

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670632

研究課題名(和文)悪性神経膠腫に対するALA-PET誘導式音響力学療法の開発

研究課題名(英文)Development of ALA-PET guided sonodynamic therapy for malignant gliomas

研究代表者

小林 浩之(KOBAYASHI, HIROYUKI)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：70374478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性神経膠腫は難治性悪性腫瘍で手術や放射線化学療法を行っても予後は不良である。そこでこれまでとは異なる治療法の開発が必要とされてきた。今回我々の研究グループは超音波とそれに反応する音響感受性物質を組み合わせた音響力学療法の効果を悪性神経膠腫細胞株を用いて行った。音響感受性物質としてアミノレブリン酸などのポルフィリン関連物質を用いた。結果、神経膠腫細胞に対して音響力学療法に殺細胞効果があることが証明され、さらにアポトーシス誘導がその細胞障害のメカニズムであり、その程度はポルフィリン製剤の細胞取り込みの量に依存することが確認された。本結果から音響力学療法が新規治療として有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Malignant glioma is a poor prognosis cancer despite of multidisciplinary treatment such as aggressive surgery and chemoradiotherapy. Thus there has been a need for new therapeutic approaches to control deeply migrated tumor cells. For this aim, we investigated the efficacy of sonodynamic therapy (SDT) using sonosensitizers including 5-aminolevulinic acid, protoporphyrin, and talaporfin sodium on glioma cells. These substances have been known to be accumulated in glioma cell and are expected to have cytotoxic effect by sonication. Our in vitro study demonstrated that the cytotoxicity of sonication on glioma cells was enhanced by each sonosensitizers. And induction of apoptosis was suggested to be a major mechanism of cell death. While the efficacy of SDT may be depend on the degree of intracellular accumulation of sonosensitizer. Though further investigations will be necessary, our preliminary result showed a potential of STD with sonosensitizers for glioma treatment.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：神経膠腫 音響力学療法 ポルフィリン誘導体 アミノレブリン酸 PET 超音波

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫に代表される悪性神経膠腫は原発性脳腫瘍で最も有病率が高く、固形癌の中で最も低い5年生存率(6.9%)を呈する。本疾患に対する標準治療は、可及的腫瘍切除に次ぐ放射線化学療法であるが、治療後も90%が原発巣の2cm以内に局所再発を来す。このため近年、局所への補助療法として脳内留置用抗腫瘍薬(ギリアデル®)や、抗VEGFヒト化モノクローナル抗体(アバスチン®)が登場し、標準治療への上乗せ効果が証明されたが、十分な生存期間の延長には至っていない。ここで我々がまず着目したのが光線力学療法(Photodynamic Therapy: PDT)であり、いくつかの基礎研究を行い報告してきた。これは標的腫瘍細胞に特異的に集積した光感受性物質(Pp)が特定波長のレーザー光の照射によって励起し、これが基底状態に戻る際に活性酸素を発生することを利用して、標的腫瘍細胞に酸化的損傷を引き起こすといったものである。この治療法は毒性が低く、かつ長期的に反復実施が可能であるが、レーザー光は組織深達度が浅いため皮膚癌などの浅部の腫瘍では有効である一方、脳腫瘍においては開頭後に腫瘍の蛍光部分を視認し、これに直接レーザー光を照射するといった方法に局限されている。Ppは超音波照射によっても同様に励起して活性酸素を発生することは知られており、レーザー光に比して超音波は圧倒的に組織深達度に優れていることから、深部の腫瘍に対して効率的に治療が可能と考えられた。

2. 研究の目的

本研究は悪性神経膠腫に対する新規補助療法となり得る音響力学療法の確立を目的としたin vitroでの検討である。ここで意味する音響力学療法は、これまでの超音波治療の基本原理である熱凝固を用いたものではなく、超音波によって励起され活性酸素を発生する

音響感受性物質を触媒とした治療を指す。音響感受性物質としては、既に術中蛍光診断や光線力学療法などで臨床応用されているアミノレブリン酸(ALA)に着目した。ALA自身は音響感受性物質ではないが、腫瘍細胞に選択的に取り込まれて代謝されることで、音響感受性を有するプロトポルフィン(Pp)が生成されることはこれまでの研究で立証されている。また同時に、ALAの腫瘍特異的な集積を生かして、PET用の新規アミノ酸トレーサーの開発・実用化を目指す。これによってALA-PETを用いた照射部位の設定が可能となり、より正確な治療計画を立案できる。

3. 研究の方法

(1) ALA-SDTの抗腫瘍効果のin vitroでの比較検討

細胞培養

ヒト膠芽腫細胞株U87(ATCC® the American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA)を10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS; GIBCO™, NY, USA)、100 U/mlのpenicillin Gと100 µg/mlのstreptomycin(SIGMA®, MO, USA)を含むDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM; GIBCO™, NY, USA)内で単層培養する。培養環境は37℃、100% relative humidity、95% air、5% CO₂とする。70% confluenceとなった段階で接着細胞をトリプシン処理して、MULTIWELL™ 6 well(BD FALCON®, NJ, USA)に播種した各5×10⁵、1×10⁶、2×10⁶ cells/wellの単層培養細胞を用いる。

