Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-02

Intra-arterially infused carbon dioxide-saturated solution for sensitizing the anticancer effect of cisplatin in a rabbit VX2 liver tumor model

Katayama, Naoto

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2017-09-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7025号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007025

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Intra-arterially infused carbon dioxide-saturated solution for sensitizing the anticancer effect of cisplatin in a rabbit VX2 liver tumor model

ウサギ VX2 肝腫瘍における炭酸飽和水動注療法のシスプラチン増感作用

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

放射線診断学

（指導教員：佐々木　良平　特命教授）

片山　直人

序文

固形癌では腫瘍増殖に伴って細胞内は低酸素状態となることが知られているが、低酸素によって化学療法・放射線治療への治療抵抗性が惹起されることが報告されている。

二酸化炭素ガス（炭酸ガス)は従来、皮膚潰瘍や褥瘡などに対する治療法として知られている一方、近年では経皮的な炭酸ガス投与実験での抗腫瘍効果が確認されている。微小循環における血流増加や、血管新生の促進、Bohr 効果に伴う酸素分圧上昇などがそのメカニズムとして挙げられている。これらの研究を基にして、以前に我々の研究グループでは炭酸ガスを生理食塩水に飽和･溶解させた炭酸飽和水の血管内投与(動注療法)を行い、ウサギ大腿腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果を報告した。

本研究においては炭酸飽和水動注療法のウサギ肝腫瘍モデルへの応用を企図するとともに、臨床応用を見据えて抗癌剤動注療法との併用による増感作用についても実験・検証を行った。

対象と方法

肝臓に VX2 腫瘍を移植されたウサギ 40 匹（日本白色家兎:月齢 3-4 ヶ月)を用いた。対照群：生理食塩水 50ml、炭酸群：炭酸飽和水 50ml、シスプラチン群（シスプラチン 1.75mg/kg)・混合群（炭酸飽和水 50ml + シスプラチン 1.75mg/kg)の 4 群各 10 匹に分けて、下記の通りに動注を行った。なお炭酸飽和水は生理食塩水 100ml に炭酸ガスを 15 分かけてバブリングして作成した(pH=4)。

全身麻酔下に右鼠径部を切開し、大腿動脈を露出した。22G 針にて大腿動脈を穿刺してシースを挿入し、マイクロカテーテルを用いて固有肝動脈を選択した。X 線透視

下に血管造影を施行して腫瘍血管の描出を確認後、同ルートより各群に上記の薬剤を投与した。投与後は穿刺針を抜去し、結紮止血後に創閉鎖を行った。実験終了後は常食管理とし、7 日後に薬殺、臓器を摘出した。また、処置直前と 3 日目・7 日目に造影 CT（Rm−CT2，Rigaku）を撮影後 3mm 厚スライスによる volumetry にて腫瘍体積を算出した。

摘出された検体は、TUNEL 染色によって DNA フラグメンテーションアッセイ、cleaved caspase-3・cleaved caspase-9 抗体を用い Western blotting にて分子生物学的にアポトーシスを評価した。また HIF-1α (hypoxia-inducible factor-1α)および CA IX (carbonic anhydrase IX)による免疫組織染色で低酸素を評価した。

結果

経過の中で合併症や関連死亡は見られず、体重の増減に関しても各群間に有意差はみられなかった。

平均腫瘍増大率は、対照群（3 日目・7 日目）: 202.6 ± 23.7%・429.2 ± 94.8%、炭酸群:172.2 ± 38.1%･376.5 ± 61.1%、シスプラチン群:156.1 ± 15.1%･269.6 ± 45.2%、混合群：118.3 ± 28.1%・210.3 ± 55.1%であった。炭酸群では対照群と比較して 3 日目では有意に腫瘍増大の抑制（$P < 0.05$)を認めたが、7 日目では有意差を認めなかった（$P = 0.16$)。混合群ではシスプラチン群と比較して、3 日目・7 日目ともに有意な腫瘍増大抑制（$P < 0.05$)が認められた。また炭酸群・シスプラチン群より算出した相加効果による予測腫瘍増大率との比較でも、混合群では有意な腫瘍増大抑制（$P < 0.05$)がみられた。

TUNEL 染色を基に HE 染色でのアポトーシス領域を算出したところ、対照群と比較して炭酸群・シスプラチン群・混合群ではアポトーシス領域の増加と腫瘍領域の減

少を認め、特に混合群では顕著であった。Western blotting では炭酸群・混合群では対照群・シスプラチン群よりも cleaved caspase-3・cleaved caspase-9 の発現増加を認めた。

