

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 22 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20300182

研究課題名（和文） 超音波を併用した癌分子標的・血管新生阻害療法の臨床導入に向けての研究

研究課題名（英文） Research for the purpose of introduction in clinical use of molecular target and antiangiogenic cancer therapy combined with ultrasound energy

研究代表者

江本 精 (EMOTO MAKOTO)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80258540

研究成果の概要（和文）：新たな癌化学療法の治療戦略であるメトロノミック化学療法は少量の抗癌剤を持続的に使用する方法であり、腫瘍血管内皮細胞をターゲットとする。我々はヒト子宮肉腫を対象として本療法の治療効果の増強を図る目的で、メトロノミック化学療法に低出力超音波照射を併用し、その相乗効果について検討した。抗癌剤は塩酸イリノテカンを使用した。子宮肉腫は人体に発生する腫瘍のなかでも最も悪性度の高い腫瘍の一つであるため、本研究には我々が樹立したヒト子宮肉腫株である FU-MMT-3 株を用いた。血管新生阻害作用の評価には circulating endothelial progenitor cells (CEP) を測定した。その結果、FU-MMT-3 株に対して *in vitro* 及び *in vivo* においてもメトロノミック投与量の塩酸イリノテカンに低出力超音波照射 (2.0 w/cm², 1 MHz, 4 分間週 3 回照射) を併用した治療群が最も腫瘍増殖抑制効果と血管新生阻害効果をもたらした。結論として、メトロノミック化学療法と低出力超音波照射の併用療法は新たな癌治療法として期待できうるものであることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Metronomic chemotherapy is the frequent administration of low doses of chemotherapeutic agents targeting tumor-associated endothelial cells. We examined the efficacy of metronomic irinotecan combined with low-intensity ultrasound (US) in human uterine sarcoma and evaluated its antiangiogenesis mechanism by measuring the circulating endothelial progenitor cells (CEP), a surrogate marker of angiogenesis. A human uterine sarcoma cell line, FU-MMT-3, was used in the present study because this tumor is one of the most malignant neoplasms of human solid tumors and it also has a high angiogenesis property. The combination of low dose irinotecan and US irradiation significantly inhibited the tube formation of HUVEC and vascular endothelial growth factor expression of tumor cells *in vitro*. The FU-MMT-3 xenografts in nude mice were treated using US at a low intensity (2.0 w/cm², 1 MHz) for 4 min three times per week each after the intraperitoneal administration of irinotecan; this treatment was continued for 5 weeks. The tumor vascularity was assessed by contrast-enhanced color Doppler US in real time. The combination treatment significantly inhibited the mobilization of CEP and intratumoral vascularity compared with the control. This combination therapy showed a significant reduction in tumor volume, resulting in a significant prolongation of survival, in comparison with each treatment alone. These results suggest that the effect of metronomic chemotherapy for human uterine sarcoma was accelerated by US irradiation *in vivo* and this combination might therefore be potentially effective for new cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 4,000,000 | 1,200,000 | 5,200,000 |
| 2009年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 2010年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 2011年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,800,000 | 4,440,000 | 19,240,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波医科学

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療は、従来の抗がん剤とは異なりがん細胞が特異的に有する機能を抑制する。中でもがんの血管新生は固形腫瘍の増殖・転移において必要不可欠な現象の一つであることが判明し、近年のがん生物学のエポックとなったため新たながん分子標的治療戦略の一つとして大いに期待されている。つまり、血管内皮細胞の増殖を抑制し、血管新生因子である VEGF 等の産生を抑えることにより、腫瘍細胞への栄養・酸素供給を阻止して癌の増殖・転移を抑制しようという兵糧攻めの戦略である。しかし、分子標的薬・血管新生阻害薬と放射線照射を併用した臨床試験が欧米では大きく展開されているが、超音波エネルギーの併用はまだ行われていない。

2. 研究の目的

近年、超音波エネルギーによる生体作用について、薬剤透過性亢進作用のみならず癌細胞に対する DNA 合成阻害作用も認めることが *in vitro/in vivo* で最近報告された。生体に対して超音波は放射線と比較して圧倒的に低侵襲であり、今後あらゆる疾患の治療や媒体の手段の一つとして期待されている。しかし、超音波エネルギーと血管新生阻害剤を併用した基礎研究はまだ世界的に行われておらず、我々は、初めてその研究を子宮癌マ

