

令和元年6月17日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10343

研究課題名(和文) IVR技術による標的組織の微小循環系の制御を利用した抗腫瘍療法の開発

研究課題名(英文) An experimental study of control of the tumor microcirculation using interventional radiology techniques

研究代表者

香田 渉 (Koda, Wataru)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30401920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ICGを注入して光音響イメージングを行うことにより、生体内の腫瘍および組織におけるICGの血管外漏出像を観察することが可能であり、組織の血管透過性の変化をリアルタイムに画像的に評価する手法を確立することができた。また、光音響イメージングにより生体内の組織酸素飽和度を評価することが可能であり、虚血再灌流24時間後の腎酸素飽和度はその後の腎組織障害度に相関した。CO₂の動注により肝内動脈枝は拡張し、肝の腫瘍濃染は明瞭化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌自然発生モデルラットの作成ならびに血管造影手技を成功させ、原発性肝癌に対するIVRの動物実験系を確立した。また、光音響イメージングによる生体内での腫瘍の血管透過性ならびに組織酸素飽和度のリアルタイム評価法を確立したことは、今後の腫瘍微小循環系に関するin vivo実験に大きく寄与する。さらに、光音響イメージングにより、治療による血管透過性の変化をいち早く検出できること、早期の組織酸素飽和度の評価がその後の組織障害度と相関することを示したことは、微小環境の制御と評価が新しい治療の開発に重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Photoacoustic imaging with ICG administration can demonstrate extravasation of ICG in mouse organs and tumors, indicating the potential for real-time detection of changes in vascular permeability by image evaluation. Oxygen saturation, measured by photoacoustic imaging at 24 h after acute kidney injury can predict the extent of subsequent histological alterations in the kidney early after injury. The hepatic arterial small branches are dilated by injection of CO₂ bubbles. As a consequence, the visualization of hepatic tumor stain can improve somewhat.

研究分野：放射線科学

キーワード：IVR 癌 血管透過性 微小環境 光音響イメージング

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療において、標的組織に対して作用物質を空間的、時間的、量的に制御することは重要である。組織には毛細血管が張り巡らされているので、血管系を介して作用物質を標的組織に送達することは効率的である。この点において、IVR 技術を利用した超選択的な経動脈的投与の手法は非常に有用であると考えられ、癌治療の臨床において一定の成果も収めている。

これまでに我々の教室では、病理組織学的検討および画像解析により、肝腫瘍を中心とした腫瘍血管の解剖ならびに血行動態を明らかにしてきた。また、生体顕微鏡を用いて肝腫瘍における微小血行動態の変化も明らかにしてきた。肝細胞癌に対する樹状細胞免疫療法では、樹状細胞の経動脈的投与と動脈塞栓を併用した細胞移入の臨床試験を行い、その基礎的根拠を確認するため、血管内投与した標識樹状細胞の生体内分布ならびに動態を経時的に追跡する動物実験も行ってきた。さらに血管作動性物質の肝疾患や病態形成への関与や血管新生および血管障壁機能についての基礎的研究も行い、血管作動性物質の役割や微小循環が治療の標的となり得ることについても明らかにしてきた。また、小動物用超音波システムを用いた光音響画像による非侵襲的生体内血管透過性の評価法も確立した。

以上の研究動向と我々の研究成果を踏まえて、従来の DDS 開発のアプローチに加えて、標的組織の微小循環系を制御することでより効率的な DDS を実現し、抗腫瘍療法に応用するという新しい着想に至った。また、研究を進めるなかで、まず腫瘍の組織血管透過性ならびに組織酸素飽和度の変化をリアルタイムに評価する手法を確立することが、この種の研究と治療開発において重要であることに気付いた。

2. 研究の目的

IVR 技術を用いて、標的組織の微小循環制御により drug delivery の効率化と治療効果の増強を図る新しい抗腫瘍療法の開発を目指す。そのための基礎的研究として、(1) ヒト肝細胞癌に近い肝癌自然発生モデルラットの安定した作成とラットにおける経血管的 IVR 手技の確立すること、(2) 生体内における腫瘍の血管透過性について、光音響画像を用いてリアルタイムに画像的に評価する手法を確立すること、(3) 生体内における組織酸素飽和度について、光音響画像を用いてリアルタイムに画像的に評価する手法を確立し、その意義を明らかにすること、(4) 血管作動性物質が組織の循環系に及ぼす影響を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝癌自然発生モデルラットの作成ならびに血管造影手技の確立：4~5 週 Wister 系ラットに対して 0.01% DEN を 12 週間連続給餌と与えることにより原発性肝癌を誘発した。頸部で外科的に内頸動脈を露出し、目視下でマイクロカテーテルを導入した。さらに腹腔動脈を選択してマイクロインジェクターにて造影剤を注入し、ラット肝臓および原発性肝癌の DSA を撮像した。なお、カテーテルは小動物用に特注して作成した 1.7Fr マイクロカテーテルを用いた。

(2) 光音響画像を用いた生体内における腫瘍血管透過性の評価：光音響画像は小動物用超音波

画像システム (Vevo LAZR) を用いて撮像した。C57BL6/J および B6N-Tyrc-Brd/ BrdCrCrl アルビノマウス雄に対して、Lewis lung carcinoma (LLC) cell を継代培養後に皮下に植え込み、腫瘍が直径 1 cm になるまで飼育した。超音響画像は、肝臓、腎臓、唾液腺、下大静脈そして植え込んだ腫瘍に対して ICG を用いて撮像した。尾静脈より自動注入器を用いて ICG を注入し、近赤外光波長 780nm、超音響ゲイン 42-dB、フレームレート 5fr/s で呼吸同期を用いて撮像した。ICG 注入後 10 分間観察し、シグナルの peak 値を比較した。また、腫瘍に対して異なる濃度の ICG (1、2.5 および 5 mg/ml) を用いた撮像も行った。さらに、抗血管新生阻害薬による変化を確認するため、VEGF-trap を腹腔内投与した群でも ICG を注入してシグナルの peak 値を比較した。ICG の血管外への移行について組織学的検討も行った。凍結切片で血管内皮および核染色を行い、組織中の ICG を fusion させて、近赤外光対応の蛍光顕微鏡システムで評価した。

(3) 超音響画像を用いた生体内における組織酸素飽和度と組織障害度の評価：血液中の酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンが吸収する 2 つの波長 (750 nm/ 850nm) を用いて、超音響画像によりそれぞれの近赤外光の吸収程度の差を画像化した。C57Bl/6N マウスを用いて腎臓虚血再灌流モデルを作成した。35 分間および 50 分間の虚血後に再灌流し、それぞれ重度虚血および軽度虚血モデルとした。再灌流 4 時間後、8 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後に超音響画像による画像評価を行い、28 日後に腎臓容積、腎機能の変化および組織障害度を評価した。再灌流 12 時間後、24 時間後においては別群を設け、組織内の一酸化窒素(NO)と H₂O₂ 濃度を評価した。その際、NO 合成阻害薬(L-NAME)を投与した上での濃度および組織酸素飽和度の評価も行った。

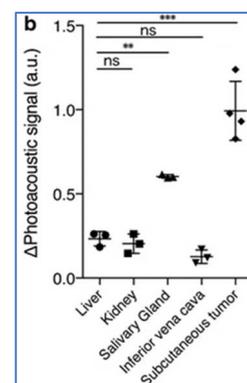
(4) 血管作動性物質が組織の循環系に及ぼす影響の評価：作成した DEN 誘発肝癌ラットを用い、血管拡張薬 (アルプロスタジル) や炭酸ガスの投与前後での総肝動脈造影 DSA を撮像した。DSA 画像は ImageJ software (NIH) を用いて解析処理、定量化を行った。

