

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 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：2011～2013

課題番号：23791776

研究課題名(和文) 磁性ナノ粒子を用いた温熱治療と光力学的治療を併用した新しい治療法の開発

研究課題名(英文) The development of the new therapy that combined treatment of the photodynamics with the hyperthermic potentiation using magnetic nanoparticles

研究代表者

恵谷 俊紀 (Etani, Toshiki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・臨床研究医

研究者番号：30600754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：作成したモデルマウスを Control群 MCL注入群(AMF非照射群) MCL注入+AMF照射群(治療群)に分類し、治療を開始した。MCL集積周囲にはnecrosis areaを認めた。治療群はControl群に比べ、腫瘍の増殖を抑えた。さらにapoptosisを誘導した。治療群において、IL-2, IFN- γ をwestern blottingにて計測したところ、有意な誘導を認めた。さらに、CD8陽性Tリンパ球は、治療群において有意な誘導を認めた。以上の結果からMCL Heat Therapyは膀胱がんに対する直接的な抗腫瘍効果を示すだけでなく、腫瘍免疫を強化していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The model mouse which made 1, Control group 2, MCL infusion group (classified it in AMF non-radiation group) 3, MCL infusion +AMF radiation group (treatment group), and started treatment. We accepted necrosis area around MCL accumulation. The treatment group suppressed the growth of tumor as compared with Control group. Furthermore, we induced apoptosis. After measuring IL-2, IFN- γ in western blotting in a treatment group, we showed significant instruction. Furthermore, the CD8-positive T lymphocyte accepted significant instruction in a treatment group. MCL Heat Therapy did not only show direct antitumor effect for the bladder cancer from the above-mentioned results, and it was recognized that we strengthened tumor immunity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：MCL Heat Therapy

1. 研究開始当初の背景

外科治療が不要な新しい治療法として私たちは、正電荷リポソーム包埋型磁性ナノ粒子 (Magnetic Cationic Liposome: MCL) を発熱体とする深在性がんの温熱治療 (MCL Heat Therapy) を開発した。MCL Heat Therapy とはマグネタイト微粒子をカチオン性のリン脂質で被覆した MCL だけが発熱する周波数で交番磁場発生装置によって磁場照射することで、がん組織のみの加温が可能である。私たちがこれまで行ってきた研究では、マウス悪性黒色腫、ラット脳腫瘍、ハムスター骨肉腫、ウサギ舌がんの動物と腫瘍において、腫瘍を完全退縮させることに成功している。さらに私たちは、加温されていない腫瘍 (転移がん) の同時に完全退縮することを見出した。これは、MCL Heat Therapy を行ったことにより、抗腫瘍免疫が強く誘導されたためであり、MCL を用いた温熱治療がこれまでにない免疫賦活効果があることを示したものである。

私たちは、これまでに MCL を用いた磁場誘導加温法による前立腺がん治療を目的とした基礎実験を 3 つ行ってきた。

(1) ラット前立腺がん細胞を同種のラット皮下に移植し、磁場誘導加温法によりラット前立腺がん腫瘍は増殖抑制されることを確認した。

(2) ヒト前立腺がん細胞株 (LNCap および PC-3 の 2 種類) を用いたヌードマウス皮下移植モデルを用いた実験で、磁場誘導加温法により増殖抑制のみならず、皮下腫瘍を完全退縮させることができた。

(3) ラット頭頂部皮下にラット前立腺がんを移植し、前立腺がん骨転移治療の可能性を検討した。磁場誘導加温法により骨浸潤は抑制され、骨転移治療の可能性が示唆された。この正電荷リポソーム包埋型磁性ナノ粒子を発熱体とする温熱治療の弱点は腫瘍塊は MCL を注入した腫瘍中心部から壊死して腫瘍周辺部の残存腫瘍が増殖するため、腫瘍塊は容易には消失しないという点にあった。

Photodynamic therapy (PDT) は光線力学的療法といわれ、さまざまな光線を利用し、臨床的にも治療へ応用されている。例えばアトピー性皮膚炎などの炎症性疾患への PUVA 療法やがん治療においては、腫瘍親和性のある光感受性物質を体内へ投与し、正常組織と腫瘍細胞の濃度差をつくることで、レーザー光を照射する方法などが子宮頸がんや肺がんなどの分野で行われている。私たちの教室では、有効深度が浅く粘膜内のみ照射が可能な紫外線と増感効果があるフラレンを併用した表在性膀胱癌への photodynamic therapy を開発した。フラレン (C60-Glu1) とは、炭素原子 60 個からなるサッカーボール状の構造をした分子であり単独でも光感受性をもつが、グルコースを付加することで糖代謝が盛んな腫瘍特異的に集積する物質である。

これまでに、私たちは以下のことを証明した。

(1) 膀胱癌細胞株 3 種類 (T24, 5637, RT4) へ UVA-1 120J/m² を照射すると、約 10-20% の細胞に細胞死が誘導された。

(2) 光感受性物質であるフラレンにグルコースを付加することで、PET-CT の原理を応用した、癌特異的に取り込まれると考えられる分子 (C60-Glu1) を生成した。

(3) C60-Glu1 を膀胱癌細胞株と 24 時間反応させたあとに、2.5J/m² の UVA-1 を照射したところ、約 50% の細胞死を、WST-1 assay により確認した。

(4) 次に 5 μM C60-Glu1 を膀胱癌細胞株と 24 時間反応後、UVA-1 2.5J/m² を照射し、24 時間後の細胞を回収しフローサイトメトリーを行ったところ、死細胞の大部分は apoptosis であることを認めた。

そこで我々は、腫瘍深部を壊死させる MCL を用いた磁場誘導加温法とその弱点である周辺部の増殖を治療可能な photodynamic therapy を融合することにより、副作用が少なく治療効果の高い新しい浸潤性膀胱がん治療法を開発できないかと考えた。

2. 研究の目的

浸潤性膀胱がんでは、治療法として根治的膀胱全摘除術および尿路変更術などの侵襲の高い治療法が選択され、QOL を著しく低下させている。私たちは、正電荷リポソーム包埋型磁性ナノ粒子 (Magnetite Cationic Liposome: MCL) を用いた磁場誘導組織内加温法 (MCL Heat Therapy) の癌に対する治療効果を研究し、前立腺癌をはじめ様々な癌の増殖抑制効果を報告してきた。また、新規光感受性物質フラレンと紫外線による膀胱内 Photodynamic Therapy の開発を進め、表在性膀胱がんに対する治療効果を認めている。この MCL Heat Therapy と Photodynamic Therapy を融合することにより、浸潤性膀胱がんに対する保存的根治的治療法を開発をすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルの作成: BALB / c Slc-nu/nu に T24: 1×10⁶ cells / 100 μl (in PBS) を背中左右に皮下移植し腫瘍長径が 5mm になるまで経過観察する。

(2) MCL heat therapy: 我々はすでに MCL heat therapy における、最適な治療時間・治療間隔・治療回数などは証明済みである。30 分以上の治療時間、2 日おきの治療、複数回治療を繰り返すことで、治療効果は高まる。MCL の注入の有無により 2 群に分ける (各 5 匹ずつ、計 10 匹): (1) MCL 注入群 (2) MCL 非注入群 MCL の濃度は 33mg/ml、用量は 100 μl/回、2 方向から腫瘍中心部に 5 μ/min の速度で注入する。両群共に交番磁場を照射し、照

射時間は30min/回、2日おきに施行し、施行前に毎回MCLを注入する。施行回数は、腫瘍塊が消失するまで繰り返す。消失した場合MCL heat therapyは中止とし、局所再発を認めた場合、再開する。その治療効果を腫瘍体積の変化および病理組織学的検査により解析する。組織学的検査はH-E染色にて、MCLの集積は鉄染色にて評価する。破骨細胞の同定・apoptosis+necrosis・細胞増殖はそれぞれ、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ(TRAP)染色・TUNEL染色・Ki67染色にて、またWestern blotting法にてHSP-70,IL-6,TNF-,CD4,CD8など免疫組織化学的に検討する。腫瘍表面温度・直腸温度は光ファイバー・プローブ、動物実験用サーモグラフィーにて測定する。

(3)紫外線最適波長およびフラレン(C60-Glu1)の最適濃度の検討：膀胱がんモデルマウスに対し280-400nmの間で適宜紫外線波長を変更し、WST-1 assayにてできる限り線量を小さく、治療効果の高い波長を同定する。

(4)photodynamic therapy：フラレン(C60-Glu1) 6.25 μmol / kgの投与方法で3群に分ける：(1)腹腔内注射 (2)局所注射 (3)表面散布。各群5匹ずつ、計15匹のマウスを使用する。24時間後にUVA-1を2.5J/m²照射する(ただし実験結果から最適と判明した線量および波長で照射する可能性あり)。その治療効果を腫瘍体積の変化および病理組織学的検査により解析する。

