

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500433

研究課題名（和文） 癌の超音波力学療法-化学療法剤と超音波感受性物質の併用効果に関する基礎的検討

研究課題名（英文） Sonodynamic cancer therapy - the combination effects of an anticancer drug and a sonosensitizer

研究代表者

芝口 浩智 (SHIBAGUCHI HIROTOMO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：60295061

研究成果の概要（和文）：低侵襲的ながん治療法として有望な超音波力学療法の抗腫瘍効果増強を指向して、新規ポルフィリン誘導体 DEG の超音波感受性物質としての性状を解析するとともに、抗癌剤併用による効果を *in vitro* と *in vivo* でそれぞれ検討した。その結果、DEG が光に反応せず超音波によって特異的に活性化し腫瘍を傷害することが示された。さらに、抗癌剤 5-FU と CDDP との併用によりその効果が増強されることを示した。

研究成果の概要（英文）：Low-intensity ultrasound irradiation with a sonosensitizer (sonodynamic therapy, SDT) is one of the promising candidates for cancer therapy because of the deeper tissue penetrating ability than light and lower phototoxicity than photodynamic therapy with a photosensitizer. In order to develop SDT, DEG, a novel sonosensitizer, was characterized and assessed. Furthermore, Combinational effect of an anticancer drug and DEG on SDT was evaluated both *in vitro* and *in vivo*. The synergistic antitumor effect was observed in mouse xenograft model as well as *in vitro* cytotoxic assay in combination of DEG and anticancer drug on ultrasound irradiation, suggesting that the SDT in combination of DEG and anticancer drug might be a useful treatment for cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学、腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波医科学、超音波力学療法、超音波感受性物質、がん、非侵襲的治療

1. 研究開始当初の背景

がん治療における三大療法は、外科療法、

放射線療法ならびに化学療法であるが、これらはいずれも高い治療効果が認められるものの人体に対し侵襲的であり、特に、放射線療法と化学療法の併用では、強い副作用のため治療の中断を余儀なくされることもしばしばである。

非侵襲的ながん治療を考えたとき、低出力の超音波と超音波感受性物質を用いた超音波力学療法 (sonodynamic therapy, SDT) は極めて有望である。しかしながら、これまで SDT で用いられてきた超音波感受性物質の多くは元来光感受性物質であり、例えば photofrin は、現在早期の肺癌や胃癌患者などに対し光線力学療法 (photodynamic therapy, PDT) で用いられるが、その性質上、SDT においても光線過敏症などの副作用が問題となる。この問題を回避するために、我々の研究室ではこれまで (A) 光/超音波感受性物質 (ATX-70) のドラッグデリバリーシステム (DDS) を指向して、腫瘍関連抗原に特異的な抗体との複合体を作製し、腫瘍細胞への集積性を高め、また、(B) 光にほとんど感受性を持たず、おもに超音波によって励起状態となる新規超音波感受性物質 (DCPH-P-Na (I)) の抗腫瘍効果の確認に取り組んできた。その一方で、これら SDT による *in vivo* での効果は、*in vitro* で期待されたほどには強力でないため、さらなる SDT の効果増強のための方法が望まれる。

2. 研究の目的

本研究計画では、化学療法剤の副作用を軽減しつつも、非侵襲的かつ高い治療効果が期待できる新しいがん治療法の開発を指向し、新規超音波感受性物質を探索するとともに、超音波感受性物質を用いた低強度の SDT と化学療法とを組み合せ、これら併用効果に関する基礎的検討を行う。超音波感受性物質を用いた SDT と化学療法の増強は、ともに低強度の超音波照射によるキャビテーション現象によって発生するエネルギーを利用しているが、一方は発生した活性酸素種による細胞傷害であり、他方は化学療法剤の DDS という、それぞれ相互に全く関連のない作用機序であるため、原理的にも高い相加・相乗効果が期待できる。またその一方で、これら超音波感受性物質を用いた SDT と化学療法剤の併用効果に関しては、これまで報告がなかった。

