

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462496

研究課題名(和文) 抗RANKL抗体結合ナノ粒子を用いた前立腺がん骨転移に対する選択的温熱治療の開発

研究課題名(英文) Development of the selective hyperthermia for the bone metastasis of prostate cancer using anti RANKL antibody-binding nanoparticles

研究代表者

永田 大介(Nagata, Daisuke)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20336689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：磁性ナノ粒子(Magnetite Nano Particle:MNP)に前立腺癌骨転移に関連するRANKL (nuclear factor kappa-B ligand)の抗体を結合して経静脈的投与し、骨転移巣へ到達させ温熱治療をする目的でin vitroおよびin vivoで研究を行った。in vitroでRANKLが存在するマウス骨芽細胞MC3T3-E1に有意に接着することが確認された。In vivoではラット前立腺癌骨浸潤モデルを用いて経静脈的(経尾静脈的)に抗RANKL抗体結合MNPを注入したが、骨浸潤巣に認められなかった。温熱治療の効果を確認する実験はできなかった。

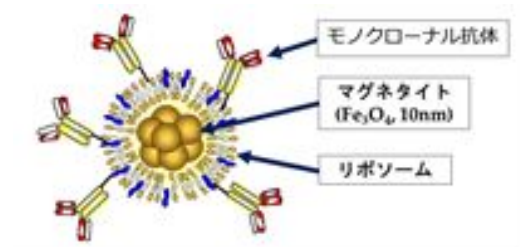
研究成果の概要(英文)：We developed the new hyperthermic therapy (Magnetic induced intra cellular hyperthermia) which generate heat by magnetic nano particle: MNP). We connected an antibody of RANKL (nuclear factor kappa-B ligand) which became the key to exacerbation of prostate cancer bone metastases to MNP and gave it transvenously subsequently. And we studied in vitro and in vivo for the purpose of performing hyperthermia for bone invasion lesion after arriving of MNP at bone invasion lesion. It was confirmed that anti RANKL antibody-binding MNP significantly adhered to mouse osteoblasts MC3T3-E1 where RANKL was present in in vitro. Anti RANKL antibody-binding MNP were injected into rat prostate cancer bones invasion models transvenously. We were not able to examine confirming the effect of the hyperthermia.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：温熱治療 磁性ナノ粒子 前立腺癌 骨転移

1. 研究開始当初の背景

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 (下図)。



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、ウサギ舌ガン等の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³、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⁴。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^{5,6}。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。局所注入でしか行い得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る。In vivo ではがん骨転移の増悪の鍵となる RANKL (nuclear factor kappa-B ligand) に対する抗体を結合した MNP (抗 RANKL 抗体結合 MNP) をラット前立腺がん骨浸潤モデルに対し経尾静脈的に投与することで、がん骨転移に対する温熱治療の可否を検討する必要がある。

2. 研究の目的

(1) 抗 RANKL 抗体結合正電荷リポソーム包埋型磁性ナノ粒子 (抗 RANKL 抗体結合 MNP) の開発

Fe₃O₄ の重合体である MNP をポリ(ビニルピロリドン-co-メタクリル酸)ナトリウム塩 (P(VP-co-MA)) でポリマーコーティングする。そして、N-シクロヘキシル-N'-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド (CMCD) 試薬を用いて、抗 RANKL 抗体を結合させる。

(2) in vitro における前立腺がん細胞株への細胞取り込み解析

RANKL を発現しているマウス骨芽細胞株を

用いて、抗 RANKL 抗体結合 MNP の吸着を、鉄の濃度を用いて評価する。

(3) 抗 RANKL 抗体結合 MNP を用いた磁場誘導加温法の有効性の検証

ラット前立腺がん骨浸潤モデルは脊椎付近にラット前立腺がん細胞 PCAi1 を皮下移植して脊椎骨に前立腺がんを浸潤させるモデルである。動物用レントゲンで骨転移巣を確認後、抗 RANKL 抗体結合 MNP を尾静脈から投与。その 48 時間後に磁場照射を行わず、骨組織を回収する群と磁場照射をする群に分ける。磁場照射を行わない群は組織学的と鉄の定量で取込の評価をする。磁場照射をして骨転移巣の治療効果を検討する。

(4) intervention therapy (IVR) 技術を用いたがん転移巣治療の可能性の検討

本実験の目的は、「陽性電荷マグネトリポソームを発熱補助体とした誘電加温措置 RF-8 を用いた固形がんの転移巣に対する温熱治療法の臨床試験」の治療手技を確立することである。陽性荷電マグネトリポソーム (以下 MCL) を固形がんの転移巣へ注入するためには、動脈造影の技術を用いる。MCL 単剤では動脈造影の技術で注入しても、標的臓器で拡散してしまうため、臨床で塞栓物質として使用されるヨード化ケシ油脂肪酸エチルエステル (リピオドール) と混合 (以下混和物とよぶ) して動注する。混和物を標的臓器に留置する手技の確認と、24 時間程度停滞するか否かの確認をする。

