HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	悪性神経膠腫に対する220-kHz経頭蓋MRIガイド下集束超音波装置と5-アミノレブリン酸を用いた音響力学療法［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	吉田, 道春
Description	配架番号：2416
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13037号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70569
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Michiharu_Yoshida_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　吉田　道春

学 位 論 文 題 名

悪性神経膠腫に対する 220-kHz 経頭蓋 MRI ガイド下集束超音波装置と
5-アミノレブリン酸を用いた音響力学療法
(Sonodynamic therapy using 220-kHz transcranial MRI-guided focused ultrasound and 5-aminolevulinic acid on malignant glioma)

【背景と目的】近年、経頭蓋 MRI ガイド下集束超音波(TcMRgFUS)装置が開発され脳腫瘍分野への多面的な治療応用が期待されている。現状では高エネルギー照射による温熱凝固がその主体であるが、広範に浸潤する悪性脳腫瘍治療においては正常組織への障害が危惧される。そこで我々は温熱凝固にかわる方法として、腫瘍細胞選択性を持つと考えられる音響感受性物質に低エネルギーの超音波を照射することで細胞死を誘導する音響力学療法(Sonodynamic therapy: SDT)に着目した。本研究の目的は、220-kHz TcMRgFUS 装置(ExAblate Neuro; InSightec, Israel)を用いた集束超音波(FUS)照射に 5-アミノレブリン酸(ALA)を併用することで、悪性神経膠腫に対して腫瘍細胞選択的に音響力学的な抗腫瘍効果が得られるか *in vitro* と *in vivo* で検討することである。

【材料と方法】F98 ラット悪性神経膠腫細胞を用いて細胞内と移植脳腫瘍への 5-ALA 由来 PpIX (protoporphyrin IX)の蓄積を評価した。任意の濃度と時間で 5-ALA と共培養後、フローサイトメトリーを用いて共培養条件を最適化し、PpIX の局在を Hoechst 33342 と MitoTracker Green による共染色を行い蛍光顕微鏡下に観察した。脳移植モデルではヒト臨床用量のラット換算量である 100 mg/kg を腹腔投与し 4 時間後、移植脳を摘出し 405-nm 光源を用いて MRI および HE (hematoxylin & eosin)染色の所見と比較した。続いて、照射範囲を温度上昇として正確に把握しつつ、正常脳組織の障害を回避するために 40～42℃(＋3～5℃)の温度上昇に抑えるように照射条件を最適化した。条件設定の後、細胞懸濁液と脳腫瘍ラットに対して 5-ALA 併用または未併用の集束超音波(FUS)を照射した。この際、半球状のトランスデューサーをお椀のように水平に置き、その中心部に細胞懸濁液を満たしたテストチューブを位置させ 37℃の脱気水に完全に沈め、脳移植ラットは剃毛した頭頂部を同位置で 21℃の脱気水に沈めた。脱気水は酸素濃度 1 ppm 未満を維持した。細胞実験における 5-ALA の共培養濃度と時間は 200 μg/ml と 4 時間、動物実験における 5-ALA の用量と時間は 100 mg/kg と 4 時間とした。細胞実験では、5-ALA との共培養後 4000 J、20 W、240 秒 100% duty cycles の照射条件で超音波を照射した後、20 時間後に細胞生存率と細胞障害機序を評価した。細胞生存率は premix WST-1 試薬を使用し、細胞障害機序は Hoechst 33342 と FITX-Annexin V、Ethidium homodimer Ⅲによる蛍光染色と、cleaved caspase-3 (CC-3)抗体によるウェスタンブロットを用いて分析した。動物実験では、5-ALA を投与後 500 J、18 W、30 秒、100% duty cycles、10 回照射(計 5000 J) の照射条件で超音波を照射した後、T2

強調画像(T2WI)で治療前後の腫瘍体積変化を評価し、HE 染色、抗 GFAP (glial fibrillary acidic protein)抗体、抗 Ki-67 抗体、CC-3 抗体、Elastica-Masson (E-M)染色により治療後の病理組織を観察した。

【結果】F98 細胞において PpIX の細胞内蓄積量は 5-ALA の共培養濃度と時間に依存しており、200 μg/ml の 5-ALA と 4 時間の共培養後、PpIX の細胞内蓄積量は最大値に達した。同濃度と時間で共培養を行うと、蛍光顕微鏡下で PpIX の赤色蛍光はコントロール群よりも遥かに強く、細胞質の MTG の緑色蛍光に一致しており、5-ALA 由来 PpIX が主にミトコンドリアに局在を持つことを示していた。脳移植モデルでは HE 染色で認める F98 腫瘍に一致するように PpIX の赤色蛍光が検出され、T2WI の高信号領域よりも鋭敏に浸潤領域を反映していた。続いて細胞照射実験では、照射 20 時間後の細胞生存率はコントロール群に対し ALA 単独群が 107.1±1.1%、FUS 単独群が 91.5±5.1%、SDT 群が 20.4±5.5%（n=3、平均値±標準偏差）と、SDT 群が他群に比し明らかな有意差($p<0.01$)を以て低かった。さらにその細胞障害機序をまず上記の三重染色で評価したところ、ほぼ全ての細胞が晩期アポトーシス細胞であり、ウェスタンブロットによる検索でもアポトーシス関連蛋白である CC-3 が明らかに有意に発現($p<0.01$)していた。また動物照射実験では、移植 11 日目に超音波照射後、腫瘍体積において SDT 群は一時的な抗腫瘍効果を認め、移植 16 日目の腫瘍増大速度は他群に比し有意に抑制($p<0.05$)されていた。さらに、移植 12 日目の Ki-67 染色で SDT 群は陽性細胞が少なく細胞増殖能が低下していた。移植 16 日目の CC-3 染色では腫瘍内辺縁部に集簇した陽性細胞の領域が散在しアポトーシス誘導の関連が示唆された。E-M 染色では腫瘍辺縁部も明瞭で、その近傍の浸潤腫瘍結節数も新生血管数も明らかに減少していた($p<0.05$)。HE 染色と GFAP 染色で腫瘍周囲の正常組織構造を確認したところ、超音波照射が原因と思われる正常脳組織の損傷は認められなかった。動物実験の結果から、5-ALA 併用 FUS では正常脳組織を損傷することなく、腫瘍増殖と浸潤、血管新生を抑制することが示された。

【考察】現在、本態性振戦やパーキンソン病に臨床使用されている FUS 装置の周波数は 650-kHz であり、温熱凝固をもたらす 55℃(＋18℃)以上の温度上昇（照射強度）を確保するために安全に治療できる領域は脳中心部の非常に狭い領域に限られている。本研究で使用した 220-kHz TcMRgFUS 装置は 650-kHz に比べその領域はより大きくなることが知られている上に、今回の実験で要した最高上昇温度は 42℃(＋5℃)以下と照射強度、エネルギーとも非常に低かった。これらの理由から、220-kHz FUS と 5-ALA を併せて臨床で SDT を行う場合、治療可能領域の更なる拡大が期待でき脳皮質下腫瘍も治療適応となるかもしれない。また上昇温度が低いため正常脳組織の障害は確認されず、腫瘍細胞選択的にアポトーシスを誘導し、悪性神経膠腫の最大の問題であり特徴である浸潤性と増殖性を抑制できる可能性が示された。

【結論】220-kHz TcMRgFUS に 5-ALA を併用することで、正常脳組織の損傷を回避しつつ、悪性神経膠腫の増殖と浸潤、血管新生を抑制する効果が示唆された。SDT は悪性神経膠腫患者に対する非侵襲的かつ継続可能な新規の治療技術になる可能性がある。