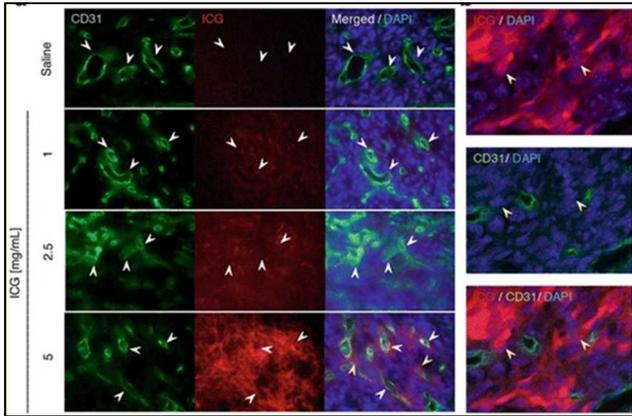
4. 研究結果

(1) 肝癌自然発生モデルラットの作成ならびに血管造影手技の確立

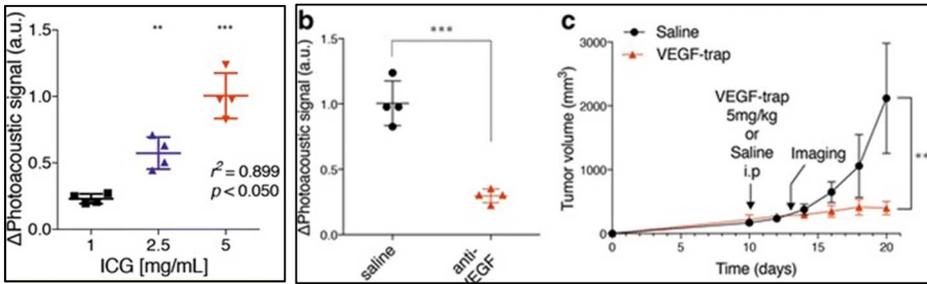
Wister 系ラットに対して 0.01% DEN を 12 週間連続給餌で与えることで、ヒト肝細胞癌に近い原発性肝癌自然発生モデルラットの作成に成功した。また、小動物に適した短小な細径マイクロカテーテルを新たに作成し、このカテーテルを用いた経動脈的カテーテル操作の習熟に努めることで、ラットを用いた選択的肝動脈造影下での実験が可能となり、原発性肝癌モデルで肝動脈造影あるいは肝動注を伴う IVR 手技の実験系が確立された。

(2) 超音響画像を用いた生体内における腫瘍血管透過性の評価：超音響画像では、最も ICG 濃度が高いはずの血管 (下大静脈) や多血性臓器 (肝臓、腎臓) で信号が乏しく、腫瘍などの血管透過性が高い組織で信号が強かった (右図)。これは、蛍光カメラによる ICG 動態評価や CT・MRI での造影評価とは異なる。超音響画像の性質上、血管内は subtraction され、





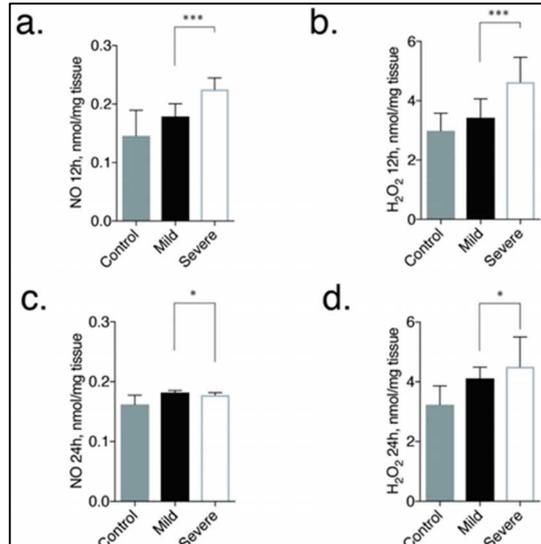
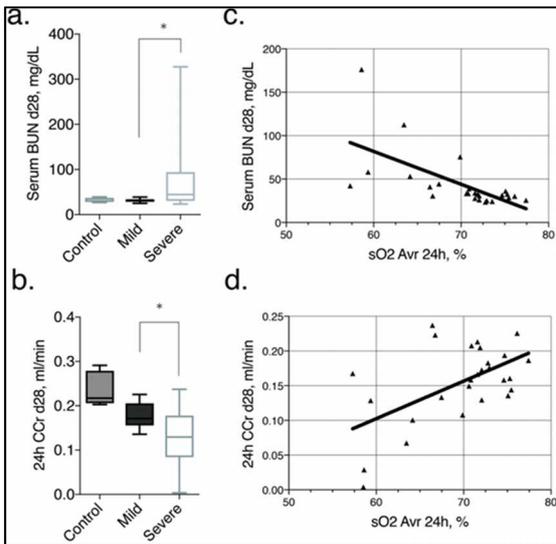
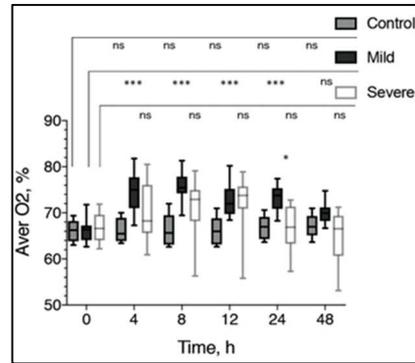
標的組織の血管外（間質や細胞など）の情報を中心に拾っていると考えられる。組織学的に ICG は血管周囲間質あるいは細胞内に存在し、ICG 投与濃度の上昇に伴い組織 ICG 量も増加した（左図）。光音響画像によるシグナルも ICG 投与濃度に依存して増強した（下左図）。画像が組織変化に対応していたと同時に、腫瘍内において血管外への漏出像を優位に



描出していると考えられた。抗血管新生阻害薬（VEGF-trap）を投与すると、腫瘍サイズ

が縮小する前段階でシグナルが減少し、血管のいわゆる正常化を示唆すると考えられた（上右図）。また、ICG 投与後、光音響画像で評価することにより、血管透過性を評価しうる可能性を示す結果であった。

(3) 光音響画像を用いた生体内における組織酸素飽和度の評価：光音響画像による虚血再灌流後の画像化および酸素飽和度の定量化評価では、軽度虚血では再灌流後直後～24 時間後にかけて組織酸素飽和度が高いが、重症虚血では再灌流直後～24 時間後に高～低値であるものが不均一に含まれていた（右図）。重度虚血群では腎機能が悪化した

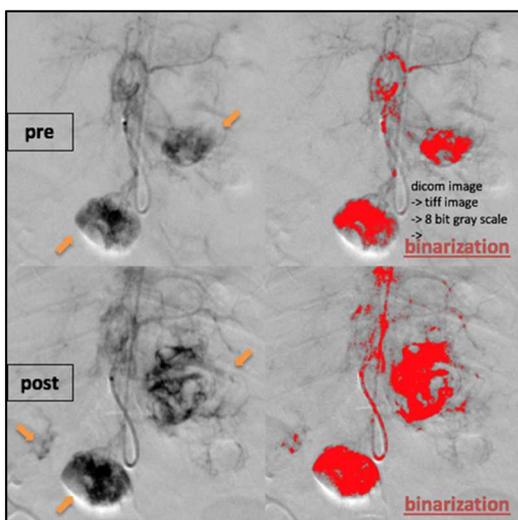


が、虚血再灌流 24 時間後の酸素飽和度と組織障害度に相関関

と相関関

係が見られ（前頁下左図）、虚血再灌流後の腎機能予後を再灌流直後に予測できる可能性が示唆された。重度虚血では、再灌流 12 時間後に NO および H₂O₂ は上昇し、24 時間後には H₂O₂ が上昇している一方、NO は低下した（前頁下右図）。12 時間後には強い組織障害が生じていると同時に血管拡張状態にあり、24 時間後にはそれらが収束して組織障害としてほぼ完成したものと考えられた。また、それにより 24 時間後に組織酸素飽和度に差が見られ、慢性期の腎機能と関連したものと考えられた。

(4) 血管作動性物質が組織の循環系に及ぼす影響の評価：原発性肝癌モデルラットの固有肝動



脈から、CO₂ 投与前後で DSA を撮像すると、CO₂ 投与後に腫瘍濃染が明瞭となった（左図）。ImageJ を用いた定量化評価においても、腫瘍の濃染程度は CO₂ 投与後に優位な上昇を呈した。また、A-P シャントや A-V シャントといった様々な血管吻合を開通させやすい傾向もみられた（右図）。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Okumura K, Matsumoto J, Iwata Y, Yoshida K, Yoneda N, Ogi T, Kitao A, Kozaka K, Koda W, Kobayashi S, Inoue D, Sakai N, Furuichi K, Wada T, Gabata T. Evaluation of renal oxygen saturation using photoacoustic imaging for the early prediction of chronic renal function in a model of ischemia-induced acute kidney injury. PLoS One. 2018 Dec 17;13(12):e0206461. (査読有)
2. Okumura K, Yoshida K, Yoshioka K, Aki S, Yoneda N, Inoue D, Kitao A, Ogi T, Kozaka K, Minami T, Koda W, Kobayashi S, Takawa Y, Gabata T. Photoacoustic imaging of tumour vascular permeability with indocyanine green in a mouse model. Eur Radiol Exp. 2018;2(1):5. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. Matsumoto J, Ogi T, Okumura K, Minami T, Koda W, Gabata T. The Effect of Carbon Dioxide Gas for Hypervascular Liver Tumors on abdominal Angiography: an Experimental Study of Rats. CIRSE 2018. September 22-25, 2018 (Lisbon)
2. 奥村健一郎, 吉田耕太郎, 井上 大, 米田憲秀, 松本純一, 北尾 梓, 扇 尚弘, 小坂一斗,

香田 渉, 小林 聡, 蒲田敏文. 腎虚血再灌流時の腎機能予後早期診断への超音響画像による腎組織酸素飽和度の評価の有用性. 第 77 回日本医学放射線学会総会. 2018 年 4 月 13～15 日 (横浜)

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権] (計 0 件)

該当なし

[その他] (計 0 件)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：蒲田 敏文

ローマ字氏名：(GABATA, toshifumi)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：教授

研究者番号：00169806

研究分担者氏名：吉田 耕太郎

ローマ字氏名：(YOSHIDA, kotaro)

所属研究機関名：金沢大学

部局名：医学系

職名：助教

研究者番号：30645130

研究分担者氏名：南 哲弥

ローマ字氏名：(MINAMI, tetsuya)

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号：60436813

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。