

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701027

研究課題名(和文) 局所温熱化学療法は転移リンパ節に対しても有効な治療法となりうるか

研究課題名(英文) Is local chemohyperthermia also feasible for metastatic lymph node?

研究代表者

吉田 素平 (Yoshida, Motohira)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60380218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円、(間接経費) 510,000円

研究成果の概要(和文)：消化器癌治療における低侵襲治療には限界が存在し、早期癌(胃・大腸)の治療はリンパ節転移の有無のみで侵襲度が大きく異なるのが現状である。金属磁性体と抗癌剤を同時包埋したリポソーム(DML)に誘導加熱を行うことで腫瘍局所と所属転移リンパ節を同時に治療することを目的とし、実験を行った。リンパ節転移を有する腫瘍モデルの盲腸の原発巣に免疫DMLを注入し、転移リンパ節を染色して金属磁性体の移行を調べたが満足のごく集積は認められず、新たにマイクロバブルリポソームを作製した。その結果、マイクロバブルリポソームは転移リンパ節への取り込みがDMLよりも高い結果が得られ、これを用いて現在も実験を継続中である。

研究成果の概要(英文)：We have developed docetaxel-embedded magnetoliposome (DML) and reported its feasibility for tumor local chemo-hyperthermia with induction heating. In our report, this treatment have seemed to be effective not only to tumor local but also to metastatic lymph node. We examined whether this treatment was feasible also for metastatic lymph node or not in this study. DMLs were not accumulated in metastatic lymph nodes as our expected, thus, we newly developed micro-bubble liposome. We clarified its effectiveness for more accumulation to metastatic lymph node than DML. We have continued this study using micro-bubble liposome.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：癌 転移リンパ節 温熱化学療法

1. 研究開始当初の背景

近年、消化器癌治療では、腹腔鏡手術や内視鏡治療による低侵襲治療の発展が目覚ましい。ただし、これらの治療にも限界や制限が存在し、例えば、早期癌(胃・大腸)に対しての現在の治療方針ではリンパ節転移の有無のみで治療の侵襲度が大きく異なる。

我々のグループでは腫瘍に対する温熱療法の研究を行ってきたが、温熱療法は副作用の少ない低侵襲な癌治療法の一つである。ただし、43 以上の熱が加わると腫瘍のみならず、正常周囲組織にも不可逆的な障害が生じ、逆に低温では効果が減弱してしまうという弱点があった。そこで、誘導加熱(金属磁性体に交流磁場をかける)を応用することで、腫瘍選択的な加熱を実現し、さらに抗癌剤を併用することで低い温度(43 以下)でも十分な抗腫瘍効果が得られるという二つの工夫で温熱療法の弱点が補えるものと考え、一度の投与で腫瘍選択的に温熱化学療法が行えるよう、リポソームに抗癌剤(ドセタキセル)と金属磁性体(マグネタイト)を同時包埋した DML を新規に開発し、実際にヒト胃癌皮下腫瘍モデルのマウスに投与して治療を行い、良好な抗腫瘍効果を得ることに成功し、また、同時に DML が腫瘍近傍のリンパ節に移行することも証明されたため、これを応用して早期癌のリンパ節転移も同時に治療を行える可能性が示唆されたのが、本研究の背景である。

2. 研究の目的

金属磁性体と抗癌剤を同時包埋したリポソーム(DML)に誘導加熱を行うことで腫瘍局所の抗腫瘍効果を証明し、さらに腫瘍局所のみならず所属転移リンパ節に移行した DML によって転移リンパ節も同時に治療を行うことが可能であることを明らかにする。また、DML に抗腫瘍抗体を標識した免疫 DML を用いることで、その抗腫瘍効果の増強が可能かどうかを確認することを目的とする。

3. 研究の方法

(実験 1)リンパ節転移を有する腫瘍モデルの作製と免疫 DML の作製

ヒト胃癌細胞株 NCI-N87(HER2 過剰発現)をヌードマウス 18 匹の盲腸腸間膜側の漿膜下に移植。その後、3,4,5,6,7,8 週後に各々 3 匹ずつ再開腹し、盲腸腸間膜リンパ節を摘出して検鏡し、転移の有無を調べる。この実験で所属リンパ節転移が認められるようになる週数を把握するとともに、以後の実験で用いるモデルとして完成させる。また、DML の表面に抗腫瘍モノクローナル抗体を標識しその性状を電子顕微鏡にて評価する。尚、モノクローナル抗体は抗 HER2 抗体を用いるが、標識方法については既に我々のグループで確立されており、同方法を用いることとする。

