
腎癌に対する加熱による 腫瘍縮小効果の検討

宮内 勇貴

愛 媛 医 学

第35巻 第1号 別刷
平成28年 3月 1日発行

原 著

腎癌に対する加熱による腫瘍縮小効果の検討

宮内 勇貴

愛媛大学大学院泌尿器科学

要 旨

目的：小径腎癌の治療において、低侵襲な治療としてラジオ波熱凝固術（radiofrequency ablation；RFA）の有効性が報告されている。RFAは通常100℃の熱凝固による組織壊死を来すが、周辺臓器への熱伝播の影響で合併症も報告されている。今回、より低温の加熱による腫瘍縮小効果を *in vivo* で検討した。

方法：4週齢の雌性BALB/c-nu系ヌードマウスの背部皮下にヒト腎癌樹立細胞株であるCaki-1を移植し、腫瘍の増大を待って入熱実験を行った。入熱は研究用焼却治療器と加熱針を用い、45℃、55℃、65℃で5分ないし10分間行った。入熱後1、2、4、7、14、21、28日目に腫瘍体積を測定した。また腫瘍摘出後、組織学的検索を行った。

結果：針を刺入しただけの非加熱群の腫瘍体積は漸増し、28日後には約3.5倍となった。それに対し、45℃で5分もしくは10分間入熱した群では、7日目まで腫瘍の増大は抑制されたが、それ以降は早い速度で増大した。55℃や65℃で加熱した群では、腫瘍は縮小し、65℃で10分間入熱した群では、28日目の腫瘍縮小効果が全ての群のうち最大で、穿刺直後の約15%程度まで縮小した。細胞機能を評価するために、NADPHの恒常的な発現を検討すると、45℃の入熱ではほとんど影響を及ぼさなかったが、55℃や65℃で加熱すると、1日目から細胞機能が低下した部分の面積が増加し、その後面積は回復した。入熱により腫瘍の周辺部にfocalにapoptosisを確認したが、対照群と比較して若干の増加を認めたのみであった。HE染色で、45℃で加熱した群では、入熱後4日目から炎症細胞浸潤を認め、その後狭い範囲のnecrosisを認めたが、55℃や65℃で加熱した群ではより早期に炎症細胞浸潤を認め、より広範囲にnecrosisを認めた。

結論：腎癌組織において、現在臨床で使用されているRFAよりも、より低温で腫瘍縮小効果を認めた。これは加熱による直接的な凝固壊死に加えて、二次的な炎症細胞浸潤が腫瘍縮小効果を増強していると考えられる。合併症の少ない局所治療の開発へとつなげていきたい。

Key Words：腎癌、加熱、抗腫瘍効果

緒 言

熱による抗腫瘍効果は古くから言われているが、実際に温熱治療の研究が盛んに行われるようになったのは1980年代である。特に表在性腫瘍で盛んで、乳癌、頭頸部癌、皮膚癌などで応用されるようになってきた。機器の進歩によりさらに高温での治療が可能になり、代表的な治療法として高周波電流による電磁波（ラジオ波）を発生し、腫瘍塊を凝固壊死させるラジオ波熱凝固術（radiofrequency ablation；RFA）が確立した。腎癌に対するRFA治療は、1997年にZlottaら¹⁾が報告して以来、小径腎癌の局所治療として広く認識されるようになってきている。現在本邦では、保険適応ではないものの、腎癌診療ガイドライン²⁾においても「全身状態や合併症のため根治的な治療が困難な場合に推奨される」とされている。一方で、その頻度は少ないも

の、正常組織や尿路などへの熱凝固の影響により重篤な合併症も報告されている³⁾ため、合併症の軽減には比較的低温で治療することが有用と考える。

今回、より効果的な加熱条件を求めため、厳密に温度制御可能なシステムを用いて、ヒト腎癌細胞株に対する抗腫瘍効果を *in vivo* で検討した。

対象と方法

実験動物および細胞株

3週齢の雌性BALB/c-nu系ヌードマウスを日本クレア（東京）から購入し、1週間飼育した後に本実験に用いた。なお本実験は、愛媛大学動物実験規則に従って行った。また、ヒト腎癌樹立細胞株であるCaki-1はDSファーマバイオメディカル社（大阪）から購入し、10%ウシ胎児血清（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,

