

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500448

研究課題名（和文） 消化器癌に対する画像誘導選択的音響化学療法システムの開発

研究課題名（英文） Sonodynamic therapy of gastric cancer using novel sonosensitizers

研究代表者

小西 晃造（KONISHI KOUZOU）

九州大学・大学病院・特任助教

研究者番号：90380641

研究成果の概要（和文）：

消化器癌を対象として、超音波エコーや蛍光検出法等の画像診断法に対応する機能化造影剤を開発した。これらの薬剤は癌部への集積性を有し、同時に光あるいは音響などの物理刺激に対する増感作用を有する。この新しい機能性造影剤を各種の画像診断装置等と組み合わせることにより、これまでよりも遙かに精密な癌治療システムを構築することが可能である。

研究成果の概要（英文）：

Sonodynamic therapy, the ultrasound dependent enhancement of cytotoxic activities of certain compounds (sonosensitizers) in studies with cells in vitro and in tumor bearing animals. In this study, we describes a bifunctional agents that combine two modalities into a single cost-effective “see and treat” approach, namely, a single agent that can be used for contrast agent-enhanced ultrasonographic imaging followed by targeted sonodynamic therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：音響化学療法、収束超音波、ナビゲーション医療、医療・福祉

1. 研究開始当初の背景

腫瘍親和性のある光感受性物質ポルフィリン製剤を取り込ませた腫瘍にレーザー光を照射して光化学反応を起こさせる光線力学的療法(PDT:Photo Dynamic Therapy)は、癌を選択的に破壊する治療法として注目を

集めている。第二世代の光感受性物質、NPe6は腫瘍親和性のクロリン骨格を持つ化合物で、レーザー光線と組み合わせることで抗腫瘍効果を示す。しかし、レーザー光の到達が前提となるため、表層にある早期癌のみにしか行われていないのが現状である。

最近ポルフィリン製剤(ポルフィマーナトリウム:Pf)は超音波でも活性化されることがわかり、音響化学療法(SDT:Sono DynamicTherapy)が研究されてきている。本法を術中MRIあるいは超音波画像誘導技術と融合させれば、レーザー光の届かない深部の腫瘍や、切除不能な進行癌に対する治療への活路が開ける。また、超音波は収束超音波(HIFU:High Intensity Focused Ultrasound)による温熱凝固療法としても広く有用性が認められ、乳癌、子宮筋腫、腎癌、肝癌を対象とする臨床例が既に報告されている。我々は、超音波により活性化されるマイクロバブルを併用することで局所の温度上昇を抑えつつ高い治療効果が発揮できることを動物実験にて確認した。本研究の目的は、エネルギーとしての超音波の多彩な作用に着目し、超音波を中心とした低侵襲な治療システムを確立することである。

2. 研究の目的

PDTやSDTにおいて鍵となるのは光(および音響)感受性薬剤と、それらが集積する深部へ強い物理刺激を加えることができる装置の開発である。とりわけ新規薬剤の開発については、癌部への集積性の向上(薬物動態)が不可欠の課題である。そこで本研究においては、我々が開発した癌集積性蛍光分子MPC1に加えて、新たに多くの癌細胞で過剰発現していることが確認されている上皮成長因子受容体(EGFR)を認識するanti-EGFR抗体を修飾した超音波造影剤を合成し、これらの機能評価を実施した。

3. 研究の方法

DSPC:DSPE-PEG:DSPE-PEG-MAL=94:3:3の割合の脂質により構成されたバブルリポソームを調整し、その表面にanti-EGFR抗体を修飾した。このanti-EGFR抗体はあらかじめジスルフィド結合を還元剤(2-melcaptoethylamine-HCl)により切断、さらにゲルろ過クロマトグラフィーにて精製し、MALDI-TOF/MSにより重鎖間のジスルフィド結合の解離によって、分子量が半分になっていることを確認した。還元剤により露出したチオール基とマレイミドをpH=8.0のbuffer中(1×PBS)で一晩反応させてリポソームに抗体を修飾し、遠心操作(10,000×g, 15 min)によりリポソームを回収した。

また、以前に我々が開発した癌特異的蛍光分子プローブ(MPC01)の各種癌細胞への集積性を*in vitro*において評価した。ヒト正常膀胱上皮細胞およびヒト膀胱癌細胞の細

胞懸濁液を 1×10^4 cells/wellとなるようにミューズライドに播種した。播種8時間後、分子プローブMPC01を終濃度1ug/mlとなるようにに添加した。所定の時間インキュベートした後、培地をPBSで2回洗浄し、Opti-MEM培地に交換して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。なお画像の取得に際しては、感度や倍率を全て同条件で行った。さらに、ヒト膀胱癌腹膜播種モデルマウスを製作し、*in vivo*での集積性についても評価した。

4. 研究成果

抗体標識超音波造影剤

動的光散乱法によってバブルリポソーム(1 mg/ml)の粒径を測定したところ、ガス封入前の平均粒径が135nmであったのに対し、パーフルオロプロパンガス封入後は247nmとほぼ2倍に膨張していることが分かった。この値は、市販のマイクロバブル型造影剤あるLevoist^Rの平均粒径2~4mmと比較して約1/10以下であり、PEG化バブルリポソームが組織深部への到達性に優れたバブル製剤であると期待される。またバブルリポソーム懸濁液は自濁しており、この懸濁液を静置すると、マイクロバブルと同様に水相上部に浮上する性質を有していた。なお、この浮上したバブルリポソームは、少なくとも調製後12時間以内であれば混和により容易に再懸濁可能であった。バブルリポソームは高輝度の超音波造影ガスであるパーフルオロプロパンを封入したバブル製剤であり、超音波エコーによる造影が可能である。そこでバブルリポソームを内径3mmのシリコンチューブに流し、9MHzリニアプローブによる超音波造影を行ったところ、封入したパーフルオロプロパンガスによる造影シグナルの増強が確認された。これらの結果により、バブルリポソームは超音波エコーによる新規超音波造影剤として利用可能であることが示唆された(図1)。

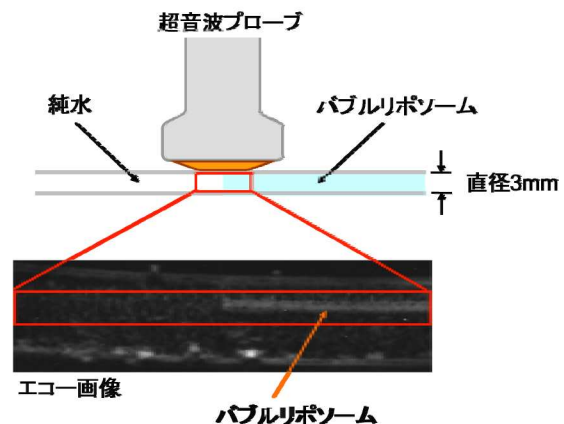


図1 バブルリポソームによる超音波エコー造影シグナルの増強

次に抗体修飾バブルリポソームの癌細胞特異性を評価するためEGFR過剰発現細胞株である食道扁平上皮癌細胞株A431細胞を皮下に接種した担癌マウスに抗体修飾バブルリポソームを静脈投与した。投与24時間後に蛍光イメージングにより癌への集積を評価したところ、抗体修飾したバブルリポソームの癌組織への集積性は、未修飾バブルリポソームあるいはEGFRを認識しない抗体を修飾したバブルリポソームを投与した場合と同様であり、癌特異性は観察されなかった。現時点ではこの原因の詳細は詳らかではないが、投与から蛍光イメージングを行うまでの時間設定の最適化が不十分であったことや、抗体のバブルリポソーム表面への修飾効率の低さなどの原因が考えられる。特に後者については、本実験で調製した抗体修飾バブルリポソームは、単に抗体の重鎖間のジスルフィド結合を切断してチオール基を露出し、そのチオール基とリポソーム中のマレイミドを反応させただけである。この手法では抗体の立体障害によりチオールとマレイミドの反応性が極端に低下することが危惧された。そこで、より効率的に抗体修飾を行う手段として、2-*iminethiolate* (Traut's Reagent) を用いる方法を試みた。このTraut's Reagentはアミノ基と高選択的かつ高効率で反応してチオール基を付加する化合物である。本研究では、IgGの前に安価なアルブミンとTraut's Reagentとを反応させ、反応条件の最適化を行ったところ、修飾率80%と高い効率で反応させることに成功した。現在、この方法による抗体修飾バブルリポソームの開発を継続中である。

癌集積性蛍光分子の機能評価

MPC01は比較的低出力の超音波に対して感受性を有していることが既に明らかにされている。そこでその癌細胞への集積性を *in vitro*において評価したところ、実験条件下において、膵癌、肝癌細胞へ効果的に集積したのに対して、正常な膵管上皮細胞や肝細胞にはほとんど集積しなかった (図2)。

この分子機序については現在のところ不明であり、今後詳細に検討する予定である。

次に、分子プローブMPC01の *in vivo*における機能評価を、ヒト膵癌腹膜播種モデルマウスを用いて行った。分子プローブMPC01を腹腔全体に投与した後、所定の時間経過後に、生理食塩水で2回洗浄し、*in vivo*蛍光イメージング装置によって蛍光測定を行った。

