

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659635

研究課題名(和文)肺癌に対する Porphysome 増感併用による気管支鏡下光温熱治療の開発

研究課題名(英文) Development of Porphysomes photoenhancer enabled bronchoscopic photothermal ablation

研究代表者

穴山 貴嗣 (ANAYAMA, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：30403893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ポルフィゾームナノ粒子に全身投与による気管支鏡下での光温熱治療が、早期の肺癌に対して有効な内視鏡的治療であるとの仮説のもと、ヒト肺癌動物実験モデルを作成し、この研究のコンセプトの妥当性と、臨床応用への可能性について研究を進めた。またすでに臨床において全身投与が認められているインドシアニングリーン(以下ICG)を腫瘍に局所注入し、これを吸光する近赤外線レーザーを照射して光温熱効果についても検証した。この知見をもとに、臨床応用に向けて準備を進める。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that the combination of the existence of photo enhancer and low dose laser irradiation can heat the target tumor selectively to kill the cancer. Systemically administrated porphysomes nano-particles accumulate in lung cancer at higher level than that of normal tissue and absorb red light energy to heat the tumor. Locally injected Indocyanine green also absorb the infra-red light energy to heat the tumor. Using lung cancer animal models, we confirmed the cytotoxic effect of the combination therapy of photo-enhancer administration and low power laser irradiation. Reflect on the promising results of the current study, we are preparing for the clinical study in the next step.

研究分野：癌の低侵襲治療

キーワード：photo-thermal therapy

### 1. 研究開始当初の背景

全世界の癌死亡原因の一位である悪性疾患である肺癌の治療は早期発見例には根治切除が、縦隔転移症例には化学療法・放射線療法を組み合わせた集学的治療が試みられる。一部の中枢発生早期肺癌には事前の光感受性物質(レザフィリン等)静注と200mW程度のClass 3Bレーザーの経気道照射を組み合わせたPDTが施行される。また進行肺癌症例で中枢気道閉塞症例ではClass 4の高出力レーザー照射による気道内腫瘍焼灼もPalliative therapyとして施行される。これらはいずれも気管支鏡下治療デバイスの到達限界から、中枢型肺癌にのみ施行されている。肺癌の大多数を占める末梢性肺癌は気管支鏡での到達がしばしば困難で、手術以外の局所治療としては体表からの経皮的ラジオ波焼灼術やクライオ治療が試みられる。高齢化が進む人口背景と集学的治療の発達を考慮し、より低侵襲かつ効果的な局所治療モダリティの開発が求められる。

2011年に発表された光感受性物質であるPorphysomeは、Liposome類似の親水基・疎水基を有するPolymerで60nmのナノ粒子を形成する。ポルフィリン構造を持ち、高い光励起能とEPR(enhanced permeability and retention effect)により腫瘍へ選択的に集積する。申請者はUniversity Health Networkにおいて全身投与されたPorphysomeが腫瘍に集積することを確認した。また集積状態の腫瘍は、本来は腫瘍を加熱できない低出力レベルのレーザーは、光増感物質の存在下で光エネルギーを熱エネルギーに変換し腫瘍細胞を加熱することができる。またPorphysome全身投与以外にもICGの注入と低出力レーザーの組み合わせでも同様の効果を期待できる。低出力レーザーで十分な温熱効果を発揮できる結果、光ファイバーを小型化・細径化できるため、特に細径気管支鏡による末梢肺癌の治療への道を開くことができる。

本研究では適切な動物モデルを作成し実際に光増感物質と低出力レーザーを組み合わせた新たな内視鏡的温熱治療コンセプトの治療効果を証明する。

### 2. 研究の目的

Porphysome光増感・ICG光増感レーザー焼灼による末梢性肺癌に対する低侵襲温熱治療の有用性を動物実験により証明し、臨床応用に導くことが本研究の目的である。

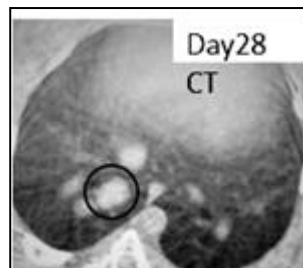
### 3. 研究の方法

- (1) ウサギ肺腫瘍モデルの作成
- (2) 光増感レーザー治療の条件設定
- (3) マウス腫瘍モデルによる治療実験
- (4) ウサギ肺腫瘍モデルによる治療実験