ウス移植腫瘍に対して行い、その良好な治療成績と超音波の薬剤取り込み促進効果を最近報告した (Emoto M, Tachibana K; Cancer Science 2007, 2004 年日本超音波医学会奨励賞)。また、超音波による薬剤取り込みのメカニズムの概要も明らかにされつつある。超音波によって細胞周辺で微細な泡が発生し、また非常に短時間で潰れて消失するキャビテーションと呼ばれる物理運動が起こる。この微細な泡が細胞の周囲で破裂することによってマイクロなジェット水流が起こり細胞膜に微細な穴を開ける (ソノポレーション：本研究に超音波を併用する重要な意義の一つ)。従って、本研究申請は非常に安全性の高いとされる低出力超音波を、可及的速やかにがん治療の臨床試験に導入するための重要なステップとなる可能性が極めて高い。

3. 研究の方法

本研究の特徴は、超音波を癌に対する治療手段としてだけでなく、血流画像診断法として、抗腫瘍効果と血管新生阻害の効果判定にも利用することである。この診断法は血管新生抑制効果を *real-time* に評価できる最も有用な方法の一つであり、その意義は既に我々が初めて病理学的に裏付けた。つまり、超

音波を、動物実験の治療だけでなく診断法として使用するという合理的なアプローチで国際的にも注目されている。我々は婦人科癌の血管新生について超音波画像、細胞培養、免疫組織、分子病理学的に検討し報告してきた。また、我々は、微小気泡造影剤を用いた超音波カラードプラ法によって、小さな卵巣癌の腫瘍内血流の検出に初めて成功し早期診断に貢献した(Emoto M: J Clin Oncol 2003)。本申請では既存の治療法に抵抗性を示す固形癌に対して超音波併用化学療法の有用性を更に追求し、造影超音波診断法や LASER Doppler にて治療効果を非侵襲的にリアルタイムで判定する。

研究分担者である立花は、超音波エネルギーが細胞膜透過性を亢進させることにより薬剤取込量が促進されること、更に遺伝子導入が促進されることを報告した(Lancet 1997, Lancet 1999, Gene Therapy 2002)。低出力の超音波照射は低侵襲であり、分子標的薬や血管新生阻害剤との組合せは、被験者の QOL に対する貢献度も高い。本申請は超音波併用癌化学療法における preclinical study であり、超音波強度とその安全性、及びそれに伴う薬剤濃度の設定を行った。

4. 研究成果

本研究における最も顕著な成果は、超音波照射とメトロノミック化学療法の併用療法がもたらす抗腫瘍効果と血管新生阻害作用である。新たな癌化学療法の治療戦略であるメトロノミック化学療法は少量の抗癌剤を持続的に使用する方法であり、腫瘍血管内皮細胞をターゲットとする。我々はヒト子宮肉腫を対象として本療法の治療効果の増強を図る目的で、メトロノミック化学療法に低出力超音波照射を併用し、その相乗効果について検討した。抗癌剤は塩酸イリノテカンを使用

した。子宮肉腫は人体に発生する腫瘍のなかでも最も悪性度の高い腫瘍の一つであるため、本研究には我々が樹立したヒト子宮肉腫株である FU-MMT-3 株を用いた。血管新生阻害作用の評価には circulating endothelial progenitor cells (CEP)を測定した。その結果、FU-MMT-3 株に対して in vitro 及び in vivo においてもメトロノミック投与量の塩酸イリノテカンに低出力超音波照射(2.0 w/cm, 1 MHz, 4 分間週 3 回照射)を併用した治療群が最も腫瘍増殖抑制効果と血管新生阻害効果をもたらした。治療の安全性においても in vivo では特別な有害事象は出現せず、臨床試験への移行は可能であると判断された。結論として、メトロノミック化学療法と低出力超音波照射の併用療法は新たな癌治療法として期待できるものであることが示唆された(Choijamts B, Emoto M, et al. Cancer Sci 2011)。

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 10 件)

- ① 江本 精: Müller 管混合腫瘍。「子宮疾患・子宮内膜症の臨床」 日本臨床社 67, 251-255, 2009
- ② Emoto M, Naganuma Y, Choijamts B, Ohno T, Yoshihisa H, Kanomata N, Kawarabayashi T, Aizawa M, Novel chemoembolization using calcium-phosphate ceramic microsphere incorporating TNP-470, an anti-angiogenic agent. Cancer Sci 101, 984-990, 2010
- ③ Choijamts B, Naganuma Y, Nakajima K, Kawarabayashi T, Tachibana K, Emoto M, Metronomic irinotecan combined with

