

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08010

研究課題名（和文）肝動脈塞栓術後の再発を司る低酸素応答遺伝子の解明と、siRNA搭載塞栓剤の開発

研究課題名（英文）Elucidation of hypoxia-responsive genes that control recurrence after hepatic artery embolization and development of siRNA-loaded embolization preparations

研究代表者

高木 治行（Takaki, Haruyuki）

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30378377

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生分解性ポリマーを用いて、肝動脈塞栓術後の再発抑制に応用可能な、新しい血管塞栓物質の開発を試みた。ポリマー溶媒や安定化水の比率、作成時の流速等を調整することで、粒子径を自在に調節することが可能となった。更に、肝癌再発に関与する低酸素誘導因子を阻害可能な、新しい血管塞栓物質の開発へとつながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝動脈塞栓術後の再発抑制に応用可能な、新しい血管塞栓物質の開発基盤を確立した。更に、肝癌再発に関与する低酸素誘導因子を標的とする新しい塞栓物質のプロトタイプも作成することができた。今後、臨床への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, using a biodegradable polymer, we attempted to develop a new vascular embolization material that can be applied to prevent recurrence after hepatic artery embolization. By adjusting the ratio of the polymer solvent and the stabilizing water, the flow rate during preparation, etc., it became possible to freely adjust the particle size. Furthermore, it led to the development of new vascular embolization substances that can inhibit hypoxia-inducible factors involved in liver cancer recurrence.

研究分野：Interventional Radiology (IVR)

キーワード：肝癌 肝動脈塞栓術 低酸素誘導因子 マイクロ粒子 siRNA

## 1. 研究開始当初の背景

原発性肝癌は本邦の癌死因第4位で、年間約3万人が死亡している。また、悪性腫瘍による死亡例の20~50%が転移性肝癌を有している。肝動脈塞栓術は、塞栓物質で肝癌の栄養血管を塞栓し、阻血壊死に陥らせる治療法である。切除不能な原発性及び転移性肝癌に対する有効な治療法として選択されている。しかし、塞栓術後も50~80%でガン再発が認められ、再発した場合の予後は不良である。そこで、肝動脈塞栓術の治療成績向上が喫緊の課題である。

近年、肝動脈塞栓術による腫瘍の低酸素状態が、ガン再発や悪性形質獲得を誘導しているというパラドックスが議論となっている。特に、低酸素誘導因子・HIF-1(Hypoxia Inducible Factor 1)は、抑制性免疫チェックポイント分子であるPD-L1(Programmed Cell Death 1 Ligand 1)や血管内皮増殖因子・VEGF(Vascular endothelial growth factor)等、複数の低酸素応答遺伝子を活性化し、ガン細胞を増悪化させる主要な因子の1つとして注目されてきた。

## 2. 研究の目的

肝動脈塞栓術による腫瘍の低酸素状態は、低酸素誘導因子依存的に複数の遺伝子を活性化し、ガン細胞を増悪させる主要な因子として注目されている。そこで、“肝動脈塞栓術の際にHIF-1の蓄積や低酸素応答遺伝子を阻害すれば、抗腫瘍効果を高めることができる”という仮説を立案した。そして、肝動脈塞栓術の際に用いる塞栓物質に低酸素応答遺伝子を標的としたsiRNAや低分子化合物を搭載した新しい塞栓剤を開発すれば、効果の高い治療ができるのではないかとこの着想に至った。

本研究の最終目標は、HIF-1の蓄積や低酸素応答遺伝子を制御するsiRNAや低酸素化合物を搭載した新しい塞栓剤を開発し、肝動脈塞栓術の治療成績向上を目指すことである。

## 3. 研究の方法

### (1) HIF-1 標的 siRNA の作成と低酸素応答遺伝子抑制効果の検証

ラットHIF-1のmRNA配列をもとに、HIF-1標的siRNAを作成した。赤色蛍光タンパク(mCherry)を導入したラット肝細胞癌株(N1S1)に、緑色蛍光標識したHIF-1標的siRNAを加え、PD-L1やVEGFの発現変動をreal-time PCRで解析した。

### (2) 薬剤徐放性マイクロ粒子の開発

生分解性高分子:ポリ乳酸グリコール酸共重合体を素材とし、マイクロ流路システムを用いて、薬剤徐放性塞栓物質としての応用が可能なマイクロ粒子を作成した。作成したマイクロ粒子の大きさ、形状、表面性状を、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡で観察した。

