

令和元年5月29日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10349

研究課題名(和文) VX2肝腫瘍モデルにおける炭酸ガス併用選択的動注化学療法の効果の検討

研究課題名(英文) The sensitizing anti-cancer effect of intra-arterial infusion of carbon dioxide-saturated solution in a rabbit VX2 liver tumor model

研究代表者

山口 雅人 (YAMAGUCHI, Masato)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10457096

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)：本研究はウサギ腫瘍モデルに対する炭酸飽和水動注療法の抗腫瘍効果および抗癌剤(シスプラチン)の増感作用を検討することを企図したものである。肝臓に腫瘍(VX2)を移植した日本白ウサギ40羽に対して、移植後3週に肝動脈まで挿入したカテーテルより炭酸ガス飽和水を注入した。対象をコントロール群、炭酸群、シスプラチン群、混合群の4群に分け、注入3日目、7日目に造影CTでの腫瘍体積を計測を行い、7日目に安楽死後、低酸素やアポトーシスの評価を行った。結果は炭酸群、混合群で腫瘍増大効果の抑制がみられ、炭酸関連の2群では低酸素、アポトーシスの誘導が認められた。さらに混合群ではシスプラチン増感作用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてウサギ腫瘍モデルに対する炭酸飽和水動注療法の有効性が示唆され、炭酸ガス研究の発展に寄与するものと考えられる。また炭酸飽和水動注療法の安全性や有効性をさらに研究し、実臨床への使用が可能となれば、肝細胞癌を始めとした肝腫瘍に対する動注化学療法において容易かつ安価に腫瘍の治療効果を高めることが可能となり、臨床的意義は非常に高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to evaluate the efficacy of an intra-arterially infused carbon dioxide (CO₂)-saturated solution in sensitizing the anti-cancer effect of cisplatin in a rabbit VX2 liver tumor model. Forty VX2 liver tumor-bearing Japanese white rabbits were randomly divided into four groups and infused via the hepatic artery with a saline solution (control group, CO₂ group, cisplatin group, and combined group). The tumor growth ratios were calculated on days 3 and 7. Hypoxia (HIF-1 α) and apoptosis (cleaved caspase-3) were evaluated on day 7. The tumor growth ratio was significantly lower in the CO₂ group than in the control group (day 3), and in the combined group than in the cisplatin group (days 3 and 7). HIF-1 α suppression and increased cleaved caspase-3 expression were detected in the CO₂ and combined groups, compared with the other two groups.

An intra-arterially infused CO₂-saturated solution inhibits liver VX2 tumor growth and sensitizes the anti-cancer effect of cisplatin.

研究分野：放射線科学

キーワード：炭酸ガス 動注化学療法 抗癌剤増感作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

固形癌では腫瘍増殖に伴って細胞内は低酸素状態となることが知られているが、低酸素によって化学療法・放射線治療への治療抵抗性が惹起されることが報告されている。二酸化炭素ガス(炭酸ガス)は従来、皮膚潰瘍や褥瘡の治療法として知られている一方、近年では経皮的な炭酸ガス投与と実験での抗腫瘍効果が確認されている。微小循環における血流増加や、血管新生の促進、Bohr 効果に伴う酸素分圧上昇などがそのメカニズムとして挙げられている。これらの研究を基にして、以前に我々の研究グループでは炭酸ガスを生理食塩水に飽和・溶解させた炭酸飽和水の血管内投与(動注療法)を行い、ウサギ大腿腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果を報告した。

2. 研究の目的

本研究においては炭酸飽和水動注療法のウサギ肝腫瘍モデルへの応用を企図するとともに、臨床応用を見据えて抗癌剤動注療法との併用による増感作用についても実験・検証を行った。

3. 研究の方法

肝臓に VX2 腫瘍を移植されたウサギ 40 匹(日本白色家兔:月齢 3-4 ヶ月)を用いた。対照群:生理食塩水 50ml、炭酸群:炭酸飽和水 50ml、シスプラチン群(シスプラチン 1.75mg/kg)・混合群(炭酸飽和水 50ml + シスプラチン 1.75mg/kg)の 4 群各 10 匹に分けて、下記の通りに動注を行った。なお炭酸飽和水は生理食塩水 100ml に炭酸ガスを 15 分かけてバブリングして作成した(pH=4)。