USA) を含むMcCoy 5A培地 (Life technologies, Grand Island, NY, USA) 中で数回継代し, 凍結保存した. 本実験に用いる際は, 解凍後6~8回継代したものを本実験に用いた. 10 cm培養皿(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) で70%コンフルエントになった状態でトリプシン (和光, 大阪) 処理をし, $3 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ mediumとした. 同量のマトリゲル (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) を混合して注射液とした. イソフルラン (マイラン製薬, 東京) による吸入麻酔下に, 左右のヌードマウス背部皮下に $200 \mu\text{l}$ ずつ注射し, 穿刺が可能になる (腫瘍長径が約10~20 mm) まで約3週間飼育した (図1A).

腫瘍への入熱

腫瘍への入熱には, 研究用焼却治療器 (AMTC300; アドメテック, 愛媛) (図1B) と加熱針 (SUS304; 22G, 加熱部長さ10 mm) (図1C) を用いた. 本装置は, RFAのような生体への高周波の通電を行わず, 腫瘍部位に穿刺した針を内部から発熱させ, そこから生体への熱伝導を行うものである. 加熱針にセンサーを付けて温度のモニタリングを行った. イソフルラン吸入麻酔下に, 加熱針を腫瘍の長軸方向に穿刺し (図1D), 入熱は, 45°C , 55°C , 65°C で5分ないし10分間

行った. 吸入麻酔下に加熱針で穿刺のみ施行した群を対照群とした.

腫瘍体積測定

穿刺・入熱後1, 2, 4, 7, 14, 21, 28日目に, 腫瘍長径および短径, 腫瘍高を測定し, 体積を概算した ($0.5 \times \text{長径} \times \text{短径} \times \text{高さ}$). 体積のデータは, 各群5腫瘍のデータから平均値 \pm 標準偏差を算出した. 腫瘍の摘出は, 頸椎脱臼にて屠殺した後に行った. 腫瘍は2分割し, 一方を10%中性ホルマリン (pH 7.4) で48時間固定し, パラフィンに包埋した. 他方はOptimal Cutting Temperature (O. C. T.) コンパウンド (Tissue-Tek; サクラファインテックジャパン, 東京) 内に包埋し, -80°C で保存した.

NADPH染色

O. C. T. コンパウンド内に包埋した凍結組織を $10 \mu\text{m}$ 厚に薄切し, この染色に用いた. 薄切切片を 1mM nicotinamide adenin dinucleotide phosphate (NADPH; Sigma-Aldrich), 0.3mM Nitro Blue Tetrazolium (NBT; Sigma-Aldrich), 50mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS, ナカライテスク, 京都) (pH 8.2) 中で 37°C , 3時間反応させ, 光学顕微鏡 (BX63; OLYMPUS, 東京) で観察した. 陰性コントロールとして, NADPHを

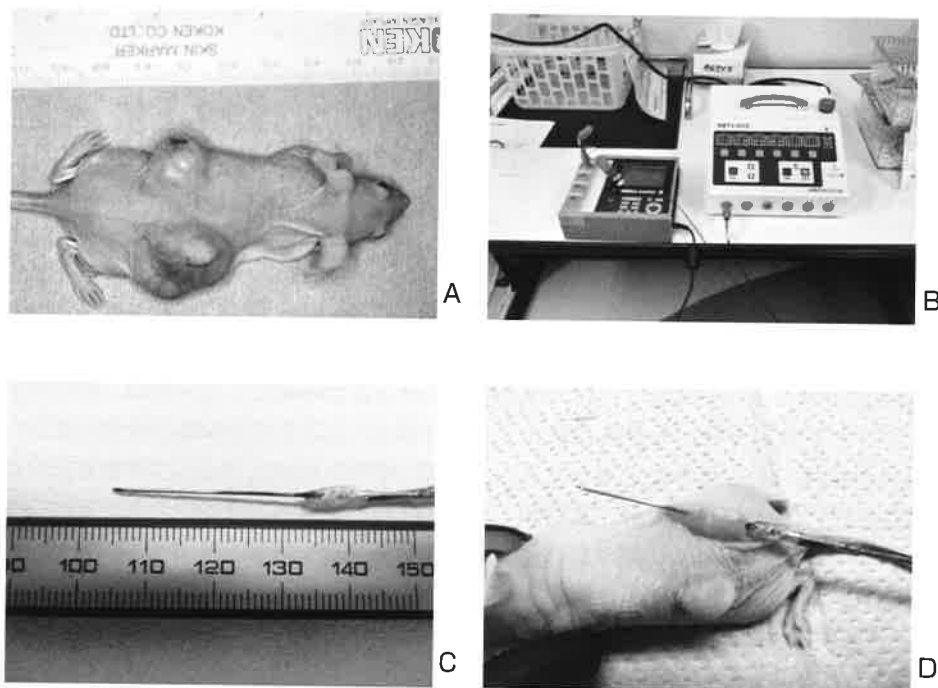


図1. (A) ヒト腎癌細胞株Caki-1を背部皮下に移植し, 約3週間で長径約10~20 mm大に成長
(B) 研究用焼却治療器 (AMTC300)
(C) 加熱針 (SUS304; 22G, 加熱部長さ10 mm)
(D) 針を穿刺した上で加熱

含まない溶液中で反応させた切片を用いた。画像解析ソフト (cellSens Standard; OLYMPUS) を用いて、熱処理によって染色性の脱落した領域の面積を測定し、平均値±標準偏差を計算した。

ヘマトキシリン-エオジン染色とApoptosis染色

O. C. T. コンパウンド内に包埋した凍結組織を5μm厚に薄切し、連続切片を作成した。そのうち1枚にヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行った。さらに連続切片を用いて、In Situ細胞死検出キット (ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京) でプロトコールに沿って染色した。陰性コントロールとしてTdTを含まない反応液中で反応させた切片を用い、対比染色はメチルグリーン (ダコ・ジャパン, 東京) で行った。

免疫組織学的検討

パラフィン包埋した組織を5μm厚に薄切し、免疫組織学的検討に使用した。まず20μg/mlのProteinase K (Sigma-Aldrich) で10分間処理した。内因性ペルオキシダーゼをブロッキングした後、正常ヤギ血清を用いて30分間室温でブロッキングした。一次抗体として抗マウスCD45・ラットモノクローナル抗体 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を4℃で一晩反応させ、Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後に、ヒストファインシンプルステインMAX-PO (Rat) (ニチレイバイオサイエンス, 東京) と室温で30分間反応させた後、3, 3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich) で可視化した。染色の陰性コントロールとして、一次抗体の代わりに非免疫ラットIgGを用いた。メチルグリーンにて対比染色を行い、光学顕微鏡下に観察した。

結果

腫瘍体積の変化

65℃・10分間加熱した腫瘍の28日後の状態を図2に示す。皮下に移植された腫瘍は著明に縮小し、ほぼ平坦化している。加熱針を穿刺した直後の腫瘍体積を100%として、その後の推移を示したものが図3である。針を刺入しただけで熱を加えなかった群の腫瘍体積は漸増し、28日後には339.6±72.6%となった。それに対し、45℃で5分もしくは10分間加熱した群では、7日目までその腫瘍の増大を抑制されたものの、それ以降は早い速度で増大した。ただ28日後のその体積は穿刺直後と比較して、45℃・5分の群では154.3±16.2%、10分の群では187.0±51.7%にとどまった。一方、55℃や65℃で加熱した群では、1日目に一時的



図2. 皮下移植した腫瘍の加熱後28日目の外観 (左側: 65℃・10分間, 右側: 65℃・5分間)

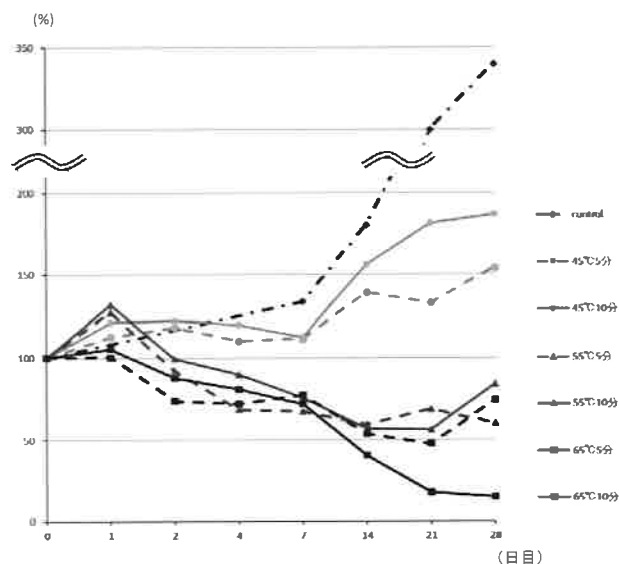


図3. 加熱した温度別あるいは時間別腫瘍体積の変化。腫瘍体積=0.5×直径×短径×高さ、として測定し、各群5腫瘍ずつの平均値を示した。

な腫瘍の増大を認めたが、その後は腫瘍の増大は抑制され、むしろ縮小していった。65℃で10分間加熱した群では、28日目の腫瘍縮小効果が全ての群のうち最大で、穿刺直後の14.9±18.7%まで縮小した。

NADPH染色

細胞機能を評価するために、NADPHの恒常的な発現を検討した。加熱による細胞機能への影響を染色陰性部分の面積を測定することにより行った (図4)。対照群 (穿刺のみ施行した群)、55℃で10分間誘導加熱した後7日目の代表的な写真を図4A, 図4Bにそれぞれ示す。陰性部分の面積を測定すると、45℃の入熱では、たとえ10分間加熱してもほとんど陰性部分の

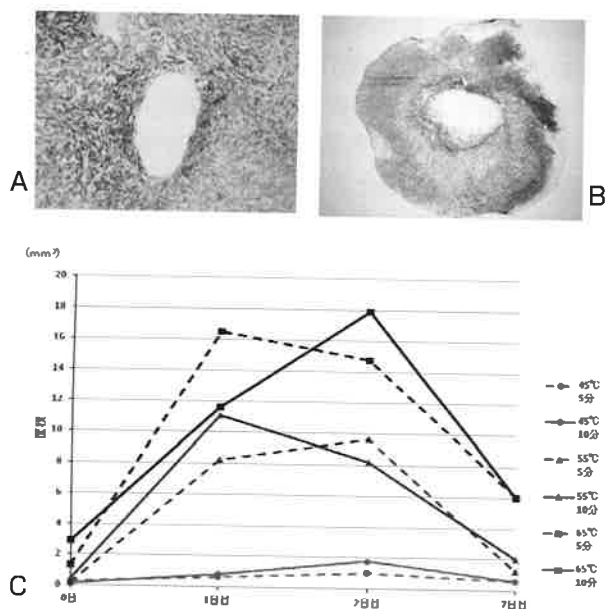


図4. NADPH染色
 (A) 対照群(穿刺のみの群) 0日目, ×100
 (B) 55°C・10分間加熱 7日目, ×20
 (C) 加熱した温度別あるいは時間別非染色部分の面積の変化. 各プロットは4~10切片の測定値の平均値とした.

増加を認めなかった ($0.6 \pm 0.19 \text{ mm}^2$). 一方, 55°Cや65°Cで加熱すると, 1日目から染色陰性部分の面積が増加し, 55°C・5分や10分, 65°C・5分の入熱ではその1日目をピークに (55°C・5分; $8.2 \pm 4.5 \text{ mm}^2$, 55°C・10分; $11.0 \pm 2.4 \text{ mm}^2$, 65°C・5分; $16.5 \pm 3.6 \text{ mm}^2$), 65°C・10分間の入熱では2日目をピークに ($17.9 \pm 4.6 \text{ mm}^2$) その面積が減少した (図4C).

Apoptosis染色

対照群では, 散在性にapoptosisが確認されたのに対し, 入熱により影響を受けたと思われる部の外側, 腫瘍の周辺部にfocallyにapoptosisが確認された (図5). 55°Cや65°Cで加熱後徐々に増加し, 4日目に最も多くなったが, その増加は顕著なものではなく, 対照群と比較して若干の増加を認めたのみであった.

