

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16721

研究課題名(和文)膀胱がん再発予防を目的としたソノポレーション法による新規抗がん剤投与方法の開発

研究課題名(英文) A new treatment of non-muscle invasive bladder cancer with ultrasound-assisted intravesical chemotherapy.

研究代表者

佐藤 琢磨 (SATO, TAKUMA)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80804856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ソノポレーション法(微小気泡存在下に超音波を標的組織/臓器へ照射することで、薬物送達効率を改善させる手法)が膀胱内に投与された抗がん剤の抗腫瘍効果を改善させるか否かを検討した。細胞実験/動物実験において膀胱がんの細胞株/マウス膀胱がんモデルを用いて超音波+微小気泡+抗がん剤群と抗がん剤投与単独、超音波照射単独群の抗腫瘍効果を比較した。細胞実験においては超音波+微小気泡+抗がん剤群が他の群と比較し有意に高い抗腫瘍効果を呈することを示した。動物実験においては超音波照射+微小気泡+抗がん剤膀胱内注入群は他の群より高い抗腫瘍効果を呈する傾向を示したものの、統計的な有意差は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋層非浸潤性膀胱がんに対し、標準治療である手術(経尿道的膀胱腫瘍切除術)の代替の治療法となることを目指した薬物治療(ソノポレーション法を用いた膀胱内への抗がん剤注入療法)の抗腫瘍効果について解析を行った。動物実験において、ソノポレーション法を用いた抗がん剤膀胱内注入療法は抗がん剤(膀胱注)単独よりも高い抗腫瘍効果を示したが、統計的な有意差を得られなかった。本研究で用いた手法は現状において、手術の代替となりうる治療効果を示すには至っていない。

研究成果の概要(英文)：Ultrasound (US) irradiation in the presence of US contrast agents induces transient and reversible membrane poration of target cells that enhances delivery of exogenous molecules and improves the antitumor activity of chemotherapeutic drugs. In the present study, the synergistic antitumor activity of chemotherapeutic drugs combined with microbubbles (MBs) and US exposure on bladder cancer cells (in vitro) and experimental bladder cancer model (in vivo) was investigated. In the specific condition, cell viability was significantly lower in the chemotherapeutic drugs + MBs + US group than in the chemotherapeutic drugs + MBs and US + MBs groups. In vivo study showed that, in comparison with other groups, the chemotherapeutic drugs + MBs + US group expressed higher antitumor activity against tumor in the bladder, although statistical significance was not reached.

研究分野：泌尿器科

キーワード：膀胱がん ドラッグデリバリーシステム ソノポレーション

## 1. 研究開始当初の背景

筋層非浸潤性膀胱がんは複数の基礎疾患を持つ高齢の患者に多く発症する。現在の標準治療は経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TURBT) + リスクに応じた術後補助療法であるが、手術のリスク (麻酔や抗血小板剤/抗凝固剤の中止などを含む) が高い症例もまれではなく、TURBT の代替となりうる抗腫瘍効果の高い薬物治療の開発が望まれている。膀胱はその解剖学的および生理学的特徴から、高濃度の薬物を含む液体を一定の期間貯留することが可能である。実際、膀胱内に投与された抗がん剤の膀胱内 (尿中) 濃度は、同用量を静脈内投与された場合の約 20-30 倍である (投与後 2 時間値で比較)。しかし、長時間かつ高濃度の抗がん剤を腫瘍に暴露することが可能であるにも関わらず、抗がん剤の膀胱療法は十分な抗腫瘍効果を呈しているとは言い難い。この理由の一つとして、膀胱内に投与された抗がん剤が腫瘍細胞へ十分移行していない可能性が想定される。

## 2. 研究の目的

膀胱内に注入された抗がん剤の薬物送達効率を改善させるため、本研究ではソノポレーション法に着目した。ソノポレーション法は微小気泡存在下に標的の組織/臓器に超音波を照射し、薬剤透過性を亢進させる手法である。研究者はリンパ節内の腫瘍に対してソノポレーション法がリンパ系を介して投与した抗がん剤の抗腫瘍効果を増強させることを見出した。そこで本研究ではこれまでの研究成果を基盤として、ソノポレーション法を膀胱に応用することで既存の抗がん剤の腫瘍への薬剤移行性を改善させ、低侵襲で抗腫瘍効果の高い抗がん剤膀胱内注入療法を確立させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 【細胞実験】

膀胱内注入療法に使用する抗がん剤と超音波照射を併用し、抗腫瘍効果の増強が得られるか、また最適な抗がん剤濃度および超音波照射条件が存在するかを明らかにする。膀胱がんの細胞株 (MBT-2) を 48 ウェルプレートで培養し、抗がん剤 (ドキソルビシン、マイトマイシン C、シスプラチン)、微小気泡 (ソナゾイド) 投与下に超音波を照射する群 (抗がん剤 + 超音波併用群) の抗腫瘍効果を他の 3 群 (コントロール、超音波単独、抗がん剤単独) と比較した。細胞生存率を測定するための手法として MTT アッセイを用いた。

### 【動物実験】

#### マウス膀胱がんモデルの作製

マウス (C3H/HeNjcl) および膀胱がん細胞株 (MBT-2) を用いて、安定して腫瘍を形成し、治療による抗腫瘍効果の判定が可能となる膀胱がんモデルを確立する。

1) MBT-2 にルシフェラーゼ遺伝子を導入し、恒常的にルシフェラーゼ遺伝子を発現する MBT-2/Luc を作製する。

2) 細胞懸濁液 (MBT-2/Luc + PBS + マトリゲル) を超音波ガイド下に膀胱壁内に接種し膀胱がんモデルを作製する。

#### 抗がん剤膀胱内投与 + ソノポレーション法の膀胱がん治療の有効性の検討

上記のマウス膀胱がんモデルに対し、ソノポレーション法を併用した膀胱内抗がん剤投与を行い、治療効果を検討する (コントロール、超音波単独、抗がん剤単独、抗がん剤 + 超音波併用の

4 群で比較)。抗腫瘍効果はルシフェラーゼ発光強度（生体発光イメージング装置で測定）および最大腫瘍径/面積（小動物用高周波超音波診断装置で測定）を経時的に測定することで評価する。

#### 4. 研究成果

##### 【細胞実験】

##### 1) MBT-2/Luc 細胞の作製

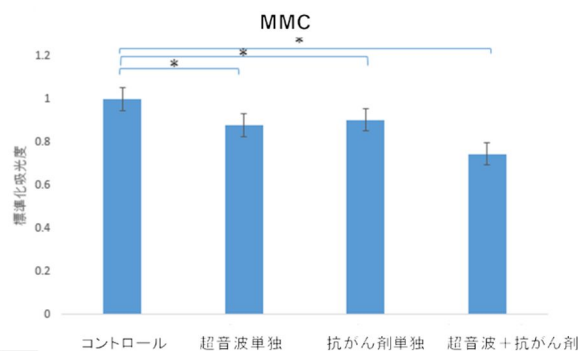
膀胱がん細胞株（MBT-2）にリポフェクション法を用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入したのちに single cell cloning を行い、ルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に高発現する細胞株（MBT-2/Luc）を作製した。

##### 2) 超音波 + 抗がん剤併用群の抗腫瘍効果の評価

・抗がん剤は濃度依存性に抗腫瘍効果の上昇を認めたが、シスプラチンの抗腫瘍効果は他の 2 剤よりも低かった

・抗がん剤 + 超音波併用群とその他の 3 群（コントロール、超音波単独、抗がん剤単独）の抗腫瘍効果を比較した際には、特定の抗がん剤濃度および超音波照射強度（ $0.5 \text{ W/cm}^2$  or  $1.0 \text{ W/cm}^2$ ）という条件下において、抗がん剤 + 超音波併用群が他の 3 群より高い抗腫瘍効果を呈する傾向があることが示された（以下にその 1 例を示す）。3 種類の抗がん剤のうち、マイトマイシン C がソノポレーション法による抗腫瘍効果の上昇が最も顕著である可能性が示された

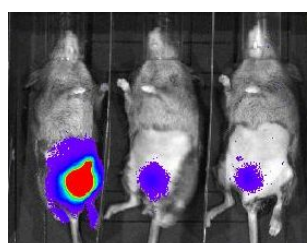
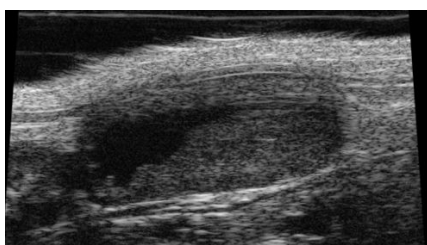
・細胞実験の結果から超音波 + 抗がん剤群が他の 3 群より高い抗腫瘍効果を発揮できる可能性が示唆されたが、それは特定の条件下（超音波強度および抗がん剤濃度）に限定され则认为られた



##### 【動物実験】

##### 1) 動物モデル作製

・腫瘍細胞懸濁液を超音波ガイド下に膀胱壁内へ接種することにより、膀胱内腔での腫瘍形成およびその経時的な増大を生体発光イメージングおよび小動物用高周波超音波診断装置を用いて確認することが可能であった。接種する腫瘍細胞懸濁液の濃度および投与量の最適化を行うことにより治療効果の判定が可能となる動物モデルの作製に成功した。



## 2)治療実験

- ・上記モデルを対象とし、抗がん剤（マイトマイシンC）および微小気泡（ソナゾイド）を膀胱内に経尿道的に投与し、 $1.0 \text{ W/cm}^2$ , 60 秒（照射）の条件で超音波を照射した
- ・超音波 + 抗がん剤（マイトマイシンC）併用群は他の3群に比べ、腫瘍の増大を抑制もしくは腫瘍を縮小させる傾向を示したが統計的有意差を得るには至らなかった
- ・動物実験においては治療効果を最大化する条件（抗がん剤投与量、治療を行う回数およびタイミング）について十分な最適化が行えておらず、さらなる検討を要すると考えられた

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤琢磨 山下慎一 伊藤明宏
2. 発表標題 東北大学病院における筋層非浸潤性膀胱がんの治療成績について
3. 学会等名 第107回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 琢磨, 山下 慎一, 田中 峻希, 折笠一彦, 齋藤 英郎, 池田 義弘, 徳山 聡, 喜屋武 淳, 太田 章三, 小川 修, 伊藤 明宏
2. 発表標題 筋層非浸潤性膀胱がんの再発に関連する因子およびBCG膀胱療法の治療効果の検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------