

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16807

研究課題名（和文）浸潤性膀胱がんに対する磁性ナノ粒子と免疫治療を用いた新しい治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new therapeutic method using magnetic nanoparticles and immunotherapy for invasive bladder cancer

研究代表者

小林 大地 (Kobayashi, Daichi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：80570704

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：【目的】ヒト膀胱癌に対するMCLの至適吸着条件およびヒト膀胱癌における加温による免疫誘導の状態を*in vitro*で検討した。【方法】（研究1）ヒト膀胱癌細胞株BC31、T24の培養液にMCLを添加し走査型および透過型電子顕微鏡で観察した。（研究2）ヒト膀胱癌細胞株BC31、T24およびRT4を加温してPD-L1の発現およびapoptosisの発現を検討した。【研究成果】（研究1）BC31、T24の細胞表面にMCLがびまん性に付着が確認できた。エンドサイトーシスによる細胞内への取り込みが確認できた。研究2）BC31、T24、RT4のいずれにおいてもPD-L1の発現は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MCLと交流磁場を用いた温熱治療を膀胱癌に用いるときは、MCLの投与経路はMCL水溶液の膀胱内注入となる。本研究により、この投与経路でもMCLが膀胱癌細胞に吸着し、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが可能であることが示された。筋層非浸潤膀胱癌(NMIBT)が再発を繰り返すと浸潤性膀胱癌(MIBT)になる。NMIBTの再発予防が重要であるが、標準予防法としてのBCG膀胱注療法も副作用が強く、40%は抵抗性となる。本研究により新しいNMIBTの再発予防治療法の開発、つまりMIBTの予防法確立のための基礎データを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：[Objective] The optimal adsorption conditions of MCL for human bladder cancer and the state of immune induction by heating in human bladder cancer were investigated *in vitro*. [Method] (Study 1) MCL was added to the culture solution of human bladder cancer cell lines BC31 and T24, and the cells were observed with a scanning electron microscope and a transmission electron microscope. (Study 2) Human bladder cancer cell lines BC31, T24 and RT4 were heated to examine the expression of PD-L1 and apoptosis. [Research Results] (Research 1) Diffuse adhesion of MCL was confirmed on the cell surfaces of BC31 and T24. Uptake into cells by endocytosis was confirmed. Study 2) Expression of PD-L1 was not observed in BC31, T24, or RT4.

研究分野：泌尿器腫瘍学

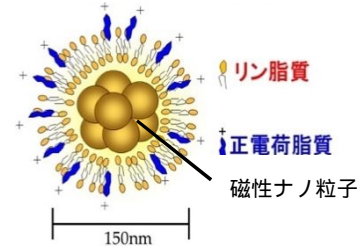
キーワード：癌温熱治療 膀胱癌 磁性ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

温熱治療はがんに対する治療法、あるいは放射線や抗がん剤の効果を高める補助療法として世界的に注目され、1980年代から各国で盛んに行われるようになった。しかし、人体内の病巣を限局性に一定の温度の加温できる精度と信頼性の高い装置が開発されないことから、1990年以降、次第に温熱療法は勢いがなくなってきた。本邦で唯一薬事承認されたがん温熱治療器は電極で患部を挟み込み 8MHz の交流電流で加温するメカニズムである(サーモトン RF-8)。体外から電流(周波数としてはラジオ波帯)を流し、体組織のわずかなラジオ波の吸収の違いを利用して加熱しているため、体表面や正常組織も加温され、癌を死滅させるほど加温することが難しく、癌治療の第一選択とはなっていない。

私たちは従来の温熱治療の欠点を克服するために、磁性のある酸化鉄微粒子(Fe_3O_4 、マグネタイト)を正電荷のリン脂質に埋め込んだ脂質マグネタイト粒子(Magnetic Cationic Liposome:MCL) (図1)を発熱体として交流磁場照射による癌温熱治療の研究を続けてきた。この治療法では MCL を腫瘍組織に注入し、MCL のみが発熱する周波数で交流磁場発生装置によって出力を調整して磁場照射することで腫瘍組織のみを選択的に自在に加熱できる革新的ながん温熱治療である。泌尿器科医として主に前立腺癌を対象とし研究を続けてきた。今回、もう一つの泌尿器科腫瘍の代表である膀胱癌治療への応用も検討した。尿をためる中空臓器である膀胱は、内壁は粘膜で覆われ、その粘膜から癌が発生する。従って膀胱癌に対し MCL と交流磁場を用いて温熱治療を行う場合は、尿という液体に接している膀胱粘膜への MCL の付着の程度が重要となる。また温熱免疫の発現も大事な点である。

