

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18799

研究課題名(和文)3次元培養系でのソノポレーションの機序解明とシスプラチンの抗腫瘍効果増強

研究課題名(英文)Spatial-Temporal profile of ultrasound-mediated cisplatin delivery

研究代表者

佐々木 東(SASAKI, Noboru)

北海道大学・獣医学研究科・助教

研究者番号：00754532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ドラッグデリバリーはガン組織での抗がん剤濃度を高め、正常な組織を保護することができる技術である。超音波と微小気泡を用いる「ソノポレーション」もその1つである。この組み合わせは既に診断法として普及しているため、安全であり臨床応用に近い。これまで、抗がん剤がどのくらいの距離までデリバリーできるか、抗がん剤がデリバリーできる時間は不明であった。本研究では動物を使わない3次元培養使い、1回のソノポレーションによって100 μmまでデリバリー可能であり、なおかつデリバリー可能時間は1時間と明らかにした。今後、この結果に基づき、臨床応用するための治療プロトコルを作成することができる。

研究成果の概要(英文)：Ultrasound-triggered microbubble cavitation is a promising tool for drug and gene delivery in cancer therapy. We evaluated the temporal and spatial profile of cisplatin delivery by ultrasound-triggered microbubble cavitation. We used a bladder cancer mimicking 3D culture model for this study. Single treatment of ultrasound-triggered microbubble cavitation increased an intracellular concentration of cisplatin at the thickness of 100 μm. The duration of enhanced delivery was 1 hr. Based on the distance and duration of delivery, we further tested the feasibility of repetition of the treatment. Triple treatment increased the effective distance by 2-fold. Our results clearly showed spatial and temporal profile of delivery by ultrasound-triggered microbubble cavitation in a tumor-mimicking structure. The results of this study suggest that ultrasound-triggered microbubble cavitation can be repeatable and is promising for cancer treatment.

研究分野：獣医学

キーワード：超音波治療 ドラッグデリバリー 細胞内薬剤濃度

### 1. 研究開始当初の背景

超音波は非侵襲的かつリアルタイムモニタリングを行うことができ、医療でも獣医療でも重要な診断ツールである。非侵襲的に病変へのアプローチが可能な特徴ゆえに、超音波のがん治療への応用が非常に期待されている。超音波治療のメカニズムは機械的作用および化学作用、熱作用の3つに分類される。このうち機械的作用と化学作用を合わせ持つ超音波治療法として期待されているのが、超音波と微小気泡を併用するドラッグデリバリー法、「ソノポレーション(音響穿孔)」である。超音波が気泡を振動させる際に、気泡近傍の細胞の細胞膜透過性が亢進し(穿孔) 普段は細胞内に入りにくい薬剤や遺伝子を細胞内に導入することができる。超音波は非侵襲的に腫瘍局所へ照射できるため、ソノポレーションは非侵襲的かつ腫瘍細胞特異的な治療法である。

われわれはこれまでにソノポレーションの獣医臨床への応用を目指し基礎的な検討を行ってきた。そして、ソノポレーションの獣医臨床への応用を加速させるために、デリバリーの定量化を通し、ソノポレーションのメカニズム解明及び作用増強の戦略の構築を目指す研究に着手した。

### 2. 研究の目的

未だ有効な治療手段が確立されていない犬の膀胱癌に対する治療として、ソノポレーションによる抗がん剤デリバリー法の確立を目指す。膀胱は比較的体表に位置する臓器であり、内部に水(尿)を貯めているために超音波の減衰が少なく、治療対象として適する。さらに、医療でBCGの膀胱注入療法が存在するように、マイクロバブルの膀胱注入が可能である。ソノポレーションの機序を考えた場合、できるだけがん細胞の近くにマイクロバブルを位置させることは重要である。これまで我々の行ってきたソノポレーション研究は、単層培養のがん細胞を用いた殺細胞効果の評価、およびモデルドラッグとして蛍光色素の導入効率の評価、続いてマウス移植腫瘍モデルを用いた抗腫瘍効果の評価、という一般的な流れだった。しかしこの実験系には、

