

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16098

研究課題名（和文）過形成副甲状腺に対する臨床応用可能な光線力学的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of photodynamic therapy for hyperparathyroidism

研究代表者

都川 貴代（MIYAKOGAWA, Takayo）

東海大学・医学部・助教

研究者番号：50631842

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：慢性腎不全の進行過程で発症する二次性副甲状腺機能亢進症により過形成した副甲状腺に光線力学的治療法を適用することを目的として、モデル動物を用いた技法の開発を行った。5-アミノレブリン酸を投与した個体へ侵襲的/非侵襲的に光照射を行い、約半数の個体で副甲状腺ホルモンの低下を永続的に維持することを可能とした。さらに低カルシウム血症の抑制と照射後の副甲状腺での血管新生を抑制する技法の開発により治療効率が上昇し、臨床応用の可能性を高めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

年々増加する本邦約33万人の透析患者の腎不全の進行に伴う二次性副甲状腺機能亢進症の発症は、肥大化（過形成）した副甲状腺からの副甲状腺ホルモンの過剰分泌を原因とする骨代謝や心血管系の異常を引き起こし、患者の予後を甚だしく悪化させている。進行した過形成副甲状腺は通常、外科的に摘出されているが、患者の高齢化が進み、手術に耐える体力の無い患者も多くなってきており、非侵襲的な治療法の開発が望まれている。本研究は高齢低体力の患者の治療に有用と考えられている光線力学的治療法の過形成副甲状腺への適用を目指すものである。

研究成果の概要（英文）：The potential application of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy (PDT) for hyperparathyroidism (HPT) was examined in rats which were caused hyperplasia of the parathyroid glands by subtotally nephrectomy and phosphate-rich diet. After administration of a photosensitizer, 5-aminolevulinic acid, hyperplastic parathyroid glands of rats were irradiated by either of two types of light-emitting diode with different wavelength, 385 nm and 630 nm, under invasive and noninvasive conditions, respectively. Photodynamic therapy with nonlethal conditions which were repeated three times at one-week intervals injured the parathyroid glands drastically and decreased parathyroid hormone secretion into the blood. However, a half of the irradiated animals restored secretion of parathyroid hormone, and regenerated the parathyroid glands in eight weeks after the start of irradiation. Our results showed that PDT can be utilized for HPT.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：副甲状腺過形成 光線力学的治療

1. 研究開始当初の背景

二次性副甲状腺機能亢進症(SHPT)は慢性腎不全の過程で進行する、血中のカルシウムやリン、ビタミンDの濃度調整不良に反応した適応症として発症し、副甲状腺細胞の増殖と過形成、副甲状腺ホルモン(PTH)の過剰な産生と分泌を特徴とする。進行したSHPTは高カルシウム血症や高リン血症を促進させ、透析患者の予後に関わる異所性石灰化や血管硬化症を誘発する。SHPTに対する療法としてはカルシトリオールやカルシミメティクスの投薬が一般的に行われており、現在ではカルシウム検知受容体(CaSR)のアロステリック・モジュレーターであるシナカルセト塩酸塩によりSHPTの進行が抑えられるケースが多いが、薬剤に対する抵抗性の強い進行したSHPTに対しては副甲状腺摘出術(PTX)に至る場合もまだ多い。PTXは1923年にIsac Y Olchが初めて成功し、当院においても年間20例以上が行われている効果の高い治療法であるが、手術に際して腺の視認による特定が困難な場合が間々ある。特にPTXに至る以前にカルシトリオールやカルシミメティクスなどの投薬治療が長期間行われていた場合は、過形成副甲状腺の部分的な退縮により周辺組織への癒着や埋没の事例が多く、腺の境界が不明確になる場合も多い。また、通常PTXの際には、切除した副甲状腺組織の一部を患者の腕などに自家移植するが、この移植片が後に再び腫大してSHPTを再発した場合も、再手術に際して移植片の位置の特定が難しい場合がある。