### (3) 薬剤徐放性マイクロ粒子の塞栓効果検証

蛍光タンパク質と赤色蛍光タンパク質を共発現させた肝癌細胞をラット肝臓に移植し、肝癌モデルを作製した。このラット肝癌モデルの肝動脈内に、X線透視下で経カテーテル的に、新規開発した薬剤徐放性マイクロ粒子を注入した。注入後は肝臓を摘出し、凍結切片を作成。血管内へのマイクロ粒子分布を確認した。また、HE染色標本を作成し、腫瘍壊死効果を検証した。

### (4) 低酸素誘導因子阻害剤を封入した薬剤徐放性マイクロ粒子の開発

低酸素誘導因子阻害剤の一つであるボルテゾミブをもちい、ポリ乳酸グリコール酸共重合体を基質としたマイクロ粒子を開発した。

## 4. 研究成果

### (1) HIF-1 標的 siRNA の作成と低酸素応答遺伝子抑制効果の検証

作成した緑色蛍光標識siRNAは、赤色蛍光タンパクを導入したラット肝細胞癌株に取り込まれていることが、蛍光顕微鏡で確認できた(図1a)。Real-time PCRによる検討では、HIF-1標的siRNAはHIF-1およびPD-L1遺伝子の発現を有意に抑制した(図1b)。

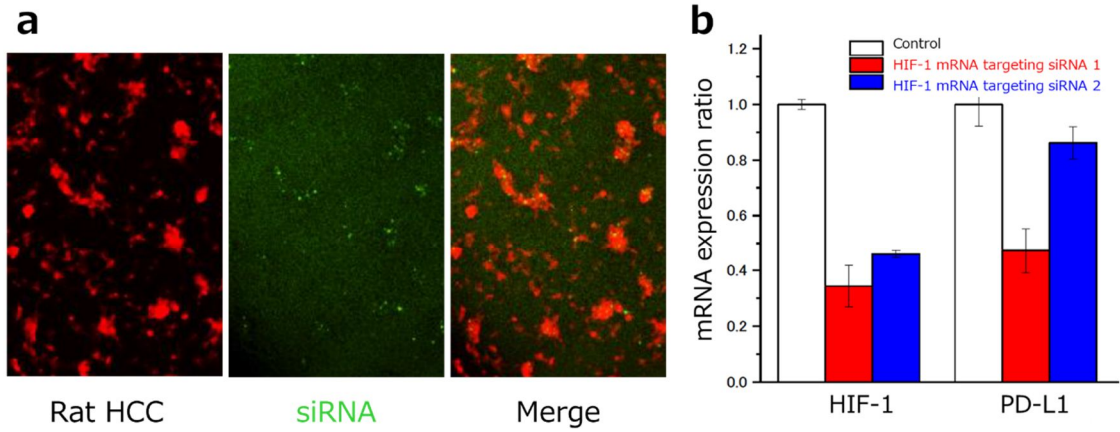


図1. a) 蛍光顕微鏡による観察では、緑色蛍光標識siRNAが赤色蛍光タンパクを導入したラット肝細胞癌株に取り込まれていることが、確認できた。b) ラット肝細胞癌株 (N1S1) にHIF-1標的siRNA導入後、HIF-1及びPD-L1の発現が有意に抑制された。

### (2) 薬剤徐放性マイクロ粒子の開発

作成した塞栓物質は、およそ 100 $\mu$ m ~ 1000 $\mu$ m のサイズであり、マイクロ流路システムを通過する際の流速、ポリ乳酸グリコール酸共重合体の濃度、添加する Polyvinil Alcohol の濃度により、異なる粒子径の塞栓物質が得られた (図2)。

