

研 究 報 告 書
一般課題：A
(平成27年度)

平成29年 3月31日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 国立研究開発法人 国立がん研究
センター 先端医療開発センター

住 所 千葉県柏市柏の葉 6-5-1

研究者氏名 山口 雅之



(研究課題)

酸化鉄ナノ粒子の洗い出し分子機構を利用した肝がん放射線治療支援 MRI の開発

平成28年 2月19日付助成金交付のあった標記一般課題：Aについて研究が終了致しましたのでご報告いたします。

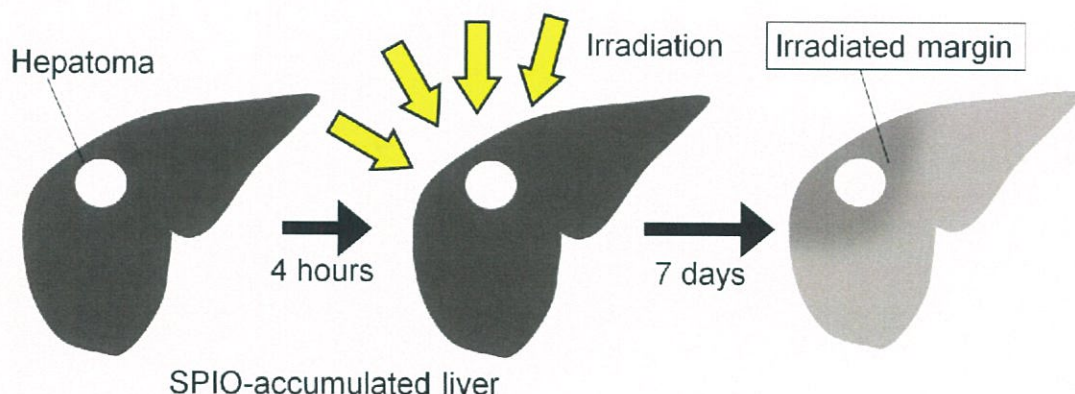
酸化鉄ナノ粒子の洗い出し分子機構を利用した肝がん放射線治療支援 MRI の開発

【要約】

肝がんに対する体幹部定位放射線治療 (Stereotactic Body Radiation Therapy; SBRT) や粒子線治療は、低侵襲かつ効果的な根治療法として期待されている。治療後の局所再発リスクの推定や肝不全発症の予測に役立つため、酸化鉄ナノ粒子 (SuperParamagnetic Iron Oxide; SPIO) を造影剤として利用する MRI 撮影技術を開発した。放射線照射前に SPIO を投与し、Kupffer 細胞を SPIO でラベルした状態で、担がん肝臓に対し放射線を照射する。1 週間後、残存腫瘍、放射線によって機能が変調した肝組織、正常肝組織を MRI 上で鑑別できる。動物実験によって、臨床的な治療線量に近い X 線照射において、Kupffer 細胞からの、SPIO の洗い出しが遅延し、肝組織の信号が低下し、放射線が照射された肝組織の描出に成功した。私達は、小分割、高線量率の肝がん放射線治療において、本技術が臨床応用可能と考えている。

【研究の背景と目的】

肝がんに対する体幹部定位放射線治療 (SBRT) や粒子線治療は、低侵襲かつ効果的な根治療法として期待されている。肝臓のように動く臓器では、放射線治療中や治療直後に、計画照射部位と実際の照射部位との乖離をインビボ画像上で評価したり、放射線傷害肝を定量化したりすれば、局所再発リスクの推定や肝不全発症の予測に役立つ。私達は、照射前に酸化鉄ナノ粒子 (SPIO) を投与し、Kupffer 細胞を SPIO でラベルした状態で、担がん肝臓に対し放射線照射を行う独自の手法を試み、照射部位 (腫瘍と、腫瘍を取り囲む照射肝、以下"照射マージン"と呼ぶ)、非照射部位を MRI 上で区別することに成功した (Furuta T, Yamaguchi M, *et al.* 2017) ^{1, 2}。照射マージンでは、Kupffer 細胞の鉄排泄機能が障害され、SPIO の洗い出しが遅れ、MRI 上低信号に (黒く) 見えると考えられた。

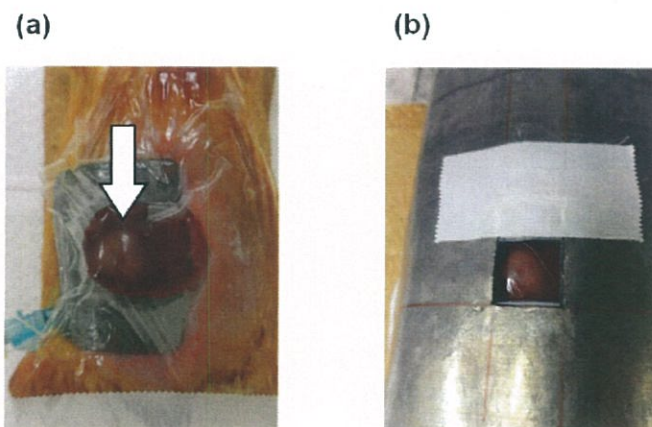


本研究の最終的なゴールは、照射後の Kupffer 細胞における SPIO 分解と鉄排泄に関連する分子の発現変化を調査し、洗い出し遅延の分子メカニズムを明らかにすることである。

また、本手法の臨床応用を目指す観点から、臨床と同等の放射線照射量で、SPIO の洗い出し遅延を生じせしめ、検討することが望ましい。上述の先行研究においては、臨床より高い照射線量 (50~70 Gy) を用いて実験を行っていた。そこで、本年度は先ず、照射線量を減じて、SPIO の洗い出し遅延が生じるか、動物実験で明らかにすることとした。

【対象と方法】

動物実験は、国立がん研究センター動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。Sprague-Dawley 種の雌性ラットを実験に供した。N1-S1 hepatoma 細胞 (CRL-1604; the American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA) を、肝被膜下に移植した³⁾。1週間後、9.4 tesla 小動物用 MRI 装置 (BioSpec 94/20 USR; Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) を用いて、SPIO 造影 MRI 検査を実施し、肝腫瘍の生着を確認した。SPIO 造影剤の ferucarbotran (Resovist; Bayer Yakuhin, Ltd, Japan) は、臨床利用可能な造影剤である。カルボキシデキストラン分子によって表面を被覆された酸化鉄結晶で、平均粒子径は 60 nm である。ラットの尾静脈より、20 μ mole iron/kg 体重の ferucarbotran を投与し、呼吸同期法を併用した高速スピンエコー法 (Repetition time [TR], 1376–1651 ms; echo time [TE], 27 ms) 及びグラジエントエコー法 (TR, 500 ms; TE, 10 ms; flip angle [FA], 30°) を使い、肝臓の T2 強調画像および T2*強調画像を得た。得られた T2*強調画像において、腫瘍サイズを計測した。この MRI 撮影の 4 時間後、投与した ferucarbotran が十分に肝臓の Kupffer 細胞に集積した状態において、担がん肝領域に対し 30 Gy の X 線照射を研究用の 160 kV X 線照射装置 (CP-160; Faxitron X-ray Corp., Wheeling, IL) を用いて実施した。放射線照射では、ラットを上腹部正中切開にて開腹し、担がん肝葉を牽引して、切開創より体外へ露出した。この肝葉以外は、鉛板を使ってシールドし、不要な放射線被ばくを避けた (下図。矢印は腫瘍を示している)。