近年、ヘム合成経路におけるポルフィリンの代謝前駆物質である5-アミノレブリン酸(5-ALA)をPTX術前に投与して過形成した副甲状腺を特異的に蛍光ラベルする手法が開発され、実際に術中診断に用いられた例がいくつか報告されている(Prosst RL, et al. Am J Kidney Dis. 48:327-31, 2006. Prosst RL, et al. Surg Endosc. 20:1488-92, 2006)。この手法は、腫瘍細胞で見られる代謝異常を利用した組織腫瘍部位の検出法として開発されたが、過形成副甲状腺においても同様に、5-ALAの代謝により腫瘍親和性光感受性物質であるプロトポルフィリン(Pp)の蓄積が起こる。この手法は腫瘍では悪性脳腫瘍、膀胱癌、口腔癌、腎細胞癌、腎尿管癌、前立腺癌、消化器癌などの光線力学的診断(PDD)や術中蛍光診断切除術に利用されている他、皮膚腫瘍性病変(日光角化症、Bowen病、Paget病など)やその他の皮膚疾患(疣贅、尋常性ざ瘡、脂腺増殖症)あるいは子宮頸部癌、悪性脳腫瘍等においては励起されたPpが産出する活性酸素による細胞傷害・細胞死を利用した光線力学的治療(PDT)に応用されており、非侵襲的な治療手法として、いろいろな組織・器官での診断や治療への応用が期待されている。副甲状腺過形成への応用としては、現在のところ上記のような術中診断への利用程度であるが、私たちはより積極的なPDD/PDT応用の可能性を探るため、副甲状腺過形成のモデル動物(ラット)を使って予備的な調査を行い、LED照射システムを用いた照射条件の検討から、過形成副甲状腺の光線力学的な診断と治療のための基本的な技法を模索した。

2. 研究の目的

本研究は、過形成副甲状腺に対する光線力学的な診断および治療を実現するために、モデル動物に副甲状腺過形成を誘導し、これに腫瘍親和性光感受性物質プロトポルフィリンを蓄積させて種々の条件下でLED光照射による副甲状腺細胞の細胞死誘導を試みることで、副甲状腺過形成の光線力学的な診断と治療のための基本的な技法を構築し、さらに将来的な臨床応用を可能とする技法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、モデル動物を用いた過形成副甲状腺の光線力学的治療法を構築し、これを改良して将来的な臨床応用を可能とする技法を開発する。これらは以下の工程を経て実施された。

(1) 副甲状腺過形成モデル動物(ラット)を用いた光線力学的治療法の構築

副甲状腺過形成モデル動物と照射システムの開発

副甲状腺に過形成を呈するモデル動物は、5週齢ラット(SD系、オス)を5/6腎摘し、これに1.2%高リン食餌をあたえて作製した。2から4週間後に血中副甲状腺ホルモン濃度を計測し、200pg/mlを越えるものを副甲状腺過形成として判定し、以下の実験に使用した。

光線力学的治療の光照射に先立つ3時間前にラットの腹腔内に3%5-アミノレブリン酸/生理的食塩水を適量注射して、その代謝物であるプロトポルフィリンを副甲状腺に蓄積させた。

光照射は波長385nmおよび630nmのLEDランプ(オプトコード社製 38mW/cm²)により実施した。

侵襲的照射条件と効果の判定

侵襲的照射はラットを麻酔下で頸部切開して副甲状腺を露出させ、これに直接385nm波長のLED光を照射した。照射後は傷を縫合して麻酔より回復させた。光線力学的治療の効果は経時的な血中副甲状腺ホルモンの測定により判定した。実験個体は適時、安楽死させて気管部位を回収し、光照射した副甲状腺の観察を行った。

非侵襲的照射条件と効果の判定

非侵襲的照射はラットを麻酔下で頸部を剃毛して、皮膚上から630nm波長のLED光を照射し

た。光線力学治療効果の判定は侵襲的照射と同様に行った。

(2) 臨床応用へ向けた技法の改良

低カルシウム血漿による死亡回避技法の開発

照射による副甲状腺機能低下症による低カルシウム血症を予防するため、照射直後と翌日に 40mg/kg 体重のカルチコール酸を静脈注射し、その効果を照射後 2 日目までの死亡率で判定した。

