

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501328

研究課題名(和文) ナノ化デキストラン・マグネタイトを用いた食道癌に対する誘導温熱免疫療法の開発

研究課題名(英文) A combination therapy with hyperthermia and immunotherapy using dextran magnetic nanoparticle for esophageal cancer

研究代表者

阿久津 泰典 (Akutsu, Yasunori)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00375677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：(1)誘導温熱療法併用樹状細胞腫瘍内局注療法の開発を行った。樹状細胞療法単独の場合に比較し、温熱療法を併用した場合において、より強力な抗腫瘍効果が確認され、また、分子生物学的評価にてヒートショックプロテイン発現変動が確認された。(2)ICGを付加したリポソームを作成し、光線力学的温熱療法の開発を行った。ナノ粒子の持つEPR効果により同リポソームが腫瘍に集積していることを確認し、また近赤外光にて腫瘍特異的加温が可能であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：(1)We developed a combination therapy with hyperthermia and direct intratumoral administration of dendritic cells. When compared with dendritic cell therapy alone, a combination therapy showed strong antitumor effect. Furthermore, we elucidated the molecular mechanism. The expression of heat shock protein was enhanced by hyperthermia.(2)We also developed ICG-Liposome as an enhancer of PDT. ICG-Liposome was accumulated in the tumor by EPR effect. By near infrared, tumor specific heating was possible.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：免疫療法 温熱療法 樹状細胞 ヒートショックプロテイン 食道癌 扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

がんは我が国の死亡原因の第1位となつて久しく国民にとって重大な問題である。食道癌は癌による死亡のうち男性で第6位、女性で第13位を占める。現在、手術を含め放射線、抗癌剤による治療が行われ一定の効果が報告されているが、その成績はきわめて不良で、手術可能症例でさえ3年生存率が60%、切除不能症例にいたっては平均生存期間が9か月と、きわめて予後不良である。これは食道癌が診断時に高度進行状態であることが多い上、遠隔転移や再発をきたしやすく、容易に Systemic Disease へ移行するという特徴があるためである。

このような Systemic な病態となった食道癌に対しては手術や放射線の適応はなく、抗癌剤の全身投与が行われるが、その効果は限定的で、有効な抗癌剤治療が Failure した後の治療は事実上ない。したがってこのような特徴をもつ食道癌に対しては、新たな Modality として Systemic な治療法である免疫療法は非常に有望な治療法である。最近では、申請者らが行っている「食道癌に対するペプチドワクチン療法」などに代表されるように良好な成果が報告され(2011年 ASCO シンポジウムにて発表)、なおかつその抗腫瘍効果のメカニズムも科学的に証明されるに至っている。

そこで申請者はさらに強力な免疫療法を開発するため、これまでに NKT 療法、 α -ガラクトシルセラミドパルス樹状細胞療法などの別な切り口での免疫療法の開発を続けてきた(Akutsu Y. et al. JJCR 他英文5報)。これらの一連の研究の中で、申請者は癌抗原が抗原提示細胞に取り込まれる際に Heat Shock Protein(HSP)が分子シャペロンの役割を果たすこと、HSP の発現と宿主の免疫状態とが密接に関連していることを見出した(研究業績文献5)。また、申請者は食道癌細胞に放射線によるストレスを加えることで HSP の発現を増強させ、「樹状細胞腫瘍内局注」による免疫療法の効果を増強させることにも成功した。さらに、放射線による免疫増強効果(Abscopal Effect)が HSP 由来であることを示した(研究業績文献20,21、概略は左図)。これは HSP が免疫療法の Enhancer として作用することを示している。現在、海外でもいくつかの HSP を介した免疫療法の試みが始まっており、有効例の報告が増加している(DNA-hsp65 immunotherapy for SCC of the head and neck. Cancer Gene Ther. 2008;15:676-84.)。2008年4月には米国で腎癌細胞を対象とした HSP(gp96)-Peptide Complex(HSPPC-96, Vitespen)が発売され、またその成績は Lancet(Lancet. 2008;372:145-54.)にも報告されている。

