

学術紹介:

ハイパーサーミアと超音波マイクロバブルの併用による腫瘍血管破壊とがん治療効果の増強

西岡 エミリ・鈴木 亮*

*帝京大学 薬学部

現在、放射線療法・化学療法・外科的療法ががん治療の三大療法となっている。しかし、これらの治療法は患者に対する身体的負担が大きく、放射線療法では被曝量の問題や化学療法では副作用の発現が大きな問題となっている。近年では、この問題を軽減するため、放射線療法または化学療法とハイパーサーミア (HT) の併用による放射線線量や抗がん剤投与量の低減が図られている。HT は、正常組織 (細胞) に比べて腫瘍組織 (細胞) が熱に弱いという原理を利用し、標的組織の温度を 39~45 °C に上昇させがん細胞を死滅させる方法である。このがん細胞死誘導メカニズムとして、細胞内のタンパク質の変性・凝集、HT 誘発性の抗腫瘍免疫、腫瘍血管の損傷や活性酸素種生成の増加などが考えられている¹⁾。実際に、HT と放射線療法の併用により、多様ながん種で腫瘍サイズを大幅に縮小できる²⁾。また、化学療法と HT の併用では、化学療法の治療効果の増強が報告されている。このような取り組みにより、放射線治療による被曝量や抗がん剤投与量の減量が可能となり、これら治療における身体への負担軽減につながる事が示されている³⁾。一方、HT 処置後の腫瘍細胞ではヒートショックプロテイン (HSP) の発現増加が認められており、併用治療に対する耐性誘導の可能性が指摘されている⁴⁾。そのため、HT 療法の治療効果を向上させる新たな併用治療法の探索が進められている。

超音波照射野のマイクロバブル (MB) は、超音波による圧力変動により膨張や圧壊が誘導される。この MB の機械的作用により、超音波照射部位に限定して血管損傷を引き起こすことができる。腫瘍組織において、腫瘍血管は栄養や酸素の供給、がん細胞転移の経路になるなど、がんの進展に重要な役割を果たしている。そのため、腫瘍

血管を損傷することのできる超音波とマイクロバブルを利用した治療法 (USMB) は、がんの進展を阻止する新たな治療法として期待されている。また、この USMB を放射線療法や化学療法と併用する研究も進められている。このように USMB は、様々ながん治療法との併用が期待される治療法として注目されており、本法は HT の治療効果を増強可能な併用療法になるものと考えられる⁵⁾。今回、HT と USMB の併用による腫瘍血管への影響やがん治療効果を検討した論文が発表されたので紹介する⁶⁻⁸⁾。

本研究では、HT への USMB の併用によるがん治療効果の増強を検討している⁶⁾。ヒト前立腺がん細胞 (PC3) を背部皮下に移植したマウス (雄性 SCID-C.B-17) に、MB (1% (v/v), 100 µL) を静脈内投与し、異なる音圧 (0~570 kPa) の超音波 (中心周波数 500 kHz, パルス繰り返し周波数 3 kHz) (Transducer (Aperture diameter: 28.6 mm, Focus: 85 mm, Focal zone -6 dB, Beam-width 31 mm (IL0509HP, Valpey Fisher Inc), Wave-form generator (AWG520, Tektronix), Amplifier (RPR 4000, Ritec), Digital acquisition system (Acqiris DC440/PXI8570, Agilent Technologies)) を腫瘍組織に 5 分間照射した。USMB の 5 時間後に腫瘍組織を 43 °C の温浴に浸し、HT (0~50 分間) を行った。その後、腫瘍組織の切片を作成し、TUNEL 染色や CD31 の免疫組織化学染色によりアポトーシス細胞や血管内皮細胞数を評価した。その結果、USMB または HT 単独と比較して、併用治療において音圧や HT 治療時間の延長に伴うアポトーシス細胞数の増加および腫瘍血管内皮細胞数の減少が確認された。このことから、USMB と HT の併用治療により腫瘍血管が損傷され、腫瘍細胞のアポトーシスが効率よく誘導されたのではないかと考えられた。そこで、この併用治療における繰り返し治療の効果を検討するために、MB (1% (v/v)) を静脈内投与後に超音波 (中心周波数 500 kHz, パルス繰り返し周波数 3 kHz, 音圧 570 kPa) を 5 分間照射した USMB に HT (43 °C, 50 分間) を併用する治療を週に 1 回または 2 回を

4週間繰り返して行った。その結果、週2回の併用治療を行うことで、大幅な腫瘍の増殖抑制が認められた。次に、この併用治療における腫瘍内の繊維化と増殖細胞の割合を検討した。なお、本検討では腫瘍組織内の繊維化状態をマッソントリクローム染色により評価し、増殖性細胞の割合はKi-67染色により検討した。その結果、HT単独およびUSMB+HTにおいて繊維化組織の増加と増殖細胞の減少が認められた。以上の結果より、HT単独治療および併用治療において、腫瘍血管内皮細胞が減少することで、腫瘍細胞のアポトーシスが誘導され、それに続き繊維化が起きていることが推察される。

前項の検討においてUSMBとHTの抗腫瘍効果に腫瘍血管への作用が重要であることが示された。そこで、腫瘍内の新生血管が発達したヒト乳がん細胞(MDA-MB-231)を後脚に皮下注射したマウス(雌性SCID-C.B17)を用いUSMBとHTの治療効果について検討した⁶⁾。また、本検討では併用治療のパラメーターについても最適化を行った。MDA-MB-231移植マウスにMB(3%(v/v), 100 μ L)を静脈内投与し、腫瘍組織に超音波(中心周波数500 kHz, パルス繰り返し周波数3 kHz, 音圧(570 kPa), 5分間)(Unfocused planar ultrasound transducer: 2.85 cm, Focus: 8.5 cm, Focal point: -6 dB, Beam-width: 31 mm (Valpey Fisher Inc), Wave-form generator (AWG520, Tektronix), Amplifier (RPR4000, Ritec), Digital acquisition system (Acqiris DC440/PXI8570, Agilent Technologies))を照射した。その5時間後、HT(43 $^{\circ}$ C, 50分間)を実施した。この併用治療後、腫瘍組織をTUNEL染色し、アポトーシス細胞数を定量化した。その結果、USMBとHTの併用治療においてアポトーシス細胞数が有意に増加した。また、CD31の免疫組織化学染色を用いて血管内皮細胞を確認したところ、USMBとHTの併用治療において血管内皮細胞の有意な減少が確認できた。さらに、血管内皮細胞の減少を示した領域はアポトーシス細胞の多い領域であった。これらの結果より、腫瘍細胞のアポトーシスが内皮細胞

の減少に由来することが考えられる。次に、USMBやHTによる腫瘍血管損傷を腫瘍内の血行動態を指標に評価した⁵⁾。本検討は、MDA-MB-231移植マウスにMB(3%(v/v), 100 μ L)を静脈内投与し、腫瘍組織に超音波(中心周波数500 kHz, パルス繰り返し周波数3 kHz, 音圧(570 kPa), 5分間)を照射した。その5時間後、HT(43 $^{\circ}$ C, 50分間)を実施した。腫瘍組織の血行動態は、パワードップラー超音波画像診断(VEVO770 imaging system (Visual Sonics), Transducer: 中心周波数25 MHz (RMV-710B))による腫瘍内の総血流量および光音響イメージング(Visual Sonics 2100 VEVO LAZR system (Visual Sonics), Transducer: 中心周波数18 MHz (LZ-250), レーザー波長: 750 nm (deoxygenated hemoglobin) & 850 nm (oxygenated hemoglobin))による血中酸素飽和度により評価した。その結果、併用治療により腫瘍内の血流量および酸素飽和度が有意に低下した。このことから、併用療法は腫瘍血管を効率よく損傷することで腫瘍血管の血流量を減少させ、腫瘍内の酸素飽和度を減少させたと考えられる。このときの腫瘍組織内の状態を検討するため、腫瘍組織切片のCD31の免疫組織化学染色による血管内皮細胞の観察およびTUNEL染色によるアポトーシス細胞の検出を行った。その結果、HT単独またはUSMBに比べ、併用治療群で腫瘍血管内皮細胞の減少および腫瘍組織内でのアポトーシス細胞の顕著な増加が確認できた。このことから、併用治療において、腫瘍血管内皮細胞が効率よく傷害されて、腫瘍組織内への酸素や栄養分の移行が遮断されたことで、腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されたのではないかと推察される。そこで、腫瘍血管の減少やアポトーシス細胞増加に向けた最適化を行った⁷⁾。まずHTの最適な治療時間を検討するため、MDA-MB-231移植マウスにMB(3%(v/v))を静脈内投与し、腫瘍組織に超音波(中心周波数500 kHz, パルス繰り返し周波数3 kHz, 音圧(570 kPa), 5分間)を照射した。その5時間後、HT(43 $^{\circ}$ C, 10, 20, 30, 40, 50または60分間)を行った。その24時間後、腫瘍組

