

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10603

研究課題名(和文) MCL温熱治療による高リスク表在性および浸潤性膀胱がんに対する新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapies for high-risk superficial and invasive bladder cancer by MCL thermotherapy

研究代表者

高田 英輝 (Takada, Hideki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10747611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：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)を発熱体とする温熱治療(MCL Heat Therapy)を開発し、様々ながんの増殖抑制効果を報告してきた。その研究で、MCL Heat TherapyのMHC分子を介した強い抗腫瘍免疫の誘導を見出した。今回、MCLを膀胱注入し交番磁場を照射することで、Th1およびCTLへの誘導を強化し、有意な腫瘍縮小効果を証明した。さらに、抗TGF- β 抗体および抗IL-6抗体を投与することでTh-17、Tregへの分化誘導を抑制し、Th1への誘導が強化され、より強い腫瘍縮小効果を証明した。

研究成果の概要(英文)：As a new therapy that does not require surgical treatment, we developed thermotherapy (MCL Heat Therapy) using positively charged liposome-embedded magnetic nanoparticles (MCL) as a heating element, and prostate cancer We have reported the growth inhibitory effect of various cancers at the beginning. In that study, we found induction of strong antitumor immunity via MHC molecule of MCL Heat Therapy. In this study, we injected MCL bladder and irradiated with an alternating magnetic field to strengthen induction to Th1 and CTL and proved a significant tumor reduction effect. In addition, by administering anti-TGF- β antibody and anti-IL-6 antibody, induction of differentiation into Th-17, Treg was suppressed, induction to Th 1 was strengthened, and demonstrated stronger tumor reduction effect.

研究分野：前立腺がん

キーワード：MCL

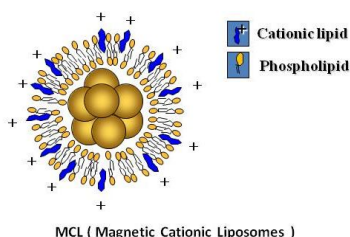
1. 研究開始当初の背景

従来のがん温熱治療は電極で患部を挟み交流電流により加温する誘電加温法である。しかしながら、この加温法では正常組織まで加温してしまうため、十分に加温することは不可能である。そこで私たちは、外科治療が不要な新しい治療法として、正電荷リポソーム包埋型磁性ナノ粒子 (Magnetic Cationic Liposome : MCL) を発熱体とする温熱治療 (MCL Heat Therapy) を開発した。マグネタイト微粒子 (Fe_3O_4) をカチオン性のリン脂質で被覆した MCL を腫瘍組織に注入し、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腫瘍組織のみを選択的に加温できるため、非常に高い治療効果が得られる。私たちは、この方法を **MCL Heat Therapy** と名付けた。この治療法は従来の誘電加温法の欠点を克服する治療法である。

膀胱がんにおいて表在性がんの占める割合は約 70% と報告されている。しかし、膀胱内再発率は約 80% と高い。再発時の大部分は表在性がんであるが、再発後の 10 ~ 30% は浸潤性がんであり¹⁾、浸潤性がんの 5 年生存率は T2、T3、T4 でそれぞれ 80%、40%、25% と予後不良である。したがって膀胱がんの再発予防は、膀胱がんによる死亡率の低下の一端を担うことは明白である。

2. 研究の目的

高容量の Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) を膀胱内に注入することによる BCG 膀胱内注入療法は臨床的有効性が最も確立したがんに対する免疫治療であり、表在性膀胱がんの標準的治療となっている。しかしながら、BCG 注入療法の問題点は、生菌を使用していることから全身への菌播種の危険性を回避することはできない。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) を発熱体とする新たな温熱治療 (MCL Heat Therapy) を開発し、前立腺がんをはじめ様々ながんの増殖抑制効果を報告してきた。その研究で私たちは、MCL Heat Therapy の MHC 分子を介した強い抗腫瘍免疫の誘導を見出した。本研究では MCL を膀胱内に注入し表在性膀胱がんに対する新たな保存的根治的治療法の開発をすることが目的である。



3. 研究の方法

申請者グループはこれまでに MCL Heat Therapy を用いて様々な腫瘍を完全退縮させることに成功している。さらに最新の研究で、抗腫瘍免疫の強い誘導を見出した。本研究では、表在性膀胱がんに対して MCL 膀胱内注入療法を施行し、新しい治療法としての可能性を検討する。

1. in vitro の研究

MCL の膀胱がん細胞への吸着および取り込みの確認。HSP70 の発現、CD4・CD8 陽性 T リンパ球の発現、さらに免疫誘導サイトカイン (IL-2, IFN-gamma) などの免疫応答細胞の発現の確認。

2. in vivo の研究

膀胱がんをマウス両側背部に移植、片側のみを MCL Heat Therapy を用いて治療し、未治療側の腫瘍サイズの計測と免疫応答細胞の発現の確認。さらに MCL を膀胱内に注入し MCL の膀胱がん細胞への吸着および取り込みによる実際の免疫応答による腫瘍の退縮の検討。

4. 研究成果

ヒト膀胱がん細胞株における MCL の吸着の検討

ヒト膀胱がん由来の 4 つの細胞株 (RT4, RT112, 5637, T24) における MCL の吸着を確認。さらにがん細胞が死滅しない温度 (42 °C) に 30 分間暴露し、HSP70, IL-2, IFN- γ の発現亢進を確認。

高温度暴露によるヒト膀胱がん細胞株における免疫誘導サイトカインの検討

がん細胞が死滅しない温度 (43 °C) に 30 分間暴露を繰り返し施行し、免疫誘導サイトカインの発現量を計測した。IFN- γ , IL-12, TGF- β , IL-6 の発現亢進を認めた。

動物モデルの作成

0.05% の BBN の自由飲水により浸潤性膀胱がんマウスを作成。

MCL の膀胱内注入における MCL の吸着の検討

作成した浸潤性膀胱がん動物モデルに MCL を膀胱内注入し、MCL の吸着および取り込みを確認。

膀胱がん皮下腫瘍に対する MCL Thermotherapy の治療効果の検討

BALB / c Slc-nu/nu に T24 : 1×10^6 cells / 100 μ l (in PBS) を背中左右に皮下移植。MCL の注入の有無により 2 群に分けた (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 μ /回、2 方向から腫瘍中心部に 5 μ /min の速度で注入。両群共に交番磁場を照射、照射時間は 30min/回、2 日おきに施行し、施行前に毎回 MCL を注入した。両側の腫瘍体積の変化を評価、MCL 注入群に有意な腫瘍縮小効果を認めた。病理組織学的検査において、MCL 注入群は有意な necrosis area の拡大を認めた。鉄染色にて necrosis area の中心に MCL の存在を確認した。また免疫組織化学的評価にて HSP-70, IL-2, IFN-gamma, CD4, CD8 の発現亢進を認めた。

MCL 膀胱内注入療法とがん免疫療法の併用による治療効果の検討

がん免疫治療を高率よく行うためには、Th1 および CTL への誘導を抑制する Treg、また血管新生を介したがん増殖促進機構をもつ Th17 への誘導を抑制し、Th1 主導免疫の導入が重要である。抗 TGF- β 抗体および抗 IL-6 抗体を投与、Th-17, Treg への分化誘導を抑制し、Th1 への誘導が強化されると考えた。

1) 膀胱がん動物モデルにおける治療効果の検討

作成した高リスク表在性膀胱がん（上皮内がん）マウスを 無治療群 MCL 膀胱注入群 MCL 膀胱注入 + 交番磁場照射群 MCL 膀胱注入 + 交番磁場照射群 + がん免疫治療群（抗 TGF- β 抗体, 抗 IL-6 抗体）に分類。抗体は腹腔内投与とする。MCL 膀胱注入 + 交番磁場照射群 + がん免疫治療群において有意な腫瘍縮小効果を認めた。

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）

1. Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Iida Keitaro, Etani Toshiki, Kato Hiroyuki, Suzuki Shugo, Yamashita Yoriko, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro, Takahashi Satoru: GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis. *Oncotarget*, 9(22):15847-15859, 2018
2. Okada Atsushi, Hamamoto Shuzo, Taguchi Kazumi, Unno Rei, Sugino Teruaki, Ando Ryosuke, Mizuno Kentaro, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Kidney stone formers have more renal parenchymal crystals than non-stone formers, particularly in the papilla region, *BMC Urology*, 18:19, 2018