### 4. 研究成果

#### (1) ウサギ動物モデル作成

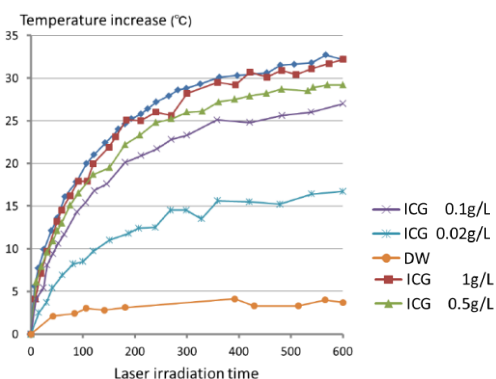
本研究では簡便に作成が可能な皮下モデルでの検討に加えて、同所性肺癌モデルでの検討を加えた。同所性肺癌モデルでは治療に対する腫瘍の変化のみならず、周囲の肺実質、肺内血管・リンパ系の反応など実際に臨床応用した場合に生じうる様々な事象を同時評価し問題点を抽出することが可能であるからである。【方法】マウスモデルでは、ヌードマウスに対して、先端が鈍な21G金属チューブを気管支の生理的湾曲にそって曲げ、これを経口挿管・腫瘍注入することによって低侵襲に同所性肺癌を作成する技術を確立した。ウサギモデルはラリングアルマスク全身麻酔下に極細径気管支鏡を気管支に挿入し、



右肺下葉の末梢肺にVX2腫瘍を $1.0 \times 10^6$ 個/マトリジェル100 $\mu$ L程度注入することで、肺腫瘍モデル作成に成功した。

#### (2) 光増感レーザー治療の条件設定

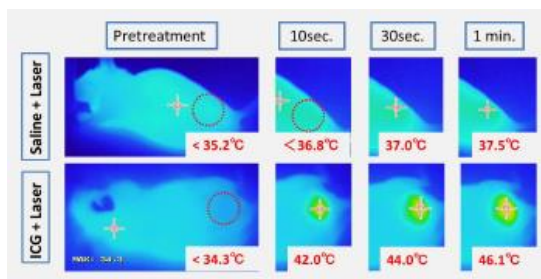
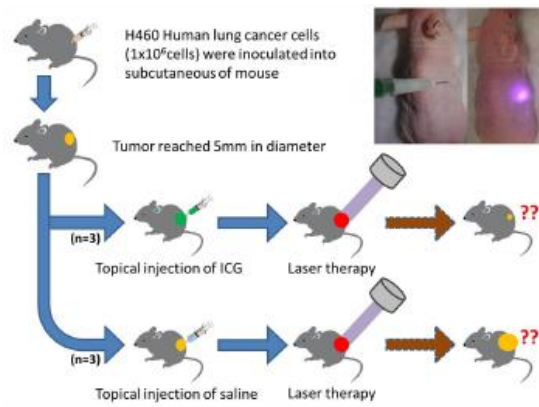
In-vitro環境では、光増感物質の局所の存在濃度と500mW Class 3レーザー照射による温度上昇との関係について明らかにした。光増感物質ICGの場合、0.1g/Lの濃度で、照射開始10分以内に目標温度の $\Delta 25^{\circ}\text{C}$ (生体内で $57^{\circ}\text{C}$ )を達成することを見出した。



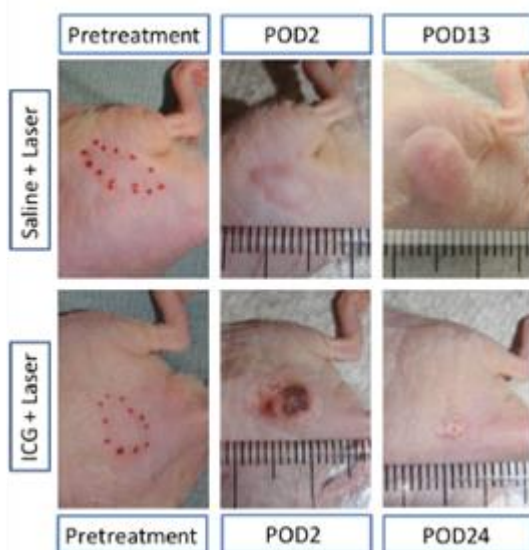
#### (3) マウス腫瘍モデルによる治療実験

マウスモデルに対して、レーザー光を照射しPorphysome投与量とLaser照射出力との関係を明らかにした。Porphysomesを20mg/kg全身投与されたマウスにおいて、投与48時間後に腫瘍を摘出し645nmレーザー500mW/cm<sup>2</sup>を照射することにより、腫瘍組織の局所温度を25°C以上加熱することを確認した。

一方、ICG の局所注入と低出力レーザーの組み合わせによる光温熱療法の効果についてはマウス皮下腫瘍モデルを用いて検証した。0.5 mg/ml の濃度において720nm レーザー500mW/cm<sup>2</sup> の照射によって腫瘍組織を摂氏25℃以上加熱することを確認した。



いずれも体温 37℃ の体内条件下では、局所温度は照射開始5分以内に60℃を超える温度に到達した。皮下腫瘍生存モデルにおいて、照射後24日以内に腫瘍の消滅を確認した。ICGの局注を伴わないレーザー照射のみのコントロール群では腫瘍の増大を認めた。

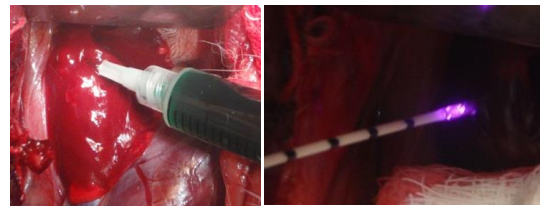


(4) ウサギ肺腫瘍モデルによる治療実験

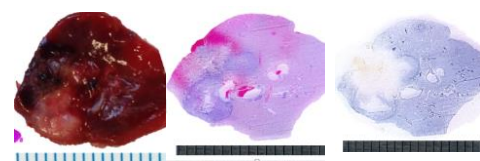
新しい治療概念の安全性と有効性を確認するには、治療による腫瘍増殖抑制効果を直接評価する以外に周囲の正常組織への悪影響や呼吸器・全身に与える影響・安全性を総

合的に評価する必要がある。動物モデルでは皮下腫瘍モデルが頻用されるが、本研究では気管支鏡が挿入可能なウサギ VX2 同所性肺腫瘍モデルを用いて実際の気管支鏡下レーザー治療を施行した。同所性肺腫瘍モデルの作成は研究責任者が開発報告した気管支鏡による腫瘍細胞の肺内接種法を用いた。

Porphysome 投与 48 時間後に極細径気管支鏡をウサギ気道に挿入し 500mW 10 分間の気管支鏡下レーザー照射を施行した。この治療中また治療後二日間実験動物は良好な生存状態を維持した。ICG 局所注入併用による光温熱治療はウサギ肺腫瘍モデルを用いて開胸下に施行した。



ICG 0.5mg/ml を 1mL 腫瘍周囲に注入した後に 720nm laser を 10 分間、肺腫瘍に照射した。光温熱療法による腫瘍傷害作用の評価は、腫瘍を摘出後に新鮮凍結切片を作成し NADH 酵素染色によってミトコンドリア膜機能の消失範囲を組織切片上で評価することによって治療効果の範囲を組織学的に評価した。結果、長軸方向のレーザー照射によって直径 8 mm の範囲内において腫瘍細胞の完全死滅を確認した。その周囲 2 mm にわたって出血を伴う組織学的変化を認め、さらにその外周 3 mm にわたり毛細血管の拡張・細胞外浸出液の漏出といった熱傷に類似する組織学電気変化を認めた。Control 症例において ICG 局所注入無しに同条件でレーザー照射した場合には細胞傷害作用を認めなかった。



新鮮組織 H. E. 染色 NADH 酵素染色 (1mm/scale)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Hirohashi, K., **T. Anayama**, H. Wada, T. Nakajima, T. Kato, S. Keshavjee, K. Orihashi and K. Yasufuku. "Photothermal Ablation of Human Lung Cancer by Low-power Near-Infrared Laser and Topical Injection of Indocyanine Green." J Bronchology Interv Pulmonol 22(2): 99-106, 2015 査読有 DOI:10.1097/LBR.000000000000158

②Nakajima, T., **T. Anayama**, Y. Matsuda, D. M. Hwang, P. Z. McVeigh, B. C. Wilson, G. Zheng, S. Keshavjee and K. Yasufuku. "Orthotopic lung cancer murine model by nonoperative transbronchial approach." Ann Thorac Surg 97(5): 1771-1775, 2014 査読有  
DOI:10.1016/j.athoracsur.2014.01.048

③**Anayama, T.**, T. Nakajima, M. Dunne, J. et al. A novel minimally invasive technique to create a rabbit VX2 lung tumor model for nano-sized image contrast and interventional studies. PLoS One 8(6): e67355. 2013. 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0067355

[学会発表] (計 3 件)

①Kentaro Hirohashi, **Takashi Anayama**, et al. INDOCYANINE GREEN FLUORESCENCE FOR LOCALIZATION OF HUMAN LUNG CANCER; A PRELIMINARY ANIMAL STUDY. European Society of Thoracic Surgeon annual meeting committee Lisbon June 4. 2015

② **Takashi Anayama**, Cheng Jin, Patrick McVeigh, Takahiro Nakajima, Brian Wilson, Gang Zheng, Shaf Keshavjee, Kazuhiro Yasufuku. Bronchoscopic Detection of Lung Cancer with Porphysome Nano-contrast Enhancement and Prototype Fluorescent Bronchoscope. American college of chest physician (ACCP) 2013. Atlanta, U.S.A. 2012-10-24 (Oral)

③ **T. Anayama**, C. S. Jin, P. McVeigh, T. Nakajima, K. Ng, J. F. Lovell, K. Hirohashi, H. Wada, B. Wilson, K. Yasufuku, G. Zheng  
Porphysome-enhanced bronchoscopic fluorescence detection and photothermal ablation of peripheral lung cancer: Preliminary in vivo studies. 15th World congress of lung cancer (WCLC) Oct 27, 2013. Sydney, Australia.

[その他]

ホームページ等

研究概略の紹介

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_srgr2/newanayamalabo.html](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_srgr2/newanayamalabo.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

穴山 貴嗣 (ANAYAMA, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：30403893

### (2) 研究分担者

岡田 浩晋 (OKADA, Hironobu)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：10444770

宮崎 涼平 (MIYAZAKI, Ryohei)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：70566489