(5) ヒトへの臨床応用へ向けての RF-8 と MCL を用いた温熱治療の第 1 相臨床試験

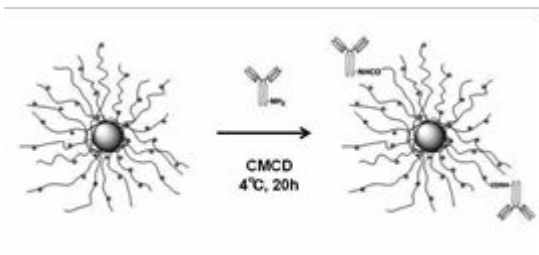
本学 IRB の許可を得て「標準治療が無効であった再燃・再発前立腺がんを対象とした陽性荷電マグネトリポソームと誘電加温装置「サーモトロン RF-8」を用いた温熱治療の第 1 相臨床試験」として 3 名の患者に MCL を用いた温熱治療を実施。

3. 研究の方法

(1) 抗 RANKL 抗体結合 MNP の作成

N-ビニル-2-ピロリドン/メタクリル酸メチル/メタクリル酸三元共重合体 (P(VP-MMA-MA) 存在下、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 中、鉄ペンタカルボニル (Fe(CO)₅) の高温熱分解反応を行うことにより、既報の粒子に比べリン酸緩衝生理食塩水中でも分散性が高く、また、交番磁場の照射でも発熱する性質を有している

P(V-MMA-MA) 被覆磁性ナノ粒子 (P(VP-MMA-MA)-MNP) を合成した(下図)。



得られた P(VP-MMA-MA)-MNP に標的指向性を付与するため、乳がんや胃がん細胞に認められる HER-2 タンパク質のモノクローナル抗体であるハーセプチンとの反応を、pH 6.5 のリン酸ナトリウム緩衝液中 N-シクロヘキシル-N'-(2-モルフォリノエチル)カルボジイミド (CMCD) を用いて 4 で 20 時間行い、ハーセプチン結合 P(VP-MMA-MA)-MNP を得た。

(2) In vitro 細胞取込実験

培養細胞の準備

In vitro で用いる培養細胞をマウス骨芽細胞培養細胞 MC3T3-E1 とした。

抗 RANKL 抗体結合 MNP と抗 HER-2 抗体結合 MNP(対照) の MC3T3-E1 への接着を評価

100 mm シャーレに MC3T3-E1 を 1.0×10^6 cell / Dish で播種し、24 時間培養させた。その後 1 mg / mL に調整した抗 RANKL 抗体結合 MNP を 200 μ L 添加して、4 時間振盪培養を行った。アスピレーターで微粒子を添加した培養培地を吸引除去して PBS で 3 回洗浄後細胞をはがし、培地 4 mL を添加して遠沈管に回収しセルカウントを行った。その後回収した遠沈管を、10,000 rpm, 15 min, 4 で遠心し、培地を吸引除去した後、12 mol/L 塩酸 0.5 mL (6.0×10^{-3} mol) で取込まれた微粒子と細胞を溶出。鉄濃度測定を行い 1 細胞あたりに取込まれたマグネタイト量を算出した。

走査型電子顕微鏡 (SEM) 画像による評価

抗 RANKL 抗体結合 MNP の MC3T3-E1 に対する接着の様子を、SEM での確認を試みた。抗 HER2 抗体結合 MNP は MC3T3E-1 像にほとんど影響は及ぼしていない。一方、抗 RANKL 抗体結合 MNP は MC3T3E-1 の表面上に白色の固形物が多数存在しているのが示された。さらにこの白色固形物が抗 RANKL 抗体結合 MNP であることを確認するために、X 線蛍光分析を用いて成分を分析した。その結果、微量ではあるが、通常では存在しない鉄が検出されてい

る。従って、この白色固形物は抗 RANKL 抗体結合 MNP である可能性が示唆された。

(3) 抗 RANKL 抗体結合 MNP を用いた磁場誘導加温法の有効性の検証

ラット前立腺がん細胞株 PCa1 (マイコプラズマ検査済、 1×10^5 個) を Phosphate buffer (0.05M sodium phosphate and 0.15M NaCl, pH7.4) 100ml に懸濁し、イソフルレン吸入麻酔 (導入時 5%、維持 3%) を施した被移植動物の背部脊椎骨周囲皮下に 27G 針付きシリンジで移植する。同一群内の個体識別のため、イヤープンチを施す。移植直後から 3 日に 1 回、腫瘍径を測定する。腫瘍が十分に大きくなる移植後約 3~4 週後に、尾静脈から磁性ナノ粒子を 50 μ l 注入する。注入後 24 時間で頸椎脱臼にて屠殺する。即座に血球の解析、血液内サイトカイン定量のため採血する。さらに腫瘍塊を摘出・腫瘍塊を半割し、半分を 10%ホルマリン固定し病理組織標本を作成し、磁性ナノ粒子の分布を評価する。

