

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-517495

(P2018-517495A)

(43) 公表日 平成30年7月5日 (2018. 7. 5)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 6 1 N 7/00 (2006.01)	A 6 1 N 7/00	4 C 0 9 6
A 6 1 B 5/055 (2006.01)	A 6 1 B 5/05 3 9 0	4 C 1 6 0

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁)

(21) 出願番号 特願2017-563052 (P2017-563052)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月2日 (2016. 6. 2)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年12月25日 (2017. 12. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/035440
 (87) 国際公開番号 W02016/196741
 (87) 国際公開日 平成28年12月8日 (2016. 12. 8)
 (31) 優先権主張番号 62/170, 378
 (32) 優先日 平成27年6月3日 (2015. 6. 3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/204, 312
 (32) 優先日 平成27年8月12日 (2015. 8. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 512201731
 モンテフィオーレ メディカル センター
 MONTEFIORE MEDICAL
 CENTER
 アメリカ合衆国 1 0 4 6 7 ニューヨー
 ク州 ブロンクス イースト トゥーハン
 ドレッドアンドテンス ストリート 1 1
 1
 (71) 出願人 515314797
 アルバート アインシュタイン カレッジ
 オブ メディシン, インコーポレイティ
 ド
 アメリカ合衆国 1 0 4 6 1 ニューヨー
 ク、ブロンクス、モリス パーク アベニ
 ユー 1 3 0 0

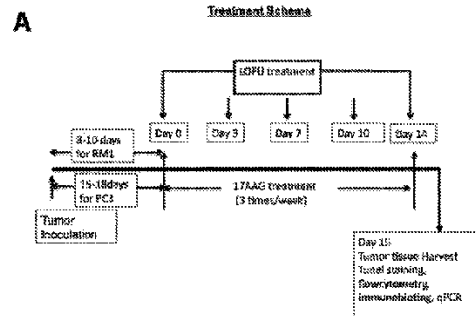
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌と転移を処置するための低密度焦点式超音波

(57) 【要約】

癌を処置するための及び抗癌治療と組み合わせて低密度焦点式超音波を使用して転移を予防するためのシステムおよび方法が開示される。

【選択図】 図 1 0 A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) と (ii) ある量の化学療法薬を被験体に施す工程を含む、被験体における化学療法の有効性を高める方法であって、

ここで、化学療法薬は腫瘍細胞において小胞体 (ER) ストレスおよび／または小胞体ストレス応答 (UPR) をもたらし、(i) と (ii) の量はともに、化学療法の有効性を高めるのに十分である、方法。

【請求項 2】

被験体中のあらかじめ決められた体積の組織における化学療法の有効性を高める方法であって、前記体積が被験体全体未満であり、

前記方法は、(i) ある量の化学療法薬を被験体に投与する工程であって、化学療法薬が腫瘍細胞において小胞体 (ER) ストレスおよび／または小胞体ストレス応答 (UPR) をもたらす、工程と、(ii) ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) を、被験体のあらかじめ決められた体積の組織に施す工程とを含み、ここで、(i) と (ii) の量はともに、あらかじめ決められた体積の組織内で化学療法の有効性を高めるのに十分である、方法。

【請求項 3】

化学療法薬に耐性のある被験体の腫瘍を処置する方法であって、

前記方法は、

指定された化学療法薬に対する耐性を有する腫瘍を有していると被験体を特定する工程と、

(i) ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) と (ii) ある量の指定された化学療法薬を被験体に施す工程とを含み、ここで (i) と (ii) の量はともに、腫瘍を処置するのに十分である、方法。

【請求項 4】

被験体の化学療法抵抗性の腫瘍を処置する方法であって、

腫瘍は以前に投与された化学療法薬に対して化学療法抵抗性になっており、

前記方法は、

(i) ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) と (ii) ある量の化学療法薬を被験体に施す工程を含み、

ここで (i) と (ii) の量はともに、化学療法抵抗性の腫瘍を処置するのに十分である、方法。

【請求項 5】

化学療法薬は腫瘍細胞中で小胞体 (ER) ストレスおよび／または小胞体ストレス応答 (UPR) をもたらす、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

化学療法薬は被験体に複数回投与されており、腫瘍は化学療法薬の初期の投与後に化学療法薬に対する耐性を有するものとして診断されたことがある、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

以前に投与された化学療法薬に対して化学療法抵抗性の腫瘍を有していると被験体を特定する工程をさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

化学療法薬は腫瘍細胞で UPR をもたらす、請求項 1－7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

化学療法薬は腫瘍細胞で ER ストレスをもたらす、請求項 1－7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

(i) と (ii) の量はともに、腫瘍細胞のアポトーシスを誘発するか、腫瘍細胞のアポトーシスを増加させるのに十分である、請求項 1－9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

投与された化学療法薬のみの量は、有効性を高めるものではなく、腫瘍を処置することに関して治療量以下の投与量である、請求項 1、2、または 8－10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】

被験体の腫瘍を処置する方法であって、

前記方法は、

(i) ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) と、(ii) ある量の化学療法あるいはある量の放射線療法あるいはある量の免疫療法を被験体に施す工程を含み、(i) と (ii) の量はともに、腫瘍を処置するのに十分である、方法。

【請求項 13】

被験体の腫瘍の転移を阻害する方法であって、

前記方法は、

ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) とある量の放射線療法を、腫瘍を抱える被験体に施す工程を含み、その量はともに、被験体の腫瘍の転移を阻害するのに十分である、方法。

【請求項 14】

前記量の LOFU と、前記量の放射線療法が被験体に施される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記量の LOFU と、前記量の化学療法が被験体に施される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 16】

前記量の LOFU と、前記量の免疫療法が被験体に施される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 17】

放射線療法は切除型の小分割放射線治療である、請求項 12、13、または 14 に記載の方法。

【請求項 18】

施される LOFU は被験体の腫瘍の位置に向けられる、請求項 1－17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

被験体の腫瘍を処置するのに必要とされる抗癌化学療法の有効な量を減らす方法であって、

前記方法は、

腫瘍を処置するために必要とされる有効な量の抗癌化学療法を減らすのに十分な低密度焦点式超音波 (LOFU) の量を、抗癌化学療法を受ける被験体に施す工程を含む、方法。

【請求項 20】

低密度焦点式超音波 (LOFU) は、化学療法あるいは放射線療法あるいは免疫療法の前、あるいはこれらと同時に、被験体に施される、請求項 1－19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

LOFU は放射線療法が施される前に被験体に施される、請求項 12、13、14、17、または 18 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

LOFU は化学療法が施される前に被験体に施される、請求項 1－12、15、18、または 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

化学療法薬は HSP90 阻害剤である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

L O F Uはトランスデューサーを含む超音波機械から超音波ビームによって送達され、超音波機械と被験体は腫瘍の少なくとも一部がトランスデューサーの焦点に位置するように位置付けられる、請求項 1－2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5】

L O F Uは腫瘍の少なくとも一部に送達され、被験体の腫瘍の位置は画像化技術によってモニタリングされる、請求項 1－2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 6】

画像化技術は磁気共鳴撮像である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

L O F Uは、1 時間未満の時間のあいだに腫瘍内の複数の塊に少なくとも一度施される、請求項 1－2 6 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 2 8】

L O F Uは非切除的である、請求項 1－2 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 9】

L O F Uは、施される組織中でキャビテーションを引き起こさない、請求項 1－2 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 0】

L O F Uの超音波成分は0. 5 M H z から1. 5 M H z までの周波数で施される、請求項 1－2 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 1】

L O F Uは1～3 秒間施される、請求項 1－3 0 のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 3 2】

処置ゾーンにおいて、インサイツ強度が被験体の1 m m－7 5 m mの組織深さで2 5 0 W／c m² から7 5 0 W／c m² となるように、L O F Uは超音波ビームによって施される、請求項 1－3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 3】

L O F Uは全腫瘍体積にわたって施される、請求項 1－3 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 4】

前記方法は、腫瘍1 c c 当たり3 0 0～3 0 0 0 ジュールの範囲のエネルギーを腫瘍に送達する、請求項 1－3 3 のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 3 5】

高密度焦点式超音波（H I F U）は被験体に施されない、請求項 1－3 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6】

放射線療法との量とL O F Uの量は腫瘍の処置において相乗的である、請求項 1 2－1 4、1 7、1 8、2 0、2 1、または2 4－3 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 7】

被験体の腫瘍をある量の抗癌治療に感作させる方法であって、

前記方法は、抗癌治療の前に、被験体の腫瘍をある量の抗癌治療に感作させるのに効果的なある量の低密度焦点式超音波を、被験体に施す工程を含む、方法。 40

【請求項 3 8】

抗癌治療は化学療法、放射線療法、免疫療法、あるいは手術を含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

被験体に抗癌治療を施す工程をさらに含む、請求項 3 7 または3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

被験体はヒトである、請求項 1－3 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 1】

腫瘍は、前立腺、乳房、鼻咽腔、咽頭、肺、硬骨、脳、唾液腺、胃、食道、精巣、卵巣、子宮、子宮内膜、肝臓、小腸、虫垂、結腸、直腸、膀胱、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、頸 50

部、膣、外陰、前立腺、甲状腺または皮膚、頭頸部の腫瘍、神経膠腫、あるいは軟部組織肉腫である、請求項 1－40 のいずれかに記載の方法。

【請求項 42】

腫瘍は前立腺癌である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

転移は肺転移である、請求項 13、17、18、20、または 24－35 のいずれかに記載の方法。

【請求項 44】

LOFU は、以下を含む装置で施される：

周波数波形を生成する制御システム、および、

処置ゾーンで $1-1000\text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均音響出力強度 ($I_{\text{sp ta}}$) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された 1 つ以上のトランスデューサーであって、

ここで、超音波は、0.5－5 秒までの範囲の間に処置ゾーンで継続的に適用され、ここで、超音波周波数は 0.01～10 MHz の範囲であり、および、任意のビームのメカニカルインデックスは 4 未満である、請求項 1－43 のいずれかに記載の方法。

【請求項 45】

1 つ以上のトランスデューサーの各々は、0.05～5 MHz の範囲の中心周波数と、 $20-1000\text{ W/cm}^2$ の音響出力強度とを備えた周波数波形に基づいて超音波ビームを生成するように構成される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

1 つ以上のトランスデューサーの各々は、0.5～1.5 MHz の範囲の中心周波数と、 $20-1000\text{ W/cm}^2$ の音響出力強度とを備えた周波数波形に基づいて超音波ビームを生成するように構成される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 47】

各トランスデューサーは、-3 dB のビームプロファイルウエストが処置ゾーンで 5 mm 以上となるように、カラム状の超音波を生成するように構成される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 48】

1 つ以上のビームは処置中に機械的に動かされる、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 49】

1 つ以上のトランスデューサーは、連続的にあるいは同時に動作し、かつ処置期間に処置ゾーンでの平均空間ピーク 250 W/cm^2 の超音波を生成するように構成された 2 つ以上のトランスデューサーを含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 50】

1 つ以上のトランスデューサーは、10 kHz から 300 kHz の範囲内の周波数を有する超音波を生成するように構成される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 51】

1 つ以上のトランスデューサーは、300 kHz から 3 MHz の範囲内の周波数を有する超音波を生成するように構成される、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 52】

1 つ以上のトランスデューサーは、300 kHz から 3 MHz の周波数で動作し、1 つ以上のトランスデューサーは 30～300 kHz の周波数で動作する、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 53】

2 つ以上の超音波トランスデューサーは、各ビームが $10-500\text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンに $I_{\text{sp ta}}$ を有するような、処置ゾーンを通る超音波ビームを生成する、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 54】

処置時間は 1 立方センチメートルの腫瘍当たり 5 秒未満である、請求項 53 に記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 55】

2つのトランスデューサーは、各々が $50 \sim 500 \text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンに $I_{\text{sp t a}}$ を有する、処置ゾーン内で交差する超音波ビームを生成する、請求項52に記載の方法。

【請求項 56】

3つのトランスデューサーは、各々が $50 \sim 500 \text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンに $I_{\text{sp t a}}$ を有する、処置ゾーンを通る超音波ビームを生成する、請求項53に記載の方法。

【請求項 57】

1つ以上のトランスデューサーは、処置ゾーン内で互いに実質的に同位相である超音波ビームを生成する、請求項44に記載の方法。

【請求項 58】

別々の超音波トランスデューサーから発せられる2つの超音波ビームは、実質的に同位相であり、処置ゾーン内で交差し、各ビームは $70 \sim 100 \text{ W/cm}^2$ の範囲で、交差ゾーンで音響パワー空間ピーク強度を有し、超音波は連続して1～5秒間適用される、請求項57に記載の方法。

【請求項 59】

別々の超音波トランスデューサーから発せられる3つの超音波ビームは、実質的に同位相であり、処置ゾーン内で交差し、各ビームは $50 \sim 70 \text{ W/cm}^2$ の範囲で、交差ゾーンで音響パワー空間ピーク強度を有し、超音波は連続して1～5秒間適用される、請求項57に記載の方法。

【請求項 60】

別々のトランスデューサーから始まる超音波ビームはそれぞれ、処置ゾーンで約 $100 \sim 1000 \text{ W/cm}^2$ の範囲の $I_{\text{sp t a}}$ を生成する、請求項44に記載の方法。

【請求項 61】

少なくとも1つのトランスデューサーは、処置ゾーンよりもサイズが実質的に大きな高密度の直径を備えた超音波ビームを生成し、処置ゾーンが完全にビーム内にあるように向けられる、請求項44に記載の方法。

【請求項 62】

2つ以上の超音波ビームが経路で交差する集中処置ゾーンが形成され、集中処置ゾーンは、送信されたエネルギー方向に垂直に約1cm以上であり、送信された方向に平行にも約1cm以上である、請求項44に記載の方法。

【請求項 63】

各トランスデューサーから処置ゾーンに加えられる音圧は $0.1 \sim 10 \text{ MPa}$ である、請求項44に記載の方法。

【請求項 64】

集中超音波処置ゾーンを提供するトランスデューサーの数は1～1000の間である、請求項44に記載の方法。

【請求項 65】

1つ以上のトランスデューサーからの超音波は処置時間のあいだ継続的に適用される、請求項44に記載の方法。

【請求項 66】

超音波は、1オン時間単位：9オフ時間単位の範囲のデューティサイクルで生成される、請求項44に記載の方法。

【請求項 67】

トランスデューサーは、単周波音あるいは多周波数チャープの超音波を生成するように構成される、請求項44に記載の方法。

【請求項 68】

1つ以上のトランスデューサーは時間内に連続して動作する、請求項44に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 6 9】

適用の全過程の間に標的組織と標的のまわりの所望の縁に送達される総エネルギーは、周囲組織に送達される総エネルギーよりも大きい、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 0】

1 つ以上のトランスデューサーは、超音波の周波数が適用中に一掃されるように構成される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 1】

1 つ以上のトランスデューサーは二次元のフェーズドアレイを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 2】

1 つ以上のトランスデューサーは環状アレイを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 3】

1 つ以上のトランスデューサーは三次元のフェーズドアレイを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 4】

1 つ以上のトランスデューサーは 1 つ以上の内視鏡装置に組み入れられる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 5】

1 つ以上のトランスデューサーは磁気共鳴撮像機械に組み入れられる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

1 つ以上のトランスデューサーは放射線療法機械に組み入れられる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

1 つ以上のトランスデューサーは、超音波が約 2 秒以下のあいだ処置ゾーンに適用される場合に、処置ゾーンで到達した最高温度が処置のあいだに 4 5 ° C 未満であるように、超音波を生成するように構成される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 8】

1 つ以上のトランスデューサーは、超音波が約 2 秒以下のあいだ処置ゾーンに適用される場合に、処置ゾーンで到達した最高温度が処置のあいだに 5 0 ° C 未満であるように、超音波を生成するように構成される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 7 9】

1 つ以上のトランスデューサーは、超音波が約 2 秒以下のあいだ処置ゾーンに適用される場合に、処置ゾーンで到達した最高温度が処置のあいだに 5 5 ° C 未満であるように、超音波を生成するように構成される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 8 0】

システムであって、

超音波刺激療法装置であって、

周波数波形を生成する制御システム、および、

処置ゾーンで $1 - 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均音響出力強度 (I_{spt_a}) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された 1 つ以上のトランスデューサーを含み、

超音波が 0. 5 ~ 5 秒の範囲の時間、継続的に適用され、および、超音波周波数が 0. 0 1 ~ 1 0 MHz の範囲である、超音波刺激療法装置と、

放射線療法機械と、

第 1 の量の超音波と第 2 の量の放射線療法が被験体に施されるように、超音波刺激療法装置と放射線療法機械を制御するように動作可能に構成された制御システムであって、第 1 の量と第 2 の量がともに、被験体の腫瘍を処置するのに十分である、制御システムとを備える、システム。

10

20

30

40

50

【請求項 8 1】

L O F U と放射線療法はシステムにより施され、

前記システムは、

L O F U 装置であって、

周波数波形を生成する制御システム；および、

処置ゾーンで $1 - 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均音響出力強度 (I_{spt_a}) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された 1 つ以上のトランスデューサーを含み、ここで、超音波は、0.5 から 5 秒の範囲の時間、継続的に適用され、および、超音波周波数は 0.01 ~ 10 MHz の範囲である、L O F U 装置と、

放射線療法機械と、

第 1 の量の超音波と第 2 の量の放射線療法が被験体に施されるように、L O F U 装置と放射線療法機械を制御するように動作可能に構成された制御システムであって、第 1 の量と第 2 の量がともに、被験体の腫瘍を処置するのに十分である、制御システムとを備える、請求項 12 - 14、17、18、20、21、24、25、36、または 37 - 43 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 2】

システムであって、

前記システムは、

超音波刺激療法装置を含み、

超音波刺激療法装置は、

周波数波形を生成する制御システム、および、

処置ゾーンで $1 - 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均音響出力強度 (I_{spt_a}) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された 1 つ以上のトランスデューサーを含み、超音波は 0.5 ~ 5 秒の範囲の時間、継続的に適用され、および、超音波周波数は 0.01 ~ 10 MHz の範囲であり、

超音波刺激療法装置は、第 1 の量の超音波と第 2 の量の化学療法が被験体に施されるように、化学療法と組み合わせて使用され、第 1 の量と第 2 の量はともに、被験体の腫瘍を処置するのに十分である、システム。

【請求項 8 3】

システムであって、

前記システムは、

超音波刺激療法装置を含み、

超音波刺激療法装置は、

周波数波形を生成する制御システム、および、

処置ゾーンで $1 - 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均音響出力強度 (I_{spt_a}) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された 1 つ以上のトランスデューサーを含み、超音波は 0.5 ~ 5 秒の範囲の時間、継続的に適用され、および、超音波周波数は 0.01 ~ 10 MHz の範囲であり、

超音波刺激療法装置は、第 1 の量の超音波と第 2 の量の免疫療法が被験体に施されるように、免疫療法と組み合わせて使用され、第 1 の量と第 2 の量はともに、被験体の腫瘍を処置するのに十分である、システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015 年 6 月 3 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 170, 378 号と 2015 年 8 月 12 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 204, 312 号の利益を主張するものであり、両文献は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

