



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1987号
学位記番号	第1398号
氏名	永井 隆
授与年月日	令和5年9月25日
学位論文の題名	<p>Role of HIKESHI on Hyperthermia for Castration-Resistant Prostate Cancer and Application of a Novel Magnetic Nanoparticle with Carbon Nanohorn for Magnetic Hyperthermia (去勢抵抗性前立腺癌に対する温熱療法におけるHIKESHIの役割とカーボンナノホーンを用いた新規磁性ナノ粒子の磁気温熱療法への応用)</p> <p>Pharmaceutics, 15: 626, 2023</p>
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 濱野 高行, 樋渡 昭雄

## 論文内容の要旨

【目的】 去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC)の予後は不良であり、新規の治療法が求められている。私たちはこれまでに前立腺癌の温熱療法、とりわけ磁気温熱療法に着目し研究を行ってきた。磁気温熱療法は、交流磁場(Alternating magnetic field : AMF)下で金属が発熱する性質を利用した治療法である。酸化鉄ナノ粒子 (iron oxide nanoparticle: IONP)を含むナノ粒子が腫瘍周囲に注入され AMF 下に配置されることで、ナノ粒子のみが発熱し腫瘍部位のみが加温されるものである。これまでに前立腺癌に対して磁気温熱療法の報告が散見されるものの、臨床現場での実用に至っていない。前立腺癌への温熱療法を行うにあたり、課題の一つとして熱耐性、すなわち腫瘍細胞の温熱療法への抵抗性の問題がある。本研究では、ヒト CRPC 細胞株 22Rv1 を用いて、熱耐性に関わると近年報告されている Hikeshi との関連性に着目して解析を行った。Hikeshi とは熱ショック下において、heat shock protein (HSP) 70 を核内に輸送するタンパクで、分子シャペロン効果にて熱ショックにおけるタンパク損傷の修復を行い、熱耐性に関わるとされる。また磁気温熱療法を行うにあたり、さらに治療効果の高い磁性ナノ粒子の開発が求められている。そこで私たちは薬剤キャリアとしてのカーボンナノホーン (carbon nanohorn: CNH) に着目し、磁気温熱療法に適応可能な新規ナノ粒子の開発を行い、その治療効果を検証した。

.....

【方法】 2種類の siRNA を用いて 22Rv1 の Hikeshi 発現を knockdown した。熱ショックとしてインキュベーターの温度設定を 43°Cに維持し、熱ショック下での HSP 70 の挙動を western blotting を用いて測定した。また、熱ショック下での細胞生存率を WST-8 assay を用いて測定し、hikeshi を knockdown することでの熱ショックの効果が増強されるかを検証した。また前立腺生検の臨床検体を用いて tissue microarray を行い、HIKESHI の免疫染色強度および前立腺癌の悪性度である Gleason pattern の関連を検索した。

中部大学および台湾科学技術大学と共同研究を行い、CNH を用いた温熱療法が可能なナノ粒子を作製した。3-aminopropylsilyl を用いて CNH と IONP を結合させ、CNH-APS-IONP と命名した。CNH-APS-IONP の磁気温熱療法効果を検証するために、22Rv1 を用いた前立腺癌皮下移植モデルマウスを使用した。22 Rv1 を 6 週齢の雄ヌードマウスの背部に皮下移植した。皮下移植後 3 週間 (21 日目) に、注入群 (CNH-APS-IONP 注入)および治療群(CNH-APS-IONP 注入および AMF 照射) (各群 n=6) のモデルマウスの腫瘍に 300  $\mu$ L の CNH-APS-IONP (Fe 濃度: 36.3 mg/m)を腫瘍周囲に局所的に注射した。治療群のマウスには、コイル型 AMF 発生装置を用いて、2 日間に渡り 30 分間 AMF を照射した。サーモグラフィを用いて腫瘍周囲の温度を測定した。また、コントロール群、注射群、治療群の 3 群での各群の腫瘍の大きさを経時的に測定し、治療効果を検証した。また各群における Ki-67 labeling index を測定し細胞増殖活性を評価した。

.....

【結果】 熱ショック下において HSP 70 の核内移行阻害が Western blotting により確認された。また WST-8 assay において siRNA で Hikeshi を knockdown した群では negative control と比較して細胞生存率が低下しており、温熱療法効果が増強したと考えられた。さらに、tissue microarray では Gleason pattern が上昇するにつれ Hikeshi の免疫染色強度が増強しており、悪性度と熱耐性の関係が示唆された。動物実験においては CNH-APS-IONP を用いた温熱療法により腫瘍温度は 42-46°Cに保つことができた。さらに、治療群の腫瘍増殖率は、コントロール群や注入群より有意に抑制された。Ki-67 labeling index においても治療群はコントロール群や注入群

と比較し有意に低い結果であった。

.....