図1 脂質マグネタイト



2. 研究の目的

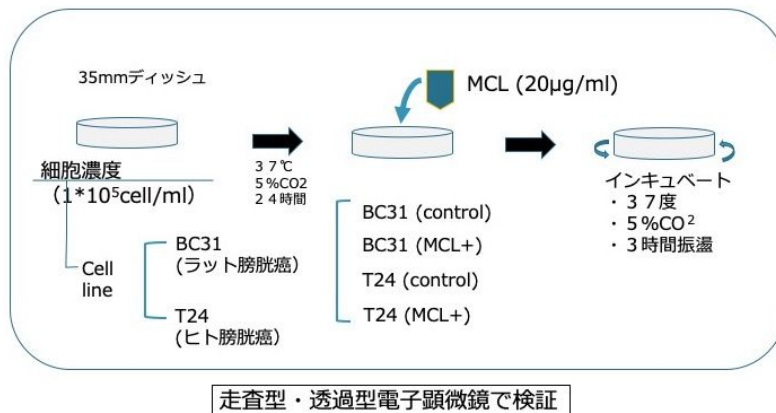
ヒト膀胱癌に対する MCL の至適吸着条件およびヒト膀胱癌における加温による免疫誘導の状態を *in vitro* で検討した。

3. 研究の方法

(研究1) ヒト膀胱癌細胞株 BC31、T24 の培養液に MCL (20 μ g/ml) を添加。37 $^{\circ}$ C で 3 時間震盪培養後、細胞を走査型(SEM)および透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。

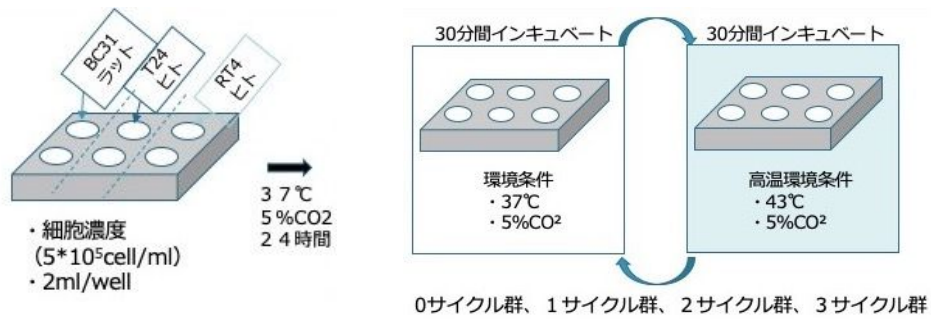
研究方法のシエーマ

1) 膀胱がん細胞株に対してMCLの吸着・取り込み状況



(研究2) ヒト膀胱癌細胞株 BC31、T24 および RT4 を培養条件を 37 $^{\circ}$ C \cdot 30 分と 43 $^{\circ}$ C \cdot 30 分と交互に変更し培養した。PD-L1 の発現および apoptosis の発現を Western Blot で検討した。

研究方法のシエマ

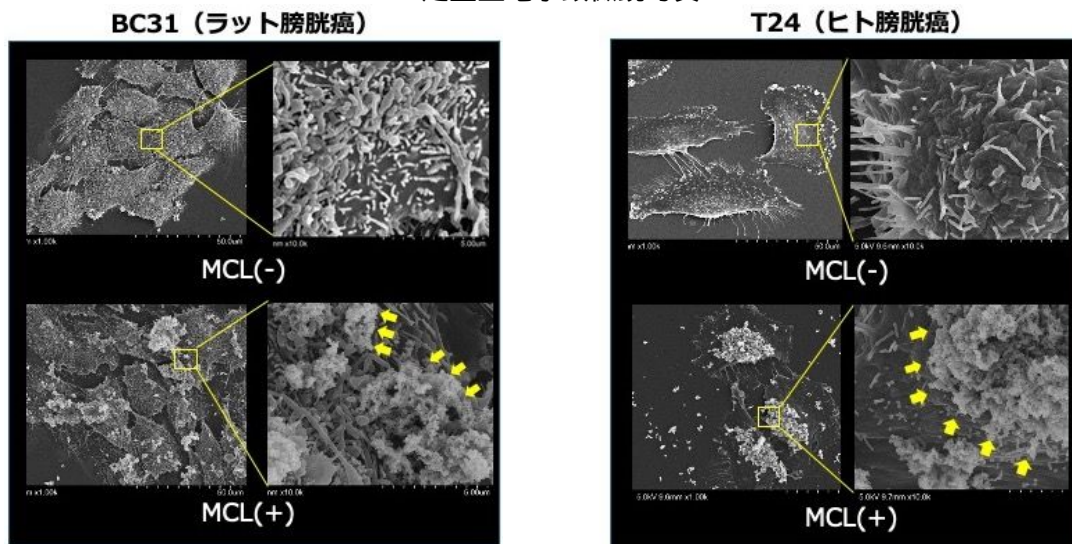


4. 研究成果

(研究1)