HE染色とCD45に対する免疫組織学的検討

HE染色で形態学的に炎症細胞浸潤とnecrosisを, また抗CD45抗体は大部分の白血球に反応するため, その染色により免疫組織学的に炎症細胞浸潤を確認した. 対照群 (図6A) では認められなかった炎症細胞浸潤が, 入熱後に種々の程度に認められた. まず45°Cで加熱した群では, 入熱後4日目から炎症細胞浸潤を認め, 7日目には穿刺部付近の狭い範囲にnecrosisを

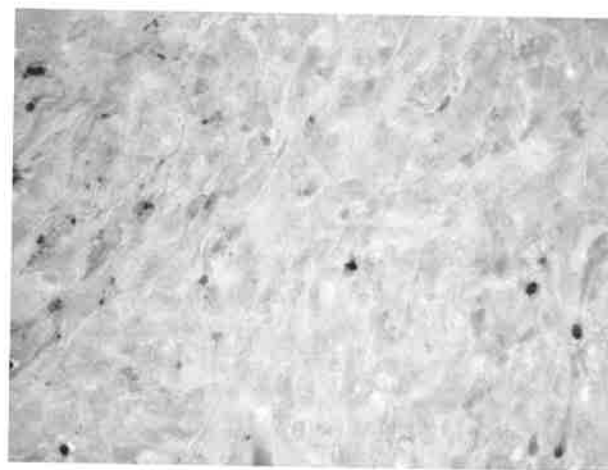


図5. Apoptosis染色
 入熱により影響を受けた部の周辺に, focallyにapoptosisが確認される. ×400

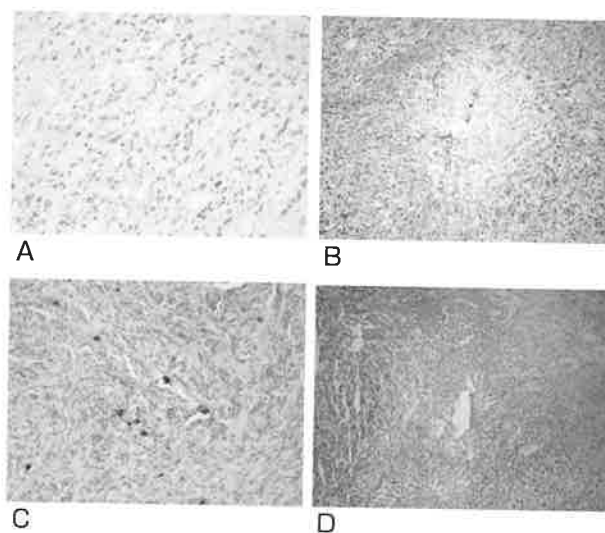


図6. HE染色とCD45染色

- (A) 対照群, 炎症細胞浸潤は認めない. (HE染色, ×200)
- (B) 65°C・10分間加熱1日目, necrosisとその周囲に炎症性細胞浸潤を認めた. (HE染色, ×100)
- (C) CD45染色により, 白血球の浸潤を確認できる. (CD45染色, ×200)
- (D) 65°C・10分間加熱2日目, より広範囲にnecrosisを認める. (HE染色, ×100)

認めた. 55°Cで加熱した群では入熱後1日目から炎症性細胞浸潤を認め, 4日目に穿刺部を中心にnecrosisを認めた. さらに65°Cで加熱した群は, 入熱後1日目から炎症性細胞浸潤を認め (図6B, C), 翌2日目には穿刺部を中心に広範囲にnecrosisを認めた (図6D).