2. 研究の目的

このように HSP を介した癌免疫療法はきわめて有望な治療法である。これまで申請者は放射線によるストレスを加えることにより HSP の発現を増強させる方法をとったが、一方食道癌症例の多くがすでに放射線治療を受けていること、より効率的なストレスを加えることが可能なことから樹状細胞による免疫療法における HSP の Inducer として温熱療法を併用することを考案した。特に本研究において独創的な点は温熱療法における微小磁性体であるデキストラン・マグネタイト(DM)をナノ粒子に封入して併用することにある。DM は一般に肝腫瘍に対する MRI 造影剤として用いられる一方で、温熱療法時に併用することで、発熱量増加と抗腫瘍効果をもつことで知られている。しかし、DM と温熱療法の併用には課題がある。DM は直径がおよそ 5nm であり、その多くが肝クッパー細胞に容易にトラップされてしまい、通常の静脈投与ではターゲットとなる腫瘍に集積することはほとんどない。これまで腫瘍内へ直接 DM を投与する DM 併用温熱療法がいくつか試みられてきたが、実際の治療では現実的ではなく、実用化には至っていない。

近年、ナノテクノロジーの急速な発展により、ナノメートル単位の領域において物質を制御することが可能となり、医療の分野においてもその応用が叫ばれ始めている。ナノ粒子は EPR 効果(enhanced permeability and retention 効果)により癌に選択的に集積するという特性を持つ。この特性を利用し、必要な物質を必要な細胞に確実に到達させ、かつ、必要のない細胞には影響をあたえない理想的なドラッグ・デリバリー・システム(DDS)の構築が可能となった。医療の領域においてこの技術は画期的ともいえるものである。

そこで、申請者は

- (1) ナノ粒子化した DM を EPR 効果によって腫瘍に特異的に集積させる。
- (2) 温熱療法の併用を行う。
- (3) 「樹状細胞腫瘍内局注」による免疫療法を併用する。

このような複合的誘導温熱免疫療法によって、かつてない強力で効率的、かつ、侵襲が少ない、「患者さんにやさしい免疫療法」が実現する。したがって本研究の最終的な目標は臨床での実用化である。

3. 研究の方法

本研究の遂行のため、次の通り4つのステップを計画した。

(1) Lipo-DM の確立と EPR 効果の確認：
これまで EPR 効果によるリポソーム（ナノ粒子）単体の腫瘍集積性の検討を行い、リポソームが腫瘍に特異的に集積することをすでに確認できている。本研究の最初のステップとして、Lipo-DM の腫瘍集積性を評価することとした。

(2) Lipo-DM による誘導温熱療法の増強効果についての検討：

第二段階として Lipo-DM による温熱療法の増強効果について確認することとした。

(3) 誘導温熱療法併用樹状細胞腫瘍内局注免疫療法の検討：

第三段階として担癌マウスモデルを用いて腫瘍増殖を観察し抗腫瘍効果を評価することとした。

(4) 抗腫瘍効果の増強のメカニズムを科学的に証明する：

最終段階として抗腫瘍効果の理論的裏付けとして *in vivo*, *in vitro* における抗腫瘍効果を評価し、同時に、免疫逃避機構関連分子の発現の変化を観察することとした。

4. 研究成果

(1) 誘導温熱療法併用樹状細胞腫瘍内局注療法の開発

樹状細胞療法単独の場合に比較し、樹状細胞療法併用温熱療法を併用した場合において、腫瘍の増殖がおよそ 1/4 程度となり、より強力な抗腫瘍効果が確認された。また、腫瘍近傍のリンパ節内のリンパ球の表面マーカーを調べたところ、樹状細胞療法単独にくらべ、樹状細胞療法に温熱療法を加えた群において CTL 分画が 30% 程度増加した。分子生物学的評価にてヒートショックプロテイン（gp96）の発現増強が確認された。gp96 の増加は放射線併用による樹状細胞腫瘍内局注療法でも同様に放射線でも増強することが確認されているため、温熱療法と樹状細胞腫瘍内局注療法との併用は放射線既照射症例にも可能であり汎用性が高いと考えている。

(2) ICG-Liposome の開発と PDT 治療への応用

当初はデキストランマグネタイトをリポソームに封入したナノ粒子を作成したが、残念ながら効率的な抗腫瘍効果を証明することができなかった。しかし、デキストランマグネタイトの代わりにリポソーム表面に ICG を封入したナノ粒子を作成し、EPR 効果にて腫瘍に集積させ、しかる後に近赤外光を腫瘍

に照射する光線力学的温熱療法（PDT）のマウスモデルを作成した。その結果、ICG-Liposome が腫瘍に集積していることが確認され、投与後 3-5 日の間に集積のピークがみられた。PDT による照射を行ったところ、ICG-Liposome 投与群における腫瘍温度は 39 度弱にまで上昇し、Liposome のみ、生食の群と比較し効率的な加温が可能であることが示された。また、病理学的に検索すると、ICG-Liposome の後に PDT を施行した群にて著明なアポトーシスが誘導されていることを確認した。この治療モデルで ICG-Liposome をもちいた PDT 治療で、効果的な腫瘍特異的な加温が可能であり、また、抗腫瘍効果が得られることが示唆された。

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）

上記の研究計画と結果から、本研究課題においては 3 本の英文論文を Publish することができた。

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Maruyama T, Akutsu Y, Suganami A, Tamura Y, Fujito H, Ouchi T, Akanuma N, Isozaki Y, Takeshita N, Hoshino I, Uesato M, Toyota T, Hayashi H, Matsubara H. Treatment of near-infrared photodynamic therapy using a liposomally formulated indocyanine green derivative for squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2015 Apr 7;10(4):e0122849. (査読有り). doi: 10.1371/journal.pone.0122849. eCollection 2015.

Qin W, Akutsu Y, Andocs G, Suganami A, Hu X, Yusup G, Komatsu-Akimoto A, Hoshino I, Hanari N, Mori M, Isozaki Y, Akanuma N, Tamura Y, Matsubara H. Modulated electro-hyperthermia enhances dendritic cell therapy through an abscopal effect in mice. *Oncol Rep*. 2014 Dec;32(6):2373-9. (査読有り). doi: 10.3892/or.2014.3500. Epub 2014 Sep 19.

Yusup G, Akutsu Y, Mutallip M, Qin W, Hu X, Komatsu-Akimoto A, Hoshino I, Hanari N, Mori M, Akanuma N, Isozaki Y, Matsubara H. A COX-2 inhibitor enhances the antitumor effects of chemotherapy and radiotherapy for esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2014 Apr;44(4):1146-52. (査読有り). doi: 10.3892/ijo.2014.2300. Epub 2014

Feb 14.

〔学会発表〕(計 5件)

Akutsu Y, Tamura Y. A research for dendritic cell therapy and boosting procedures. 第 72 回日本癌学会学術総会.2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜 (神奈川県,横浜市)

Maruyama T, Akutsu Y, Tamura Y. Photodynamic therapy with ICG-liposome for squamous cell carcinoma in mice. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜(神奈川県,横浜市)

阿久津泰典、新規温熱治療による Abscopal Effect による免疫治療の基礎と臨床. 日本ハイパーサーミア学会第 30 回大会.2013 年 8 月 30 日, 横浜シンポジア (神奈川県,横浜市)

丸山哲郎、阿久津泰典、田村裕. ICG-Liposome を用いた食道扁平上皮癌に対する光線力学的療法の開発. 第 68 回日本消化器外科学会総会.2013 年 7 月 17 日, シーガイアコンベンションセンター(宮崎県,宮崎市)

丸山哲郎、阿久津泰典、田村裕. ICG-Liposome を用いた扁平上皮癌に対する光線力学的温熱療法の開発. 第 113 回日本外科学会定期学術集会.2013年4月12日, 福岡国際会議場 (福岡県,福岡市)

〔図書〕(計 0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

該当なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

該当なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 阿久津 泰典 (Yasunori Akutsu) 千葉大学・大学院医学研究院.講師

研究者番号：00375677

(2)研究分担者 田村 裕 (Yutaka Tamura) 千葉大学・大学院医学研究院.准教授

研究者番号：50263174

(3)連携研究者

()

研究者番号：