

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592055
 研究課題名（和文）抗体結合型磁性ナノ粒子を用いた前立腺癌転移巣選択的磁場誘導加温法の基礎研究
 研究課題名（英文） Establishment of magnetic field induced interstitial hyperthermic therapy for specific metastatic lesion of prostate cancer using antibody conjugated magnetic nano-partilce
 研究代表者
 河合 憲康 (KAWAI NORIYASU)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：20254279

研究成果の概要（和文）：

- (1) 動物実験モデル作成：骨浸潤モデルの腫瘍塊に直接抗体を結合していない磁性ナノ粒子を注入し、交番磁場照射をすることにより磁場誘導組織内加温法を実施した。結果としては骨浸潤巣における前立腺癌腫瘍塊は縮小した。
- (2) 前立腺細胞膜特異抗原 prostate membrane specific antigen：PMSA に対する抗体（抗 PMSA 抗体）の性状の確認をした。F344 ラットの前立腺、膀胱、腎臓、心臓、肺、大腸、肝臓を用いて抗 PMSA 抗体を用いた免疫染色を実施したところ、前立腺が多臓器より強く染色された。抗 PMSA 抗体は前立腺癌細胞膜に選択的に結合することがわかった。
- (3) 抗 PMSA 抗体結合型磁性ナノ粒子の作成：PMSA を用いた AML の作成は、成功率が低かった。磁性ナノ粒子の形状から再検討する必要性があった。

研究成果の概要（英文）：

- (1) Bone invasion model: Interstitial hyperthermia with magnetite demonstrated suppression of bone invasion of prostate cancer.
- (2) Prostate membrane specific antigen: The character of anti PMSA antibody was examined. Immunohistochemistry revealed moderate adhesion of anti PMSA antigen to prostate cancer cells.
- (3) Manufacturing of anti PMSA antibody -conjugated magnetite: The success rate was low in the making of the AML using PMSA. We should review the form of the magnetite nanoparticle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌骨転移、磁場誘導組織内加温法、抗体結合型磁性ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

私たちはサブミクロンオーダーの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を開発した。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。実験レベルではマウス悪性黒色腫、ラット脳腫瘍、ハムスター骨肉腫、ウサギ舌ガン等様々な動物と腫瘍において、腫瘍を完全退縮させるといった高い治療効果を得てきた。前立腺がんを対象としてラット前立腺がん皮下移植モデル、ヒト前立腺がん細胞ヌードマウス皮下移植モデルを用いて実験を行い、同様に高い治療効果を得た。また前立腺がん骨転移モデルを用いて、骨転移に対する治療効果も示唆された。しかし、これらの実験は皮下移植腫瘍に直接を注入する方法である。局所注入でしか行うことができない治療法は臨床応用を考えたときにその利用が極めて限定され、価値がなくなる。そこで経静脈的に MCL を投与し、選択的に目的病巣へ到達させる治療法の確立が必要となっていた。

2. 研究の目的

経静脈的に MCL を投与し選択的に目的病巣へ到達させる治療法を確立するために前立腺がん細胞膜抗原 (Prostate-Specific Membrane Antigen; PSMA) に着目した。PSMA は前立腺細胞に特異的な前立腺細胞膜貫通膜タンパクであり、PSA のように分泌されることはない。PSMA に対するモノクローナル抗体を正電荷リポソーム包埋型磁性ナノ粒子に結合させ、抗体結合型磁性ナノ粒子を経静脈投与することにより選択的に前立腺がん原発巣及び転移巣に到達させ、交番磁場照射によって前立腺がん原発巣および転移巣を選択的に治療する治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 前立腺癌骨転浸潤モデルの作成

①7 週齢 F344 ラットにイソフルランで全身麻酔をかける (以降持続吸入) ②ラットをコルク板にのせ仰向けにする③処置用ハサミで大腿前部表皮を切開し、ピンセットおよびディスクポーザブルメスを用いて大腿骨周囲の筋肉を切開し遠位側前部の大腿骨を露出する④Electric handy drill および Diamond file を用いて露出した大腿骨の骨膜除去お

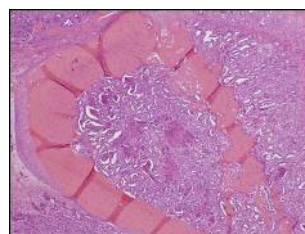
よび表層を擦過し、粗面を形成する⑤細切した PLS-P を 0.55g 粗面を形成した大腿骨直上に移植する⑥移植部周囲の筋肉で PLS-P を包む⑦筋膜を 4-0 バイクリルで縫合する⑧切開した表皮を外科用ホッチキスで閉創する。

組織を移植したラットは、術後 3 週間後にレントゲン撮影、CT 撮影を行い評価した。



右大腿に腫瘍を移植

【図 1】



右大腿の組織像。腫瘍周囲と骨髓内に前立腺癌が浸潤している。

【図 2】

(2) 抗 PMSA 抗体の前立腺癌細胞に対する反応部位の確認

ヒト前立腺癌細胞を細胞免疫染色用チャンバーで培養。パラフィンで固定した後、抗 PMSA 抗体を用いて免疫染色を行った。抗 PMSA 抗体は前立腺癌細胞膜に有意に結合している様子が観察された。