3. 研究の方法

本研究計画では、現在臨床で汎用されている化学療法剤と、近年その臨床応用が期待されている、超音波感受性物質を用いた低強度の超音波力学療法 (SDT) の併用効果の検討に先立ち、新規ポルフィリン誘導体 DEG の超

音波感受性物質としての有用性について、まず *in vitro* 実験にて可視光 (6,000 lux) と超音波 (1 W/cm², 1 MHz) の照射に対する反応性を、光/超音波感受性物質として知られる ATX-70 とともにヒト胃癌細胞株 MKN-74 を用いて検討した。このとき、生細胞数は WST-8 アッセイにより決定した。また、細胞の傷害機構を明らかにするために Annexin-V と Spy-LHP への結合を、それぞれフローサイトメトリーにて検討した。細胞傷害を起こす活性酸素種の同定には、活性酸素の捕捉剤を用いることで同定を試みた。次いで、各種癌の樹立細胞に対する細胞傷害活性についてもその効果を検討した。さらに、担癌モデル動物を用いた *in vivo* 実験を行い、SDT 適用時期の検討と合わせて、腫瘍の増殖抑制効果を検討した。このとき、腫瘍組織傷害の主経路を精査する目的で治療直後の組織を摘出し、H. E. 染色と ApoMark Apoptosis Detection kit を用いて病理組織学的な検討を行った。

一方、抗癌剤 (5-FU と CDDP) との併用効果の *in vitro* における検証では、予め MKN-74 を抗癌剤に IC₅₀ の濃度で 24 時間暴露し、DEG を用いた SDT の細胞傷害効果を WST-8 アッセイにて検討した。このとき、細胞内への抗癌剤の移行増強の有無については FITC で蛍光標識した dextran を用いてフローサイトメトリーにて検討した。また、担癌モデル動物を用いた *in vivo* 実験では、抗癌剤単独や DEG のみを用いた SDT と抗癌剤を併用した場合における腫瘍増殖抑制効果についてそれぞれ検討した。

4. 研究成果

光感受性物質の ATX-70 ならびに新規ポルフィリン誘導体 DEG 存在下、MKN-74 に光照射をした結果、ATX-70 は～80%の細胞傷害活性を示した一方で DEG は全く傷害しなかったことから、DEG が超音波に特異的に反応をする超音波感受性物質であることが示された。また、低出力の超音波照射では DEG と ATX-70 のいずれも MKN-74 を傷害したが、DEG (～75%) の方が ATX-70 (～50%) よりも超音波による細胞傷害能が高く、超音波感受性物質としての優位性が明らかとなった。

低出力超音波と DEG で起こる細胞傷害過程におけるアポトーシス関与の有無をホスファチジルセリンの細胞表面への表出を指標に測定した結果、超音波照射直後では Annexin-V との結合が認められなかったことから、主にネクローシスによって細胞が傷害されていることが示唆された。さらに、このときの細胞膜の構成脂質の過酸化を Spy-LHP にて測定した結果、DEG 存在下での超音波照射により、超音波単独群や未処置群に比べて明らかな脂質の過酸化が認められたことか

ら、細胞膜脂質過酸化による膜の流動性低下が細胞傷害の主要な原因であることが示唆された。

低出力超音波と DEG で起こる細胞傷害や細胞膜脂質過酸化がどの活性酸素種で惹起されているのか捕捉剤を用いて検討した結果、ヒドロキシラジカルがその主要な活性酸素であることが示された。

ヒト胃癌細胞株 MKN-74 で認められた細胞傷害効果が、他臓器由来のものを含めた他のヒト樹立癌細胞においても認められるか否かを検討したところ、超音波に対する感受性に違いは見られたものの、今回検討したすべての樹立癌細胞に対して有意な細胞傷害活性を示した。

これらの *in vitro* の結果を元に SCID マウスに MKN-74 を播種した担癌モデル動物で DEG を用いた SDT の効果を検討した結果、隔日治療を 2 週間続けた場合、未治療群や超音波単独群に比べて有意な腫瘍増殖抑制効果を得た。このとき、治療直後の腫瘍を摘出し傷害部位を組織染色により検討したところ、DEG を用いた SDT で認められた明らかな組織傷害部位の周囲にアポトーシス細胞は認められず、*in vitro* の結果と同様に *in vivo* においても細胞傷害過程は主にネクローシスによるものであることが示唆された。