(5)アポトーシス関連タンパクについてウエスタンブロットによる解析：腫瘍縮小効果(治療開始時の最大径の50%)が認められたら、サンプルを回収し、ホモジナイズ後BSAにてタンパク定量を行いタンパク量をそろえ、サンプル処理する。ただしチェックポイントタンパクは各細胞により元々の発現量が異なるため、各細胞間で総タンパク量をそろえてデータがとれない場合はそれぞれの細胞にてウエスタンブロットでバンドが見える条件にてサンプルを処理する場合もある。サンプルを泳動し、セミドライ法にてタンパクをメンブレンに転写し、次の各種抗体(PARP,cleaved,caspase3,8,9)にてウエスタンブロットを行う。

(6)MCL Heat Therapy+ Photodynamic Therapyの相乗効果について証明：Photodynamic therapyにてもっとも効果がある群を同定し、その実験モデルを対象とし磁性体を用いた温熱治療を行う。すなわちC60-Glu1投与後24時間後にUVA-1を2.5J/m²照射する。その後腫瘍塊にMCLを注入し、交番磁場を30分照射することにより温熱治療を実施する。その治療効果を腫瘍体積の変化および病理組織学的検査により解析する。また(1)control群(無治療)、(2)MCL heat therapy 単独群、

(3)Photodynamic therapy 単独群(4) MCL heat therapy + Photodynamic therapy 併用群の4群に分類し、相乗効果についても検討する予定である。

4. 研究成果

(1)マウス膀胱がん皮下転移モデルの作成；BALB / c Slc-nu/nuにT24:1×10⁶ cells / 100 μl (in PBS)を背中の中左に皮下移植しマウス膀胱がん皮下移植モデルを作成した。(2)MCL Heat Therapyの治療効果；作成したモデルマウスをControl群(無治療群)MCL注入群(AMF非照射群)MCL注入+AMF照射群(治療群)に分類し、治療を開始した。治療は2回/週、4週間行った。MCLの注入後、30分間AMFを照射した。治療は片側のみとした。治療終了後、MCLの集積の確認を鉄染色にて行った。腫瘍部にMCLを認め、MCL集積周囲にはnecrosis areaを認めた。MCL注入+AMF照射群はControl群に比べ、腫瘍の増殖を抑えた。さらにControl群に比べ、腫瘍の壊死領域が有意に拡大し、apoptosisを誘導した。これらの結果から、MCL注入+AMF照射群はより強力に腫瘍を抑制することが判った。また、MCL注入+AMF照射群において、非治療側の腫瘍縮小効果が認められた。HSP70,CD8陽性Tリンパ球の誘導サイトカインである、IL-2,IFN- γ をwestern blottingにて計測したところ、治療群において有意な誘導を認めた。さらに、CD8陽性Tリンパ球の評価を目的に免疫染色を行ったところ、治療群において有意な誘導を認めた。以上の結果からMCL Heat Therapyは膀胱がんに対する直接的な抗腫瘍効果を示すだけでなく、CD8陽性Tリンパ球を介した腫瘍免疫を強化していることが判明した。

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5件)

Kobayashi Daichi, Kawai Noriyasu, Sato S, Naiki T, Yamada Kenji, Yasui T, Tozawa Keiichi, Kobayashi Takeshi, Takahashi S, Kohri Kenjiro:Thermotherapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate Cancer bone metastasis in a novel rat model. The Prostate, 73:913-922, 2013 (doi:10.1002/pros.22637) (査読あり)
恵谷 俊紀, 河合 憲康, 橋本 良博, 坂倉 毅, 池上 要介, 神谷 浩行, 岩瀬 豊:Gemcitabine, Cisplatin 併用化学療法が有効だった肝転移性膀胱肉腫様癌の1例 泌尿器外科 25:1871-1874, 2012
(<http://www.de-hon.ne.jp/digital/bin>)

