

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12060

研究課題名（和文）腫瘍新生血管オープニングによる革新的がん治療法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative cancer therapy by opening of tumor neovasculature

研究代表者

大崎 智弘（OSAKI, Tomohiro）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：40431332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：In vivo試験において、リピッドバブル（LBs）と低強度超音波（LIUS）を併用することで、腫瘍組織内へのPEG修飾リポソーム化ドキシルビシン塩酸塩（PLD）の蓄積を増加させ、PLDの抗腫瘍効果を増強させることが判明した。さらに、イヌの切除不可能な固形腫瘍に対する臨床試験においても、これらの併用療法により顕著な腫瘍の縮小効果が認められた。以上のことから、LBsにLIUSと化学療法剤を併用する治療法は、腫瘍罹患犬に対する治療選択肢になる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リピッドバブルの投与と超音波照射により、同時に投与した抗がん剤を腫瘍組織内に効率よく送達することができ、抗腫瘍効果を増強させることができた。これは、投与する抗がん剤の投与量を減少させることができるため、薬剤の副作用を軽減することができることを意味する。本研究結果は、ヒト医療への橋渡し研究として十分な意義のあるものである。

研究成果の概要（英文）：In an in vivo experiment, we clarified that the combined use of lipid bubbles and low-intensity ultrasound enhanced the accumulation of pegylated liposomal doxorubicin hydrochloride in tumor tissues, thereby increasing its antitumor effect. In a veterinary clinical experiment on unresectable canine solid tumors, we found that that abovementioned triple-combination therapy induced a notable reduction in tumor volume. These findings indicate that lipid bubbles, in combination with chemotherapeutic agents and low-intensity ultrasound irradiation, have potential therapeutic applications for the treatment of canine tumors.

研究分野：腫瘍

キーワード：リピッドバブル 薬物送達 腫瘍 イヌ

1. 研究開始当初の背景

超音波は、非侵襲的かつ深部到達性の良い物理エネルギーとして、診断や治療で広く用いられている。これまで我々は、超音波を駆動力として、抗がん剤の治療効果を高める方法について研究を行ってきた。2015年に超音波、超音波増感剤および抗がん剤を併用した超音波内包化技術 (Sono-Chemical Internalization, SCI) を世界で初めて開発し、著しい抗腫瘍効果を認めた。しかし、SCI では増感剤や抗がん剤の量が多いために副作用が強く発現する懸念がある。また、増感剤の腫瘍組織特異性が低く、治療効率が悪い。そのため、より薬剤の副作用が軽微で、かつ効率的な治療法の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、上記の問題点を克服するために、新規マイクロバブルであるバブルリポソーム (BLs) と超音波 (US) を用いて、腫瘍新生血管 (TNV) をオープニングして EPR 効果を亢進させ、同時に投与した抗がん剤の抗腫瘍効果を増強させるという、新規がん治療法を開発することを目的とした。過去の研究において、BLs と US を併用することにより、色素標識された血中アルブミンが血管外に漏出することがマウスの正常組織において確認された。近年、丸山らは造影超音波検査および TNV オープニングを目的に、分子量 2,000 のポリエチレングリコール (PEG) で修飾された単層のリン脂質から成る外殻内にパーフルオロプロパンガスを内包した BLs である Lipid bubbles (LBs) を新規に開発した。

そこで本研究では、腫瘍モデルマウスを用いて LBs と低強度超音波 (LIUS) の併用により腫瘍組織内で TNV オープニングが生じ、抗がん剤である PEG 修飾リポソーム化ドキシソルビシン塩酸塩 (PEGylated liposomal doxorubicin hydrochloride, PLD) の腫瘍組織内蓄積および抗腫瘍効果の増強が得られるかを検討した。また、獣医臨床応用に向けて、健常犬において LBs の安全性および超音波造影効果を評価した。さらに、肝臓の腫瘍性病変を認めた犬を対象に、LBs を用いた造影超音波検査の有用性を評価した。最後に、切除困難な体表腫瘍を有する犬の 3 例に対して PLD および LBs の投与および LIUS 照射を行う併用治療を実施し、治療効果に関して予備的に評価した。

