

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592403

研究課題名(和文) 磁場誘導組織内加温法と免疫治療の融合による前立腺癌に対する新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy for prostate cancer by the fusion of the thermotherapy mediated by magnetic field and the immunotherapy

研究代表者

河合 憲康 (Kawai, Noriyasu)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20254279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化鉄微粒子(MCL)が、NS極が交互に入れ替わる交番磁場の照射により発熱する性質を利用したがん温熱治療(MCL Heat Therapy)を数年前に開発した。これをがん免疫治療と融合し、全身治療が可能な新しい治療法の開発のための基礎研究を行った。In vitroでは加温によって腫瘍抗原の発現を増強させることはできなかった。しかし、in vivo研究において、MCL Heat TherapyによりヘルパーT細胞および殺細胞性T細胞の発現を確認した。本学IRBの承認を得て、人を対象としたMCLの局所注入を併用する誘電加温装置による温熱治療を同意を得られた3名に実施、安全性を確認した。

研究成果の概要(英文)： We developed several years ago new cancer thermotherapy "MCL Heat Therapy", which is based on the particular character of the magnetite (Fe₃O₄). The character is generating heat by irradiation of alternative magnetic field. We performed basic research for the purpose of developing new therapy to treat both primary and metastatic lesion by which MCL Heat Therapy and cancer immunotherapy are fused. In vitro, we could not find the enhancement of tumor antigen from prostate cancer cell by heat therapy. However, in vivo, helper T cell and cytotoxic T cell were appeared in tumor tissue by MCL Heat Therapy.

Under the acceptance of Institutional Review Bore of our university, new Heat Therapy with inductive heating machine RF-8 and local injection of MCL was performed for three patients. There were no adverse events.

研究分野：泌尿器系腫瘍学

キーワード：温熱治療 温熱免疫 前立腺癌 ナノテクノロジー 磁場

1. 研究開始当初の背景

私たちは、酸化鉄微粒子(Fe3O4)が、NS 極が交互に入れ替わる交番磁場の照射により発熱する性質を利用した“がん温熱治療”を数年前に開発した。従来の“がん温熱治療”は電極で患部を鉄み交流電流により加温する“誘電加温法”である。この方法は電極で挟まれた正常部分まで加温されること、加温が不安定になるため深部加温には適さないという欠点がある。一方、私たちが開発した温熱治療法は磁場の誘導により加温するので“磁場誘導組織内加温法”と呼ばれる。酸化鉄微粒子は生体への親和性を考慮しプラスに荷電した脂質に包まれており、正電荷脂質包埋型磁性ナノ粒子(Magnetic Cationic Liposome: MCL)と呼ばれ、この方法を MCL Heat Therapy と名付けた。MCL Heat Therapy は深部加温が可能で正常部分は加温しない、従来の“誘電加温法”の欠点を克服する方法である(下図)。



磁場誘導組織内加温法は、私たちの研究グループのほかにはドイツの Dr. Manfred Johannsen のグループと東北大学や富山医科薬科大学のグループなど数カ所しかない。一方、臨床において従来の温熱治療に際し、活性化リンパ球療法を併用した数例の成績発表はある。しかし温熱療法と免疫療法を分子機構から解明した報告は少ない。そして局所制御に優れている MCL heat Therapy と免疫療法を融合した基礎データは存在せず、本研究が初めてのものである。

現在までに MCL Heat Therapy のラット前立腺癌皮下移植モデルでの抗腫瘍効果、ヒト前立腺癌細胞株を用いた腫瘍完全退縮効果を証明してきた。このモデルではホルモン不応性の PC-3 を用いた腫瘍の完全退縮を認めたので、臨床面におけるホルモン不応性前立腺癌への治療効果も期待できる結果であった。前立腺癌ラット大腿骨浸潤モデルでは、骨転移巣の形成抑制の可能性も認められた。これまでの研究成果を踏まえて、局所制御に優れている MCL Heat Therapy をがん転移巣の制御という全身治療に応用することはできないかと考えた。全身治療に関しては抗癌剤治療と“がん免疫治療”がある。そして“がん免疫治療”は温熱処理において著しく増感されるという基礎データがある。そこで本研究において MCL Heat Therapy と“がん免疫治療”を融合することにより、局所制御を行いつつ転移巣の治療も可能となる前立腺癌に対する新しい治療法を開発を目指したいと考え本研究を開始した。

