

平成 22 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007 年度 ～ 2009 年度  
 課題番号：19360378  
 研究課題名（和文）  
 バイオ技術を駆使して標的細胞を殺傷または活性化する治療戦略の深化  
 研究課題名（英文）  
 Development of therapy killing or activating targeted cells using bio-techniques  
 研究代表者  
 小林 猛（KOBAYASHI TAKESHI）  
 中部大学・応用生物学部・教授  
 研究者番号：10043324

研究成果の概要（和文）：磁性ナノ粒子を用いて悪性腫瘍部位だけを加温する温熱療法を開発した。強力な免疫誘導材として知られているイミキモドの注射と温熱療法との併用効果も検討し、相乗効果があることが分かった。開発した素材を使用した温熱治療の臨床研究を信州大学医学部皮膚科との共同研究により 2008 年 10 月 30 日に、名古屋大学医学部付属病院の 4 つの診療科合同との臨床研究を 2009 年 11 月 11 日に、戸畑共立病院がん治療センターとの臨床研究を 2010 年 2 月 8 日に開始した。

研究成果の概要（英文）：I have developed a new cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. Combination therapy with injection of imiquimod well known as immuno-inducer and hyperthermia was synergistic. Translational research was started at Shinshu University from Oct. 30, 2008, at Nagoya University from Nov. 11, 2009, and Tobata Kyouritu Hospital from Feb. 8, 2010.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医用工学

科研費の分科・細目：プロセス工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：がん、バイオテクノロジー、マグネタイト微粒子、温熱療法、加温、リポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

これまでがんの治療は、手術、化学療法（抗がん剤）、放射線療法が主な治療法である。そして、多くの研究者が様々な観点から検討してきた。研究代表者の小林は逆にほとんど

注目を集めてこなかった温熱療法の抜本的な改良研究をしよう、と考えた。

そこで、現在利用されている温熱療法とは違う原理に基づいて、悪性腫瘍部位だけを加温できる方法を検討した。最後に到達した考

えは、バイオ技術を駆使して悪性腫瘍にだけ磁性ナノ粒子を送り込み、交番磁界を照射して悪性腫瘍だけを加温しよう、という戦略である。

現在行われている温熱療法は、悪性腫瘍が存在する身体の部位を電極で挟み、ラジオ波と同じ程度の周波数（8 MHz）の交流電流を流す方法である。この方法では主としてジュール熱損で加温され、悪性腫瘍のみならず、電極で挟んだ正常組織も同時に温度が上がる。正常組織よりは悪性腫瘍組織の方が温度上昇に対して細胞が死滅しやすいが、患者さんの負担を考慮して、42℃を越す加温は容易でなく、悪性腫瘍組織を温熱療法だけで退縮させることは難しい。

## 2. 研究の目的

研究代表者の小林が開発した温熱療法は、磁性ナノ粒子であるマグネタイト微粒子を悪性腫瘍部位にだけに集積させ、交番磁界を照射すると磁性ナノ粒子だけが発熱する性質を利用する。悪性腫瘍部位を46℃程度に保つとその周辺の細胞は確実に死滅する。また、40℃程度に加温して逆に活性化する戦略も悪性腫瘍以外の病気に対しては考えられよう。全く新しい概念に基づいた温熱療法であり、加温に伴ってHSPが多量に生成し、これを介して、がん細胞特有の免疫活性が強く賦活される、という特徴がある。このような標的細胞だけを、細胞が死滅する温度である46℃に保つ、あるいは細胞は死滅せずに活性化する可能性がある40℃程度に保つ、という治療法を開発し、その成果を臨床研究に応用することを目標とした。

## 3. 研究の方法

磁性材料は交番磁界の照射によって発熱する。この発熱はヒステリシス損およびNeel緩和損という原理によるものである。ナノサ

イズの磁性微粒子、特に毒性が無いと考えられるマグネタイト（酸化鉄の $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ）微粒子を悪性腫瘍組織あるいは標的細胞にだけ集積させる技術を開発する。120 kHz程度の交番磁界を照射すると、磁性体であるマグネタイト微粒子だけが発熱するので、正常組織は加温されずに、悪性腫瘍組織あるいは標的細胞だけを何度にも加温できる。

マグネタイト微粒子を悪性腫瘍部位あるいは標的細胞にだけに集積させるために、マグネタイトを発熱体とする二つの素材系を開発した。一つ目の素材としては、悪性腫瘍細胞あるいは標的細胞に対する特異性が高いモノクローナル抗体が開発されている場合に利用するものである。電荷を持たない組成のリポソームでマグネタイト微粒子を包埋し、リポソームの表面にモノクローナル抗体を共有結合で固定化する。この素材(AML: Antibody-conjugating magnetite liposome)は静脈注射による投与が可能である。二つ目の素材として、カチオニックリポソームでマグネタイト微粒子を包埋することで、正電荷脂質包埋型マグネトリポソーム(MCL: Magnetite cationic liposome)を開発した。このMCLの場合には腫瘍組織に局注する必要がある。通常は、細胞は負に帯電しているから、腫瘍組織に注射することによって静電的な相互作用によって約6割が腫瘍組織に留まる。本研究では、これらよりさらにもっと良い素材の開発を検討した。