3. 研究の方法

(1) *In vivo*における評価

マウス乳腺腫瘍 (EMT6) を Balb/c マウスの背部皮下に移植し、腫瘍モデルマウスを作製した。PLD (10 mg/kg) および LBs (3.2×10^7 個/匹) 混合液をマウス尾静脈内投与直後、理学療法用超音波治療器 (UST-770、伊藤超短波株式会社) を用いて腫瘍組織に LIUS を照射した。LIUS 出力条件は、次のように設定した。周波数: 1 MHz、出力強度: 2 W/cm^2 、デューティサイクル: 50%、パルス繰り返し周波数: 100 Hz、照射時間: 60 秒。照射 1 時間後に腫瘍組織を摘出し、PLD の腫瘍組織内重量を測定した。また、FITC 標識デキストラン (分子量 70,000) および BLs 混合液をマウス尾静脈内投与直後、腫瘍組織に超音波を照射した。1 時間後に腫瘍を摘出し、抗 CD31 抗体を用いて免疫蛍光染色を行なった。さらに、上記治療を Day0、2 および 4 に計 3 回実施した。対照群、LBs 群、LIUS 群、LBs+ LIUS 群、PLD 群、PLD+ LIUS 群および PLD+LBs+ LIUS 群の 7 群で試験を実施した。Day8 に各群の一部個体で腫瘍組織を摘出し、病理組織学的 (H&E 染色および TUNEL 染色) に評価した。

(2) 健常犬における LBs の短期的安全性および超音波造影効果の評価

覚醒下において、健常ビーグル犬 6 頭の静脈内に LBs を投与し、肝臓に対する超音波造影検査を 15 分間実施した。超音波画像上で肝門脈と肝臓組織に関心領域を設置し、時間経過に伴う平均グレースケール強度 (Mean Grayscale Intensity, MGI) の変化を観察した。MGI は画像解析ソフトを用いて算出し、時間-MGI 曲線を作成した。LBs の投与前後に血液検査と身体検査を実施し、LBs の犬に対する短期的な安全性を評価した。また、市販の BLs 製剤であるソナゾイド®を用いた交互試験を実施した。

(3) 悪性腫瘍罹患犬に対する PLD、LBs および LIUS の併用治療

鳥取大学農学部附属動物医療センターに来院した切除困難な体表腫瘍に罹患した犬の 3 例に対して、PLD、LBs および LIUS 併用治療 (動物臨床研究倫理委員会承認済み) を実施した。治療前に、飼い主からインフォームドコンセントを取得した。PLD ($8\sim 16 \text{ mg/m}^2$) を 10~20 分かけて持続点滴投与した後、LBs ($2.5\sim 5.0 \times 10^9$ 個/mL) を 5 分ごとに間欠的に静脈内投与しながら治療用超音波を腫瘍に照射した。LIUS 出力条件は、次のように設定した。周波数: 1 MHz、出力強度: 2 W/cm^2 、デューティサイクル: 50%あるいは 100%、照射時間: 15~40 分間。治療は、少なくとも 7 日以上間隔をあけて実施した。PLD と LBs の投与量、超音波の照射時間、および治療サイクル数は、各症例の全身状態を考慮して治療毎に決定した。経時的にノギスを用いて腫瘍

サイズを測定し、体積を算出した。

4. 研究成果

(1) *In vivo*における評価

PLD、LBs および LIUS 併用群では、PLD 群と比較して腫瘍組織内のドキシソルビシン重量が有意に増加し、約 1.3 倍となった (図 1)。このことから、LBs と LIUS を併用することにより、静脈内投与された PLD の腫瘍組織内への蓄積が増加することが示された。

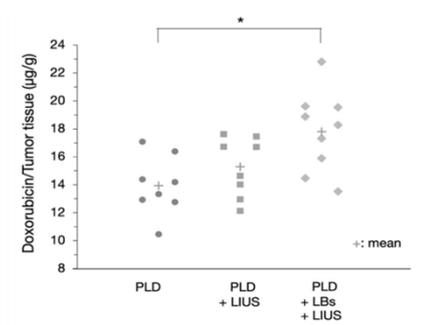


図 1. PLD および LBs の投与および LIUS 照射が与える腫瘍組織内ドキシソルビシン塩酸塩集積効果

また、免疫蛍光染色では、FITC 標識デキストランおよび LBs の投与および LIUS 照射を併用すると、FITC 標識デキストランが腫瘍組織内の血管周囲により広範かつ明瞭に分布した (図 2)。このことから、LBs と LIUS を併用することにより、FITC 標識デキストランが腫瘍組織内の血管内から血管周囲組織へ漏出した可能性が考えられた。