2. 研究の目的

私たちは、酸化鉄微粒子(Fe3O4)が、NS 極が交互に入れ替わる交番磁場の照射により発熱する性質を利用した“がん温熱治療”を数年前に開発した。その後マウス、ラット前立腺癌移植モデルを用いて局所における抗腫瘍効果や骨転移巣の形成抑制効果を明らかにしてきた。しかし、転移巣の制御という全身治療への方向性は見つかっていない。一方、“がん免疫治療”もその分子機構が明らかにされ、温熱処理により著しく増感されるという基礎データもある。そこで本研究では、Fe3O4 と磁場を用いた“がん温熱治療”と“がん免疫治療”を融合し、全身治療が可能なる前立腺癌に対する新しい治療法を開発するための基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

(1). *in vitro* での免疫応答増加への工夫

①温熱処理による MHC クラス I 抗原発現亢進の解析

ヒト前立腺癌細胞 PC-3, LNCap と研究分担者の内木が樹立したラット前立腺癌細胞 PCa11 の培養ディッシュを加温して、細胞を回収。FACS scan で MHC クラス I 発現の増強を解析する。

②ヒストン脱アセチル化阻害剤処理による MHC クラス I 抗原発現亢進の解析

PC-3, LNCap および PCa11 をヒストン脱アセチル化阻害剤である trichostatin A (TSA) によって処理、その後細胞を回収。FACS scan で MHC クラス I 発現の増強を解析する。

(2). *in vivo* での MCL Heat Therapy の免疫応答細胞へ与える影響の解析

温熱処理による NK 細胞活性の解析

ラット前立腺癌皮下移植モデルに対し MCL heat Therapy を行う。

①培養細胞と動物モデル

ラット前立腺癌細胞は本学第一病理学(現: 実験病態病理学分野)で樹立された PLS-10 を用いた。4 週齢オスラットを日本チャールズリバーから購入した。1×10⁶/100u1 の PLS-10 を F344 ラットの右背部へ皮下注射した。皮下腫瘍が直径 5mm になったところで実験に用いた。

② MCL の準備

MCL は戸田工業(広島)から入手した。

③ MCL Heat Therapy

前立腺がん小結節が直径 5-6mm に増大したあと、MCLs を 26G の注射器針で皮下に縦方向に各前立腺がん小結節に注入した。合計 2 グラムの MCLs が、注入ポンプを用いて注射した。

ラットは2群に分けた：グループ I：マウスは、MCLsの注射の後、交番磁場照射がない群（対照群）、グループ II：MCL 注入後、交番磁場照射を30分間継続し、腫瘍温度は45.0℃となった。交番磁場は、水平コイル（内径：7cm；長さ：7cm）を用い、トランジスタ・インバータで（LTG-100-05；第一高周波工業、東京）118kHzで磁場照射を行った。磁場強度は、30.6kA/m（384の麻植）であった。小結節がコイルの中心になるようラットを配置した。腫瘍の中心と、直腸（ラット体温）の内側の体温は、光ファイバー・プローブで測定された（FX-9020；アンリツ Meter、東京）。腫瘍の中心の温度は、45℃に維持された。

④免疫組織化学染色

MCL注射の後の30日目に、2群の腫瘍を摘出した。そして、免疫組織化学染色のための標本は以下の通りに処理した。血液はリン酸塩緩衝液で洗浄した。そして、腫瘍組織を核出、-20℃にTissue-Tek OCT compound（Sakura Fine technical、東京）で固定した。固定した腫瘍組織は、10umにスライスした。30分の間空気乾燥されて、15分間、アセトンで冷却。37℃で5%のヤギ血清と1%のスキムミルクでインキュベートした。マウス抗ラットCD3（1F4）、抗ラットCD4（W3/25）、抗ラットCD8（MRC OX-8）（Serotec、オックスフォード（英国））1:200の希釈剤反応させた。各ステップの後に、燐酸塩緩衝液で洗浄。0.005%の水素ペルオキシダーゼを含んでいる0.02%のジアミノベンジジン・テトラヒドロ塩化物溶液で、10分の間室温で治療によって視覚化された。ヘマトキシリンでも染色した。