(実験 2)免疫 DML が所属転移リンパ節に移行することの証明

実験 1 で作製したモデルの盲腸の原発巣に免疫 DML を注入し、3,6,12,24,48,72 時間後に犠牲死させて転移リンパ節を摘出する(各 n=6)。リンパ節をベルリンブルー染色して金属磁性体の移行を証明し、さらに Marchettini の方法に従って HPLC にてドセタキセル濃度を測定する。

(実験 3)免疫 DML 誘導加熱の所属転移リンパ節に対する抗腫瘍効果の検討

実験 2 で作製したモデルの盲腸の原発巣に薬剤を注入し、抗腫瘍効果を検討する。

group 1 : PBS 0.1 ml を投与し、磁場を印加する群(コントロール群)

group 2 : 免疫 DML 投与、磁場印加なし群

group 3 : タキソテールのみを投与する群

group 4 : マグネタイトのみリポソームに包埋(ML)、磁場を印加する群

group 5 : 免疫 DML 投与、磁場印加あり群

(各 group は n=12)

1,3,7,14 日後に各々犠牲死させて(各 n=3)原発巣、転移リンパ節、各臓器、血液を採取する。原発巣、転移リンパ節は最大断面で半切して組織標本を作製し、残りは凍結保存する。各臓器、血清も凍結保存して以後の実験で使用する。ただし、薬剤投与量、治療時間等の治療条件は実験 1 と同じとする。抗腫瘍効は TUNEL,HE 染色で apoptotic index を算出し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期測定を行い、腫瘍内 TNF 定量を ELISA 法にて行うことで評価する。

(実験 4)免疫 DML 誘導加熱後の免疫 DML の体内動態の解析

実験 3 で採取したサンプルを用い、DML の体内動態を解析する。各群の原発巣、転移リンパ節、各臓器(肝、脾、肺、腎)、血清をそれぞれ前処理(アセトニトリルを加えてホモジナイズし、遠心後に上清を乾燥濃縮)し、HPLC にてドセタキセル濃度を測定する。

(実験 5)免疫 DML 誘導加熱の副作用の検討

実験 4 で採取した血液を用いて各群の血球成分の計測を行い、骨髄抑制についての検討を行う。実験 3 の際の体重変化も併せて評価する。

4. 研究成果

(実験 1)リンパ節転移を有する腫瘍モデルの作製と免疫 DML の作製

ヒト胃癌細胞株 NCI-N87(HER2 過剰発現)をヌードマウス 18 匹の盲腸腸間膜側の漿膜下に移植。その後、3,4,5,6,7,8 週後に各々 3 匹ずつ再開腹し、盲腸腸間膜リンパ節を摘出して検鏡し、転移の有無を調べた。その結果、リンパ節転移を生じた個体はわずかであった。そのため、細胞株を MKN45 に変更して再度同条件でモデルを作成したが、同様であ

った。そのため、さらに細胞株を DLD-1 に変更してモデル作成を施行したところ、転移モデルが確立された。具体的には、ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 をヌードマウス 18 匹の盲腸腸間膜側の漿膜下に移植した。8 週後に 2 匹の転移が認められた (図 1)。



図 1 盲腸腸間膜からの転移モデル

(実験 2) 免疫 DML が所属転移リンパ節に移行することの証明

実験 1 で作製したモデルの盲腸の原発巣に免疫 DML を注入し、3, 6, 12, 24, 48, 72 時間後に犠牲死させて転移リンパ節を摘出し (各 n=6)、リンパ節をベルリンブルー染色して金属磁性体の移行の証明を試みたが、満足のいく集積は認められなかった。そこで、今回我々は、新たにマイクロバブルリポソームを作製した。マイクロバブルリポソームを用いることで、転移リンパ節への集積の改善を図った。マイクロリポソームに包埋する抗癌剤はドセタキセルでは現時点では包埋不可能なため、ドキソルビシン (DOX) に変更した。よって、研究 3、4、5 に関しては実験方法の変更を行うこととなった。以下に詳細な結果を示す。

(改良実験 1) マイクロバブルリポソームの作製

マイクロバブルリポソームは、薄膜法により調整した。マイクロバブルリポソームはエクストルーダー法により、粒子径を 100nm に整えた。

(改良実験 1 結果)