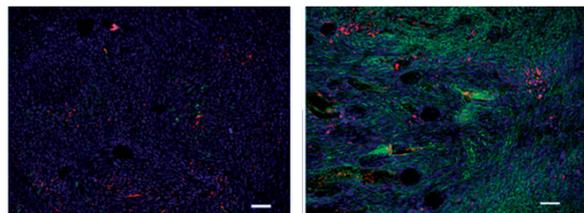


図 2. LBs の投与および LIUS 照射が与える腫瘍組織内 FITC 標識デキストラン漏出効果

(左) : FITC 標識デキストラン投与のみ
(右) : FITC 標識デキストランおよび LBs の投与および LIUS 照射
(緑) : FITC 標識デキストラン
(赤) : Alexa Fluor 594 で標識した二次抗体が結合した CD31 抗原 (血管内皮細胞を表す)
(青) : 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色された細胞核

Day18 において、対照群と比較して PLD 群、PLD+ LIUS 群および PLD+LBs+ LIUS 群において有意腫瘍成長抑制効果が認められた (図 3)。Day22 において、PLD+LBs+ LIUS 群における腫瘍体積が最も小さかった。PLD 群および PLD+ LIUS 群では、それぞれ 8 個体中 1 個体および 9 個体中 0 個体で完全奏功が認められたが、PLD+LBs+ LIUS 群では CR を示した個体は 9 個体中 4 個体で完全奏功が認められた。Day8 における病理組織学的検査では、対照群でほとんど壊死領域やアポトーシス細胞が認められなかったのに対し、PLD 群では腫瘍中央に中程度の壊死領域およびその周囲にアポトーシス細胞が認められた。PLD+LBs+ LIUS 群では、腫瘍組織の両端を除く全域に広範な壊死領域が認められ、その周囲に多数のアポトーシス細胞が検出された。これらの結果から、PLD および LBs の投与および LIUS 照射を併用することにより、腫瘍組織内に PLD が集積して抗腫瘍効果が増強されたと考えられた。

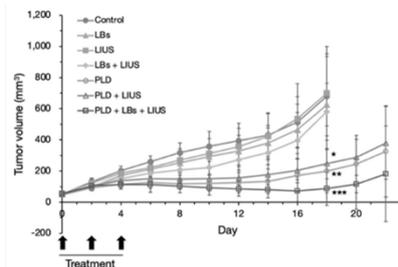


図 3. 腫瘍モデルにおける PLD および LBs の投与および LIUS 照射が与える腫瘍成長抑制効果

(2) 健常犬における LBs の短期的安全性および超音波造影効果の評価

健常犬において、LBs の投与直前と投与 24 時間後では、血液検査において異常値は検出されなかった。また、身体検査上も異常所見は認められなかった。これらのことから、LBs の単回投与は健常犬において安全に実施できると考えられた。また、LBs の投与により、血管相および後血管相でそれぞれ造影効果が認められた (図 4 左)。血管相のうち門脈優位相では、投与後 1 分で肝門脈内の MGI はピークとなり、その後徐々に低下して 8 分以降に基準値までに低下した。肝臓組織では、投与後 1 分後に定常状態に達し、後血管相に移行した。LBs の投与により肝門脈だけでなく肝臓組織が造影されたことから、LBs はソナゾイド® (図 4 右) と同様に動脈優位相、

