

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21200021

研究課題名（和文） 電気刺激による腫瘍血流制御を応用した新癌治療法の開発 - 放射線・化学療法との併用

研究課題名（英文） The new radiotherapy methods reoxygenated of intratumoral hypoxia induced by electrical stimulation

研究代表者

仲田 栄子 (NAKATA EIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60375201

研究成果の概要（和文）：

今日のがん治療において、腫瘍内低酸素領域の克服が重要な課題となっている。そこで我々は電気刺激を用いることで腫瘍内低酸素領域を改善できるのではないかと考えた。C3H マウスの右大腿部に Squamous Cell Carcinoma-VII 腫瘍 (SCC-VII) を移植し、仙骨部後仙骨孔直上の皮膚表面に電気刺激を行った結果、刺激中に腫瘍表面の血流値で 22% の増加、電気刺激終了から約 50 分後に腫瘍内部の酸素分圧で 28% の増加が確認された。低酸素マーカーであるピモニダゾールを使用した結果、電気刺激終了後 40 分で低酸素領域は 20% 有意に減少した。X 線を腫瘍移植部に局所照射したところ、一回照射（総線量 5Gy）・分割照射（総線量 7.5Gy）のいずれにおいても放射線単独群より放射線+電気刺激併用群で腫瘍の成長に遅延が認められた。

研究成果の概要（英文）：

The hypoxic region in the tumor tissue resist for radiation. In this study, we tried the in vivo studies and investigated whether the blood flow and hypoxia in the tumor tissues are improved by the surface electrical stimulation.

We transplanted SCC-VII tumor to the C3H/HeJ female mice's right distal of femoral region and gave electrical stimulation at the sacral surface area from S2 to S4.

Therefore, blood flow at the surface of tumor was increased 22% during electrical stimulation and intratumor PO₂ was increased 28% after 50 minutes from the end of electrical stimulation. The result of the microscopy of the tumor cells stained by hypoxic marker, the number of hypoxic cells of tumor was decreased 20% after 40 minutes from the end of electrical stimulation. The treatment results of radiotherapy combined with electrical stimulation is more better than independent radiotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2011 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
総計	23,500,000	7,050,000	30,550,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学/生体材料学

キーワード：癌 電気刺激 血流制御 低酸素領域 放射線治療

1. 研究開始当初の背景

今日のがん治療における3大療法として手術療法・化学療法・放射線療法が知られており、我が国ではこれらを中心に病状に適した複数の治療法を組み合わせて治療を行う集学的治療法が行われるのが一般的である。特に、がんの罹患率の上昇に伴って患者の体力に起因した手術療法・化学療法の適用外の症例が増える中、放射線療法は患者への浸襲の少なさや局所制御が可能であることから、その適応症例は増加している。

しかし、腫瘍内には組織酸素分圧の低い低酸素領域が存在し、これが放射線に対し抵抗性を示す。このことは、放射線によるがんの治療効果を低下させる一要因となっているだけでなく、低酸素細胞は薬剤のデリバリーも阻害し、化学療法抵抗性になることも報告されている。また、がん組織が低酸素状態であることは、がん細胞の低酸素応答を惹起し、低酸素に反応する転写因子である hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) を介して血管内皮細胞増殖因子をはじめとする関連遺伝子を誘導する。その結果、腫瘍血管新生や腫瘍増殖が引き起こされ、再発や転移が促進されてしまい、腫瘍の悪性度が増加してしまうことが分かっている。

したがって、腫瘍内低酸素細胞の存在が現在の集学的がん治療の成績を低下させる最大要因であり、現在のがん治療の成績を向上させ、予後改善に向けた新規がん治療を開発するためには腫瘍内低酸素領域の克服が重要である。

一方、電気刺激には血管を拡張させる物質の分泌を促す効果があると考えられており、これまでに電気刺激による血流の増加現象や循環改善効果が報告されている。我々の研究グループにおいても、これまでの研究にお

いて電気刺激による血流増加現象を確認しており、電気刺激によって抹消血中のサブスタンスP濃度が有意に増加する結果を得ている。サブスタンスPはそれ自身が血管拡張物質として知られ、血中濃度上昇により全身の循環動態に何らかの変化をきたすことが想起される。さらに、後仙骨孔直上の皮膚表面を電気刺激することにより、下肢、特に膝窩動脈の血流が有意に増加する結果も得られている。

2. 研究の目的

我々は、電気刺激を用いて腫瘍血流を増加させ、腫瘍内低酸素領域の酸素濃度を上昇させることで腫瘍内低酸素領域を改善し、放射線治療を含む集学的癌治療法の成績を向上させることができるのではないかと着想した。電気刺激はすでに疼痛制御や筋トレーニング、リハビリテーションの一手段として利用されている手法で、人体に非侵襲である。もし、電気刺激を応用することで腫瘍血流を増加させ、治療抵抗因子である腫瘍内低酸素領域を改善することに成功すれば、人体に無侵襲かつより効果的に放射線や薬剤を用いた癌治療の成績を向上させることができるはずである。

以上より、本研究ではがん治療の成績向上を大目的として、電気刺激によって腫瘍内低酸素領域を改善することができるかを検討することにした。

3. 研究の方法

実験用マウスにはC3H/HeJマウス(♀, 7週齢)、腫瘍細胞にはSquamous Cell Carcinoma-VII腫瘍(SCC-VII)を用い以下の実験を行った。

(1) 腫瘍細胞の培養と移植

SCC-VIIを培地(90%D-MEM+10%FBS)にて、

37°C、5.0%CO₂調整のインキュベータ内で培養した。培養 SCC-VIIは細胞計数装置にてセルカウントを行った後、1800rpm、4°C、10分間で冷却遠心分離して目的細胞を取出し、PBSを加えて10×10⁶cells/0.2mlPBSとなるように調整し細胞液とした。

調整した細胞液は、26Gの注射針を用いてマウス1匹に対して0.2mlずつ背部皮下に移植し、Source mouseを作成した。Source mouseの腫瘍長径が10mmに成長した時点で切開により腫瘍を摘出し、PBSで洗浄の後1mm角に切断し、移植腫瘍片としてトロッカー針にて実験用マウスの右大腿部皮下に移植した。

実験用マウスでの平均腫瘍長径が約10mmに成長した時点を実験開始とした。

(2) 電気刺激

下肢の腫瘍移植部位に対し、デルマトームを考慮し、下部胸椎から仙椎レベルまでの脊髄神経根部を、皮膚表面に貼付した電極にて刺激する表面電気刺激法を採用した。

刺激条件は最大刺激電圧7~10V、刺激周波数30Hzのレクタングュラーバイポーラパルスを用い、通電時間10秒、休止時間5秒、総刺激時間15分とした。

(3) 腫瘍表面の血流および腫瘍内組織酸素分圧の測定

小動物用麻酔器を用いて、2%イソフルランガスを吸入投与し対象マウスを麻酔した後、二次元レーザー血流計にて腫瘍移植部皮膚直下0.5mm深のBlood Flowイメージを撮像し、腫瘍表面における血流量を求めた。また、腫瘍中心部に針電極を刺入し、ポーラログラフの原理で、腫瘍内部組織の酸素分圧P02を同時測定した。測定の間は保温マットを使用し、対象マウスの体温を35°C一定に保った。

(4) 低酸素マーカによる低酸素組織の描出
腫瘍内部低酸素領域の細胞をピモニダゾール染色により描出した。

摘出した腫瘍から、腫瘍1個について2断面、1断面あたり3枚、すなわち、マウス1匹当たり6枚の腫瘍切片を作成した。検鏡は2名の観測者により行い、2名の平均値をその腫瘍切片における低酸素領域の割合として評価した。

(5) 放射線照射実験

高エネルギーX線照射装置を用い、管電圧200kV、付加フィルター0.5mmCu+1.0mmAlの線質で照射を行った。

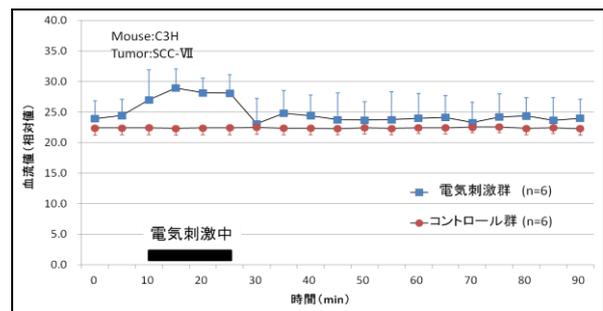
照射条件は総線量5Gyを一度に照射する一回照射と、1.5Gy/dayを5日間かけて与え総線量7.5Gyとする分割照射の2種類を行った。なお、いずれの場合においてもX線照射開始50分前に電気刺激が終了するようにした。

4. 研究成果

(1) 腫瘍表面の血流値

電気刺激群において、電気刺激を行った直後から腫瘍表面の血流値は増加し、刺激中は血流が増加した状態が続いたが、刺激終了後は速やかに元の血流値に回復した。一方コントロール群においては、腫瘍表面の血流値は一定の値を保った。

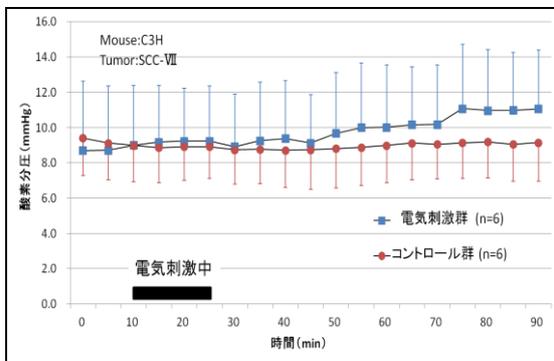
電気刺激群およびコントロール群間における初期血流値からの血流変化量について、測定開始から15分後において統計的有意差が認められた (p<0.01)



(2) 腫瘍内部組織 PO₂

電気刺激群において、刺激直後には大きな変化は見られなかったが、刺激が終了し 20 分ほど経った後から徐々に酸素分圧が上昇し始めた。そして刺激終了から約 50 分後にはピークに達し、測定が終了しても効果は持続した。一方コントロール群においてはほぼ一定で大きな変化はなかった。

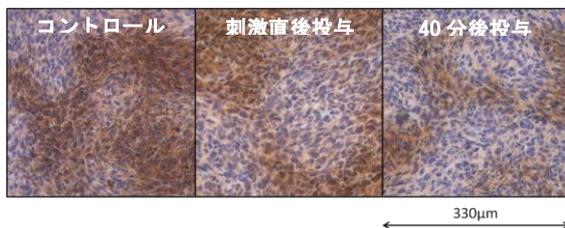
電気刺激群の酸素分圧がピークとなった時間において、両群の初期酸素分圧値からの変化量には統計的有意差が認められた ($p < 0.05$)。