(3) 抗体結合 MCL の作成

N-succinimidyl-3-(2-pyridylthio)propionate (SPDP) を抗 PMSA 抗体溶液に加えて室温で 30 分反応。余剰の SPDP を取り除き、SPDP で処理された抗体は 1,4-dithiothreitol で希釈する。抗 PMSA 抗体 (ab')₂ は抗 PMSA 抗体をペプシンで分解することによって処理する。37°C 12-15 時間反応させ 3M Tris を加えて反応を停止させる。1,4-dithiothreitol 含有 0.1M アセトンバッファーで希釈することにより Fab' 1 本鎖が得られる。Fab' 1 本鎖を EMC-DPPE とともに正電荷リポソーム包埋型磁性ナノ粒子と 4°C 20 時間反応させる。13000G 30 分の遠心分離で J591 結合正電荷リポソーム包埋型磁性ナノ粒子を抽出する。

(4) 抗体結合 MCL の前立腺癌細胞株への吸着試験

①低接着 6 well plate (CORNING) の各 well に培地、Cytodex 1、細胞、を入れ、2 時間 37°C、5%CO₂ インキュベータで培養。次に、抗体結合 MCL (100pg/cell) を添加し 1 時間

37°C、5%CO₂ インキュベータで振盪 (25rpm) 培養する。その後、培地や取り込まなかった AML、Cytodex 1 に接着しなかった細胞などを除くために洗浄を行い、鉄濃度測定を行う。

②鉄濃度測定

②-1 検量線の調整

②-2 試料の調整

②-3 呈色反応

②-4 吸光度測定

②-5 細胞取り込みの算出

の順に行い、前立腺癌細胞株への抗体結合 MCL の取り込みを検討した。しかし、取り込みは不十分な結果であった。

4. 研究成果

前立腺癌骨転移巣の治療法の開発のための、前立腺癌骨浸潤モデルの開発に成功した。このモデルでは、骨表面と腫瘍境界部において、破骨細胞の活性化の様子や、骨基質からサイトカインの放出により腫瘍そのものが増殖する様子も観察できた。また、このモデルを用いて、私たちの MCL を用いた磁場誘導組織内加温法は、骨の浸潤を抑制することや、さらにサイトカインの放出を抑制することにより骨転移巣における腫瘍の増殖を抑制することが解明できた。

抗 PMSA 結合 MCL は、その抗体結合の割合が低く、ヒト前立腺癌細胞株を用いた in vitro での接着実験でも、選択的な接着はしめさなかった。今後 MCL 自体の改良が必要であると考えられた。

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 3 件)

1. Naiki T, Okamura T, Nagata D, Mori Y, Kawai N, Ogawa K, Akita H, Hashimoto Y, Tozawa K, Kohri K : Preoperative Prediction of Neurovascular Bundle Involvement of Localized Prostate Cancer by Combined T2 and Diffusion-weighted Imaging of Magnetic Resonance Imaging, Number of Positive Biopsy Cores, and Gleason Score. Asian Pac J Cancer Prev 2011; 12: 909-13 (査読有り)
2. Okamura Takehiko, Akita Hidetoshi, Ando Ryosuke, Ikegami Yosuke, Naiki Taku, Kawai Noriyasu, Tozawa Keiichi, Kohri Kenjiro: Single monthly bacillus Calmette-Guerin intravesical

instillation is effective maintenance therapy to prevent recurrence in Japanese patients with non-muscle-invasive bladder cancer. International Journal of Clinical Oncology, 2011 Sep
DOI. 10.1007/s10147-011-0314-3 (査読有り)

3. Shido Y, Nishida Y, Suzuki Y, Kobayashi T, Ishiguro N : Targeted hyperthermia using magnetite cationic liposomes and an alternating magnetic field in a mouse osteosarcoma model, J Bone Joint Surg Br. 92. 580-585 2010 (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

1. 河合 憲康、小林 大地、内木 拓、山田 健司、安藤 亮介、福田 勝洋、池上 要介、金本 一洋、秋田 英俊、岡村 武彦、戸澤 啓一、芝本 雄太、郡 健二郎 : 前立腺癌に対する強度変調放射線治療 (IMRT) における内分泌療法併用の意義。第 49 回日本癌治療学会学術集会、2011. 10. 27-29、名古屋市
2. 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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 憲康 (KAWAI NORIYASU)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 20254279

(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・准教授
研究者番号 : 40264733

橋本 良博 (HASHIMOTO YOSHIHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号 : 40244561

安藤 亮介 (ANDO RYOSUKE)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号 : 30381867

郡 健二郎 (KOHRI KENJIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30122047

福田 勝洋 (FUKUTA KATSUHIRO)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：30468251

池上 要介 (IKEGAMI YOSUKE)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：40381868

(3)連携研究者
小林 猛 (KOBAYASHI TAKESHI)
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：10043324