

機関番号：32643

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21700511

研究課題名(和文) 超音波による温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用による低侵襲的がん治療システムの構築

研究課題名(英文) The combination therapy of mild-hyperthermia with therapeutic ultrasound and dendritic cell-based immunotherapy

研究代表者

鈴木 亮 (SUZUKI RYO)

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：90384784

研究成果の概要(和文)：微小気泡と超音波の併用による温熱効果を利用したがん治療後に、とり残されたがん細胞を死滅させる目的で樹状細胞をがん組織に投与し、がん免疫の増強を図った。その結果、超音波温熱療法と免疫療法の併用により、がん治療効果の増強が認められた。また、この併用療法において、がん細胞特異的な免疫系の活性化が確認された。このことから、本併用療法が新たながん治療戦略になるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Ultrasound (US) exposure to tumor tissue which was intratumorally injected nanobubbles (Bubble liposomes(BLs)), could induce anti-tumor effect by heating and shock waves derived from disruption of BLs. In addition, we found that strong tumor-specific immunity was induced by intratumoral injection of dendritic cells (DCs) after US therapy with BLs. The combination of US therapy with nanobubbles and DC-based immunotherapy efficiently suppressed tumor growth. Therefore, this might be a useful strategy for cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波、リポソーム、がん温熱療法、樹状細胞、がん免疫療法、低侵襲

1. 研究開始当初の背景

近年、強力収束超音波 (HIFU: High Intensity Focused Ultrasound) を用いた前立腺がんや子宮筋腫に対するがん温熱療法が行われている。しかし、HIFUによるがん治療は、大きな腫瘍組織への適用に時間がかかること、皮膚への火傷や焦点のずれによる

がん組織以外への傷害などの問題が懸念されている。この問題点を解決するため、微小気泡への超音波照射により誘導される微小気泡のキャビテーションに着目した。このキャビテーション時には、局所的な発熱とマイクロジェット流の発生が誘導される。そのため、がん組織に投与した微小気泡に超音波を

照射すれば、HIFU を利用しなくてもがん温熱療法が可能になると期待される。また、微小気泡への超音波照射によるキャビテーション誘導は、HIFU における超音波照射強度の $1/10 \sim 1/100$ 程度の低い強度の超音波照射で誘導可能であるため、皮膚の火傷や正常組織の傷害を回避可能になる。そこで我々は、超音波造影に利用されているパーフルオロプロパンガスをナノバブル化し、そのナノバブルをリポソームに封入したりポソーム型バブル（バブルリポソーム (BL)）を利用した超音波がん温熱療法の研究を始めた。しかし、がん温熱療法では、がん組織内全体を均一に加熱することができず、一部のがん細胞がとり残され、一時的ながん治療効果しか得られなかった。

がん温熱療法では、がん細胞の死滅に伴い死細胞からがん関連抗原が放出されるとともにがん組織内の炎症性サイトカイン濃度が高まっていることが知られている。そのため、腫瘍組織内に樹状細胞を投与することで、樹状細胞へのがん関連抗原の取り込みおよび活性化が誘導され、強力な抗腫瘍免疫の賦活化によるがん治療効果を向上できると考えられる。

2. 研究の目的

微小気泡と超音波を利用したがん温熱療法と樹状細胞を利用したがん免疫療法の併用による低侵襲的がん治療システムを構築する。この治療システムでは、腫瘍組織に集積する微小気泡を全身投与後、その腫瘍組織に体外から治療用超音波を照射することで誘導される微小気泡の圧壊（キャビテーション）により生じるジェット流や発熱を利用してがん細胞を死滅させるがん温熱療法を行う。さらに、強力な抗原提示細胞である樹状細胞を投与し、がん細胞に対する免疫系を賦活化する。そこで本研究では、超音波を利用したがん温熱療法と樹状細胞を利用したがん免疫療法の併用による、効果的ながん治療戦略の構築を図った。

3. 研究の方法

(1) 超音波温熱療法と DC 免疫療法の併用によるがん治療効果の評価

Colon-26 細胞を皮下移植した担がんマウスの腫瘍内に BL を投与し超音波照射 (1 MHz、1-4 W/cm²、2 分間) した。その 1, 2, 3, 5 日後、DC を腫瘍内投与し、抗腫瘍効果を検討した。また、超音波照射直後の腫瘍組織を HE 染色にて観察した。

(2) 超音波温熱療法と DC 免疫療法の併用によるがん治療メカニズムの解析

① DC の活性化に関する検討方法

Colon-26 細胞 (1×10^6 cells) 450 μ L に

バブルリポソーム (1 mg/mL) 50 μ L を添加し、超音波を照射した。その 30 分後に細胞上清を DC (1×10^6 cells) に添加。添加 48 時間後に DC の CD40/CD80/CD86 発現上昇をフローサイトメトリーにて観察した。超音波照射条件 (1 MHz, 4 W/cm², 2 分間)

② エフェクター細胞に関する検討方法

CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、Natural Killer (NK) 細胞に対する抗体を投与し各種免疫担当細胞を枯渇したマウスに、Colon-26 細胞を移植した。8 日後、この担がんマウスのがん組織内にバブルリポソーム (0.1 mg/mL) 30 μ L 投与し、その直後、がん組織に向けて経皮的に超音波を照射した。その後、腫瘍径を指標に抗腫瘍効果を評価した。超音波照射条件 (1 MHz, 4 W/cm², 2 分間)

(3) 遠隔転移部位に対する治療効果

BALB/c マウスの左右後背部 2 か所それぞれにマウス結腸がん Colon-26 細胞を移植し遠隔転移モデルを作成した。8 日後、一方のがん組織のみにバブルリポソームを腫瘍内投与し、体外から腫瘍に向け超音波 (1 MHz, 4 W/cm², 2 分間) 照射した。その 1, 2, 3, 5 日後、治療を行った側の腫瘍内にマウス骨髄由来 DC またはコントロールとして PBS を投与し、治療を行っていない側の腫瘍径を計測した。

4. 研究成果

(1) 超音波温熱療法と DC 免疫療法の併用によるがん治療効果

超音波照射直後の腫瘍組織では照射強度依存的な組織傷害が確認された (図 1)。また、超音波がん治療後 DC の投与により照射強度依存的な抗腫瘍効果の増強が認められた (図 2)。このことから、BL を用いた超音波がん温熱免疫療法で腫瘍組織を大きく傷害するほど、DC 併用時に抗腫瘍効果が増強されることが明らかとなった。

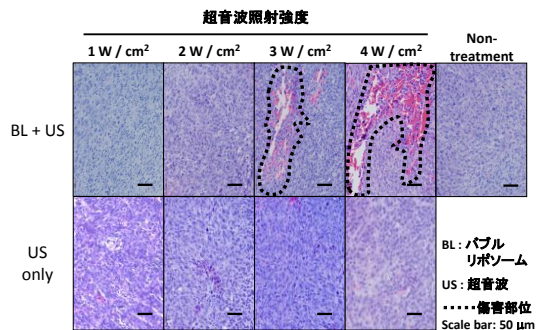


図 1 バブルリポソームと超音波照射併用後のがん組織傷害 (HE 染色)

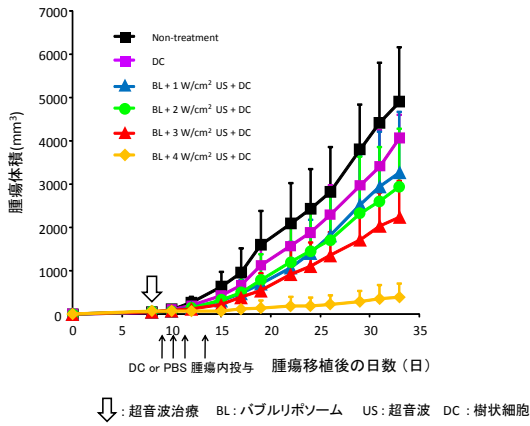


図2 超音波がん温熱療法と DC 免疫療法の併用による抗腫瘍効果

(2) 超音波温熱療法と DC 免疫療法の併用によるがん治療メカニズムの解析

① DC の活性化に関する検討

バブルリポソーム存在下で超音波照射したがん細胞の培養上清を DC に添加することで、DC の成熟化マーカーである CD40/CD80/CD86 分子の発現が増加した (Table 1)。このことから、がん細胞をバブルリポソームと超音波で処理することで DC の成熟化が誘導されることが示された。このことから、前項におけるバブルリポソームと超音波照射による治療の際もがん組織内に投与した DC が成熟化するものと考えられた。

Table 1 超音波温熱処理したがん細胞による DC の活性化

	CD40 (%)	CD80 (%)	CD86 (%)
培地のみ	8.2	6.1	10.6
無処理がん細胞培養上清	24.5	8.1	18.7
BL+US 処理がん細胞培養上清	38.1	15.8	36.0
LPS (positive control)	56.5	15.5	40.8

BL:バブルリポソーム, US: 超音波
LPS: Lipopolysuccuride

② エフェクター細胞に関する検討

バブルリポソームを用いた超音波治療と DC 免疫療法の併用における抗腫瘍メカニズムを解析するため、各種免疫担当細胞を欠損した担がんマウスを用いて検討を行った (図3)。その結果、CD4⁺ T 細胞、CD8⁺ T 細胞、NK 細胞欠損マウスにおいて、抗腫瘍効果の減弱が認められた。特に CD8⁺ T 細胞欠損マウスにおいて、抗腫瘍効果が完全に

消失していた。このことから、本併用療法における治療において CD8⁺ T 細胞が主要なエフェクター細胞として治療効果に参与していることが示された。

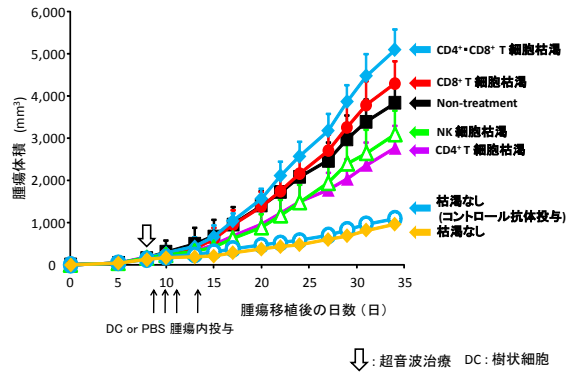


図3 超音波がん温熱療法と DC 免疫療法の併用における免疫担当細胞の関与

(3) 遠隔転移部位に対する治療効果

バブルリポソームと超音波の併用による治療後に PBS を腫瘍内投与した群において、治療を行っていない側のがん組織の腫瘍増殖抑制効果は全く認められなかった。これに対し、DC 免疫療法を併用した群では、腫瘍増殖抑制効果が観察された (図4)。これは、超音波がん温熱療法に DC 免疫療法を併用することでがん細胞特異的な T 細胞が活性化され、遠隔部位に存在するがん細胞をも傷害したものと考えられた。このことから、バブルリポソームを用いた超音波がん温熱療法と DC 免疫療法の併用は、取り残されたがん細胞や遠隔転移したがんに対しても治療が可能になるものと考えられた。

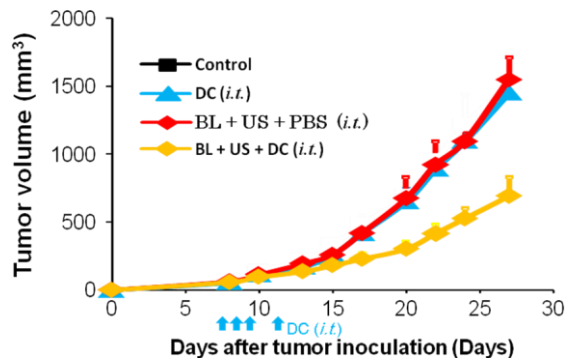


図4 遠隔転移部位に対する治療効果

まとめ

バブルリポソームを用いた超音波温熱

療法で治療したがん組織内に DC を投与するとがん組織内で DC が成熟化し、その後、その DC が効率よく CD8⁺ T 細胞を活性化しているものと考えられた。このように、がん細胞に対する全身免疫系が効率よく活性化されることで、超音波温熱療法では傷害できなかったがん細胞や遠隔部位にあるがん細胞をも傷害できるようになったものと考えられた。以上のことより、本併用療法が、新たながん治療戦略として利用可能になるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Maruyama K. Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles. *J Control Release*. 査読：有, 149: 36-41 (2011)
- ② Ikeda-Dantsuji Y, Feril LB Jr, Tachibana K, Ogawa K, Endo H, Harada Y, Suzuki R, Maruyama K. Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against *Chlamydia trachomatis*-infected human epithelial cells in vitro. *Ultrason Sonochem*. 18(1):425-430. (2010)
- ③ Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. *Biomaterials*. 査読：有, 31: 7813-726 (2010)
- ④ Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Res*. 査読：有, 70(15):6238-6246. (2010)
- ⑤ Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannosylated lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure. *Hum Gene Ther*. 21: 65-74 (2010)
- ⑥ Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Namai E, Taira Y, Okada N, Kadowaki N, Kodama T, Tachibana K, Maruyama K. A novel strategy utilizing ultrasound for antigen delivery in dendritic

cell-based cancer immunotherapy. *J Control Release*. 133: 198-205. (2009)

[学会発表] (計 17 件)

- ① Ryo Suzuki, Cancer immunotherapy utilized ultrasound sensitive liposomes (Bubble liposomes), PSWC2010, 平成 22 年 11 月, 2010, New Orleans, USA (招待講演)
- ② 鈴木 亮, 小田雄介, 丸山一雄, リポソーム技術と超音波技術を基盤とした革新的がん治療システムの構築, 化学工学会ソノプロセス分科会, 平成 22 年 10 月, 東京 (招待講演)
- ③ 鈴木 亮, 丸山一雄, リポソーム製剤, ナノメディシン研究会, 平成 22 年 9 月, 東京 (招待講演)
- ④ Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Risa Koshima, Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Development of effective cancer therapy by the combination of ultrasound mediated mild hyperthermia and immunotherapy, WMIC2010, 平成 22 年 9 月, 京都
- ⑤ 鈴木 亮, 超音波感受性リポソームを利用した新たな薬物・遺伝子送達システムの開発に関する研究, 日本バイオイメージング学会, 平成 22 年 9 月, 神奈川 (奨励賞受賞)
- ⑥ Ryo Suzuki, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Anti-tumor effect by the combination of therapeutic ultrasound and dendritic cell-based immunotherapy, 日本癌学会, 平成 22 年 9 月, 大阪
- ⑦ Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Risa Koshima, Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Anti-tumor effect by the combination of liposomal bubbles and ultrasound, Liposome Research Days 2010 (LRD2010), 平成 22 年 8 月, Vancouver, Canada
- ⑧ Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Development of novel antigen delivery system with liposomal bubbles (Bubble liposomes) and ultrasound in cancer immunotherapy 平成 22 年 8 月, 2010, Copenhagen, Denmark
- ⑨ Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama, Analysis of anti-tumor mechanism by the combination of therapeutic ultrasound and immunotherapy, ISTU2010, 平成 22 年 6 月, 東京

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

なし

○取得状況（計0件）

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.teikyo-u.ac.jp/lab/s-yakuzai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 亮 (SUZUKI RYO)
帝京大学・薬学部・講師
研究者番号：90384784

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし