

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591560

研究課題名（和文）人工酸素運搬体による放射線照射の抗腫瘍効果増強 細胞傷害特性と血管新生の検討

研究課題名（英文）Enhanced radiation response andn inhibition of angiogenesis by artificial oxygen carrier

研究代表者

堀之内 宏久（HORINOUCI HIROHISA）

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：60173647

研究成果の概要：

低酸素環境で増殖する悪性腫瘍に対し、腫瘍組織を酸素加すると、放射線の治療効果を増強できる可能性がある。我々が開発している人工酸素運搬体（アルブミンヘム）は分子状で、腫瘍循環でガス交換が可能と考えられ、実験腫瘍の酸素分圧を上昇させる効果がある。Donryu rat 右大腿に腹水肝癌株 LY80 を移植し頸動脈的に Hb 小胞体を投与して腫瘍を酸素加し、照射を加えるモデルを作成した。腫瘍移植後 6 日目に、腫瘍を酸素加、照射の効果を検討したところ、腫瘍の成長遅延を認め、放射線照射の抗腫瘍効果を増強することが明らかとなった。腫瘍血管については血管密度が減少している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	600,000	4,100,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：低酸素、癌、酸素消費率、人工酸素運搬体、腫瘍循環

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の酸素環境は腫瘍細胞の活発な代謝と細胞分裂により、供給が需要に追いつかず、極端な低酸素環境にあることが知られており、この低酸素環境が各種の治療（化学療法や放射線照射）に抵抗性である原因であるとされている。腫瘍組織を酸素加して放射線感受性が増強する可能性があることは 1980 年代より報告があり、CO₂ 含有高濃度酸素吸入による放射線照射の効果を検討する ARCON

study では、その効果は限定的であった。高濃度 CO₂ を含む混合気の吸入は患者にとっては苦痛を訴える人も多く、苦痛の少ない方法で腫瘍の酸素加を行う方法の開発が期待されていた。

2. 研究の目的

われわれは、1986 年より早稲田大学理工学術院高分子研究室と共同で人工酸素運搬体の開発研究を進めている。人工合成のヘムを血清蛋白のアルブミンヘムを動注し、放射線照

射を加えることにより、抗腫瘍効果を増強するかについて検討し、更に腫瘍内の血管密度について固定標本を用いて放射線照射前後の変化を明らかとする。

3. 研究の方法

5週齢の Donryu rat を用いた。Donryu rat に発生した腹水肝癌である LY80(東北大学加齢医学研究所腫瘍循環 堀勝義先生より供与していただいた)を用いた。LY80 は Donryu rat の腹水内で維持した。

腹水内で維持された腫瘍細胞を 1×10^7 個/ml の濃度で生食に浮遊させ、 1×10^6 個を Donryu rat の右大腿筋膜下に 30G 針を用いて注入した。6 日後に筋膜内の腫瘍が 10mm 大になったのを確認して実験を開始した。

ペントバルビタール 25mg 腹腔内投与により麻酔を行い、左頸動脈を剥離露出し、ここより PE チューブ (SP10, 夏目製作所) を 9cm 挿入固定した。この挿入により、カテーテル先端は腹部大動脈下端の分岐部直上 5mm の位置に固定される。カテーテル挿入後、動物を腫瘍部以外の部分を鉛でシールドするように設計したケージに固定し、照射装置 (Hitachi medicotecnology 社製 MBR-1520-3) のテーブルに装着した。アルブミンヘムを 2.5ml/kg/min のスピードで 4 分間かけて動注し、ただちに 20Gy の照射を行った。照射後ケージより動物を取り出し、頸動脈より挿入したカテーテルを抜去、頸動脈は結紮した。



図 1:(上図はシールド用のケージ、窓の開いている部分だけ照射が行われる)

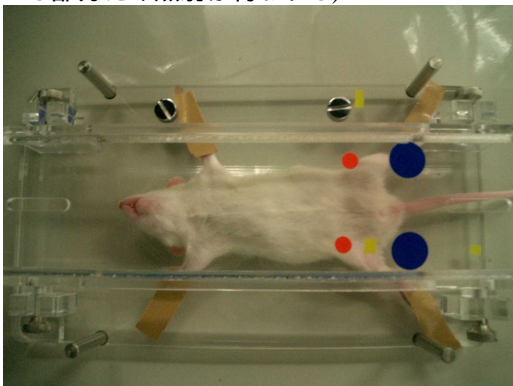


図 2(シールドケージ内の動物固定パッド図の黄色の部分に腫瘍がある。)