考 察

RFAに比較してより低温の入熱でも、穿刺部位周辺に炎症細胞浸潤をきたし、最終的にnecrosisをきたした。特に65℃、10分間の入熱では、入熱後28日目にはマウス皮下に移植したヒト腎癌細胞が大幅に縮小するに至った。

わが国の2010年の腎細胞がん死亡数は男性約2.7千人、女性約1.3千人で、男女ともがん死亡全体の1%を占める⁴⁾。腎癌の三主徴は疼痛、血尿、腹部腫瘤と言われているが、これらが揃うことはほとんどなく、最近では健診や他疾患フォロー中の画像検査により発見される小径腎癌が多くなってきている。特に径4cm以下のT1a症例には種々の治療選択肢があるが、病変のみを治療する腎温存療法が主流である。一般的には腎部分切除術が選択されるが、保険適応外の局所療法としてRFAが報告されている。腎癌診療ガイドラインでも、高齢や合併症などの理由により手術が適当でない症例に対して推奨されている²⁾。しかしながら、周囲の正常組織への影響が問題であり、実際、経皮的RFAにより8~13%の合併症が生じる。出血、膿瘍、尿管狭窄、血尿などが挙げられており、重篤なものでは腎・十二指腸瘻なども報告されている^{5)~7)}。

RFAでは60℃以上、通常約100℃を目標に加熱され、不可逆的な組織の熱変性を来す、いわゆる凝固壊死の状態となる。壊死した細胞は焼灼後3~7日でマクロファージなどにより貪食され、細胞構築は約1か月で消失したり、あるいは癒痕化すると言われている⁸⁾。今回、現在行われている高温のRFAに比較して、より低温で抗腫瘍効果を認めたことは意義深い。RFAより低温で治療が可能になれば、その合併症を軽減できる。高温のRFAで期待されるような直接的な広範囲な凝固壊死を引き起こさなくても、より低温で細胞機能が落ちると、その後直ちに誘導される炎症細胞浸潤が、その抗腫瘍効果を増強しているものと考えられる。

一般的に40℃までは可逆性の熱変性であると言われている。また癌細胞は42.5℃以上の熱に弱いとも言われているため、今回は、45℃から10℃ずつ温度を上げて、3通りの温度設定(45℃、55℃、65℃)で実験を行った。Sterrettらは45℃~55℃のより低温の加熱では著明な変化は認めないが、細胞酵素や細胞膜輸送体の変化などによる生化学的変化が浮腫などを来しているとしている⁸⁾。本研究においても、NADPHの恒常的発現を観察することにより細胞機能を評価したところ、

55℃や65℃の入熱で一時的にNADPH染色性の脱落を認めた。これは55℃や65℃の入熱により細胞機能が一時的に低下することを示している。さらに55℃や65℃の入熱後1日目に一時的な腫瘍体積の増加を認めたが、これは局所における浮腫を反映しているものと思われる。一方、45℃の入熱では、NADPHの染色性にほとんど影響することなく、10分間の入熱後2日目に狭い範囲で染色性の脱落を認めたのみで、その変化は有意ではなかった。NADPHの恒常的な発現に限ると、45℃の入熱ではさほどの機能低下を来さないことがわかる。しかしながら45℃、5分間の入熱でも、腫瘍体積の増加は1週間程度抑制しており、45℃でも他の細胞機能低下が起こっていることが示唆された。現に、入熱後4日目には炎症細胞浸潤を認め、7日目には狭い範囲でnecrosisも認めている。ただし45℃、5分あるいは10分間の入熱では、1週間後より腫瘍は再増殖しており、45℃の入熱では不十分であると言わざるをえない。一方、55℃や65℃の入熱を行った群では、腫瘍は入熱後2日目以降徐々に縮小した。これらの標本を組織学的に観察してみると、穿刺部位周囲では、apoptosisの著明な増加は認めず、necrosisが観察された。またnecrosisの拡がりに先んじて炎症細胞浸潤が確認されることより、加熱による瞬間的な細胞死以降のnecrosisの拡大、ひいては腫瘍縮小に炎症細胞浸潤が関与していることが予想される。すなわち、55℃や65℃では直接的な凝固壊死は少ないものの、その後の二次的な細胞障害が起きている可能性がある。肝細胞癌におけるRFAの研究で、壊死によりactivating signalが出現し、樹状細胞をはじめとする免疫担当細胞が活性化されることと報告されている⁹⁾。その中で、免疫認識は腫瘍焼灼部と非焼灼部に交差反応があるが、正常組織とは交差反応が乏しいことより、直接的な凝固壊死に引き続く細胞浸潤も細胞障害の一端を担っていることが示唆されている。今回の検討により、65℃、10分間の入熱により、腫瘍体積は漸減し、28日後には穿刺直後の約15%程度まで縮小した。65℃入熱の腎癌細胞に対する有効性を示し得たと思われる。また55℃入熱の結果は不十分とも言えるが、複数回治療や薬物療法との併用の可能性は残されている。今後の検討課題としたい。

謝 辞

稿を終えるにあたり、直接ご指導いただき、論文の

執筆にご助言賜りました現・重信クリニック副院長島本憲司先生ならびに愛媛大学大学院医学系研究科泌尿器科学講座准教授丹司 望先生に深甚なる謝意を表します。また、論文のご校閲を賜りました同講座教授横山雅好先生に深謝するとともに、共同研究として参画し、研究用焼却治療器と加熱針をご供与いただいたアドメテック社に深謝申し上げます。さらに、本研究を実際に行うにあたりご協力いただいた実験助手の菅野一美さん、谷本いずみさんにも感謝いたします。

文 献

1. Zlotta AR, Wildschutz T, Raviv G et al : Radiofrequency interstitial tumor ablation (RITA) is a possible new modality for treatment of renal cancer : ex vivo and in vivo experience. *J Endourol* 1997 ; 11 : 251-8.
2. 腎癌診療ガイドライン2011年版. 日本泌尿器科学会編, 東京 ; 金原出版 2011 : 47-9.
3. 杉村芳樹, 神田英輝, 有馬公伸ほか : 腎癌に対するラジオ波熱凝固術radio frequency ablation (RFA). *Jpn J Endourol* 2014 ; 27 : 316-22.
4. 国立研究開発法人国立がん研究センターがん対策情報センター : 腎細胞がん.
http://ganjoho.jp/public/cancer/renal_cell/index.html
5. Kurup AN : Percutaneous Ablation for small renal masses-complication. *Semin Intervent Radiol* 2014 ; 31 : 2-49.
6. Ramanathan R, Leveillee RJ : Ablative therapies for renal tumors. *Ther Adv Urol* 2010 ; 2 : 51-68.
7. Wah TM, Irving HC, Gregory W et al : Radiofrequency ablation (RFA) of renal cell carcinoma (RCC) : experience in 200 tumours. *BJU Int* 2014 ; 113 : 416-28.
8. Sterrett SP, Nakada SY, Wingo MS et al : Renal thermal ablation therapy. *Urol Clin North Am* 2008 ; 35 : 397-414.
9. Zerbin A, Pilli M, Penna A et al : Radiofrequency thermal ablation of hepatocellular carcinoma liver nodule can activate and enhance tumor-specific T-cell responses. *Cancer Res* 2006 ; 66 : 1139-46.

Antitumor effects of heating on human renal cancer cells *in vivo*

Yuki Miyauchi

Department of Urology, Ehime University Graduate School of Medicine

Abstract

Objective : Radiofrequency ablation (RFA) is sometimes used as a treatment for small renal tumors. We examined the antitumor effects of heat treatment using a lower temperature than RFA.

Materials and Methods : Caki-1 was subcutaneously injected in the back of nude mice. After a tumor developed, tumor was punctured with a needle and was heated using heat therapeutic equipment. The temperature was fixed at 45°C, 55°C or 65°C for 5 or 10 minutes, respectively.

Results : Tumors heated to 45°C increased in volume after 7 days. However, tumors heated to 55 or 65°C reduced gradually in size after a temporary increase. A stain for nicotinamide adenin dinucleotide phosphate (NADPH) showed that the tumor area increased on the first day after heating to 55 or 65°C, and thereafter the area gradually decreased. Inflammatory cell infiltration followed by expansion of necrosis was identified and the reaction was most remarkable in the group subjected to 65°C heating.

Conclusion : Heating to lower temperatures than RFA had an antitumor effect in renal cancer cells *in vivo*. The result suggests the possibility of another safe treatment for small renal cancer.

Key Words : renal cancer, heating, antitumor effect