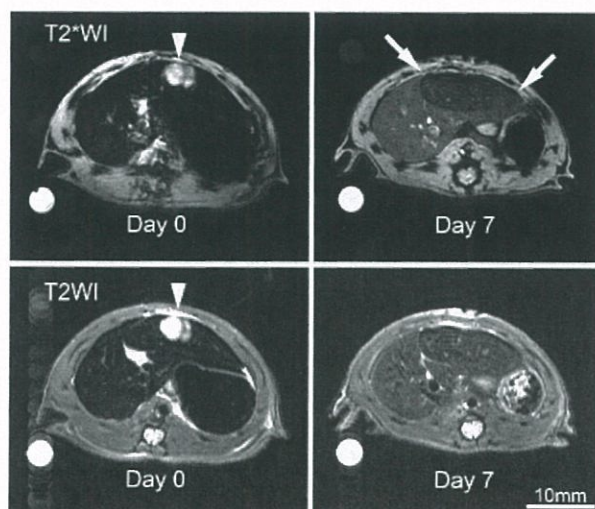
放射線照射後、肝葉を元の位置に戻し、閉腹した。7 日後、ferucarbotran の追加投与はせずに、MRI を再検した。T2 強調画像及び T2*強調画像を撮影した上、T2*緩和時間計測を、

Multiple Gradient Echo 法 (TR/TE/FA, 1000/3.1–18.5 ms [5 steps]/25°) を用いて実施した。MRI 取得後、肝左葉、右葉、及び傍脊柱筋に関心領域を置き、平均画素値を測定したのち、相対信号強度 (relative intensity; RI) を計算した。肝左葉、右葉の平均画素値を傍脊柱筋の平均画素値で除した。放射線照射前及び照射後 7 日において、肝左葉及び右葉の相対信号強度 (RI_L 及び RI_R) の差を Tukey's test を用いて検定した。また、放射線照射後 7 日において、肝左葉、右葉の $T2^*$ 緩和時間の差も検定した。有為水準は 5%とした。

【結果及び考察】

放射線照射時 (Day0) の肝腫瘍のサイズは $166 \pm 27 \text{ mm}^3$ (mean $\pm$ standard error) であった (下図、矢頭、図は Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med. 25 [2017] 2054 より転載)。 $T2^*$ 強調画像において RI_L 及び RI_R は、 0.17 ± 0.017 、 0.17 ± 0.014 であった。また、 $T2$ 強調画像においては、 0.33 ± 0.0067 、 0.29 ± 0.0093 であった。 $T2^*$ 強調画像及び $T2$ 強調画像いずれにおいても、肝両葉は同等に信号が低下し、ferucarbotran を十分集積したものと考えられた。放射線照射 7 日後、すべてのラットにおいて肝腫瘍は検出されず、放射線照射に反応して消失したと考えられた。 $T2^*$ 強調画像において、 RI_L 及び RI_R は、 0.23 ± 0.03 、 0.52 ± 0.03 であり、照射前と比べ、信号は上昇傾向にあった。また、放射線が照射された左葉では、右葉に比べ、有意に信号が低下していた ($P < 0.001$, Tukey test, 下図右上、矢印)。 $T2^*$ 緩和時間は左葉では $3.2 \pm 0.34 \text{ ms}$ に対し、右葉では $9.1 \pm 0.17 \text{ ms}$ であり、放射線が照射された左葉では、有意に短縮していた ($P < 0.05$)。一般的に、 $T2^*$ 緩和時間が短縮したり、プロトン密度が低下したりすると、 $T2^*$ 強調画像における信号は低下する。本実験においては、放射線を照射した肝左葉において、 $T2^*$ 緩和時間が短縮し、 $T2^*$ 強調画像において信号が低下したものと考えられた。

また、 $T2$ 強調画像において RI_L 、 RI_R は、 0.46 ± 0.06 、 0.56 ± 0.06 であり、照射前と比べ、上昇傾向にあった。なお、肝左葉、右葉間で有意差は認められなかった。



T2*強調画像では、放射線照射をした肝左葉にて、照射しなかった右葉に比べて有意な信号低下を認めたのに対し、T2 強調画像では、両葉の信号に有意差はなかった。T2*強調および T2 強調画像間の観測結果の違いは、肝臓の Kupffer 細胞に取り込まれた後の ferucarbotran の磁性の変化の違いや、MRI 撮影法の違いによって説明可能と考えられる。Ferucarbotran を含む SPIO 造影剤は、酸化鉄結晶による超常磁性効果によって、T2*緩和時間を短縮する。酸化鉄結晶が、鉄イオンに分解されると超常磁性効果は低下し、T2*緩和時間は短縮しない^{4,5}。本実験において、放射線照射した左葉では右葉に比べ、ferucarbotran に由来する酸化鉄結晶が多く残存し、T2*強調画像において信号が低下したと考えられた。また、MRI 撮影法の観点から、T2*強調画像の取得に用いたグラジエントエコー法は、T2 強調画像の取得に用いた高速スピンエコー法と比較して、超常磁性効果の検出に鋭敏であることがよく知られている。従って、T2 強調画像において、肝左葉、右葉より信号が低下傾向にあったものの、T2*強調画像ほど大きな信号差が検出されなかったと考えられる。

