

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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591513

研究課題名（和文）ナノバブルを用いた膵癌肝転移に対する分子デリバリー療法

研究課題名（英文）Molecular delivery therapy for metastatic liver tumor derived from pancreatic cancer using the nanobubble

研究代表者

赤田 昌紀（AKADA MASANORI）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：20375075

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、膵癌肝転移の制御のため、抗癌剤をナノバブルに内包の上、投与し、腫瘍血管の径に応じたドラッグデリバリー効果が得られるか検討するものである。われわれはマウスに腫瘍細胞を肝臓に移植した肝転移モデルを作成し、ナノバブル造影剤で移植早期に肝臓の造影効果が得られるかどうかを検討した。マイクロバブル造影剤と比較したところ、造影の早期の退縮が見られたものの、ソナゾイドと同様の肝臓造影効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to develop a novel type of nanobubble anticancer agent for treating metastatic liver tumor derived from pancreatic cancer, and to evaluate the effectiveness. We prepared the mice which were received transplantation of tumor cell line, and performed high frequency ultrasonography to the mice using the agent and evaluated the enhancement of the liver in early stage of the transplantation. The enhancement effect was certified and the effect was similar to a microbubble agent used in clinical (Sonazoid®).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	2,200,000	660,000	2,860,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
24年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学・膵臓外科学

キーワード：（高周波）超音波検査、ナノバブル、抗癌剤、膵癌、膵島移植、肝転移

1. 研究開始当初の背景

膵癌の予後は未だ極めて不良である。その一因として、膵癌は肝転移へ移行し易いといった特性が挙げられる。

よって、肝転移をコントロールすることは膵癌の治療成績を向上させるために重要な課題である。近年、ナノバブル造影剤を用いた

超音波検査による肝転移巣の描出法が注目を集めている。腫瘍により新生された血管は脆弱で透過性が高く、ナノバブルのサイズであれば腫瘍本体に直接到達することが可能と考えられている。ナノバブルは超音波照射により破壊されることから、抗癌剤をナノバブルに内含する事によって、腫瘍に抗癌剤を

到達させ、超音波照射により腫瘍特異的に抗癌剤を作用させることが可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗癌剤をナノバブルに内包しそのサイズを調節し投与ことで、腫瘍新生血管からの漏出及びEPR効果、さらに体外式超音波発生装置にて局所的に破壊することでより強い抗腫瘍効果を期待するものである。

3. 研究の方法

(1)治療用・標的ナノバブルの作成 (赤田, 江川)

内部に塩酸 Gemcitabine を含んだ液体とガスを含む、治療用・標的脂質ナノバブルを作成する。EPR 効果の定量をおこなうために、直径が異なる二つのナノバブルを作成する。各バブルの膜組成と平均直径 Distearoyl-Posphocholine (DSPC)+DistearoylPhosphoethanolamine (DSPE)-PEG-OMe (平均 50-200nm) および Distearoyl phosphatidylcholine (PC)-PEG (平均直径 400-800nm) である。内部には上記の治療用プラスミドを内包する。

脂質膜には CD31 (PECAM-1) 抗体ないし血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 抗体を組入れる。ナノバブルのゼータ電位と粒径はゼータ電位・粒径測定システムで計測する。

(2)ナノバブル破壊用衝撃圧制御装置の開発 (小玉)

分担研究者はナノバブルの最適崩壊を目的に、高効率型分子導入装置 (特願 2006-109894、国際特許 PTC/JP2001/057878) を開発してきた。この装置は、圧電素子を面振動させることで高次のモードを同時に発生させることを基本概念としている。実際のバブルは粒径分布に広がりがあるので、この広がりのあるナノバブル群を効率的に崩壊することができれば、分子導入効率が改善されるものと期待される。そこで、固有振数の異なる複数の圧電素子を同一面に配置し、それぞれを独立した位相差で駆動できるような超音波装置を開発し、高次モードを表現する。

(3)Gemcitabine 内包ナノバブルの抗腫瘍効果の評価 (赤田)