- 抗がん剤と蛍光色素との挙動が異なる
- 単層培養と移植腫瘍モデルの生物学的な差が大きすぎる

という問題点があった。これら2つの問題点を解決すべく3次元培養系を用い、以下の3点の解明を目指した。

- 抗がん剤デリバリーの定量
- デリバリーの空間的、時間的な拡がり
- デリバリー量と殺細胞効果の関連

### 3. 研究の方法

動物福祉の観点から動物実験を削減するため、膀胱癌を模した3次元培養系を作成した(図1)。膀胱癌株細胞を細胞外基質の1つ

である型コラーゲンに包埋した。

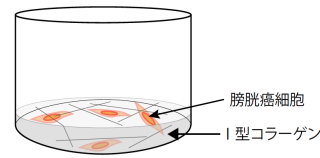


図1 3次元培養による膀胱癌モデル

この3次元培養系に対して、白金系抗がん剤シスプラチンをソノポレーションして殺細胞効果を判定した。さらに、抗がん剤デリバリーを検証するため、細胞内および細胞外の白金濃度を誘導結合プラズマ質量分析計(ICP-MS)によって定量した。

3次元培養系の厚みを変えることでソノポレーションの効果の及ぶ距離を解析した。また、超音波照射とシスプラチン投与の間隔を変えることで、1回のソノポレーションの効果が持続する時間も検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) デリバリーの検証

上述の3次元培養系にシスプラチン 6 μg/mLとマイクロバブル100 μLを含む培地を加え、ソノポレーションを行った。2日後に生細胞数を測定して、殺細胞効果を評価した。比較対照群として、無処置、マイクロバブル+超音波群、シスプラチンのみ、シスプラチン+超音波群の4群を設定した。

1回のソノポレーションにより厚さ100 μmまでシスプラチンの効果が増強された(図2)。また、その増強の持続時間は1時間までだった(図3)。さらに、ソノポレーションを30分置きに3回繰り返した場合、シスプラチンの効果増強は200 μmまで広がった(図4)。

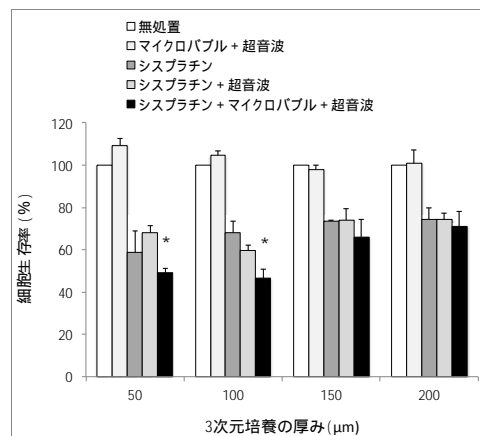


図2 3次元培養の厚さと殺細胞効果

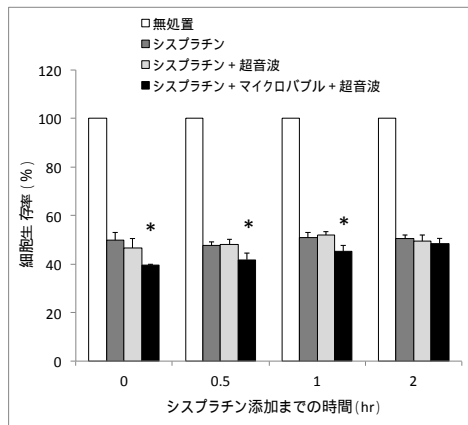


図3 超音波照射とシスプラチン添加の間隔が殺細胞効果に及ぼす影響

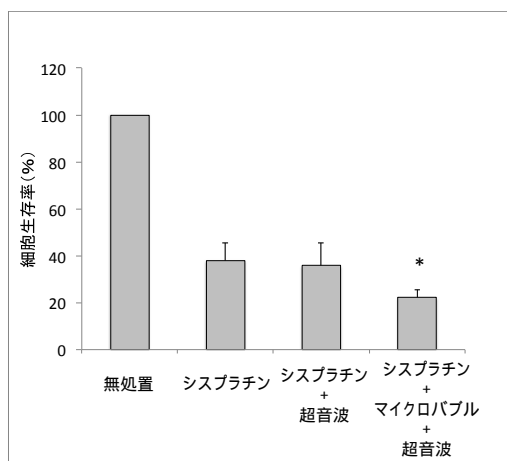


図4 200 μmの厚みに3回ソノポレーションを行ったときの殺細胞効果

抗がん剤およびマイクロバブルは膀胱内注入療法によって膀胱内へ直接投与することが可能である。本研究から、膀胱内注入療法にソノポレーションを組み合わせることで、局所コントロールをさらに改善する治療法の可能性が示された。前述の甲状腺癌モデルでも明らかになったように、ソノポレーションに大きな副作用はない。したがって、ソノポレーションの回数を増やすことで、非侵襲的で効果の高い局所療法が確立できる。

#### (2) ソノポレーションのメカニズム検証

3次元培養系および(1)と同じ条件を用い、細胞内白金濃度および細胞を回収した後のコラーゲン内白金濃度を測定した。

ソノポレーションによって厚さ 50 および 100 μm において細胞内白金濃度が有意に上昇した(図5)。一方で、コラーゲン内の白金濃度には差がなかった。

ソノポレーションの機序として、コラーゲン中の細胞へシスプラチンをデリバリーし、殺細胞効果が生じたと明らかになった。従来のソノポレーションの機序はマイクロバブ

ルに接する細胞へのデリバリーと言われていたが、本研究の結果により、ある程度の厚みがあってもデリバリー可能なことが初めて示された。このことはソノポレーションを臨床応用へと発展させる上で、重要な科学的エビデンスとなる。

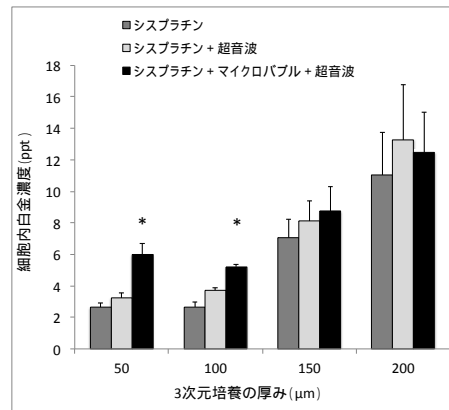


図5 細胞内白金濃度

## 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2件)

Noboru Sasaki, Kazuhiro Ishi, Nobuki Kudo, Shouta M.M. Nakayama, Kensuke Nakamura, Keitaro Morishita, Hiroshi Ohta, Mayumi Ishizuka, Mitsuyoshi Takiguchi. Spatial and temporal profile of cisplatin delivery by ultrasound-assisted intravesical chemotherapy in a bladder cancer model. PLoS ONE, 12(11):e0188093, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188093> 【査読あり】

佐々木東、工藤信樹、中山翔太、滝口満喜。ソノポレーションを用いた膀胱内注入療法の開発。超音波TECHNO、29号4巻、27-30ページ、2017年。【査読なし】

〔学会発表〕(計5件)

佐々木東、中山翔太、森下啓太郎、中村健介、大田寛、水川葉月、池の中良徳、石塚真由美、滝口満喜。超音波と膀胱内注入療法を組み合わせた膀胱癌治療法の開発。第160回日本獣医学会学術集会、2017年9月13日、鹿児島大学(鹿児島県・鹿児島市)。

Sasaki N, Kudo N, Nakayama S, Nakamura K, Morishita K, Ohta H, Takiguchi M. Spatial and Temporal Window for cisplatin delivery in a 3D culture model. The 22nd European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging, 2017.1.19-1.20, Rotterdam

(The Netherlands)

佐々木東、石井和浩、工藤信樹、滝口満喜. 超音波とマイクロバブルによるデリバリーの時間的制約. 第15回日本超音波治療研究会、2016年11月12日、東京女子医科大学 Twins (東京都・新宿区).

Sasaki N, Takiguchi M. Low intensity pulsed ultrasound and microbubbles increase cellular cisplatin and enhance cisplatin effect in a bladder cancer culture model. 5th International Symposium on Focused Ultrasound, 2016.8.28-9.1, Bethesda (MD, USA)

佐々木東、工藤信樹、中村健介、森下啓太郎、大田寛、滝口満喜. シスプラチンデリバリーの効果が及ぶ距離. 日本超音波医学会第89回学術集会、2016年5月27~29日、京都国際会議場(京都府・京都市).

〔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

佐々木 東 (SASAKI, Noboru)  
北海道大学・大学院獣医学研究院・助教  
研究者番号：00754532

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )