

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292155

研究課題名(和文) 動物自然発生腫瘍に対するマイクロバブル併用超音波照射による実用的な新規がん治療

研究課題名(英文) Novel cancer therapy for spontaneous animal tumor using ultrasound irradiation with microbubble

研究代表者

滝口 満喜 (TAKIGUCHI, MITSUYOSHI)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：70261336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,200,000円

研究成果の概要(和文)：超音波による診断と治療の融合の確立に向けた基盤を形成し、臨床応用へと発展させることを目的とし、犬の甲状腺癌および膀胱癌に対する超音波とマイクロバブルを用いた実用的な新規がん治療法「ソノポレーション」に関する前臨床段階の知見を得た。また、ソノポレーションの新たなメカニズムを明らかにすることで、臨床応用の基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that sonoporation, the combination of ultrasound and microbubbles, enhances the antitumor effect of a chemotherapeutic agent with minimum invasiveness in preclinical canine thyroid and bladder cancer models. Moreover, the results of this study clarified the mechanism of sonoporation. This preclinical study may contribute to establish sonoporation as a theranostic tool in cancer therapy.

研究分野：獣医内科学

キーワード：獣医学 トランスレーショナルリサーチ がん治療 超音波治療 マイクロバブル ソノポレーション
ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

超音波の治療への応用の試みは半世紀以上の長い歴史をもつ。しかしながら、診断分野においては生体に障害を及ぼさない低いエネルギーの超音波を、一方、治療分野においては局所照射に高いエネルギーの超音波を利用しようとする点で、両者が同じ領域の手法として発展することはなかった。ところが、近年、超音波の生体作用についての基礎研究が進められたことや装置への工夫がなされてきたことから、診断と治療の2つの領域の距離が縮まりつつある。

その中で、現在最も注目されているのがマイクロバブルを利用した超音波治療である。マイクロバブルと超音波を併用することで細胞膜に一時的に孔を開け、そこから薬物や遺伝子を細胞内に取り込ませることができるからである (Tachibana, et al. Lancet 1999)。特にがん治療においては、超音波を腫瘍局所に照射することで腫瘍細胞に抗がん剤を直接取り込ませることができるので、副作用の少ない安全かつ効率的な治療法として、その実用的な臨床応用が期待されている。しかしながら、これまでの培養細胞ならびに実験動物を用いた研究では、超音波発生装置として臨床現場では用いられない特殊な装置が用いられており、安全性に問題があることから臨床応用までには至っていない。言い換えるなら、安全性が担保されている診断用超音波装置を用いて可視化しながら治療する、“診療現場における診断と治療の融合を目指した研究”は行われていない。

申請者はこれまで獣医画像診断学の分野において、とりわけ超音波診断の領域で研究成果をあげてきた。なかでも、近年、超音波造影剤の獣医臨床応用に関する研究にいち早く取り組み、マイクロバブルである超音波造影剤を利用した超音波治療に早くから興味を抱き、診断用超音波装置を用いた獣医臨床応用に向けた基礎研究に着手してきた (Nakamura and Takiguchi, Vet Radiol Ultrasound 2009 & 2010; J Vet Intern Med 2011)。そして、これまでの研究に基づき、可視化しながら治療する超音波治療の可能性へ研究を発展させるに至った。特に、超音波による診断と治療の実現可能性が高い表在性腫瘍に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、現在獣医臨床において有効な治療手段が確立されていない犬の甲状腺癌と膀胱癌に対する新規治療の開発に向けた基盤を形成することを目指す。犬の甲状腺癌および膀胱癌はいずれも予後不良の悪性腫瘍である。また、犬の甲状腺癌および膀胱癌は表在性腫瘍であるがゆえ体表からの超音波治療の標的として最適と考えられる。最終的には実際の臨床例への適応を目指すのが、安全性ないし有効性の検証はそれぞれマウス移植腫瘍モデルを用いて行う。甲状腺癌に対

しては、超音波診断装置ガイド下でマイクロバブルと抗がん剤を腫瘍局所に投与し、診断装置にて超音波を照射する手法を候補とする。一方、膀胱癌に対しては、抗がん剤とマイクロバブルの膀胱内注入療法に、超音波照射を組み合わせる手法を採る。

本研究では、甲状腺癌および膀胱癌の両面から以下に挙げる具体的目標に取り組む。

(1) 腫瘍モデルを用いた腫瘍成長抑制効果ならびに安全性の検証。

(2) 培養細胞における抗がん剤の効果増強作用およびそのメカニズムの解明。

3. 研究の方法

(1) 甲状腺癌に対するソノポレーションの可能性

7週齢のヌードマウスの背部皮下に犬甲状腺癌株細胞を移植した、甲状腺癌モデルを作成した。腫瘍径が5mmに達した時点で、抗がん剤シスプラチン、およびマイクロバブルを超音波診断装置ガイド下で腫瘍内に投与し、そのまま診断装置によってソノポレーションを行った。処置後、3週間にわたって腫瘍体積および体重をモニターし、治療効果と副作用を評価した。

(2) 膀胱癌に対するソノポレーションの可能性

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I型コラーゲンに包埋した3次元培養系に対して、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。また、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。さらに、1回のソノポレーションの効果を持続する時間についても検討した。

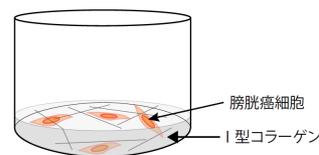


図1 3次元培養による膀胱癌モデル

(3) ソノポレーションのメカニズム検証

ソノポレーションは超音波とマイクロバブルによるドラッグデリバリー技術である。ソノポレーションによる抗腫瘍効果もしくは殺細胞効果が、抗がん剤の細胞内デリバリーによるものか検証した。シスプラチンが白金系抗がん剤であることを利用し、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。

4. 研究成果

(1) 甲状腺癌に対するソノポレーションの

可能性

シスプラチン 1 μg とマイクロバブルであるソナゾイド 10 μL を超音波診断装置のガイド下で腫瘍内へ投与する処置を、1 日置きに 4 回行った。その後、6 日置きに腫瘍体積およびマウスの体重測定を行った。比較対照として、無処置、生理食塩水のみ、シスプラチンのみ、マイクロバブルのみ、マイクロバブル+超音波照射の 5 群を設定した。

シスプラチンをソノポレーションした群（シスプラチン+マイクロバブル+超音波）では、12、18、24 日後において、腫瘍体積が比較対照 5 群全てより有意に小さかった（図 2）。また、シスプラチンをソノポレーションした群での体重減少は確認されなかった（図 3）。

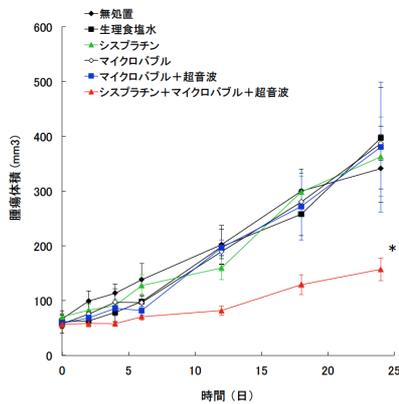


図 2 腫瘍体積の経時変化

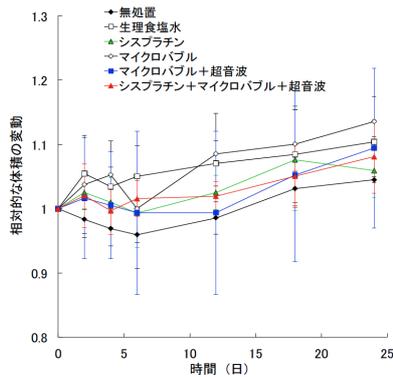


図 3 体重の経時変化

本研究により、シスプラチンのソノポレーションは副作用を示すことなく腫瘍の成長を抑制した。さらに、本研究のソノポレーションは、超音波診断装置ガイド下かつ診断装置によるものであった。つまり本研究の成果は、超音波診断装置による非侵襲的なソノポレーションを初めて示したと言える。本研究により、超音波による診断と治療の融合へ向けた礎と言え、その臨床的意義は大きい。

(2) 膀胱癌に対するソノポレーションの可能性

上述の 3 次元培養系にシスプラチン 6 μ

g/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 4）。また、その増強の持続時間は 1 時間までだった（図 5）。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厚さ 200 μm まで広がった。

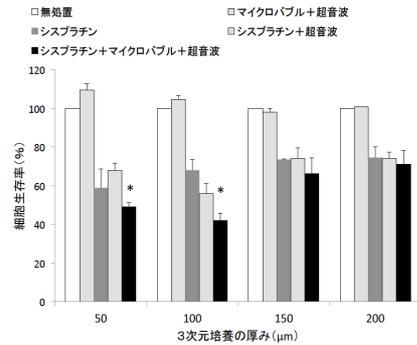


図 4 ソノポレーションの効果的な距離

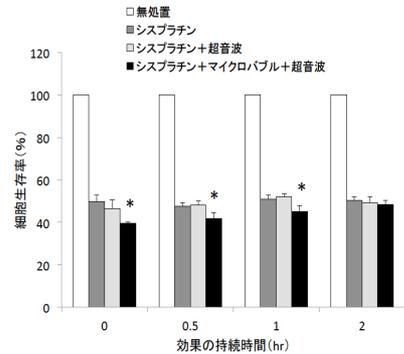


図 5 ソノポレーションの効果持続時間

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。

(3) 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 (2) 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 6）。一方で、コラーゲン内の白金

濃度には差が認められなかった。

ソノポレーションの機序として、コラーゲン中の細胞ヘシスプラチンをデリバリーし、殺細胞効果が生じたことが明らかになった。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、組織にある程度の厚みがあっても抗がん剤を細胞内にデリバリーすることが可能である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。

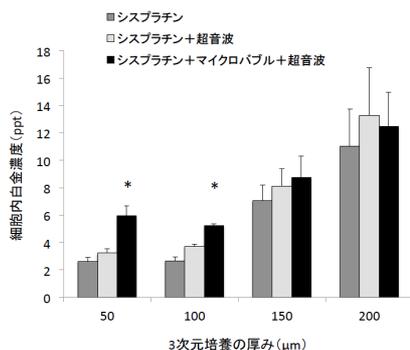


図6 細胞内へのシスプラチンデリバリー

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3件)

佐々木東. 獣医臨床における超音波の治療への応用. MP アグロジャーナル, 査読なし, 2016, 4-7.

Sasaki N, Bos C, Escoffre J-M, Storm G, Moonen C. Development of a tumor tissue-mimicking model with endothelial cell layer and collagen gel for evaluating drug penetration. Int J Pharm, 査読有り, Vol. 482, 2015, 118-122. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.01.039

佐々木東. 超音波治療 診断からのひろがり 北海道獣医師会雑誌 査読なし, 2015, 22-27

[学会発表](計9件)

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. 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)

佐々木東, 工藤信樹, 滝口満喜. 膀胱癌を模した3次元培養系でのシスプラチンデリバリー. 第14回日本超音波治療研究会, 2015年11月28日、高知市分化プラザかるぽーと(高知県・高知市)

佐々木東, Moonen C, 滝口満喜. 3次元培養でのシスプラチンと超音波-マイクロバブルの併用. 日本超音波医学会平成27年度第1回超音波分子診断治療研究会, 2015年8月7日、北海道大学大学院情報科学研究科(北海道・札幌市)

佐々木東, 工藤信樹, 中山翔太, 滝口満喜. 本当にソノポレーションか? 日本超音波医学会平成28年度第1回超音波分子診断治療研究会, 2015年8月6日、北海道大学大学院情報科学研究科(北海道・札幌市)

佐々木東, 滝口満喜, Bos C, Moonen C. ドラッグデリバリーを可視化する培養系の開発. 日本超音波医学会第88回学術集会, 2015年5月22~24日、品川プリンスホテル(東京都・品川区)

Sasaki S, Bos C, Escoffre J-M, Storm G, Moonen C. A tissue-mimicking model for assessment of drug penetration by ultrasound-mediated drug delivery. 15th International Symposium on Therapeutic Ultrasound, 2015.4.15-4.18, Utrecht (The Netherlands)

[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

滝口 満喜 (TAKIGUCHI, Mitsuyoshi)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号：70261336

(2) 研究分担者

中村 健介 (NAKAMURA, Kensuke)
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号：80625898

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

(3) 連携研究者

工藤 信樹 (KUDO, Nobuki)
北海道大学・大学院情報科学研究科・准教授
研究者番号：30271638

(4) 研究協力者 なし