

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09959

研究課題名(和文) ナノメディシンを用いた温熱・免疫療法による腹膜播種の新規治療戦略

研究課題名(英文) Hyperthermia at the single-cell level for purging disseminated disease with immuno-magnetic nanoparticles

研究代表者

岸本 浩行 (KISHIMOTO, HIROYUKI)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50613155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：交流磁場焼灼療法は有望な癌治療の一つとして研究されているが、従来の腫瘍組織へ磁性粒子を直接注入して温熱治療をするという組織レベルの治療選択性ではなく、腹腔内などの播種性病変の治療にも応用できるように、交流磁場焼灼療法の治療選択性を個々の細胞レベルにまで向上させる。すなわち、癌細胞指向性を持たせた発熱効率の高い磁性ナノ粒子を遊離癌細胞ヘデリバリーし、エンドサイトーシスで細胞質内へ取り込ませ、磁場を印加して磁性ナノ粒子を癌細胞質内で発熱させて超選択的に癌細胞を焼灼死滅させるという、これまでに例がない治療コンセプトを検証し、治療に難渋する播種病変への応用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Hyperthermia using magnetic nanoparticles and alternating magnetic field has been investigated in the past two decades and is promising for cancer therapy. However, in most cases, magnetic nanoparticles are simply administered by direct injection into the tumor, and the modality just treats only a few space-occupying lesions so far. We hypothesized that if the MNPs were delivered cancer specifically at the cellular level, Hyperthermia using magnetic nanoparticles would have the potential to treat various sorts of disseminated cancer diseases. The aim of this study was to seek for the cancer specific delivery system of immuno-magnetic nanoparticles and to establish the cancer selective intracellular hyperthermia.

研究分野：消化器外科

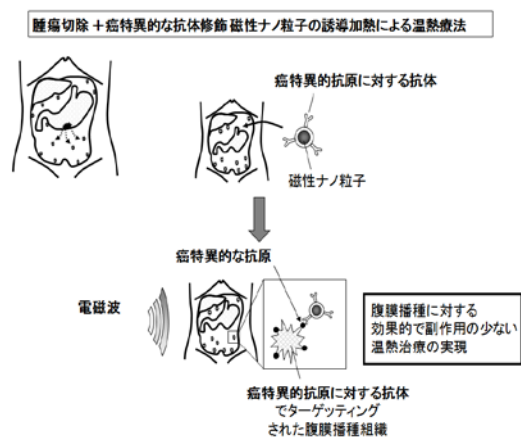
キーワード：温熱療法 磁性ナノ粒子 腹膜播種

### 1. 研究開始当初の背景

原発癌病巣から腹腔内に癌細胞がこぼれ落ちて広がる腹膜播種は、非治癒因子の一つで、その制御は治療成績の向上に必須である。欧米では消化器癌などの腹膜播種症例で、腫瘍組織だけでなく腫瘍細胞の着床部位となる腹膜も合併切除する腹膜全切除を伴う腫瘍減量手術と、温水と抗がん剤を腹腔内投与する腹腔内温熱化学療法併用の併用が積極的に行われ、有効性が報告されている。しかし、腫瘍減量手術は侵襲が高く重篤な合併症もまれではないため、日本での施行は極めて少ない。近年、癌細胞は正常細胞に比べ熱に弱いことを利用した「交流磁場焼灼療法」が注目されている。腫瘍周辺の正常組織にも熱損傷がおよぶ従来の温熱療法と異なり、磁性体ナノ粒子を癌組織に集積させ磁場印加により腫瘍を焼灼させる試みであるが、発熱効率の高い磁性体ナノ粒子をいかに腫瘍特異的に滞留させるかが鍵となる。本研究では、連携研究者である愛媛大学理工学研究科 青野教授により新開発された発熱能力の高いイットリウム鉄ガーネット ( $Y_3Fe_5O_{12}$ ) の磁性ナノ粒子を含む各種の磁性ナノ粒子を、癌細胞に特異的に発現している抗原に対する抗体で修飾し、それを腹腔内投与して播種癌細胞に特異的に結合させ、磁場印加により播種細胞の選択的な焼灼を目指す。侵襲性が高いがために敬遠されていた腫瘍減量手術の安全かつ有効な代替療法の提案を目的とする。

### 2. 研究の目的

消化器癌の治療成績向上に不可避である腹膜播種の克服を目的として、交流磁場焼灼療法と磁性体ナノ粒子に着目し、それらが細胞レベルでの温熱治療に応用可能かどうか検証する。癌特異的抗体で修飾した磁性ナノ粒子を細胞に投与し、細胞質内に磁性ナノ粒子をエンドサイトーシスで導入し、磁場印加で磁性ナノ粒子を細胞内で発熱させて癌細胞を選択的に焼灼死滅させるという、これまでに前例がない治療コンセプトを検証する。



