

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461880

研究課題名(和文) VX2担癌ウサギモデルにおける選択的動脈内炭酸ガス注入治療の効果の検討

研究課題名(英文) The evaluation of the efficacy of selective intraarterial infusion of CO₂-saturated solution in rabbit VX2 tumors

研究代表者

山口 雅人 (Yamaguchi, Masato)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10457096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：炭酸ガス溶解液の抗腫瘍効果を調べるため、ウサギVX2腫瘍大腿移植モデルを使用し、炭酸ガス溶解液を経動脈的に注入した。炭酸ガス注入群とコントロール群に分け、腫瘍サイズの変化およびアポトーシス誘導の比較を行った。腫瘍サイズは造影CT、アポトーシスの評価はTUNEL染色およびcaspase-3によるウェスタンブロッティングを用いて行った。炭酸ガス注入群で、腫瘍増大率が有意に低く、アポトーシスの発現が有意に高かった。炭酸ガスの動脈注射によりCaspase-3を介したアポトーシスを生じ、VX2腫瘍サイズの増大が抑制されることが示された。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the efficacy of intraarterial infusion of CO₂-saturated solution, 50 ml of solution (saline solution and CO₂-saturated solution for the control and CO₂ groups, respectively) was administered close to the feeding artery of the VX2 tumors, that were implanted to fourteen Japanese white rabbits 3 weeks before. Rabbits were divided into control and CO₂ groups. All rabbits were killed for tumor harvest on day 3 after the procedure. Tumor volume was evaluated with contrast-enhanced computed tomography (CECT). Tumor apoptotic changes were examined by DNA fragmentation assay and immunoblot analysis. Tumor growth ratio was significantly decreased in the CO₂ group compared with the control group. Apoptotic activity in the CO₂ group was higher than in the control group. Intraarterial infusion of CO₂-saturated solution inhibits rabbit VX2 thigh tumor growth by activation of apoptotic cell death through cleaved caspase-3 upregulation.

研究分野：IVR

キーワード：動脈内炭酸ガス投与

1. 研究開始当初の背景

現在、世界では炭酸ガスの働きを利用した様々な研究や治療が行われている。日本でも炭酸泉が健康や美容に良いことが言われているが、これは炭酸泉に溶け込んだ炭酸ガスが皮膚から吸収されて局所へ酸素供給量を増やすためである。つまり、細胞活動に必要な酸素を炭酸ガスがコントロールしていると言える。炭酸ガスは血管拡張作用と Bohr 効果を有している。炭酸ガスの経皮的吸収治療法は、組織中の酸素分圧を増加させ、褥瘡や創傷などの損傷組織の再生を促進すると考えられ、近年、再生医療の分野で注目を浴びつつある。

近年、各種進行癌や再発癌に対する集学的な治療が注目され臨床試験も積極的に取り組まれてきた。その組み合わせは手術療法・化学療法・放射線療法が主体の併用療法であるが、いずれも抗腫瘍効果と共に体への負担や副作用を少なからず持ち合わせている。一方、癌治療において、内部の低酸素環境が治療抵抗の一因となっていることも知られている。2011年に神戸大学医学系研究科では、ラットの悪性腫瘍モデルに対し炭酸ガスを経皮的に投与する実験を行ったところ、抗腫瘍効果と共に腫瘍内環境の変化、および化学療法との相乗効果が確認され、この成果は *J Cancer Sci Ther* 誌に (Onishi et al, *Transcutaneous Application of Carbon Dioxide (CO₂) Enhances Chemosensitivity by Reducing Hypoxic Conditions in Human Malignant Fibrous Histiocytoma*, 2012, 4.7) 報告された。ただし、この炭酸ガス治療は経皮的吸収治療法であり、治療対象となる腫瘍は表層部位に限られる。

このような背景の下、申請者らは大部分の悪性腫瘍が深部臓器に存在することに鑑みて、経カテーテル的に炭酸ガスを動脈内注入(動注)して、その抗腫瘍効果を検証することを考案した。深部悪性腫瘍に対して、効果