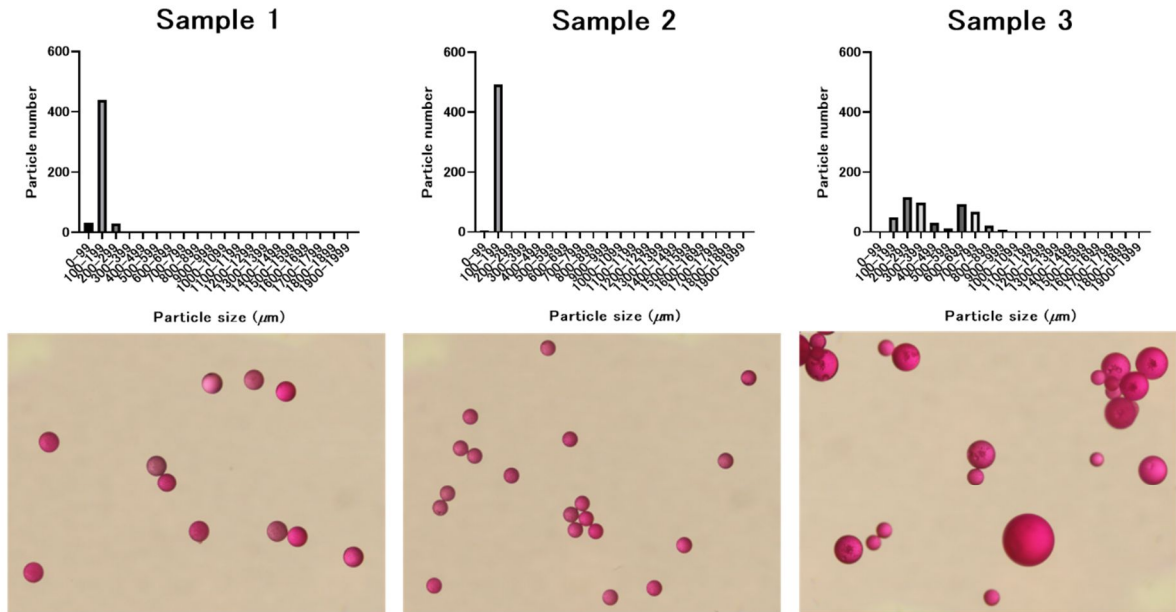


図2. マイクロ粒子の粒子径と顕微鏡写真

Sample 1: ジクロロメタン/水 = 0.1/9.9 (mL/min) 、 Sample 2: ジクロロメタン/水 = 0.5/9.5 (mL/min) 、 Sample 3: ジクロロメタン/水 = 1.0/9.0 (mL/min)