**【結論】** 前立腺癌の熱耐性メカニズムに Hikeshi が関わる可能性が示唆された。また、新規ナノ粒子 CNH-APS-IONP の開発に成功した。CNH-APS-IONP を用いた磁気温熱療法により腫瘍増殖を抑制することができた。今後は CNH の特性を活かし、抗体や抗腫瘍薬などの結合により複合的な治療が可能なナノ粒子開発が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

【目的】 去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) の予後は不良であり、新規の治療法が求められている。磁気温熱療法は、交流磁場 (Alternating magnetic field: AMF) 下で金属が発熱する性質を利用した治療法である。酸化鉄ナノ粒子 (iron oxide nanoparticle: IONP) を含むナノ粒子が腫瘍周囲に注入され AMF 下に配置されることで、ナノ粒子が発熱し腫瘍部位のみが加温される。前立腺癌への温熱療法を行うにあたり、熱耐性、すなわち腫瘍細胞の温熱療法への抵抗性が課題である。本研究では、ヒト CRPC 細胞株 22Rv1 を用いて、熱ショック下において heat shock protein (HSP) 70 を核内に輸送して、熱ショックにおけるタンパク損傷の修復を行う HIKESHI に着目し、検討した。さらに磁気温熱療法を行うにあたり、さらに治療効果の高い磁性ナノ粒子を開発するため、カーボンナノホーン (carbon nanohorn: CNH) に着目した新規ナノ粒子を作成し、その治療効果を検証した。

【方法】 2 種類の siRNA を用いて 22Rv1 の HIKESHI 発現を knockdown した。43°C の熱ショック下で HSP 70 の挙動を western blotting を用いて測定した。熱ショック下での細胞生存率を WST-8 assay を用いて測定した。また前立腺全摘出検体から作成した tissue microarray を用いて、HIKESHI の免疫染色強度および Gleason pattern の関連性を検討した。3-aminopropylsilyl を用いて CNH と IONP を結合させた新たなナノ粒子 (CNH-APS-IONP) を作成した。CNH-APS-IONP の磁気温熱療法効果を検証するために、22Rv1 を 6 週齢の雄ヌードマウスの背部に皮下移植し、21 日目に、注入群 (CNH-APS-IONP 注入) および治療群 (CNH-APS-IONP 注入および AMF 照射) (各群 n=6) のモデルマウスの腫瘍に 300  $\mu$ L の CNH-APS-IONP (Fe 濃度: 36.3 mg/m) を腫瘍周囲に局所的に注射し、コイル型 AMF 発生装置を用いて、AMF を照射した。コントロール群、注射群、治療群の 3 群での各群の腫瘍の大きさを経時的に測定し、治療効果を検証した。また各群における Ki-67 labeling index を測定し細胞増殖活性を評価した。

【結果】 熱ショック下において HSP70 の核内移行阻害が Western blotting により確認された。また WST-8 assay において siRNA で HIKESHI を knockdown した群では negative control と比較して細胞生存率が低下しており、温熱療法効果が増強したと考えられた。さらに、tissue microarray では Gleason pattern が上昇するにつれ HIKESHI の免疫染色強度が増強しており、悪性度と熱耐性の関係が示唆された。動物実験においては CNH-APS-IONP を用いた温熱療法により腫瘍温度は 42-46°C に保つことができた。さらに、治療群の腫瘍増殖率は、コントロール群や注入群より有意に抑制された。Ki-67 labeling index においても治療群はコントロール群や注入群と比較し有意に低い結果であった。

【結論】 前立腺癌の熱耐性メカニズムに HIKESHI が関わる可能性が示唆された。また、新規ナノ粒子 CNH-APS-IONP の開発に成功した。CNH-APS-IONP を用いた磁気温熱療法により腫瘍増殖を抑制することができた。今後は CNH の特性を活かし、抗体や抗腫瘍薬などの結合により複合的な治療が可能なナノ粒子開発が期待される。

【審査内容】 申請者による約 20 分の研究内容発表が行われた後、主査の高橋教授から、HIKESHI の核内移行の機序、核内タンパクの分離・解析方法、核内移行への確認方法、CRPC 組織における HIKESHI 発現など 11 項目、第一副査の濱野教授から、前立腺癌への温熱治療、HIKESHI の臨床応用、HSP70 発現の解釈、DDS への応用など 10 項目、第二副査の樋渡教授から、温熱療法の発熱原理、cell cycle との関連、PSMA による臨床応用の方法など 8 項目の質問があった。これらの質問に対して申請者から、一部回答に窮したものの概ね適切な回答が得られ、本論文の内容について十分に理解し、専攻分野 (腎・泌尿器科学) に関する知識を習得しているものと判断された。本研究は、前立腺癌の熱耐性メカニズムに HIKESHI が関わる可能性を示し、新たに開発したナノ粒子 CNH-APS-IONP を用いた磁気温熱療法により腫瘍増殖を抑制することを初めて明らかにした。よって、本論文の筆頭著者である申請者は、博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判断した。