ルシフェラーゼ蛋白質をコードするプラスミドをマウス結腸癌細胞 (Colon26-luc)、マウス乳癌細胞 (EMT6-luc)、ヒト膵癌細胞 (Suit2-luc) にトランスフェクションさせ、これらを重症複合型免疫不全 (SCID) マウスに上腸間膜静脈系由で移植し、肝転移モデルを作成する。腫瘍作成後、Gemcitabine 内包ナノバブルを門脈に投与する。

これを小動物用高解像度超音波イメージングシステムにて検出し、更に高出力の超音波を照射し、破壊する。腫瘍縮小効果を Gemcitabine 単独投与群 (対照群)、ナノバブ

ル群、ナノバブル+超音波照射群に対し、生体発光イメージング法で評価する。

4. 研究成果

本研究の目的は、膵癌肝転移の制御のため、抗癌剤をナノバブルに内包の上、投与し、腫瘍血管の径に応じたドラッグデリバリー効果が得られるか検討するものであり、そして体外式超音波発生装置にてナノバブルを局所的に破壊することでより強い抗腫瘍効果が期待できるか検討するものである。この目的に際し、まずわれわれはマウスに腫瘍細胞を肝臓に移植した肝転移モデルを作成し、ナノバブル造影剤で移植早期に肝臓の造影効果が得られるかどうかを検討した。既に臨床応用されているマイクロバブル造影剤 (ソナゾイド) と比較したところ、造影の早期の退縮が見られたものの、ソナゾイドと同様の肝臓造影効果が認められた (投稿中)。また、小動物用の高周波超音波機器 (VEV0770 system) の有効性を評価するために、基礎実験として糖尿病マウス腎被膜下に異種 (ラット) の膵島を移植し、移植した膵島の拒絶性変化がこの機器で確認できるかを検討したところ、移植膵島は拒絶反応のため移植後 7 日までに低エコー像を示し、移植後 14 日以降に消失がみられ、28 日で完全に消失していた。超音波のみならず、摘出腎での所見、病理組織検査の所見でも移植後 7 日までの移植部位の血腫様変化と移植後 14 日以降の膵島の消失が認められた。血糖値は移植後 7 日までの一過性の低下と 14 日以降の再上昇が、Cペプチド値は一過性の上昇とその後の低下がそれぞれ認められた。移植片の容積は移植後 3 日から 7 日にかけて一過性に上昇し、14 日以降は著明に低下した。異種膵島は拒絶反応により、移植後 7 日までに破壊が進んで液状の変化を呈し、14 日以降は破壊された膵島が吸収され消失するという一連の変化が高周波超音波検査で捕えることが可能であった。以上の結果により移植後の膵島の状態を超音波検査で評価できることが示された。更に膵臓特異的に造影可能なナノバブル造影剤を開発中である。

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 5 件)

- ① Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Egawa S, Unno M. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. *Exp Diabetes Res*. 2012; 256707. doi: 10.1155/2012/256707. (査読あり)
- ② Sakata N, Sumi S, Yoshimatsu G, Goto M, Egawa S, Unno M. Encapsulated islets transplantation: Past, present

and future. World J Gastrointest Pathophysiol. 2012; 3: 19-26. doi: 10.4291/wjgp.v3.i1.19. (査読あり)

- ③ Sakata N, Goto M, Yoshimatsu G, Egawa S, Unno M. Utility of co-transplanting mesenchymal stem cells in islet transplantation. World J Gastroenterol. 2011; 17: 5150-5155. doi: 10.3748/wjg.v17.i47.5150. (査読あり)
- ④ Sakata N, Egawa S, Rikiyama T, Yoshimatsu G, Masuda K, Ohtsuka H, Ottomo S, Nakagawa K, Hayashi H, Morikawa T, Onogawa T, Yamamoto K, Yoshida H, Akada M, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Unno M. Computed tomography reflected endocrine function of the pancreas. J Gastrointest Surg. 2011; 15: 525-532. doi: 10.1007/s11605-010-1406-5. (査読あり)
- ⑤ Sakata N, Kodama T, Chen R, Yoshimatsu G, Goto M, Egawa S, Unno M. Monitoring transplanted islets by high-frequency ultrasound. Islets. 2011; 3: 259-266. <http://dx.doi.org/10.4161/isl.3.5.17058>. (査読あり)