また、DEG の光感受性を *in vivo* でも検討したところ、ATX-70 では著名な皮膚過敏症が認められる条件で、薬物非投与（未処置）群とともに全く皮膚表面上の異常は認められず、*in vitro* と同様に DEG が光に対する感受性を持たないことが *in vivo* でも示された。

低出力超音波と DEG に抗癌剤を併用したときの細胞傷害効果の増強を検討したところ、5-FU と CDDP とともに DEG を用いた超音波照射群に比べて有意に細胞傷害活性の増強が認められた。このとき、抗癌剤の細胞内への移行が増強しているかどうかを分子量の異なる FITC-dextran を用いて検討した結果、DEG による dextran の細胞内移行は増強されなかったことから、期待された二次的な相乗効果のためにはより強力な超音波照射条件など別の超音波照射条件／方法が必要なことが示唆された。

一方、*in vivo* においても抗癌剤併用による DEG を用いた SDT の抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討したところ、抗癌剤単独や DEG を用いた SDT に対して抗癌剤併用群では 5-FU と CDDP いずれにおいてもその効果が増強した。

以上の結果から、新規ポルフィリン誘導体 DEG を用いた SDT が、光線過敏症などの副作用を考えると、これまでに報告されてきた光／超音波感受性物質を用いる SDT よりも有望であり、また抗癌剤を併用することでその効果が増強され高い治療効果が期待できるだけでなく、抗癌剤の副作用低減にも有用な手

段となりうることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

① Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M, Kuroki M. Sonodynamic cancer therapy: a non-invasive and repeatable approach using low-intensity ultrasound with a sonosensitizer. *Anticancer Res*, in press, 2011, 査読有.

② Shirasu N, Shibaguchi H, Kuroki M, Yamada H, Kuroki M. Construction and molecular characterization of human chimeric T-cell antigen receptors specific for carcinoembryonic antigen. *Anticancer Res*, 30(7): 2731-2738, 2010, 査読有.

③ Shibaguchi H, Yamamoto T, Kuroki M, Futagami K. Measurement and assessment of the titer of immunoglobulin (Ig) G specific for cytomegalovirus in Ig preparation. *Yakugaku Zasshi*, 130(7): 977-982, 2010, 査読有.

④ Yamamoto T, Wahiyama A, Sejima E, Shibaguchi H, Kataoka Y, Futagami K. Establishment of a system for early exposure provided by new pharmacists in a hospital. *Yakugaku Zasshi*, 130(6): 821-831, 2010, 査読有.

⑤ Yanagisawa J, Shiraishi T, Iwasaki A, Maekawa S, Higuchi T, Hiratuka M, Tanaka T, Shibaguchi H, Kuroki M, Shirakusa T. PPARalpha ligand WY14643 reduced acute rejection after rat lung transplantation with the upregulation of IL-4, IL-10 and TGFbeta mRNA expression. *J Heart Lung Transplant*, 28(11): 1172-1179, 2009, 査読有.

⑥ Huo Q, Kinugasa T, Wang L, Huang J, Zhao J, Shibaguchi H, Kuroki M, Tanaka T, Yamashita Y, Nabeshima K, Iwasaki H, Kuroki M. Claudin-1 protein is a major factor involved in the tumorigenesis of colorectal cancer. *Anticancer Res*, 29(3): 851-857, 2009, 査読有.

⑦ Shibaguchi H, Luo NX, Tanaka T, Kuroki M, Kuroki M. Engineering T cells in cancer

immunotherapy: their gene constructions and antitumor activity. Trends in Cancer Res, 5: 21-27, 2009, 査読有.

⑧ Tanaka T, Shibaguchi H, Maekawa S, Shimura H, Tamura K, Kuroki M. Recent developments in cancer gene therapy with adenovirus vectors. Trends in Cancer Res, 5: 63-69, 2009, 査読有.

⑨ Maekawa S, Iwasaki A, Shirakusa T, Kawakami T, Yanagisawa J, Tanaka T, Shibaguchi H, Kinugasa T, Kuroki M, Kuroki M. Association between the expression of chemokine receptors CCR7 and CXCR3, and lymph node metastatic potential in lung adenocarcinoma. Oncol Rep, 19(6): 1461-1468, 2008, 査読有.

⑩ Zhao J, Kuroki M, Shibaguchi H, Wang L, Huo Q, Takami N, Tanaka T, Kinugasa T, Kuroki M. Recombinant human monoclonal IgA antibody against CEA to recruit neutrophils to CEA-expressing cells. Oncol Res, 17(5): 217-222, 2008, 査読有.

⑪ Kuroki M, Wang L, Huo Q, Shibaguchi H, Yanagisawa J, Fukami T, Yotsumoto F, Tanaka T, Miyamoto S. Fusion therapy of cellular and humoral immunity for cancer using antibodies or their genes against carcinoembryonic antigen. Recent Develop in Immunol, 233-245, 2008, 査読有.

[学会発表] (計9件)

① 芝口浩智、二神幸次郎：抗癌剤と超音波感受性物質の併用によるがん超音波力学療法の効果増強, 第131回日本薬学会年会、2011年3月30日、静岡.

② 芝口浩智、水流弘文、黒木 求、黒木政秀：新規超音波感受性物質を用いたがん超音波力学療法におけるヒドロキシラジカル産生と抗腫瘍効果. 第3回超音波分子診断治療研究会、2011年3月5日、福岡.

③ 芝口浩智、水流弘文、黒木 求、黒木政秀：超音波力学療法における抗がん剤と超音波感受性物質の相乗効果. 第69回日本癌学会学術集会、2010年9月22日、大阪.

④ Shibaguchi H, Tsuru H, Kuroki M, Kuroki M: Enhancement of antitumor activity in the combination therapy of anticancer drug and a fully human antibody specific for CEA is involved in CDC and ADCC, but not anoikis. The 14th

international congress of immunology, 2010.8,27. Kobe, Japan.

⑤ 芝口浩智、山本知佳、黒木政秀、二神幸次郎：ヒト免疫グロブリン製剤における抗サイトメガロウイルス抗体の力価測定とその評価, 第130回日本薬学会年会、2010年3月28日、岡山.

⑥ 芝口浩智、水流弘文、黒木 求、黒木政秀：抗癌剤とヒト抗CEA抗体の併用による抗腫瘍効果増強とその作用機序. 第13回バイオ治療法研究会学術集会、2009年12月5日、香川.

⑦ 芝口浩智、水流弘文、黒木 求、黒木政秀：抗がん剤と超音波感受性物質の併用によるがん超音波治療法. 第68回日本癌学会学術集会、2009年10月3日、横浜.

⑧ 芝口浩智、水流弘文、黒木 求、田中俊裕、黒木政秀：ヒト抗CEA抗体の5-FUまたはCDDPとの併用による抗腫瘍効果. 第28回日本分子腫瘍マーカー研究会、2008年10月27日、名古屋.

⑨ 芝口浩智、水流弘文、黒木 求、田中俊裕、黒木政秀：ヒト型抗CEA抗体と抗癌剤の併用による消化器癌治療の検討. 第67回日本癌学会学術集会、2008年10月29日、名古屋.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 超音波感受性物質を含む腫瘍増殖抑制剤および腫瘍増殖抑制剤と低出力超音波を用いた腫瘍増殖抑制方法

発明者: 芝口浩智、水流弘文

権利者: 福岡大学

種類: 特許

番号: 特願2010-192916

出願年月日: 2010年8月30日

国内外の別: 国内

[その他]

(1)ホームページ

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/biochem1/index-j>.

6. 研究組織

(1)研究代表者

芝口 浩智 (SHIBAGUCHI HIROTOMO)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：60295061

(2)研究分担者
該当無し ()

研究者番号：

(3)連携研究者
該当無し ()

研究者番号：