- ultrasound irradiation for human uterine sarcoma xenografts. *Cancer Sci* 102, 452-459, 2011
- ④ Emoto M, Sadamori R, Hachisuga T, Kawarabayashi T, Miyamoto S. Clinical usefulness of contrast-enhanced color Doppler ultrasonography in invasive and noninvasive gestational trophoblastic diseases: a preliminary study. *J Reprod Med* 56:224-234, 2011
- ⑤ Naganuma Y, Chojimats B, Shiota K, Nakajima K, Ogata S, Miyamoto S, Kawarabayashi T, Emoto M. Metronomic doxifluridine chemotherapy combined with the anti-angiogenic agent TNP-470 inhibits the growth of human uterine carcinosarcoma xenografts. *Cancer Sci* 102:1545-1552, 2011
- ⑥ Chojimats B, Jimi S, Naganuma Y, Matsumoto T, Kuroki M, Iwasaki H, Emoto M. CD133 Cells in Carcinosarcoma (Malignant Mixed Mullerian tumor) of the Uterus Have Cancer Stem Cell-like Properties. *Stem Cells* 29:1485-1495, 2011
- ⑦ 江本 精: 低出力超音波を用いたがん治療 「超音波医学」 39:251-257, 2012
- ⑧ Matsueda M, Emoto M, Aizawa M. Preparation of calcium-phosphate microspheres by salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique and their drug release behavior using anti-angiogenic agent, TNP-470. *Key Engineering Materials* 493; 672-677, 2012
- ⑨ 江本 精: 子宮肉腫の診断と治療. 「婦人科がん-最新の研究動向」 日本臨床社 70, 442-446, 2012
- ⑩ Negishi Y, Hamano M, Tsunoda Y, Oda Y, Batsuren C, Takahashi Y, Omata D, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Emoto M, Aramaki Y. AG73-modified Bubble liposomes for targeted ultrasound imaging of tumor neovasculature. *Biomaterials* 34; 501-507, 2013
- [学会発表] (計6件)
- ① 江本 精, エラストグラフィと超音波カラードプラを併用した新たな画像診断の評価-In vivo study、第83回日本超音波医学会学術集会シンポジウム、2010年5月30日、京都
- ② Emoto M, Naganuma Y, Chojimats B, Kanomata N, Miyamoto S, Kawarabayashi T, Aizawa M., Novel Chemoembolization using Calcium-phosphate Ceramic Microsphere Incorporating TNP-470, an Anti-angiogenic Agent for Uterine Sarcomas, 13th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 2010年10月24日、チェコ国・プラハ
- ③ Emoto M. Metronomic doxifluridine chemotherapy combined with the anti-angiogenic agent TNP-470 inhibits the growth of human uterine carcinosarcoma xenografts, 2nd Biennial Meeting of the Asian Society of Gynecologic Oncology, 2011年11月4日、Seoul
- ④ 江本 精. 平成22年度日本婦人科腫瘍学会公募研究報告: ミューラー管がん幹細胞の追求とその性状分析を基礎とした治療法の開発、第51回日本婦人科腫瘍学会学術集会、2011年11月25日、久留米

⑤ 江本 精. ミューラー管癌幹細胞の追求と血管性ニッチを標的とした新たな治療戦略、第 53 回日本臨床細胞学会学術集会：教育講演、2012 年 6 月 2 日、千葉

⑥ Kayashima K, Oyama R, Emoto M, Maehashi H, Matsuura T, and Aizawa M.
Three-dimensional Culture of Vascular Endothelial Cells Using Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Apatite-fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property. 2012 年 10 月 22 日、九州大学医学部、福岡

[図書] (計 1 件)

① 江本 精：子宮肉腫。「婦人科がん化学療法ハンドブック」(分担著書) 中外医学社 87-95, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江本 精 (EMOTO MAKOTO)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：80258540

(2) 研究分担者

立花克郎 (TACHIBANA KATSURO)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40271605

堀内新司 (HORIUCHI SHINJI)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：70360302

(辞退：平成 22 年 7 月 16 日)