

令和元年6月11日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21516

研究課題名(和文)高度制御マイクロ波の非熱照射による難治性癌治療システムのための基礎的研究

研究課題名(英文)A fundamental study on development of refractory cancer therapy system by precise controlled microwave normothermic irradiation.

研究代表者

浅野 麻実子(Asano, Mamiko)

京都大学・生存圏研究所・研究員

研究者番号：20582133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ波は、生体を非侵襲に透過し、医療では癌細胞を高温死滅する目的で使用されている。特殊な加熱機構を有するマイクロ波加熱では、多くの化学反応が熱伝導加熱よりも低温かつ短時間で進行する。そのため、生体でも同様の現象が推測されるが、そのメカニズムの多くは未解明である。我々は、本メカニズムを解析・制御することで、現行の治療法よりも低温で癌細胞を死滅させると考えた。そこで、マイクロ波を培養細胞に対して精密に照射可能な装置を開発した。また本装置を用いて、種々の培養癌細胞が死滅することを明らかにした。更に、ヒト骨髄性白血病由来HL-60細胞の死滅メカニズムについて解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、新しい癌治療システムの構築のための基礎研究である。本治療システムは、腫瘍の高温化を必須としないのが特徴である。このため侵襲性が少なく、現在適用不可である脳腫瘍等の難治性癌や全身照射による転移癌への適用も期待できる。また抗癌剤投与量を最小限にすることで副作用は低減し、患者のQOLは格段に向上する。また治療機器は低コストで開発・販売・維持ができ、操作に高度な技術や特別の設備を必要としない。つまり、本システムでの治療経費は極めて低く、医療経済面でも大きく社会貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Microwaves, a type of electromagnetic wave, can efficiently generate heat in target substances. Microwaves have been utilized in cancer therapies as a tool for heating cancer cells to a high temperature. Recently, it has become possible to irradiate microwaves to substances with precise control of temperature, output and frequency. In this study, we induced cancer cell death using normothermic conditioned microwave irradiation, wherein the temperature of cancer cells was maintained at 37°C. And we also analyzed the mechanism of the cell death by our microwave irradiation methods. If this could be applied as a cancer therapy, the treatment efficacy would be improved, and heat-related side effects would be avoided.

研究分野：生体医工学

キーワード：マイクロ波癌治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ波は電磁波の一種であり、熱発生効率の良さが特徴である。医療では、癌治療にて腫瘍を高温にするツールとして使用されてきた。その経緯から、これまでのマイクロ波癌治療は、高温に観点を置いた発展しかしてこなかった。一方で近年、マイクロ波の特殊な加熱機構（スーパーヒーティング・内部加熱・選択加熱等）により、様々な化学反応が通常加熱での反応温度よりも低温で制御できることがわかってきた。また臨床現場では、体温に近い低温条件下でのマイクロ波の非熱照射により、癌細胞の酵素失活等の機能変化や（*Pathol. Int.*, 59(5): p294-299, 2009.）抗癌剤併用効果の増大が確認されており（*J. Integr. Oncol.*, 3(1): p115, 2014.）マイクロ波加熱との関連が示唆されている。我々は、これらのマイクロ波独自の加熱機構がもたらす癌細胞への影響を詳細に解析・制御できれば、副作用を低減し、治療効率を増大した新しい癌治療システムに応用できると考えた。

2. 研究の目的

マイクロ波高度制御による新しい癌治療システムを構築するためには、第一段階としてマイクロ波照射が癌細胞に与える影響を細かく解析する必要がある。しかし、世界的に主流のマグネトロン発振器では、周波数や出力、温度上昇の微弱制御ができないため、細胞に照射されるマイクロ波の周波数や出力、温度を一定に保つことが不可能である。そこで我々は、半導体発振器を搭載したアプリケーションを開発し、これらの問題を克服した。また本装置を用いて培養細胞へのマイクロ波による死滅効果を確認した。更に、その死滅メカニズムを併せて確認した。