照射済み副甲状腺の再生防止技法の開発

照射後の副甲状腺の再生を防ぐために、血管新生阻害薬であるカプトプリルを 1mg/day/kg 体重で継続投与し、その効果を血中副甲状腺ホルモン濃度の継続的測定により判定した。実験個体は適時、安楽死させて気管部位を回収し、光照射した副甲状腺の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 副甲状腺過形成モデル動物（ラット）を用いた光線力学的治療法の構築

副甲状腺過形成モデル動物と照射システムの開発

施術した 79 個体の血中副甲状腺ホルモン（intact PTH）濃度は 206.5 - 3734.2 pg/ml の範囲で平均値は 1225.7 pg/ml であった。腎摘を施していない Sham 個体の血中副甲状腺ホルモン濃度は 34.8 - 118.3 pg/ml の範囲で平均値は 72.5 pg/ml であった。過形成副甲状腺は 5-アミノレブリン酸を投与した後、頸部を切開して波長 385nm の LED 光を照射して確認された（図 1）。

侵襲的照射条件と効果の判定

5-アミノレブリン酸 500mg/kg 体重以上を投与された個体は 5 分以上の照射時間で全個体が死亡したが、それ以下の投与量では照射 10 分間で生存率 65.2%（15/23）、照射 5 分以下では生存率 100%（12/12）であった。照射による副甲状腺の傷害程度は死亡個体で重大であり、腺内には生きた細胞はほとんど見られず、血管などの構造も確認できなかった。生存個体でも副甲状腺の傷害は観察されたが、腺の構造は比較的維持されており、生きた細胞や血管もより多く観察された。

非致死条件で連続 3 週間の光照射を行い、その後の血中副甲状腺ホルモンの濃度変化を追跡したところ、照射開始から 9 週目で 60%（3/5）

の個体では照射後も血中副甲状腺ホルモン濃度は低下を続け、実験終了時まで低値を維持した（9 週目の平均； 80.5 ± 54.0 pg/mL）が、その他の 40%（2/5）の個体では一旦低下した副甲状腺ホルモン濃度はその後増加に転じた（9 週目の平均； 970.0 ± 215.6 pg/mL）（図 2）。光照射を施さなかった過形成モデルの血中副甲状腺ホルモン濃度はいずれも次第に増加し、9 週目の平均値は 2739.3 ± 322.3 pg/mL であった。光線力学的治療を施した個体の血中のカルシウムとリンの濃度は非致死的な範囲にとどまっていた。副甲状腺ホルモン濃度が回復した個体では副甲状腺細胞や血管の増加が観察され、副甲状腺が再生したと考えられた。

非侵襲的照射条件と効果の判定

侵襲的照射と同様にして非侵襲的照射を行い、その効果を判定した。その結果、42.9%（3/7）の個体では照射後も血中副甲状腺ホルモン濃度は低下を続け、実験終了時まで低値を維持した（9 週目の平均； 233.7 ± 51.6 pg/mL）が、その他の 57.1%（4/7）の個体では一旦低下した副甲状腺ホルモン濃度はその後増加に転じた（9 週目の平均； 3305.9 ± 107.3 pg/mL）。光照射を施さなかった過形成モデルの血中副甲状腺ホルモン濃度はいずれも次第に増加し、9 週目の平均値は 2974.6 ± 372.1 pg/mL であった。光線力学的治療を施した個体の血中のカルシウムとリンの濃度は非致死的な範囲から逸脱することはなかった。