政府の支援についての声明

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた認可番号 E B 0 0 9 0 4 0 と A I 0 5 9

10

20

30

40

50

738で政府の支援を受けて作られた。政府は本発明において一定の権利を有している。

【背景技術】

【0003】

本出願全体にわたって、様々な出版物が括弧で引用される。これらの文献の十分な引用は明細書の最後に見られる。これらの出版物、および本明細書で参照されるすべての特許、特許出願公報、および文献の開示は、本発明が関係する技術を余すところなく記載するために本出願に全体として参照することにより組み込まれる。

【0004】

癌細胞に対する免疫反応は、腫瘍微環境の免疫抑制性の性質によって頻繁に妨げられ、それは、腫瘍の免疫療法の有効性を妨げる原因でもある（1と2）。複数のメカニズムは、抑制的な活性によるサイトカインあるいは他の因子の分泌（3-5）、調節性T細胞と骨髄由来の抑制細胞の動員（6-9）、共抑制的な受容体用リガンドの発現の増加（10-13）、あるいは樹状細胞成熟の阻害（14と15）を含む免疫抑制環境を生成する腫瘍の能力の根底にあることが特定されている。そうしたメカニズムの結果として、T細胞は腫瘍抗原にしばしば無反応となる（15）。腫瘍抗原への反応性の低下状態の誘発は、CD4+とCD8+T細胞集団の両方で生じ、往々にして、適応性のある免疫系が効率的な非腫瘍性反応を開始させることができない原因となる（16-18）。腫瘍抗原へのT細胞応答の減少は、固形腫瘍と血液の腫瘍の両方で生じ、樹状細胞による抗原の非効率的な提示によって引き起こされるように思われており、これは、転写因子NFATとEgr2に依存する遺伝子発現の免疫寛容原性プログラムの優先的な活性化をもたらす（18-21）。腫瘍によって引き起こされたT細胞の反応性低下のこのプロセスの重要な役割は、この免疫寛容原性遺伝子発現プログラムの誘発を防がれた遺伝子マウスモデルが、抗腫瘍T細胞応答の増強と腫瘍の増殖の制御をもたらしたという事実によって強調される（19と21）。

【0005】

焦点式超音波（FUS）による局所的な腫瘍の処置は、インサイツの腫瘍切除に一連の入力エネルギーを使用する、画像誘導型低侵襲性治療である（22と23）。生物学的組織へのFUSの適用は、熱とキャビテーション効果の生成に関連付けられ、伝達されるエネルギーへ依存して標的細胞の生理機能の変化を引き起こす。高密度焦点式超音波（HIFU）は局所的な腫瘍を熱により除去するために臨床的に使用された（23-26）。FUS処置のモダリティによって生成された実質的な熱エネルギーは、標的とされた焦点で組織の迅速な凝固壊死を引き起こす。複数の研究によれば、リンパ球浸潤の増加、リンパ器官において腫瘍特異性のT細胞を産生するIFN γ の生成、および樹状細胞の腫瘍への成熟と移動を含む、いくつかの免疫調節効果が報告されているが、HIFU処置に起因する熱により引き起こされた凝固壊死は、腫瘍微環境内で免疫賦活性分子の放出を弱めることもできる（26と27）。したがって、確立された原発腫瘍の進行を停止させることはできるが、HIFUは、残存する腫瘍細胞から発生する局所かつ遠隔の転移を防ぐことはできないこともある。

【0006】

本発明は、低密度焦点式超音波を用いる腫瘍および癌の治療の改善と、化学増感を引き起こして癌治療処置の有効性を高める方法とをもたらす。

【発明の概要】

【0007】

(i)ある量の低密度焦点式超音波（LOFU）と(ii)ある量の化学療法薬を被験体に投与する工程を含む、被験体における化学療法の有効性を高める方法が提供され、ここで、化学療法薬は腫瘍細胞において小胞体（ER）ストレスおよび／または小胞体ストレス応答（UPR）をもたらし、ここで、(i)と(ii)の量は化学療法の有効性を高めるのに十分である。

【0008】

体積が被験体全体未満である被験体中のあらかじめ決められた体積の組織における化学

療法の有効性を高める方法も提供され、該方法は、(i) ある量の化学療法薬を被験体に投与する工程であって、化学療法薬が腫瘍細胞において小胞体 (ER) ストレスおよび／または小胞体ストレス応答 (UPR) を引き起こす、工程と、(ii) ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) を、被験体のあらかじめ決められた体積の組織に投与する工程とを含み、ここで、(i) と (ii) の量はともに、あらかじめ決められた体積の組織内での化学療法の有効性を高めるのに十分である。

【0009】

化学療法薬に耐性のある被験体の腫瘍を処置する方法が提供され、該方法は、指定された化学療法薬に対する耐性を有する腫瘍を有していると被験体を特定する工程と、(i) ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) と (ii) ある量の指定された化学療法薬を被験体に投与する工程とを含み、ここで (i) と (ii) の量は腫瘍を処置するのに十分である。

10

【0010】

さらに、被験体の化学療法抵抗性の腫瘍を処置する方法も提供され、ここで腫瘍は以前に投与された化学療法薬に対して化学療法抵抗性になっており、該方法は、(i) ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) と (ii) ある量の化学療法薬を被験体に投与する工程を含み、ここで (i) と (ii) の量は化学療法抵抗性の腫瘍を処置するのに十分である。

【0011】

本発明の様々な典型的な実施形態に係る超音波刺激療法 (acoustic priming therapy) (APT) システムは、処置ゾーンで $10-1000\text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均強度 ($I_{\text{sp ta}}$) 間の音響パワーを生成するように構成されたトランスデューサーを含み、超音波の周波数は $0.01-10\text{ MHz}$ の範囲であり、メカニカルインデックスは4未満であり、超音波は、処置ゾーンにおける任意の特定の量について $0.5-5$ 秒の範囲の時間から継続的に適用される。そのような処置は、超音波刺激療法 (APT) 処置であると本明細書では特定される。

20

【0012】

本発明の典型的な実施形態に係る超音波刺激療法装置は、以下を含む：周波数波形を生成する制御システム；および、 $0.5-5\text{ MHz}$ の範囲のピーク周波数と、 $20-1000\text{ W/cm}^2$ の音響出力強度を有する周波数波形に基づいて超音波ビームを生成するように各々構成された1つ以上のトランスデューサー。

30

【0013】

典型的な実施形態では、各トランスデューサーは、 -3 dB のビームプロファイルウエストが処置ゾーンで 5 mm 以上となるように、カラム状 (columnated) の超音波を生成するように構成される。

【0014】

典型的な実施形態では、2つ以上のトランスデューサーは、連続的にあるいは同時に操作可能であり、治療期間に処置ゾーンで平均空間ピーク 250 J/cm^2 の超音波を生成することができる。

【0015】

典型的な実施形態では、トランスデューサーは、超音波が $0.1-10$ 秒の範囲の治療期間のあいだに処置ゾーンで生成される、連続モードで操作される。

40

【0016】

本発明の典型的な実施形態に係るシステムは、超音波刺激療法装置であって、周波数波形を生成する制御システム、および、処置ゾーンで $1-1000\text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均音響出力強度 ($I_{\text{sp ta}}$) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された1つ以上のトランスデューサーを含み、超音波が $0.5-5$ 秒の範囲の時間、継続的に適用され、および、超音波周波数が $0.01-10\text{ MHz}$ の範囲である、超音波刺激療法装置と、放射線療法機械と、第1の量の超音波と第2の量の放射線療法が被験体に施されるように、超音波刺激療法装置と放射線療法機械を制御するように動作可能に構成

50

された制御システムであって、第1の量と第2の量が被験体の腫瘍を処置するのに十分である、制御システムとを含む。

【0017】

本発明の典型的な実施形態に係るシステムは、超音波刺激療法装置を含み、超音波刺激療法装置は、周波数波形を生成する制御システム、および、処置ゾーンで $1-1000\text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均音響出力強度 ($I_{\text{sp ta}}$) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された1つ以上のトランスデューサーを含み、超音波は0.5～5秒の範囲の時間、継続的に適用され、および、超音波周波数は0.01～10MHzの範囲であり、超音波刺激療法装置は、第1の量の超音波と第2の量の化学療法が被験体に施されるように、化学療法と組み合わせて使用され、第1の量と第2の量は被験体の腫瘍を処置するのに十分である。

10

【0018】

本発明の典型的な実施形態に係るシステムは、超音波刺激療法装置を含み、超音波刺激療法装置は、周波数波形を生成する制御システム、および、処置ゾーンで $1-1000\text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均音響出力強度 ($I_{\text{sp ta}}$) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された1つ以上のトランスデューサーを含み、超音波は0.5～5秒の範囲の時間、継続的に適用され、および、超音波周波数は0.01～10MHzの範囲であり、超音波刺激療法装置は、第1の量の超音波と第2の量の免疫療法が被験体に施されるように、免疫療法と組み合わせて使用され、第1の量と第2の量は被験体の腫瘍を処置するのに十分である。

20

【0019】

被験体の腫瘍を処置する方法は、(i) ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) と、(ii) ある量の化学療法あるいはある量の放射線療法あるいはある量の免疫療法を被験体に投与する工程を含み、(i) と (ii) の量は腫瘍を処置するのに十分である。

【0020】

ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) とある量の放射線療法を、腫瘍を抱える被験体に施す工程を含む、被験体の腫瘍の転移を阻害する方法も提供され、その量は腫瘍を処置するのに十分である。

【0021】

さらに、被験体の腫瘍を処置するのに必要とされる抗癌化学療法の有効な量を減らす方法が提供され、該方法は、腫瘍を処置するために有効な量の抗癌化学療法を減らすのに十分な低密度焦点式超音波 (LOFU) の量を、抗癌化学療法を受ける被験体に投与する工程を含む。

30

【0022】

さらに、被験体の腫瘍をある量の抗癌治療に感作させる方法が提供され、該方法は、抗癌治療の前あるいは間に、被験体の腫瘍を追加の抗癌治療モダリティの量に感作させるのに効果的なある量の超音波刺激療法を、被験体に投与する工程を含む。

【0023】

被験体の腫瘍を処置する方法が提供され、該方法は、(i) APTシステムで使用される超音波形態の典型的な実施形態を示す、ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) と、(ii) ある量の化学療法あるいはある量の放射線療法あるいはある量の免疫療法を、被験体に投与する工程を含み、ここで、(i) と (ii) の量は腫瘍を処置するのに十分である。

40

【0024】

さらに、被験体の腫瘍の転移を阻害する方法が提供され、該方法は、ある量の低密度焦点式超音波 (LOFU) とある量の放射線療法を、腫瘍を抱えている被験体に投与する工程を含み、その量はともに被験体の腫瘍の転移を阻害するのに十分である。

【0025】

さらに、被験体における腫瘍を処置するために必要とされる抗癌化学療法の有効な量を減らす方法が提供され、該方法は、腫瘍を処置するために必要とされる抗癌化学療法の有

50

効な量を減らすのに十分な量の低密度焦点式超音波（LOFU）を、抗癌化学療法を受ける被験体に投与する工程を含む。

【0026】

さらに、被験体の腫瘍をある量の抗癌治療に感作させる方法が提供され、該方法は、抗癌治療の前あるいは間に、被験体の腫瘍をある量の抗癌治療に感作させるのに効果的なある量の低密度焦点式超音波（LOFU）を、被験体に投与する工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】A-F。黒色腫瘍は、CD4+T細胞のサイトカイン産出を抑える：A-B：C57BL/6マウスに 3×10^5 B16-F1黒色腫細胞を腰椎の側腹部に投与した。腫瘍を7-8mm³のサイズまで成長させた。CD4+T細胞を腫瘍DLNと遠位の反対側のNDLNから単離し、抗CD3と抗CD28の抗体で刺激した。IL-2とIFN γ をELISAによって測定した。腫瘍のないマウスからのCD4+T細胞を対照として用いた。C-D：OTIマウスに、記載されているように 3×10^5 B16-F1-OVA黒色腫細胞を投与した。T細胞をOVA323-339ペプチド負荷脾細胞で刺激し、IL-2とIFN γ の産生をELISAによって測定した。E-F.上に記載されているように、B16-F1細胞を用いてTymp1マウス中で腫瘍を引き起こした。単離したCD4+T細胞を抗CD3と抗CD28の抗体で刺激し、IL-2とIFN γ の産生をELISAによって測定した。グラフは、4つ（A-B）あるいは3つ（C-F）の独立した実験からの平均+SEMを示す。結果は各実験につき3-5匹のマウスからの平均+SEMとして示される。チューキーの検定（Tukey post-test）（*** $P < 0.01$ ；** $P < 0.01$ ；* $P < 0.05$ ）を用いるANOVA（分散分析）を使用してデータを分析した。

【図2】A-D。LOFUを用いる黒色腫瘍の処置は、腫瘍により誘発されたCD4+T細胞寛容を克服する：A-B.腰椎の側腹部に 3×10^5 B16-F1黒色腫細胞の皮下注射によってC57BL/6マウスにおいて腫瘍を引き起こした。腫瘍を未処置のままにするか、LOFUで処置した。FUS処置の36時間後に、CD4+T細胞を腫瘍DLNあるいはNDLNから単離し、抗CD3と抗CD28の抗体で刺激した。IL-2とIFN γ の産生をELISAによって評価した。結果（各群中のNDLNとDLNからのT細胞によって産生されたサイトカインレベルの総サイトカイン産生と比率）を、1つの条件当たり3つの異なるマウスからの平均+SEMとして提示する。処置していないマウスあるいは処置されたマウス中のDLN T細胞のサイトカイン産生間の差を、両側検定（* $P < 0.05$ ）を使用して分析した。C.腫瘍を引き起こすために、マウスに 3×10^5 B16黒色腫細胞を投与した。腫瘍の発生後、総RNAサンプルを、癌を抱えているマウスと腫瘍のない対照マウスのDLNとNDLNから単離したCD4+T細胞から抽出した。アネルギーに関連する遺伝子の発現を定量的RT-PCRによって測定した。結果は、腫瘍がないマウスから単離されたT細胞と比較して、腫瘍を抱えているマウス中のDLNまたはNDLNの常在性T細胞中で遺伝子発現の倍誘発として示される。データは、3つの独立した実験からの平均+SEMを表す。D.処置していない、あるいはLOFUで処置したTymp1マウスにおいてB16-F1黒色腫瘍を誘発した。様々なアネルギーに関連する遺伝子の発現を、DLNとNDLNから単離されたCD4+T細胞中でRT-PCRによって測定した。アネルギーに関連する遺伝子の発現は、腫瘍を抱えていないTymp1マウスからのT細胞中で得られた値を上回る倍誘発（5つの独立した実験からの平均+SEM）として提示される。

【図3】A-B。LOFUで処置されたB16-F1黒色腫瘍からの溶解物は、アネルギーT細胞3Aの反応性低下状態を覆すことができる。ナイーブCD4+T細胞をTymp1マウスの脾臓とリンパ節から単離し、TH1細胞に分化させた。その後、細胞を16時間、未処置のままにするか、抗CD3で処置することで、アネルギーを誘発した。その後、細胞をIL-2が厳密に存在しない状態で72時間静止させ、抗CD3と抗CD28の抗体で再度刺激した。IL-2レベルをELISAによって測定した。結果は2つの独

立した実験からの平均+SEMとして示される。B. CD11c+樹状細胞を腫瘍がないTy rp1マウスの脾臓から単離した。(3A)(A)に記載されるようなTy rp1マウス由来CD4+T細胞から生成されたアネルギーTH1細胞を、処置していないあるいはLOFUで処置されたB16-F1黒色腫瘍に由来する樹状細胞と腫瘍溶解物で共培養した。24時間後に上清を集め、ELISAによってIL-2について分析した。結果は、各実験で使用される腫瘍溶解物の3つの独立したセットを用いて2つの独立した実験からの平均+SEMとして示される。データはチューキーの検定(**P<0.01)を用いる分散分析を使用して分析された。

【図4】A-D. FUS処置は、Hsp70の発現と細胞分布、およびB16-F1黒色腫細胞のカルレティキュリンの変化を引き起こす。A. 処置していない、およびLOFUで処置されたB16-F1黒色腫を抱えているマウスからの総DLN常在細胞を単離させ、CD11cについて免疫染色することで、樹状細胞をゲート(gate)した。その後、B7.1、B7.2、およびMHCIの表面の発現をフローサイトメトリーによって評価した。適切なアイソタイプ対照を個々の原発性の抗体に使用した。代表的なヒストグラムを示す。B. 処置していない、あるいは、LOFUで処置したマウスから得られたB16腫瘍細胞懸濁液の代表的なFACSドット・プロットを、生存度マーカー(生きている/死んでいるMk)で染色した。死細胞の相対的な定量化を報告する。ボックスと矢印は死細胞(生きている/死んでいるMK+)を示す。C. 処置していないマウス、あるいはLOFUで処置したマウスから単離されたB16-F1腫瘍組織の蛍光免疫染色。カルレティキュリンあるいはHsp70およびTRP1を検知するために、組織切片を抗体で染色した。核をDAPIで染色した。拡大60x。D. LOFUで処置されたマウスと処置していないマウスの腫瘍からの細胞を、CD45と、TRP1の発現のために染色した。その後、CD45-TRP1+B16細胞をHsp70の発現について分析した。代表的なヒストグラムを示す。ゲートと矢印は、分析のための選択された集団を示す。

【図5】A-B. 黒色腫瘍のFUS処置は、樹状細胞を媒介としたCD4+T細胞の刺激を増強する：A. CD11c+脾臓樹状細胞をC57Bl/6マウスから精製し、OT-Iマウスから単離された応答者ナイーブCD4+T細胞で共培養した。B16-F1-OVA黒色腫瘍溶解物を、処置していない、あるいは、LOFUで処置した腫瘍を抱えているマウスから調製し、それぞれの培養物に添加することで樹状細胞を媒介としたT細胞刺激を駆り立てた。別々のサンプルでは、外因性のOVA323-339ペプチドも腫瘍溶解物と共に加えた。上清を24時間後に集めて、IL-2産生をELISAによって評価した。結果は4つの独立した実験からの平均+SEMとして示され、一元配置分散分析(one-way ANOVA)とその後のチューキーの検定で分析した(*P<0.05; ***P<0.001; n.s.、有意でない)。B. B16-F1黒色腫瘍を、未処置のままにするか、LOFUで処置した。腫瘍DLNを単離し、T細胞を消耗させた。DLN細胞をその後ナイーブTy rp1 CD4+T細胞で共培養し、インビトロ培養物から得られたB16黒色腫瘍溶解物で刺激した。上清を24時間後に集め、ELISAによってIL-2レベルについて分析した。データは3つの独立した実験からの平均+SEMとして示される。処置していないマウスあるいはLOFUで処置されたマウスからのDLN細胞を使用する培養物中でのサイトカイン産生間の差を、両側検定(*P<0.05)を使用して分析した。