超音波感受性物質

アミノレブリン酸(5-Aminolevulinic acid hydrochloride; COSMO BIO Co., Ltd, Tokyo, Japan)ならびにγ-アミノレブリン酸メチル塩酸塩(Methyl γ-aminolevulinate hydrochloride; Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan)を用いる。これらは4℃暗所で保存し、使用1時

間前にDMEM で各0, 10, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ に希釈する。これらを各1, 2, 4 時間、上記培養環境下で共培養した後、各々のwell に対して超音波照射を行う。

(2) 非熱的作用を誘導する超音波の至適条件の獲得

超音波照射

これまでの音響力学療法に関する我々の基礎研究では照射装置は民生機を使用してきたが、照射データの満足できる再現性を得ることができなかった。このため照射装置は本学情報科学研究科人間情報工学研究室と共同で開発し、現在その調整を行う。照射条件は上記論文を踏襲して、Peak intensity: 0.4 - 1.2 W/cm^2 , Resonant frequency: 1.0 MHz, Duty ratio: 50 %, Exposure duration: 5sec - 2 min, プレート温: 37 $^{\circ}\text{C}$ 以内で想定しており、他の文献報告を参照して超音波照射の際に発生する熱を可能な限り排除するよう水槽型の装置とした。

抗腫瘍効果の判定

照射24時間後にCell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) を用いて細胞増殖/毒性を判定する。抗腫瘍効果は% Survival rate = $[\text{absorbance of treated group} / \text{absorbance of control group without any treatment}] \times 100$ の公式で算出する。

免疫染色

蛍光顕微鏡 (IX71+U-LH100HGAP0; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて評価する。照射前, 24 時間後にCalcein AM/Ethidium homodimer costaining kit (Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit[®]; Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて生細胞/死細胞を観察する。

4 . 研究成果

悪性神経膠腫は難治性悪性腫瘍で手術や放射線化学療法を行っても予後は不良である。そこでこれまでとは異なる治療法の開発が必要とされてきた。今回我々の研究グループは超音波とそれに反応する音響感受性物質を組み合わせた音響力学療法の効果を悪性神経膠腫細胞株を用いて行った。音響感受性物質としてアミノレブリン酸などのポルフィリン関連物質を用いた。結果、神経膠腫細胞に対して音響力学療法に殺細胞効果があることが証明され、さらにアポトーシス誘導がその細胞障害のメカニズムであり、その程度はポルフィリン製剤の細胞取り込みの量に依存することが確認された。本結果から音響力学療法が新規治療として有望であ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 1 件)

Porphyrin derivatives-mediated sonodynamic therapy for malignant gliomas in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 2015 Sep;41(9):2458-65. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.05.007. Epub 2015 Jun 10.
Endo S, Kudo N, Yamaguchi S, Sumiyoshi K, Motegi H, Kobayashi H, Terasaka S, Houkin K.

[学会発表](計 5 件)

悪性神経膠腫細胞株に対するポルフィリン誘导体を用いた音響力学療法 (一般口演) 2015/11/28 第14回日本超音波治療研究会高知市文化プラザかるぼーと(高知市)

遠藤将吾、工藤信樹、山口秀、住吉洸城、茂木洋晃、金子貞洋、小林浩之、寺坂俊介、寶金清博

悪性神経膠腫細胞株に対するポルフィリン誘導体を用いた音響力学療法（一般口演）
2015/10/15 日本脳神経外科学会第74回学術総会 ロイトン札幌、さっぽろ芸術文化の館、札幌市教育文化会館（札幌市）
遠藤将吾、工藤信樹、山口秀、住吉洗城、茂木洋晃、金子貞洋、小林浩之、寺坂俊介、寶金清博

悪性神経膠腫細胞株に対するポルフィリン誘導体を用いた音響力学療法（一般口演） 2015/8/7 第2回アコースティックイメージング研究会 北海道大学（札幌市）

遠藤将吾、工藤信樹、山口秀、住吉洗城、茂木洋晃、金子貞洋、小林浩之、寺坂俊介、寶金清博

悪性神経膠腫細胞株に対するポルフィリン誘導体を用いた音響力学療法（一般口演） 2015/6/5 第34回日本脳神経超音波学会総会 京都テルサ（京都市）

遠藤将吾、工藤信樹、山口秀、住吉洗城、茂木洋晃、金子貞洋、小林浩之、寺坂俊介、寶金清博

Porphyrin Derivatives Mediated Sonodynamic Therapy on Malignant Glioma Cells in Vitro（一般口演） 2014/11/16 2nd International ALA and porphyrin Symposium 東京大学医科学研究所（東京都）

Shogo ENDO, Nobuki KUDO, Shigeru YAMAGUCHI, Hiroyuki KOBAYASHI, Shunsuke TERASAKA, Kiyohiro HOUKIN

〔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

小林 浩之（KOBAYASHI HIROYUKI）

北海道大学・北海道大学病院・講師

研究者番号：70374478

(2) 研究分担者

寺坂 俊介（TERASAKA SHUNSUKE）

北海道大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10447055

工藤 信樹（KUDO NOBUKI）

北海道大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：30271638

志賀 哲（SHIGA TORU）

北海道大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80374495

(3) 連携研究者

（ ）