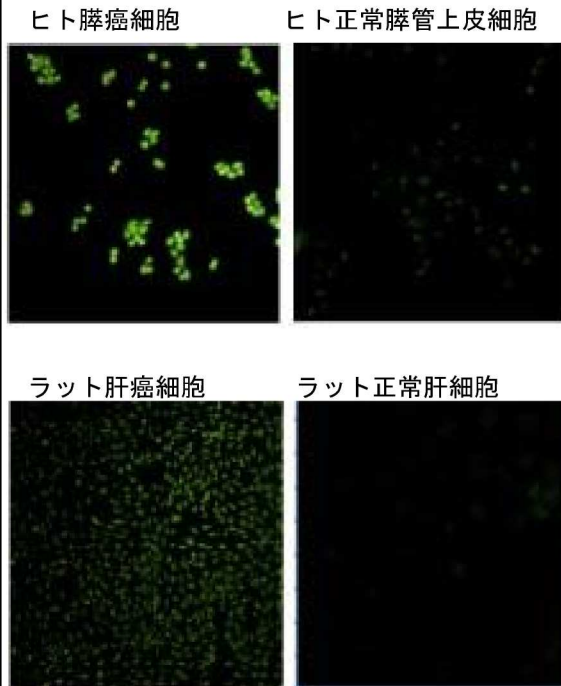
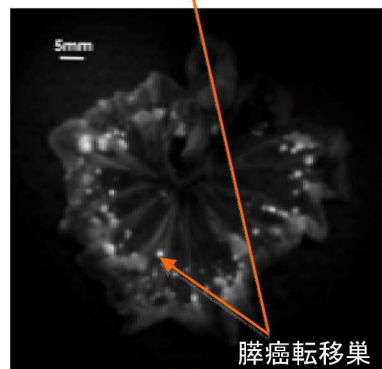


図2. MPC01の癌細胞集積性



膵癌転移巣

図 3. ヒト膵癌微小転移巣の *in vivo* イメージング

腸管を摘出して撮影した写真を図3に示した。この結果、蛍光画像で高輝度となったポイントが実体写真の転移巣と一致しており、分子プローブMPC01が *in vivo* においてもヒト膵癌細胞へ特異的に集積することが明らかとなった。直径1mmに満たない転移巣をも明瞭に描出することに成功しており、癌標的化分子プローブとしてのMPC01の高い性能が示唆された。今後、大腸癌モデルマウスなど様々な病態モデルを用いた癌の *in vivo* イメージングを予定している。

現在、この癌特異的分子プローブMPC01を超音波造影剤バブルリポソーム表面に固定化する技術開発を進めており、超音波エコーによる診断の後に、光(音響)化学療法による治療を目指している。

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 13 件)

- ① Ieiri S, Uemura M, **Konishi K**, Souzaki R, Nagao Y, Tsutsumi N, Akahoshi T, Ohuchida K, Ohdaira T, Tomikawa M, Tanoue K, Hashizume M, Taguchi T. Augmented reality navigation system for laparoscopic splenectomy in children based on preoperative CT image using optical tracking device. 査読有、Pediatr Surg Int. 2012 Apr;28(4):341-6. Epub 2011 Dec 1.
- ② Souzaki R, Kinoshita Y, Matsuura T, Tajiri T, Taguchi T, Ieiri S, Hong J, Uemura M, **Konishi K**, Tomikawa M, Tanoue K, Hashizume M, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y. Successful resection of an undifferentiated sarcoma in a child using a real-time surgical navigation system in an open magnetic resonance imaging operation room. 査読有、J Pediatr Surg. 2011 Mar;46(3):608-11.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 植村宗則, 長尾吉泰, 家入里志, 小西晃造, 大平 猛, 橋爪 誠:
内視鏡下外科手術を安全に行うために～画像重畳を用いた画像誘導下手術ナビゲーションシステムの開発.
第24回日本内視鏡外科学会総会,
2011年12月9日, 大阪
- ② 富川盛雅, 洪 在成, 植村宗則, 小西晃造, 家入里志, 塩谷聡子, 徳永えり子, 前原喜彦, 橋爪 誠:
Open MRIを応用した3次元バーチャル画像によるリアルタイムナビゲーション下乳腺部分切除術.
第50回 日本生体医工学会大会, 2011年5月1日, 東京
- ③ 植村宗則, 小西晃造, 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋爪 誠:
CFD(数値流体力学)を用いた血管血流シミュレーションにおけるfeasibilityの検討.
第50回 日本生体医工学会大会, 2011年4月29日, 東京

[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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小西 晃造 (KONISHI KOUZOU)
九州大学・大学病院・特任助教
研究者番号：90380641

(2) 研究分担者

村垣 義浩 (MURAGAKI YOSHIHIRO)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：70210028

(3) 連携研究者

()

研究者番号：