

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5月31日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591783

研究課題名（和文） PEG修飾フラーレンと収束超音波併用による尿路悪性腫瘍に対する音響化学療法確立

研究課題名（英文） Combined therapy for urologic cancer cells by high-intensity focused ultrasound and PEG-conjugated fullerene

研究代表者

住友 誠（SUMITOMO MAKOTO）

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：50255535

研究成果の概要（和文）：

ポリエチレングリコール(PEG)にて化学修飾することによって水溶性PEG-フラーレン結合体を作製した。ヒト前立腺癌細胞株PC-3において、培養液内にPEG修飾フラーレンの存在あるいは非存在下で収束超音波（HIFU）照射を行い、MTSアッセイを行ったところ、併用治療においては有意な増殖抑制効果が認められた。PEG修飾フラーレンの体内動態の検討では、ラベル化フラーレンの安定性に問題があることが判明し、フラーレンの腫瘍内選択的集積に関する実験結果の再現性が確認できていない。鶏肉を用いた実験ではPEG修飾フラーレン局所注入、HIFU併用による変性効果の増強が認められたが、PC-3皮下腫瘍モデルにおける検討では両者併用による腫瘍増殖抑制効果を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

By chemically modifying fullerene (C60) with polyethylene glycol (PEG), we succeeded in synthesizing water-soluble PEG-conjugated fullerene. MTS assays showed that the combination of HIFU with PEG-conjugated fullerene resulted in synergistic growth inhibitory effects in PC-3 cells *in vitro*. *In vivo*, however, we failed to confirm reproducibility on the results of selective tumor tissue accumulation of fullerene because of instability of labeled PEG-conjugated fullerene. Using chicken tissue model we found synergistic tissue degenerating effects by this combination therapy, which showed no additive or synergistic antitumor effects in PC-3 xenograft models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,500,000	360,000	1,860,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	420,000	3,920,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：ポリエチレングリコール、フラーレン、癌細胞株、収束超音波、抗腫瘍効果、担癌マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 今日、超音波の特質を診断技術のみならず、治療に応用することが可能になっている。波動の性質を利用した局所治療のアプローチとしては、電磁場や粒子線を応用する方法（放射線、粒子線など）もあるが、深部減衰と標的へのフォーカス効果を両立することが技術的に難しく、また、大掛かりな装備が必要になる。一方、超音波は人体と媒体に対して、その波長と減衰係数の関係が適切であり、腫瘍が体表からある程度離れていても、必要な強度を持つフォーカスを形成することが、原理的にも、必要な装備規模としても、比較的容易に実現が可能である。高密度焦点式超音波 (High-intensity focused ultrasound; HIFU) は、この超音波の特性を生かした局所治療技術であり、2002 年より限局性前立腺癌に対して臨床応用されている。HIFU の有する生体作用には加熱凝固作用と音響化学作用（キャビテーション）がある。加熱凝固作用は収束超音波の最大の特徴であり、短時間に焦点領域を凝固温度以上に加熱するため、凝固領域をフォーカスポットに限局できる特性を有している。これは、優れた空間的選択性を意味する一方で、単位時間当たりの凝固体積が小さくなる、すなわち治療のスループットが低くなることを意味する。さらに、生体組織の過熱を防ぐための冷却時間が必要となり、結果的に治療時間が長くなってしまふ弊害が生じてしまう。また、生体内の音響インピーダンスの違いから、収束超音波エネルギーの深部減衰が起こることがあり、標的焦点領域が十分に加熱されない可能性が当講座の研究からも明らかになっている。このような HIFU の持つ課題を解消するための方法として、標的となる生体組織の超音波に対する感度を局所的に増加させるアプローチが研究されており、キャビテーション作用を利用するのもその一つである。キャビテーションとは、超音波照射を受けて微小気泡が急速に圧壊する際に生じる現象である。超音波は粗密波として伝播する縦波であり、負圧の生じたところに気泡が生じ、この気泡が崩壊する時に短時間ではあるが高温で高圧の「ホットスポット」という一種の極限反応場が出現し、反応場の温度は 5 千—5 万°C、圧力は約 1500 気圧にも達することがある。この反応場で生成したエネルギーによって、フリーラジカルやフォトン（発光）が起こる。この発光現象は超音波発光現象 (sonoluminescence) と呼ばれ、発光強度は気泡の大きさと相関があり、気泡が大きいほど発光強度が強い。すなわち、この現象は、超音波と光増感剤とを組み合わせることにより、photodynamic therapy と同じ効果が期待できることを示している (sonodynamic therapy; SDT)。癌組織に集積性のある光増

感剤を生体内に投与し、癌組織への光増感剤の集積量が最大になった時点でがん組織にのみ HIFU 照射を実施する。癌組織に集積した光増感剤は sonoluminescence による光でがん組織内の溶存酸素から種々の活性酸素を生成する。生成された活性酸素は非常に反応性に富むため、周囲の癌組織を破壊する。ただし、sonoluminescence は微弱な光であるため、よりエネルギー変換効率の高い光増感剤を用いる必要がある。

(2) フラーレンはグラファイト、ダイヤモンドに次ぐ第三の炭素同位体で、微弱な可視光によっても活性酸素を効率よく発生する性質を持つ物質である。すでに、フルーレンと光照射の組み合わせで細胞を強く殺傷することが報告されている。がんの SDT 光増感剤に必要な性質は、①増感剤自身ががん組織に集積しやすいこと、②微弱な光でも効率よく十分な活性酸素を産生しうることである。フルーレンは他の光増感剤と比較しても、光エネルギーを溶存酸素に渡して活性酸素を生成する量子効率が 0.96 と高く、光増感剤としては最適物質である。しかしながら、フルーレン自体は水に不溶性であり、また、分子径も 1 nm 程度であるため、フルーレン自体のがん組織への選択的集積は期待できない。水酸基などによる修飾による水溶性フルーレンの試みもなされているが、分子量が低ければ生体内からの排泄が早く、癌組織に対する特異性を持たせる工夫をしない限り、癌組織への集積性を解決できない。

(3) 一般に、がん組織と正常組織との間には解剖学的な違いがあることが知られている。癌組織では、速い細胞増殖を支えるため血管新生が常に行われており、その新生血管は構築性が悪い上に、VEGF などの血管透過促進因子の過剰発現により極小血管壁の透過性が正常血管に比べて約 3-10 倍程度大きくなっている。このため、高分子物質は容易に透過し、癌組織内に集積する。加えて、正常組織では漏出した高分子物質はリンパ系へ移行されて排泄されるが、癌組織ではリンパ管が未発達なためにこれらの物質は排泄されずに長時間残存する。結果として、高分子物質はがん組織に蓄積しやすい性質を持ち、これは enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) と呼ばれている。そこで、フルーレンを水溶性高分子で化学修飾し、見かけのサイズを大きくすれば、フルーレンは癌組織に移行しやすくなり、癌組織により多く集積させる受動的ターゲティングが可能となる。この化学修飾でフルーレンの水溶性も同時に達成される。この目的のためにポリエチレングリコール (PEG) を水溶性高分子として選択した。PEG はがん組織へ集積される性質を持つことは既に報告されている。PEG 修飾フルーレンは癌組織に集積しやすいの

で、投与後適当な時間をおけば、正常組織に対する癌組織のフラレン濃度差が大きくなる。この時、癌組織部位にHIFUを行えば、がん組織のみを選択的に破壊できると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 前立腺癌および腎細胞癌の細胞株を用いてPEG修飾フラレンとHIFUとの組み合わせによる*in vitro*抗癌活性を検討する。
- (2) PEG修飾フラレンの体内動態と癌組織への移行を検討することにより、癌組織へのターゲティングが可能かどうかを検討する。
- (3) マウスを用いて前立腺癌の同所性モデルないしは腎細胞癌の肺転移モデルを作製し、PEG修飾フラレン投与とHIFU照射による*in vivo*での抗腫瘍効果を検討する。