【図6】A-D. FUSとその後の少分割IGRTは、T細胞を媒介とした長期の原発腫瘍対照と遠位の転移の減少とをもたらした：A. 50mm³の皮下の背側の右後肢腫瘍を有するC57Bl/6マウスを4つの処置群：処置していない群、LOFU群、少分割IGRT群、あるいはLOGU+IGRT群のうちの1つに分け、62日間、あるいは原発腫瘍が300mm³を越えて増大するまで、腫瘍の増殖をモニタリングした。グラフは、2つの代表的な実験(1つの群当たり3-5匹のマウス)のうちの1つからの腫瘍体積の平均±SEMを示す。データは、一元配置分散分析とその後のボンフェローニ補正検定(29日目以前)、あるいは両側スチューデントt検定(29日目以後)により分析された。処置していないマウスあるいはLOFUで処置されたマウスと、IGRTあるいはLO

10

20

30

40

50

FU+IGRTとの間の有意差 (<0.05 を P として定義される) は、25日目の後に生じ、IGRTで処置されたマウスとLOFU+IGRTで処置されたマウスとの間の有意差は35日目の後に生じた。特定の日の腫瘍サイズの分布を示す個々のグラフも示されている。B. Aに記載される実験に類似する実験をBALB/cヌードマウスで行った。有意差はどの時間点でも様々な群で観察されなかった。C. C57BL/6マウスを原発腫瘍進行/再発についてモニタリングし、多くの 150mm^3 の体積に達する再発として、あるいは膝窩リンパ節または鼠径リンパ節への局所的な転移の進行のいずれかとして定義した。加えて、自然死した動物を、疾患を再発あるいは進行させたとしてスコアした。無再発生存データを、マンテル・コックス検定を用いて分析した。D. 自然死したか、腫瘍量が非常に多すぎて安楽死を必要としたか、あるいは2か月間の長い実験の最後に犠牲にした動物から肺を収集した。その後、肺転移を測定した。融合してプラークになるか、250を超過する小結節を備えた肺は、あまりにも数が多すぎて数えることができないと考えられ、250の最大値を割り当てられた。各処置群について代表的な検体が示されている。結果は、クラスカル・ウォリス検定で、その後、ダン検定 (Dunn's post test) により分析された、1つの群当たり $n=3-5$ 匹のマウスの平均 $\pm$ SEMとして示されている。* $P<0.05$ 。

【図7】A-G: LOFUはUPRを誘発する。A. LOFUは、Bip/Grp78とEDEM mRNAの発現を増加させる。LOFUで処置されたRM1腫瘍から単離されたRNAのリアルタイムPCR分析は、未処置の対照と比較して、Bip/Grp78で 29.73 ± 0.56 倍の増加、および、EDEM mRNAレベル 9.27 ± 1.18 倍の増加を示した。B. LOFUは、IRE1 α mRNAの発現を 2.8 ± 0.4 倍増加させる。リアルタイムPCR分析は、LOFUにより誘発されたIRE1 α 発現の増加が17AAG処置で変わらなかったことを実証する。C. LOFUは、XBP1 mRNAのスプライシングを引き起こした。17AAG処置は、XBP1のスプライシングを阻害する。XBP1s、XBP1h、およびXBP1uは、それぞれXBP1のスプライシングされた形態、ハイブリッド形態、およびスプライシングされていない形態を示す。D-G. LOFU+17AAG併用療法は、RM1腫瘍細胞のERストレスを延ばす。ウェスタンブロットと棒グラフは、ERP78 (D&E)、ERP57 (D&F) およびERP44 (D&G) タンパク質の発現が併用療法群で誘発されたことを示す。

【図8】A-E: LOFU+17AAGは、UPRのアポトーシス促進性の経路を活性化し、腫瘍細胞でアポトーシスを誘発する。A & B. pPERK (A) と pEIF2 α (B) のウェスタンブロット。LOFU+17AAGはPERK (pPERK) のリン酸化によってPERKを活性化し、これはさらにEIF2 α リン酸化 (pEIF2 α) のリン酸化を誘発する。C. CHOP mRNAのリアルタイムPCR分析。対照と比較して、LOFU+17AAGで処置された群ではCHOP転写物の 25 ± 1.3 倍の増加があった。D. LOFU+17AAGで処置された腫瘍から単離されたRNAのリアルタイムPCRアレイ。ヒートマップ分析は、処置していない対照あるいはLOFU群と比較して、LOFU+17AAG処置群がアポトーシスの遺伝子の転写物レベルを数倍増加させたことを示した。E. TUNEL染色。免疫組織化学的染色は、対照あるいはLOFU群と比較して、LOFU+17AAG処置群中でtune1陽性細胞を優勢的に示した。17AAGのみではLOFUによって増大された腫瘍組織中のアポトーシスをさらに誘発したことに注意する。

【図9】A-C: LOFU+17AAG処置はRM1腫瘍細胞中でシャペロン介在性オートファジー (CMA) を阻害する。(A & B) 免疫ブロット分析は、併用療法群においてSMAマーカーLAMP2 α 発現レベルの数倍のダウンレギュレーションを示した。LOFUまたは17AAGのいずれかを用いる処置はLAMP2 α 発現レベルをアップレギュレートする。(A & C) LOFUと17AAGの併用療法は、マクロオートファジーマーカーであるベクリンの発現レベルを変えなかった。

【図10A】LOFU+17AAG処置後のマウスとヒトの前立腺腫瘍の腫瘍増殖遅滞。10A. 処置計画。2週間にわたって投与された5つの画分について3-4日ごとにLO

10

20

30

40

50

F Uで明白な腫瘍を処置した。動物はこの間に17 A A Gを1週当たり3回受け取った。L O F Uの最後の分画の24時間後に腫瘍を収集した。

【図10B】L O F U + 17 A A G処置後のマウスとヒトの前立腺腫瘍の腫瘍増殖遅滞。10B. RM1腫瘍。C57B16マウスでは、L O F U + 17 A A G併用療法は、対照と比較して、RM1腫瘍の増殖を有意に減少させた ($p < 0.004$)。L O F Uあるいは17 A A Gのいずれかだけでは腫瘍を著しく制御することに失敗したことに注意する。L O F Uは、低用量 (体重1kg当たり25mg) の17 A A Gの効果を感じた。

【図10C】L O F U + 17 A A G処置後のマウスとヒトの前立腺腫瘍の腫瘍増殖遅滞。10C. PC3腫瘍。BalbC nu/nuマウスでは、L O F U + 17 A A G併用療法は、PC3腫瘍の増殖の有意な減少を示した ($p < 0.007$)。 10

【図11】A-F: L O F U + 17 A A G処置は、RM1細胞において前立腺癌幹細胞マーカーの発現を減らした。単離されたRM1腫瘍細胞のフローサイトメトリーは、L O F U + 17 A A G処置後にRM1腫瘍細胞上でSCA1 (A & B)、CD44 (A & C)、CD133 (A & D)、および $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン (A & E) 細胞表面発現の有意な減少を示した。(11F) qRT-PCRアレイとその後のヒートマップ分析は、L O F U + 17 A A G併用療法群が幹細胞転写因子のmRNAレベルをダウンレギュレートすることを示した。

【図12】本発明の典型的な実施形態に係るA P T装置のブロック図である。

【図13】本発明の別の典型的な実施形態に係るA P T装置のブロック図である。

【図14】本発明の別の典型的な実施形態に係るA P T装置のブロック図である。 20

【図15】一体型超音波画像化装置を含む本発明の典型的な実施形態に係るA P T装置のブロック図である。

【図16】一体型超音波画像化装置を含む本発明の典型的な実施形態に係るA P T装置のブロック図である。

【図17】一体型超音波画像化装置を含む本発明の典型的な実施形態に係るA P T装置のブロック図である。

【図18】本発明の典型的な実施形態に係るトランスデューサーの斜視図である。

【図19】本発明の典型的な実施形態に係る位置決め装置を例証する。

【発明を実施するための形態】

【0028】 30

H I F U形態と比較して、処置ゾーンに低減されたレベルのエネルギーを送達する超音波 (U S) 治療が本明細書で開示される。典型的な実施形態では、特定の病変量の処置は、腫瘍組織の温度を約45°C未満に上昇させる、1MHzの常時電力で短時間 (例えば~1.5秒) ある。この超音波処置は、処置ゾーンで超音波を修飾させるために凹面のトランスデューサーを使用して生成され、本明細書では「低エネルギーの非切除型焦点式超音波」 (L O F U) と呼ばれる命名され、腫瘍細胞で軽度の機械的かつ熱的なストレスを生成しつつ、組織を損傷させるキャビテーションと凝固壊死を回避するものである。非切除型の「音波」ストレス応答は腫瘍で誘発され、熱ショックタンパク質を実際に死滅させることなく、その発現を増加させる。L O F Uは、熱ショックタンパク質 (28と29) を含む免疫調節性の因子を放出する可能性を有し、腫瘍に特有の免疫の活性化 (30と31) を誘発する際に効果的であり得る。マウスB16黒色腫瘍モデルを使用して、L O F U処置が腫瘍により誘発される耐性を覆し、腫瘍抗原に特有のCD4+T細胞中のエフェクターサイトカイン産生を増大させることが開示され、これは腫瘍細胞による免疫原性分子の放出によって引き起こされるように考えられている。さらに、L O F Uと切除型の少分割コーンビーム断層撮影法 (C T) の画像誘導放射線療法 (I G R T) との組み合わせは、原発腫瘍の相乗的な制御をもたらし、さらに免疫適格マウスにおいて自発的な肺転移の減少を引き起こし、無再発生存期間を延ばす (実施例1を参照)。加えて、L O F Uは、化学療法薬に癌細胞 (実施例における前立腺癌) を感作することが分かった (実施例2を参照)。

【0029】 40 50

典型的な実施形態では、LOFU（本明細書で「超音波刺激療法」とも呼ばれる）は、超音波を $0.5 \sim 5$ 秒の範囲の時間、継続的に適用する、処置ゾーンで $10 \sim 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均強度（ $I_{\text{sp t a}}$ ）間の音響パワーでの超音波の適用を含み、ここで、周波数は $0.01 \sim 10 \text{ MHz}$ の範囲であり、メカニカルインデックスは4未満である。メカニカルインデックス（MI）は、 MHz の単位で中心周波数の平方根上の MPa の単位での希薄化圧力である。適用される超音波のエネルギーと強度は、主として切除効果あるいは主として診断効果のいずれかを引き起こす超音波のエネルギーと強度の中間に位置するように意図される。

【0030】

より詳細に以下に説明されるように、本明細書で議論される様々な処置方法は、処置ゾーンで $10 \sim 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均強度（ $I_{\text{sp t a}}$ ）間の音響パワーを生成するトランスデューサーを含む、LOFUまたは超音波刺激療法装置を使用して施されてもよい。超音波は、 $0.5 \sim 5$ 秒の範囲の時間で継続的に適用されるか、あるいは $1 \sim 100$ ミリ秒の脈拍時間でパルス状であり、周波数は $0.01 \sim 10 \text{ MHz}$ の範囲である。いくつかの実施形態では、周波数は $0.05 \sim 5 \text{ MHz}$ の範囲である。いくつかの実施形態では、周波数範囲は $0.1 \sim 2 \text{ MHz}$ である。いくつかの実施形態では、処置ゾーンでの任意の超音波ビームの最小直径は、約 1 cm である。一実施形態では、LOFUは、処置の領域で $10 \sim 100 \text{ W/cm}^2$ の $I_{\text{sp t a}}$ で施される。一実施形態では、LOFUは、処置の領域で $100 \sim 200 \text{ W/cm}^2$ の $I_{\text{sp t a}}$ で施される。一実施形態では、LOFUは、処置の領域で $300 \sim 400 \text{ W/cm}^2$ の $I_{\text{sp t a}}$ で施される。一実施形態では、LOFUは、処置の領域で $400 \sim 500 \text{ W/cm}^2$ の $I_{\text{sp t a}}$ で施される。一実施形態では、LOFUは、処置の領域で $500 \sim 600 \text{ W/cm}^2$ の $I_{\text{sp t a}}$ で施される。一実施形態では、LOFUは、処置の領域で $600 \sim 700 \text{ W/cm}^2$ の $I_{\text{sp t a}}$ で施される。一実施形態では、LOFUは、処置の領域で $700 \sim 800 \text{ W/cm}^2$ の $I_{\text{sp t a}}$ で施される。一実施形態では、LOFUは、処置の領域で $800 \sim 900 \text{ W/cm}^2$ の $I_{\text{sp t a}}$ で施される。一実施形態では、LOFUは、処置の領域で $900 \sim 1000 \text{ W/cm}^2$ の $I_{\text{sp t a}}$ で施される。一実施形態では、超音波は、 $0.5 \sim 1$ 秒の範囲の時間に適用される。一実施形態では、超音波は、 $1 \sim 2$ 秒の範囲の時間に時に適用される。一実施形態では、超音波は、 $2 \sim 3$ 秒の範囲の時間に適用される。一実施形態では、超音波は、 $4 \sim 5$ 秒の範囲の時間に適用される。一実施形態では、超音波は、 $0.01 \sim 1 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。一実施形態では、超音波は $1 \sim 2 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。一実施形態では、超音波は $2 \sim 3 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。一実施形態では、超音波は $3 \sim 4 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。一実施形態では、超音波は $4 \sim 5 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。一実施形態では、超音波は $5 \sim 6 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。一実施形態では、超音波は $6 \sim 7 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。一実施形態では、超音波は $7 \sim 8 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。一実施形態では、超音波は $8 \sim 9 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。一実施形態では、超音波は $9 \sim 10 \text{ MHz}$ の周波数で適用される。

【0031】

(i) ある量の低密度焦点式超音波（LOFU）と(ii) ある量の化学療法薬を被験体に投与する工程を含む、被験体における化学療法の有効性を高める方法が提供され、ここで、化学療法薬は腫瘍細胞において小胞体（ER）ストレスおよび／または小胞体ストレス応答（UPR）を引き起こし、ここで、(i)と(ii)の量は化学療法の有効性を高めるのに十分である。

【0032】

体積が被験体全体未満である被験体中のあらかじめ決められた体積の組織における化学療法の有効性を高める方法も提供され、該方法は、(i) ある量の化学療法薬を被験体に投与する工程であって、化学療法薬が腫瘍細胞において小胞体（ER）ストレスおよび／または小胞体ストレス応答（UPR）を引き起こす、工程と、(ii) ある量の低密度焦点式超音波（LOFU）を、被験体のあらかじめ決められた体積の組織に投与する工程と

を含み、ここで、(i)と(ii)の量はともに、あらかじめ決められた体積の組織内での化学療法の有効性を高めるのに十分である。

【0033】

化学療法薬に耐性のある被験体の腫瘍を処置する方法が提供され、該方法は、指定された化学療法薬に対する耐性を有する腫瘍を有していると被験体を特定する工程と、(i)ある量の低密度焦点式超音波(LOFU)と(ii)ある量の指定された化学療法薬を被験体に投与する工程とを含み、ここで(i)と(ii)の量は腫瘍を処置するのに十分である。

【0034】

さらに、被験体の化学療法抵抗性の腫瘍を処置する方法も提供され、ここで腫瘍は以前に投与された化学療法薬に対して化学療法抵抗性になっており、該方法は、(i)ある量の低密度焦点式超音波(LOFU)と(ii)ある量の化学療法薬を被験体に投与する工程を含み、ここで(i)と(ii)の量は化学療法抵抗性の腫瘍を処置するのに十分である。

10

【0035】

方法の一実施形態では、化学療法薬は腫瘍細胞中で小胞体(ER)ストレスおよび／または小胞体ストレス応答(UPR)をもたらす。

【0036】

方法の一実施形態では、化学療法薬は被験体に複数回投与されており、腫瘍は化学療法薬の初期の投与後に化学療法薬に対する耐性を有するものとして診断されていた。

20

【0037】

化学耐性に関する方法の一実施形態では、方法は、以前に投与された化学療法薬に対して化学療法抵抗性の腫瘍を有していると被験体を特定する工程をさらに含むことができる。

【0038】

方法の一実施形態では、化学療法薬は、腫瘍細胞でUPRをもたらす。

【0039】

方法の一実施形態では、化学療法薬は、腫瘍細胞でERストレスをもたらす。

【0040】

方法の一実施形態では、(i)と(ii)の量は、腫瘍細胞のアポトーシスを誘発するか、腫瘍細胞のアポトーシスを増加させるのに十分である。

30

【0041】

方法の一実施形態では、投与された化学療法薬のみの量は、有効性を高めるものではなく、腫瘍を処置することに関して治療量以下の投与量である。

【0042】

方法の一実施形態では、投与されたLOFUは、被験体の腫瘍の位置を目的としている。

【0043】

方法の一実施形態では、低密度焦点式超音波(LOFU)は、化学療法あるいは放射線療法あるいは免疫療法の前、あるいはこれらと同時に、被験体に施される。方法の一実施形態では、LOFUは投与されている放射線療法の前に被験体に施される。方法の一実施形態では、LOFUは投与されている化学療法の前に被験体に施される。方法の一実施形態では、LOFUは投与されている免疫療法の前に被験体に施される。方法の一実施形態では、LOFUは投与されている放射線療法と同時に被験体に施される。方法の一実施形態では、LOFUは投与されている化学療法と同時に被験体に施される。方法の一実施形態では、LOFUは投与されている免疫療法と同時に被験体に施される。

40

【0044】

方法の一実施形態では、化学療法薬はHSP90阻害剤である。一実施形態では、HSP90阻害剤は17AAG(tanespimycinあるいは17-Nアリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシナン(demethoxygeldanamycin

50

n)) である。一実施形態では、化学療法剤はHSP90阻害剤である。HSP90阻害剤の一例は、17AAG（タネスピマイシンあるいは17-Nアリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシナン）である。一実施形態では、化学療法剤はアルキル化薬である。一実施形態では、化学療法剤はトラベクテジンである。一実施形態では、化学療法剤はマスタードガス誘導体である。一実施形態では、化学療法剤は金属塩である。一実施形態では、化学療法剤は植物アルカロイドである。一実施形態では、化学療法剤は抗腫瘍抗生物質である。一実施形態では、化学療法剤は代謝拮抗薬である。一実施形態では、化学療法剤はトポイソメラーゼ阻害剤である。一実施形態では、化学療法剤はプロテアソーム阻害剤である。一実施形態では、化学療法剤は化学療法薬NSAIDである。一実施形態では、化学療法剤は以下に列挙された様々な抗悪性腫瘍薬の1つである。

10

【0045】

方法の一実施形態では、LOFUはトランスデューサーを含む超音波機械から超音波ビームによって送達され、機械と被験体は腫瘍の少なくとも一部がトランスデューサーの焦点に位置するように位置付けられる。方法の一実施形態では、LOFUは腫瘍の少なくとも一部に送達され、被験体の腫瘍の位置は画像化技術によってモニタリングされる。方法の一実施形態では、画像化技術は磁気共鳴撮像である。方法の一実施形態では、画像化技術はコンピューター断層撮影である。方法の一実施形態では、画像化技術は超音波画像化である。

【0046】

方法の一実施形態では、LOFUは、1時間未満の時間のあいだに腫瘍内の複数の塊に少なくとも一度施される。

20

【0047】

方法の一実施形態では、LOFUは非切除的である。方法の一実施形態では、LOFUは、施される組織中でキャビテーションを引き起こさない。

【0048】

方法の一実施形態では、LOFUの超音波成分は0.5MHzから1.5MHzまでの周波数で施される。方法の一実施形態では、LOFUは1～3秒間施される。方法の一実施形態では、処置ゾーンにおいて、インサイツ強度が被験体の1mm～75mmの組織深さで250W/cm²から750W/cm²となるように、LOFUは超音波ビームによって施される。

30

【0049】

方法の一実施形態では、LOFUは全腫瘍体積にわたって施される。方法の一実施形態では、方法は、腫瘍1cc当たり300～3000ジュールの範囲のエネルギーを腫瘍に送達する。方法の一実施形態では、高密度焦点式超音波（HIFU）は被験体に投与されない。一実施形態では、HIFUは、薬80℃以上の焦点ゾーンの組織温度をもたらす集束超音波である。HIFUは、固体の組織への数秒の暴露時間のあいだに最大で60～85℃に温度を上昇させ、および／または組織中の熱切除を引き起こす。熱切除は、0.8～7MHzの報告された周波数で1kW/cm²を越えるパワー強度で通常は達成される。他方で、LOFUは、例えば1～3W/cm²のパワー強度と、0.5～3MHzの周波数で達成可能である（しかしながら、本明細書の他のLOFU範囲を参照）。LOFUは、デューティーサイクルの調節により、連続的（100%DC）、あるいはパルス状（<100%DC。低密度パルス状超音波またはLIPUSと呼ぶ文献もある）の集束超音波であり得る。10分間の1MHzと1W/cm²の連続的なLOFUにより、組織中で0.1℃上昇させることができる。筋組織に関するインビボ実験は、1MHzの周波数の超音波処理が、0.5W/cm²で0.04℃/分；1.0W/cm²で0.16℃/分；1.5W/cm²で0.33℃/分；2.0W/cm²で0.38℃/分の率で温度を増加させることを示す。

40

【0050】

方法の一実施形態では、放射線療法の量とLOFUの量の効果は、腫瘍を処置する際に相乗的である。

50

【0051】

方法の一実施形態では、被験体はヒトである。

【0052】

方法の一実施形態では、腫瘍は、前立腺、乳房、鼻咽腔、咽頭、肺、硬骨、脳、唾液腺、胃、食道、精巣、卵巣、子宮、子宮内膜、肝臓、小腸、虫垂、結腸、直腸、膀胱、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、頸部、膣、外陰、前立腺、甲状腺、または皮膚、頭頸部の腫瘍、神経膠腫、あるいは軟部組織肉腫である。方法の一実施形態では、腫瘍は前立腺癌である。

【0053】

方法の一実施形態では、転移は肺転移である。

【0054】

方法の一実施形態では、LOFUは、以下を含む装置で施される：周波数波形を生成する制御システム、および、処置ゾーンで $1-1000\text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均音響出力強度 (I_{spta}) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された1つ以上のトランスデューサーを含み、ここで、超音波は、0.5秒までの範囲の間に処置ゾーンで継続的に適用され、ここで、超音波周波数は0.01~10MHzの範囲であり、および、任意のビームのメカニカルインデックスは4未満である。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーの各々は、0.05~5MHzの範囲の中心周波数と、 $20-1000\text{ W/cm}^2$ の音響出力強度中を備えた周波数波形に基づいて超音波ビームを生成するように構成される。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーの各々は、0.5~1.5MHzの範囲の中心周波数と、 $20-1000\text{ W/cm}^2$ の音響出力強度中を備えた周波数波形に基づいて超音波ビームを生成するように構成される。方法の一実施形態では、各トランスデューサーは、-3dBのビームプロファイルウェストが処置ゾーンで5mm以上となるように、カラム状の超音波を生成するように構成される。方法の一実施形態では、1つ以上のビームは処置中に機械的に動かされる。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは、連続的にあるいは同時に動作し、かつ処置期間に処置ゾーンでの平均空間ピーク 250 W/cm^2 の超音波を生成するように構成された2つ以上のトランスデューサーを含む。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは、10kHzから300kHzの範囲内の周波数を有する超音波を生成するように構成される。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは、300kHzから3MHzの範囲内の周波数を有する超音波を生成するように構成される。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは、300kHzから3MHzの周波数で動作し、1つ以上のトランスデューサーは30~300kHzの周波数で動作する。方法の一実施形態では、2つ以上の超音波トランスデューサーは、各ビームが $10-500\text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンに I_{spta} を有するような、処置ゾーンを通る超音波ビームを生成する。方法の一実施形態では、処置時間は1立方センチメートル腫瘍の当たり5秒未満である。方法の一実施形態では、2つのトランスデューサーは処置ゾーン内で交差する超音波ビームを生成し、各ビームは $50-500\text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンに I_{spta} を有する。方法の一実施形態では、3つのトランスデューサーは、処置ゾーンを通る超音波ビームを生成し、各々が $50-500\text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンに I_{spta} を有する。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは、処置ゾーン内で互いに実質的に同位相である超音波ビームを生成する。方法の一実施形態では、別々の超音波トランスデューサーから発せられる2つの超音波ビームは、実質的に同位相であり、処置ゾーン内で交差し、各ビームは $70-100\text{ W/cm}^2$ の範囲で、交差ゾーンで音響パワー空間ピーク強度を有し、超音波は連続して1~5秒適用される。

【0055】

方法の一実施形態では、別々の超音波トランスデューサーから発せられる3つの超音波ビームは、実質的に同位相であり、処置ゾーン内で交差し、各ビームは $50-70\text{ W/cm}^2$ の範囲で、交差ゾーンで音響パワー空間ピーク強度を有し、超音波は連続して1~5秒間適用される。方法の一実施形態では、別々のトランスデューサーから始まる超音波ビームはそれぞれ、処置ゾーンで約 $100-1000\text{ W/cm}^2$ の範囲の I_{spta} を生成

10

20

30

40

50

する。方法の一実施形態では、少なくとも1つのトランスデューサーは、処置ゾーンよりもサイズが実質的に大きな高密度の直径を備えた超音波ビームを生成し、処置ゾーンが完全にビーム内にあるように向けられる。方法の一実施形態では、2つ以上の超音波ビームが経路で交差する集中処置ゾーンが形成され、集中処置ゾーンは、送信されたエネルギー方向に垂直に約1 cm以上であり、送信された方向に平行にも約1 cm以上である。方法の一実施形態では、各トランスデューサーから処置ゾーンに加えられる音圧は0.1~10 MPaである。方法の一実施形態では、集中超音波処置ゾーンを提供するトランスデューサーの数は1~1000の間である。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーからの超音波は処置時間のあいだ継続的に適用される。方法の一実施形態では、超音波は、1オン時間単位：9オフ時間単位の範囲のデューティサイクルで生成される。方法の一実施形態では、トランスデューサーは、単周波音あるいは多周波数チャープの超音波を生成するように構成される。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは時間内に連続して動作する。方法の一実施形態では、適用の全過程の間に標的組織と標的のまわりの所望の縁に送達される総エネルギーは、周囲組織に送達される総エネルギーよりも大きい。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは、超音波の周波数が適用中に一掃されるように構成される。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは二次元のフェーズドアレイを含む。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは環状アレイを含む。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは三次元のフェーズドアレイを含む。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは1つ以上の内視鏡装置に組み入れられる。方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは磁気共鳴撮像機械に組み入れられる。

10

20

【0056】

方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは放射線療法機械に組み入れられる。

【0057】

方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは、超音波が約2秒以下のあいだ処置ゾーンに適用される場合に、処置ゾーンで到達した最高温度が処置のあいだに45℃未満であるように、超音波を生成するように構成される。

【0058】

方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは、超音波が約2秒以下のあいだ処置ゾーンに適用される場合に、処置ゾーンで到達した最高温度が処置のあいだに50℃未満であるように、超音波を生成するように構成される。

30

【0059】

方法の一実施形態では、1つ以上のトランスデューサーは、超音波が約2秒以下のあいだ処置ゾーンに適用される場合に、処置ゾーンで到達した最高温度が処置のあいだに55℃未満であるように、超音波を生成するように構成される。

【0060】

方法の一実施形態では、LOFUと放射線療法は、以下を含むシステムにより施される：LOFU装置であって、周波数波形を生成する制御システム；および、処置ゾーンで1~1000 W/cm²の空間ピーク時間平均音響出力強度（ I_{spta} ）の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された1つ以上のトランスデューサーを含み、ここで、超音波は、0.5から5秒の範囲の時間、継続的に適用され、および、超音波周波数は0.01~10 MHzの範囲である、LOFU装置と、放射線療法機械と、第1の量の超音波と第2の量の放射線療法が被験体に施されるように、LOFU装置と放射線療法機械を制御するように動作可能に構成された制御システムであって、第1の量と第2の量は被験体の腫瘍を処置するのに十分である、制御システム。

40

【0061】

被験体の腫瘍を処置する方法は、(i)ある量の低密度焦点式超音波（LOFU）と、(ii)ある量の化学療法あるいはある量の放射線療法あるいはある量の免疫療法を被験体に投与する工程を含み、(i)と(ii)の量は腫瘍を処置するのに十分である。

50

【0062】

方法の一実施形態では、その量のLOFUとその量の放射線療法が被験体に施される。方法の別の実施形態では、その量のLOFUとその量の放射線療法が被験体に施される。方法の別の実施形態では、その量のLOFUとその量の免疫療法が被験体に施される。

【0063】

被験体の腫瘍を処置する方法は、(i)ある量の低密度焦点式超音波(LOFU)と(ii)ある量の標的とされた抗癌治療を被験体に投与する工程を含み、ここで、(i)と(ii)の量は腫瘍を処置するのに十分である。一実施形態では、標的治療は、Her2またはVEGFRを対象としたmAbを含む。一実施形態では、標的治療はチロシンキナーゼ阻害剤を含む。

10

【0064】

さらに、被験体の腫瘍の転移を阻害する方法が提供され、該方法は、ある量の低密度焦点式超音波(LOFU)とある量の放射線療法を、腫瘍を抱えている被験体に投与する工程を含み、その量はともに被験体の腫瘍の転移を阻害するのに十分である。

【0065】

方法では、放射線療法は切除型の少分割放射線治療であり得る。

【0066】

好ましくは、この方法では、LOFUは被験体の腫瘍の位置に向けられる。

【0067】

さらに、被験体における腫瘍を処置するために必要とされる抗癌化学療法の有効な量を減らす方法が提供され、該方法は、腫瘍を処置するために必要とされる抗癌化学療法の有効な量を減らすのに十分な量の低密度焦点式超音波(LOFU)を、抗癌化学療法を受ける被験体に投与する工程を含む。

20

【0068】

方法の各々の実施形態では、LOFUは、化学療法あるいは放射線療法あるいは免疫療法の前に、またはこれらと同時に、被験体に施される。

【0069】

一実施形態では、LOFUは放射線療法の投与前に被験体に施される。

【0070】

抗癌化学療法が施される方法では、一実施形態では、抗癌化学療法は、被験体へのHSP90阻害剤の投与を含む。HSP90阻害剤は17AAG(タネスピマイシンあるいは17-Nアシルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシナン)でありえる。一実施形態では、化学療法剤はアルキル化薬である。一実施形態では、化学療法剤はトラベクテジンである。一実施形態では、化学療法剤はマスタードガス誘導体である。一実施形態では、化学療法剤は金属塩である。一実施形態では、化学療法剤は植物アルカロイドである。一実施形態では、化学療法剤は抗腫瘍抗生物質である。一実施形態では、化学療法剤は代謝拮抗薬である。一実施形態では、化学療法剤はトポイソメラーゼ阻害剤である。一実施形態では、化学療法剤はプロテアソーム阻害剤である。一実施形態では、化学療法剤は化学療法薬NSAIDである。一実施形態では、化学療法剤は以下に列挙された様々な抗悪性腫瘍薬の1つである。

30

40

【0071】

方法の一実施形態では、LOFUはトランスデューサーを含む超音波機械から超音波ビームによって送達され、機械と被験体は腫瘍の少なくとも一部がトランスデューサーの焦点長さに位置するように位置付けられる。

【0072】

方法の一実施形態では、LOFUは腫瘍の少なくとも一部に送達され、腫瘍の位置は画像化技術によってモニタリングされる。磁気共鳴撮像はこうした画像化技術であり得る。

【0073】

方法では、LOFUは、1時間未満の時間のあいだ、腫瘍内の複数の点に少なくとも一度投与可能である。

50

【0074】

方法の一実施形態では、LOFUは非切除型である。

【0075】

方法の一実施形態では、LOFUは0.5MHzから1.5MHzまでの周波数で施される。

【0076】

方法の一実施形態では、LOFUは1.5－3秒間施される。

【0077】

方法の一実施形態では、超音波ビームの焦点において、インサイツ強度が 250 W/cm^2 から 750 W/cm^2 までとなるように、LOFUは超音波ビームによって施される。方法の一実施形態では、超音波ビームの焦点において、インサイツ強度が被験体の $1\text{ mm}-75\text{ mm}$ の組織深さで 250 W/cm^2 から 750 W/cm^2 となるように、LOFUは超音波ビームによって施される。方法の一実施形態では、超音波ビームの焦点において、インサイツ強度が被験体の $1\text{ mm}-75\text{ mm}$ の組織深さで 350 W/cm^2 から 650 W/cm^2 となるように、LOFUは超音波ビームによって施される。方法の一実施形態では、超音波ビームの焦点において、インサイツ強度が被験体の $1\text{ mm}-75\text{ mm}$ の組織深さで 450 W/cm^2 から 550 W/cm^2 となるように、LOFUは超音波ビームによって施される。

【0078】

LOFUは全腫瘍体積に投与可能であるか、あるいは腫瘍体積の一部に投与可能である。好ましい実施形態では、LOFUは全腫瘍体積に施される。

【0079】

方法の一実施形態では、LOFUは、腫瘍を介して 1 cc の腫瘍組織当たり少なくとも $500\sim5000$ ジュールのエネルギーを送達する。方法の一実施形態では、LOFUは、 1 cc の腫瘍組織当たり少なくとも $1000\sim4000$ ジュールのエネルギーを送達する。方法の一実施形態では、LOFUは、腫瘍を介して 1 cc の腫瘍組織当たり少なくとも $2000\sim3000$ ジュールのエネルギーを送達する。

【0080】

一実施形態では、高密度焦点式超音波(HIFU)は被験体に投与されない。一実施形態では、高密度焦点式超音波は被験体に投与されていない。一実施形態では、高密度焦点式超音波は腫瘍に投与されていない。LOFUが抗癌治療の前に被験体に施される一実施形態では、LOFUが投与された後、および抗癌治療が施される前には、高密度焦点式超音波は被験体に投与されない。

【0081】

一実施形態では、放射線療法とのLOFUの量の抗癌治療効果は相乗的である。

【0082】

一実施形態では、投与されたLOFUは、組織／腫瘍の温度をせいぜい $40^\circ\text{C}-45^\circ\text{C}$ にしか上げない。一実施形態では、投与されたLOFUは組織／腫瘍の温度をせいぜい 40°C にしか上げない。一実施形態では、投与されたLOFUは組織／腫瘍の温度をせいぜい 45°C にしか上げない。一実施形態では、投与されたLOFUは組織／腫瘍の温度をせいぜい 50°C にしか上げない。HIFUは一般に、組織の温度をこれ以上上げる。

【0083】

一実施形態では、LOFUは0.5～3秒間施される。一実施形態では、LOFUは1.5－3秒間施される。一実施形態では、LOFUは100%のデューティーサイクルで施される。一実施形態では、LOFUは10、20、30、40、50、60、70、80、あるいは90%のデューティーサイクルの別の実施形態の1つで施される。

【0084】

さらに、被験体の腫瘍をある量の抗癌治療に感作させる方法が提供され、該方法は、抗癌治療の前後、あるいはその最中に、被験体の腫瘍をある量の抗癌治療に感作させるのに

10

20

30

40

50

効果的なある量の低密度焦点式超音波（L O F U）を、被験体に施す工程を含む。一実施形態では、抗癌治療は化学療法、放射線療法、あるいは免疫療法、あるいは標的治療、あるいは手術を含む。一実施形態では、抗癌治療は化学療法を含む。一実施形態では、抗癌治療は免疫療法を含む。一実施形態では、抗癌治療は放射線療法を含む。一実施形態では、抗癌治療は、例えば、腫瘍を切除するための外科手術を含む。方法は被験体に抗癌治療を施す工程をさらに含むことができる。ある量の抗癌治療へ腫瘍の感作させることで、腫瘍を処置に対してますます弱くなる。例えば、腫瘍体積の減少などの腫瘍処置を測定し得るパラメーターは、感作された腫瘍に適用された抗癌治療の所定量について、同じあるいは同等の被験体における同等の量の非感作腫瘍に適用される同じ量の抗癌治療、血管分布、位置、およびタイプと比較して、より大きくなる。一実施形態では、ある量の抗癌治療へ被験体の腫瘍を感作するのに効果的なL O F Uと抗癌治療の量は効果が相乗的である。

10

【0085】

本明細書に記載された方法のいずれかにおいて、被験体は哺乳動物である。一実施形態では、被験体はヒトである。

【0086】

方法で言及される腫瘍は、前立腺、乳房、鼻咽腔、咽頭、肺、硬骨、脳、唾液腺、胃、食道、精巣、卵巣、子宮、子宮内膜、肝臓、小腸、虫垂、結腸、直腸、膀胱、胆嚢、膵臓、腎臓、膀胱、頸部、膣、外陰、前立腺、甲状腺、または皮膚、頭頸部の腫瘍であるか、神経膠腫、あるいは軟部組織肉腫である。1つの実施形態では、腫瘍は前立腺癌である。1つの実施形態では、腫瘍は軟部組織肉腫である。一実施形態では、原発腫瘍が処置される。一実施形態では、二次腫瘍が治療される。一実施形態では、腫瘍の処置は、二次腫瘍の可能性を減らす。1つの実施形態では、転移は1つ以上の肺転移を含む。

20

【0087】

用語「腫瘍」は、本明細書で使用されるように、別段の定めがない限り、新生細胞の増殖を指し、前癌性と癌性の細胞と組織を含む。腫瘍は通常病変またはしこりとして現れる。一実施形態では、腫瘍は悪性新生物である。

【0088】

本明細書で使用されるように、「転移する」（あるいは文法的等価物）とは、癌または腫瘍に関して、被験体の1つの臓器あるいは組織から、最初の臓器あるいは組織から空間的に離れた被験体の別の臓器あるいは組織へと癌あるいは腫瘍が広がることを意味する。

30

【0089】

本明細書で使用されるように、腫瘍を「処置する」ことは、腫瘍そのもの、腫瘍の血管新生、あるいは特徴としている他のパラメーターなどの疾患の1つ以上の症状が、減少し、改善され、阻害され、緩解の状態に置かれ、あるいは緩解の状態で維持されることを意味する。腫瘍を「処置する」ことはさらに、腫瘍の1つ以上の特徴が処置によって除去され、減らされ、あるいは防がれ得ることを意味する。そのような特徴の非限定的な例は、基底膜と近位の細胞外マトリックスの制御されない分解、内皮細胞の新しい機能的な毛細管への移動、分裂、および組織化、ならびにそのような機能的な毛細管の存続を含んでいる。一実施形態では、腫瘍を処置することは腫瘍のサイズあるいは量を減らすことを意味する。