3. 研究の方法

(1) 細胞用マイクロ波照射装置の開発

細胞用マイクロ波照射装置として、2.45GHz 半導体発振器を導入したアプリケーションを開発した（図1）。出力の微弱制御が可能な半導体発振器とアプリケーションにより、細胞を培養温度である 37°C 条件下で一定に保つことができる。アプリケーション内のシャーレ設置場所の下部には赤外線温度センサーがあり、シャーレ底面の温度をモニターしている。本装置では、この温度が 37°C を維持した状態となるようマイクロ波を照射することができる。このとき、アプリケーション内の温度を冷却することで、37°C に維持した状態でも出力を変動することができる。

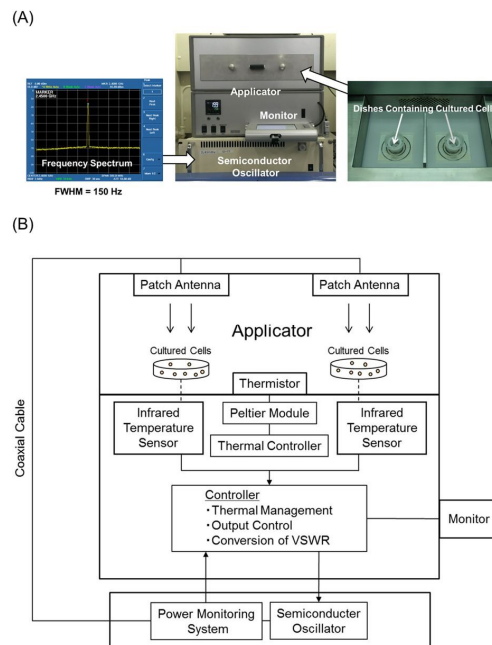


図1：細胞用マイクロ波照射装置の概要（雑誌論文2のFigure 5より抜粋）

(2) マイクロ波照射による培養細胞の生存率と誘電特性との比較解析

培養細胞として、ヒト骨髄性白血病株（HL-60）ヒト乳癌細胞株（MCF-7, MDA-MB-231）ヒト乳腺上皮細胞株（MCF-12A）ヒト胃癌細胞株（HGC-27, KATO III）ヒト膵臓腺癌細胞株（Panc-1）及びヒト神経膠芽腫細胞株（T98G）を用い、マイクロ波照射下での細胞生存率を測定した。照射条件は、(1)の装置のアプリケーションを 10°C に冷却した状態で、赤外線温度センサーが 37°C となるようにマイクロ波を 1 時間照射した。更に、一般的な細胞の死滅温度である 42.5°C にて 1 時間静置した群を比較対象とした。また、ネットワークアナライザー（N5242A, Agilent Technologies Inc.）を用いて、細胞培養液や細胞、培地の比誘電率、誘電損失を測定した。

(3) マイクロ波照射における HL-60 細胞の細胞死経路の解析

(2)の検討にて、マイクロ波照射により最も生存率の低下した HL-60 細胞を用いて、その

細胞死経路を解析した。HL-60 細胞に対して、(1)の装置のアプリケーターを 12°C に冷却した状態で、赤外線温度センサーが 37°C となるようにマイクロ波を 1 時間照射した。その後、アポトーシス解析として、ミトコンドリア傷害や誘引因子の解析、カスパーゼ群の活性評価、DNA 断片化の確認及び熱ストレス応答について解析を行った。

(4) 癌幹細胞様細胞との関連

ヒト乳癌由来 MDA-MB-231 細胞を用いて、マイクロ波が癌幹細胞様細胞に与える影響を解析した。(1)の装置のアプリケーターを 10°C に冷却した状態で、赤外線温度センサーが 37°C となるようにマイクロ波を 1-3 時間照射し、CD44 及び 24 の割合及び Propidium Iodide (PI) を用いて死滅細胞の割合を測定した。また、細胞の浸潤、遊走能についても検討した。