### 3. 研究の方法

(1) 癌特異的抗体結合磁性ナノ粒子の作成と、修飾抗体を介する腫瘍への磁性ナノ粒子の

デリバリーの検証：

磁性ナノ粒子として、①新規磁性体イットリウム鉄ガーネット ( $Y_3Fe_5O_{12}$ ) の磁性ナノ粒子、②ポリエチレングリコール (PEG) で表面コーティングされた粒子径 10 nm のマグネタイト ( $Fe_3O_4$ )、③デキストランコーティングの粒子径 10 nm のマグネタイト、④オレイン酸コーティングの粒子径 10 nm のマグネタイト、で検討した。癌特異的抗原として HER2 抗原、それに対する抗体としてハーセプチンを使用した。各種コーティングの磁性ナノ粒子とハーセプチンの結合には、EDC/NHC カップリング反応を使用し、magnetic separation により磁性ナノ粒子を回収することにした。得られたハーセプチン結合磁性ナノ粒子は、in vitro で HER2 強発現癌細胞に投与し、癌細胞に磁性ナノ粒子をデリバリーと導入できるか検討した。

(2) 腫瘍特異的デリバリーの検証：

HER2 発現が陰性で、GFP で標識した正常線維芽細胞 (GFP-FEF3) と HER2 陽性乳癌細胞 (AU565) を共培養し、それらにハーセプチン結合磁性ナノ粒子 (デキストランコーティングされた粒子径 10 nm のマグネタイト) を散布し、腫瘍選択性を評価した。

(3) 細胞レベルでの温熱治療：

HER2 陽性乳癌細胞 (AU565) に、ハーセプチン結合磁性ナノ粒子 (オレイン酸コーティングされた粒子径 10 nm のマグネタイト) を 12 時間作用させ、癌細胞に接着できなかった余剰な鉄粒子は洗浄で除去して、280 kHz、350 A、(31 kA/m) で 20 分間、磁場印加した。48 時間後に XTT アッセイで細胞生存を評価した。対象として、何もしない群 (control)、磁性ナノ粒子のみを投与した群、磁場のみを印加した群を設定した。

(4) 腫瘍細胞特異的な温熱治療：

HER2 陰性の GFP 導入した正常線維芽細胞 (GFP-FEF3) と HER2 陽性乳癌細胞 (AU565) を共培養し、ハーセプチン結合磁性ナノ粒子 (オレイン酸コーティングされた粒子径 10 nm のマグネタイト) を 12 時間作用させ、280 kHz、350 A、(31 kA/m) で 20 分間、磁場印加した。その後、温熱治療による影響を経時的に顕微鏡観察で評価した。磁性ナノ粒子を投与せず、磁場も印加しないものを比較対象として設定した。

### 4. 研究成果

(1) 癌特異的抗体結合磁性ナノ粒子の作成と、修飾抗体を介する腫瘍への磁性ナノ粒子のデリバリーの検証：

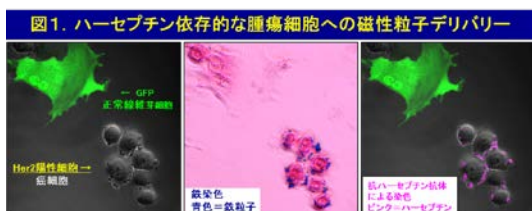
①新規磁性体イットリウム鉄ガーネット ( $Y_3Fe_5O_{12}$ ) の磁性ナノ粒子、②ポリエチレングリコール (PEG) コーティングの粒子径 10 nm のマグネタイト ( $Fe_3O_4$ )、③デキストランで表面コーティングされた粒子径 10 nm のマグ

ネタイト、④オレイン酸コーティングの粒子径 10 nm のマグネタイトで抗体結合が可能か検討した。イットリウム鉄ガーネットは凝集傾向が非常に強く細胞レベルでの投与に十分なだけ分散させることができず、使用を断念した。対して PEG コーティングの粒子径 10 nm のマグネタイトは分散性が強すぎて magnetic separation の回収効率が極めて低く使用を断念した。③デキストランコーティングの粒子径 10 nm のマグネタイトと④オレイン酸コーティングの粒子径 10 nm のマグネタイトはともに、粒子表面に官能基としてカルボキシル基がでており、抗体（ハーセプチン）のアミノ基と結合させる EDC/NHC カップリング反応を行った後に magnetic separation により磁性ナノ粒子を回収した。次に、in vitro で HER2 陽性癌細胞にハーセプチン結合磁性ナノ粒子を散布した。③デキストランコーティングと④オレイン酸コーティングのマグネタイト粒子はともに、12 時間後には、磁性ナノ粒子は細胞質内に取り込まれ核周囲に局在化するのが確認された。また、鉄染色された部位に一致して、ハーセプチンの存在も確認されたため、癌細胞特異的な抗体で磁性ナノ粒子を修飾することができた事、それにより癌細胞に磁性ナノ粒子を導入することが可能であることが示された。抗体の Fc 部分には共通の官能基があるため、ハーセプチンだけでなくすべての希望の抗体を結合することが可能である。



