



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 [全文の要約]
Author(s)	吉田, 道春
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2416 他
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/2115/70570
Type	doctoral thesis
File Information	Michiharu_Yoshida_summary.pdf



学 位 論 文 (要 約)

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)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

吉 田 道 春

学位論文の要約

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】 悪性神経膠腫は原発性脳腫瘍の中で最も予後不良な疾患の一つに代表される。本疾患に対する標準治療は機能温存の上での最大切除に次ぐ放射線化学療法である。しかし、基底核や脳幹といった脳深部腫瘍や被曝上限量、深刻な副作用や免疫不全状態、服薬管理不足、低い治療効果の場合、治療の完遂は難しくなる。それゆえに非侵襲性と継続可能性を保った新規治療戦略が早急に必要である。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°C(+3~5°C)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°C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°C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

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。データは全て Statcel 4 software (OMS publishing Inc, Saitama, Japan) を用いて統計学的解析を行った。3 群以上の多群間比較は Tukey-Kramer 法と Bonferroni/Dunn 法による一元配置分散分析法(one-way analysis of variance: ANOVA)を用いて、2 群間比較は Student の t 検定により評価し、 $p < 0.05$ を統計学的優位差ありと判定した。

【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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $107.1 \pm 1.1\%$ 、FUS 単独群が $91.5 \pm 5.1\%$ 、SDT 群が $20.4 \pm 5.5\%$ ($n=3$ 、平均値 $\pm$ 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】 今回の研究で我々はヒト膠芽腫に酷似した浸潤性と増殖性、病理組織像を呈する脳深部腫瘍モデルを作成するために F98 細胞株を選択した。しかし同細胞に対して 5-ALA を用いて SDT の抗腫瘍効果を検討した細胞および動物実験の報告はなかったため、F98 細胞の 5-ALA 由来 PpIX の細胞内蓄積能力の評価から開始した。他の神経膠腫細胞株や癌細胞株と同様に、F98 細胞株においても濃度および時間依存性に PpIX が細胞内に蓄積し、ミトコンドリアに局在を持つことを *in vitro* で確認した。また *in vivo* でも、5-ALA の臨床適応濃度(20 mg/kg)のラット換算量(100 mg/kg)を投与すると、F98 腫瘍に PpIX が優先的に集積することを示した。これらの結果は、これまで示された 5-ALA の悪性腫瘍に対する腫瘍細胞選択性を支持するものである。

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 $55^{\circ}\text{C}(+18^{\circ}\text{C})$ 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°C(+5°C)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。

5-ALA を用いた SDT はミトコンドリアの機能異常に関連しており、悪性腫瘍細胞内のミトコンドリアに蓄積した 5-ALA 由来 PpIX が超音波によって励起された後 ROS を産生、それが MMP (mitochondrial membrane potential) を欠失させ cytochrome C を大量に放出、caspase を活性化させ腫瘍細胞選択的にアポトーシスを誘導すると考えられている。本研究でも *in vitro* と *in vivo* を通して殺細胞効果の機序としてはアポトーシスを介していた。また、*in vivo* の実験では上昇温度が低いため正常脳組織の障害は確認されず、一方で腫瘍の浸潤や血管新生、増殖能を抑制していた。以上の結果から、悪性神経膠腫に 5-ALA 併用低温照射を実施することで、腫瘍細胞選択的にアポトーシスを誘導し腫瘍の浸潤と増殖を抑制できる可能性が示唆された。

【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。