様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２１年　４月３０日現　在

研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2005～2008
課題番号：17390348
研究課題名（和文）　ハーセプチン結合マグネトリポソームを用いた乳癌温熱免疫療法の効果発現機序の解明
研究課題名（英文）　Mechanism of immuno-heat therapy for breast cancer using herceptin conjugated magnetoliposome

研究代表者
今井　常夫　(IMAI TSUNEO)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80252245

研究成果の概要：
ハーセプチンが表面に結合したマグネタイトを含んだリポソーム（ＨＭＬ）を開発した。ヌードマウス移植ヒト乳癌皮下腫瘍のモデルで､腫瘍へのＨＭＬ局注により 48 時間までＨＭＬは局所に残留し、他臓器移行はきわめて少ないことが示された。局注直後、24 時間後に各々30 分の交番磁場照射で、腫瘍のみを特異的に加温することができ、その結果腫瘍のほぼ完全な消退をもたらすことが確認された。以上からＨＭＬは乳癌組織特異的温熱療法の発熱素材として用いうることが示され、再発乳癌において第Ｉ相臨床試験を計画することができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００５年度	6,200,000	0	6,200,000
２００６年度	3,500,000	0	3,500,000
２００７年度	3,000,000	900,000	3,900,000
２００８年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総　計	15,000,000	1,590,000	16,590,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般
キーワード：乳癌、温熱免疫療法、ハーセプチン、マグネタイト、リポソーム

１．研究開始当初の背景

(1)腫瘍細胞は 42.5℃以上に加温すると殺傷され腫瘍組織は正常組織に比べて熱に弱いという性質があるが、いまだ温熱療法は外科手術、化学療法、放射線療法に代わるほどの強力な悪性腫瘍治療法にはなっていない。その一因は、腫瘍組織だけを自在に加温する技術が開発されていないことがある。

(2)鉄の微粒子であるマグネタイトに交番磁場を照射すると発熱する性質がある。この性質を利用し、マグネタイトを脂質であるリポソームで包んだナノ微粒子の表面に、乳癌に対するヒト化マウスモノクローナル抗体（実地臨床で使用しているハーセプチン）を結合させたハーセプチン結合マグネトリポソーム（ＨＭＬと略）を研究分担者の小林猛ら（中部大学）と開発してきた。

(3)従来から行われている温熱療法では腫瘍のみならず正常組織も同様に加温されるので、42.5℃付近に腫瘍組織の温度を調節せざるをえない。しかし加温する温度が高いほど腫瘍細胞が死にやすいことは自明である。し

たがって、正常組織が加温されずに腫瘍組織だけを特異的に加温することができれば、どのような種類の固形腫瘍であっても死滅させることが可能である。乳癌に対する特異的な抗体ですでに臨床でその有用性が証明されているハーセプチンをマグネトリポソームに結合させることにより、乳癌組織だけを特異的に加温することができるのではないかと考えた。

２．研究の目的

(1)ＨＭＬ製剤の作成、調整方法を確立し、研究のために安定して使用できる供給体制を構築する。

(2)HER2 を強発現している乳癌組織にマグネトリポソームを集積させ、交番磁場照射による温熱療法を行い、乳癌組織における細胞レベルでの効果を詳細に検討する。

３．研究の方法

(1)ＨＭＬ製剤の作成、調整方法を種々検討し、安全性、長期保存後の製剤の性能についても検討する。

(2)ＨＭＬを用いた in vitro 実験

HER2 強発現ヒト乳癌培養細胞および HER2 弱発現ヒト乳癌培養細胞にＨＭＬを作用させ、温熱療法を行うことによりその効果を検討する。

(3)ヒト乳癌培養細胞のヌードマウスへの移植、腫瘍形成

Her2 強発現株である MDA-MB-361、MDA-MB-453、BT-474、Her2 弱発現株である MBA-MB-231、MCF-7 をヌードマウス（nu/nu Balb/c）へ移植し腫瘍形成するかどうかを検証する。

(4)移植ヒト乳癌での HER2 の発現の検討

形成された腫瘍を摘出して Her2 の発現を免疫染色で検討する。

(5)移植ヒト乳癌へのＨＭＬ投与による効果、体内分布、副作用の検討

ＨＭＬを乳癌移植ヌードマウスへ静脈投与、あるいは局所投与する。投与後 48 時間に屠殺してマグネタイトの腫瘍内、臓器分布を検討する。またハーセプチンに対する抗体（ヒト IgG に対する抗体）でＨＭＬの体内分布、腫瘍への集積を検討する。ＨＭＬのマウスにおける副作用について観察する。

(6)交番磁界による腫瘍加温、組織反応の検討

ＨＭＬを投与し、交番磁界をかけ腫瘍の温度上昇を検討する。さらに数回程度の交番磁界による加温を繰り返し、48 時間後に屠殺して腫瘍の変性を組織学的に検討する。

(7)移植ヒト乳癌へのＨＭＬ投与による腫瘍縮小効果の検討

Her2 強発現株と Her2 弱発現株の 2 種類の細胞株を移植したヌードマウスおよび control 群を設定し、温熱療法の腫瘍縮小効果、生存率を検討する。

４．研究成果

(1)ＨＭＬ製剤の作成、調整方法の検討。

マグネタイトとリポソームを反応させ、マグネタイトを含有するリポソーム（マグネトリポソーム）を作成し、リポソームの表面に乳癌細胞の表面抗原 HER2 に対するヒト化モノクローナル抗体であるハーセプチンを共有結合させる製剤の調整方法を確立し、安定的に供給できる体制を構築した。製剤の粒子径、安定性、細菌テスト、エンドトキシンテストなどを行い、製剤の安全性についての検討を行った。さらに製剤を凍結乾燥するための成分、手順を確立し、凍結乾燥製剤による供給を可能とした。

(2)ＨＭＬを用いた in vitro 実験

ＨＭＬは特異的に HER2 強発現ヒト乳癌培養細胞（SKBr3）に取り込まれた。SKBr3 にＨＭＬを作用させ 42.5℃に 30 分間保つと（図１A)、HER2 弱発現ヒト乳癌培養細胞に比較して有意に細胞増殖を抑制した。(図１B)

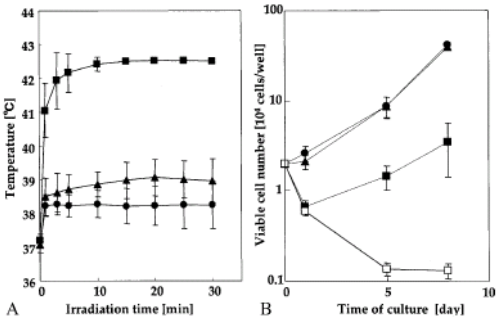

図１A:42.5℃30 分
図１B:SKBr3（白丸）細胞増殖抑制効果

(3)ヒト乳癌培養細胞のヌードマウスへの移植、腫瘍形成

HER2 発現乳癌細胞を移植したヌードマウスの系を確立した。この動物実験系を用いることにより、ＨＭＬを投与したマウスに交番磁場照射を加える温熱免疫療法のモデルを作成した。

(4)移植ヒト乳癌での HER2 の発現の検討

HER2 発現乳癌細胞をヌードマウスに移植し、増殖した腫瘍において HER2 が強発現していることを確認した。

(5)移植ヒト乳癌へのHML投与による効果、体内分布、副作用の検討

移植した腫瘍にHMLを全身投与し、鉄の体内分布を検討した。移植した腫瘍にHMLを局所投与し、鉄の体内分布を検討した。腫瘍内への局注では、48 時間後も投与量のほとんどが局所に残留し、他臓器への移行はきわめて少ないことが示された。(図２)