今回の検討において、臨床と同等の放射線照射量で、SPIO の洗い出し遅延現象が観測されることが明らかとなり、私達は、肝腫瘍症例の放射線治療例、特に SBRT により、少ない分割数で、高線量を、病変と周囲の肝組織（治療マージン）に照射するタイプの治療例で、将来、この方法が利用できる可能性があると考えている。放射線照射とは治療原理が異なるが、肝がんラジオ波焼灼術においては、SPIO の洗い出し遅延現象を利用した焼灼マージン評価が実現し、治療後の局所再発予測に役立つものと期待されている⁶。

また、SPIO の洗い出しに関する分子メカニズムや、放射線照射が洗い出しを阻害する原因に関して検討する必要がある。SPIO は、Kupffer 細胞 のライソゾームに集積し、翌日には鉄イオンに還元され始め、約 7 日間かけて徐々に細胞外へ排泄される。そこで、ライソゾーム膜上の酸化鉄分解や鉄イオンの移動に関連が深い分子（H⁺-ATPase、Nramp-1、DMT-1 等）や、Kupffer 細胞膜上に発現する、鉄排泄トランスポーター蛋白の ferroportin が、照射後の SPIO の洗い出し遅延や MRI の信号低下の持続に関与すると考えられる。現在、摘出した肝組織や培養マクロファージにおいて、鉄排泄に関与する分子の発現の調査に着手している。

【謝辞】本研究は、公益財団法人 がん研究振興財団 がん研究助成事業 第 48 回助成金による支援を受けて実施されました。ご支援に対し深く感謝致します。

【参考文献】

1. Furuta T, Yamaguchi M, Minami M, Ohtomo K, Fujii H. Persistent T2*-hypointensity of the liver parenchyma after irradiation to the SPIO-accumulated liver: An imaging marker for responses to radiotherapy in hepatic malignancies. J Magn Reson Imaging 2017; 45: 303-312.

2. Furuta T, Yamaguchi M, Nakagami R, Akahane M, Minami M, Ohtomo K. Delayed hepatic signal recovery on ferucarbotran-enhanced magnetic resonance images in a rat model with regional liver irradiation. *MAGMA* 2014; 27: 501-508.
3. Yamaguchi M, Mitsuda M, Ezawa K, Nakagami R, Furuta T, Sekine N, Niitsu M, Fujii H. Artifact-reduced simultaneous MRI of multiple rats with liver cancer using PROPELLER. *J Magn Reson Imaging* 2013; 38: 225-230.
4. Weissleder R, Stark DD, Engelstad BL, Bacon BR, Compton CC, White DL, Jacobs P, Lewis J. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol* 1989; 152: 167-173.
5. Nagai M, Yamaguchi M, Mori K, Furuta T, Ashino H, Kurosawa H, Kasahara H, Minami M, Fujii H. Magnetic resonance-based visualization of thermal ablative margins around hepatic tumors by means of systemic ferucarbotran administration before radiofrequency ablation: animal study to reveal the connection between excess iron deposition and T2*-weighted hypointensity in ablative margins. *Invest Radiol* 2015; 50: 376-383.
6. Mori K, Fukuda K, Asaoka H, Ueda T, Kunimatsu A, Okamoto Y, Nasu K, Fukunaga K, Morishita Y, Minami M. Radiofrequency ablation of the liver: determination of ablative margin at MR imaging with impaired clearance of ferucarbotran--feasibility study. *Radiology* 2009; 251: 557-565.