3. Nagai Takashi, Naiki Taku, Iida Keitaro, Etani Toshiki, Ando Ryosuke, Hamamoto Shuzo, Sugiyama Yosuke, Akita Hidetoshi, Kubota Hiroki, Hashimoto Yoshihiro, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro: Early abiraterone acetate treatment is beneficial in Japanese castration-resistant prostate cancer after failure of primary combined androgen blockade. *Prostate International*, 6(1):18-23, 2018
4. Kato Taiki, Mizuno Kentaro, Naiki Taku, Nishio Hidenori, Iida Keitaro, Moritoki Yoshinobu, Ando Ryosuke, Okada Atsushi, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro: Urothelial carcinoma of the urinary bladder in a 12-year-old girl: A case report with immunohistological analysis and a review of the literature. *Urology Case Reports*, 17:29-31, 2018
5. Taguchi Kazumi, Hamamoto Shuzo, Okada Atsushi, Unno Rei, Kamisawa Hideyuki, Naiki Taku, Ando Ryosuke, Mizuno Kentaro, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Genome-wide gene expression profiling of randall's plaques in calcium oxalate stone formers. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(1): 333-347, 2017 (doi: 10.1681/ASN.2015111271)
6. Nozaki Satoshi, Naiki Taku, Hamamoto Shuzo, Ando Ryosuke, Iida Keitaro, Kawai Noriyasu, Mizuno Kentaro, Okada Atsushi, Umemoto Yukihiro, Yasui Takahiro: A case of delayed radiation myelopathy of the thoracic vertebrae following low dose radiation therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Urology Case Reports*, 11:66-68, 2017(doi: 10.1016/j.eucr.2017.01.005.)
7. Sugiyama Yosuke, Naiki Taku, Kondo Masahiko, Iida Keitaro, Kondo Yuki, Tasaki Yoshihiko, Kataoka Tomoya, Hotta Asami, Yasui Takahiro, Kimura Kazunori: Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone caused by carboplatin after switching from cisplatin in a metastatic urethral cancer patient. *Urology Case Reports*, 12:17-19, 2017

8. Unno Rei, Taguchi Kazumi, Okada Atsushi, Ando Ryosuke, Hamamoto Shuzo, Kubota Yasue, Zuo Li, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro, Yasui Takahiro: Potassium-sodium citrate prevents the development of renal microcalculi into symptomatic stones in calcium stone-forming patients. International Journal of Urology, 2017 (doi: 10.1111/iju.13242)
9. Tanaka Yutaro, Okamura Takehiko, Nagai Takashi, Kobayashi Daichi, Kobayashi Takahiro, Akita Hidetoshi, Yasui Takahiro, Moritoki Yoshinobu: A study of patients with primary mediastinal germ cell tumors treated using multimodal therapy. Advances in Urology, 2017: Article ID 1404610, 2017(doi: 10.1155/2017/1404610.)
10. Nagai Takashi, Okamura Takehiko, Taki Yosuke, Tanaka Yutaro, Kobayashi Daichi, Kobayashi Takahiro, Akita Hidetoshi, Yasui Takahiro: Extramedullary plasmacytoma of the ureter in an HIV-positive patient. International Cancer Conference Journal, 2017(doi:10.1007/s13691-017-0300-3)
11. Etani Toshiki, Naiki Taku, Yamaguchi Sachiyo, Mori Saori, Nagai Takashi, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Mogami Tohru, Yasui Takahiro: Antimicrobial susceptibility of pathogens in acute uncomplicated cystitis cases in the Urology Department of a community hospital in Japan: comparison with treatment outcome and hospital-wide antibiogram. Journal of Infection and Chemotherapy, 23(10):692-697, 2017(doi: 10.1016/j.jiac.2017.07.011.)
12. Naiki Taku, Iida Keitaro, Kawai Noriyasu, Etani Toshiki, Ando Ryosuke, Nagai Takashi, Tanaka Yutaro, Hamamoto Shuzo, Hamakawa Takashi, Akita Hidetoshi, Sugiyama Yosuke, Yasui Takahiro: A pilot study of gemcitabine and paclitaxel as third-line chemotherapy in metastatic urothelial carcinoma. The Japanese Association of Rural Medicine, 12(2):105-111, 2017
13. Nagai Takashi, Okamura Takehiko, Tanaka Yutaro, Kobayashi Daichi, Kobayashi Takahiro, Akita Hidetoshi, Yasui Takahiro: The neutrophil-to-lymphocyte ratio as a prognostic factor for long-term Interleukin-2 use in renal cell carcinoma. Immunome Research, 13(3):10000145, 2017(doi: 10.4172/1745-7580.1000145)
14. Naiki Taku, Etani Toshiki, Naiki-Ito Aya, Fujii Kana, Ando Ryosuke, Iida Keitaro, Nagai Takashi, Sugiyama Yosuke, Nakagawa Motoo, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro: Metastatic urothelial carcinoma with glandular differentiation that confirmed the response by autopsy specimen to second-line mFOLFOX6 (Fluorouracil, Oxaliplatin, and Leucovorin) plus bevacizumab chemotherapy. Case Reports in Oncology, 10:1057-1064, 2017(doi: 10.1159/000484597)
15. Sugino Teruaki, Ando Ryosuke, Unno Rei, Iida Keitaro, Naiki Taku, Hamamoto Shuzo, Mizuno Kentaro, Okada Atsushi, Umemoto Yukihiko, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Hayashi Yutaro, Inaki Anri, Kayano Daiki, Kinuya Seigo, Yasui Takahiro: Complete remission of metastatic pheochromocytoma in 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy after a single session of 131I-metaiodobenzylguanidine therapy: a case report. BMC Research Notes, 10:750, 2017