[学会発表] (計 19 件)

- ① 坂田直昭, 後藤昌史, 小玉哲也, 元井冬彦, 水間正道, 吉松軍平, 青木 豪, 深瀬耕二, 大塚英郎, 乙供 茂, 岡田恭穂, 中川 圭, 林 洋毅, 森川孝則, 吉田寛, 内藤 剛, 三浦 康, 片寄 友, 里見 進, 海野倫明、移植膵島の超音波画像、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 13 日、福岡
- ② 坂田直昭, 江川新一, 力山敏樹, 吉松軍平, 元井冬彦, 三浦 康, 片寄 友, 海野倫明、ドナー膵の機能評価を予見するための CT 所見に関する検討、第 40 回日本膵・膵島移植研究会、2013 年 3 月 2 日、高松
- ③ 坂田直昭, 元井冬彦, 吉田 寛, 内藤剛, 三浦 康, 廣田衛久, 正宗 淳, 片寄 友, 江川新一, 下瀬川徹, 海野倫明、当科における慢性膵炎に対する取り組み、第 194 回日本消化器病学会東北支部例会、2013 年 2 月 9 日、仙台
- ④ Sakata N, Yoshimatsu G, Aoki T, Ishida M, Fukase K, Ottomo S, Mizuma M, Okada T, Nakagawa K, Hayashi H, Morikawa T, Yoshida H, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Miura K, Egawa S, Unno M, Surgical treatment for chronic pancreatitis, discussion of drainage and total pancreatectomy with islet

autotransplantation、2012 Joint American Pancreatic Association (APA) / International Association of Pancreatology (IAP) Annual Meeting、2012 年 11 月 1 日、Miami、USA

- ⑤ 坂田直昭, 後藤昌史, 元井冬彦, 林洋毅, 中川 圭, 水間正道, 山谷英之, 長谷川豊, 澤田正二郎, 吉松軍平, 伊藤経夫, 菅野 敦, 廣田衛久, 石垣 泰, 力山敏樹, 江川新一, 片桐秀樹, 下瀬川徹, 里見 進, 海野倫明、膵動静脈奇形に対する新たな治療戦略、JDDW2012、2012 年 10 月 10 日、神戸
- ⑥ 坂田直昭 (土屋朗之代演), 後藤昌史, 元井冬彦, 林 洋毅, 中川 圭, 水間正道, 力山敏樹, 江川新一, 里見 進, 海野倫明、膵動静脈奇形に対する治療戦略としての膵全摘術および自家膵島移植、第 67 回日本消化器外科学会総会、2012 年 7 月 20 日、富山
- ⑦ 坂田直昭, 元井冬彦, 石田晶玄, 深瀬耕二, 大塚英郎, 乙供 茂, 水間正道, 岡田恭穂, 中川 圭, 林 洋毅, 森川孝則, 小野川徹, 吉田 寛, 力山敏樹, 内藤剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明、慢性膵炎の外科的標準治療法としての Frey 手術と膵全摘および自家膵島移植の正当性、第 43 回日本膵臓学会大会、2012 年 6 月 28 日、山形
- ⑧ 坂田直昭, 後藤昌史, 元井冬彦, 林 洋毅, 中川 圭, 水間正道, 吉松軍平, 石田晶玄, 深瀬耕二, 乙供 茂, 大塚英郎, 森川孝則, 岡田恭穂, 吉田 寛, 小野川徹, 力山敏樹, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 里見 進, 海野倫明、本学で施行した自家膵島移植の 3 例、第 24 回日本肝胆膵外科学会学術集会、2012 年 5 月 30 日、大阪
- ⑨ 坂田直昭, 吉松軍平, Eba Hathout, 小玉哲也, 江川新一, 力山敏樹, 陳 鋭, 石田晶玄, 土屋郎之, 後藤昌史, 海野倫明、膵島移植医療に有用な各種画像モダリティの使用法の確立に向けて、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 12 日、千葉
- ⑩ 坂田直昭, 小玉哲也, 吉松軍平, 石田晶玄, 土屋朗之, 後藤昌史, 海野倫明: 高周波超音波検査による異種膵島の移植後急性期変化、第 39 回日本膵・膵島移植研究会、2012 年 3 月 10 日、旭川
- ⑪ 坂田直昭, 小玉哲也, 陳 鋭, 吉松軍平, 後藤昌史, 江川新一, 海野倫明、移植膵島生着に対する超音波検査の有効性、第 47 回日本移植学会総会、2011 年 10 月 5 日、仙台
- ⑫ 坂田直昭, 後藤昌史, 元井冬彦, 山口