開発した方法で腫瘍組織を焼き切ることも可能であるが、これはあまり利口な方法では無い。悪性腫瘍組織の場合にはこの組織を44℃～46℃程度に30分間保つのが重要な点であり、このことによって、加温をしたときに生成するタンパク質である熱ショックタンパク質(heat shock proteins; HSP)が多量に生成する。このHSPが腫瘍抗原ペプ

チドと結合し、免疫に関連した細胞障害性 T 細胞およびNK 細胞を腫瘍特異的に活性化することを見いだした。このような Remote effect が観察されたことは大変好ましいことである。本治療法は、腫瘍局所における選択的な温熱療法であるにもかかわらず、直接加温されない全身のがん（転移がんを含む）に対しても免疫賦活によって治療効果を示すといった、がん治療の理想を実現可能にする治療法である。

HSP を介したこの免疫賦活メカニズムを基にして、さらに温熱免疫療法の免疫賦活能を高めるための新しい治療方法の開発も研究する。具体的には、マグネタイト微粒子を用いた温熱療法との組み合わせとして、IL-2 などのサイトカインとの併用療法やイミキモドのような免疫誘導剤との併用療法などの開発を行う。マグネタイト微粒子を用いた温熱療法だけでも十分悪性腫瘍を退縮させることが可能であるが、これらの組み合わせ方法も実際の治療法として役立つからである。

#### 4. 研究成果

##### (1) 発熱素材の再検討

① 血流の早い臓器に対しても使用できる素材の開発

発熱特性が高い金属合金素材を検討したが、人体に毒性がある金属を使用する必要があり、結果としてマグネタイトが最適であると判断した。マグネタイトを生分解性があるポリ乳酸で固めて針状に加工した素材、および注射により固まる素材と混練する素材を開発し、マウスを用いた実験でその有効性を確認した。

② マクロファージを特異的に認識する糖鎖を結合させたマグネトリポソーム (SML) の調製

トリマンノースを化学的に修飾し、リポソーム表面に共有結合させた素材 (SML) を調

製した。マクロファージへの取り込み能およびリンパ節への遊走能がかなり高いことがわかった。

##### (2) 転移腫瘍部位を迅速に診断できる素子の開発

磁性ナノ粒子の調製法として高温熱分解法を検討し、平均粒子系が 5 nm のマグネタイトナノ粒子を得た。さらに Mannich 反応を用いて  $\gamma$ -アミノ酪酸で修飾し、腫瘍細胞に対する抗体 Herceptin を結合させた。2 型ヒト上皮成長因子受容体 (HER2) を強発現した乳がん細胞では選択的な取り込みが認められ、100  $\mu\text{g/ml}$  のマグネタイト濃度であった。MRI を使用すると、1  $\mu\text{g/ml}$  以上のマグネタイト濃度で検出可能であり、十分に転移腫瘍部位の早期診断に応用可能であることが分かった。

乳がんだけでなく、最近、進行胃がんの 20% が HER2 陽性であることが明らかになった。開発した素材は *in vitro* 実験において HER2 陽性の胃がん細胞も選択的に認識可能であることが分かった。胃がんの転移部位がもっと早期に診断でき、治療できる可能性が示された。

また、細胞膜に発現しており、転移に関連した抗原として COX-2 および EGFR の 2 種類を選び、これに対する抗体を化学的に結合させたマグネトリポソーム (AML) を調製した。In vitro 実験ではがん細胞への集積性が確認できた。

##### (3) 標的細胞の加温による機能変化を解析するバイオインフォマティクス手法の開発とその利用

DNAチップによる網羅的な遺伝子解析をバイオインフォマティクス手法により行い、熱による細胞死を促進する薬剤の探索を行った。matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) 阻害剤が有力な候補として選択できた。この

薬剤による細胞死促進効果をin vitroの実験で認め、さらにマウスを使用したモデルでin vivoの効果も確認した。

#### (4) がんの温熱療法の効果を高めるための制御性T細胞の抑制効果および免疫誘導剤の検討

温熱療法によってがん特有の免疫活性が強く賦活されることを研究代表者の小林が見いだし、そのメカニズムも明らかにした。しかし、この効果を打ち消すのが制御性T細胞である。制御性T細胞を抑制する抗体を精製し、この抗体を腹腔に投与することによって、がんの温熱療法の効果を高めることをマウスによるin vivo 実験で明らかにした。

イミキモドは自然免疫に関連した樹状細胞のTLR7に結合し、IL-12を誘導生産し、さらにキラーT細胞やNK細胞を活性化する。この効果は、温熱療法によるがん特有の免疫活性の賦活メカニズムと組み合わせることによって強い併用効果が引き起こされる可能性が高い。実際に、マウスを用いたメラノーマの動物モデルで大変に高い併用効果があることが認められた。イミキモドはウイルスの治療用に臨床応用されている薬剤であり、このような腫瘍免疫を誘導する薬と温熱治療との併用は臨床でももっと積極的に応用すべきであることが判明した。

#### (5) 生活習慣病などへの治療に対する温熱療法の検討

細胞が死滅しない 40℃程度に温熱処理を行い、その後の細胞の変化、特に糖尿病に関連した膜タンパク質の変化を調べた。まず、糖尿病に対するモデル細胞を使用した in vitro 実験を行って、DNAチップを使用した遺伝子発現情報も調べた。これらの情報を総合的に判

断し、糖尿病治療に対する温熱療法の可能性があることが判明した。

#### (6) AML を用いる進行期メラノーマの温熱治療の臨床研究

メラノーマに対しては多くの抗原が明らかになっている。米国 Roswell Park Cancer Institute 免疫学部門主任の Ferrone 教授は高分子量メラノーマ関連抗原に対する抗体を開発し、臨床研究もしてきたので、彼から供与される抗体 (225.28) を使用することとした。この抗体を結合させた AML を中部大学で GMP 基準に準拠して調製した。

最初に動物モデルでAMLを用いる進行期メラノーマの温熱治療が有効なことを確認した。また、AMLの投与量や注入方法、交番磁界照射による局所温度上昇など、第一相臨床試験の治療プロトコル策定に必要なデータを得た。さらに、ヒトのメラノーマ細胞移植ヌードマウスを用いてAMLの腫瘍内投与後の臓器分布に関する検討を行った。

これらの成績を基に腫瘍表面温度を46℃に加熱するという臨床試験のための最終的条件を決定し、この照射条件によりヒトメラノーマ細胞移植ヌードマウスの腫瘍を完全退縮に導けることを確認した。外部委託によるAMLの安全性試験を実施し、AMLのGMP基準における製剤化と院内製剤化手順の作成、各種の臨床試験関連文書の作成、臨床用交番磁界照射装置の設置を行った。

メラノーマが44℃～46℃に加熱された

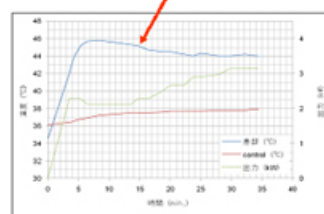


図1 信州大学でのメラノーマ患者の治療

信州大学医学部皮膚科斎田俊明教授の研究グループとの共同研究により、進行期メラノーマを対象とした AML の転移腫瘍内投与による局所温熱免疫療法の第 1 相+早期第 II 相臨床試験を信州大学医学部医倫理委員会先端医療専門小委員会に申請し、承認が得られた後で、2008 年 10 月 30 日に初めての臨床試験が行われた (図 1)。交番磁界を照射するとメラノーマ部位の温度は順調に加温され、44℃から 46℃に保たれた。なお、2009 年度末までに合計 3 例の臨床研究が実施された。

#### (7) 名古屋大学医学部附属病院との共同研究による臨床研究

研究者としての立場からは AML は魅力的な素材であるが、臨床家としての立場からは MCL に魅力を感じる、と多くの外科医から指摘を受けて、MCL を使用した温熱療法の臨床研究を名古屋大学医学部附属病院の乳腺・内分泌外科、耳鼻咽喉科、口腔外科および整形外科の 4 つの診療科が合同して研究代表者の小林と共同研究を行った。表在性の悪性腫瘍を対象とした臨床研究である。

信州大学と同様に、各種の書類を作成し、表在性の悪性腫瘍を対象とした MCL の腫瘍内投与による局所温熱免疫療法の第 I 相臨床試験を名古屋大学医学部倫理委員会 (バイオ先端臨床研究審査委員会) に申請し、2009 年 8 月に倫理委員会の承認が得られた。2009 年 11 月 11 日に初めての臨床研究が実施された (図 2)。甲状腺癌の転移部位に対して MCL が局注された。マグネタイト微粒子が転移部位に留まっていることを X 線 CT で確認した後で、交番磁界が患部に照射された。患部の温度は順調に加温され、出力電圧を調整して 44℃から 46℃に保たれた。なお、2009 年度末までに合計 2 例の臨床試験が実施された。



図2 名古屋大学での臨床研究

#### (8) 戸畑共立病院がん治療センターとの共同研究

現在臨床的に温熱療法で使用されているサーモトロン RF-8 の場合には、8 MHz の交流電流を腫瘍部位に流す方式である。この場合には電極で挟んだ部位全体が加温され、悪性腫瘍だけでなく、正常部位も加温される、という欠点がある。患者の正常部位も温熱治療でダメージを受けないように 42℃までの加温しか実施出来ず、大きな治療効果が期待できない。研究代表者の小林はマグネタイト微粒子が存在する部位はサーモトロン RF-8 を使用しても 3-4℃程度高くなることを見いだした。この原理を利用すれば、現在の温熱療法の問題点、つまり腫瘍部位を 43℃以上に加温し、熱により壊死させることが可能となる。そこで、サーモトロン RF-8 が設置されており、日本での温熱治療の第一の実績がある戸畑共立病院がん治療センターでの臨床研究を開始した。

名古屋大学と同様に、各種の書類を同病院の倫理委員会に提出した。倫理委員会の承認のもとで、患者さんに対する温熱療法が 2010 年 2 月 8 日に実施された (図 3)。直径 7 cm もの巨大な頭頸部腫瘍がある患者さんに、最初は通常の温熱療法が同年 2 月 2 日に実施された。電力として 226 kW が流されたが、腫瘍部位は 42℃までしか加温出来なかった。これに対して、MCL を腫瘍部位に局注

した後で同年2月8日に実施された温熱療法では、電力として188 kWが流された段階で腫瘍部位は44℃に達した。この温度は細胞を熱で死滅させるのに十分な温度であり、安全性を重視してここまでの加温に留めた。もっと電力を上げることは可能であるから、将来的には腫瘍部位を46℃まで加温することが可能となろう。

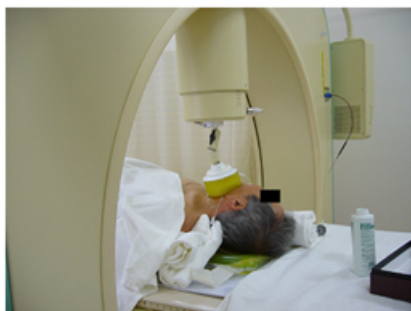


図3 MCLとサーモロンRF-8による温熱治療

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

1. A. Ito, **T. Kobayashi** : Intracellular hyperthermia using magnetic nanoparticles: A novel method for hyperthermia clinical applications, Thermal Medicine, 査読有, 24, 113-129 (2008)
  2. T. Kikumori, **T. Kobayashi**, M. Sawaki, T. Imai : Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes, Breast Cancer Research Treatment, 査読有, 113, 435-441 (2009)
- その他8件の雑誌論文(査読有り)を発表しています。

[学会発表] (計25件)

1. **小林 猛**、西村奈津実、奥田和智、尾藤宗俊 : 温熱治療におけるmatrix metalloproteinase-3 (MMP-3) 阻害剤の細胞死滅促進効果、日本ハイパーサーミア学会第24回大会、前橋、2007年9月14日

2. **小林 猛** : メラノーマに対する温熱療法と樹状細胞の併用療法の効果、第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月28日  
その他23件の学会発表をしています。

[図書] (計1件)

1. **小林 猛**、井藤 彰、本多裕之 : 磁性ナノ粒子を用いた新しいがん治療法の開発、ナノ粒子・マイクロ粒子の調製と応用技術(川口春馬 監修)シーエムシー出版、pp.197-209、2010.2

[産業財産権]

○ 取得状況 (計2件)

名称 : 細胞培養方法  
発明者 : 井藤 彰、本多裕之、小林 猛、上田 実、各務秀明、畠 賢一郎  
権利者 : 名古屋大学  
種類 : 特許  
番号 : 特許第4160842号  
取得年月日 : 20年7月25日  
国内外の別 : 国内

名称 : 細胞培養方法及び培養組織  
発明者 : 井藤 彰、本多裕之、小林 猛、上田 実、各務秀明、畠 賢一郎  
権利者 : 名古屋大学  
種類 : 特許  
番号 : 特許第4322253号  
取得年月日 : 21年6月12日  
国内外の別 : 国内

[その他]

その他関連した成果

中日新聞記事、2007年10月30日

ホームページ

[http://stu.isc.chubu.ac.jp/bio/public/Bio\\_Chem/labokobayashi\\_lab/index.html](http://stu.isc.chubu.ac.jp/bio/public/Bio_Chem/labokobayashi_lab/index.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 猛 (KOBAYASHI TAKESHI)  
中部大学・応用生物学部・教授  
研究者番号 : 10043324