5. 学会発表

1. (講演 講師) 河合 憲康: 医工連携による前立腺癌新規治療法の開発。第6回 医・薬・工連携フォーラム 産学連携の推進に向けて、2018.2.9、名古屋市
2. 内木 拓、恵谷 俊紀、内木 綾、飯田 啓太郎、河合 憲康、安井 孝周、高橋 智: エピゲノム変化を介した去勢抵抗性前立腺癌におけるオートファジー制御メカニズムの解明と新規治療法の開発。第33回前立腺シンポジウム、2017.12.9-10、東京都
3. 内木 拓、飯田 啓太郎、恵谷 俊紀、田中 勇太郎、永井 隆、濱川 隆、安藤 亮介、河合 憲康、岡村 武彦、永田 大介、安井 孝周: 高齢の転移性尿

- 路上皮膚癌患者に対する 2nd line GD 療法の検証。第 67 回日本泌尿器科学会中部総会、2017.11.24-27、大阪市
4. 小林 大地、茶谷 亮輔、永井 隆、小林 隆宏、秋田 英俊、岡村 武彦：単孔式腹腔鏡下副腎摘除術の有効性の検討。第 31 回日本泌尿器内視鏡学会総会、2017.11.16-18、徳島市
 5. 安藤 亮介、濱川 隆、内木 拓、濱本周造、岡田 淳志、秋田 英俊、河合 憲康、戸澤 啓一、岡村 武彦、安井 孝周：3 ポート腹腔鏡下膀胱全摘除術の短期術後成績。第 31 回日本泌尿器内視鏡学会総会、2017.11.16-18、徳島市
 6. 内木 拓、安藤 亮介、志賀 一慶、高橋 広城、瀧口 修司、河合 憲康、安井 孝周：憩室炎に伴う S 状結腸膀胱瘻に対して経尿道的操作の併用下に腹腔鏡手術を行った 1 例。第 31 回日本泌尿器内視鏡学会総会、2017.11.16-18、徳島市
 7. 内木 拓、飯田 啓太郎、恵谷 俊紀、田中 勇太郎、永井 隆、安藤 亮介、河合 憲康、岡村 武彦、永田 大介、安井 孝周：高齢の転移性尿路上皮癌患者に対する 2nd line GD 療法の有用性。日本泌尿器腫瘍学会第 3 回学術集会、2017.10.22-23、東京都
 8. 小林 大地、茶谷 亮輔、永井 隆、小林 隆宏、秋田 英俊、岡村 武彦：ドセタキセル抵抗性去勢抵抗性前立腺癌に対するカバジタキセルの初期治療成績。第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017.10.20-22、横浜市
 9. 内木 拓、杉山 洋介、恵谷 俊紀、飯田 啓太郎、田中 勇太郎、永井 隆、安藤 亮介、河合 憲康、秋田 英俊、永田 大介、安井 孝周：転移性尿路上皮癌患者に対するショートハイドレーション GC 療法の有用性の検証。第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017.10.20-22、横浜市
 10. 河合 憲康、下平 政史、小林 大地、永井 隆、田中 勇太郎、飯田 啓太郎、恵谷 俊紀、内木 拓、安藤 亮介、畦元 将隆、安井 孝周：泌尿器系腫瘍に対する IVR を用いた選択的マグネタイト温熱治療への挑戦。第 55 回日本癌治療学会学術集会、2017.10.20-22、横浜市
 11. Okamura Takehiko, Nagai Takashi, Tanaka Yutaro, Kobayashi Daichi, Kobayashi Takahiro, Akita Hidetoshi, Yasui Takahiro: Evaluation of the dwell-time difference in intravesical bacillus Calmette-Guèrin therapy. SIU2017, 2017.10.19-22, Lisbon, Portugal
 12. 柳瀬 貴弘、小林 大地、永井 隆、小林 隆宏、秋田 英俊、岡村 武彦：ドセタキセル抵抗性去勢抵抗性前立腺癌に対するカバジタキセルの初期治療成績。第 66 回日本農村医学会学術総会、2017.10.5-6、那覇市
 13. 茶谷 亮輔、秋田 英俊、永井 隆、小林 大地、小林 隆宏、岡村 武彦、小林 周、高橋 佐智子：長距離旅行が可能となった間欠式バルンカテーテルの導入症例。第 66 回日本農村医学会学術総会、2017.10.5-6、那覇市
 14. 秋田 英俊、岡村 武彦、小林 隆宏、小林 大地、永井 隆、茶谷 亮輔、柳瀬 貴弘：当院における腹腔鏡下膀胱全摘術。第 66 回日本農村医学会学術総会、2017.10.5-6、那覇市
 15. Naiki Taku, Naiki-ito Aya, Etani Toshiki, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Tanaka Yutaro, Nagai Takashi, Kawai Noriyasu, Takahashi Satoru, Yasui Takahiro: GPX2 overexpression is involved in proliferation via ROS regulation in urothelial carcinoma. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017.9.28-30、横浜市
 16. 河合 憲康：泌尿器科内視鏡手術の現状。医療介護ものづくり研究会 医療部会 医療機器開発ワーク(4 回目)、2017.7.25、名古屋市
 17. 内木 拓、内木 綾、恵谷 俊紀、永井 隆、飯田 啓太郎、安藤 亮介、河合 憲康、戸澤 啓一、高橋 智、安井 孝周：天然食品由来フラボノイドを用いた前立腺癌多段階抑制効果の検証。第 26 回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会、2017.7.13-14、三重県津市
 18. 高田 英輝、岩月 正一郎、梅本 幸裕：膀胱 nephrogenic metaplasia の 1 例。第 275 回日本泌尿器科学会東海地方会、2017.6.10、名古屋市
 19. 河合 憲康：ウエルフェア健康大学 前立腺がんの兆候～こんな症状が出たらがんかも～。第 20 回国際福祉健康産業展ウエルフェア 2017、2017.5.18-20、名古屋市
 20. Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Etani Toshiki, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Nagai Takashi, Kawai Noriyasu, Takahashi Satoru, Yasui Takahiro: GPX2 is a prognostic marker and has a therapeutic potential via regulation of oxidative stress in bladder cancer. American Urological Association Annual Meeting 2017, 2017.5.12-16,