(3). 人に対する第I相臨床試験

本学 IRB の許可を得て「標準治療が無効であった再燃・再発前立腺癌を対象とした陽性荷電マグネトリポソームと誘電加温装置「サーモトロン RF-8」を用いた温熱治療の第I相臨床試験」として3名の患者にMCLを用いた温熱治療を実施。

①本試験の意義

本研究の目的は、MCLの前立腺への局所注入を併用する誘電加温装置「サーモトロン RF-8」による温熱治療の安全性を確立することである。対象は標準治療が無効であった再燃・再発前立腺癌である。二次的に治療効果、免疫系の動きを確認し、将来的によりよい医療を提供することにある。

②試験の目的

MCLの前立腺への局所注入を併用する誘電加温装置「サーモトロン RF-8」による温熱治療の安全性を確立することであ

る。対象は標準治療が無効であった再燃・再発前立腺癌である。

③サーモトロン RF-8 に関する情報

相対向する2枚の平板電極で身体を挟み、高周波（電磁波）エネルギーを利用して、体表面はもとより人体深部を選択的に42℃に加温することが可能。

【主な特徴】

1. 8MHzの周波数を採用し、 1500W までの出力を出せるため、人体への電磁波深達性に優れ、深部臓器を無理なく加温できる。
2. 対向する電極を大小组み合わせることでより浅部から深部まで病巣の深さに合わせて選択的に効率的に治療できる。
3. 治療部位は、脳と眼球以外の全ての部位に適用できる。
4. 局所治療なので、全身への負担がなく、外来治療も可能である。
5. 化学療法や放射線療法との併用では相乗効果があり、治療効果を増強する。
6. 副作用がほとんどない。
7. 健康保険適用機器である。
8. サーモシミュレーションが内蔵されているので、実測温度の必要性が低い

④試験の対象

④-1 選択基準

1. 前立腺癌に対し前立腺全摘除術ではなく、薬物療法あるいは放射線治療を受け、再燃・再燃した患者。
2. 遠隔転移の有無は問わない。
3. 再燃・再燃に対し少なくとも1種類以上のホルモン剤および1レジメン以上の抗癌剤治療が無効となった症例。
4. 年齢:20歳以上80歳未満の症例(同意取得時)
5. Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) の performance status 0~2 に該当する症例

Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) の performance status

0. 無症状で社会活動ができ、制限をうけることなく、発病前と同等にふるまえる。
1. 軽度の症状があり肉体労働は制限を受けるが、歩行、軽労働や座業はできる。例えば軽い家事、事務など。
2. 歩行や身の回りのことはできるが、時に少し介助がいることもある。軽労働はできないが、日中の50%以上は起居している。

3. 身の回りのある程度のことはできるがしばしば介助がいり、日中の50%以上は就床している。
4. 身の回りのこともできず常に介助がいり、終日就床を必要としている。

* 固形癌化学療法直接効果判定基準」より

6. 本人から本試験に参加する旨、文書による同意が得られた患者

⑤ 主要評価項目

- ⑥-1 主要エンドポイント：有害事象の有無と程度の評価
- ⑥-2 副次エンドポイント：前立腺腫瘍マーカー (PSA) の変化および免疫系指標の変化

⑥ 治療計画

⑥-1 プロトコル治療

臨床試験説明、文書による同意、適格性の判定に必要な検査を行い、適格性の判定を行う。

1. 第1病日：現症の把握、血液検査、プロトコルの開始
2. 第2病日：MCLの注入と温熱治療
 - (1) MCLの解凍
実施 1 時間前に名古屋市立大学病院薬剤部冷凍庫で保存されていたMCLを、30℃の温水で解凍しておく
 - (2) MCLの注入
 - ① 中央診療棟2階8番透視室 (泌尿器科撮影室) で行う。患者はストレッチャーで移動する。2%キシロカイン10mlを用いて、仙骨硬膜外麻酔を行う。ペンタゾシン (ソセゴン[®]) 15mg+ヒドロキシジン塩酸塩 (アタラックスP[®]) 25mgを点滴で注入し麻酔とする。碎石位となり、経直腸超音波プローブで前立腺を描出。
 - ② 左右それぞれ periferal zone (PZ), transition zone (TZ), central zone (CZ) に1カ所ずつ マグネタイト濃度 30mg/ml のMCL 0.5mlをゆっくり注入する。エコーと透視で注入を確認する。
 - ③ また同時にエコーガイド下で熱伝対挿入用に、18G 留置針の外套をCZに挿入する。
 - ④ 尿道には cryosurgery用のダブルバブルの灌流用尿道カテーテルを留置する。
 - ⑤ 注射後30分間は被験者の状態を慎重に観察する。異常が認められない

ことを確認後、骨盤部CT撮影を行い、MCLが前立腺に存在することを確認する。

(3) 温熱治療

- ① 温熱治療室へ移動し温熱治療台にのる。
- ② RF-8の出力を調整しながら前立腺の温度が43度をとるように30分間温熱治療を行う。このとき加温による尿道損傷をさけるため、尿道カテーテルは生理食塩水で灌流を行う。
- ③ 温熱治療前後、治療中は血圧、脈拍を測定、心電図モニターの記録は行う。
- ④ 治療後、測温用ファイバーは抜去する。
- ⑤ 異常がなければ病室へもどり、帰宅後1時間、3時間、6時間、以後6時間ごとに24時間後までバイタルチェックを行う。穿刺部、尿道、直腸からの出血の有無を確認する。出血・感染の予防のため止血剤、抗生剤を投与する。

3. 第4病日：全身状態の観察を行い、特に有害事象を認めなければ退院を許可する。血液検査を行う。
4. 第7病日：骨盤部のCT撮影
5. 実施後1ヶ月、3ヶ月にCT、エコーを行う。

⑥-2 投与レベル設定

本研究ではMCLは試験目的となる薬剤ではなく、温度上昇させるための媒体である。標的臓器を目的温度 (43℃) に加温させるのに最低限必要な量を注入する必要はあるが、43℃以上に発熱させるための余分な量の注入は必要ではない。あらかじめ画像検査 (エコーやCT) で前立腺重量を計測しておき、ファントムや大型動物での研究から得られた適量を注入すればよい。

4. 研究成果

(1). *in vitro* での免疫応答増加への工夫

① 温熱処理によるMHCクラスI抗原発現亢進の解析

温熱処理によるMHCクラスI抗原発現亢進を解析した。ヒト前立腺癌細胞PC-3、LNCap、研究分担者の内木が樹立したラット前立腺癌細胞PCai1の培養ディッシュの加温して、細胞を回収。FACS ScanでMHCクラスI抗原発現を解析。しかし、発現の亢進は認められなかった。そこで加温を38, 40, 42, 45℃と多段階に設定して検討した。その結果として

も MHC class I 抗原の発現増強は認められなかった。

②ヒストン脱アセチル化阻害剤処理による MHC クラス I 抗原発現亢進の解析

PC-3, LNCap, PCa11 をヒストン脱アセチル化阻害剤である trichostatin A (TSA) によって処理、その後細胞を回収し FACS Scan で MHC class I 発現の増強を解析した。しかし、trichostatin A (TSA) 処理によっても MHC class I 抗原の発現増強は認められなかった。

(2). *in vivo*での MCL Heat Therapy の免疫応答細胞へ与える影響の解析

温熱処理による NK 細胞活性の解析



上図は PLS-10 を F344 ラットに背部皮下注射して形成された腫瘍塊に対する MCL Heat Therapy の効果を示している。横軸は MCL Heat Therapy 後の日数。縦軸は治療前に対する計測時の腫瘍定積の比である。グラフ A はコントロール群、グラフ B は治療群である。コントロール群は腫瘍体積が増大しているが、MCL Heat Therapy 群では腫瘍の増殖が抑えられている。



上図は MCL Heat Therapy 群の腫瘍塊の免疫応答細胞を標的とした免疫染色である。

A: コントロール群、免疫細胞は認められない。

B: CD3 (ヘルパーT細胞)

C: CD4 (ヘルパーT細胞)

D: CD8 (殺細胞性T細胞)

以上より MCL Heat Therapy により、免疫応答細胞の出現が認められた。

NK 細胞も出現が認められた。

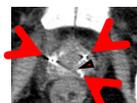
(3) 人に対する第 I 相臨床試験



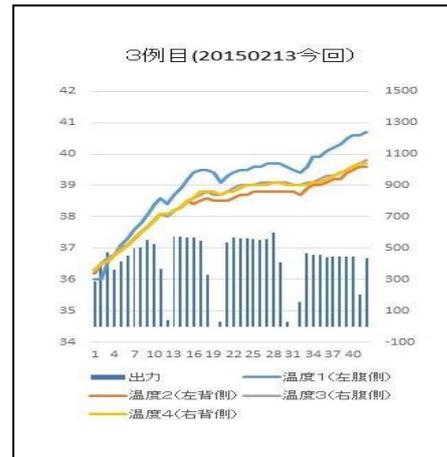
砕石位、エコーガイド下で MCL を前立腺に注入。



温度計を 4 本刺入



MCL30mg/ml を 0.5ml ずつ左右 3 カ所前立腺に注入



上図：3 例目の温度経過

MCL と RF-8 においても MCL は発熱することがわかった。

有害事象は認めなかった。

【結果】症例 1：67 歳男性、cT3aN1M1b サーマトロン RF-8 最大出力 375W。最高温度 38.5°C。治療前後 PSA 123.8/205.3 ng/ml。治療前後 IL-6 1.8/3.2pg/ml。症例 2：72 歳男性、cT3aN1M1b サーマトロン RF-8 最大出力 710W。治療前後 PSA 123.8/205.3 ng/ml。治療前後 IL-6 1.8/3.2pg/ml。最高温度 41.5°C。症例 3：78 歳男性、cT3aN1M1b サーマトロン RF-8 最大出力 600W。治療前後 PSA 0.91/1.12 ng/ml。治療前後 IL-6 1.7/4.1pg/ml。最高温度 40.8°C。3 症例ともアレルギー、血液像、皮膚症状の有害事象は認めなかった。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 河合 憲康、小林 大地、小林 猛、堤内 要、内木 拓、恵谷 俊紀、飯田 啓太郎、安藤亮介、戸澤 啓一、郡 健二郎、安井 孝周

標準治療が無効となった固形癌の再発巣の治療を目的としたマグネタイト微粒子と誘電加熱装置を用いた新規温熱治療の開発：第 53 回 日本癌治療学会学術集会

2015年10月29日 国立京都国際会館
(京都市 京都府)

2. 河合 憲康、堀内 要、小林 猛、恵谷俊紀、小林 大地、内木 拓、安藤 亮介、戸澤 啓一、郡 健二郎
前立腺がん骨転移巣に対する抗 RANKL 抗体結合型マグネタイトを用いた選択的磁場誘導加温法の開発 第 101 回日本泌尿器科学会総会
2013年4月25日：さっぽろ文化芸術の館
(札幌市 北海道)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：なし

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

小林 猛 (Kobayashi Takeshi)
中部大学・生物機能開発研究所・教授
研究者番号：10043324

郡 健二郎 (Kohri Kenjiro)
名古屋市立大学・その他の部局・学長
研究者番号：30122047

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

佐々木 昌一 (Sasaki Shoichi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50225869

内木 拓 (Naiki Taku)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：50551272