組織の切片を作成し、CD31の免疫組織化学染色およびTUNEL染色を行った。その結果、USMBとHT40～60分間を併用したときに血管内皮細胞の減少および腫瘍細胞内のアポトーシス細胞の増加が認められた。特に、40分間のHTを併用したときに血管内皮細胞の減少および腫瘍細胞内のアポトーシス細胞の増加が最大となった。このように、HTの最適処置時間が判明した。次にUSMBの最適化を行うため、投与するMB濃度（0.1/1/3%, 100 μ L）と超音波（中心周波数500 kHz, パルス繰り返し周波数3 kHz, 音圧570 kPa）の照射時間（1, 3, 5分）の影響を検討した。その結果、HTにいずれの条件のUSMBを併用しても、血管内皮細胞数やアポトーシス細胞数に大きな変化は認められなかった。このことから、USMBの処置時間やMB投与量は、HTの効果増強にほとんど影響しないことが明らかとなった。以上より、USMB（中心周波数500 kHz, パルス繰り返し周波数3 kHz, 音圧570 kPa）において、40分間のHTを実施することが最適であることが示唆される。今回紹介した報告は、腫瘍血管を損傷する治療であるUSMBとHTの併用によるがん治療効果の増強の可能性を示した報告であり、これらの治療の併用において治療条件の最適化が重要であることが示された。今後、USMBとHTの治療順序や治療時間の間隔などの検討をすることで、本併用療法のさらなるがん治療効果の向上が期待される。

これまでの研究は、USMBやHTについて、それぞれ個別に行われており、併用効果についての報告はほとんどなかった。特に、今回紹介したようなUSMBとHTによる腫瘍血管の損傷メカニズムや治療条件による作用の違いを詳細に検討している報告は皆無であった。今回の研究では、USMBとHTの併用における最適な治療条件を決定しており、本併用治療の臨床応用を進めて行く上で貴重な参考情報になる。一方で、本併用療法は血管を標的とした治療法であるため、血管が発達していないがん種に対する治療には適していない可能性がある。そのため、がん種の異なる腫瘍組織に対する治療効果を検討するとともに、腫瘍

組織の血管密度や血流量と治療効果の相関などに関する詳細な検討が必要であると考えられる。この結果が得られれば、実臨床の腫瘍組織において、がん種や個人差による血管密度や血流量の違いをMBを利用した造影超音波で診断し、USMBとHTの併用療法の適否を判断することができる。また、併用療法を適用した際の治療効果の予測が可能になるものと期待される。なお、USMBに関しては、設定するパラメーターが多く、腫瘍組織の血流状態や体表からの深さなどにより、MBの投与量や超音波照射の条件などを個別に設定することが必要になると考えられる。この点について、超音波照射下でのMBの挙動に関するシミュレーション研究が盛んに行われており、この研究をうまく取り入れ、治療条件の最適化につなげられるとよいのではないかと考えている。また別の研究として、MBに抗がん剤などの薬物を搭載した研究や、MB表面に腫瘍の血管内皮細胞標的化する分子を修飾する研究が進められている。このように、USMBに関して多角的な研究が進められており、様々な研究の中からHTと相性のよいUSMB条件が見出されることを期待したい。

参考文献

- 1) Mallory M., Gogineni E., Jones G.C., Greer L., Simone C.B.: 2nd, Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming. *Crit Rev Oncol Hematol*, 97: 56-64, 2016.
- 2) Wust P., Hildebrandt B., Sreenivasa G., Rau B., Gellermann J., Riess H., Felix R., Schlag P.M.: Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 3: 487-497, 2002.
- 3) van der Zee J.: Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol*, 13: 1173-1184, 2002.
- 4) Pelz J.O., Vetterlein M., Grimmig T., Kerscher A.G., Moll E., Lazariotou M., Matthes N., Faber M., Germer C.T., Waaga-Gasser A.M., Gasser M.: Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis: Role of heat shock proteins and dissecting effects of hyperthermia. *Ann Surg Oncol*, 20: 1105-1113, 2013.
- 5) Sharma D., Cartar H., Quiaoit K., Law N., Giles A., Czarnota G.J.: Effect of ultrasound-stimulated

- microbubbles and hyperthermia on tumor vasculature of breast cancer xenograft. *J Ultrasound Med*, 41: 2659-2671, 2022.
- 6) Sharma D., Giles A., Hashim A., Yip J., Ji Y., Do N.N.A., Sebastiani J., Tran W.T., Farhat G., Oelze M., Czarnota G.J.: Ultrasound microbubble potentiated enhancement of hyperthermia-effect in tumours. *PLoS One*, 14: e0226475, 2019.
 - 7) Sharma D., Cartar H., Law N., Giles A., Farhat G., Oelze M., Czarnota G.J.: Optimization of microbubble enhancement of hyperthermia for cancer therapy in an in vivo breast tumour model. *PLoS One*, 15: e0237372, 2020.
 - 8) Sharma D., Carter H., Sannachi L., Cui W., Giles A., Saifuddin M., Czarnota G.J.: Quantitative ultrasound for evaluation of tumour response to ultrasound-microbubbles and hyperthermia. *Technol Cancer Res Treat*, 22: 1-10, 2023.

用語解説

超音波：ヒトの聴覚では認識できない 20 kHz 以上の周波数領域の音波のこと。診断用超音波装置では、体内での超音波の減衰や造影解像度の観点から、主に 2 MHz ～ 20 MHz の超音波が利用されている。一方、治療用超音波装置では、超音波の機械的作用や熱的作用の誘導などの観点から、主に 500 kHz ～ 3 MHz の超音波が利用されている。

マイクロバブル (MB)：超音波造影ガス (C₃F₈, C₄F₁₀, SF₆) を脂質またはアルブミンなどの外殻で覆い、数マイクロメートルのサイズとなるように安定化した微小気泡である。医療分野において MB は、血流イメージン

グなどの超音波造影剤として利用されている。なお、本稿で紹介した論文では、米国で臨床応用されている C₃F₈ を内包した脂質の外殻を有する MB の Definity® (Lantheus Medical Imaging, Inc., MA, USA) が利用されている。

低酸素領域：固形がんでは、がん細胞の増殖に対して血管新生が不十分となると、血流不足により酸素が供給されにくい領域が生じる。これにより、がん組織中心部の壊死などが生じる。また、低酸素領域ではがん細胞が Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) という低酸素に応答する遺伝子発現調節因子を活性化する。このことが、がんの悪性化や、放射線療法や化学療法の耐性発現の一因になっていると考えられている。

利益相反に関する開示

著者に利益相反状態は認められなかった。

Mini-review:

Enhancement of Anti-Tumor Effect by the Combination of Hyperthermia and Microbubble-mediated Ultrasound Treatment

EMIRI NISHIOKA, RYO SUZUKI*

Laboratory of Drug and Gene Delivery Research, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University

*Corresponding author: r-suzuki@pharm.teikyo-u.ac.jp

Key Words: Ultrasound, Microbubble, Tumor blood vessel, Hypoxia, Apoptosis

Received: 24 June, 2024

Accepted: 7 Oct, 2024