走査型電子顕微鏡では BC31, T24 の細胞表面に MCL がびまん性に付着が確認できた。

走査型電子顕微鏡写真

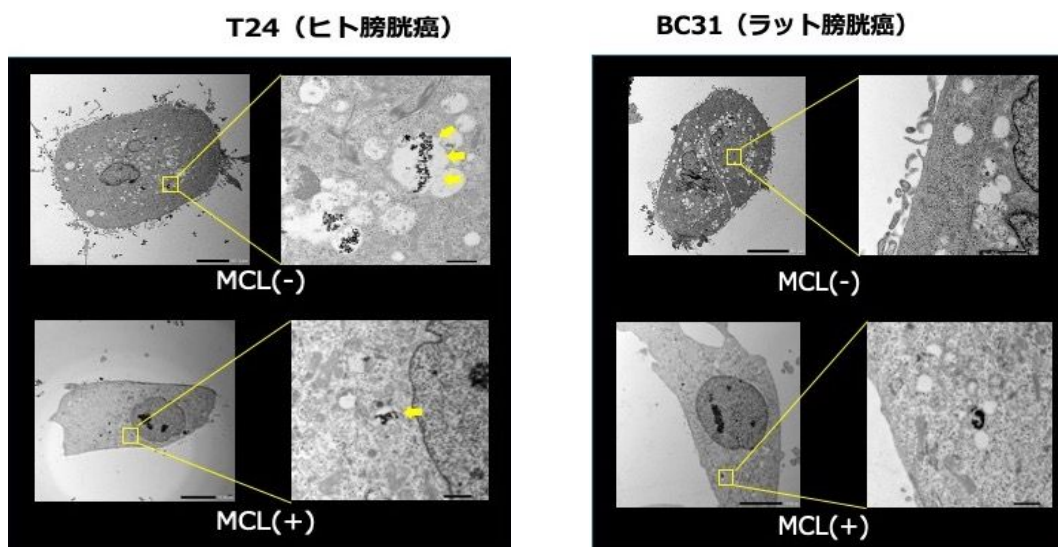


黄矢印：BC31 細胞表面に吸着している MCL

矢印：T24 の細胞表面に吸着している MCL

TEM では BC31, T24 とともに MCL エンドサイトーシスによる細胞内への取り込みが確認できた。

透過型電子顕微鏡写真

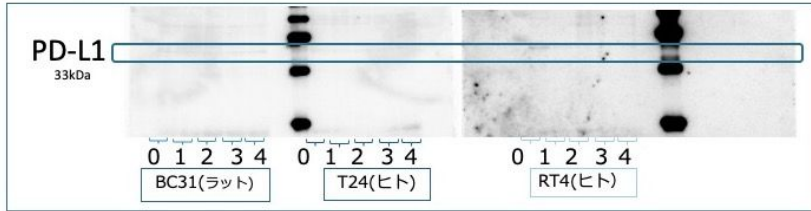


黄矢印:エンドサイトーシスにより細胞質内に取り込まれた MCL

(研究 2)

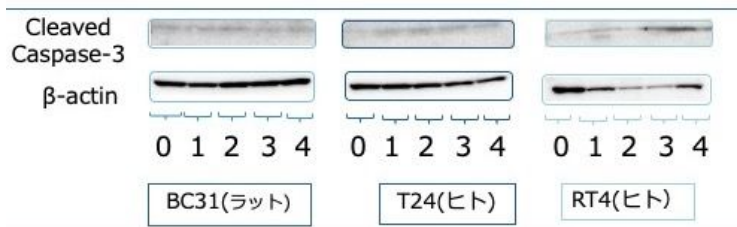
BC31、T24、RT4 のいずれにおいても PD-L1 の発現は認めなかった。

膀胱がん細胞株のPD-L1発現の検討



RT4 では温度暴露を繰り返すことで Cleaved Caspase-3 発現をわずかに認めた。

膀胱がん細胞株の高温暴露による免疫誘導の検討



【考察】MCL と交流磁場を用いた温熱治療を膀胱癌に用いるときは、MCL の投与経路は MCL 水溶液の膀胱内注入となる。本研究により、この投与経路でも MCL が膀胱癌細胞に吸着し、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが可能であることが示された。MCL を用いていない加温単独での温熱免疫の誘導は明らかにはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡村 武彦、永井 隆、茶谷 亮輔、小林 大地、小林 隆宏、秋田 英俊、安井 孝周 |
| 2. 発表標題 BCG膀胱内注入療法： Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio(NLR)は再発予測因子となりうるか？ |
| 3. 学会等名 第106回日本泌尿器科学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 河合 憲康、小林 大地、田中 勇太郎、恵谷 俊紀、飯田 啓太郎、内木 拓、安藤 亮介、堤内 要、小林 猛、安井 孝周 |
| 2. 発表標題 膀胱癌に対するMagnetic Cationic Liposomeを用いた新規温熱治療の開発のための基礎研究-第1報 |
| 3. 学会等名 第32回東海ハイパーサーミア研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 河合 憲康、小林 大地、田中 勇太郎、恵谷 俊紀、飯田 啓太郎、内木 拓、安藤 亮介、堤内 要、小林 猛、安井 孝周 |
| 2. 発表標題 膀胱癌に対するMagnetic Cationic Liposomeを用いた新規温熱治療の開発のための基礎研究 第1報 |
| 3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第35回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|