

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07730

研究課題名（和文）新規磁性体粒子による胃癌腹膜播種の克服

研究課題名（英文）Hyperthermia generated by newly developed magnetic nanoparticles for effective treatment of peritoneal dissemination of a stomach cancer

研究代表者

岸本 浩行（Kishimoto, Hiroyuki）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：50613155

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）：本研究では胃癌の腹膜播種マウスモデルにおいて、磁性ナノ粒子として超常磁性酸化鉄ナノ粒子（SPION）を使用して磁気温熱療法を試みた。SPIONを腹腔内投与し、交流磁場を印加し磁気温熱療法を行ったところ、未治療群と比較して腹膜播種形成は有意に抑制された。本研究により、磁性ナノ粒子と交流磁場を用いた磁気温熱療法は胃癌の播種病変に対する新規治療法となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌は、肉眼的に病巣を完全切除できても、腹腔内遊離癌細胞を認めた場合は、術後5年で9割が腹膜播種再発で死亡する。播種病変は標準治療である化学療法では治療困難であるため新たな治療が求められている。我々は、これまで播種病変に治療応用されることがない交流磁場焼灼療法に注目した。本研究では、発熱能力の高い磁性ナノ粒子を腹腔内投与し、磁場印加して磁性粒子を発熱させて腹膜播種再発の原因となる遊離癌細胞を選択的に死滅させる治療コンセプトを証明し、新しい胃癌治療の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we treated peritoneal metastasis of gastric cancer with magnetic hyperthermia (MHT) using superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) as a magnetic nanoparticle (MNP), in an orthotopic mouse model mimicking early peritoneal disseminated disease of gastric cancer. SPIONs of an optimal size were intraperitoneally administered, and an AMF (390 kHz, 28 kAm<sup>-1</sup>) was applied for 10 minutes, four times every three days. After the MHT treatment, the peritoneal metastases were significantly inhibited compared with the untreated control group. The results of the present study show that MHT can be applied as a new treatment option for disseminated peritoneal gastric cancer.

研究分野：磁気温熱療法

キーワード：温熱療法 磁性ナノ粒子 腹膜播種 胃癌

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌の再発形式は腹膜播種が多く、治癒切除可能進行癌 (Stage II/III) の開腹時腹腔洗浄細胞診 (CY) で陽性であった患者の 80% は 4 年以内に腹膜播種を起こし、5 年以内に 85% の患者で腹水を貯留し、3 か月の余命を宣告される。腹腔内に遊離した癌細胞から生じると考えられる腹膜播種には、現時点では、全身化学療法が最も有効である。しかし、腹腔という「閉鎖空間」で生じる腹膜播種は、極論すれば“腹腔という限局した部分での局所病変”とも考えられる。腹膜播種限局の胃癌患者も遠隔転移を有する胃癌患者と同様に全身化学療法が行われるが、全身投与された薬剤は腹膜に少量しか到達しないと言われている。実際に、腹膜播種限局の胃癌患者に対しては、補助化学療法としての腹腔内化学療法に関するメタ解析が延命効果を示している (Yang S, et al: Sci Rep.2015)。他の治療方法では、減量手術と腹腔内温熱化学療法の併用も有効性が示されている (Glehen O, et al: Ann Surg Oncol. 2010 ; Sugarbaker PH: Cancer Treat Rev. 2016)。このような背景から、Paclitaxel (PTX) の腹腔内および経静脈投与と S-1 の併用療法 (IP) の安全性と有効性を我が国の標準治療である S-1+Cisplatin 併用療法 (SP) との比較により検証する試験が行われた (Phoenix-GC 第 3 相臨床試験、Ishigami H, et al: JCO. 2018)。本試験では、残念ながら、標準治療である SP 療法に対して IP 療法の全生存期間 (OS) における統計学的優越性を示すことはできなかった。しかしながら、OS に関するサブグループ解析では治療効果と腹水量の間で有意な相関関係を認め、特に、腹水量に関する解析では IP 群のほうがより良い奏効が得られたことが示された。すなわち、腹水量が多く、より予後不良傾向の強い腹膜播種胃癌患者に対しては、腹腔内化学療法と全身化学療法の併用療法のほうが、全身化学療法のみよりも効果が期待できる可能性を本試験では示している。

