

令和元年6月20日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09961

研究課題名(和文) 局所温熱化学療法による原発巣と所属転移リンパ節の同時治療の挑戦

研究課題名(英文) Treatment for primary lesion and lymph node metastasis by using local chemohyperthermia

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) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：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り、金属磁性体に交流磁場をかけて発熱させる誘導加熱を応用して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43度以下の低い温度でも十分な抗腫瘍効果を得ることに成功した。これを応用し、腫瘍近傍のリンパ節転移も同時に治療する研究を行ったが、転移リンパ節への薬剤の移行を証明する事ができず、実験は途中中止となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験は実験途中であるが、これが実現すれば、早期癌でリンパ節転移を伴う場合でも、内視鏡による治療が可能となる。例えば胃癌の場合、現行では早期癌であっても胃の2/3を切除する必要があるが、本治療を行うことによって胃を全て残すことが可能となり、治療後の食事の制限や体重減少といった後遺症を生じることなく、治療が完結するようになると思われる。

研究成果の概要(英文)：Hyperthermia is one of the minimally invasive treatment for cancer. We have developed chemohyperthermia by using induction heating with docetaxel embedded magnetoliposome (DML). We planned to new experiment treating metastatic lymph node with this DML, but the tumor model have not been established. Therefore, this experiment have been stopped, and we have planned new experiment by using another tumor model and methods.

研究分野：消化管癌低侵襲治療

キーワード：温熱療法 化学療法 誘導加熱 温熱化学療法 消化器癌 リンパ節転移 低侵襲治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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が、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、逆に低温では十分な効果が得られないといった弱点があった。そこで、金属磁性体に交流磁場をかけて発熱させる誘導加熱を応用して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43度以下の低い温度でも十分な抗腫瘍効果が得られるように、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た。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。(International journal of Cancer, 2010)。

2. 研究の目的

上記研究結果を踏まえ、本研究では DML にさらに抗腫瘍抗体を標識した免疫 DML を用い、腫瘍局所のみならず、所属転移リンパ節にも移行した免疫 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かどうかを明らかにし、本治療法が新しい低侵襲癌治療法となる可能性を示すことを目的とした。

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

<方法>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

<方法>実験 2 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

<方法>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。group1:PBS 0.1 ml を投与し、磁場を印加する群(コントロール群、n=12)、group2:免疫 DML 投与、磁場印加なし群(n=12)、group3:タキソテールのみを投与する群(n=12)、group4: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(n=12)、group5:免疫 DML 投与、磁場印加あり群(n=12)とし、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

<方法>実験 4 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 5-1)免疫 DML 誘導加熱の副作用の検討

<方法>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。

(実験 5-2)免疫 DML の改良の余地についての検討

<方法>DML のリポソームについて改良が可能か検討を行う。リポソームを薄膜法にてマイクロバブル化して、細胞内への取り込み効率改善を目指す。96 ウェルに NCI-N87 細胞を 1×10^4 播種し、group1:PBS 0.1 ml を投与(コントロール群、n=12)、group2:DML 投与群(n=12)、group3:マイクロバブル DML 投与群(n=12)、group4:タキソテールのみを投与する群(n=12)にわけて MTT アッセイ法にて細胞増殖を評価し、マイクロバブルリポソームで免疫 DML の細胞増殖効果が高まるかどうかを検討し、免疫 DML の更なる可能性を検討する

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認めなかった。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、結果は同様であった。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 週後に低い確率ながら、数匹で転移が認められた(図1)。



(図1)

(実験2)

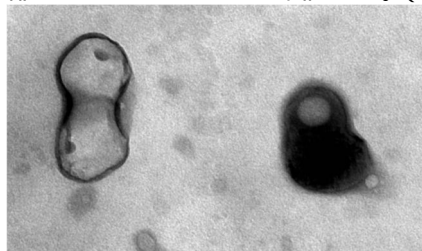
作製したモデルの盲腸腫瘍部分に免疫 DML を注入し、3,6,12,24,48,72 時間後に犠牲死させて転移リンパ節を摘出(各 n=6) ベルリンブルー染色にて金属磁性体のリンパ節への移行証明を試みたが、明らかな集積は認めなかった。リポソームのリンパ管、リンパ節への親和性が低いことが原因と考え、リポソームの改良を行うこととし、腫瘍親和性が高いと言われているマイクロバブルリポソームを新たに作製した。ただし、マイクロリポソームに包埋する抗癌剤は現時点ではドセタキセル、ならびに金属磁性体の包埋方法は確立されておらず、まずは抗癌剤自体を水溶性のドキソルピシン(DOX)に変更して包埋し、投与実験を行った。以下、改良実験の内容、結果を示す。

(改良実験1) マイクロバブルリポソーム作製

マイクロバブルリポソームは、薄膜法により調整。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、リポソーム内部のマイクロバブルを確認した。(図2)



(図2)

(改良実験2) DOX の細胞内取り込み具合の評価

マイクロバブルリポソーム DOX を投与後、DOX の細胞への取り込み効率を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(改良実験2 結果)

マイクロバブルリポソーム DOX を投与後、24 時間後の細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡にて観察し、DOX の細胞内への取り込みが観察された。(図3)

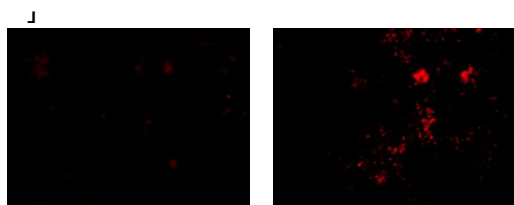


図3 DOX の細胞内への取り込み(左: DOX のみ。右: マイクロバブルリポソーム DOX)

マイクロバブルリポソム内に金属磁性体、ならびに表面への抗体標識については実験施行できず、したがって、誘導加熱を行う実験についても施行できなかった。

5. 主な発表論文等

なし

〔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)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。