(3) 低酸素マーカによる低酸素組織の描出

コントロールと比べ、電気刺激終了直後の投与では低酸素領域の減少は見られなかったが、電気刺激終了後 40 分の投与では低酸素領域の減少が見られた。

刺激 40 分後投与群と刺激直後投与群の低酸素領域の割合にはそれぞれ有意に差が認められた ($p < 0.05$)。



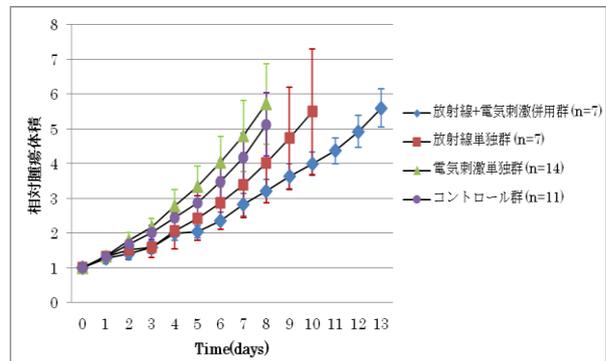
(4) 放射線照射実験

① 一回照射

腫瘍体積が測定開始時の 5 倍になるまでの

日数は、放射線+電気刺激併用群は 12.7 ± 0.6 日、放射線単独群は 10.5 ± 2.1 日、電気刺激単独群は 8.0 ± 1.3 日、コントロール群は 8.5 ± 1.0 日であった。

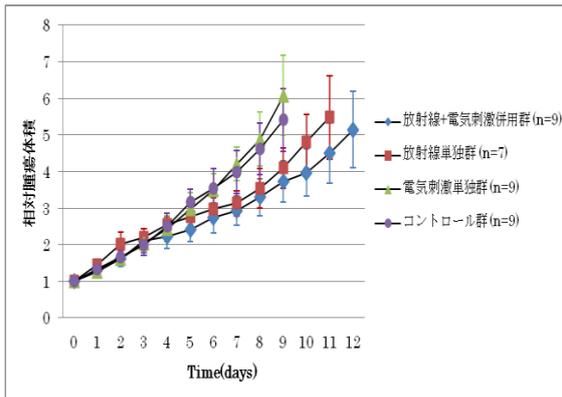
腫瘍体積が 5 倍になる日数について、電気刺激単独群とコントロール群の間に差異は見られなかったが、放射線を照射した群は放射線を照射しなかった群に比べて腫瘍の成長に明らかな遅延が見られた。放射線+電気刺激併用群は放射線単独群よりも腫瘍の成長に 2 日ほど遅延が見られ、両群の間には有意差が認められた ($p < 0.05$)。



② 分割照射

腫瘍体積が測定開始時の 5 倍になるまでの日数は、放射線+電気刺激併用群は 12.7 ± 1.6 日、放射線単独群は 11.2 ± 1.3 日、電気刺激単独群は 9.0 ± 0.9 日、コントロール群は 9.2 ± 1.2 日であった。

一回照射実験と同様に、腫瘍体積が 5 倍になる日数について、電気刺激単独群とコントロール群の間に差異は見られなかったが、放射線を照射した群は放射線を照射しなかった群に比べて腫瘍の成長に明らかな遅延が見られた。放射線+電気刺激併用群は放射線単独群よりも腫瘍の成長に 1 日ほど遅延が見られ、両群の間には有意差が認められた ($p < 0.05$)。しかし、一回照射実験に比べると有意差は小さかった



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0件)

[学会発表] (計3件)

①Takahide OGURA

Reoxygenation of intratumoral hypoxia induced by surface electrical stimulation
Moscow Regional Research Clinical Institute
2011年6月2日 Moscow/Russia

②小倉隆英

Sacral surface electrical stimulation
日本ニューロモデュレーション学会 2011年5月21日 東京

③地元佑輔

電気刺激による腫瘍内低酸素細胞の酸素化の検討 日本ニューロモデュレーション学会 2011年5月21日 東京

[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

仲田 栄子 (NAKATA EIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 60375201

(2)研究分担者

有賀 久哲 (ARIGA HISANORI)

岩手医科大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 30333818

(H21~H22)

半田 康延 (HANDA YASUNOBU)

東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授

研究者番号: 00111790

(3)連携研究者

小倉 隆英 (OGURA TAKAHIDE)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10312688

関 和則 (SEKI KAZUNORI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 20206618

高井 良尋 (TAKAI YOSHIHIRO)

弘前大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 50107653