40

【0090】

本明細書で使用されるように、被験体の腫瘍の「転移を阻害する」ことは、特徴としているその1つ以上の症状あるいは1つ以上の他のパラメーターが減らされるか、改善されるか、あるいは阻害されることを意味する。こうしたパラメーターの非限定的な例は、基底膜と近位の細胞外マトリックスの制御されない分解、遠位か局所である第2の部位における、血流またはリンパ管を通る腫瘍細胞の移動、浸潤、調節異常性の癒着および増殖を含む。一実施形態では、転移を処置することは、発生を減らすこと、あるいは転移の進行の阻害を意味する。

【0091】

放射線療法は当該技術分野で周知である。本明細書に包含されるような放射線療法は、

50

身体外部にある機械により送達される医学治療用放射線（体外照射療法）、癌細胞付近の身体に配される放射性物質から送達される医学治療用放射線（体内照射療法）、又は全身放射線治療を含む。本明細書に包含されるような放射線療法は、三次元原体照射治療（3D-CRT）、強度変調放射線治療（IMRT）、画像誘発放射線治療（IGRT）、及びトモセラピーを含む。放射線療法はまた、定位手術的照射又は体幹部定位放射線治療（SBRT）の一部であり得る。例えば、当該技術分野で既知の任意の粒子ビームによる送達も包含され、例えば、陽子線治療、炭素イオン治療、又は、腫瘍のタイプと位置に依存した他の荷電粒子ビームである。

【0092】

一実施形態において、放射線療法は、CT画像により誘発される。一実施形態において、放射線療法は、少分割コーンビーム放射線療法である。一実施形態において、放射線療法は、少分割コーンビームCT画像誘発放射線療法である。本明細書に記載される様々な要素の全ての組み合わせは、本明細書で指定されていない限り、又は文脈により明確に否定されていない限り、本発明の範囲内である。

【0093】

本発明に使用され得る化学療法薬は様々である。化学療法薬の例は、次のものを含む：アルキル化剤（例えばトラベクチジン（trabectedin）（（1'R, 6R, 6aR, 7R, 13S, 14S, 16R）-6', 8, 14-トリヒドロキシ-7', 9-ジメトキシ-4, 10, 23-トリメチル-19-オキソ-3', 4', 6, 7, 12, 13, 14, 16-オクタヒドロスピロ[6, 16-（エピチオプロパノ-オキシメタノ）-7, 13-イミノ-6aH-1, 3-ジオキソロ[7, 8]イソキノ[3, 2-b][3]ベンザゾシン-20, 1'（2'H）-イソキノリン]-5-イル酢酸塩））；マスタードガス誘発体（例えばメクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、メルファラン、及びイホスファミド）；エチレンイミン（例えば、チオテパ及びヘキサメチルメラミン）；スルホン酸アルキル（例えばブスルファン）；ヒドラジン及びトリアジン（例えばアルトレタミン、プロカルバジン、ダカルバジン、及びテモゾロミド）；ニトロソ尿素（nitrosureas）（例えばカルムスチン、ロムスチン、及びストレプトゾシン）；金属塩（例えばカルボプラチン、シスプラチン、及びオキサリプラチン）；植物アルカロイド（例えばビンクリスチン、ビンブラスチン、及びビノレルビンなどのビンカアルカロイド、バクリタキセル及びドセタキセルなどのタキサン、エトポシド及びテニポシドなどのポドフィロトキシン、イリノテカン及びトポテカンなどのカンプトテカン類似体（トポイソメラーゼ阻害剤））；抗腫瘍抗生物質（例えばアントラサイクリン：ドキソルビシン、ダウノルビシン、エピルビシン、ミトキサントロン、及びイダルビシン；クロモマイシン：ダクチノマイシン及びプリカマイシン；マイトマイシン及びブレオマイシンなどの様々なもの）；代謝拮抗薬（例えば葉酸拮抗体：メトトレキサート；ピリミジンアンタゴニスト：5-フルオロウラシル、フロクスウリジン（foxuridine）、シタラビン、カペシタビン、及びゲムシタビン；プリンアンタゴニスト：6-メルカプトプリン及び6-チオグアニン；アデノシンデアミナーゼ阻害剤：クラドリビン、フルダラビン、ネララビン、及びペントスタチン）；トポイソメラーゼ阻害剤（例えばイリノテカン（irinotecan）、トポテカン；アムサクリン、エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド）；プロテアソーム（proteasomal）阻害剤；化学療法用のNSAID；及び様々な抗悪性腫瘍薬（例えばリボヌクレオチドリダクターゼ阻害剤：ヒドロキシ尿素；副腎皮質ステロイド阻害剤：ミトタン；酵素：アスパラギナーゼ及びペガスパルガーゼ；微小管阻害薬：エストラムスチン；レチノイド：ベキサロテン、イソトレチノイン、トレチ

10

20

30

40

50

ノイン (A T R A)) 。

【0094】

細胞中の小胞体 (E R) ストレスをもたらし及び／又は折り畳まれなかったタンパク質の応答 (U P R) をもたらす化学療法薬が、当該技術分野で知られている。例えば、プロテアソーム阻害剤、例えばボルテゾミブ (V e l c a d e ; P S - 3 4 1 として以前に知られている) は、E R ストレス応答を誘発する。また、プロテアソーム阻害剤、例えばボルテゾミブは、U P R を誘発する。ヒストン脱アセチル化酵素 (H h i s t o n e d e a c e t y l a s e) (H D A C) 阻害剤は、E R ストレス応答を誘発する。化学療法用の N S A I D (例えば、インドメタシン、ジクロフェナク、及びセレコキシブ) は E R ストレス応答を誘発することができ、且つ U P R を誘発することができる。エストロゲン受容体 α 阻害剤、B H P I (1, 3-ジヒドロ-3, 3-ビス (4-ヒドロキシフェニル)-7-メチル-2H-インドール-2-オン) は、U P R を活性化することができる。白金含有抗癌剤：シスプラチンは、E R ストレス応答を誘発すると知られている。薬物のタキサンファミリー：パクリタキセルは、E R ストレス応答を誘発すると知られている。ドキソルビシンなどのアントラサイクリンは、E R ストレスを誘発すると知られている。シクロホスファミドは E R ストレスを誘発すると知られている。また、引用により本明細書に組み込まれる、H e t z e t a l, N a t u r e R e v i e w s, D r u g D i s c o v e r y, 12:703-719 (S e p t., 2013) の表2も参照されたい。

10

【0095】

小胞体 (E R) は、合成の部位と、分泌された膜結合型タンパク質及び幾つかの小器官標的化タンパク質の合成及びフォールディングの部位である。E R は、細胞エネルギーレベル、レドックス状態、又は $C a^{2+}$ 濃度を乱すストレスに非常に敏感である。そのようなストレスは、E R のタンパク質フォールディング能力を減らし、この能力は、折り畳まれなかったタンパク質の蓄積及び凝集、及び／又は、E R における内在及び輸送タンパク質の負荷と、その負荷を処理する小器官の能力との間の不均衡を、結果としてもたらし得る。この条件は、本明細書及び当該技術分野において「E R ストレス」と呼ばれる。E R ストレス応答は、タンパク質フォールディングを増強する E R のシャペロン、酵素、及び構造成分のタンパク質合成及び／又はアップレギュレーションの全体的な減衰により、折り畳まれなかったタンパク質の負荷を軽減することにより、細胞の修復及び持続した生存を促進することができる。この応答は総じて、小胞体ストレス応答 (U P R) と名付けられる。折り畳まれなかったタンパク質の蓄積は、P E R K、A T F 6、及び I R E 1 からの G R P 7 8 の解離を引き起こし、それにより U P R を起こす。

20

30

【0096】

【表 1 - 1】

表 1 - LOFUと共に使用され得る化学療法の非限定的な例

作用のタイプ	薬物の名称	作用の機構	選択された LOFU との相互作用
プロテオソームの遮断/ 誤って折り畳まれたタンパク質の分解			LOFU が誘発する、誤って折り畳まれたタンパク質の分解を減らし、それにより、アポトーシスに向かう先端に対する小胞体ストレス応答の量を増やす
	ボルテゾミブ	プロテオソーム阻害剤	UPR による ATF-4 の誘発は、ボルテゾミブに耐性を与えることができる
	3-メチルアデニン	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3-キナーゼ) の阻害剤は、ATG5 の誘発と LC3-II の活性化を妨げ、オートファゴソームの形成を遮断した	
	ポリフェノール (緑茶) 没食子酸エピガロカテキン	プロテオソーム阻害剤	
	ゲニステイン	プロテオソーム阻害剤	
	クルクミン	プロテオソーム阻害剤	
	レスベラトロール	プロテオソーム阻害剤 / XBP-1 の生存促進性のシグナル伝達を抑制する	
オートファジーの阻害剤			ストレスの時間中、細胞はオートファジーを誘発して、直後に枯渇している構築

10

20

30

40

【表 1 - 2】

			ブロックを再び満たす。LOFU で処置した細胞におけるオートファジーのプロセスの阻害は、ストレスに直ちに応答することができず且つそれによりアポトーシスを誘発する細胞を結果としてもたらす。	10
	15,16-ジヒドロタンシノン I (Tanshen root)	プロテオソーム阻害を介して UPR を誘発		20
	クロロキン	オートファジーの阻害剤		
オートファジーの誘発物質			小胞体ストレス応答の減少は、LOFU により、及び細胞をあまり敏感でないようにすることにより誘発される(sparked)。オートファジーが十分に長時間活性化される場合、その後細胞をアポトーシス促進性状態にすることができる。増加したマクロオートファジーと増加した UPR の組み合わせは、免疫応答を提供することができる。	30 40
	ラパマイシン	mTOR 阻害剤		
	テムシロリムス	mTOR 阻害剤		

【表 1 - 3】

	4-O-カルボキシメ チルアスコクロリ ン	核内ホルモン受容体 PPAR γ のアゴニスト; ER ストレスで誘発され たオートファジー及び アポトーシス	
ER ストレス誘 発物質			UPR を誘発する薬剤 の 2 つの異なるソー スの組み合わせは、 細胞を死滅させる付 加的な効果をもたら すことができる。
	セレコキシブ	Cox-2 阻害剤 - ER から サイトゾルへのカルシ ウムの漏出を引き起こ すことによる	
	ベラパミル	Ca チャネル阻害剤	ER ストレスのシグ ナル伝達を増強する
	リトナビル	プロテオソーム阻害剤 と相乗するタンパク質 分解を阻害する	
	3-チア脂肪酸テト ラデシルチオ酢酸	ER ストレスの誘発物質	
	ネルフィナビル	CHOP 発現を調節	
DNA 構造の損 傷/ DNA 合成の 予防			LOFU 損傷後の細胞 修復を妨げるための 修復機構を阻害
	シスプラチン	ER ストレスと dmg DNA を誘発	
	ゲムシタビン	ヌクレオシドアナログ	
タンパク質合成 の遮断			
	サルブリナール	eIF2a ホスファターゼの 阻害剤	

【表 1 - 4】

	シクロヘキシミド		
死亡のシグナル 伝達を増大			
	TRAIL		
化学シャペロン			
	4-フェニル酪酸	突然変異体アルファ 1- アンチトリプシン表現 型を救出する化学シャ ペロン	
シャペロン阻害 剤			
	ゲルダナマイシン	HSP90 阻害剤	
	17-アリルアミノ -17-デメトキシ-ゲ ルダナマイシン (17AAG)	HSP90 阻害剤	
	17-ジメチルアミノ- エチルアミノ-17-デ メトキシゲルダナ マイシン (17DMAG)	HSP90 阻害剤	
ソノポレーショ ン修復を遮断			
	バキュオリン	創傷及び Ca^{2+} により引 き起こされるリソゾー ムと原形質膜の融合を 遮断する、新たに発見さ れた小さな有機分子	

10

20

30

40

【0100】

方法の実施形態において、化学療法薬はHSP90阻害剤である。HSP90阻害剤の一例は、17AAG（タネスピマイシン又は17-N-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン）である。一実施形態において、化学療法薬はアルキル化剤である。一実施形態において、化学療法薬はトラベクチジンである。一実施形態において、化学療法薬はマスタードガス誘発体である。一実施形態において、化学療法薬は金属塩である。一

50

実施形態において、化学療法薬は植物アルカロイドである。一実施形態において、化学療法薬は抗腫瘍抗生物質である。一実施形態において、化学療法薬は代謝拮抗薬である。一実施形態において、化学療法薬はトポイソメラーゼ阻害剤である。一実施形態において、化学療法薬はプロテアソーム阻害剤である。一実施形態において、化学療法薬は化学療法の N S A I D である。一実施形態において、化学療法薬は、上記に列挙された様々な抗悪性腫瘍薬のうちの 1 つである。

【0101】

本発明により包含される化学療法薬又は薬剤の他の限定しない例は、他に明言されない限り、アントラサイクリン、マイタンシノイド、アルキル化剤、抗代謝物質、植物アルカロイド又はテルペノイド、及び細胞毒性抗生物質を含む。一実施形態において、化学療法剤は、シクロホスファミド、ブレオマイシン、エトポシド、白金薬剤（シスプラチン）、フルオロウラシル、ビンクリスチン、メトトレキサート、タキソール、エピルビシン、ロイコボリン（フォリン酸）、又はイリノテカンである。

10

【0102】

本明細書に包含される抗腫瘍免疫療法は、（i）癌に関連する生体分子標的に高親和性で結合する、モノクローナル抗体（裸の、化学結合、放射結合、又は毒素結合の抗体、及び同様に二重特異性抗体）、F a b フラグメント又は s c F v フラグメントで構成されたフラグメントなどのその関連する抗原結合性フラグメント；（i i）腫瘍細胞及び腫瘍細胞抗原に関して非特異性のもの；サイトカイン又はサイトカイン受容体に結合する抗腫瘍免疫療法薬、例えばサイトカイン、インターロイキン、インターフェロン、G M - C S F、小有機分子（例えば 1, 500 ダルトン以下）、又は他の薬物；及び、免疫応答を標的とする、C T L A - 4、P D - 1、P D L - 1、及び他の小さな有機分子、ペプチド及びアプタマーのうちの 1 つを含むがこれらに限定されない、チェックポイントを標的とする物質を含む。一実施形態において、本明細書に使用されるような免疫療法は、細菌ベースの抗癌性免疫療法又は抗腫瘍免疫療法を除外する。1 つの実施形態において、本明細書に使用されるような免疫療法は、リステリア菌ベースの免疫療法を除外する。

20

【0103】

一実施形態において、処置の効果の増大は、適用される効果を増大させる方法が無い状態での、同じ量の処置（例えば与えられた処置用量）のために達成された範囲に対して達成された治療効果の範囲の増大を意味する。

30

【0104】

また、次のものを含む超音波刺激療法装置も提供される：周波数波形を生成する制御システム；及び処置ゾーンで $1 \sim 1000 \text{ W} / \text{cm}^2$ の空間ピークの一時的な平均の音響出力強度（ $I_{\text{sp}} t_a$ ）の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された 1 以上のトランスデューサーであって、ここで、超音波は 0.5 ～ 5 秒の範囲の時間にわたり処置ゾーンへと連続的に適用され、超音波周波数は 0.01 ～ 10 MHz の範囲であり、任意のビームのメカニカルインデックスは 4 未満である。

【0105】

装置の一実施形態において、1 以上のトランスデューサーの各々は、中心周波数が 0.05 ～ 5 MHz の範囲である周波数波形と、 $20 \sim 1000 \text{ W} / \text{cm}^2$ の音響出力強度に基づいて、超音波ビームを生成するように構成される。

40

【0106】

装置の一実施形態において、1 以上のトランスデューサーの各々は、中心周波数が 0.5 ～ 1.5 MHz の範囲である周波数波形と、 $20 \sim 1000 \text{ W} / \text{cm}^2$ の音響出力強度に基づいて、超音波ビームを生成するように構成される。

【0107】

装置の一実施形態において、各トランスデューサーは、-3 dB でのビームプロファイルのウェストが処置ゾーンにおいて少なくとも 5 mm となるように、カラム状（columnated）超音波を生成するように構成される。

【0108】

50

装置の一実施形態において、1以上のビームが、処置中に機械的に移動される。

【0109】

装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、連続して又は一斉に作動し、且つ、処置期間に処置ゾーンで平均空間ピーク 250 W/cm^2 の超音波を生成するように構成された、2以上のトランスデューサーを含む。

【0110】

装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、 $10\text{ kHz} \sim 300\text{ kHz}$ の範囲内の周波数を有する超音波を生成するように構成される。

【0111】

装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、 $300\text{ kHz} \sim 3\text{ MHz}$ の範囲内の周波数を有する超音波を生成するように構成される。

10

【0112】

装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは $300\text{ kHz} \sim 3\text{ MHz}$ の周波数で作動し、1以上のトランスデューサーは $30 \sim 300\text{ kHz}$ の周波数で作動する。

【0113】

装置の一実施形態において、2以上の超音波トランスデューサーは、処置ゾーンを通過する超音波ビームを生成し、各ビームは、 $10 \sim 500\text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンにおいて I_{spta} を有している。

【0114】

装置の一実施形態において、処置時間は、腫瘍1立方センチメートル当たり5秒未満である。

20

【0115】

装置の一実施形態において、2つのトランスデューサーは、処置ゾーン内で交差する超音波ビームを生成し、各ビームは、 $50 \sim 500\text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンにおいて I_{spta} を有している。

【0116】

装置の一実施形態において、3つのトランスデューサーは、処置ゾーンを通過する超音波ビームを生成し、各ビームは、 $50 \sim 500\text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンにおいて I_{spta} を有している。

30

【0117】

装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、処置ゾーン内で互いに実質的に同位相である超音波ビームを生成する。

【0118】

装置の一実施形態において、別個の超音波トランスデューサーから放たれる2つの超音波ビームは、処置ゾーン内でほぼ一致し且つ交差し、各ビームは、 $70 \sim 100\text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンにおいて音響パワーの空間ピーク強度を有しており、超音波は1～5秒まで連続的に適用される。

【0119】

装置の一実施形態において、別個の超音波トランスデューサーから放たれる3つの超音波ビームは、処置ゾーン内でほぼ一致し且つ交差し、各ビームは、 $50 \sim 70\text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーンにおいて音響パワーの空間ピーク強度を有しており、超音波は1～5秒にわたり連続的に適用される。

40

【0120】

装置の一実施形態において、別個のトランスデューサーから生じる超音波ビームはそれぞれ、処置ゾーンにおいておよそ $100 \sim 1000\text{ W/cm}^2$ の範囲の I_{spta} を生成する。

【0121】

装置の一実施形態において、少なくとも1つのトランスデューサーは、処置ゾーンよりも実質的に大きなサイズであり、且つ処置ゾーンが完全にビーム内にあるように配向され

50

る、高強度直径を持つ超音波ビームを生成する。

【0122】

装置の一実施形態において、集中的処置ゾーンが形成され、そこでは、2以上の超音波ビームが経路を渡り、集中的処置ゾーンは、伝達されたエネルギー方向に対して垂直に約1cm以上であり、及び集中的処置ゾーンは、伝達された方向に対して平行に約1cm以上である。

