

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660233

研究課題名(和文) マイクロバブルと超音波を利用した新しい増感放射線療法の開発

研究課題名(英文) The development of a novel sensitizing radiation therapy in conjunction with microbubbles and ultrasound exposure

研究代表者

滝口 満喜 (TAKIGUCHI, Mitsuyoshi)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・教授

研究者番号：70261336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロバブル(MB)存在下での超音波照射に引続く放射線照射が、放射線誘発アポトーシスの増強効果を示すかを明らかにすることを目的とした。マウス扁平上皮癌細胞にMB存在下で超音波照射直後に放射線を照射した結果、増感比1.1と弱い増感作用を認めた。次いで、超音波による細胞周期変動作用に着目してより効果が期待できる放射線照射の時期を検討したところ、9時間後が最も効果が期待できることが明らかになった。そこで超音波照射後9時間後に放射線を照射したが、増感比は1.1と変わらなかった。平板培養系での超音波照射による細胞の剥離が原因と考えられたため、今後は3次元培養系での検討が必要と思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the sensitizing effect of irradiation-induced apoptosis after ultrasound exposure in the presence of microbubbles. Mouse squamous cell carcinoma cell was irradiated right after the ultrasonic exposure with microbubbles resulted in sensitizing effect of 1.1. After considering optimal irradiation timing in the light of the effect of cell cycle variation of ultrasound exposure, it was suggested that 9 hours after the ultrasound exposure was suitable. However, the sensitizing effect of irradiation-induced apoptosis remained 1.1. Further study is needed using 3-dimensional cell culture system.

研究分野：獣医内科学

キーワード：獣医学 超音波 マイクロバブル 増感放射線療法 ソノポレーション

1. 研究開始当初の背景

超音波の治療への応用の試みは半世紀以上の長い歴史をもつ。しかしながら、画像表示法を中心とした診断分野においては生体に障害を及ぼさない低いエネルギーの超音波を、一方、治療分野においては局所照射に高いエネルギーの超音波を利用しようとする点で、両者が同じ領域の手法として発展することはなかった。ところが近年、超音波の生体作用についての基礎研究が進められたことや装置への工夫がなされてきたことから診断と治療の2つの領域の距離が縮まりつつある。その中で現在最も注目されているのがマイクロバブルを利用した超音波治療である。マイクロバブルと超音波を併用することで細胞膜に一時的に孔を開け、そこから薬物や遺伝子を細胞内に取り込ませることができるのみならず(Tachibana, et al. Lancet 1999)、遺伝子制御された細胞死であるアポトーシスが誘導されることが明らかとなった(Kondo, et al. Cancer Lett 2005)。したがって、マイクロバブルを利用した超音波治療は、がん治療に新たな展開を創成し、画期的変革をもたらすことが大いに期待される。

申請者はこれまで獣医画像診断学の分野において、特に超音波診断の領域で研究成果をあげてきた。中でも、近年、がんの早期診断に有用な超音波造影剤の獣医臨床応用に関する研究にいち早く取り組み、我が国で開発された第2世代超音波造影剤ソナゾイドが、犬の肝臓腫瘍性病変の良悪性鑑別に90%を超える高い診断精度で有用であることを明らかにした(Nakamura and Takiguchi, Vet Radiol Ultrasound, 2010)。また、脾臓についてもソナゾイドが犬の脾臓に造影増強効果を有することを発見し(Nakamura and Takiguchi, Vet Radiol Ultrasound 2009)、ついで犬の脾臓の腫瘍性病変の良悪性鑑別においても高い診断精度で有用であることを示した(Nakamura and Takiguchi, Vet Radiol Ultrasound, 2010)。このように超音波造影剤を用いて診断精度の向上を目指した研究を展開してきたが、治療効果の確実性という点でマイクロバブルを利用した超音波治療の発展性に強く惹かれ、獣医学領域に