全身麻酔下に右鼠径部を切開し、大腿動脈を露出した。22G 針にて大腿動脈を穿刺してシースを挿入し、マイクロカテーテルを用いて固有肝動脈を選択した。X 線透視下に血管造影を施行して腫瘍血管の描出を確認後、同ルートより各群に上記の薬剤を投与した。投与後は穿刺針を抜去し、結紮止血後に創閉鎖を行った。実験終了後は常食管理とし、7 日後に薬殺、臓器を摘出した。また、処置直前と 3 日目・7 日目に造影 CT (Rm-CT2, Rigaku) を撮影後 3mm 厚スライスによる volumetry にて腫瘍体積を算出した。

摘出された検体は、TUNEL 染色によって DNA フラグメンテーションアッセイ、cleaved caspase-3・cleaved caspase-9 抗体を用い Western blotting にて分子生物学的にアポトーシスを評価した。また HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) および CA IX (carbonic anhydrase IX) による免疫組織染色で低酸素を評価した。

4. 研究成果

(1) 結果

経過の中で合併症や関連死亡は見られず、体重の増減に関しても各群間に有意差はみられなかった。

平均腫瘍増大率は、対照群(3日目・7日目): $202.6 \pm 23.7\%$ ・ $429.2 \pm 94.8\%$ 、炭酸群: $172.2 \pm 38.1\%$ ・ $376.5 \pm 61.1\%$ 、シスプラチン群: $156.1 \pm 15.1\%$ ・ $269.6 \pm 45.2\%$ 、混合群: $118.3 \pm 28.1\%$ ・ $210.3 \pm 55.1\%$ であった。炭酸群では対照群と比較して 3 日目では有意に腫瘍増大の抑制($P < 0.05$)を認め、7 日目では有意差を認めなかった($P = 0.16$)。混合群ではシスプラチン群と比較して、3 日目・7 日目ともに有意な腫瘍増大抑制($P < 0.05$)が認められた。また炭酸群・シスプラチン群より算出した相加効果による予測腫瘍増大率との比較でも、混合群では有意な腫瘍増大抑制($P < 0.05$)がみられた。

TUNEL 染色を基に HE 染色でのアポトーシス領域を算出したところ、対照群と比較して炭酸群・シスプラチン群・混合群ではアポトーシス領域の増加と腫瘍領域の減少を認め、特に混合群では顕著であった。Western blotting では炭酸群・混合群では対照群・シスプラチン群よりも cleaved caspase-3・cleaved caspase-9 の発現増加を認めた。

免疫組織染色においては炭酸群・混合群では対照群・シスプラチン群よりも HIF-1・CA IX とともに発現抑制を認めた。HIF-1 の定量(各視野での平均カウント)では対照群: $246 \text{ 個} \pm 118$ 、炭酸群: $21 \text{ 個} \pm 10.4$ 、シスプラチン群: $152 \text{ 個} \pm 40.7$ 、混合群: $16 \text{ 個} \pm 7.3$ であり、炭酸群・混合群では他の 2 群より有意に低かった。

(2) 考察

炭酸群では対照群と比較して、混合群ではシスプラチン群と比較して、いずれも有意に腫瘍増大が抑制された。特に混合群ではシスプラチン増感作用がみられ、動注化学療法への貢献が期待される。

二酸化炭素による抗腫瘍効果・シスプラチン増感作用のメカニズムとしてはアポトーシス誘導や低酸素改善が関与していると考えられる。二酸化炭素は細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を来し、ミトコンドリア機能を活性化させて DNA アポトーシスを誘導することが知られている。In vivo の研究では、悪性線維性組織球腫モデルを用いた経皮的炭酸ガス治療において細胞内のカルシウムイオン濃度上昇を来し、caspase-9 経路を介したミトコンドリア DNA アポトーシスを生じることが示されている。また二酸化炭素が活性酸素種を誘導し、アポトーシス促進作用を有する p53 転写シグナルを刺激することも知られている。本研究では炭酸群・混合群ともミトコンドリアを介したアポトーシスを反映する cleaved caspase-9 の発現増加を