【0123】

装置の一実施形態において、各トランスデューサーから処置ゾーンに加えられた音圧は0.1～10MPaである。

【0124】

10

装置の一実施形態において、集中的超音波処置ゾーンをもたらすトランスデューサーの数は、1～1000である。

【0125】

装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーからの超音波は、処置時間中に連続的に適用される。

【0126】

装置の一実施形態において、超音波は、1のオン時間単位～0乃至9のオフ時間単位の範囲のデューティサイクルで生成される。

【0127】

装置の一実施形態において、トランスデューサーは、単一周波数音又は複数周波数のチャープを生成するように構成される。

20

【0128】

装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、時間内に連続して作動される。

【0129】

装置の一実施形態において、適用の全経過にわたる、標的組織及び標的組織周囲の所望の縁に送達される全エネルギーは、周囲の組織に送達されるものよりも大きい。装置の一実施形態において、超音波の周波数が適用中に掃引されるように、1以上のトランスデューサーが構成される。装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、二次元フェーズドアレイを含む。装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは環状アレイを含む。装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、三次元フェーズドアレイを含む。装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、1以上の内視鏡装置に組み込まれる。装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、磁気共鳴撮像機械に組み込まれる。装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、放射線療法機械に組み込まれる。

30

【0130】

装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、超音波が約2秒以下にわたり処置ゾーンに適用される処置中に処置ゾーンにおいて達する最高温度が45℃未満となるよう、超音波を生成するように構成される。装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、超音波が約2秒以下にわたり処置ゾーンに適用される処置中に処置ゾーンにおいて達する最高温度が50℃未満となるよう、超音波を生成するように構成される。

40

【0131】

装置の一実施形態において、1以上のトランスデューサーは、超音波が約2秒以下にわたり処置ゾーンに適用される処置中に処置ゾーンにおいて達する最高温度が55℃未満となるよう、超音波を生成するように構成される。

【0132】

また、システムであって、

超音波刺激療法装置であって：

周波数波形を生成する制御システムと、

50

処置ゾーンで $1 \sim 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピークの一時的な平均の音響出力強度 (I_{spta}) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された 1 以上のトランスデューサーであって、ここで、超音波は $0.5 \sim 5$ 秒の範囲の時間にわたり連続的に適用され、超音波周波数は $0.01 \sim 10 \text{ MHz}$ の範囲である、トランスデューサーとを含む音響刺激装置；

放射線療法機械；及び

第 1 の量の超音波及び第 2 の量の放射線療法が被験体に施されるよう、超音波刺激療法装置及び放射線療法機械を制御するように動作可能に構成された制御システムであって、ここで、第 1 及び第 2 の量は共に、被験体の腫瘍を処置するのに十分なものである、制御システム

を含む、システムも提供される。

【0133】

また、超音波刺激療法装置を含むシステムも提供され：

該超音波刺激療法装置は：

周波数波形を生成する制御システムと、

処置ゾーンで $1 \sim 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピークの一時的な平均の音響出力強度 (I_{spta}) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された 1 以上のトランスデューサーであって、ここで、超音波は $0.5 \sim 5$ 秒の範囲の時間にわたり連続的に適用され、超音波周波数は $0.01 \sim 10 \text{ MHz}$ の範囲である、トランスデューサーとを含む、

超音波刺激療法装置は、第 1 の量の超音波及び第 2 の量の化学療法が被験体に施されるよう、化学療法と組み合わせて使用され、ここで、第 1 及び第 2 の量は共に、被験体の腫瘍を処置するのに十分なものである。

【0134】

また、超音波刺激療法装置を含むシステムも提供され：

該超音波刺激療法装置は：

周波数波形を生成する制御システムと

処置ゾーンで $1 \sim 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピークの一時的な平均の音響出力強度 (I_{spta}) の周波数波形に基づいて超音波を生成するように構成された 1 以上のトランスデューサーであって、ここで、超音波は $0.5 \sim 5$ 秒の範囲の時間にわたり連続的に適用され、超音波周波数は $0.01 \sim 10 \text{ MHz}$ の範囲である、トランスデューサーとを含む、

超音波刺激療法装置は、第 1 の量の超音波及び第 2 の量の免疫療法が被験体に施されるよう、免疫療法と組み合わせて使用され、ここで、第 1 及び第 2 の量は共に、被験体の腫瘍を処置するのに十分なものである。

【0135】

本発明は、以下の実施例からより良く理解されるものである。しかし、当業者は、議論された特定の方法及び結果が、後に付随する特許請求の半においてより具体的に記載されるような発明の単なる例示にすぎないことを、容易に認識する。

【0136】

<実施例 1>

B16 黒色腫腫瘍は、腫瘍に特異的な CD4+T 細胞による IL-2 及び IFN γ の生成を抑止する：黒色腫細胞がどのようにして腫瘍により誘発されたエフェクター CD4+T 細胞応答を調節するのかを判定するために、3 つの異なるマウスモデルを使用した。最初に、B16-F1 黒色腫腫瘍を、腰椎の側腹部に B16 細胞を皮下注射することにより、C57B1/6J マウスにおいて誘発させた。腫瘍は 7-8 mm の大きさに成長し、その後 CD4+T 細胞を、同側の鼠蹊部の流入領域リンパ節 (DLN) と遠位の対側の非流入領域頸リンパ節 (NDLN) の両方から単離した。T 細胞も、腫瘍を抱いていなかった対照マウスから得た。マウスの黒色腫における腫瘍抗原に特異的な T 細胞寛容の以前の報告を支持すると (18、21)、腫瘍 DLN から単離された CD4+T 細胞は、抗 CD3

10

20

30

40

50

及び抗CD28抗体によりエキソピボでの刺激時に、同じマウスの遠位の対側のNDLNから、又は対照の腫瘍の無いマウスのリンパ節から単離された細胞よりも著しく少ないIL-2を生成した。同様であるが、あまり明白でない効果も、IFN γ (図1のAとB)について観察した。

【0137】

これらのデータを確認するために、代用の腫瘍抗原としてOVAを発現させるように安定してトランスフェクトされたB16-F1黒色腫細胞株を、使用した。これら細胞を、OT-Iマウス、OVA323-339ペプチドを認識する、トランスジェニックMHCクラスII制限TCRを発現させるT細胞を持つマウスに皮下注射した。T細胞を記載されるようにこれらマウスから集めて、OVA323-339ペプチドを与えた脾細胞を使用してエキソピボで刺激した。再度生成された同側のDLNからのCD4+T細胞は、対側のNDLN又は腫瘍の無いマウスからの細胞と比較して、IL-2及びIFN γ の量を著しく減少させた(図1のC及びD)。

【0138】

これらの結果は更に、Ty rp1マウスを使用して第3のモデルにおいて確証され、このマウスは、チロシナーゼ関連タンパク質1が不足しており、且つ、この内因性のメラノサイト分化抗原のTRP-1113-127ペプチドに特異的なMHCクラスII制限TCRを発現するT細胞を有している。それらマウスにB16-F1細胞を注入した。前の2つのモデルにおけるように、同側のDLNから採取されたCD4+T細胞によるIL-2及びIFN γ の生成は、対側のNDLN又は腫瘍の無いマウスから採取された細胞と比較して著しく減少した(図1のE及びF)。総じて、これらの結果は、黒色腫瘍が、再刺激後にエフェクターサイトカインを生成する能力の減少において翻訳を行う、腫瘍抗原特異性CD4+T細胞の低応答性を誘発することを支持している。

【0139】

LOFUによる原発性B16黒色腫の処置は、CD4+T細胞における腫瘍誘発耐性を克服する：HIFUは、凝固壊死につながる腫瘍組織内部の高度の熱量の生成により、腫瘍切除を優勢的に引き起こすように現在使用されている。HIFUは、局所の腫瘍管理を達成するための非常に有効で非侵襲的な切除手順ではあるが、脈管構造と組織の下部構造をほぼ一瞬にして破壊し、それにより抗原の提示及び認識のために樹状細胞及び免疫細胞の浸潤を制限する。LOFUの投与が、新しい腫瘍抗原を生成する腫瘍組織における非致死性の熱/機械ストレスを誘発し、及び/又は、腫瘍の免疫原性を増大させ且つCD4+T細胞の腫瘍により誘発された耐性を克服することができる、ストレスにより誘発されたタンパク質の発現を誘発するかどうかを、調べた。この可能性を調べるために、C57BL/6Jマウスの別個の群の上で成長した原発性B16-F1黒色腫瘍を、未処置のままにするか、又はLOFUで処置した。LOFU処置の36時間後、DLN及びNDLN内在CD4+T細胞を、マウスの両方の群から単離して、抗CD3及び抗CD28抗体によりエキソピボで再刺激した。著しくもっと生成された、LOFUで処置したマウスのDLNからのCD4+T細胞は、腫瘍が未処置のままのマウスの群から得た細胞と比較して、著しくより多くのIL-2を生成した。対照的に、対応するNDLNからのT細胞は、処置済み及び未処置のマウスにおいて同等量のIL-2を生成した(図2のA)。同様ではあるがあまり明白でない効果を、これら同じマウスの実験群のIFN γ の生成上で観察した(図2のB)。全体として、これら結果は、B16黒色腫瘍のLOFU処置が、黒色腫瘍微小環境により誘発される、低応答性の状態を克服するためにCD4+T細胞を支えるように思われることを示しており、活性化の改善、及び腫瘍により誘発されたT細胞寛容の減少を示唆している。

【0140】

黒色腫瘍は、TCRシグナル伝達に干渉し、且つサイトカインの発現を直接阻害し、その結果CD4+T細胞(21)における機能性アネルギーの確立をもたらす、1セットのタンパク質を生成する遺伝子発現のNFAT1に依存するプログラムを誘発し得ることが、以前に示されていた。LOFU処置が、アネルギー誘発を妨げることにより腫瘍に

10

20

30

40

50

より誘発されたT細胞寛容を阻害し、且つ、L O F Uでの処置後にD L N内在C D 4 + T細胞に観察されたサイトカイン発現の増大に起因し得る可能性を判定するために、B 1 6腫瘍を持つマウスのD L Nから分離したC D 4 + T細胞におけるそのようなアネルギー関連遺伝子の発現を、最初にモニタリングし、同じマウスのN D L Nから採取したT細胞なかの遺伝子の発現と比較した。癌を患うマウスのD L NからのT細胞は、E 3 ユビキチンリガーゼG r a i l、C b l - b、及びI t c、並びに転写因子E g r 2を含む、より高レベルのアネルギー関連遺伝子を発現させた（図2のC）。しかし、F o x p 3の発現の差は、腫瘍を持つマウスのD L N及びN D L N T細胞の間では観察されず、このことは、調節性T細胞の存在の増加が、この研究に使用される条件下でC D 4 + T細胞応答の減少におそらく起因しなかったことを示唆している（図2のC）。 10

【0141】

その後、L O F UによるB 1 6 黒色腫の処置が、T細胞中のそのようなアネルギー関連遺伝子の発現に対して効果があるかどうかを判定した。内因性の腫瘍抗原により誘発された応答を評価するために、T y r p 1 マウス上で成長するB 1 6 腫瘍を、未処置のままにするか、又はL O F Uで処置した。C D 4 + T細胞をD L N及びN D L Nから分離し、様々なアネルギー関連遺伝子の発現を評価した。D L N由来のT細胞は、G r a i l、I t c h、及びC b l b、同様に、転写因子E g r 2 及びG r g 4、並びにプロテアーゼC a s p a s e 3を含む、分析された7つのアネルギー遺伝子のうち6つの、様々な程度のアップレギュレーションを示した（図2のD）。様々なインビトロ及びインビボのT細胞アネルギーモデルにおいてもアップレギュレートされる、別の転写因子（I k a r o s）は、腫瘍により誘発されたアネルギーのこの黒色腫モデルにおいては著しくアップレギュレートされず、そのレベルは、D L N及びN D L N由来のT細胞両方において大きく類似したままであった（図2のD）。興味深いことに、腫瘍をL O F Uで処置すると、D L Nから分離されたT細胞におけるそれらの遺伝子のうち5つ、G r a i l、I t c h、C b l b、E g r 2、及びG r g 4の発現はアップレギュレートされず、N D L N中のこれらの遺伝子の発現に匹敵するレベルを示し（図2のD）、このことは、L O F U処置が、腫瘍抗原特異性C D 4 + T細胞におけるアネルギーを誘発する遺伝子の発現の誘発を阻害したことを支持している。 20

【0142】

L O F Uで処置した黒色腫腫瘍は、アネルギーの腫瘍抗原特異性T細胞を再活性化することができる：この結果は、腫瘍により誘発されたT細胞寛容がL O F U処置後に克服され得ることを支持していた。この観察は、様々なアネルギー関連遺伝子の発現が腫瘍部位のL O F U処置後に腫瘍D L N由来のT細胞中で減少し、その一方で、活性化により誘発されたサイトカイン発現が、遠位のN D L Nから分離されたT細胞又は対照の腫瘍が無いマウスから分離されたT細胞において検出されたものに近いレベルにまで回復されたという事実により、実証された。 30

【0143】

L O F Uは、腫瘍抗原特異性T細胞アネルギーの誘発を妨げるだけでなく、確立されたアネルギーを逆転し、且つ前に寛容されたT細胞における生産的なエフェクター応答を生成するかどうかについてが、調査された。ナイーブC D 4 + T細胞を、T y r p 1 マウスの脾臓とリンパ節から分離し、インビトロでT H 1細胞に分化し、且つ、共刺激の無い状態で抗C D 3抗体を用いた部分的な刺激によりこれらを活性化することにより、アネルギー化した。予想通りに、T細胞は低応答性になり、抗C D 3及び抗C D 2 8の抗体での再刺激後にI L - 2生成の深刻な減少を示した（図3のA）。その後、これらアネルギー性細胞を、未処置の又はL O F Uで処置した黒色腫腫瘍の何れかに由来する溶解物を与えたC D 1 1 c + 樹状細胞で再活性化させた。予想通りに、未処置のB 1 6 - F 1 黒色腫由来の腫瘍溶解物を与えた樹状細胞で刺激したアネルギー性T y r p 1 T細胞は、ごく少量のI L - 2を生成した。しかし、樹状細胞に、L O F Uで処置した腫瘍から調製した腫瘍溶解物を与えると、以前にアネルギー化したT細胞は、未処置の溶解物で活性化されたものより著しく多くのI L - 2を生成した（図3のB）。これらの結果は、黒色腫腫瘍のL 40 50

OFU処置が、耐性を破ることが可能な活性化シグナルを樹状細胞に送達させることを可能にし、その他にアネルギー性T細胞が抗原との再遭遇に応答し且つ生産的な応答を生成することを可能にすることができる、免疫原分子の生成を結果としてもたらし。

【0144】

LOFUによる黒色腫の処置は、メラノーマ腫瘍細胞における分子シャペロンカルレティキュリン及びHsp70の発現と細胞内分布の変化を誘発する：樹状細胞によるメラノーマに特異的なT細胞の活性化は、それらの運命を判定するのに重要な事象である。エフェクターT細胞応答を誘発することができる優れた抗原提示事象は、寛容原性の刺激を伝える樹状細胞の活性化状態に大きく依存する。結果は、LOFUでの黒色腫腫瘍の処置が、腫瘍により誘発されたT細胞寛容の妨害の結果としてCD4+T細胞活性化の増大をもたらししたことを示す。このことは、より多くの免疫原性の樹状細胞集団の生成に潜在的に起因し得る。T細胞へと効率的に提示される抗原の樹状細胞の能力に対するLOFUの効果を試験するために、腫瘍を持つマウスのDLN由来の全細胞を最初に分離し、処置せず又はLOFUで処置し、免疫染色して、フローサイトメトリーによりCD11c+樹状細胞集団上でのB7.1、B7.2、及びMHCIの発現を測定した。LOFUで処置されたマウスにおけるこれらのタンパク質の発現の著しい増強は、検出されなかった（図4のA）。

【0145】

カルレティキュリン及びHsp70を含む分子シャペロンによる腫瘍抗原の輸送も、T細胞（32-35）への抗原の後の生産的な提示に重要である。インビボ及びインビトロ両方の方法を利用して、未処置の及びLOFUで処置したB16黒色腫腫瘍における膜のカルレティキュリン及びHsp70を検出した。未処置のまま、又はLOFUで処置した何れかの腫瘍を、腫瘍を持つマウスから採取し、単個細胞浮遊液にして、生/死のマーカーで染色して、細胞の生存率を評価した。細胞の生存率の差異はLOFU処置に応じて観察されず、このことは、FUSの低エネルギー形態が腫瘍細胞死を直接誘発していなかったという考えを支持している（図4のB）。B16黒色腫腫瘍を未処置のままにし、又はLOFU処置に晒して、腫瘍組織切片をスライド上に置いた。免疫蛍光による後の検出のために、抗Hsp70抗体又は抗カルレティキュリン抗体による染色に、スライドをさらした。LOFUで処置した黒色腫の免疫蛍光分析は、LOFUがHsp70の発現増加を誘発したことを確認した（図4のC）。興味深いことに、未処置の細胞と比較したので、LOFUで処置した細胞も、B16細胞上の原形質膜の不連続部位に蓄積するように思われるカルレティキュリンの分布の変化を示した（図4のC）。Hsp70発現の増大も、このタンパク質の膜における存在の増大と相互に関連したかどうかを判定するために、非透過性のCD45-TRP-1+B16黒色腫細胞をHsp70について染色し、LOFU処置後の細胞表面発現をFACSにより評価した。この分析は、B16黒色腫のLOFU処置が腫瘍細胞におけるHsp70の膜の存在の増大を引き起こしたことを確認した（図4のD）。

【0146】

メラノーマ腫瘍のLOFU処置は、より強力なCD4+T細胞応答を誘発するために、樹状細胞を媒介とした腫瘍抗原提示を強化する：腫瘍のLOFU処置が、内在する樹状細胞の刺激能の増大を結果としてもたらし得る可能性を判定するために、LOFUで処置したマウスから調製した溶解物が、抗原特異性T細胞の刺激の増大を誘発して、より強固なエフェクター応答を引き起こすのかどうかを、直接試験した。この実験のために、B16-F1-OVA黒色腫細胞を使用して、C57BL/6マウスの腫瘍を誘発させた。溶解物を、未処置の及びLOFUで処置した腫瘍から調製した。脾臓樹状細胞、及びレスポンダーであるナイーブCD4+T細胞を、それぞれC57BL/6とOT-Iの腫瘍の無いマウスから分離して、上述の異なる腫瘍溶解物の存在下、又は不在下で共培養した。腫瘍溶解物を含有するOVAは、レスポンダーT細胞を刺激するために腫瘍抗原のソースとして作用し得るが、外因性のOVA323-339ペプチドも追加して、全ての条件下でこのペプチドを持つ樹状細胞の均一な充填を確保して、異なる腫瘍溶解物の寛容原性又は

