様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ７ 月　 １ 日現在

機関番号：２４６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１０４５０

研究課題名（和文）ナノドラッグデリバリーシステムと分子イメージングを融合させた新規IVR治療の開発

研究課題名（英文）Development of new IVR treatment using nanotechnology combined with molecular imaging

研究代表者

西尾福　英之（NISHIOFUKU, HIDEYUKI）

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：８０４５８０４１

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）：１）小動物の血管解剖の検討：肝動脈の径と体重とに相関関係があること、腫瘍移植をする際は、肝の左葉に実施することが望ましいことを報告した。２）Mass spectrometryを用いた画像評価：Microsphereの肝内への分布をMSを用いて、腫瘍内の分布を評価した。大きなsizeを用いた場合は3日後に、小さなsizeを用いた場合は、7日後に抗がん剤濃度が高くなることを示した。３）肝腫瘍において虚血による腫瘍結節、腫瘍周囲の正常肝実質への組織学的、免疫学的影響の評価：治療後14日目に腫瘍結節におけるTh17細胞の有意な増殖がコントロール群と比較して確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究は、IVR技術を用いて肝腫瘍への新規治療法を開発することである。これまでの研究でナノ粒子が腫瘍に選択的に効果発現をすることを報告してきたが、今回はmicrosphereを用いた場合の組織学的、画像的評価を行った。抗がん剤の分布をイメージング化し、さらに免疫学的、組織学的変化について検討した。今後ナノ粒子の研究と融合させていくことで新規治療法の開発につなげていく基盤の構築に繋がった。

研究成果の概要（英文）：The aim is to determine the tumor immune cell landscape after transcatheter arterial bland embolization in a clinically relevant rat HCC model.Results: TAE induces increased infiltration of Th17 cells in liver tumors when compared with controls 14 d after treatment ($p = 0.02$). A similar pattern was observed in the spleen ($p < 0.001$), indicating both local and systemic effect. Conclusion: Transcatheter hepatic arterial bland embolization induces local and systemic increased infiltration of Th17 cells and expression of their signature cytokine IL-17. In a simulated post-embolization environment, IL-17 significantly reduced McA-RH7777 cell migration.

研究分野：Interventional radiology

キーワード：Interventional radiology　ナノテクノロジー　塞栓術

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

Interventional Radiology(IVR)治療は、最先端の画像技術を用い高精度に施行できる低侵襲な局所治療である。特にがん診療においては、本邦で急速に進む高齢化や抗がん剤を含めた医療費の高額化に対して、低侵襲で、かつ医療資源の効率化を高める新たながん治療法の開発が急務と考え られ、IVR 治療は大きく期待されている。また、悪性腫瘍の再発・増悪・転移の要因の一つと考えられている低酸素微小環境(hypoxia)は、腫瘍の基本的な環境でありその分子機構の解明が、がん治療の研究を急速に進展させると考えられている。

２．研究の目的

これまでの研究で獲得してきた分子イメージング、ナノ DDS、IVR 治療の各技術を融 合させることで、それぞれの欠点を補い三位一体となって、ナノ DDS の体内動態における解明を進めると共に、治療効果早期診断、さらに新規 IVR 治療を開発することが目的である。

３．研究の方法

１）ラット肝細胞癌モデルの作成：肝細胞がん N1S1 株細胞を培養し、がん細胞を Sprague-Dawley(SD)ラットの肝臓に移植する（1x10*7/200μL)。腫瘍作成の確認を１週間後に開腹下あるいは超音波で確認する。腫瘍が約 10㎜ 程度の成長することを確認した時点で腫瘍モデル作成の完成とした。２）Microsphere のサイズによる肝腫瘍、肝実質への影響：我々が確立した小動物に対する IVR 技術を用いて、肝腫瘍に対して超選択的に血管塞栓術を実施した。塞栓剤として 40-60μm と 70-150μm の２種類の大きさの microsphere を用いて実施し、その腫瘍内、肝実質内における分布を確認した。40-60μm 群においては、70-150μm 群と比べて有意に腫瘍内に分布していることが確認できた。腫瘍壊死についても 40-60μm 群に置いて高いことが確認できた。一方、40-60μm 群においては肝実質への障害（壊死性変化）を認めたことから安全性への注意が必要と考えられた。３）小動物の血管解剖の検討：小動物への IVR 技術を有効に実施するために、これまで実施してきた IVR 手技と小動物の肝臓の血管解剖について詳細に検討し、肝動脈の径と体重とに相関関係があること、腫瘍移植をする際は、肝の左葉に実施することが望ましいことを報告した。４）Mass spectrometry を用いた画像評価：Microsphere の肝内への分布と抗がん剤の分布について、mass spectrometry の画像技術を用いて、腫瘍内の分布、濃度を評価した。大きな microsphere を用いた場合、3 日後に抗がん剤濃度が高くなるが、小さな microsphere を用いた場合は、7 日後に抗がん剤濃度が高くなることが示された。５）肝腫瘍において虚血による腫瘍結節、腫瘍周囲の正常肝実質への組織学的、免疫学的影響の評価：血管塞栓術については、抗癌剤の影響を排除するため、塞栓剤のみで行った。摘出標本は、腫瘍細胞、腫瘍の辺縁の細胞、正常肝細胞を採取して検討した。治療後 14 日目に腫瘍結節におけるヘルパーT 細胞の一つである Th17 細胞の有意な増殖がコントロール群と比較して確認された。また同時にサイトカイン IL-17 の発現も確認された。

４．研究成果

Title: Influence of bead size on doxorubicin concentration and distribution after transarterial chemoembolization by Matrix-assisted laser desorption/ionization- mass spectrometry in a rat orthotopic model of hepatocellular carcinoma

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the effect of bead size on spatial distribution and relative concentration of doxorubicin in liver tumors after transarterial chemoembolization (TACE) with doxorubicin- eluting beads in a rat orthotopic model of hepatocellular carcinoma.

Methods: Tumor-bearing Sprague-Dawley rats were randomly chosen to be euthanized at three or seven days after TACE with doxorubicin-eluting beads of either 40-60 or 70-150 μm in diameter, using a fixed total bead dose of 4x104 microspheres. Fresh tumor tissues accompanied by surrounding normal liver parenchyma were sectioned along the axial plane. The middle section of the tumors was snap-frozen, and serial sections were prepared. One section was processed for Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI/MS) analysis, and an adjacent section was processed for Hematoxylin and Eosin staining. Data acquisition, and image processing was performed using high definition imaging (HDI) and Waters MassLynx platforms. Mass peak intensities signals were calculated from color intensity maps by drawing regions of interest (ROI) over areas with a positive signal. Complete mass spectrometry profiles within the ROIs were exported and further analyzed using Progenesis QI software. Relative doxorubicin concentration was expressed as abundance or area under the peak. Statistical significance was analyzed using two-sided t-test. GraphPad Prism7 was used for statistical analysis.

Results: Abundance of doxorubicin in liver samples was significantly higher in animals

treated with 70-150 μm drug-eluting beads 3 days after chemoembolization with mean abundance of 8.6 ± 0.6, when compared with 7.9 ±0.36 detected in the 40-60 μm bead group; P=0.005. A different pattern was observed 7 days after treatment, where animals treated with 40-60 μm beads showed a relative higher mean abundance of 8.1 ± 0.8, compared to 7 ±1.3 in the group treated with 70-150 μm beads; P=0.05. Thus, a significant decrease in doxorubicin abundance was observed in the group of animals treated with 70-150 μm 7 days after treatment; p=0.02. Abundance remained relatively stable in the 40-60 μm bead group throughout the 7 days. Spatially, our results demonstrated that doxorubicin reached the tumor more frequently in the group of animals treated with doxorubicin-drug eluting beads of 40-60 μm compared with frequency of peak signals observed in normal parenchyma regions. In contrast, doxorubicin in the 70-150 μm group was found preferentially within the peritumoral area and normal parenchyma regions.
Conclusion: Transarterial chemoembolization with 40-60 μm drug-eluting beads more efficiently delivered doxorubicin to the tumor bed, while retaining higher concentrations at 7 days after treatment. Meanwhile, doxorubicin concentration was initially significantly higher in animals treated with 70-150 μm drug-eluting beads 3 days after chemoembolization, but rapidly decreased over time. To the best of our knowledge, the present research explores for the first time the spatial distribution of doxorubicin using Matrix-assisted laser desorption/ionization - mass spectrometry.

Title; Hepatic Arterial Bland Embolization Increases Th17 Cell Infiltration in a Syngeneic Rat Model of Hepatocellular Carcinoma.

Purpose: To determine the tumor immune cell landscape after transcatheter arterial bland embolization (TAE) in a clinically relevant rat hepatocellular carcinoma (HCC) model.Materials and methods: Buffalo rats (n = 21) bearing syngeneic McArdle RH-7777 rat hepatoma cells implanted into the left hepatic lobe underwent TAE using 70-150 μm beads (n = 9) or hepatic artery saline infusion (n = 12). HCC nodules, peritumoral margin, adjacent non-cancerous liver, and splenic parenchyma were collected and disaggregated to generate single-cell suspensions for immunological characterization 14 d after treatment. Changes in tumor-infiltrating immune subsets including CD4 T cells (Th17 and Treg), CD8 cytotoxic T cells (IFNγ), and neutrophils were evaluated by multiparameter flow cytometry. Migration and colony formation assays were performed to examine the effect of IL-17, a signature cytokine of Th17 cells, on McArdle RH-7777 hepatoma cells under conditions simulating post-embolization environment (i.e., hypoxia and nutrient privation). Statistical significance was determined by the Student unpaired t test or one-way ANOVA.Results: TAE induces increased infiltration of Th17 cells in liver tumors when compared with controls 14 d after treatment (0.29 ± 0.01 vs. 0.19 ± 0.02; p = 0.02). A similar pattern was observed in the spleen (1.41 ± 0.13 vs. 0.57 ± 0.08; p < 0.001), indicating both local and systemic effect. No significant differences in the percentage of FoxP3 + Tregs, IFNγ-producing CD4 T cells, and CD8 T cells were observed between groups (p > 0.05). In vitro post-embolization assays demonstrated that IL-17 reduces McA-RH7777 cell migration at 24-48 h (p = 0.003 and p = 0.002, respectively).Conclusion: Transcatheter hepatic arterial bland embolization induces local and systemic increased infiltration of Th17 cells and expression of their signature cytokine IL-17. In a simulated post-embolization environment, IL-17 significantly reduced McA-RH7777 cell migration.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　2件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Hideyuki Nishiofuku	４．巻 11
２．論文標題 Factors impacting technical success rate of image-guided intra-arterial therapy in rat orthotopic liver tumor model	５．発行年 2019年
３．雑誌名 American journal of Translational Research	６．最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

１．著者名 Hideyuki Nishiofuku	４．巻 In press
２．論文標題 Angiographic Atlas of the Visceral Vascular Anatomy in Translational Rat Models	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Journal of Vascular and Interventional Radiology	６．最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Hideyuki Nishiofuku
２．発表標題 Influence of bead size on doxorubicin concentration and distribution after transarterial chemoembolization by Matrix-assisted laser desorption/ionization- mass spectrometry in a rat orthotopic model of hepatocellular carcinoma
３．学会等名 Society of Interventional Oncology（国際学会）
４．発表年 2018年

１．発表者名 Hideyuki Nishiofuku
２．発表標題 Impact of intra-arterial therapy using micellar nanoparticles incorporating SN-38 in a rat colorectal liver metastasis model
３．学会等名 Society of Interventional Radiology（国際学会）
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良県立医科大学　放射線科
http://www.nara-radiology.com

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