(5) In vivo 用マイクロ波照射装置の開発

産業技術総合研究所の協力により、in vivo 用マイクロ波照射装置の開発を行った。本装置のマイクロ波照射部には、セミリジッドケーブルを採用した。これを平滑に切断して開放反射端を作製し、ここから外部に出るマイクロ波を試料に照射する仕組みとした。セミリジッドケーブルは、導波管と異なり遮断周波数がないため、幅広い周波数帯にてマイクロ波照射を行うことが可能である一方で、照射範囲が限局されるといった欠点もある。そこで、細胞培養実験にて汎用されている 96 well plate を用いて、本装置を用いたマイクロ波加熱の温度分布測定を行った。

4. 研究成果

(2) マイクロ波照射による培養細胞の生存率と誘電特性との比較解析

上記の培養細胞にマイクロ波を照射したところ、正常細胞である MCF-12A 以外の培養細胞にてその生存率が有意に低下した(図2)。一方で、比誘電率及び誘電損失は、細胞培養液や細胞、培地の種類に関わらず有意差が見られなかった。以上から、細胞間ではマイクロ波の吸収能に有意差がないことが示唆された。つまり、細胞ごとにマイクロ波による生存率の違いが見られる理由は、細胞の種類ごとにマイクロ波の感受性が異なるためと推測される。

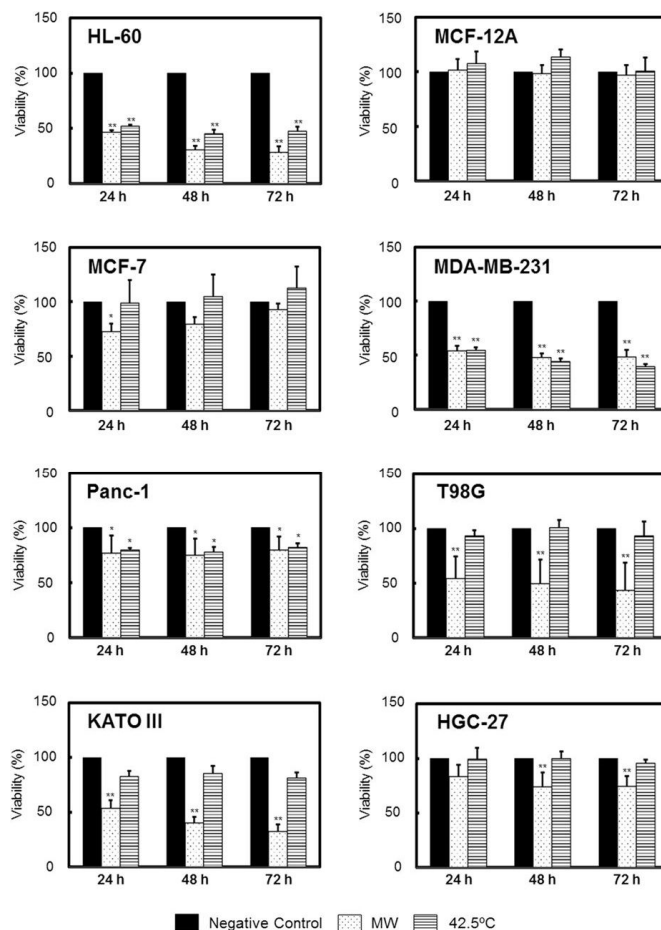


図2：種々の培養細胞のマイクロ波照射による細胞生存率の変動(雑誌論文2のFigure 1より抜粋)

(3) マイクロ波照射におけるHL-60細胞の細胞死経路の解析

マイクロ波照射によるHL-60細胞のアポトーシス経路を解析した(図3)。マイクロ波を照射した細胞では、Heat shock protein 70 (HSP70)の活性化が起きず、アポトーシス促進因子の発

現誘導が起きた。その結果、ミトコンドリア膜電位差が消失し、Apoptosis-inducing factor (AIF) がミトコンドリアからサイトゾルへと漏出、DNA の断片化が経時的に確認された(カスパーゼ非依存的アポトーシス)。更に、シトクロム C もミトコンドリアからサイトゾルへ漏出した。サイトゾル内のシトクロム C は、Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) と Caspase 9 と結合して Apoptosome と呼ばれる複合体を形成し、Caspase 9 及び 3、7 を順次活性化することでアポトーシスを誘導する(カスパーゼ依存的アポトーシス)。興味深いことに、マイクロ波照射では Apaf-1 と Caspase 9 はサイトゾル内に存在せず、Apoptosome が形成されていないことが示唆された。その結果、Caspase 3 及び 7 の活性は有意に上昇せず、結果として「カスパーゼ依存的アポトーシス」は起こらなかった。またマイクロ波照射では、Second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) がミトコンドリアからサイトゾルへ漏出した。Smac は、X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) の働きを抑制することで、Apoptosome の形成を促進するが、Apaf-1 と Caspase 9 の消失に伴い、機能していないと示唆された。つまり、マイクロ波が誘導する細胞死は「カスパーゼ非依存的アポトーシス」が主な経路であった。一方で、高温ストレス処理である 42.5°C 静置群では HSP70 が活性化したことで、アポトーシス促進因子の発現が阻害され、ミトコンドリア傷害が起きなかった。このときの主な細胞死経路は、Caspase 3 及び 7 の活性化を伴う Death Receptor 経路であると示唆された。

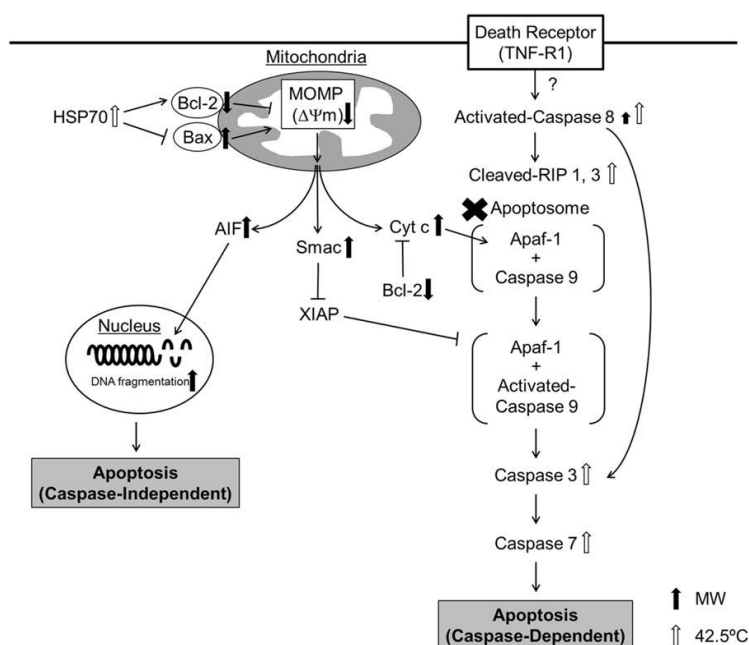


図 3：HL-60 細胞におけるマイクロ波照射での細胞死経路（雑誌論文 1 の Figure 6 より抜粋）

(4) 癌幹細胞様細胞との関連

MDA-MB-231 細胞にマイクロ波照射を行ったところ、癌幹細胞様細胞と定義されている CD44⁺/CD24⁻ 細胞の細胞数の低下が確認された。またマイクロ波照射により、細胞の接着、浸潤及び遊走能の有意な低下、matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) の活性上昇が確認された。

(5) In vivo 用マイクロ波照射装置の開発

96 well plate の底面にセミリジッドケーブルの先端を固定し、周波数 2.45 GHz のマイクロ波を照射した。この時、96 well plate 内には buffer を添加した。温度はサーモカメラを用いて、96 well plate の上面及び側面部より温度測定を行った。その結果、出力が 5W 照射時の上面及び側面部の温度は、10 分経過後に 40 °C 付近にてプラトーとなった。一方で出力が 7.8W での照射では、照射後まもなく上面と側面部の温度に有意な差が生じ、10 分経過後では 10 °C 以上の温度差が生じた。以上から、in vivo にてマイクロ波を照射する場合、セミリジッドケーブルの穿刺部周辺と外側にてマイクロ波の吸収効率が異なり、数 mm 単位で温度が大幅に異なることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- 1) *Asano M., Tanaka S., Sakaguchi M., Matsumura H., Yamaguchi T., Fujita Y., Tabuse K., Normothermic microwave irradiation induces death of HL-60 cells through heat-independent apoptosis., *Sci. Rep.*, 査読あり, 7(1), pp11406, 2017.
- 2) *Asano M., Sakaguchi M., Tanaka S., Kashimura K., Mitani T., Kawase M., Matsumura H.,

Yamaguchi T., Fujita Y., Tabuse K., Effects of normothermic conditioned microwave irradiation on cultured cells using an irradiation system with semiconductor oscillator and thermo-regulatory applicator., *Sci. Rep.*, 査読あり, 7, pp41244, 2017.

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 浅野麻実子, 「生命科学・医療分野でのマイクロ波利用におけるヒヤリハット事例」JEMEA ショートコース, 北九州, 2018 年 11 月
- 2) 浅野麻実子, 「培養温度でのマイクロ波照射による癌細胞死誘導メカニズムの解析」熊本大学パルスパワー科学研究所 第 37 回 IPPS セミナー, 熊本, 2018 年 2 月
- 3) 浅野麻実子, 「マイクロ波の非熱照射による新規癌治療法構築のための基礎的研究」京都大学生存圏研究所 第 335 回生存圏シンポジウム 生存圏ミッションシンポジウム, 京都, 2017 年 2 月
- 4) 浅野麻実子, 田中智, 坂口実, 三谷友彦, 櫻村京一郎, 山口敬子, 松村人志, 藤田芳一, 田伏克惇, 「マイクロ波非熱照射による癌細胞死メカニズムの解析」第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2016 年 10 月
- 5) 浅野麻実子, 田中 智, 坂口 実, 山口敬子, 藤田芳一, 松村人志, 田伏克惇, 「マイクロ波の非熱照射がヒト乳腺癌由来細胞に与える影響」第 10 回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム, 仙台, 2016 年 10 月
- 6) 浅野麻実子, 櫻村京一郎, 三谷友彦, 川瀬雅也, 仲谷博文, 山口敬子, 藤田芳一, 松村人志, 田伏克惇「有限要素法によるマイクロ波加熱下での HL-60 の電磁界及び温度分布挙動」第 9 回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム, 東京, 2015 年 11 月
- 7) 浅野麻実子, 川瀬雅也, 櫻村京一郎, 三谷友彦, 坂口 実, 田中 智, 高岡 昌徳, 山口敬子, 藤田芳一, 松村人志, 田伏克惇「低温でのマイクロ波照射下での細胞の誘電率と生存率の関係」第 9 回日本電磁波エネルギー応用学会シンポジウム, 東京, 2015 年 11 月
- 8) 浅野麻実子, 「マイクロ波の低温照射が癌細胞に与える影響」京都大学生存圏研究所 第 298 回生存圏シンポジウム, 京都, 2015 年 11 月
- 9) 浅野麻実子「マイクロ波低温照射による癌治療の可能性」Microwave Workshop& Exhibition (MWE) 2015, 横浜, 2015 年 11 月
- 10) 浅野麻実子, 川瀬雅也, 坂口実, 田中智, 仲谷博文, 尾崎敬, 山口敬子, 高岡昌徳, 藤田芳一, 松村人志, 田伏克惇「マイクロ波の非熱性効果が種々の培養癌細胞に与える影響」第 34 回 microwave surgery 研究会, 東京, 2015 年 9 月

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 浅野麻実子, マイクロ波低温照射による癌治療の可能性, マイクロ波加熱の基礎と産業応用事例, 第 2 部, 第 5 章 医療、薬品分野への応用, 4 節, 291-295 (2017).
- 2) 浅野麻実子, 田伏克惇, マイクロ波医療により生まれた新たな癌細胞死, 最新 マイクロ波エネルギーと応用技術, 第 7 章, 4.6 マイクロ波医療 (癌細胞死), 828-831 (2014).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 杉山順一

ローマ字氏名: Jun-ichi Sugiyama

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。