

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09157

研究課題名(和文)がん特異的DDSを利用した肝細胞癌の超音波力学治療：免疫不全ブタへの展開

研究課題名(英文)Ultrasound-activated sonodynamic therapy of hepatocellular carcinoma using cancer-specific drug delivery system: Deployment in immunodeficient pigs

研究代表者

三原 規奨(Mihara, Kisyo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：80464957

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)：本研究では、超音波力学療法が、肝細胞癌に対する治療法として応用可能となるか、という問いに対し、RAG-2ノックアウトの免疫不全ブタを用いた実験により、以下の2つの点を示した。PMBポリマーに内包されたベルテポルフィン(Verteporfin)をブタに投与、1時間後の腫瘍組織にベルテポルフィンが取り込まれた。ベルテポルフィン投与30分後から1MHz、30分の超音波力学療法を体表から1週おきに2回施行することによって細胞死が誘導された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超音波力学療法は、体表からの外部エネルギーを用いた低侵襲治療である。光線力学療法と同様に感受性物質を励起し、フリーラジカルを発生させるという原理を用いるが、超音波で励起するため、深部の癌にも有効であるという特徴がある。ブタという大動物を用い、臨床に近いサイズ感で行った実験の結果であり、今後が期待がされると考える。課題は残るものの、低侵襲で繰り返し治療可能な、深部の癌にも効果を示した点で画期的な第1歩である。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to address the question of whether ultrasound-activated sonodynamic therapy with verteporfin could be applied as a treatment for hepatocellular carcinoma. The following two points were demonstrated by experiments using RAG-2 knockout immunodeficient pigs. (1) Verteporfin encapsulated in PMB polymer was administered to pigs, and one hour later, verteporfin was incorporated into tumor tissue. (2) Cell death was induced by 1 MHz, 30-minute ultrasound-activated sonodynamic therapy applied from the surface of the body at 30 minutes after 30 minutes of verteporfin administration, twice a week apart.

研究分野：消化器外科

キーワード：超音波力学療法 免疫不全ブタ 肝細胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の予後は、他臓器のがんと異なり、腫瘍の進行と肝機能不全のふたつの要因で規定されている。現在、肝細胞癌の治療には、手術や穿刺局所療法に加えて、肝動脈化学塞栓療法やソラフェニブに代表される化学療法といった治療法が選択される。一方で、これらすべての治療法は、肝機能障害が比較的軽度な背景肝を有する患者にしか適応できないという欠点をもつ。その上、治療法自体が肝機能の増悪因子となるため、肝臓に対する腫瘍負担とあいまって、進行肝細胞癌に対しては、治療継続が困難となる場合も多い。また、肝細胞癌は、肝内の再発頻度が最も高く、繰り返しの肝臓内治療を要することをしばしば経験する。そのため、より背景肝機能に悪影響を与えない、低侵襲で、再発に際して繰り返し施行可能な治療法が求められている。

体表からの外部エネルギーを用いた低侵襲治療に超音波力学療法がある。光線力学療法と同様に感受性物質を励起し、フリーラジカルを発生させるという原理を用いるが、超音波で励起するため、深部の癌にも有効であるという優れた特徴がある。本研究に使用する超音波の周波数及び強度では、周囲組織に影響はなく、また感受性物質そのものも、励起されなければ無害である。そのため、治療対象に、薬剤を選択的にデリバリーすることを前提とすれば、限りなく低侵襲な治療法といえ、また、超音波力学療法は繰り返し施行可能な治療法である。超音波力学療法を利用した肝細胞癌治療は、背景肝への低侵襲性と再治療を行える点でメリットが高く、肝細胞癌治療の未来の扉をあける治療法に位置づけられる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、超音波力学療法が、肝細胞癌に対する治療法として抗腫瘍効果および肝機能に与える影響の側面から、臨床的に応用可能となるか、ということにある。

肝細胞癌の治療には手術・RFA・TACE・化学療法などがあるが、背景肝機能、血管支配、腫瘍数による治療適応の限界などにより、最終的には治療困難に陥ってしまう。より多くの患者を救い、できるだけ長く質の高い生活を維持していくには新しい低侵襲な肝細胞癌治療法の開発が必要不可欠である。申請者のグループでは、光線力学療法、また超音波を用いたフリーラジカルの発生による治療方法など、外部エネルギーを利用した低侵襲治療の開発と両親媒性ポリマーを応用したドラッグデリバリーシステム(DDS)に実績があり、マウス・ラットのみならず、共同研究グループと共にヒトに近いサイズであるブタの病態モデルの開発を行ってきた。本研究では、オリジナルのDDSと超音波力学療法を組み合わせ、背景肝に障害のあるブタ担癌モデルを用いて、肝機能検査や病理組織など、実臨床に近い実施状況での科学的データに基づく治療効果・副作用の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ブタ単結節担癌モデルの作製

