

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670626

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍に対する音響化学療法によるブレイクスルー

研究課題名(英文) Breakthrough in the treatment of malignant glioma by Sonochemical therapy

研究代表者

山口 文雄 (YAMAGUCHI, Fumio)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70267219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、悪性神経膠腫に対する音響化学療法についての研究を継続してきており、これまでグリオーマに対する抗腫瘍効果を明らかにしてきた。本研究ではそのメカニズムの解明を目標に実験をおこなった。その結果、近年癌細胞の増殖・維持に癌幹細胞関与が指摘されているグリオーマ幹細胞マーカーの発現の変化について解析をおこなったが、変化は認めずその関与は少ないものと考えられた。一方、グリオーマの増殖に促進的に働くことが知られている成長因子の一つである線維芽細胞成長因子とその受容体がともに発現の低下をきたしており音響化学療法の腫瘍増殖抑制効果のメカニズムの一つであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Research on Sonochemical therapy has been conducted by our group and anti-tumor effect on malignant glioma was revealed. One of the mechanisms of anti-tumor effects was elucidated. Expression of glioma stem cell markers was evaluated and no marked change was found after sonochemical therapy. While fibroblast growth factor and its receptor, were down-regulated after sonochemical therapy. Since FGF and FGFR are known as the growth activating factor, the suppression of FGF and its receptor was suggested to be one of the mechanisms.

研究分野：医学

キーワード：脳腫瘍 グリオーマ 超音波

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は現在の現在行われている手術、放射線療法、化学療法、分子標的療法、免疫療法などによっても難治である。一方、初期治療で Gross Total Resection を行えた症例はその生存期間が長期であることも事実である。そこで、本研究は初期治療である摘出手術時に徹底的に腫瘍細胞を死滅させることを目的とした治療法の研究である。

2. 研究の目的

(1) 脳腫瘍摘出術、脳腫瘍生検術など広く 5-Aminolevulinic Acid(5-ALA) を用いた Photodynamic Diagnosis(PDD)を行っている。対象は神経膠腫、転移性脳腫瘍、悪性リンパ腫など日常よく見られ手術が必要になる疾患である。悪性腫瘍には 5-ALA の取り込み、そして ProtoporphyrinIX(PpIX)への代謝率が高い。この PpIX は 405nm の青紫色光の照射により 605nm の赤色光を発光するため正常組織中に存在する腫瘍組織を分離して認識することができる。しかし、腫瘍境界は必ずしも明瞭ではなく悪性腫瘍ほどその傾向は強い。手術により腫瘍組織だけを摘出することは困難であり重要な機能を担当する部分の脳組織に発生した場合には境界部分の正常組織を含めて大きめに腫瘍を摘出することはできない。腫瘍の残存が再発率の増加、生存期間の短縮につながるため腫瘍の全摘出が重要であることは言うまでもないが、それにより患者の機能を失い、QOL を維持することに反する。5-ALA による光線力学療法の報告はあるが、用いられる光は組織透過性が悪く、脳組織では高々3mm 程度である。そこで、5-ALA を用いた蛍光診断を治療に応用することを考案した。

(2) 光に代わって組織透過性に優れた超音波を用いる方法である。音響化学療法 Sonochemical Therapy とも呼ばれる方法である。ある周波数の超音波は他のポルフィリン

製剤を励起させ活性酸素を発生させることで細胞障害を起こすことが知られているが、5-ALA を用いたものはまだ報告がない。5-ALA は前述のように悪性腫瘍細胞に高率に取り込まれ細胞内のミトコンドリアでのポルフィリン代謝により PpIX の産生量が増加する。この PpIX に超音波が作用することで細胞障害を起こし腫瘍を死滅させようというものである。また、5-ALA は他のポルフィリン製剤に比べ半減期が短く、約 24 時間経過するとほとんどが体外に排出されるため日光過敏症などの対策も比較的容易であることは大きな特徴である。5-ALA を用いることができれば臨床応用の実現化が大いに期待できる。