- 賢, 伊藤経夫, 林 洋毅, 山谷英之, 岡田恭徳, 水間正道, 長谷川豊, 澤田正二郎, 石垣 泰, 廣田衛久, 関口 悟, 藤盛啓成, 江川新一, 片桐秀樹, 下瀬川徹, 里見 進, 海野倫明、本邦 2 例目の自家膵島移植を行った急性膵炎合併膵動静脈奇形の 1 例、第 42 回日本膵臓学会大会、2011 年 7 月 29 日、弘前
- ⑬ 坂田直昭, 後藤昌史, 元井冬彦, 山口賢, 林 洋毅, 山谷英之, 関口 悟, 江川新一, 里見 進, 海野倫明、膵全摘＋自家膵島移植を行い、良好な耐糖能を得た急性膵炎合併膵動静脈奇形の 1 例、第 66 回日本消化器外科学会総会、2011 年 7 月 15 日、名古屋
- ⑭ 坂田直昭, 後藤昌史, 元井冬彦, 山口賢, 伊藤経夫, 林 洋毅, 山谷英之, 岡田恭徳, 水間正道, 長谷川豊, 澤田正二郎, 石垣 泰, 廣田衛久, 関口 悟, 藤盛啓成, 江川新一, 片桐秀樹, 下瀬川徹, 里見 進, 海野倫明、自家膵島移植後 6 か月間安定した血糖コントロールが得られた膵動静脈奇形の 1 例、第 191 回日本消化器病学会東北支部例会、2011 年 7 月 8 日、盛岡
- ⑮ 坂田直昭, 吉松軍平, 元井冬彦, 内藤剛, 力山敏樹, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明、画像モダリティによる新しい移植膵島生着の評価法、第 23 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2011 年 6 月 9 日、東京
- ⑯ 坂田直昭, Eba Hathout, Andre Obenaus, 後藤昌史, 江川新一, 海野倫明、造影 MRI による移植膵島の生着評価法、第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月 26 日、東京
- ⑰ 赤田昌紀, 江川新一, 上野達也, 佐藤俊, 後藤慎一, 高橋道長, 内藤広郎, 元井冬彦, 力山敏樹, 片寄 友, 海野倫明、膵線房細胞癌切除例の予後と治療方針、第 111 回日本外科学会定期学術集会、2011 年 5 月 26 日、東京
- ⑱ 坂田直昭, 小玉哲也, 陳鋭, 吉松軍平, 後藤昌史, 江川新一, 海野倫明、超音波検査による移植膵島の機能評価、第 38 回日本膵・膵島移植研究会、2011 年 3 月 4 日、奈良
- ⑲ 坂田直昭, 元井冬彦, 林 洋毅, 江川新一, 海野倫明, 後藤昌史, 里見 進, 山口 賢, 岡 芳知, 廣田衛久, 下瀬川徹、急性膵炎をくり返す膵動静脈奇形症例に対し自家膵島移植を施行した自験報告、第 45 回東北膵臓研究会、2011 年 2 月 4 日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤田 昌紀 (AKADA MASANORI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：20375075

(2) 研究分担者

江川 新一 (EGAWA SHINICHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00270679

小玉 哲也 (KODAMA TETSUYA)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号：40271986

(3) 連携研究者

()

研究者番号：