的に炭酸ガスを吸収・分布させるには、腫瘍の栄養動脈に経血管的に選択注入ができる動注療法が最適であり、実際、動注治療はこれまでも頭頸部や骨盤内悪性腫瘍においてその臨床的有用性が報告されている。従ってウサギ VX2 腫瘍モデルを用いて炭酸ガス動注治療の抗腫瘍効果を検証することが本研究の主たる目的である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、VX2 担癌ウサギモデルにおける選択的動脈内炭酸ガス注入治療の効果を検討することである。

炭酸ガスは組織内において血管拡張作用と Bohr 効果により組織中の酸素分圧を上昇させる効果を持つ。悪性腫瘍の内部環境は低酸素状態にあり、これが腫瘍増大の一因となっていると考えられている。体表に近い部位に存在する腫瘍において炭酸ガスを経皮吸収させることで抗腫瘍効果が得られることが実験レベルで証明されている。そこで、本研究では VX2 担癌ウサギを用い、経カテーテルに炭酸ガスを動脈内注入(動注)して、深部悪性腫瘍に対する炭酸ガスの抗腫瘍効果を評価する。

3. 研究の方法

本研究では、VX2 担癌ウサギ(右後肢埋設)を用い、カテーテルを介した炭酸ガスの経動脈的注入を行った。対照群には生理食塩水投与群を用い、これらの2群間における(1)腫瘍サイズの変化、(2)腫瘍内壊死・アポトーシスの誘導、の2項目について評価を行った。

血管内手技は X 線撮影室にて透視下に行い、腫瘍濃染確認後に経カテーテル的に炭酸ガスを直接注入した。腫瘍サイズは治療前・治療後にそれぞれ CT 撮影を行い、体積を計測した。さらに屠殺後に腫瘍を摘出し、腫瘍内アポトーシスの出現頻度を測定した。

VX2 担癌ウサギモデルにおける選択的動脈内炭酸ガス注入治療の効果の検討方法

1) 経血管的な注入を行うための至適血管系を有する実験動物として、ウサギが最適と考えられた。右後肢大腿筋内に VX2 腫瘍を移植して3週間目のウサギを使用した。静脈麻酔下に鼠径部を切開し、大腿動脈を露出させた後に 18G サーフロー針を挿入した。血管造影により腫瘍濃染を確認し、腫瘍血管近傍までカテーテルを進め、経カテーテル的に炭酸ガス注入を行った。

炭酸ガス注入群と対照群(生理食塩水注入)の2群に分け、それぞれ各2回(2回目は初回注入より3日後)の注入を行った。

2) 腫瘍体積の評価

2回の注入時、および注入終了3日後にCTを撮影した。自施設内に配備されている動物実験用CTにて、単純CTおよび造影CTを撮影し、腫瘍容量を計測し、各群での比較を行った。

3) 病理・分子生物学的検討

屠殺後に腫瘍を摘出した。組織切片を用い TUNEL 染色にて、DNA フラグメンテーションアッセイを行い病理学的に評価するとともに、腫瘍からタンパク質を抽出して、Cleaved caspase-3 の抗体を用いてウエスタンブロッティングにて分子生物学的にアポトーシスを評価した。

同モデルを用いた炭酸ガス投与量の変更を適宜行い、臨床応用に向けての至適安全投与量の検証を目的として、実験を継続して行った。また、シスプラチン(CDDP)を用いた抗癌剤の動注治療群を新たに設定し、コントロール群、炭酸ガス投与群、抗癌剤投与群、炭酸ガス+抗癌剤動注投与群の4群に振り分けて、抗癌剤動注治療の相乗効果の有無についての実験を施行した。