免疫組織染色においては炭酸群・混合群では対照群・シスプラチン群よりも HIF-1α・CA IX とも発現抑制を認めた。HIF-1α の定量（各視野での平均カウント）では対照群 : 246 個 ± 118、炭酸群 : 21 個 ± 10.4 、シスプラチン群 : 152 個 ± 40.7、混合群 : 16 個 ± 7.3 であり、炭酸群・混合群では他の 2 群より有意に低かった。

考察

炭酸群では対照群と比較して、混合群ではシスプラチン群と比較して、いずれも有意に腫瘍増大が抑制された。特に混合群ではシスプラチン増感作用がみられ、動注化学療法への貢献が期待される。

二酸化炭素による抗腫瘍効果・シスプラチン増感作用のメカニズムとしてはアポトーシス誘導や低酸素改善が関与していると考えられる。二酸化炭素は細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を来たし、ミトコンドリア機能を活性化させて DNA アポトーシスを誘導することが知られている。In vivo の研究では、悪性線維性組織球腫モデルを用いた経皮的炭酸ガス治療において細胞内のカルシウムイオン濃度上昇を来たし、caspase-9 経路を介したミトコンドリア DNA アポトーシスを生じることが示されている。また二酸化炭素が活性酸素種を誘導し、アポトーシス促進作用を有する p53 転写シグナルを刺激することも知られている。本研究では炭酸群・混合群ともミトコンドリアを介したアポトーシスを反映する cleaved caspase-9 の発現増加を認めており、以前の報告と同様の経路を介してアポトーシスが誘導され、腫瘍増大の抑制に繋がったものと推測される。

これ以外にも腫瘍内環境の酸素化や pH 低下による抗腫瘍効果も考えられる。今回の実験ではこれらの測定は行っていないが、炭酸群・混合群で他の 2 群より有意に低酸素マーカーである HIF-1α の発現低下を認めている。炭酸飽和水の投与によって細胞内 pH 低下を来し、Bohr 効果（pH 低下により酸素解離曲線の右方移動を生じ、組織内でより酸素を放出する現象)から局所での酸素分圧の上昇が得られたことで、腫瘍内低酸素の改善に繋がった可能性が考えられる。HIF-1α は bHLH-PAS 転写因子であり、生体内酸素の恒常性に重要な役割を担う一方、近年では腫瘍増殖・悪性化にも関与することが知られている。高二酸化炭素血症において細胞内 pH が下がることで、HIF 経路の活性化が抑制されるという報告や、低酸素状態の改善による HIF-1α の発現低下が化学療法への感受性を増強させるとの報告がある。また HIF-1α ノックダウンされた卵巣癌細胞ではシスプラチンへの感受性が高まるという報告や、シスプラチンの増感作用が報告されているジインドリルメタンにおいて HIF-1α や VEGF 発現の抑制が示されている。今回の実験では混合群が、炭酸群・シスプラチン群の相加効果よりも有意に腫瘍増大抑制を得られており、HIF-1α 発現抑制を介してシスプラチンへの増感作用が発揮されたものと推測される。

また炭酸ガスは、腎機能不良患者やヨード造影剤に対するアレルギーを有する患者等に対して、血管造影時の陰性造影剤としてしばしば用いられている。血管内に投与された炭酸ガスはすぐに血中に溶け込み、人体への副作用はほとんどみられない。非常に安価でもあり、シスプラチン増感剤としては理想的と考える。今回、炭酸飽和水の投与量を 50ml と設定しており、炭酸ガス 38ml 相当が溶解していると考えられる。過去の報告では最大 16.2ml/kg の炭酸ガスをウサギへ動注しても亜急性期の肝障害を来さなかったとされており、本研究の投与量（炭酸ガス 14.5ml/kg 相当)は安全な範囲内であると考える。

今回の実験に以下の limitation が存在する。第一に今回肝臓に移植された VX2 腫

瘍はヒト由来ではなく、肝細胞癌とは異なることが挙げられる。第二に腫瘍移植後から 3 週間が経過しているため腫瘍内壊死が生じている。これにより腫瘍の体積変化には個体ごとでばらつきがみられるため、サンプル数を増やした追加実験が望まれる。第三には画像評価は造影 CT のみで、機能画像の評価を行っていないことが挙げられる。その他、炭酸飽和水の効果を検証する pilot study であるため、炭酸飽和水や抗癌剤量の容量は 1 種類しか設定していない。投与量や動注回数の増加によってより強い効果を期待できる可能性があり、今後の追加実験での検証が必要と思われる。

今回、我々はウサギ VX2 肝腫瘍モデルに対する炭酸飽和水動注療法が、caspase-9 経路を介したアポトーシス誘導と HIF-1α の発現抑制による低酸素改善を来し、腫瘍増大抑制およびシスプラチン増感作用を生じることを示した。