認めており、以前の報告と同様の経路を介してアポトーシスが誘導され、腫瘍増大の抑制に繋がったものと推測される。

これ以外にも腫瘍内環境の酸素化や pH 低下による抗腫瘍効果も考えられる。今回の実験ではこれらの測定は行っていないが、炭酸群・混合群で他の 2 群より有意に低酸素マーカーである HIF-1 の発現低下を認めている。炭酸飽和水の投与によって細胞内 pH 低下を来し、Bohr 効果 (pH 低下により酸素解離曲線の右方移動を生じ、組織内でより酸素を放出する現象) から局所での酸素分圧の上昇が得られたことで、腫瘍内低酸素の改善に繋がった可能性が考えられる。HIF-1 は bHLH-PAS 転写因子であり、生体内酸素の恒常性に重要な役割を担う一方、近年では腫瘍増殖・悪性化にも関与することが知られている。高二酸化炭素血症において細胞内 pH が下がることで、HIF 経路の活性化が抑制されるという報告や、低酸素状態の改善による HIF-1 の発現低下が化学療法への感受性を増強させるとの報告がある。また HIF-1 ノックダウンされた卵巣癌細胞ではシスプラチンへの感受性が高まるという報告や、シスプラチンの増感作用が報告されているジンドリルメタンにおいて HIF-1 や VEGF 発現の抑制が示されている。今回の実験では混合群が、炭酸群・シスプラチン群の相加効果よりも有意に腫瘍増大抑制を得られており、HIF-1 発現抑制を介してシスプラチンへの増感作用が発揮されたものと推測される。また炭酸ガスは、腎機能不良患者やヨード造影剤に対するアレルギーを有する患者等に対して、血管造影時の陰性造影剤としてしばしば用いられている。血管内に投与された炭酸ガスはすぐに血中に溶け込み、人体への副作用はほとんどみられない。非常に安価でもあり、シスプラチン増感剤としては理想的と考える。今回、炭酸飽和水の投与量を 50ml と設定しており、炭酸ガス 38ml 相当が溶解していると考えられる。過去の報告では最大 16.2ml/kg の炭酸ガスをウサギへ動注しても亜急性期の肝障害を来さなかったとされており、本研究の投与量 (炭酸ガス 14.5ml/kg 相当) は安全な範囲内であると考えられる。

(3) 今後の展望

今後は炭酸ガス飽和水の臨床応用に向けて実験の追加や修正を行い、至適な投与量、投与回数
の検証に努める。また炭酸ガスによる低酸素改善が抗腫瘍効果に寄与していると考えられるため、PET-CT を用いた低酸素イメージングへの応用を検討している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

片山直人、山口雅人、他、International Journal of Oncology、2017 Aug;51(2):695-701、査読あり

<https://www.spandidos-publications.com/ijo/51/2/695>

〔学会発表〕(計 2 件)

片山直人、山口雅人、ウサギ肝 VX2 腫瘍モデルにおける炭酸ガス動注療法の抗癌剤増感作用の検討、第 44 回 IVR 学会総会、2015 年

片山直人、山口雅人、Intra-arterial infusion of carbon dioxide-saturated solution as a sensitizer for anti-cancer effect of Cisplatin in a rabbit VX2 liver tumor model、CIRSE (Cardiovascular and Interventional Radiological Society of Europe)、2015 年

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岡田 卓也

ローマ字氏名：OKADA Takuya

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：特命講師

研究者番号（8桁）：80514786

研究分担者氏名：上嶋 英介

ローマ字氏名：UESHIMA Eisuke

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：40645561

研究分担者氏名：祖父江 慶太郎

ローマ字氏名：SOFUE Keitaro

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：90622027

研究分担者氏名：杉本 幸司

ローマ字氏名：SUGIMOTO Koji

所属研究機関名：神戸大学

部局名：医学部附属病院

職名：特命教授

研究者番号（8桁）：90314476

(2)研究協力者

研究協力者氏名：片山 直人

ローマ字氏名：KATAYAMA Naoto

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。