単結節の肝癌を作製する方法として、ヌードマウス皮下などで固形にした腫瘍を小開腹により埋め込む方法とマトリゲルを用いて肝臓に直接注入する方法の2つを採用した。ブタは、4.5週齢のRAG2-KOブタを用いた。まず、ヌードマウスの皮下にA431類上皮癌株を接種し、約3週後に固形化したA431類上皮癌株を2mm角に切り出した。免疫不全豚に全身麻酔を行い、開腹下に肝臓1か所に小切開を入れて肝実質内に植え込んで縫合、もう1か所はマトリゲルにA431類上皮癌株を 1×10^7 /mlに懸濁した液を、100 μ l接種した。その後、閉腹をした。

(2) エコーでの肝臓の撮影

ブタ腹部エコーには、アロカのProSound C3cvを用いた。

(3) ベルテポルフィンの調整

ベルテポルフィン内包PMBポリマーナノ粒子の作製は、(Cancer Biother Radiopharm. 2011 Dec;26(6):697-704.)に準じ、塩化メチレンに100mg/mlの濃度で溶解したベルテポルフィンをスターラーで攪拌しながら5%PMBポリマーに滴下し、その後30分ソニケーション、エバポレーションを施行した。

(4) ベルテポルフィンの投与と超音波治療

腫瘍接種3週目のベルテポルフィン内包PMBポリマーナノ粒子を経静脈的に6mg/kg投与したブタ1頭に対し、組織内ベルテポルフィン濃度測定のため、60分後の組織を採取した。別の1頭は、腫瘍接種3週目と4週目に、投与後30分から1時間の間、体表からエコーで腫瘍があると確認された周辺を、伊藤超短波のUS-710(1MHz)を用い、duty 100%、intensity 2.0の条件下で、30分間の超音波照射を行った。対象は超音波照射のみとした。

(5) サンプル採取

腫瘍接種5週目に、凍結用サンプル、ホルマリン固定用サンプルをそれぞれ採取した。

(6) 組織中ベルテポルフィン濃度測定

ベルテポルフィン取り込み量は、蛍光強度測定により定量した。組織を凍結乾燥し、塩化メチレン500 μ lを加えてベルテポルフィンを溶出した後、蛍光光度計にて濃度測定した(励起波長430nm, 測定波長700nm)。

(7) 病理標本作製と評価

病理標本は、ホルマリン固定サンプルをパラフィン包埋し、薄切した切片をH E染色で染色し、

評価した。

4. 研究成果

(1) 組織中ベルテポルフィン濃度

対象となる皮膚の組織の乾燥重量は、150.8mg、腫瘍部の乾燥重量は20.5mgであった。蛍光強度は、皮膚が17247、腫瘍が113960であり、1mgあたりの蛍光強度で比較すると、48.6倍の取り込みが見られた。組織中ベルテポルフィン濃度については再検討が必要であると考えが、腫瘍部でのベルテポルフィンの取り込みが確認された。

(2) 病理組織の評価

5週目の腫瘍径を病理標本上で測定すると、超音波のみでは最大径が11.7mm、ベルテポルフィン内包PMBポリマーナノ粒子+超音波では、7.6mmであった(図1)。

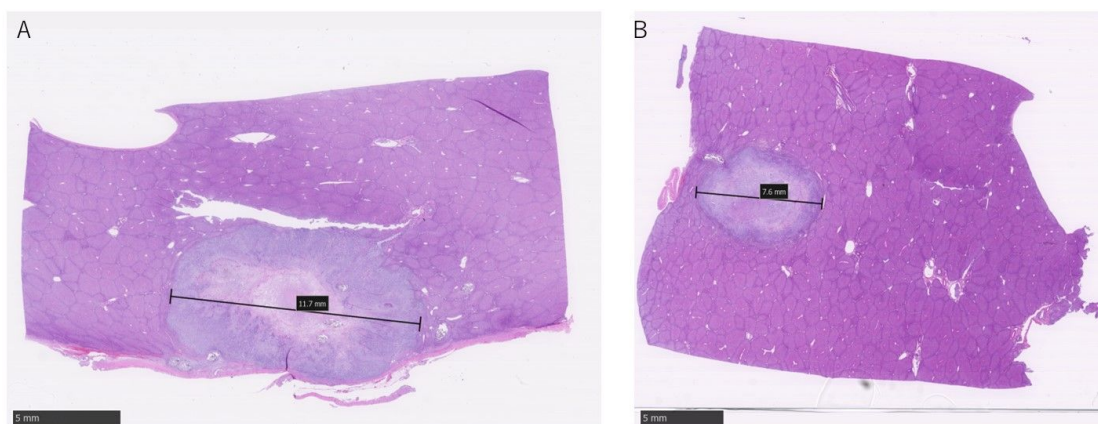


図1 肝臓に移植した腫瘍 5週目の病理像 (HE染色)