### (3) 薬剤徐放性マイクロ粒子の塞栓効果検証

動脈塞栓術後の肝標本では、マイクロ粒子が肝動脈内に注入されており、塞栓作用により周囲にうっ血が広がっていることが確認できた (図3)。

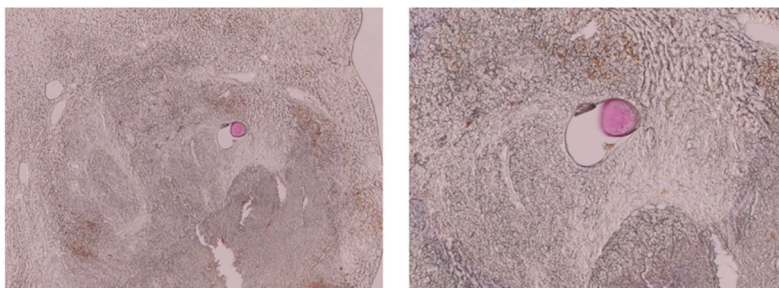


図3. ラット肝癌モデルに対する動脈塞栓術後の凍結切片

マイクロ粒子が肝動脈内に注入されており、塞栓作用により周囲にうっ血が広がっている。

(4) 低酸素誘導因子阻害剤を封入した薬剤徐放性マイクロ粒子の開発

低酸素誘導因子阻害剤の一つであるボルテゾミブをもちい、ポリ乳酸グリコール酸共重合体を基質としたマイクロ粒子を開発した(図4)。

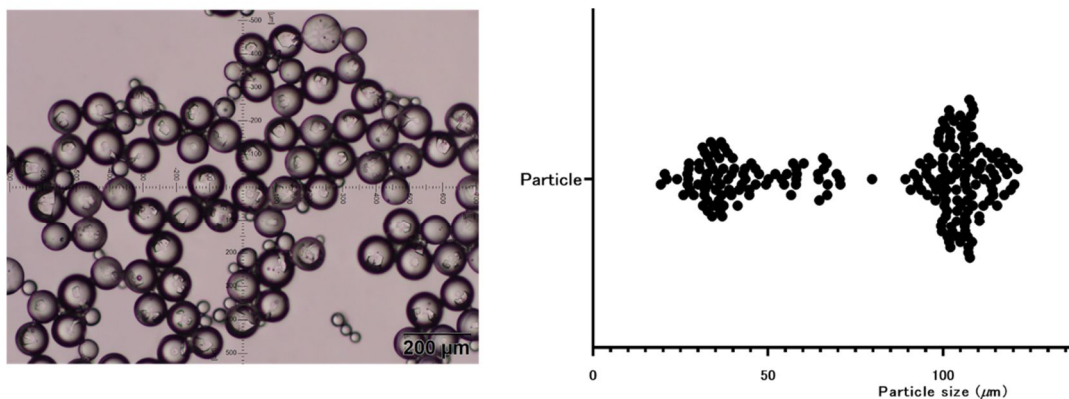


図4. ボルテゾミブ封入マイクロ粒子の顕微鏡写真と粒子径

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Cornelis Francois H., Barral Matthias, Razakamanantsoa Leo, Takaki Haruyuki, Paye Francois, El-Mouhadi Sanaa	4. 巻 32
2. 論文標題 Fogarty Balloon Catheter for Performing Ipsilateral Portal Vein Embolization with Absolute Ethanol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Vascular and Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 775 ~ 778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jvir.2021.02.007	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 Kako Yasukazu, Ueki Ryusuke, Yamamoto Shingo, Takaki Haruyuki, Aoki Yoshitaka, Yokoyama Osamu, Yamakado Koichiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Adrenal pheochromocytoma treated by combination of adrenal arterial embolization and radiofrequency ablation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 1261 ~ 1265
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ccr3.3745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 TARUTANI KAZUO, TAKAKI HARUYUKI, IGETA MASATAKA, FUJIWARA MASAYUKI, OKAMURA AYAKO, HORIO FUTO, TOUDOU YUKI, NAKAJIMA SATOSHI, KAGAWA KAZUFUMI, TANOOKA MASAO, YAMAKADO KOICHIRO	4. 巻 35
2. 論文標題 Development and Accuracy Evaluation of Augmented Reality-based Patient Positioning System in Radiotherapy: A Phantom Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 2081 ~ 2087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12477	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Futani Hiroyuki, Takaki Haruyuki, Sawai Tatsuo, Taniguchi Junichi, Kako Yasukazu, Ide Yoshi-Hiro, Yamakado Koichiro, Tachibana Toshiya	4. 巻 100
2. 論文標題 Long-term survival following radiofrequency ablation of lung metastases in an elderly patient with calcaeneal osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e26681 ~ e26681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.0000000000026681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takaki Haruyuki, Hirata Yutaka, Ueshima Eisuke, Kodama Hiroshi, Matsumoto Seiji, Wada Reona, Suzuki Hitomi, Nakasho Keiji, Yamakado Koichiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Hepatic Artery Embolization Enhances Expression of Programmed Cell Death 1 Ligand 1 in an Orthotopic Rat Hepatocellular Carcinoma Model: In Vivo and in Vitro Experimentation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Vascular and Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 1475 ~ 1482.e2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvir.2020.03.023	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 -

1. 著者名 Takaki Haruyuki, Kodama Yuki, Miyamoto Hisao, Iijima Yuto, Kikuchi Yoshinari, Kodama Hiroshi, Ueshima Eisuke, Nakasho Keiji, Wada Reona, Yamakado Koichiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Radiofrequency Ablation by a 21-Gauge Internally Cooled Electrode: Ex Vivo and In Vivo Evaluation by Rat Liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 CardioVascular and Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 150 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00270-020-02660-w	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 高木治行
2. 発表標題 次世代TACEの開発
3. 学会等名 日本肝臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木治行
2. 発表標題 副腎腫瘍のアブレーション
3. 学会等名 泌尿器画像診断・治療技術研究会 (JSURT) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木治行
2. 発表標題 Ablation for Bone and Soft Tissue Tumor
3. 学会等名 RFA凍結療法研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木治行
2. 発表標題 光イメージングで視認可能な担癌ラットモデルの開発（第2報）
3. 学会等名 第69回関西IVR研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木治行
2. 発表標題 IO in 2030
3. 学会等名 ECIO 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木治行
2. 発表標題 Inciting an Immune Response: Ablation
3. 学会等名 GEST 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木治行
2. 発表標題 Radiofrequency Ablation by Japan Life line
3. 学会等名 ACTA 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木治行
2. 発表標題 Ablation and Immunomodulation
3. 学会等名 ACTA 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruyuki Takaki
2. 発表標題 Cancer Neoantigen Presentation Following Interventional Oncology
3. 学会等名 SIR 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruyuki Takaki
2. 発表標題 Hepatic Artery Embolization and Immunomodulation
3. 学会等名 APSCVIR 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Haruyuki Takaki
2. 発表標題 Ablation for Bone and Soft Tissue Tumor
3. 学会等名 AOCR 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruyuki Takaki
2. 発表標題 IO in 2030
3. 学会等名 ECIO 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉川 公彦、荒井 保明、山門亨一郎、高木治行ほか	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 624
3. 書名 IVRのすべて	

〔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
研究 分担者	平田 豊  (Hirata Yutaka)  (10441247)	兵庫医科大学・医学部・講師    (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	山門 亨一郎  (Yamakado Koichiro)  (20263022)	兵庫医科大学・医学部・教授    (34519)	
研究分担者	児玉 大志  (Kodama Hiroshi)  (20422834)	兵庫医科大学・医学部・助教    (34519)	
研究分担者	鈴木 亮佑  (Suzuki Ryosuke)  (80611540)	神戸学院大学・薬学部・講師    (34509)	

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