門脈優位相および後血管相の描出が可能であると考えられた。

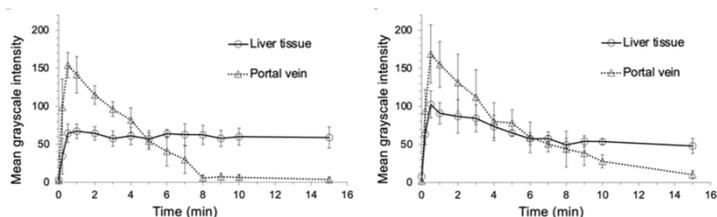


図4. 造影超音波検査における門脈および肝臓実質のグレースケールの変化

(左) : LBs

(右) : ソナゾイド®

(3) 悪性腫瘍罹患犬に対する PLD、LBs および LIUS の併用治療

切除困難な体表腫瘍に罹患した犬の 3 例に対して、PLD、LBs および LIUS 併用治療を実施した。症例 1 は肛門周囲の血管周皮腫、症例 2 は左耳根部の耳垢腺癌、症例 3 は頸部の甲状腺癌（疑い）と診断された。治療回数は、症例 1 では 2 回、症例 2 では 6 回、症例 3 では 4 回であった。症例 1、2 および 3 の治療前と比較した腫瘍体積比は、それぞれ 28.9、28.2 および 44.3% であった（図 5）。症例 3 では、治療開始前と 4 回目の治療終了後に血管造影 CT 検査を実施した。超音波照射を行った頸部の腫瘍は、ヨード造影剤による造影効果の減弱と腫瘍サイズの縮小が認められた。一方、超音波照射を行わなかった肺転移病巣の大きさには変化は認められなかった。以上のことから、犬の自然発生腫瘍においても、PLD の投与に加えて LBs の投与および LIUS 照射を併用することで腫瘍の成長を抑制できると考えられた。しかしながら、本臨床試験は予備的に実施されたため、今後は十分な症例数を確保した臨床試験を実施することにより、治療効果と副作用を詳細に評価する必要がある。

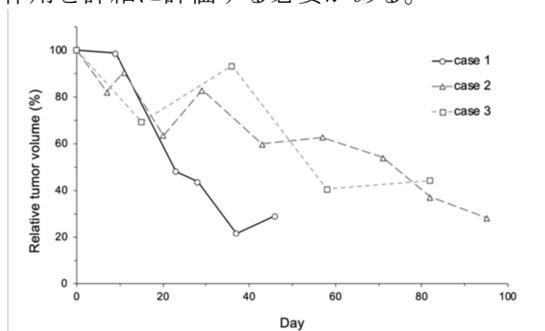


図5. 腫瘍罹患犬における PLD および LBs の投与および LIUS 照射が与える腫瘍成長抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yokoe Inoru, Murahata Yusuke, Harada Kazuki, Sunden Yuji, Omata Daiki, Unga Johan, Suzuki Ryo, Maruyama Kazuo, Okamoto Yoshiharu, Osaki Tomohiro	4. 巻 12
2. 論文標題 A Pilot Study on Efficacy of Lipid Bubbles for Theranostics in Dogs with Tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2423 ~ 2423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12092423	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokoe Inoru, Omata Daiki, Unga Johan, Suzuki Ryo, Maruyama Kazuo, Okamoto Yoshiharu, Osaki Tomohiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Lipid bubbles combined with low-intensity ultrasound enhance the intratumoral accumulation and antitumor effect of pegylated liposomal doxorubicin in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Delivery	6. 最初と最後の頁 530 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10717544.2021.1895907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横江 祈、小俣大樹、鈴木 亮、丸山一雄、大崎智弘。
2. 発表標題 リビッドバブルと超音波の併用によるリポソーム化ドキシソルピシンの抗腫瘍効果増強に関する検討
3. 学会等名 第 18 回日本超音波治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横江 祈、村端悠介、原田和記、鈴木 亮、丸山一雄、山下 真路、東 和生、柄 武志、伊藤典彦、今川智敬、岡本芳晴、大崎智弘。
2. 発表標題 新規マイクロバブル製剤を用いた超音波造影検査の有用性
3. 学会等名 第161回 日本獣医学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	丸山 一雄 (MARUYAMA Kazuo) (30130040)	帝京大学・薬学部・教授 (32643)	
研究協力者	寸田 祐嗣 (SUNDEN Yuji) (20451403)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	
研究協力者	伊藤 典彦 (ITO Norihiko) (80264654)	鳥取大学・農学部・准教授 (15101)	
研究協力者	村端 悠介 (MURAHATA Yusuke) (30734743)	鳥取大学・農学部・助教 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------