >

Nakada H, Yamashita A, A synthetic tryptophan metabolite reduces hemorrhagic area and inflammation after pulmonary radiofrequency ablation in rabbit nonneoplastic lungs, Japanese journal of radiology, 32(3):145-154, 2014

Isaji M, Miyata H, Ajisawa Y, Takehana Y, Yoshimura N, Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo, Br J Pharmacol, 122:1061-6, 1997

Isaji M, Nakajoh M, Naito J. Selective inhibition of collagen accumulation by N-(3,4-dimethoxycinnamoyl)anthranilic acid (N-50) in granulation tissue, Biochem Pharmacol, 36:469-74, 1987

高木治行、今井奈緒子、山門亨一郎、アブレーション治療と腫瘍免疫、映像情報 Medical、46(11): 934-939, 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----