これまで我々は脳腫瘍(悪性神経膠腫)樹立細胞を用い基礎実験を行い、脳腫瘍治療に 5-ALA を用いた sonochemical therapy が可能か検討した。使用した細胞株は U87MG, U251MG, T98G である。シャーレで培養し confluent になったものを実験に供した。Serum-free media 中に 1mM の濃度で 5-ALA を暴露させ、4 時間後赤色蛍光を確認した。U87MG, T98G で蛍光は強く認められたため、その後の実験に用いた。Sonicator(XL-2020 Sonicator, Misonix, Farmingdale, NY, USA)にて 20kHz の超音波を 5 分間作用させた。その後一晩培養を続け約 18 時間後に細胞を観察した。5-ALA を作用させたものはほとんどの細胞が縮小していたのに対し超音波のみのものでは全く変化は見られなかった。また、マウスに移植したヒト脳腫瘍(神経膠腫)に対し in vivo の実験を行っており、in vitro の実験と同様に 5-ALA を投与した群のマウスの腫瘍は明らかに縮小するが、5-ALA 非投与群では縮小が見られず増大を続けた。

本研究は臨床的に使いやすい 5-ALA と既存の超音波治療装置を用い、簡便かつ効率的な治療法の普及が期待できる。

3. 研究の方法

悪性グリオーマ樹立細胞を5 - アミノレブリン酸暴露化で4時間培養し、プロトポルフィリン IX の発現が十分であることを確認した後に超音波照射装置（伊藤超短波）にて1 MHz、3 MHz での照射をおこなった。照射後細胞を回収。mRNA 抽出をおこない、逆転写反応にて cDNA を作成した。このサンプルを以下の実験で、各種ファクター特異的な PCR primer を用いて RT-PCR をおこない発現量を評価する。

(1) 癌の増殖に関与し癌治療を困難にしている腫瘍幹細胞のマーカーCD133、CD15 そして nest in の治療前後の発現量を検討した。

(2) 超音波の温熱効果による細胞増殖抑制効果についての報告もあるため熱ショックタンパクである HSP-70 の変化も解析をおこなった。

(3) グリオーマの成長、増殖、維持に大きくかわり、悪性度によってもその発現様式が変わる線維芽細胞成長因子(Fibroblast Growth Factor)(FGF)とその受容体(FGFR) (Yamaguchi F, et al : Differential Expression of Two Fibroblast Growth Factor Receptor Genes is Associated with Malignant Progression in Human Astrocytomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:484-488, 1994.) についての解析をおこなった。

4 . 研究成果

(1) 癌の増殖に関与し癌治療を困難にしている腫瘍幹細胞のマーカーについて検討した。グリオーマ幹細胞のマーカーの中で CD133 と CD15、そして nest in の 5 - ALA SDT による変化は今回の条件では認められなかった。

(2) 超音波の温熱効果による細胞増殖抑制効果について熱ショックタンパクである

HSP-70 の変化も解析をおこなったが処置前、処置後で大きな変化は認められなかった。

(3) 線維芽細胞成長因子 FGF、FGFR についての検討では、超音波照射により 5 - ALA を用いた SDT はグリオーマ細胞の FGF2 の発現を抑制した。これは、U87MG、SNB19 の二つの細胞株で共通の変化であった。また、FGF2 の受容体である FGFR1 の発現にも明らかな抑制効果を示していた。これらのことから、5-ALA SDT によるグリオーマ増殖抑制効果のメカニズムの一つとして FGF、FGFR の関与が大きい可能性を示唆した。

これらの結果を踏まえ、FGF2、FGFR1 の発現抑制効果をもっとも高めるための Sonochemical therapy の条件を見つけていく予定である。

< 引用文献 >

Yamaguchi F, et al. Low Frequency Ultrasonication Induced Antitumor Effect in 5-Aminolevulinic Acid Treated Malignant Glioma. *Journal of Cancer Therapy*, 2013, 4, 170-175)

Yamaguchi F, et al : Differential Expression of Two Fibroblast Growth Factor Receptor Genes is Associated with Malignant Progression in Human Astrocytomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:484-488, 1994.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

Fumio Yamaguchi, Takayuki Asakura, Hiroshi Takahashi, Takayuki Kitamura, Akira Teramoto. Low Frequency Ultrasonication Induced Antitumor Effect in 5-Aminolevulinic Acid Treated

Malignant Glioma. Journal of Cancer
Therapy, 査読有、2013, 4, 170-175

[学会発表] (計1件)

樋口 直司、山口 文雄、朝倉 隆之、鞠 東
揮、森田明夫. グリオーマと超音波治療
第5回 千駄木脳腫瘍研究会 2015.6.3 橘桜
会館(東京・文京区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 文雄 (YAMAGUCHI, Fumio)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 70267219