4. 研究成果

VX2 担癌ウサギモデルにおける選択的動脈内

炭酸ガス注入治療の効果の検討を行った。

平均腫瘍増大率は、直接計測にて動注群：コントロール群 $= -9.5\% \pm 7.9$ ； $27.2\% \pm 6.6$ 、CTによる計測にて炭酸ガス動注群：コントロール群 $= 4.1\% \pm 4.4$ ； $35.7\% \pm 4.5$ であり、両計測ともに炭酸ガス動注群で有意に腫瘍増大が抑制されていた($p < 0.01$)。

Tunel 染色では、炭酸ガス動注群：コントロール群 $= 215.0$ 個 ± 58.7 ； 21.8 個 ± 5.4 (各視野毎の細胞死)、cleaved caspase-3 の Gel 濃度は炭酸ガス動注群：コントロール群 $= 0.23 \pm 0.07$ ； 0.04 ± 0.01 で、いずれも有意に動注群で高かった。

経過の中で合併症や関連死亡は見られなかった。また、体重の増減に関しても2群間に有意差は見られなかった。

炭酸ガス動注群ではコントロール群に比較し腫瘍のアポトーシスの誘導が高率であり、ウサギ VX2 腫瘍の増大を有意に抑制することが示された。また、細胞死の過程において caspase-3 は3つの経路に参与するが、今回の実験にて炭酸ガス飽和水注入により caspase-3 の活性化を通してアポトーシスが誘導されていることがわかった。

今回の炭酸ガス飽和水動注療法には臨床応用において、以下の利点があると考えられる。まず既存の抗癌剤に比べ、副作用が少ない点が挙げられる。低酸素状態で治療抵抗性となる化学療法や放射線療法の効果を増強させる効果も有している可能性がある。また、カテーテルの良好な血管内到達性により、人体のあらゆる部位への局所的な治療が可能となる利点も有している。

なお、同結果を英文誌 Journal of Vascular and Interventional Radiology 誌に報告し、掲載された。また同誌での Outstanding Laboratory Investigation として、Editor's Award Honoree を受賞した。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Ueshima E, Yamaguchi M, Ueha T, Muradi A, Okada T, Idoguchi K, Sofue K, Akisue T, Miwa M, Fujii M, Sugimoto K.

Inhibition of growth in a rabbit VX2 thigh tumor model with intraarterial infusion of carbon dioxide-saturated solution.

Journal of Vascular and Interventional Radiology. 査読有 2014年25巻(3):469-76.
doi: 10.1016/j.jvir.2013.11.023.

[学会発表](計 2 件)

Naoto Katayama, Masato Yamaguchi, Akhmadu Muradi, Eisuke Ueshima, Yutaka Koide, Takuya Okada, Keitaro Sofue, Koji Sugimoto

The sensitizing anti-cancer effect of intra-arterial infusion of carbon dioxide-saturated solution in a rabbit VX2 liver tumor model.

第44回日本IVR学会総会(JSIR)、第4回アジア太平洋インターベンショナルオンコロジー学会、2015年5月29日、シーガイアコンベンションセンター、宮崎

Ueshima E, Yamaguchi M, Ueha T, Muradi A, Okada T, Idoguchi K, Sofue K, Akisue T, Miwa M, Fujii M, Sugimoto K.

Inhibition of growth in a rabbit VX2 thigh tumor model with intraarterial infusion of carbon dioxide-saturated solution.

Asia Oceanic Congress of Radiology, 2014年9月26日、神戸ポートピアホテル、兵庫

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 雅人(Masato Yamaguchi)

(神戸大学医学部附属病院 准教授)

研究者番号: 10457096

(2)研究分担者

上嶋 英介(Eisuke Ueshima)

(神戸大学医学部附属病院 助教)

研究者番号: 40645561

(3)研究分担者

杉本 幸司(Koji Sugimoto)

(神戸大学医学部附属病院 教授)

研究者番号: 90314476

(4)研究分担者

祖父江 慶太郎(Keitaro Sofue)

(神戸大学医学部附属病院 講師)

研究者番号： 90622027