(4) intervention therapy (IVR) 技術を用いたがん転移巣治療の可能性の検討

硫酸アトロピン 0.05mg/kg (投与液量: 0.1mL/Kg)、塩酸メドトミジン 0.05mg/kg (投与液量: 0.05mL/kg)、ミダゾラム 0.5mg/kg (投与液量: 0.1mL/kg) を耳根部筋肉内投与し麻酔導入をする。気管カテーテル挿管後、吸入麻酔器および人工呼吸器を用いて N2O:O2=1:1 の混合ガス + 1.5%イソフルランの条件下で麻酔を維持する。

体位は背臥位とし、大腿部皮膚を切開し、大腿動脈にシースを留置する。臨床での動脈造影と同じ手順で、シースから動脈造影用のカテーテルを挿入し仮想の標的臓器として脾臓まで到達させる。MCL 3ml (鉄 33mg/1ml) とリピオドール 3ml の混和物を脾動脈から注入する。術中外科用 X 線テレビ措置を用いて X 線透視を実施する。これにより混和物が脾臓に到達したこと、脾臓で停滞していることを確認する。

標的臓器として腎臓、膀胱も同様に試みる。

(5) ヒトへの臨床応用へ向けての RF-8 と MCL を用いた温熱治療の第 1 相臨床試験

標準治療に効果がなくなった去勢抵抗性前立腺がん患者で、本第 1 相臨床試験に文書で同意した 3 名に対して実施。鉄濃度 30mg/ml の MCL 総量 2ml を前立腺にエコーガイド下で注入。RF-8 で 30 分加温して、安全性の確認を行った。

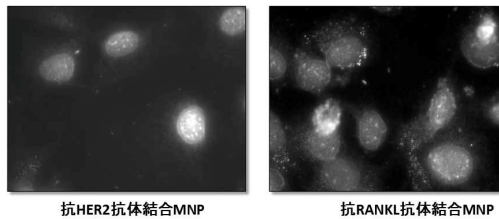
4. 研究成果

(1)抗 RANKL 抗体結合 MNP の作成

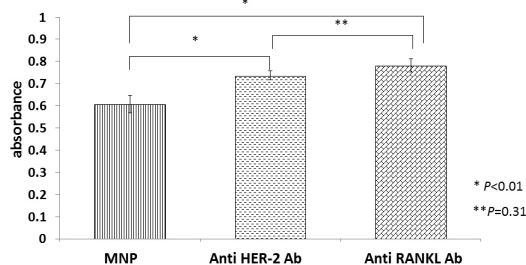
がん骨転移の鍵となる RANKL (nuclear factor kappa-B ligand)に着目して抗 RANKL モノクローナル抗体との反応も行い抗 RANKL 抗体結合 MNP の作成が可能であった。

(2)In vitro 細胞取込実験

抗 RANKL 抗体を用いた免疫染色で、MC3T3-E1 表面に RANKL が存在することを確認した。抗体結合 MNP が MC3T3-E1 に吸着している様子を蛍光顕微鏡で確認した(下図)。



マグネタイト量は取り込まれ鉄濃度で換算した。対照として用いた抗 HER2 抗体結合 MNP と抗 RANKL 抗体結合 MNP では、鉄濃度換算で、それぞれ 3.1mg/dl、6.2mg/dl と、抗 RANKL 抗体結合 MNP が有意に MC3T3-E1 に取り込まれていたことが示された(下図)。

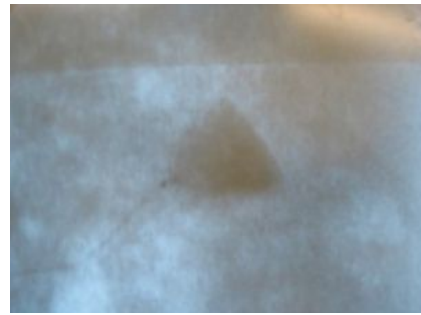


(3)抗 RANKL 抗体結合 MNP を用いた磁場誘導加温法の有効性の検証

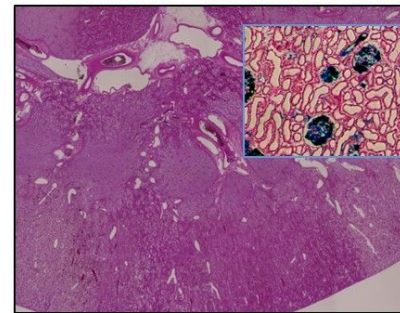
尾静脈から抗 RANKL 抗体結合 MNP を注入して 24 時間後に屠殺して骨浸潤部位を摘出した。骨浸潤部位には抗 RANKL 抗体結合 MNP は認められなかった。そのため、磁場照射による温熱治療も実施していない。

(4)intervention therapy (IVR) 技術を用いたがん転移巣治療の可能性の検討

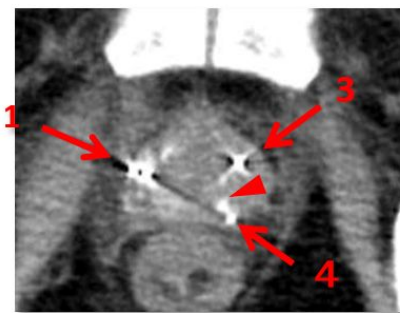
ミニプタの腎臓に対し IVR 技術で MCL を到達させ、一定時間停滞させることが可能であることを証明した(下図)



ミニプタ腎臓の組織学的検討では、腎系球体に MCL が沈着していることが証明できた。(下図)



(5)ヒトへの臨床応用へ向けての RF-8 と MCL を用いた温熱治療の第 1 相臨床試験



MCL を前立腺内に注入した後の CT 画像
上図の 1.3.4 はそれぞれ MCL の近辺に刺入した温度計を示す。

患者背景

症例	1	2	3
年齢	67	72	78
臨床病期	cT4N1M1b	cT3aNOM1b	cT3aNOMO
転移部位	LN、骨	骨	骨、肺
治療前 PSA	123	85	1.2

治療結果

症例	1	2	3
最大出力	400	700	700
治療時間	10	20	20
最大温度	39	41	41
治療前後 PSA(ng/ml)	123/205	85/105	1.2/1.3
治療前後 IL-6(pg/ml)	1.8/3.2	1.9/2.0	1.7/4.1
Grade3 以上の有害事象	なし	なし	なし

マグネタイト微粒子と誘電加熱装置「サーモトロン RF-8」を用いた温熱治療の第 相臨床試験では、有害事象がなく、患部の温度上昇を確認することができた。副次エンドポイントとしての PSA は治療後の下降はみられなかった。前立腺原発巣に MCL を注入し加熱しているため、一次的に PSA が上昇したと考えている。

<引用文献>

1. Shinkai M, Yanase M, Honda H, et al. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: In vitro study. Jpn J Cancer Res 87: 1179-1183 1996.
2. Yanase M, Shinkai M, Honda H, et al. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: Ex vivo study. Jpn J Cancer Res ; 88:630-632 1997.
3. Kawai N, Ito A, Nakahara Y, et al. Anticancer effect of hyperthermia on prostate cancer mediated by magnetite cationic liposomes and immune-response induction in transplanted syngeneic rats. Prostate 64: 373-381, 2005.
4. Kawai N, Ito A, Nakahara Y, et al. Complete regression of experimental prostate cancer in nude mice by repeated hyperthermia using magnetite cationic liposomes and a newly developed solenoid containing a ferrite core. Prostate.; 66: 718-727, 2006
5. Kawai N, Futakuchi M, Yoshida T, et al. Effect of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumor in bone. Prostate.68, 784-792.2008
6. Kobayashi D, Kawai N, Sato S, et al. Thermo-therapy using magnetic cationic liposomes powerfully suppresses prostate cancer bone metastasis in a novel rat model. Prostate. 73:913-922 2013.

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 3 件)

1. 永田 大介、池上 要介、太田 裕也、藤井 泰普、丸山 哲史：当院における腹腔鏡下前立腺全摘除術の治療成績。第 28 回日本内視鏡外科学会総会、2015.12.10-12、大阪国際会議場 他(大

阪府大阪市)

2. 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がん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 回日本がん治療学会学術集会、2015.10.29-31、国立京都国際会館(京都府京都市)
3. 河合 憲康：去勢抵抗性前立腺がんに対する治療戦略。第 14 回知多前立腺研究会、2015.3.14、セントレア会議室(愛知県常滑市)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

永田 大介(NAGATA Daisuke)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：20336689

(2)研究分担者

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

郡 健二郎(KOHRI Kenjiro)

名古屋市立大学・学長

研究者番号：30122047

安藤 亮介(ANDO Ryosuke)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30381867

恵谷 俊紀(ETANI Toshiki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：30600754

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