(2) 臨床応用へ向けた技法の改良

低カルシウム血漿による死亡回避の技法の開発

光照射後の死亡個体においては、血中副甲状腺ホルモンの濃度低下が顕著であり、血中カルシウム濃度の低下と血中リン濃度の上昇も観察された。死亡個体に観察された痙攣などが低カルシウム血症によるものと推測されたため、一部の個体に通常致死量と思われる照射をした直後と翌日に 40mg/kg 体重のカルチコール酸を静脈注射したところ、75%（6/8）の個体が生き残った。同条件でカルチコール酸の代わりに生食を注射された対照個体は 100%（3/3）死亡した。この時、カルチコール酸を投与された個体の血中カルシウム濃度は死亡個体に比べて改善されており、低カルシウム血症が照射後死亡の直接の原因である可能性が考えられた。

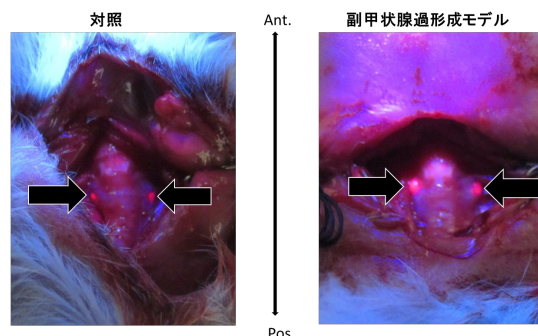


図1. 5-アミノレブリン酸投与により蛍光ラベルされた副甲状腺（矢印）

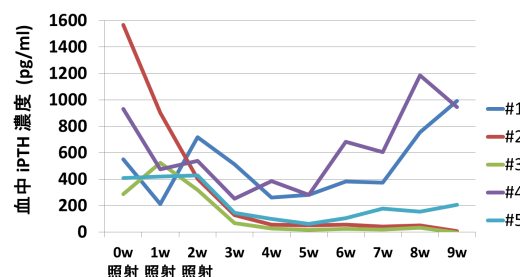


図2. 侵襲的照射後の継続観察

照射済み副甲状腺の再生防止技法の開発
光線力学的治療を施された副甲状腺から抽出されたRNAを用いた定量的リアルタイムPCRにより、血管内皮細胞マーカーPECAM1の発現は、血中副甲状腺ホルモン濃度が抑制され続けた個体では低い、血中副甲状腺ホルモン濃度が回復してきた個体では非常に高く発現していることが確認されて、血管が多く形成されていることが推測された。組織観察の結果もこれと一致しており、副甲状腺の再生には血管形成が多大に関与していることが示唆された。よって、光線力学的治療後の副甲状腺の再生を抑制するためには、照射後の副甲状腺における血管形成を抑制することが重要であると考えられた。

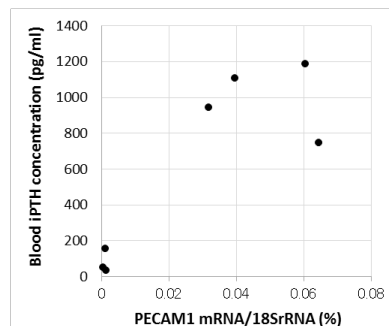


図3. 照射された副甲状腺で発現する血管内皮マーカーPECAM1と血中副甲状腺ホルモン濃度の関係

そこで、非致命的条件で光線力学的治療を行った個体に対し、ラットでの血管新生阻害効果を持つことの知られているCaptoprilを継続投与したところ、83.3% (5/6) の個体で照射副甲状腺における有意な血管新生阻害効果が確認され、副甲状腺ホルモンも低値が維持された。

以上の研究により、過形成副甲状腺に対する光線力学的治療の基本的な技法が確立され、その有用性が明らかにされた。非侵襲的照射の臨床応用には体内のより深い部分へ届く光源の開発が必要になると思われるが、より手近には、副甲状腺摘出術の際に摘出できずに残った部分腺、異所に少量存在する副甲状腺細胞あるいは腺から漏れ出た副甲状腺細胞の検出と除去などの補助的な役割への利用が考えられる。

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〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（８桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：澤田 佳一郎

ローマ字氏名：SAWADA, Kaichiro

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。