活性化の性質をより正確に判定した。

【0147】

予想通りに、対照のレスポンダーO T-I I T細胞は、O V A 3 2 3-3 3 9ペプチドを与えた樹状細胞による活性化の後、高レベルのI L-2生成による強力な応答を示した。しかし、外因性のO V A 3 2 3-3 3 9ペプチドを培養物に加えたとしても、未処置の腫瘍から得た溶解物は、O T-I I 応答を著しく阻害し、結果としてI L-2生成の深刻な減少をもたらした（図5のA）。興味深いことに、未処置の溶解物とは反対に、L O F Uで処置した腫瘍由来の溶解物は、O V A 3 2 3-3 3 9に対するO T-I I 細胞の応答に対する負の効果を持たないだけでなく、外因性のペプチドが無い状態でさえもO T-I I レスポンダーT細胞の強力な活性化を誘発することができる（図5のA）。これらの結果は、B 1 6 黒色腫瘍のL O F U処置が、腫瘍内微小環境において通常は生じる樹状細胞のT細胞刺激能力に対する負の効果を妨げるという観察の更なる指示を広げた。

10

【0148】

次に、腫瘍D L Nの内在する抗原提示細胞が、黒色腫瘍のL O F U処置後の標的T細胞の活性化において、機能的に更に効果的となるのかどうかを判定した。その効果に対し、B 1 6-F 1 黒色腫をC 5 7 B L/6 マウスに誘発させ、未処置のままにするか、又はL O F Uで処置した。D L N細胞懸濁液はT細胞が枯渇しており、これを使用して、腫瘍抗原特異生T細胞を活性化する能力及びD L N抗原提示細胞を試験した。故に、T細胞を枯渇したD L N細胞を、ナイーブT y r p 1 C D 4+T細胞、及びB 1 6のインビトロの培養物から調製した溶解物と共に、24時間共培養した。I L-2生成をE L I S Aにより測定し、レスポンダーT細胞の刺激をモニタリングした。L O F Uで処置した腫瘍を持つマウスのD L Nから分離した細胞は、未処置のマウスから分離した細胞と比較して、T y r p 1 C D 4+T細胞を活性化する能力を著しく増大させたことを示した（図5のB）。これらのデータは、B 1 6 黒色腫のL O F U処置が、腫瘍抗原レスポンダーT細胞の活性化において機能的に更に効果的である抗原提示細胞の生成を結果としてもたらすことを支持している。

20

【0149】

L O F U、続く少分割I G R Tによる腫瘍の切除の結果、原発性黒色腫病変のT細胞を媒介とした制御の増強をもたらした：L O F U治療が腫瘍免疫原性を調節し、且つ抗腫瘍免疫応答を増強することができるという観察の結果を更に判定するために、原発腫瘍対照を評価する一連のインビボの処置の戦略は、右の背側後肢において皮下に位置する定着されたB 1 6-M 1 腫瘍を持つマウス1匹当たり、10 Gyの少分割I G R Tから30 Gyの全用量までを毎日使用する腫瘍切除と組み合わせて、又は組み合わせずにL O F Uを使用して、実行された。腫瘍体積が $\sim 50 \text{ mm}^3$ に到達した時に、全てのマウスについて処置を開始した。その後、各群における腫瘍体積を、62日までの間、週に3回測定した（図6のA）。未処置のC 5 7 B L/6、又はL O F Uで処置されたマウスのみが、急速な原発腫瘍増殖を経験し続け、処置の10日以内に $\geq 300 \text{ mm}^3$ の体積に到達し、その時点で、膝下の切断（B K A）を行った（図6のA）。対照的に、少分割I G R T又はL O F U+I G R Tの群内のマウスは、処置後3週間までにわたり著しい成長の遅れを経験し、その後、I G R Tのみで処置されたマウスは原発腫瘍の再成長を示し始め、およそ5週間で $> 300 \text{ mm}^3$ の体積に到達した。著しいことに、L O F U+I G R T群におけるマウスは持続した応答を有しており、処置後6週間以上にわたり腫瘍増殖は制限されていた。L O F U+I G R T又はI G R Tを受ける群における腫瘍体積の減少は、未処置又はL O F Uのみの群と比較して、25日目まで統計的に有意であった（ $P < 0.05$ ）。更に、L O F U+I G R Tの群における腫瘍体積の減少は、I G R Tのみと比較して、35日目まで統計的に有意であり、実験期間にわたって統計的に有意なままであった（ $P < 0.05$ ）（図6のA）。加えて、L O F U+I G R Tの群におけるマウスは、ベースライン測定値からの腫瘍の退行を実証し、完全な腫瘍の無い応答を、5匹のマウスのうち4匹で確認した。

30

40

【0150】

50

L O F Uの免疫修飾効果を確証するために、同様の実験を、免疫無防備状態のB A L B / cヌードモデルを使用して行った。これらのマウスにおいて、B 1 6 - M 1腫瘍は非常に急速に成長し、C 5 7 B L / 6マウスよりもおよそ1週間早く $\geq 300\text{ mm}^3$ に到達する。全体的な処置応答は同様であり、未処置及びL O F Uのみは結果として著しい原発性腫瘍制御をもたらさない一方で、I G R TとL O F U + I G R Tは原発腫瘍増殖を遅らせた(図6のB)。しかし、I G R TとL O F U + I G R T処置の両方において、原発性の対照は短命であった。実際、B K Aは、処置の開始後2週間でI G R T群に、及び3週間未満でL O F U + I G R Tの群に必要とされた。加えて、免疫無防備状態のマウスにおけるL O F U + I G R Tは、I G R Tのみと比較すると、統計的に有意な原発性腫瘍の制御を結果としてもたらすことはできなかった(図6のB)。

10

【0151】

L O F U、次いで少分割I G R Tの結果、再発の無い生存の延長、及び肺転移の減少をもたらされる：データに基づき、L O F Uで誘発された、増強された抗腫瘍T細胞応答は、治療的なI G R Tを増大させる場合があり、局所疾患だけでなく微視的病変及び遠隔転移のより優れた制御を達成する。B 1 6 - F 1 0は、処置されない場合に許容できないサイズへと急速に成長する活動的な細胞株であるため、 $> 300\text{ mm}^3$ の原発腫瘍を持つマウスは、B K Aを必要とした。注目すべきことに、B K Aが行われる時間まで、原発腫瘍由来の細胞は既に、流出する膝窩のL Nへと広がっていた(データは示されず)。その後数週間以内に、流出する膝窩のL Nは急速に成長し、眼に見えて大きくなった一方で、より遠位の鼠蹊部のL Nは明らかに触知可能となった。腫瘍がこの点に到達すると、不快感を緩和するために実行され得る手順は無く、これらのマウスを屠殺した。結果的に、全生存は、大量の腫瘍量を持つマウスにおいて十分に査定することができない。それ故、2つの他のパラメーターを評価することが決定された：過度の局所再発の腫瘍負荷を持つ、自然死した又は屠殺した動物が正の事象として記録された、再発の無い生存；及び肺転移の進行。

20

【0152】

L O F U + I G R Tの組み合わせは、C 5 7 B L / 6マウスにおける何れかの処置のみにわたって、統計的に有意な($P = 0.04$)再発の無い生存優位性をもたらした(図6のC)。著しくは、C 5 7 B L / 6 L O F U + I G R T以外の全ての群において、流出する膝窩又は鼠蹊部のL Nへの局所転移は頻繁に、屠殺の使用を必要とした。更に、L O F U + I G R Tで処置されたマウスは、肺転移の厳密な制御を示したが、他の3つの群において、比較的小さな局所再発を伴う動物までもが、圧倒的な肺転移により最終的に死亡した(図6のD)。

30

【0153】

<考察>

適応免疫系は、悪性に変形した細胞を絶えず調査する(surveys)。これは、抗腫瘍免疫応答を開始するために適切なT細胞レパートリーを刺激する、腫瘍関連抗原の認識により主に達成される。しかし、腫瘍はまた、適応免疫系を回避し、且つ抗腫瘍T細胞応答を妨害するための多様な機構を利用する(1)。その結果、癌に対する優れた治療は、腫瘍に誘発された耐性の主な障害を克服しなければならない(36)。様々な機構が、異なるT細胞の亜型において腫瘍がどのようにして耐性を誘発するのかを説明するために記載されており、腫瘍抗原の不完全な提示及び抗原提示細胞の不適切な活性化、共阻害受容体によるシグナル伝達、腫瘍内微小環境内に放出された因子による免疫抑制、及び抑制細胞の局所動員を含む(9、15-17、20、37-39)。癌細胞の免疫原性細胞死(ICD)を促進する処置は、耐性を軽減し、且つその逆転を駆り立てることができる。ICDの特徴は、損傷に関連する分子パターン(DAMP)の放出、細胞表面への特定のシャペロン複合体の転位、及び腫瘍関連抗原の樹状細胞を媒介とする交差提示の増大を含む(40)。この研究において、非切除的L O F Uを使用する黒色腫の新たな処置が、腫瘍により誘発される耐性の予防、逆転、又は緩和、並びにそれ故抗腫瘍免疫応答の増強を結果としてもたらすかどうかを調べるのが、求められた。

40

50

【0154】

熱切除的HIFUは、原発腫瘍を制御することが可能な一方で、周囲又は遠くの組織における微小転移侵襲において典型的に有効ではなく、このことは、このFUSモダリティにより引き起こされた細胞死が、適応抗腫瘍免疫応答を十分に刺激しないことを示唆している。実際、局所又は遠位の微小転移侵襲は、最初の切除処置を回避する細胞の比較的小さな腫瘍負荷を排除することが可能な、十分に刺激された免疫系により予防又は改善され得る。この研究において、B16マウス黒色腫モデルを使用して、非切除的LOFU処置の使用が、腫瘍内微小環境の寛容化効果の克服によりT細胞エフェクター応答を増強し、且つ、切除処置前に施された時に、局所再発と遠位の転移を予防することを示す。

【0155】

腫瘍抗原に対して低応答性のT細胞の発達は、様々なマウス腫瘍モデル及びヒト癌の中のT細胞において記載されている(15、18、41)。この研究室は、腫瘍抗原特異性CD4+T細胞が、腫瘍を持つマウスにおいてアネルギーとなり、且つ、エフェクターサイトカインを増殖及び生成する能力を妨げると示された一連のアネルギー関連遺伝子を発現することを、以前に報告した(21、42)。更に、アネルギーを誘発する遺伝子の発現に起因する2つの転写因子である(43-45)、NFAT1又はEgr2を欠くマウスにおけるそれら遺伝子の発現の予防は、腫瘍抗原特異性T細胞の低応答性の阻害、及び局所腫瘍増殖の制御の改善へと繋がる(19、21)。2つの異なるB16マウス黒色腫モデルを使用して、データは、腫瘍DLNにおける内在する腫瘍抗原特異性CD4+T細胞が、Grail、Itch、Cblb、Grb4、及びEgr2を含むアネルギー関連遺伝子の発現をアップレギュレートすることを確認した。遺伝子発現のこのプログラムの活性化は、エキソピボでの再刺激後にサイトカインを生成する能力の減少と十分に関連しており、このことは、B16黒色腫が、腫瘍抗原特異性CD4+T細胞の低応答性の固有状態を誘発することを支持している。重要なことに、LOFUによる原発腫瘍の処置は、再刺激後にサイトカインを生成するという、それら腫瘍抗原特異性CD4+T細胞の能力の増大を結果としてもたらした。TCR結合(engagement)に対して反応的なUSにより誘発された回復は、その他アネルギー細胞において、大半のアネルギーを誘発する遺伝子の発現の、異なる程度までの減少を伴った。しかし、腫瘍を持つマウスにおけるDLNの内在するCD4+T細胞中のFoxp3転写物の、FUSにより誘発される変化が無いことは、FUSがFoxp3+Tregの移動又は分化に影響を及ぼさず、且つ、LOFUがT細胞アネルギーの阻害により腫瘍により誘発される耐性を妨げたことを、示唆している。

【0156】

腫瘍により誘発されたT細胞アネルギーに対する初期検査は、このプロセスにおいて抗原提示細胞が果たす重要な役割を識別し、不完全な樹状細胞の成熟は、腫瘍抗原特異性T細胞の非能率的な刺激の主な決定要因として定められた(20、46)。近年、T細胞と腫瘍抗原を提示する樹状細胞との間に形成される不安定な免疫学的シナプスが、NFATの核輸出の遅延、及び、Egr2を含む遺伝子発現の寛容原性NFAT依存性プログラムの起こり得る活性化を結果としてもたらすことが、示されてきた(47)。B16黒色腫のLOFU処置に続く、T細胞活性化の増大は、様々な異なる現象から潜在的に結果として生じる場合もある。最初に、LOFUでの腫瘍の処置は、腫瘍細胞に対する、熱的及び機械的両方のストレスを伝える。このストレスは、新たな固有の「非自己」腫瘍抗原の生成を支援することができ、これは次に、腫瘍をより免疫原性のものとし、且つ耐性をあまり誘発できないようにする場合がある。代替的に又は付加的に、腫瘍細胞による、ストレスによって誘発された危険信号の放出は、標的とする樹状細胞がT細胞における耐性の誘発にあまり貢献しないことが分かる腫瘍内微小環境を生成することができる。熱ショックタンパク質及びカルレチキュリンを含む、ストレス関連分子シャペロンは、樹状細胞の成熟、及び抗腫瘍免疫の増強に関係した(32、48-51)。原発腫瘍溶解物は、樹状細胞において成熟信号を引き起こすことが可能な熱ショックタンパク質において豊富であるという証拠が存在する(52)。重要なことに、熱ショックタンパク質はまた、腫瘍細胞

10

20

30

40

50

胞から樹状細胞まで抗原ペプチドに結合し且つそれを送達することが可能であり、更に、腫瘍細胞の原形質膜中のそれらの存在は、免疫応答の増大に関連した（53－55）。カルレティキュリンも、抗腫瘍応答において重要な役割を果たすと説明されており、その腫瘍細胞の表面への転位は、樹状細胞及び免疫活性化による細胞の食作用の増大に関連していた（56、57）。マウス腺癌モデルにおいてH I F Uを使用する以前の研究は、この処置、著しく、樹状細胞上での共刺激分子の発現を著しく増大させて、更により高レベルのI L－1 2を生成し且つその結果C T L活性を増大させたことを示した（58、59）。データは、L O F UがB 1 6細胞中のカルレティキュリンの再分布、及び誘発可能な熱ショックタンパク質H s p 7 0の発現の増大を誘発することを示しており、このことは、L O F Uにより媒介される細胞ストレスが、そのようなストレスにより誘発されたタンパク質の発現の変化を誘発することができることを示唆している。M H C－I I又はB 7タンパク質の発現の有意差は検出されなかったが、L O F Uが、腫瘍抗原の効果的な提示の増強に寄与し得る樹状細胞機能における他の変化も誘発し得ることを、無視することはできない。いかなる場合も、データは、L O F Uにより課された熱的／機械的ストレスがおそらく、腫瘍免疫原性の増強、及びアネルギー上のT細胞活性化の促進に起因することを支持している。

【0157】

腫瘍抗原により誘発されたT細胞寛容は、癌の処置における主な障害のままである。腫瘍特異性T細胞における耐性の有効な逆転は、臨床的抗腫瘍戦略における重要な目標である。データは、L O F Uで処置した黒色腫瘍から調製した溶解物によりT細胞中の予め確立されたアネルギーを逆転することができることを見出している。この観察は、腫瘍のL O F U処置が、T細胞中の予め確立された腫瘍耐性を妨げるだけでなく逆転する腫瘍細胞から新たな免疫原性分子を放つことができる可能性を広げている。I L－2受容体によるシグナル伝達は長く、T細胞におけるクローンアネルギーを妨げ且つ逆転すると知られている（60－62）。しかし、I L－2の量の上昇は、未処置又はL O F Uで処置した溶解物の何れかにおいて検出することができず（データは示されず）、これにより、I L－2の存在を、この実験においてアネルギーの逆転を引き起こした候補とはさせにくくする。しかし、他の要因がこの表現型に寄与し得ることが起こり得る。実際、T N F RファミリーメンバーO X－4 0リガンドによるT細胞の共刺激はまた、C D 4＋及びC D 8＋両方のT細胞のエフェクター応答の増大に加えて、T細胞アネルギーを予防且つ克服すると示された（63－65）。C D 1 3 7、C D 4 0の結合、及びP D 1の遮断も、インビボで予め定着されたC D 8＋T細胞寛容を予防且つ逆転すると報告された（66－68）。

【0158】

少分割I G R Tを使用する切除治療を行う前のL O F Uによる黒色腫瘍の前処置の結果、腫瘍増殖の著しい遅延がもたらされ、及び、様々な場合において、腫瘍の完全回帰を免疫適格性のマウスにのみ観察した。これらのマウスの再発の無い生存も、そのプロトコル後に著しく改善した。加えて、肺転移の発生率は、切除的I G R Tのみを受けたマウスと比較して、腫瘍切除前にL O F Uを受けたマウスにおいて最小であった。著しいことに、L O F Uは、同様の実験がT細胞の不足したヌードマウスで実行された時に、同様の保護をもたらさなかった。この観察は、L O F Uの保護効果が、原発腫瘍を制御するように制限されるだけでなく、局所又は遠位の何れかでの転移巣の確立を妨げることができることを示している。このような転移からの保護は恐らく、腫瘍抗原に対するT細胞寛容の予防／逆転、或いはその両方の結果として生じ得る。L O F Uの前処理は、より効果的に腫瘍増殖を制御しただけでなく、前に示すように、転移からの保護をもたらし且つより長い再発の無い生存を確保した、強力な免疫原性のI G R Tで誘発された腫瘍死の生成をおそらくもたらした。

【0159】

内因性の腫瘍抗原に対するT細胞寛容の予防は、癌を処置する際に最高に重要なものである。本明細書中の研究は、L O F Uでの原発腫瘍の処置がそれを達成することができる

ことを示しており、それをインサイツの自己腫瘍ワクチンの開発のための候補治療とする。固形腫瘍のFUS処置は、切除方法と組み合わせて、転移の予防と同様に原発腫瘍撲滅の効果を強化することを証明することが可能である。

【0160】

方法と材料

【0161】

マウス：6－8週齢のC57BL/6、B6.Cg-Rag1tm1MomTyrp1B-wTg(Tcratcrb)9Rest/J(Tyrp1)及びB6.Cg-Tg(Tcratcrb)425Cbn/J(OT-11)のマウス菌株を、The Jackson Laboratoryから購入した。BALBc/ヌードマウスを、Charles Riverを経由して、National Cancer Instituteから得た。チャールズ川を通して分布したので、米国国立癌研究所から得られた。マウスを全て収容し、病原体の無い設備で維持した。

10

【0162】

B16細胞株と原発性CD4+T細胞の培養：B16-F1とB16-F10の黒色腫細胞株を、American Type Culture Collection(ATCC)から購入した。B16-F10(B16-M1)の高度に活動的なサブクローンを、確立された原発腫瘍の外科切除の6週間後にC57BL/6マウスにおいて生じた転移性クローンを分離且つ拡張することにより、生成した。B16-OVA黒色腫細胞株は、親切にもE. M. Lord(University of Rochester Medical Center, Rochester, NY)から提供された。B16-OVA細胞によるOVAの発現を、リアルタイムPCRにより確認した。全ての黒色腫細胞を、10%の熱不活性化FBS、2mMのL-グルタミン、及び250IUのペニシリン/ストレプトマイシンで補われたDMEM(Thermo Scientific)において培養した。