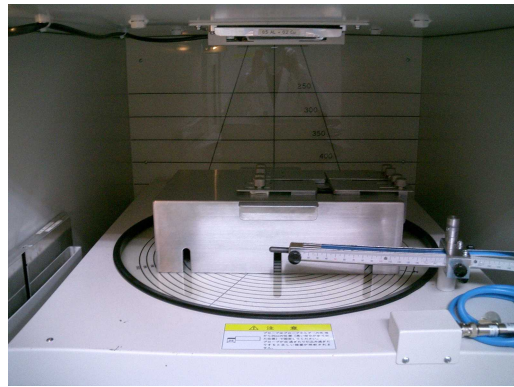


図 3(MBR-1520 内部)

この後動物をケージに戻し、飼育、体重、腫瘍径を毎日計測した。

腫瘍径より腫瘍重量を次の式で導き出し、記録した。

$$\text{estimated tumor weight(g)} = A \times B^2 / 2 / 1000$$

A: 腫瘍の長径

B: 腫瘍の短径

腫瘍重量が 30g を超えた場合(動物の体重の 12% 以下)動物を実験群より除外し、過量の麻酔薬により犠牲死させた。

評価項目として腫瘍成長抑制率 (Tumor suppression rate: TSR) を次式にて計算し求めた。

$$\text{TSRn(\%)} = \text{Tn/Cn} \times 100$$

TSRn: n 日目の腫瘍成長抑制率

Tn: n 日目の実験群の腫瘍重量

Cn: n 日目の対照群の腫瘍重量

4. 研究成果

体重の変化

腫瘍重量が増え、腫瘍の負担が大きくなると動物の体重増加率は減少した。下図のとおりカテーテル挿入のみを行った対照群では腫瘍移植 15 日後に腫瘍重量が 30g を超えたため、実験群から除外された。アルブミンヘムを動注した群では対照群とほとんど変わらぬ体重変化を示した。

Figure 2. Change of body weight

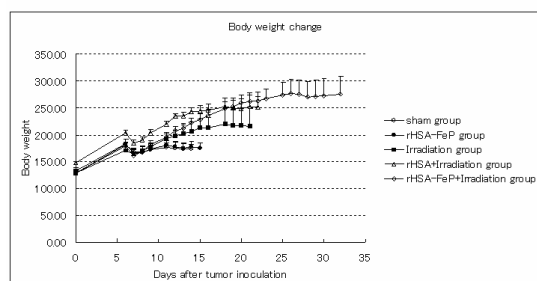


図 4: (体重の変化)

一方、照射を行った群では腫瘍移植 20 日後ま

で体重の増加が続いたが、その後増加はほとんどなかった。5%アルブミン生食を動注し、照射を行った群では体重増加は20日まで継続し、その後横ばいとなった。アルブミンヘムを動注し、照射を行った群では体重の増加は26日まで継続した。

腫瘍重量の変化

腫瘍重量は全群で照射を行っても増加した。しかし、腫瘍の成長は下図のごとく特徴的な変化を認めた。

Figure 3. Tumor growth curve

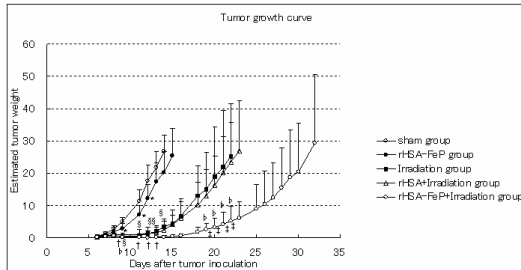


図 5: (腫瘍重量の変化)

すなわち、対照群、アルブミンヘムを投与した群ではそれぞれ13日、14日後には腫瘍が30gを超えたが、照射のみを行った群あるいはアルブミン生食を動注して照射を行った群ではそれぞれ23日、24日で腫瘍重量が30gを超えた。アルブミンヘムを動注し、照射を加えた群では腫瘍重量が30gを超えるのは腫瘍移植後32日であった。

腫瘍成長抑制率(TSR)は照射により有意に抑制されたが、アルブミンを加えて照射することにより成長率は減少し、アルブミンヘムを投与して照射を行うと、照射群に比しても有意にTSRを抑制した。(下表)

また、腫瘍重量が30gとなる時間をKaplan-Meier法で検討し、Log rank testで群間の有意差を検討したところ、照射を施した群は対照群あるいはアルブミンヘムのみを投与した群と比べ、有意に腫瘍の成長を抑制し、また、照射群とアルブミンヘムを動注し照射を加えた群の間にも有意差を認めた。

Group	D7	D12	D14
Sham	100	100	100
Albumin-heme	65.5	69.0	75.6
Irradiation	64.3	8.5	12.8
rHSA+Rdx	47.9	8.5	8.8
Albumin-heme+Rdx	39.8	0.6	0.93

表 1: (TSR の推移)