/product.asp?sku=200000328243020190
0P) (査読あり)
柴原 弘明, 戸倉 由美子, 伊勢呂 哲也,
惠谷 俊紀, 池上 要介, 神谷 浩行, 橋
本 良博, 岩瀬 豊, 植松 夏子, 今井
絵理, 西村 大作: スニチニブとオキシ
コドンによる難治性嘔気・嘔吐にミルタ
ザピンが著効した 1 例 Palliative
Care Research 7(1):514-517 2012
([https://www.jstage.jst.go.jp/artic
le/jspm/7/1/7_514/_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jspm/7/1/7_514/_pdf)) (査読あり)
惠谷 俊紀, 伊勢呂 哲也, 神谷 浩行,
橋本 良博, 岩瀬 豊: 経直腸的前立腺・
腫瘤針生検で診断した胃癌 Schnitzler
転移の 1 例 泌尿器科紀要
58(5):263-264 2012
(<http://hdl.handle.net/2433/157946>)
(査読なし)
惠谷 俊紀, 伊勢呂 哲也, 神谷 浩行,
橋本 良博, 岩瀬 豊: 腎・尿管結石に対
する TUL199 例の検討 日本泌尿器科学
会 雑誌 103(2):514 2012
([http://jglobal.jst.go.jp/detail.ph
p?JGLOBAL_ID=201202257677665309&q=%
E8%85%8E%E3%83%BB%E5%B0%BF%E7%AE%A1
%E7%B5%90%E7%9F%B3%E3%81%AB%E5%AF%B
E%E3%81%99%E3%82%8BTUL199%E4%BE%8B%
E3%81%AE%E6%A4%9C%E8%A8%8E&t=0](http://jglobal.jst.go.jp/detail.php?JGLOBAL_ID=201202257677665309&q=%E8%85%8E%E3%83%BB%E5%B0%BF%E7%AE%A1%E7%B5%90%E7%9F%B3%E3%81%AB%E5%AF%BE%E3%81%99%E3%82%8BTUL199%E4%BE%8B%E3%81%AE%E6%A4%9C%E8%A8%8E&t=0)) (査
読なし)

〔学会発表〕(計 19 件)

惠谷 俊紀, 内木 拓, 安藤 亮介, 河
合 憲康, 戸澤 啓一, 佐々木昌一, 林
祐太郎, 鈴木孝禎, 郡 健二郎: 新規
ヒストン脱メチル化酵素阻害剤を用い
た前立腺癌治療法の確立に向けた基礎
的研究。第 102 回日本泌尿器科学会総会、
2014/4/24-4/27 神戸市
小林 大地: 再熱性前立腺がんに対する
磁性ナノ粒子を用いた温熱治療の開発
とその治療メカニズムの解明。第 64 回
名古屋市立大学医学会総会、2013.12.8、
名古屋市
小林 大地, 河合 憲康, 佐藤 慎哉,
惠谷 俊紀, 内木 拓, 山田 健司, 戸
澤 啓一, 最上 徹, 高橋 智, 郡 健
二郎: 磁性ナノ粒子を用いた新しい治療
法の開発と去勢抵抗性前立腺がんに対
する免疫賦活機構の解明。第 63 回日本
泌尿器科学会中部総会、2013.11.28-30、
名古屋市
惠谷 俊紀, 内木 拓, 安藤 亮介, 河
合 憲康, 戸澤 啓一, 郡 健二郎: 尿
路上皮癌に対する
Gemcitabine/Carboplatin 併用化学療法
の治療成績第 51 回日本癌治療学会学術
総会 2013.10.24-26 京都
小林 大地, 河合 憲康, 佐藤 慎哉,
惠谷 俊紀, 内木 拓, 安藤 亮介, 福
田 勝洋, 戸澤 啓一, 最上 徹, 岡村

武彦, 高橋 智, 郡 健二郎: 磁性体ナ
ノ粒子を用いた温熱治療は新たなモデ
ルラットにおいて骨転移を抑制する。第
72 回日本癌学会学術総会、2013.10.3-5、
横浜市
河合 憲康, 堤内 要, 小林 猛, 小林
大地, 内木 拓, 惠谷 俊紀, 安藤 亮
介, 戸澤 啓一, 郡 健二郎: 前立腺癌
骨転移に対する温熱治療のための骨芽
細胞に特異的に分布し発熱効果がある
ポリマーコートされた磁性微粒子の作
成。第 72 回日本癌学会学術総会、
2013.10.3-5、横浜市
Kawai Noriyasu, Tsutsumiuchi Kaname,
Kobayashi Takashi, Kobayashi Daichi,
Etani Toshiki, Naiki Taku, Ando
Ryosuke, Tozawa Keiichi, Kohri
Kenjiro: Development of an anticancer
hyperthermic therapy for
bone-specific metastasis in prostate
cancer by using anti-RANKL
antibody-conjugated magnetic
nanoparticles. American Urological
Association Annual Meeting 2013,
2013.5.4-8, San Diego(USA)
小林 大地, 河合 憲康, 内木 拓, 山
田 健司, 池上 要介, 安藤 亮介, 福
田 勝洋, 戸澤 啓一, 佐藤 慎哉, 高
橋 智, 最上 徹, 林 祐太郎, 郡 健
二郎: 磁性ナノ粒子を用いた温熱治療の
開発と再燃性前立腺がんに対する免疫
賦活機構の解明。第 101 回日本泌尿器科
学会総会、2013.4.25-28、札幌市
Kawai Noriyasu, Kobayashi Daichi,
Etani Toshiki, Naiki Taku, Yamada
Kenji, Ikegami Yosuke, Kanemoto
Kazuhiro, Fukuta Katsuhiko, Tozawa
Keiichi, Kohri Kenjiro: Synergism
between IL-2 and/or anti-regulatory
t cell antibody injection and
hyperthermic treatment using
nano-scale magnetite conjugated
cationic liposome effect cancer
immune therapy. 第 32 回国際泌尿器科
学会 (SIU) 2012.9.30-10.4、福岡市
小林 大地, 河合 憲康, 佐藤 慎哉,
内木 拓, 山田 健司, 戸澤 啓一, 最
上 徹, 惠谷 俊紀, 高橋 智, 郡 健
二郎: 磁性体を用いた治療とドセタキセ
ルの併用治療はホルモン耐性前立腺癌
に有効である。第 71 回日本癌学会学術
総会、2012.9.19-21、札幌市
Kawai Noriyasu, Naiki Taku, Etani
Toshiki, Kobayashi Daichi, Ikegami
Yosuke, Ando Ryosuke, Hashimoto
Yoshihiro, Tozawa Keiichi, Kohri
Kenjiro: Adverse effect of
radiofrequency capacitive
hyperthermia with magnetite on blood
vessel walls: An agar phantom study.

The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine, 2012.8.29-31, Kyoto

小林 大地：MLC を用いた再燃前立腺癌・骨手に治療の基礎研究。第7回 Basic Urology Research Seminar、2012.8.25、大分市

河合 憲康：癌骨転移の新しい治療法。RANPARK Launch Symposium in Nagoya、2012.7.13、名古屋市

河合 憲康、恵谷 俊紀、小林 大地、内木 拓、戸澤 啓一、郡 健二郎：磁性体を併用したサーモトロン RF-8 による深部リンパ節転移巣治療時の副作用のシミュレーション。第26回ハイパーサーミア研究会、2012.7.7、名古屋市

河合 憲康：磁性微粒子を用いて癌転移を治療する。第54回医療 ICT に関する座談会、2012.5.30、横浜市

小林 大地、河合 憲康、佐藤 慎哉、内木 拓、山田 健司、池上 要介、安藤 亮介、福田 勝洋、戸澤 啓一、小林 猛、白井 智之、郡 健二郎：前立腺癌骨転移に対する磁性体を用いた新しい治療法の開発。第100回日本泌尿器科学会総会、2012.4.21-24、横浜市

小林 大地、河合 憲康、佐藤 慎哉、内木 拓、山田 健司、池上 要介、安藤 亮介、福田 勝洋、戸澤 啓一、郡 健二郎：磁性ナノ粒子(マグネタイト)投与によるホルモン耐性前立腺癌に対する新しい治療法の開発。第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3-5、名古屋市

河合 憲康、小林 大地、佐藤 慎也、小林 猛、内木 拓、成山 泰道、橋本良博、戸澤 啓一、佐々木 昌一、林 祐太郎、白井 智之、郡 健二郎：前立腺癌骨転移巣に対する温熱治療に向けた基礎研究：ラット前立腺癌大腿骨浸潤モデルの開発。第99回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21-24、名古屋市

小林 大地、河合 憲康、山田 健司、安藤 亮介、窪田 泰江、梅本 幸裕、藤田 圭治、佐々木 昌一、佐藤 慎也、小林 猛、白井 智之、郡 健二郎：前立腺癌の骨転移に対する新しい温熱治療法の開発。第99回日本泌尿器科学会総会、2011.4.21-24、名古屋市

〔図書〕(計1件)

恵谷 俊紀 全身合併症と周術期管理：泌尿器科レジデントマニュアル
監修：郡健二郎、医学書院 2011年

6. 研究組織

(1)研究代表者

恵谷 俊紀 (Etani Toshiki)
名古屋市立大学・医学研究科・臨床研究医
研究者番号：30600754

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

河合 憲康 (Kawai Noriyasu)
名古屋市立大学・医学研究科・講師
研究者番号：20254279

小林 大地 (Kobayashi Daichi)
名古屋市立大学・医学研究科・研究員
研究者番号：80570704