## 2. 研究の目的

胃がん腹膜播種形成の初期には、癌細胞は大網表面の乳斑と呼ばれるリンパ組織に着床する。また、腹腔内の異物も乳斑に集積する。本研究では、乳斑の性質と腹膜播種の初期形成過程に注目し、イットリウム鉄ガーネットなどの新規磁性体ナノ粒子を腹腔内投与し、腹膜播種の初期形成の場である乳斑に選択的に磁性体ナノ粒子を集約させ、磁場印加による誘導加熱を行うことで着床胃癌細胞を根絶させる新規腹腔内温熱療法の開発を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 交流磁場照射の最適な照射方法・条件の検討

in vitro で蛍光発現胃癌細胞株 (GCIY-RFP) と、イットリウム鉄ガーネット ( $Y_3Fe_5O_{12}$ ) からなる新規磁性体ナノ粒子や、粒子コアサイズが 7、10、15nm の超常磁性酸化鉄ナノ粒子 (SPION) を用いて交流磁場による治療効果を評価する。癌治療に効果的な、磁性体ナノ粒子の投与量や交流磁場の最適な照射時間に関して至適条件の検討を行う。

### (2) 腹膜播種モデルにおける磁性体粒子ナノ粒子を腹腔内投与した際の生体内分布の検討

蛍光発現ヒト胃癌細胞による腹膜播種マウスモデルにおいて、磁性体粒子ナノ粒子を腹腔内投与した際の、乳斑への磁性体粒子ナノ粒子の集積の確認を行う。組織学的検索では鉄染色等を用いて評価する。

### (3) 磁性体ナノ粒子を用いた磁気温熱治療による腹膜播種の抑制効果と安全性の評価

蛍光発現ヒト胃癌細胞を用いた腹膜播種マウスモデルに、磁性体粒子ナノ粒子を腹腔内投与し、交流磁場を照射し、播種形成が抑制されるか検証する。具体的には、①腹膜播種を腫瘍細胞の蛍光を用いて画像化し腹膜播種形成の程度を、未治療群と磁気温熱療法群で比較する。②磁気温熱治療によるマウスへの影響を、体重変化測定や血液生化学的検査などで確認する。

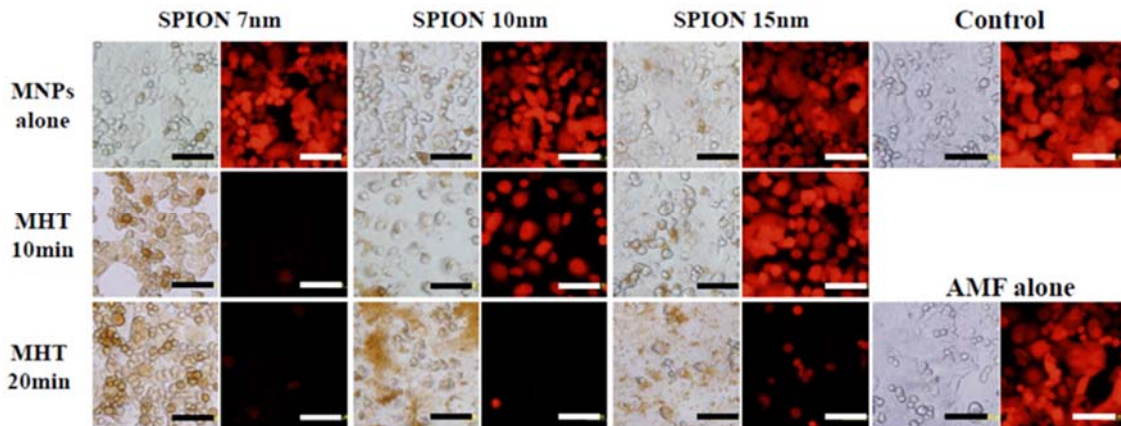
## 4. 研究成果

in vitro において、磁場印可で発熱効果が高い新規磁性体ナノ粒子イットリウム鉄ガーネット ( $Y_3Fe_5O_{12}$ ) で磁気温熱療法の治療効果の検討を開始したが、イットリウム鉄ガーネット自体の毒性が強く認められたため、本研究ではこれの使用を断念し、代わりに粒子コアサイズが 7、10、15nm の超常磁性酸化鉄ナノ粒子 (SPION) を用いて磁性ナノ粒子と磁場印可により腹膜播種治療が可能かどうか検討を行うこととした。

1) 粒子サイズの異なる SPION (7nm、10nm、15nm) による蛍光胃がん細胞株 (GCIY-RFP) に対する磁気温熱治療効果:

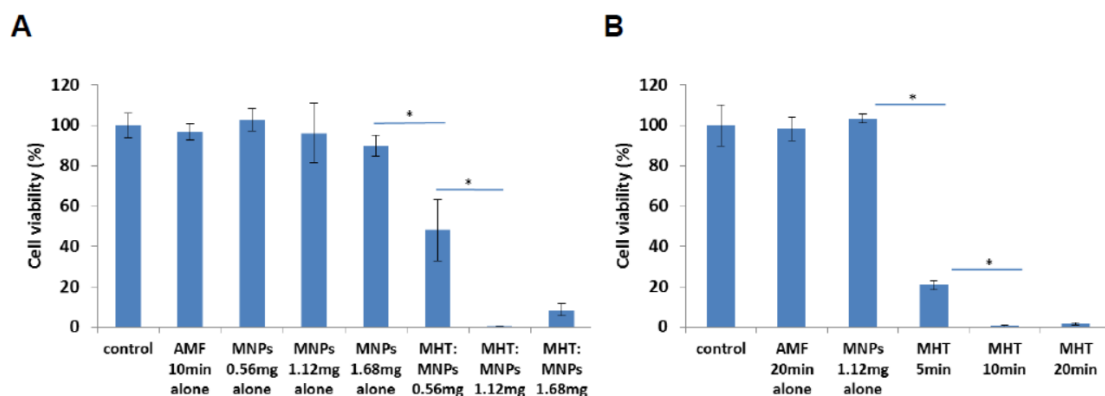
蛍光胃癌細胞株と、コアサイズが 7、10、15nm の SPION (磁性ナノ粒子の投与量は統一) を用いて磁気温熱療法の治療効果を検討した。磁場印加のみでは細胞障害は生じず、コアサイズが 7、10、15nm の SPION の投与のみを行った場合でも有意な細胞障害は認めなかった。しかし、各種サイズの SPION の投与を行って 10 分もしくは 20 分の磁場印加をすると、蛍光細胞の蛍光が減

減することにより細胞障害効果（治療効果）が確認された。7nm の SPION で磁気温熱治療を行って蛍光消失した癌細胞を治療後 6 日間にわたり培養継続したが、これらは細胞増殖をすることはなく、磁気温熱治療にて蛍光消失した細胞は死細胞であることが確認された。7nm の SPION を用いた場合は、10 分の磁場印加でほとんどの細胞が障害されており、今回用いた SPION の中では、7nm の SPION が最も治療効果高いことが示された。

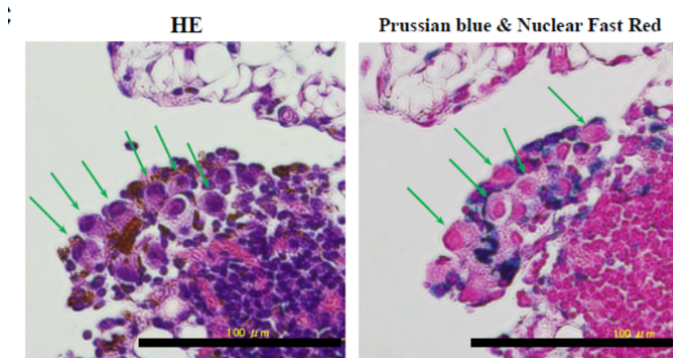


2) 7nm SPION による異なる投与量と磁場印加時間を用いた磁気温熱治療効果：  
 コアサイズ 7nm の SPION を、0.56、1.12、1.68 mg と異なる投与量で蛍光胃癌細胞に投与し磁場を 10 分間印可したところ、1.12mg から有意な治療効果が認められ、これを至適投与量と決定した。さらに、投与量 1.12mg を用いて磁場印可時間を 5、10、20 分で比較したところ 10 分でほとんどの細胞に細胞障害が認められた。SPION の投与量が増えるほど、磁場印加時間が増えるほど治療効果は増強することが示された。

Fig. 2



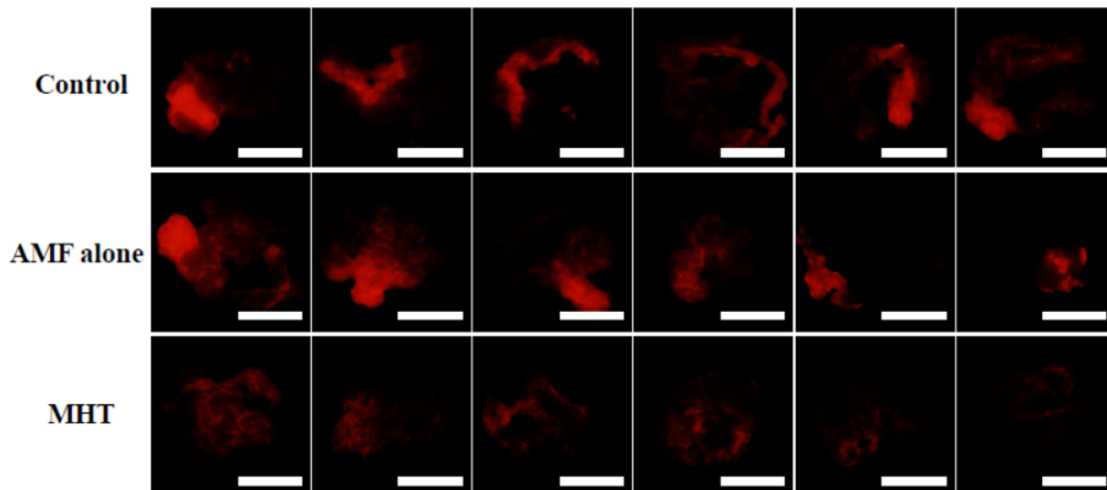
3) 早期腹膜播種マウスモデルにおける大網乳斑への SPION の集積：  
 蛍光胃癌細胞株 (GCIY-RFP) をヌードマウスの腹腔内に投与した腹膜播種マウスモデルに 7nm SPION を投与すると、腫瘍細胞も SPION 粒子も共に大網乳斑に集積することが確認された。



(緑矢印はがん細胞。乳斑に沈着した SPION が鉄染色で青く染まっている。)

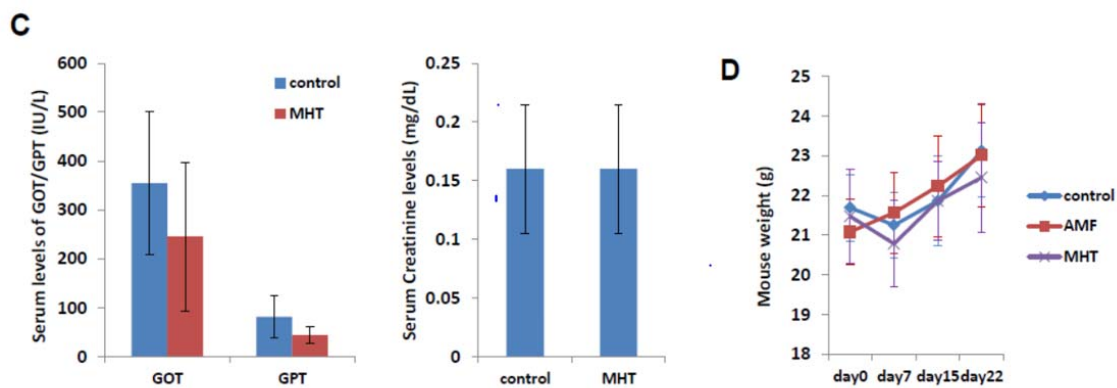
4) SPION による磁気温熱治療は腹膜播種形成を抑制する：

蛍光胃癌細胞 GCIY-RFP をヌードマウス腹腔内に投与した後に、PBS に溶いた 1.12mg の 7nm SPION を同じく腹腔内投与した。SPION 投与後 1、4、7、10 日目に 10 分間磁場を印可し 22 日目に腹膜播種形成の状況を確認した。治療を行わなかったコントロール群では蛍光を伴う腹膜播種を形成していたのに対し、磁気温熱療法を行った治療群では播種形成を示す赤色蛍光は有意に少なく、SPION を用いた磁気温熱療法により腹膜播種形成が抑制されることが示された。



5) 磁場温熱療法の安全性の評価：

マウスに磁気温熱療法を行うと、 $6.9 \pm 1.7^\circ\text{C}$  の体温上昇がみられた。磁気温熱療法してから 22 日目に採血を行い GOT/GPT、クレアチニンを調べたが、磁気温熱療法をした群と、していない群で有意差は認めなかった。また、体重についても差は認められなかった。



以上の結果より、磁性ナノ粒子と交流磁場を用いた磁気温熱療法は胃癌の播種病変に対する新規治療法となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumi Y, Kagawa T, Yano S, Tazawa H, Shigeyasu K, Takeda S, Ohara T, Aono H, Hoffman RM, Fujiwara T, Kishimoto H.	4. 巻 20(12)
2. 論文標題 Hyperthermia generated by magnetic nanoparticles for effective treatment of disseminated peritoneal cancer in an orthotopic nude-mouse model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Cycle.	6. 最初と最後の頁 1122-1133.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15384101.2021.1919441.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kagawa T, Matsumi Y, Aono H, Ohara T, Tazawa H, Shigeyasu K, Yano S, Takeda S, Komatsu Y, Hoffman RM, Fujiwara T, Kishimoto H.	4. 巻 20(13)
2. 論文標題 Immuno-hyperthermia effected by antibody-conjugated nanoparticles selectively targets and eradicates individual cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Cycle.	6. 最初と最後の頁 1221-1230.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15384101.2021.1915604.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松三雄騎、岸本浩行、香川哲也、矢野修也、重安邦俊、岡林弘樹、大原利章、田澤大、藤原俊義
2. 発表標題 フェルカルボトランを用いた胃癌腹膜播種に対する磁気温熱療法
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松三雄騎、香川哲也、矢野修也、田澤大、重安邦俊、武田正、大原利章、青野宏通、Robert M.Hoffman、藤原俊義、岸本浩行
2. 発表標題 同所性ヌードマウスモデルにおける腹膜播種に対する磁性体ナノ粒子を用いた温熱療法
3. 学会等名 日本ハイパーサーミア学会第38回大会（招待講演）
4. 発表年 2021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
連携研究者	青野 宏通  (Aono Hiromichi)  (00184052)	愛媛大学・理工学研究科・教授   (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------