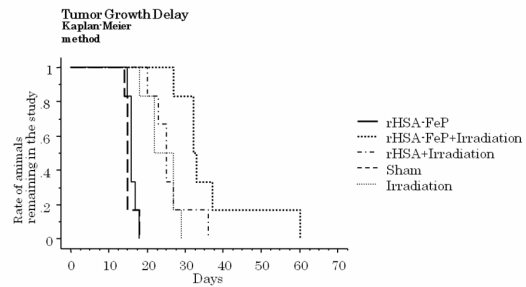


図 6: (腫瘍成長抑制の経過-Kaplan Meier 法)

考察

腫瘍を酸素加させるために現在まで、酸素吸入、CO2含有高濃度酸素等を使用し、臨床的效果が改善するとの報告はあるものの臨床的な治療法として確立してはいない。これは、腫瘍の低酸素の程度や、腫瘍循環の脆弱性のために抗腫瘍効果が予測できないためと考えられている。しかし、腫瘍を酸素加し、照射の抗腫瘍効果を増強することで、治療効果を促進する利点は大きく、簡便な方法での検討が続いている。

われわれは、早稲田大学理工学術院土田英俊博士、小松晃之博士、酒井宏水博士と共同で人工酸素運搬体の開発研究を進めている。

この酸素運搬体の中の一つであるアルブミンヘムは分子状の酸素運搬体で血中で酸素を運搬することが明らかとなっている。

一方、悪性腫瘍における血流は腫瘍細胞の旺盛な分裂、増殖に伴い腫瘍系が増大してゆくとともに独立した循環系を持たなければ成長を維持することができない。腫瘍循環は急速に増大する腫瘍に対応するために未熟で脆弱な血管壁を持つ屈曲蛇行した微細な血管網を形づくるのが特徴である。このような腫瘍循環系では血流速度も遅く、赤血球が通過せず、血漿成分のみで血流が保たれる場合もある。このような状況下では腫瘍内に十分な酸素供給が行われないと考えられる。分子状のアルブミンヘムは血漿中に溶解した形で酸素運搬を果たすので、腫瘍の酸素加が可能と考えられ、現在までの検討から、アルブミンヘム投与8分程度の腫瘍の酸素化が得られることが明らかとなっている。(Kobayashi K, Iwamaru A,2002)

この性質を利用し、照射の抗腫瘍効果を明らかとしたのが本研究で、酸素運搬を行うアルブミンヘムのみでの投与では腫瘍の成長に大きな影響を与えないことが明らかとなった。

また、LY80は照射に対する抵抗性が認められる腫瘍であるが、皮下腫瘍を形成し、照射レベルを検討することにより、成長の抑制がかかる者の再増殖するモデルを作成することができた。

このモデルを用いてアルブミンヘムの動注による腫瘍の酸素加が、照射による抗腫瘍効果の増強を起こすかについて検討したところ、アルブミンヘム投与に照射を加えることにより抗腫瘍効果が増強することが明らかとなった。

吸入酸素でも同様に腫瘍の酸素加は一時的なもので、数分から数十分で再び低酸素状態に戻ってしまうことが知られている。これは、腫瘍内での酸素消費が変化するためか、酸素運搬に変化が起るためであると考えられており、腫瘍内酸素分圧が上昇している間に効果的な治療を行うことが重要であると考えられる。

アルブミンは人の血漿蛋白の中では最も多く、膠質浸透圧の維持や、栄養状態の維持など機能も多岐にわたっている。アルブミンヘムはヘムが外れると、生理的な代謝過程を経て代謝される。また、人工合成のヘムは一部肝臓に色素上の沈着構造を残すものの大半が代謝を受けて体内より消失する。安全に使用できる人工酸素運搬体といえ、今後他の腫瘍での検討を含め、腫瘍の治療への適応について検討を深めることが必要である。

また、同時に開発を行っているヘモグロビン小胞体でも腫瘍に対する照射の増強効果を認めており、低酸素関連遺伝子 HIF-1 の発現の低下も報告した。

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12件) ALL REVIEW

1: Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Artif Organs*. 2009 Feb;33: 139-145.

2: Sakai H, Horinouchi H, Tsuchida E, Kobayashi K. Hemoglobin vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. *Shock*. 2009 May;31:507-514.

3: Sakai H, Okamoto M, Ikeda E, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Histopathological changes of rat brain after direct injection of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jul 31. [Epub ahead of print]

4: Horinouchi H, Yamamoto H, Komatsu T, Huang Y, Tsuchida E, Kobayashi K. Enhanced radiation response of a solid tumor with the artificial oxygen carrier 'albumin-heme'. *Cancer Sci*. 2008 Jun;99(6):1274-1278. Epub 2008 Apr 21.