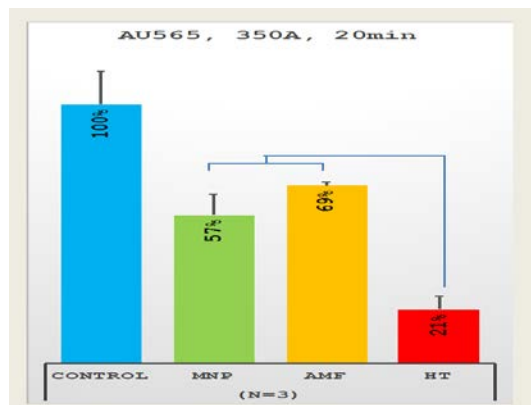
#### (2) 腫瘍特異的デリバリーの検証：

HER2 陰性の正常線維芽細胞 (GFP-FEF3) と HER2 陽性乳癌細胞 (AU565) を共培養し、ハーセプチン結合磁性ナノ粒子 (デキストランコーティングされた粒子径 10 nm のマグネタイト) を散布した。鉄染色をすると緑色の正常線維芽細胞には鉄粒子は見られず、癌細胞にのみ鉄粒子が見られた。また、鉄粒子の部位に一致してハーセプチンの存在も認められ、癌細胞選択的に磁性ナノ粒子をデリバリーできることを確認した。



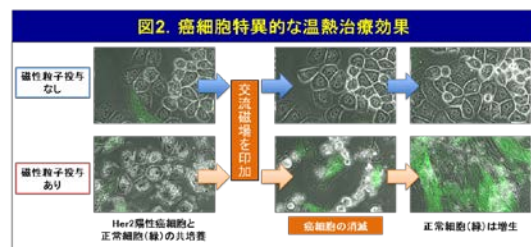
#### (3) 細胞レベルでの温熱治療：

HER2 陽性乳癌細胞 (AU565) に、ハーセプチン結合磁性ナノ粒子 (オレイン酸コーティングされた粒子径 10 nm のマグネタイト) を 12 時間作用させ、280 kHz、350 A、(31 kA/m) で 20 分間、磁場印加した。磁場印加の 48 時間後に XTT アッセイで細胞生存を評価すると、磁性ナノ粒子を投与して磁場を印加した群では、磁性ナノ粒子のみ投与した群や、磁場だけを印加した群に比べて優位に細胞障害が認められた。



#### (4) 腫瘍細胞特異的な温熱治療：

HER2 陰性の線維芽細胞と HER2 陽性癌細胞を共培養した状況で、ハーセプチン結合磁性ナノ粒子 (オレイン酸コーティングされた粒子径 10 nm のマグネタイト) を投与して、280 kHz、350 A、(31 kA/m) で 20 分間、磁場を印加すると、磁場印加後 24 時間で癌細胞は水疱状となり破裂し、最終的に線維芽細胞により置換された。癌特異的な抗体で修飾した磁性ナノ粒子を癌細胞に投与し、磁場印加で磁性ナノ粒子を細胞内で発熱させて癌細胞を選択的に焼灼死滅させるという、治療コンセプトが in vitro で示された。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)  
該当なし

〔学会発表〕（計 3 件）

①香川哲也、岸本浩行、松三雄騎、田澤大、大原利章、永坂岳司、香川俊輔、藤原俊義、抗体結合磁性ナノ粒子による温熱療法－癌播種病変への治療応用へ向けて－、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 29 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

②Tetsuya Kagawa, Hiroyuki Kishimoto, Toshiaki Ohara, Hiroshi Tazawa, Shunsuke Kagawa, Takeshi Nagasaka, Satoshi Nohara, Ichiro Kato, Adarsh Sandhu, Hiromichi Aono, Toshiyoshi Fujiwara: Hyperthermia at the single-cell level for disseminated cancer disease with immunomagnetic nanoparticles  
第 108 回 AACR、2017 年 4 月 4 日、ワシントン DC（アメリカ）

③香川哲也、岸本浩行、田澤大、大原利章、永坂岳司、香川俊輔、藤原俊義、抗体結合磁性ナノ粒子による腫瘍選択的な細胞内温熱療法の開発、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岸本 浩行 (KISHIMOTO Hiroyuki)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：50613155

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

青野宏通 (MICHIIHIRO Aono)  
愛媛大学・理工学研究科・教授  
研究者番号：00184052

### (4) 研究協力者

該当なし