ポジティブ染色法で染色したマイクロバブルリポソームを電子顕微鏡で観察した (図 2)。リポソーム内部のマイクロバブルが確認できた。

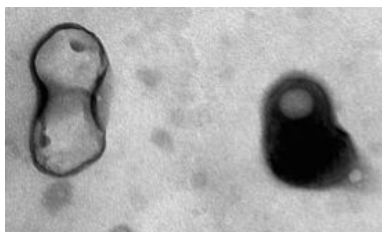


図 2 マイクロバブルリポソーム

(改良実験 2) マイクロバブルリポソームの殺細胞効果の検討

96 ウェルに DLD-1 細胞を 1×10^4 播種し、マイクロバブルリポソームを加え超音波を照射した。MTT アッセイ法にて細胞増殖を評価した。超音波照射条件は、 2.5 kW/cm^2 、15 秒とした。DOX の濃度は $5 \mu\text{g/ml}$ とした。

(改良実験 2 結果)

マイクロバブルリポソームと DOX を投与し超音波処理した群は、コントロール群、マイクロバブルリポソーム単独群、および超音波処理のみ群に対して有意差があった。しかし、DOX 単独群とは有意差が認められなかった (図 3)。マイクロバブルリポソームの殺細胞効果を確認することができた。

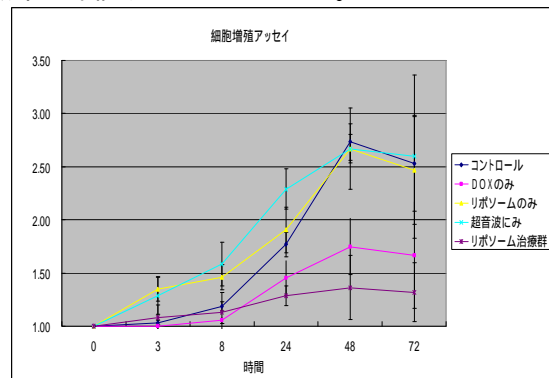


図 3 殺細胞効果の評価

(改良実験 3) DOX の細胞内への取り込みの評価

マイクロバブルリポソームの殺細胞効果の向上理由として、DOX の細胞への取り込み効率の上昇が考えられる。蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(改良実験 3 結果)

超音波処理した 24 時間後の DOX の細胞への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した (図 4)。DOX の細胞内への取り込みが観察された。

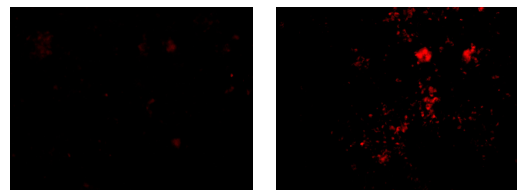


図 4 DOX の細胞内への取り込み (左: DOX のみ。右: マイクロバブルリポソーム併用)

(改良実験 4) マイクロバブルリポソームの抗腫瘍効果の検討

ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 をヌードマウス 14 匹の皮下に移植した。腫瘍が形成された後、マイクロバブルリポソームと DOX を投与し、超音波処理を行った。超音波照射条件は、 1 kW/cm^2 、120 秒とした。DOX の投与量は $100 \mu\text{g}$ とした。腫瘍体積が 150 mm^3 を超えた時点でマイクロバブルリポソームと DOX を投与し、以後腫瘍体積を測定した (図 5)。コントロール群とマイクロバブルリポソーム群で有意差があったが、同様にコントロール群と DOX

単独群でも有意差があった。マイクロバブルリポソーム群と DOX 単独群では有意差はなかったが、処理後 3 日目まではマイクロバブルリポソーム群の方が高い抗腫瘍効果が見られた。これは DOX の腫瘍組織への早期の取り込み効果が考えられる。

図 5 各群における腫瘍体積の推移

以上の結果から、転移初期の治療法として、マイクロバブルリポソームは転移リンパ節への取り込みが DML よりも高い可能性が示唆された。DML から薬剤を変更して実験を行ったため、予定の期間内では期待された実験結果を導きだすことができなかったが、マイクロバブルリポソームが転移リンパ節への集積が期待できることから、マイクロバブルリポソームへ金属磁性体を包埋してしようすることで、誘導加熱が行えるように現在も実験を継続している状況である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 素平 (Yoshida, Motohira)

愛媛大学・医学部附属病院・講師 (病院
教員)

研究者番号: 60380218

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし