

令和元年9月5日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10702

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫に対する新規強磁性体温熱療法とmTOR阻害剤の併用療法の開発

研究課題名(英文) Combined treatment of hyperthermia therapy using novel ferromagnet and mTOR inhibitor for malignant pleural mesothelioma

研究代表者

田村 昌也 (TAMURA, MASAYA)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：10397185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：共同研究施設より貸与をうけた磁性流体を用い、細胞への磁性流体への取り込みを確認する実験を追加して行った。細胞株211Hに磁性流体を添付した溶液を遠心分離し、その上清、細胞の各々のFe含有量をICP-MS法にて測定した。細胞成分にFeの取り込みが確認できた。小型動物を加熱する加熱器を本学工学部と作成し、小型動物(ヌードマウス：250g)の加熱実験を行った。腹部皮下に1mlの磁性流体を注入し、加熱を行った。2-5分で42-43の温度上昇を得た。5匹に実験を施行し、全例加熱後も生存を確認した。明らかな有害事象はなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性悪性腫瘍の一つである悪性胸膜中皮腫に対しての新たな治療法の開発が急務である。本腫瘍に対して、mTORを標的とした治療は、わずかな報告が認められるのみであり、磁性流体を用いた温熱療法についての研究はない。本研究は従来の磁性流体の弱点を改善した新規強磁性ナノ粒子を用いた温熱療法とmTOR阻害剤を併用した治療法を開発するという点に学術的な特色と独創性があり、難治性腫瘍である悪性胸膜中皮腫の治療に大きなブレイクスルーとなりことが予想される。

研究成果の概要(英文)：Using the magnetic fluid loaned from the collaborative research facility, experiments were performed to confirm uptake into the magnetic fluid into cells. The magnetic fluid was attached to the cell line 211H, the solution after 24 hours was centrifuged, and the Fe content of each of the supernatant and the cells was measured by ICP-MS methods. The uptake of Fe was confirmed in the cellular components. A small-sized heater for small animals, such as mouse, rat was created. Using this, a heating experiment of a small animals (nude mouse: 250g) was performed. The 1ml magnetic fluid was injected into abdomen subcutaneously. A temperature rise of 42-43 was obtained in 2 to 5 minutes. The experiment was conducted on 5 animals and survival was confirmed after heating in all cases. No obvious adverse events such as skin burns were identified.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 温熱療法 化学療法

1・研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト関連腫瘍であり、悪性度が高く各種治療法に対して抵抗性である。本邦においても 2010 年から 2040 年にかけて患者の急激な増加が見込まれている。局所浸潤傾向が強く、放射線化学療法に対して抵抗性である。外科的治療が治療の根幹をなすが、体に与える侵襲の大きさと良好な予後が期待し難く、実際のところ標準治療といえる治療法は確立しておらず新たな治療法の開発が急務である。

電磁誘導温熱治療とは、磁性体ナノ粒子を生体内の癌細胞に取り込ませ、外部から交流磁場を印加することで磁性体ナノ粒子を発熱させ、癌細胞を死滅させる癌治療法である。本治療法は理論上癌細胞の特異的な加熱が可能であり、正常細胞への影響が少ないという利点を有する。しかし癌細胞に対して特異的に十分量の磁性体を集積する技術も未だ改良の余地があり、既存の磁性体粒子では十分な発熱量が得られず、他癌に関しても未だ実用化には至っていない。悪性胸膜中皮腫に対する温熱療法については胸膜播種を来した肺癌や胸膜中皮腫に対して、肺全摘術を行った後に抗がん剤の胸腔内投与と高周波温熱療法を使用した胸腔内温熱化学療法を施行した報告(Kodama. *Int J Hyperthermia* 29(7): 653, 2013) があるものの、電磁誘導温熱療法の報告はない。

2・研究の目的

悪性胸膜中皮腫小動物モデル(皮下腫瘍モデル、肺全摘胸腔内腫瘍モデル)を用いて以下のことを明らかにする。

- 1) mTOR 阻害剤による in vivo での評価
- 2) 磁性ナノ粒子を用いた温熱療法の治療効果について評価
- 3) 両者の併用療法の治療効果について検証する。

3・研究の方法

1・悪性胸膜中皮腫動物モデルの作成

治療法の効果を検証するためのモデルとしてT細胞機能欠如マウスモデル(BACB/CA/NJcl-nu/nu, 日本クレア株式会社)(週齢4-6週)を用い、皮下腫瘍モデルを作成する。100 μ lのMediumに 1×10^6 個に調整したSPC111溶液をマウス側腹部皮下に投与する。腫瘍サイズ=0.5 \times (長径 + 短径)が6mmになった時点のマウスを各実験に用いる。

2・誘導加温発熱実験

上記1・で作成した動物モデルを用いて下記の実験を行う。本研究項目は筑波大学数理物質科学(喜多英治教授)との共同研究で行う。以下の実験A,Bは筑波大学より提供された磁性ナノ粒子と、電磁誘導加温器を用いて同大学の設備、施設を使用して行う実験を進める予定である。

A・磁性流体投与方法の検討

本実験では腫瘍への直接投与でのデータ集積を目標とする。

- 1) Fe 換算で 12mg/ml 濃度の磁性ナノ粒子、1ml を腫瘍に直接投与を行い、2, 12, 24, 48 時間

後に剖検し、腫瘍細胞内への取り込みを顕微鏡を用いて評価する。(各 n=3) (癌細胞内への粒子の貪食が最高になる時間 = A を評価する)

- 磁性ナノ粒子を 0.1, 0.5, 1, 2, 5ml (各 n=5) 投与し、上記時間 A にて誘導加温を施行し、誘導加温実験を施行する。ラットの生存を確認し、以降の実験における適正な磁性流体の投与量(B)、誘導加温開始時間(A)を設定する。

B・誘導加温

磁性流体投与量 (B) を投与してからA時間後に43℃以上20分の誘導加温を行う。温度測定はラット胸部を剃毛した後、非接触式サーモグラフィによる体表温度測定とし、加温時の温度曲線を得る。腫瘍部と直腸における温度を測定、記録する。

平成 29 年度以降は mTOR 阻害剤および誘導加温治療との併用による治療効果について検討する。前年度の実験にて安全性、ならびに治療効果が確認された CCI-779、磁性流体の濃度、投与量にて、両治療ならびに両者併用療法の安全性、治療効果について検討する。(田村、喜多)

- . コントロール(n=8)
- . CCI-779 のみ(n=8) (上記 2, a-b のうち効果が高かった投与量にて施行する)
- . 磁性流体のみ (n=8) (上記 3, 投与時間 A、投与量 B にて施行する)
- . CCI-779 + 磁性流体 (n=8)

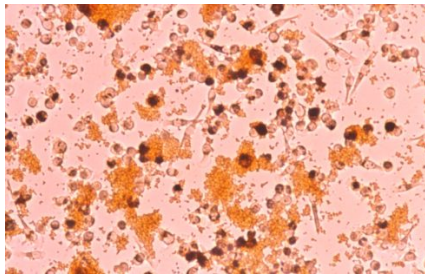
上記検討と並行して下記方法にて胸腔内腫瘍モデル作成を試みる。治療に対するより高い耐術能を期待し、マウスではなくラットモデル作成を行う。

4・研究成果

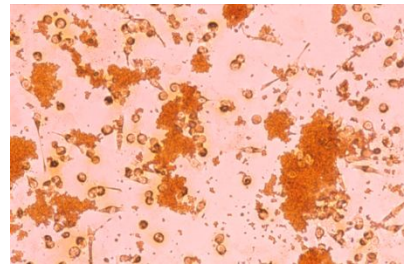
H28 年度 H29 年度にかけては、

In Vitro の実験を中心に行った。細胞株 211H に磁性流体を添付した溶液を遠心分離し、その上清、細胞の各々の Fe 含有量を ICP-MS 法にて測定した。細胞成分に Fe の取り込みが確認できた。悪性胸膜中皮腫細胞株 (211H, H226) に 4 種に対して、共同研究施設である筑波大学より貸与をうけた磁性流体を添付し、細胞への磁性流体への取り込みを確認する実験)の例数を追加して行った。やはり 211H において高率に磁性流体の細胞内への取り込みを確認した。一方、H226 には磁性流体の細胞への取り込みはほとんど確認できなかった。細胞の種類により、取り込みに差がみられることが確認できた。さらに、211H に磁性流体を添付し 24 時間経過した溶液を遠心分離し、その上清、細胞の各々の Fe 含有量を ICP-MS 法にて測定した。細胞成分に Fe の取り込みが確認できた。これも例数を追加して確認を行った。

筑波大学にある電磁誘導加温装置の貸与、搬送が未だ実現していないため、本学工学部(もともとの加温装置の開発に携わった)で残存する簡易式の加温器を用いて、新規磁性流体を用いて加温実験を行ったが、治療に有効と考えられる 42-43℃までの発熱は得られなかった。