5: Yamamoto M, Izumi Y, Horinouchi H, Teramura Y, Sakai H, Kohno M, Watanabe M, Kawamura M, Adachi T, Ikeda E, Takeoka S, Tsuchida E, Kobayashi K. Systemic administration of hemoglobin vesicle elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J Surg Res*. 2009 Jan;151(1):48-54. Epub 2008 Jan 17.

6: Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Haemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: present situation and future visions. *J Intern Med*. 2008 Jan;263 :4-15. Epub 2007 Nov 27. Review.

7: Komatsu H, Furuya T, Sato N, Ohta K, Matsuura A, Ohmura T, Takagi S, Matsuura M, Yamashita M, Itoda M, Itoh J, Horinouchi H, Kobayashi K. Effect of hemoglobin vesicle, a cellular-type artificial oxygen carrier, on middle cerebral artery occlusion- and arachidonic acid-induced stroke models in rats. *Neurosci Lett*. 2007 Jun 27;421(2):121-125. Epub 2007 Jun 2.

8: Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K. One-year observation of Wistar rats after intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers). *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2007;35(1):81-91.

9: Komatsu T, Huang Y, Wakamoto S, Abe H, Fujihara M, Azuma H, Ikeda H, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Influence of O(2)-carrying plasma hemoprotein "albumin-heme" on complement system and platelet activation in vitro and physiological responses to exchange transfusion. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Jun 15;81(4):821-826.

10: Goto Y, Terajima K, Tsueshita T, Miyashita M, Horinouchi H, Sakai H, Tsuchida E, Sakamoto A. Fluid resuscitation with hemoglobin-vesicle solution does not increase hypoxia or inflammatory responses in moderate hemorrhagic shock. *Biomed Res*. 2006 Dec;27(6):283-288.

11: Tsuchida E, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K. Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*.

2006;34(6):581-588. Review.

12: Huang Y, Komatsu T, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. PEGylated albumin-heme as an oxygen-carrying plasma expander: Exchange transfusion into acute anemia rat model. Biomaterials. 2006 Sep;27(25):4477-4483.

〔学会発表〕(計7件)

1. 富田裕, 鳥海春樹, TatarishviliJemal, 富田稔, 畝川美悠紀, 酒井宏水, 土田英俊, 堀之内宏久, 小林紘一, 鈴木則宏, マウス出血性ショック時における人工赤血球投与の脳酸素分圧への影響. 第20回脳循環代謝学会総会 (2008.11.6 東京)

2. 河野光智, 竹田貴, 堤恭介, 池田達彦, 泉陽太郎, 渡辺真純, 堀之内宏久, 小林紘一, 酒井宏水, 土田英俊. 輸血代替としての利用法 マウス肺切除+周術期出血モデルでのヘモグロビン小胞体投与の有効性の検討: 第15回日本血液代替物学会年次大会 (2008/10/23、東京)

3. 堀之内宏久, 勢司泰久, 河野光智, 泉陽太郎, 酒井宏水, 小林紘一, 土田英俊. 輸血代替としての利用法 血管損傷による制御不能出血性ショックの蘇生 人工酸素運搬体の効果について: 第15回日本血液代替物学会年次大会 (2008/10/23、東京)

4. 勢司泰久, 堀之内宏久, 相川直樹, 酒井宏水, 土田英俊, 小林紘一. 輸血代替としての利用法 腎傷害による制御不能出血モデルに対するヘモグロビン小胞体の蘇生効果: 第15回日本血液代替物学会年次大会 (2008/10/23、東京)

5. 池田達彦, 堀之内宏久, 井澤菜緒子, 河野光智, 泉陽太郎, 渡辺真純, 川村雅文, 宗慶太郎, 酒井宏水, 土田英俊, 小林紘一. 輸血代替としての利用法 Beagle 犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存後の安全性の検討: 第15回日本血液代替物学会年次大会 (2008/10/23、東京)

6. 堀之内宏久. ガスキャリアとしての人工酸素運搬体と肺循環: 第15回日本血液代替物学会年次大会 (2008/10/23、東京)

7. Enhanced radiation response by artificial oxygen carrier: Hirohisa

Horinouchi, Hisashi Yamamoto, Takayo Oba, Mizuha Haraguchi, Koichi Kobayashi, Teruaki Komatsu, Eishun Tsuchida (ISOTT2008, 2008/8/5, Sapporo)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀之内 宏久 (HORINOUCHI HIROHISA)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 60173647

(2)研究分担者

小林 紘一 (KOBAYASHI KOUICHI)
慶應義塾大学・医学部・名誉教授
研究者番号: 80051704

泉 陽太郎 (IZUMI YOTAROU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 90245506

池田 達夫 (IKEDA TATSUO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 00383802

(3)連携研究者

該当なし