A:超音波のみ B:ベルテポルフィン内包PMBポリマーナノ粒子+超音波

ベルテポルフィン内包PMBポリマーナノ粒子+超音波の腫瘍部分を拡大すると、中央のネクロシス部分、外側の増殖部分の間に、繊維化が多くみられる部分が観察された(図2)。

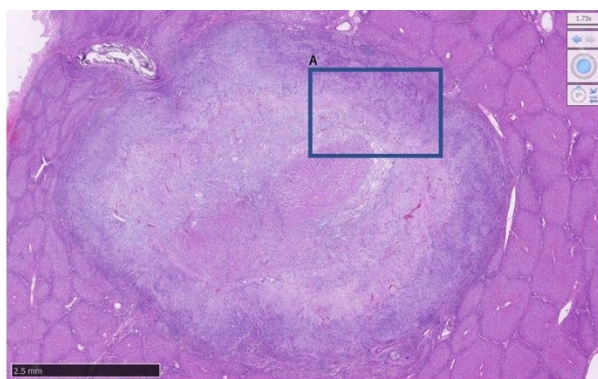


図2 ベルテポルフィン内包PMBポリマーナノ粒子+超音波治療した腫瘍部の拡大 (Aの部分を図3にさらに拡大)

図3Aの拡大である、図3Bは腫瘍の中心に近い部分であり、腫瘍の増大に伴う虚血による壊死に合致する所見が得られた。図3Cは腫瘍の辺縁に近い部分であり、生存している腫瘍細胞が、多数見られる。図3DはBとCの中間に位置し、核の濃縮、変性した細胞が見られた一方、間質の細胞は生存しており、虚血による変性とは違った所見が見られた。

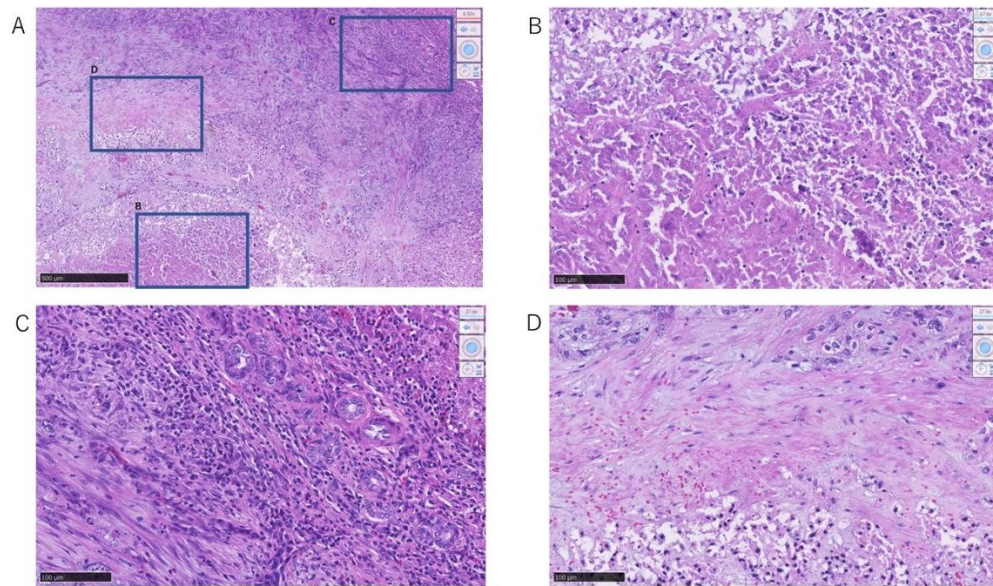


図3 ベルテポルフィン内包PMBポリマーナノ粒子+超音波治療した腫瘍部の拡大
Aの中の四角をさらに拡大 (B, C, D)

(3) 総括および今後の展望

本研究では、PMBポリマーに内包されたベルテポルフィンが腫瘍部に集積し、超音波を照射することによって細胞死が誘導されることが示唆された。大動物を用いた、臨床に近いサイズ感での良好な結果であり、今後の結果が期待されると考える。今回治療は2回ではあるが、低侵襲で繰り返し可能であり、深部の癌にも効果のある方法を示した点で画期的な成果であると言える。一方で、N数の少なさは今後の課題である。PMBポリマーの他に、抗体などのタンパク質を結合させることのできるPMBNポリマーについては、今回の検討での施行はかなわなかったが、抗体を付加できるポリマーを使用することにより、よりターゲットへの指向性が高まり、効果が増幅する、あるいは薬剤の投与量を減らすことが可能となると考える。また、今回の検討では残存した腫瘍細胞の再増殖と思われる所見が得られたため、治療回数や、治療のタイミング、超音波照射時間などの検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	淵本 大一郎 (Fuchimoto Daiichiro) (10343998)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	
研究分担者	鈴木 俊一 (Suzuki Shunichi) (90391581)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	
研究分担者	松田 祐子 (Matsuda Sachiko) (90534537)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任講師 (32612)	

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