3. 研究の方法

1) In vitroにおけるPEGフラレンとHIFUとの組み合わせによる抗腫瘍活性の検討

ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP, C4-2, PC-3, マウス腎癌細胞株 Renca, ヒト腎癌細胞株 786-0, 769P, Caki-1, ACHN を用い、HIFU 装置 (Sonablate 500, Focus Surgery Inc, USA) を用いて、PEG 修飾フラレン (0-10 \cdot g/ml) 存在下あるいは非存在下で 1-3 MHz の HIFU 照射を行い、48 時間後の細胞傷害効果を MTS assay にて、また細胞周期解析をフローサイトメトリーにて検討する。同時に、培養液中の活性酸素の産生をチトクローム C 法にて定量する。

2) PEG フラレンの体内動態の検討

マウス腎癌細胞株 Renca を背部皮下に移植した担癌マウスを作製し、PEG フラレンを放射性ヨウ素によりラベル化し、マウスの尾静脈に投与する。投与後経時的に種々の臓器、排泄物、および癌組織を回収し、各臓器の放射活性を測定する。

3) PC-3 および Renca 皮下腫瘍モデルにおける PEG フラレンと HIFU 併用による抗腫瘍効果の検討

PC-3 ないしは Renca 細胞 (2×10^6 個) をヌードマウスの背部皮下に移植する。腫瘍径が約 5mm 程度となったところで無作為に 4 グループ ($n=10/\text{group}$) に分類する。治療群の内訳は無治療群、PEG フラレン単独治療群、HIFU 単独治療群、PEG フラレンと HIFU 併用治療群とする。PEG フラレンは経尾静脈投与する。経時的にマウスの体重、腫瘍径を測定する。

4) C4-2 ないしは PC-3 同所性前立腺癌モデルを用いた PEG フラレンと HIFU 併用

による抗腫瘍効果の検討

当講座では長年にわたりマウス前立腺癌同所性モデルの確立を維持してきた。これはネンブタール麻酔下にてヌードマウスの前立腺に前立腺癌細胞を注入し生着させる方法であり、約 60-80% の癌生着率を示すため十分に同所性前立腺癌研究モデルとして使用できるものである。同所性腫瘍モデルを用いて無治療群、PEG フラレン単独治療群、HIFU 単独治療群、PEG フラレンと HIFU 併用治療群に分類する。PEG フラレンは経尾静脈投与する。30 日目にマウスを安楽死させ、前立腺腫瘍を摘出する。また転移の有無 (特にリンパ節) もあわせて検討する。

5) Renca 肺転移モデルを用いた PEG フラレンと HIFU 併用による抗腫瘍効果の検討

Renca 肺転移モデルはマウスの尾静脈に Renca を注入し、肺に生着させる方法であり、注入後約 7-10 日間で約 80-90% の癌生着率を示すため十分に腎癌肺転移研究モデルとして使用できるものである。同モデルを用いて無治療群、PEG フラレン単独治療群、HIFU 単独治療群、PEG フラレンと HIFU 併用治療群に分類する。PEG フラレンは経尾静脈投与する。30 日目にマウスを安楽死させ、肺組織を摘出し、転移結節の個数を観察する (Sumitomo et al, Cancer Res. 68(6):1631-5, 2008)。

4. 研究成果

1) PEG 修飾フラレンの作製

まず、ポリエチレングリコール (PEG) にて化学修飾することによって PEG-フラレン結合体を作製した。フラレンのベンゼン溶液に PEG のベンゼン溶液を等量加え、25°C にて 24 時間、遮光条件にて攪拌し、結合反応を行った。PEG/フラレンの混合モル比は 50/1 とし、水溶性の PEG 修飾フラレンを作製した。

2) In vitroにおける抗癌活性の検討

In vitro における PEG-フラレンと収束超音波併用による細胞障害活性を MTS アッセイにて検討した。マウス腎癌細胞株 Renca およびヒト前立腺癌細胞株 PC-3 において、培養液内に PEG 修飾フラレンの存在あるいは非存在下で HIFU 照射 (Focus Surgery 社製 Sonablate500, 1 MHz) を行い、48 時間培養後に MTS アッセイを行ったところ、併用治療においては有意な増殖抑制効果が認められた。一方、PEG 修飾フラレンないしは収束超音波照射単独では増殖抑制効果が認められなかった (表 1)。

表1 PEG修飾フラーレンとHIFU併用による前立腺癌細胞PC-3に対する細胞障害活性

PEG 修飾フラーレン (μ g/mL)	HIFU	MTS 活性
0	-	100 \pm 6.48
0	+	92.37 \pm 3.21
5	-	96.34 \pm 6.44
5	+	41.36 \pm 2.54*

* $p < 0.05$; vs control

3) PEG 修飾フラーレンの体内動態の検討

組織ターゲティングを確認することを目的として、放射性ヨウ素によりラベル化したPEG 修飾フラーレンないしは FITC 標識したPEG 修飾フラーレンの作製を試みたが、ラベル化フラーレンの安定性および実験結果の再現性に問題があることが判明し、体内動態の検討に関しては、PEG 修飾フラーレンそのものを定量できないかどうかを検討中である。

4) 鶏肉を用いたPEG修飾フラーレン局所注入、収束超音波併用による変性効果の検討

PEG 修飾フラーレンの腫瘍組織選択性が明らかにされなかったため、*in vivo*での実験に関する検討については当面は先送りすることに決定し、市販の鶏肉にPEG フラーレンを局所注入し、HIFU 照射した際の効果を検討する実験を行った。専用の実験水槽に超音波発生装置、鶏肉をセッティングし(図1)、PEG 修飾フラーレン局所注入部位と注入していない部位の2領域を照射領域として設定した(図2)。その結果、PEG フラーレン局所注射した鶏肉部分においては、収束超音波照射による組織変性効果がより増強されることが示された(図3)。

図1



図2

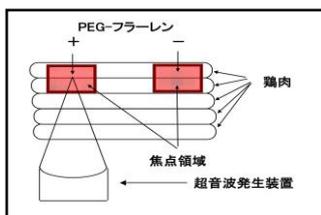


図3



5) 皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性の検討

以上の結果から、PEG 修飾フラーレンとHIFU照射の併用治療効果が期待できることが明らかになったので、PC-3皮下腫瘍モデルを用いて、PEG 修飾フラーレンを腫瘍に直接注射し、HIFU照射による効果が増強するかどうか検討した。皮下腫瘍径が1.0cmに達した段階でマウス20匹を5匹ずつ4群(無治療群、PEG 修飾フラーレン単独群、HIFU照射単独群、併用治療群)に分類し、PEG 修飾フラーレン溶液を0.2ml腫瘍に注射し、1時間後にHIFU照射(1MHz, 出力37W)した。その後、腫瘍径の計測を毎日行った。しかしながら、治療開始後4週間の観察期間内において、4群の腫瘍径変化には明らかな差が認められなかった(データ非表示)。現在、皮下腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性の検討を再度行っているところである。

以上から得られた結論は以下のとおりである。

- 1) 水溶性のPEG 修飾フラーレンを作製した。
- 2) PEG 修飾フラーレンの体内動態を検討する目的で、放射性ヨウ素ないしはFITC標識したPEG 修飾フラーレンの作製を試みたが、ラベル化フラーレンの安定性および実験結果の再現性に問題があることが判明し、体内動態の検討に関しては、PEG 修飾フラーレンそのものを定量できないかどうかを検討中である。
- 3) PEG フラーレン局所注射した鶏肉部分においては、収束超音波照射による組織変性効果がより増強されることが示された。
- 4) PC-3皮下腫瘍モデルを用いた検討では、PEG 修飾フラーレンの腫瘍直接注射とHIFU併用による抗腫瘍効果の増強作用は認められなかった。

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)

実験の再現性が得られていないので、学会発表、論文など公表はなされていない。

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

〔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〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住友 誠 (SUMITOMO MAKOTO)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号：50255535

(2) 研究分担者

浅野 友彦 (ASANO TOMOHIKO)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授
研究者番号：40167226