おける放射線療法の現状の問題点を勘案した上で本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

近年、小動物の高齢化に伴い、がんの3大療法の一つである放射線治療を受ける動物が急激に増加している。しかし、X線や電子線を用いる放射線治療は、大きく成長したがんや悪性黒色腫、種々の肉腫などに効果が低いという欠点がある。したがって、この放射線抵抗性を克服するためには、巨額の費用を要する重量子線治療装置を導入するか、放射線の効果を増強させる放射線増感剤を開発する必要がある。この点に関して獣医学領域においては、後者の選択がより現実的で実用的であることは明らかである。

本研究ではがんに対する新たな治療戦略として、マイクロバブルと超音波を利用した新しい増感放射線療法の可能性に挑戦し、マイクロバブル存在下での超音波照射に引続く放射線照射が放射線誘発アポトーシスの増強効果を示すかどうかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、マイクロバブル存在下での超音波照射に引続く放射線照射が、放射線誘発アポトーシスの増強効果を示すかどうかを明らかにすることを目的とした。

マウス扁平上皮癌細胞SCCVIIを60mmのペトリディッシュにて培養し、MBとしてソナゾイド(第一三共、東京)を0.1%で加えて培養液を満たし、パラフィルムでシールし逆さにしてバブルの細胞への接着を促した後、その状態で水槽中にて下から超音波を照射した。超音波照射には円形型プローブを用い、超音波発生装置(テクトロニクス、AFG1022)、高周波増幅器(Thamway T145-5315A)にて1MHz、0.6Vpp、30秒間、照射した。照射後、すみやかにShimazu HF-350(島津製作所、京都)を用い、2mm厚アルミフィルターを使用して2-15GyでX線を照射し、コロニー形成法により細胞増殖への影響を調べた。

次いで、超音波照射による細胞周期の変動作用に着目し、細胞周期の変動からより放射

線増感効果が期待できる放射線の照射時期を検討した。マウス扁平上皮癌細胞SCCVIIを60mmディッシュにて培養し、MBとしてソナゾイドを0.1%で加えて培養液を満し、パラフィルムでシールし逆さにして10分静置後、水槽中にて下から中心周波数1 MHz の超音波をデューティー比10%(1000 cycle、PRF 100Hz)、34.3 mW/cm²で2分間照射した。照射後0、3、6、9、12、24時間後に細胞を回収・固定し、PIで染色してフローサイトメータによって細胞周期を判定した。

4. 研究成果

マイクロバブル存在下での超音波照射に引続く放射線照射により、増感比1.1と弱いながらも増感作用が認められた。さらに活性酸素種の産生とアポトーシスへの影響を調べたところ、MB存在下で超音波照射後、放射線照射を併用することで活性酸素種の産生ならびにアポトーシスが亢進していることが示唆された。

また、細胞周期の変動への影響については、超音波照射単独群では、G1期分画は増加傾向を示し、6時間後に最大となった。S期分画は初期と後期に分けたが、共に6時間後まで減少傾向を示し、その後増加した。G2/M期分画については減少傾向を示し、6時間後が最小となった。マイクロバブル併用群ではG1期分画は増加傾向を示し9時間後に最大となった。S期分画は初期では6時間後に最小となった後増加し、12時間後に最大となった。後期では9時間後に最小となった後増加し、12時間後に最大となった。G2/M期分画は減少傾向を示し、9時間後に最小となった。以上をまとめると、超音波照射によって細胞周期が変動し、バブルを併用するとさらに細胞周期全体が3時間遅延した。よって超音波照射後、9時間後に放射線を照射することが最も増感作用を示すことが期待されたが、増感比1.1と弱い増感作用を認めるにとどまった。その原因としては、平板培養系での超音波照射により細胞が剥離してしまった影響が考えられた。今後は、3次元培養系での検討が必要であると思われる。

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 0件)

[学会発表](計 1件)

藤沢眞代, 佐々木東, 安井博宣, 工藤信樹, 滝口満喜. 超音波による細胞周期変動を利用した増感放射線療法の可能性. 第14回日本超音波治療研究会 2015年11月28日, 高知市, 高知市文化プラザかるぼーと

[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

滝口 満喜 (TAKIGUCHI, Mitsuyoshi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・教授

研究者番号: 70261336

(2)研究分担者

佐々木 東 (SASAKI, Noboru)

北海道大学・大学院獣医学研究科・助教

研究者番号：00754532

(3)連携研究者 なし