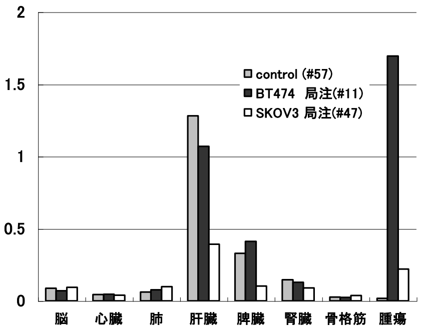

図２：HMLの体内分布（BT434：HER2 陽性細胞、SKOV3：HER2 陰性細胞）

(6)交番磁界による腫瘍加温、組織反応の検討

移植した腫瘍にHMLを局所投与し、交番磁場照射を加えることにより、すみやかに腫瘍の温度が上昇することを確認した。有効な温度上昇が得られるHMLの濃度、量、さらに交番磁場照射の強さなどを検討した。(図３)

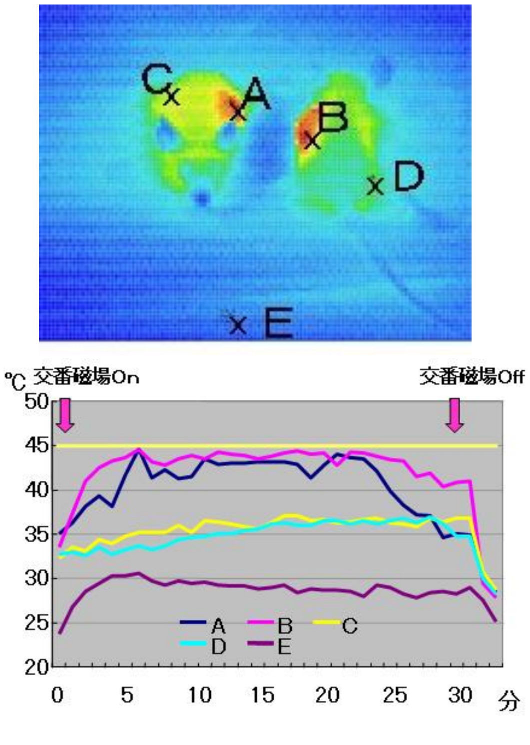

図３：A・B:2 匹のマウス移植腫瘍（HML 注射部位)、C・D：2 匹のマウス正常皮膚表面、E:コントロール部位

(7)移植ヒト乳癌へのHML投与による腫瘍縮小効果の検討

局注直後、24 時間後の２回各々HMLを移植した腫瘍に注射し、交番磁場照射を行ったマウスにおいて、その 3 分の 2 のマウスは交番磁場照射後 1 週間で腫瘍の体積が 10 分の 1 以下となり、その効果は 4 週間以上持続した。（図４、５）

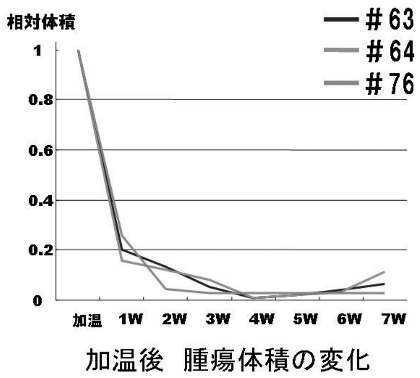

図４：#63、#64、#76：マウスの個体番号

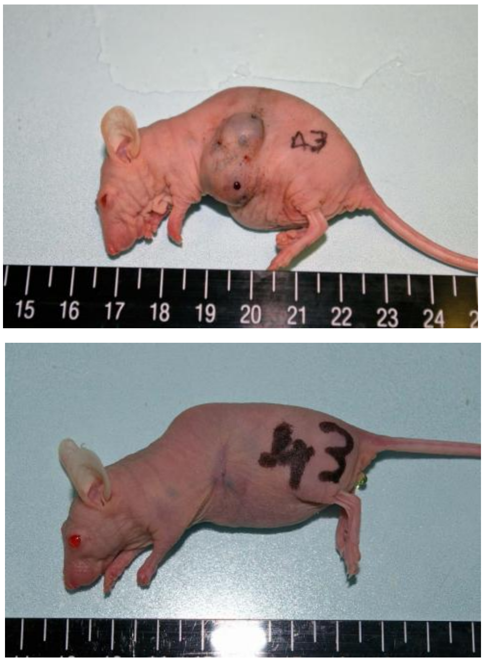

図５：加温前（上)、加温後 4 週（下)

(8)今後の展望

以上の成果を踏まえ、「再発乳癌を対象としたハーセプチン固定化マグネトリポソームと交番磁場照射装置を用いた温熱免疫療法の第Ｉ相臨床試験」を計画し、名古屋大学医学部倫理委員会に「バイオ先端臨床研究」の申請を行った。平成 20 年 6 月 25 日づけで承認を得た。

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）
① Kikumori T, Kobayashi T, Sawaki M, Imai T. Anti-cancer effect of hyperthermia on breast cancer by magnetite 3 nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes. Breast Cancer Res Treat 113(3), 435-441, (2009) 査読有
② 小林猛、斎田俊明、今井常夫、抗体付きマグネトリポソームを用いたがん温熱免疫療法、分子細胞治療、7(2)、124-128、(2008)、査読無
③ Nakao A, Takeda S, Shimoyama S, Kasuya H, Kimata H, Teshigahara O, Sawaki M, Kikumori T, Kodera Y, Nagasaka T, Goshima F, Nishiyama Y, Imai T. Clinical Experiment of Mutant Herpes Simplex Virus HF10 Therapy for Cancer. Current Cancer Drug Targets, 7(2), 171-177, (2007) 査読有
④ Ito A, Honda H, Kobayashi T, Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. Cancer Immunology, Immunotherapy, 55(3), 320-328, (2006), 査読有
⑤ Kimata H, Imai T, Kikumori T, Teshigahara O, Nagasaka T, Goshima F, Nishiyama Y, Nakao A. Pilot study of oncolytic viral therapy using mutant herpes simplex virus (HF10) against recurrent metastatic breast cancer. Ann Surg Oncol, 13(8), 1078-1084, (2006), 査読有

〔学会発表〕（計４件）
① 菊森豊根、香川力、渡邉麗子、佐々実穂、佐藤成憲、山田知弘、澤木正孝、小林猛、今井常夫、ヒト乳癌細胞株における Heat shock protein (Hsp) 90 阻害剤による温熱効果増強- HER2, Akt, Hsp の関与、日本乳癌学会総会、2008 年 9 月 27 日、大阪国際会議場
② 菊森豊根、香川力、渡邉麗子、佐々実穂、佐藤成憲、山田知弘、高田英輝、澤木正孝、今井常夫、ヒートショックタンパク阻害剤による温熱効果増強における HER2 タンパクの関与、日本外科学会総会、2008 年 5 月 15 日、長崎ブリックホール
③ 菊森豊根、香川力、渡邉麗子、高田英輝、澤木正孝、小林宏暢、柴田有宏、小林猛、今井常夫、乳癌における磁性酸化鉄を用いた温熱療法の基礎実験およびヒートショック蛋白阻害による温熱効果増強の検討、日本乳癌学会総会、2007 年 6 月 29 日、パシフィコ横浜
④ 菊森豊根、香川力、渡邉麗子、高田英輝、澤木正孝、小林宏暢、柴田有宏、今井常夫、磁性酸化鉄(マグネタイト)を用いた温熱免疫療法の乳癌に対する基礎実験、日本外科学会総会、2007 年 4 月 13 日、大阪国際会議場

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.nagoya-u.ac.jp/nyusen/

６．研究組織
(1)研究代表者
今井　常夫　（IMAI TSUNEO）
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80252245

(2)研究分担者
中尾　昭公　（NAKAO AKIMASA）
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70167542
小林　猛　（KOBAYASHI TAKESHI）
中部大学・応用生物学部・教授
研究者番号：10043324
菊森　豊根　（KIKUMORI TOYONE）
名古屋大学・医学部附属病院・病院助手
研究者番号：90402635