- Boston, USA
21. Nagai Takashi, Naiki Taku, Iida Keitaro, Etani Toshiki, Ando Ryosuke, Kawai Noriyasu, Akita Hidetoshi, Okamura Takehiko, Yasui Takahiro: Reduction of Skeletal Muscle Index as a predictive factor in patients with urothelial carcinoma. American Urological Association Annual Meeting 2017, 2017.5.12-16, Boston, USA
 22. 小林 大地、永井 隆、田中 勇太郎、小林 隆宏、秋田 英俊、岡村 武彦、安井 孝周: ドセタキセル抵抗性去勢抵抗性前立腺癌に対するカバジタキセルの初期治療成績。第105回日本泌尿器科学会総会、2017.4.21-24、鹿児島市
 23. Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Etani Toshiki, Nagai Takashi, Iida Keitaro, Ando Ryosuke, Kawai Noriyasu, Takahashi Satoru, Yasui Takahiro: Luteolin has multi-protective role for carcinogenesis and castration-resistant growth in prostate cancer. 第105回日本泌尿器科学会総会、2017.4.21-24、鹿児島市
 24. Kawai Noriyasu, Nagai Takashi, Iida Keitaro, Etani Toshiki, Hamakawa Takashi, Naiki Taku, Ando Ryosuke, Kubota Yasue, Azemoto Masataka, Yasui Takahiro: Challenge to selective hyperthermia with magnetic nanoparticle using the IVR for urological cancer metastases. 第105回日本泌尿器科学会総会、2017.4.21-24、鹿児島市
 25. 小林 大地、永井 隆、田中 勇太郎、小林 隆宏、秋田 英俊、岡村 武彦: 高齢前立腺癌に対する治療の検討。第274回日本泌尿器科学会東海地方会、2017.3.19、名古屋市

〔雑誌論文〕(計15件)

〔学会発表〕(計25件)

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 英輝 (Takada Hideki)
名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科分野 研究員
研究者番号: 10747611

(2)研究分担者

戸澤 啓一 (Tozawa Keiichi)
名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科分野
研究者番号: 40264733

(3)連携研究者

河合 憲康 (Kawai Noriyasu)
名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科分野
研究者番号: 20254279

(4)研究協力者

安藤 亮介 (Ando Ryosuke)
名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科分野
研究者番号: 30381867

(5)研究協力者

内木 拓 (Naiki Taku)
名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科分野
研究者番号: 50551272

(6)研究協力者

小林 大地 (Kobayashi Daichi)
名古屋市立大学大学院医学研究科
腎・泌尿器科分野 研究員
研究者番号: 80570704