

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 6 月 1 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591651

研究課題名（和文） 収束超音波を用いた軟部肉腫の治療について

 研究課題名（英文） An experimental treatment of soft tissue sarcoma by HIFU
(high-intensity focused ultrasound)

研究代表者

永澤 博幸 (NAGASAWA HIROYUKI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：50375284

研究成果の概要（和文）：収束超音波(HIFU)による軟部肉腫に対する抗腫瘍効果の解析，特に腫瘍免疫学的効果の解析について，Sarcoma 180 細胞をマウス背部皮下に接種することで得られた固形肉腫を対象に行った。得られたマウス背部固形肉腫に対し出力 10W の HIFU を 10 秒間単回照射し，以下の結果を得た。(1)腫瘍径・生存率：照射群における腫瘍径の増大は非照射群に比べ抑制され，生存率が良好であった，(2)アポトーシス：照射群の腫瘍細胞の旺盛なアポトーシスが観察された，(3)CD4・CD8 陽性リンパ球の発現：照射群で集簇性の浸潤が観察された，(4)腫瘍関連マクロファージの発現：照射群では腫瘍周囲を中心として TRAP 染色陽性で多核のマクロファージの浸潤が認められた，(5)マクロファージ遊走抑制因子の発現：照射群ではマクロファージ遊走抑制因子の発現が抑制された。以上より，マウス固形肉腫に対し収束超音波を単回照射することにより，腫瘍壊死のみならず抗腫瘍免疫の活性化を介して残存腫瘍に対する抗腫瘍効果が得られると考えられた。

研究成果の概要（英文）：High-intensity focused ultrasound (HIFU) therapy offers great promise for the treatment of cancer. The histological changes, including the antitumor immunological response, after HIFU treatment was examined in soft tissue sarcoma. Materials and Methods: Sarcoma 180 cells were injected subcutaneously in mice. Approximately 2 weeks after the injection, the tumor was irradiated by a single shot of HIFU. The tumor diameter was measured and the survival rate was observed after treatment. The tumors were resected, and stained with TUNEL stain, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) stain to detect tumor-associated macrophages, and immunohistochemical stains for CD4 and CD8. Results: The tumor size in the HIFU group was significantly smaller than the control and survival rate was significantly higher. The numbers of TUNEL-, TRAP-, CD4- and CD8-positive cells infiltrating the tumor were significantly higher in the HIFU group. Conclusion: HIFU, even when administered as a single shot, induces apoptosis of tumor cells and intratumoral infiltration of macrophages and lymphocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000

年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：外科系臨床医学・整形外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：HIFU, Ultrasound, Sarcoma, Treatment

1. 研究開始当初の背景

超音波による腫瘍の治療には主に2つの方法がある。一つが、超音波と音響感受性物質（超音波により励起され、抗腫瘍作用を発現する物質）を併用する音響学的療法であり、もう一つが、超音波の熱エネルギーを腫瘍に収束させて治療する収束超音波（High Intensity Focused Ultrasound; HIFU）治療である。超音波を収束させる技術と超音波画像性能が進歩し、正確な範囲内に強力なHIFUを照射できる時代になった。現在、乳癌、前立腺癌、子宮筋腫などにHIFU治療が行われるようになったものの、四肢軟部肉腫においては臨床応用されていない。また、熱による照射部位の腫瘍壊死については報告されているものの、HIFUによる抗腫瘍効果の機序に関しては未知の点が多く、基礎的検討が必要であった。

2. 研究の目的

軟部肉腫モデルマウスに対するHIFUの効果をin vivoで確認することにより、免疫学的作用や補助療法を併用した抗腫瘍作用を検討すること。

3. 研究の方法

収束超音波は長さ8.5 mm、幅1.0 mmの照射野に収束可能なトランスデューサーを用いた。Sarcoma 180細胞 3.0×10^5 個をマウス背部皮下に注入し、腫瘍径が1.5 cmとなった時点でペントバルビタールで麻酔し、脱気水中で腫瘍の中心部に10 W、10秒間の照射を1回のみ行った。照射しなかった群を対照群とし、照射後1, 3, 7, 14日目（腫瘍径については1, 3, 7, 14, 21, 28日目）に以下の項目を検討した。(1)腫瘍径および生存率、(2)腫瘍組織のTUNEL染色陽性細胞数、(3)腫瘍組織のCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞数、(4)腫瘍組織のTRAP染色陽性細胞数、(5)腫瘍組織のMIF陽性細胞数

4. 研究成果

(1)腫瘍径および生存率

7日目までは両群間の腫瘍径に有意差は認めなかったものの、14日目では対照群が 24.0 ± 6.5 mmであったのに対し、照射群は 14.5 ± 3.4 mm、21日目対照群が 33.8 ± 9.0 mm、