<1mg/ml>



<0.04mg/ml>

図 1 : 磁性流体の癌細胞への取り込み

H30 年度は

共同研究施設より貸与をうけた磁性流体を用い、細胞への磁性流体への取り込みを確認する実験を追加して行った。小型動物を加熱する加熱器を本学工学部と作成し、小型動物(ヌードマウス: 250g)の加熱実験を行った。腹部皮下に1mlの磁性流体を注入し、加熱を行った。2~5分で40-42の温度上昇を得た(直腸温は36~38)。5匹に実験を施行し、全例加熱後も生存を確認した。明らかな有害事象は認めなかった。

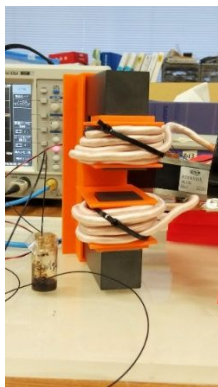


図 2 : 新規開発した小型動物用加熱器

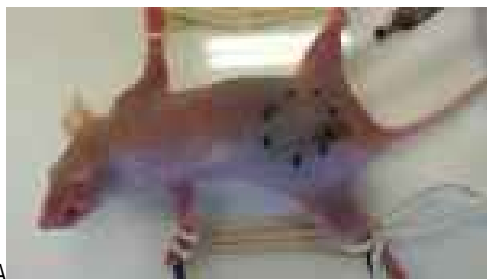


図 3A
皮下に磁性流体を注入



図 3B : 温度測定

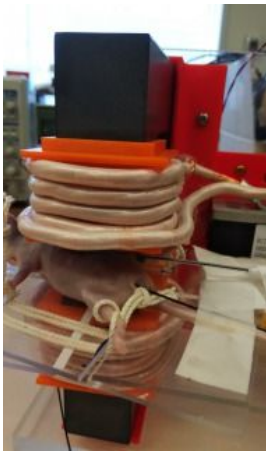


図 3C : 小型加熱器を用いた加熱実験

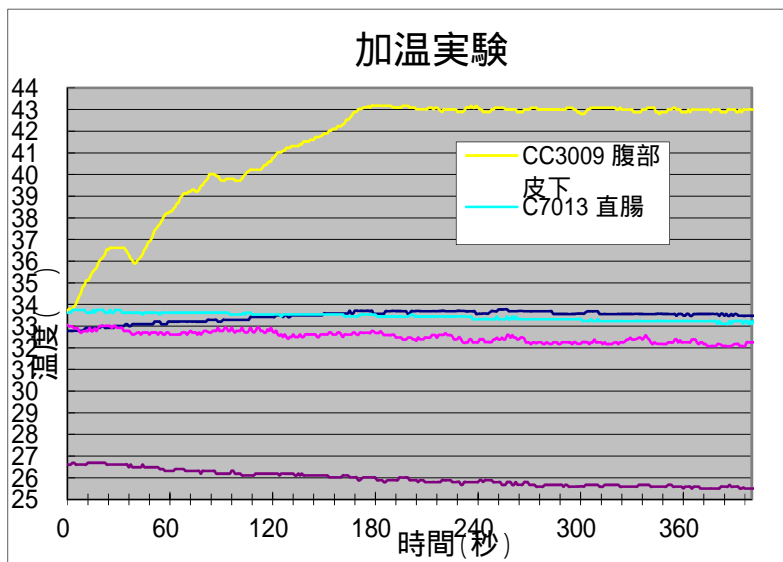


図 4 : 加熱実験結果

5・主な発表論文等

現在のところなし

6・研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：竹村博文 20242521

ローマ字氏名：Hirofumi Takemura

所属研究機関名：金沢大学附属病院

部局名：先進総合外科

職名：教授

研究分担者氏名：高田宗尚 20459514

ローマ字氏名：Munehisa Takata

所属研究機関名：金沢大学附属病院

部局名：先進総合外科

職名：助教

研究分担者氏名：矢野聖二 30294672

ローマ字氏名：Seiji Yano

所属研究機関名：金沢大学附属病院

部局名：がんセンター

職名：教授

研究分担者氏名：喜多英治 80134203

ローマ字氏名：Eiji Kita

所属研究機関名：茨城工業高等専門学校

職名：校長

研究分担者氏名：松本 勲 80361989

ローマ字氏名：Isao Matsumoto

所属研究機関名：金沢大学附属病院

部局名：先進総合外科

職名：准教授