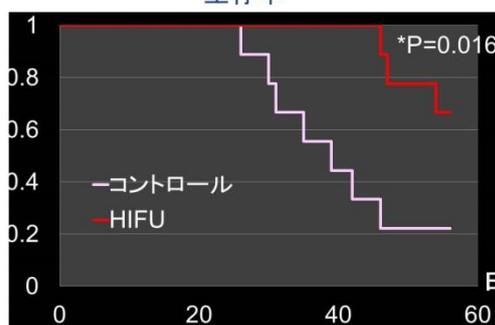
21日目照射群が 16.2 ± 6.1 mm、28日目対照群が 43.5 ± 12.2 mm、28日目照射群が 18.8 ± 7.3 mmであり、照射群は経時的に腫瘍増大が抑制された。

最大腫瘍径



Kaplan-Meier法で両群間の生存率を比較したところ、8週の時点で対照群23%であったのに対し、照射群は67%であった。

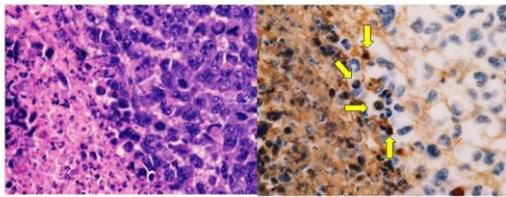
生存率



(2) TUNEL陽性細胞数

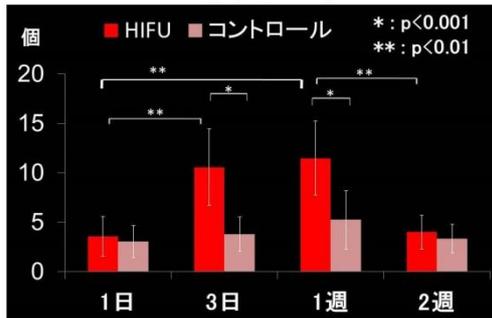
腫瘍組織のTUNEL染色により、TUNEL陽性細胞数を測定した。TUNEL陽性細胞数(個/視野)は、照射後1日目における対照群が 3.03 ± 1.62 、照射群が 3.58 ± 2.02 、3日目における対照群が 3.80 ± 1.73 、照射群が 10.55 ± 3.86 、7日目における対照群が 5.25 ± 2.95 、照射群が 11.48 ± 3.77 、14日目における対照群が 3.35 ± 1.46 、照射群が 4.00 ± 1.70 であり、HIFUによる腫瘍細胞のアポトーシス誘導が示唆された。

TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)染色(照射1週後)



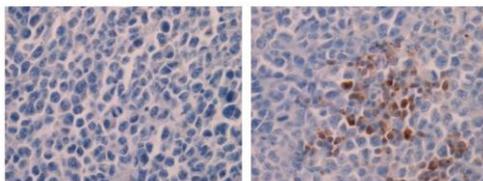
H-E TUNEL

TUNEL陽性細胞数



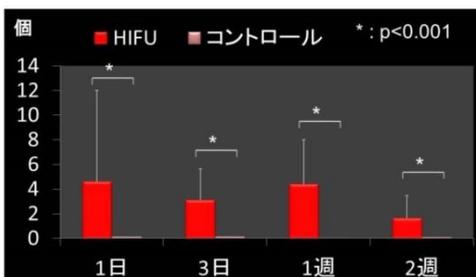
(3) CD4 陽性細胞数, CD8 陽性細胞数
腫瘍組織の免疫染色により, CD4 陽性細胞数および CD8 陽性細胞数を測定した。CD4 陽性細胞数(個/視野)は, 照射後 1 日目における対照群が 0.13 ± 0.43 , 照射群が 4.59 ± 7.12 , 3 日目における対照群が 0.15 ± 0.76 , 照射群が 3.13 ± 2.51 , 7 日目における対照群が 0.05 ± 0.22 , 照射群が 4.38 ± 3.64 , 14 日目における対照群が 0.10 ± 0.39 , 照射群が 1.65 ± 1.82 であった。

CD4



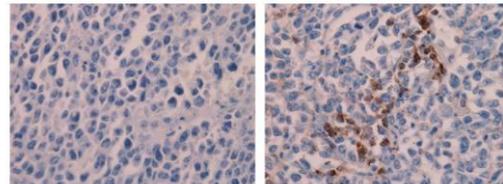
control HIFU

CD4陽性細胞数



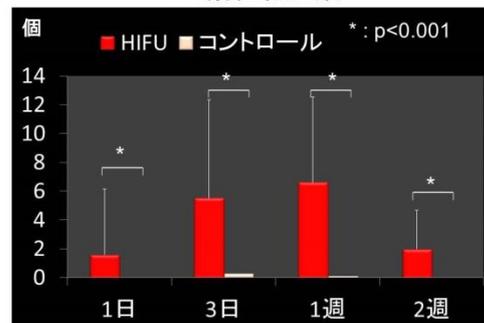
CD8 陽性細胞数(個/視野)は, 照射後 1 日目における対照群が 0.03 ± 0.18 , 照射群が 1.59 ± 4.58 , 3 日目における対照群が 0.26 ± 0.86 , 照射群が 5.50 ± 6.84 , 7 日目における対照群が 0.10 ± 0.35 , 照射群が 6.60 ± 5.96 , 14 日目における対照群が 0.03 ± 0.16 , 照射群が 1.98 ± 2.68 であり, HIFU による T リンパ球を介した免疫学的抗腫瘍効果の存在が示唆された。

CD8



control HIFU

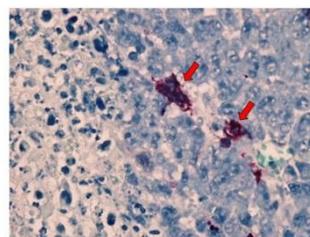
CD8陽性細胞数

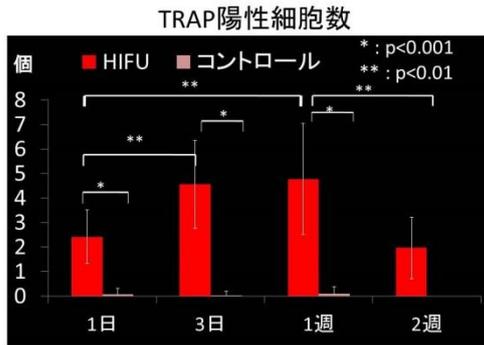


(4) TRAP 陽性細胞数

腫瘍組織の TRAP 染色により, TRAP 陽性細胞数を測定した。TRAP 陽性細胞数(個/視野)は, 照射後 1 日目における対照群が 0.07 ± 0.25 , 照射群が 2.42 ± 1.10 , 3 日目における対照群が 0.03 ± 0.18 , 照射群が 4.56 ± 1.80 , 7 日目における対照群が 0.09 ± 0.29 , 照射群が 4.78 ± 2.28 , 14 日目における対照群では TRAP 陽性細胞が認められなかったのに対し, 照射群が 1.97 ± 1.27 であり, HIFU によるマクロファージを介した免疫学的抗腫瘍効果の存在が示唆された。

TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase)染色

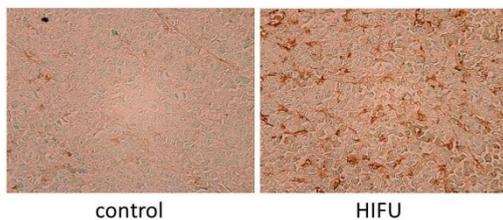




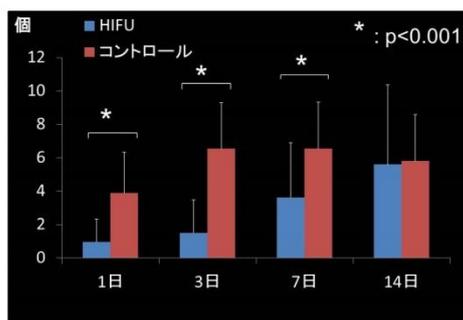
(5) MIF 陽性細胞数

近年、増殖能が亢進している腫瘍ではマクロファージ遊走抑制因子(MIF)が過剰発現していることが報告されている。腫瘍組織の抗MIF抗体を用いた免疫染色により、MIF陽性細胞数(個/視野)は、照射後1日目における対照群が 3.98 ± 2.12 、照射群が 0.95 ± 1.39 、3日目における対照群が 6.36 ± 3.02 、照射群が 1.51 ± 1.96 、7日目における対照群が 6.32 ± 3.03 、照射群が 3.63 ± 3.27 、14日目における対照群が 5.69 ± 2.68 、照射群が 5.60 ± 4.77 であった。

MIF



MIF陽性細胞数



マウス固形軟部肉腫に収束超音波を照射することにより照射部周囲のTリンパ球やマクロファージ発現を促進し、マクロファージ遊走抑制因子の発現を抑制した。収束超音波の熱作用による直接的な抗腫瘍効果のほかに、腫瘍免疫の賦活化による抗腫瘍効果も示唆された。

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)

[学会発表] (計1件)

①千田秀一, 岡田恭司, 永澤博幸, 島田洋一: 収束超音波部分照射後のマクロファージの浸潤とマクロファージ遊走抑制因子の発現について. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010年10月, 京都市

[その他]

[招待講演]

永澤博幸: 収束超音波による軟部肉腫治療の試み. 第2回秋田・札幌合同整形外科セミナー(日本整形外科学会教育研修講演), 2012年4月, 秋田市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永澤 博幸 (NAGASAWA HIROYUKI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号: 50375284

(2) 研究分担者

岡田 恭司 (OKADA KYOJI)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 10185431