20

【0163】

CD4+T細胞を、製造業者のプロトコルに従って抗CD4を結合した磁気のDynabeads(Life Technologies)を使用して分離した。ここで示されるように、CD4+T細胞は、マウスIL-12(10ng/mL)(eBioscience)、抗マウスIL-4抗体(クローン11C.11;10µg/mL)、及び10U/mLの組換え型ヒトIL-2(Biological Resources Branch of the National Cancer Institute)の存在下で、プレート結合抗CD3ε(クローン2C11;

30

【0164】

【数1】

0.25 [g/ML

)及び抗CD28(クローン37.51;

【0165】

【数2】

40

0.25 [g/mL

)抗体(BD Biosciences)での活性化によりTH1ヘルパー細胞へと分化され、及び、10%の熱不活性化FBS、2mMのL-グルタミン、

【0166】

【数3】

50 [M

の2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸、及び必須ビタミン(Cambrex)で補われたDMEMにおいて6日間培養された。

50

【0167】

腫瘍モデル：ハンクス緩衝塩類溶液（Invitrogen）中で懸濁した 3×10^5 B16-F1 黒色腫細胞を、マウスの腰椎の側腹部に皮下注射した。右後肢の背部に 2×10^5 B16-M1 細胞を注入することにより、足蹠に黒色腫瘍を誘発させた。

【0168】

腫瘍増殖のモニタリング：原発性B16-M1 黒色腫の背側の後肢にある腫瘍を、ノギスを用いて週に3回測定した。楕円体の式を使用して腫瘍体積を計算した： $V = (\pi/6 \times \text{長さ} \times \text{幅} \times \text{高さ})$ 。原発性の背側の後肢にある腫瘍は、 $30-50 \text{ mm}^3$ のI期体積、 $90-150 \text{ mm}^3$ のII期体積、及び $300-500 \text{ mm}^3$ のIII期体積を有する、ゴルペンツ成長を示す。それ故、処置効果を、 $90-150 \text{ mm}^3$ までの腫瘍増殖遅延（TGD）を判定することにより判定し、そこでは腫瘍は対数期IIである。 $300-500 \text{ mm}^3$ に到達する腫瘍は、解剖及び血管の制限により位相IIIに入り始める。結果的に、膝下の切断を、IACUCに承認されたプロトコルに従い、 $>300-500 \text{ mm}^3$ の腫瘍を持つマウスに行った。

【0169】

ELISA：1. $5 \sim 2.5 \times 10^4$ のT細胞を、静止したままにするか、或いは、抗CD3 Σ +抗CD28抗体、1：5のT細胞：脾細胞の比率でT細胞が枯渇したOVAペプチド323-339（OVA323-339）を与えられた脾細胞、又は1：3の樹状細胞：T細胞の比率でOVA323-339又は黒色腫瘍溶解物を与えたCD11c+精製樹状細胞（CD11c-ビーズを使用する；Miltenyi Biotech）の何れかで刺激した。培養上清を典型的に、刺激の24時間後に採取し、IL-2又はIFNのレベルをサンドイッチELISA（BD Biosciences）により測定した。

【0170】

腫瘍溶解物：腫瘍を持つマウスから腫瘍を切除し、1-2 mmの片に切断し、

【0171】

【数4】

40 μm

のナイロンメッシュに通した。細胞をPBS中で洗浄し、血清を含まないDMEMの中で再懸濁した。その後、細胞懸濁液を液体窒素中で急速凍結し、顕微鏡検査による完全な溶解の5回の目視確認のために 37°C で溶解した。溶解物を 4°C で15分間、10,000 gで回転し、細胞破片を持つペレットを廃棄した。精製樹状細胞と共に上清を使用して、T細胞を刺激した。

【0172】

免疫蛍光染色腫瘍組織を分離し、PBS中で洗浄し、OCT化合物（Electron Microscopy Sciences）に包埋した。組織切片（ $5 \mu\text{m}$ ）を調製し、5分間アセトンで透過され、30分間ヤギ血清でインキュベートして、非特異性タンパク質間相互作用を遮断した。組織切片を、以下の抗体で一晩インキュベートした：抗カルレティキュリン（Pierce, PA5-25922）、抗Trp1（Abeam, ab3312；クローンTA99）、及び抗Hsp70（Novus Biologicals, NBP1-77455）。適切な二次抗体を室温で30分間使用した。DAPI（Invitrogen）を使用して核を検出した。少なくとも10のフィールド/サンプルを、Inverted Olympus 1X81 蛍光顕微鏡で盲検的に分析した。

【0173】

焦点式超音波治療法システム。治療及び撮像プローブのシステム（TIPS, Philips Research North America, Briarcliff Manor, NY, USA）を、全ての超音波照射に利用した。このシステムは、焦点式且つ時空的に制御した超音波エネルギーを伝えることができ、且つ、治療制御作業端末、RF発生器及び制御電子回路、8つの要素球形シェル環状アレイ超音波トランスデューサー

(80 mmの曲率半径、80 mmの開口部)、同様に、面内のトランスデューサーの動作及び超音波ビーム軸に対し垂直な正確な位置決めを可能にする移動ステージから成る。焦点式超音波ビームも、焦点の電子偏向を使用して面外のおよそ±15 mmで操作され得る。超音波ビームは、薄い(25 µm)円形のプラスチック膜を介して標的へと垂直に広がり、音響結合が脱気水によりもたらされる。治療中、システムは、音響出力パワー、超音波照射期間、デューティーサイクル、及び超音波振動数の調整を可能にする。

【0174】

インビボでの焦点式超音波(FUS)療法。純酸素中の1.5%のイソフルランの1.5リットル/分の連続流でマウスに麻酔をかけた。適切な音響結合を確かなものとするために、腫瘍を抱えている脚または腰椎の側腹部を慎重に剪毛した。動物が治療のために位置付けられると、腫瘍を脱気水および超音波ゲルを使用してTIPSシステムに音響的に(acoustically)結合した。その後、腫瘍の中央部を、トランスデューサーから80 mmの焦点距離に置いた。超音波照射を、全腫瘍体積にわたって伸長する1 mmのグリッドパターンを使用して、腫瘍に送達した。(5 mm間隔で置かれた)グリッド点の二層を各腫瘍に設け、結果として1腫瘍当たりおよそ160の離散性病巣および5分の暴露期間につながった。超音波トランスデューサーを1.0 MHzで操作し、結果として、楕円軸に沿って測定されるように、直径およそ1.5 mmおよび長さ12 mm(−6 dBの圧力)の楕円焦点がもたらされた。超音波照射を、全腫瘍体積にわたって伸長する1 mmのグリッドパターンを使用して、腫瘍に送達した。治療前に、腫瘍体積を、特定の処置に対するグリッドサイズを計算するために測定した。各グリッド点での超音波照射の持続時間は、1.5秒であり、その後、トランスデューサーは次のグリッド点上に自動的に位置付けられ、全腫瘍体積が覆われるまで手順を繰り返した。グリッド点の二層を各腫瘍に設けた。治療用超音波装置を、具体的な音響パワー/圧力計画：音響パワー3 W、ピーク負圧=2.93 MPa(80 mmの焦点距離)/3.81 MPa(85 mmの焦点距離)で、連続波モードにおいて操作して、非切除型の低エネルギーFUS(LOFU)をもたらした。焦点で結果として生じるインサイツでの密度(Ispta)を、組織中の4 mmの深さで550 W/cm²となると推測した。腫瘍への総エネルギー付与はおよそ900 Jであった。

【0175】

インビボでの少分割コーンビームCT画像誘導放射線治療(IGRT)：341秒で10 Gyの線量を標的腫瘍に送達するために、Xstrahl Limited's Small Animal Radiation Research Platform(SARRP)を使用して、放射線をすべて送達した。麻酔をかけられた動物を、電動プラットフォームに付けられたステージ上に置き、腫瘍を抱えている右後肢を、1.5 cmの接着プラットフォームまで伸ばし、上げて、固定して、外部からの組織暴露を最小限にした。固定されると、コーンビームCT(CBCT)を実行し、データを、組織分節(tissue segmentation)および治療計画のために3Dスライサーで開いた。30 Gyの総少分割用量に対して、3日間連続で10 Gyずつ送達した。併用療法のグループにおいて、LOFUをCBCTの2-4時間前に実行した。

【0176】

肺転移の評価：肺が、自発的に死亡した動物から分離されたか、安楽死させられたか、または8週間の実験の終わりに屠殺された。1 mLのFeketeの溶液(エタノール、氷酢酸およびホルムアルデヒドベースの漂白定着液)を肺に注入して吹き込んだ。その後、気管をクランプし、肺および心臓全体を一括して取り除き、PBSで洗浄した。その後、肺をFeketeの溶液に入れ、分析前に48時間漂白した。左肺と、右肺の4葉を分離し、解剖顕微鏡の助けによって小結節をカウントした。不明瞭な又は融合した小結節は確実に数えあげることができない；それ故、肺を、数が多すぎて考慮に入れることができないものとして標識付けし、250の恣意的な転移数を割り当てた。ノンパラメトリックなクラスカル・ウォリス検定を使用して、統計分析を行い、続いて多重比較のためのダンのポスト検定(Dunn's posttest)を行った。

【0177】

無再発生存：以下の事象を、我々の無再発生存分析において正の事象としてスコア化した：腫瘍病変の検死確認による自発的な死亡、排出する膝窩または鼠径のリンパ節への広範囲な局所転移による安楽死、または広範囲な全身腫瘍量を示す瀕死状態による安楽死。以下の非腫瘍依存性の死亡を、打ち切りデータとして処理した：切断の24-48時間以内の死亡または8週間の実験の終わりでのあらゆる動物の屠殺。対照の又は処置した動物の選択的屠殺を防ぐために、動物研究所の獣医が処置および対照群から盲検化される（blinded）ように、英数字コードを使用してケージを標識付けした。マンテル・コックス検定を使用して、無再発生存を分析し、統計的有意差を $P < 0.05$ として定義した。

10

【0178】

リアルタイムPCR：RNeasy Microキット（Qiagen）を使用して、細胞から総RNAを抽出し、qScript cDNA supermix（Quanta Biosciences）を使用して、cDNAを合成した。cDNAサンプルを、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems）上でレポーター色素としてPower SYBR（Applied Biosystems）を使用して、リアルタイムPCRにさらした。試験した転写物の発現を、ベータアクチンに正規化した。使用されるプライマーセットは以下である：

actinb：F-GTGACGTTGACATCCGTAAAGA（SEQ ID NO：1）、R-GCCGGACTCATCGTACTCC（SEQ ID NO：2）；

20

Cblb：F-GCAGCATCATTTGACCCCTTTCA（SEQ ID NO：3）、R-ATGTGACTGGTGAGTTCTTGCC（SEQ ID NO：4）；

Gra1：F-ATGCAAGAGCTCAAAGCAGGAAGC（SEQ ID NO：5）、R-GTGCGCAGCTGAAGCTTTTCCAATA（SEQ ID NO：6）；

Ikaros：F-GCTGGCTCTCTCGGAGGAG（SEQ ID NO：7）、R-CGCACCTTGTACACCTTTCAGC（SEQ ID NO：8）；

Caspase3：F-ACGCGGCACAAGCTAGAAATTT（SEQ ID NO：9）、R-CTTTTGCGTGGAAAGTGGAGT（SEQ ID NO：10）；

Egr2：F-TCAGTGTTTATGCAACCAGC（SEQ ID NO：11）、R-GAAGCTACTCGGATACGGGAG（SEQ ID NO：12）；

30

Grg4：F-TCACTCAAAGTTTGCCTCACTG（SEQ ID NO：13）、R-CACAGCTAAGCACCGATGAG（SEQ ID NO：14）；

Itch：F-GTGTTGGAGTCAACCAGACCT（SEQ ID NO：15）、R-GCTTCTACTTTGCAGCCCATC（SEQ ID NO：16）；

Foxp3：F-GGCCCTTCTCCAGGACAGA（SEQ ID NO：17）；

R-GCTGATCATGGCTGGGTTGT（SEQ ID NO：18）。

【0179】

フローサイトメトリー：免疫染色前に、細胞をFcブロック（CD16/CD32）抗体であらかじめブロックした。以下の蛍光色素抱合抗体を使用した：抗B7.1、B7.2、CD11c、MHC-II、CD45の抗体の他に、それらそれぞれのアイソタイプ対照抗体（eBiosciences）；抗Hsp70（Novus Biologicals）および抗TRP1（Abcam）。UV LIVE/DEAD（登録商標）Fixable Dead Cell Stainキット（Invitrogen）を使用することによって、死細胞を検出した。免疫染色した細胞を、LSR-II Flow Cytometer（Becton Dickinson）上で分析し、FlowJoソフトウェアを使用して取得後の分析を行った。

40

【0180】

実施例2

50

低酸素腫瘍微小環境は、酸化小胞体（ER）ストレスをもたらし、結果として、タンパク質のミスフォールディングおよび小胞体ストレス応答（UPR）につながる。UPRは、UPRの延長された活性化が細胞死を誘発するが、タンパク質のミスフォールディングを補正し、癌細胞の生存および殺腫瘍性の治療に対する耐性を改善する、熱ショックタンパク質90（HSP90）を含む幾つかの分子シャペロンを誘発する。HSP90阻害剤、17AAGは、前立腺癌（PC）を含む、様々な固形腫瘍に対する見込みを示した。しかしながら、17AAGの治療量は全身毒性を引き出す。本明細書には、新しいパラダイムが開示され、ここで非切除性および非侵襲性の低エネルギー焦点式超音波（LOFU）と無毒な低用量の17AAGとの併用療法が、マウスおよびヒトのPC異種移植片中の合成致死および有意な殺腫瘍効果を引き起こす。LOFUは、細胞死を誘発することなく、腫瘍細胞においてERストレスおよびUPRを誘発する。無毒な用量の17AAGによる処置はさらに、LOFU処置したPCにおいてERストレスを増加させ、腫瘍においてUPRを細胞保護的な応答からアポトーシス応答に切り替え、結果として、アポトーシスおよび腫瘍増殖遅滞の有意な誘発をもたらした。LOFU誘発性のERストレスは、超音波処置した腫瘍を17AAGなどの化学療法剤に対してより感受性にする。LOFU誘発性の化学増感は、腫瘍、例えば、局所に進行した及び再発性の腫瘍に対して使用することができる新しい治療である。

【0181】

LOFUおよび17AAG治療の処置計画および毒性：各グリッド位置に対して、100%のデューティーサイクル、3Wの音響パワーで、および1MHzの超音波周波数を使用して、LOFUを1.5秒間施した。このプロトコルは、 270 W/cm^2 のおよそのインサイツでの空間ピークの時間平均音響密度をもたらし、結果として 3.2°C の予測された平均の腫瘍内の温度上昇につながった。処置後、脱毛、熱的損傷、または皮膚創傷などの、正常組織毒性の徴候はなかった。マウスにおける前臨床の薬物動態試験は、17AAGが広く分布し、広範囲な肝代謝を受けることを示した。17AAGの全身投与は、有意な肝毒性に関連することが知られており、これは、トランスアミナーゼおよび胆汁酸の増加、および胆嚢、総胆管、および胃腸管における薬物関連の組織病理学的病変を特徴とする。それ故、我々の治療に対しては無毒であった17AAGの用量を判定した。C57Bl/6マウスを、1週当たり3回、17AAG（ $25-75\text{ mg/kg}$ 体重）の腹腔内注射で処置した。対照マウスに等量のビヒクルDMSOを注入し、これを17AAGを可溶性にするために使用した。より高用量の17AAG（体重の $50-75\text{ mg/kg}$ ）処置は、未処置の対照と比較して、有意な腫瘍増殖遅滞を達成した（それぞれ、未処置の腫瘍、 $1879 \pm 98.65\text{ mm}^3$ 対17AAG 75 mg/kg 体重（b. w.）、 $485 \pm 24.25\text{ mm}^3$ 、 $p < 0.003$ および 50 mg/kg b. w.、 964 mm^3 および $p < 0.007$ ）が、カプラン・マイヤー法は、体重の 75 mg/kg の用量での21日間の処置後にマウスの50%における死亡を示した。

【0182】

無毒であると分かった17AAGの低用量は、C57Bl/6マウスにおいて 25 mg/kg およびBalb/cヌードマウスにおいて 14 mg/kg であった。したがって、これらの用量レベルを現在の試験のために選択した。その目的は、治療量以下であるにもかかわらず、無毒である、2つの治療を組み合わせること、およびその組み合わせが治療的であり得るかどうかを検査することであった。LOFU+17AAGの併用治療はERストレスを増幅させる：ERにおける誤って折り畳まれたタンパク質の蓄積は、タンパク質のミスフォールディングの補正を助けるシャペロンタンパク質の誘導でストレス応答を誘発する。ERストレスのレベルを検出するために、ERシャペロン、ERp44、ERp57、およびERp72の発現レベルを、異なる処置群間で定量化した。ERp44は、酸化タンパク質フォールディングの原因である[69]。ERp57はER常在性ジスルフィドオキシドレダクターゼであり[70]、一方でErp72はジスルフィドイソメラーゼである。これらのすべてのタンパク質は、ERのタンパク質フォールディングの機構に関与する。処置を受けなかった又はLOFUまたは17AAG単独を受けた動物か

らの腫瘍組織と比較して、イムノブロット解析は、L O F U + 1 7 A A G との併用療法後に腫瘍組織における E R p 7 8 ($p < 0.03$ 、図7のDおよび7E)、E R p 4 4 ($p < 0.05$ 、図7のDおよびG)、および E R p 5 7 ($p < 0.04$ 、図7のDおよびF)のタンパク質レベルの発現の有意な増加を実証した。これは、H S P 9 0 の 1 7 A A G 媒介性の障害が、E R において折り畳まれていないタンパク質負荷を増大し、それによって、E R ストレスを延長させ得ることを示唆している。

【0183】

L O F U + 1 7 A A G は、U P R のアポトーシス促進性の経路を活性化し、マウスおよびヒトの前立腺癌組織中のアポトーシスを誘発する：E R ストレスは、U P R の3つの群 (a r m s) を同時に活性化し、それによって、拮抗性の細胞保護的な及びアポトーシスのシグナルを同時に生成する。細胞の運命は、E R ストレスを低下させて、それによって、U P R を減弱する、そのタンパク質補正機構の能力に左右される。E R ストレスが持続する場合、細胞保護的な経路は、最終的に、細胞死を引き起こす P E R K 媒介性のアポトーシス経路の慢性の活性化で圧倒される (o v e r w h e l m e d)。T h r 9 8 0 での P E R K のリン酸化が、その活性化状態に対するマーカーとして働くため、1 7 A A G による処置後に腫瘍組織における p P E R K レベルの有意な増加を示したイムノブロット解析を実行した (図8のA)。リン酸化された P E R K レベルは、未処置の腫瘍および L O F U 処置した腫瘍中に存在しなかった。しかしながら、L O F U + 1 7 A A G の併用療法は、P E R K リン酸化の最も高いレベルを示した (図8のA)。

【0184】

延長された P E R K 活性化が、セリン51で翻訳開始因子 e I F 2 α のリン酸化を介する E R ストレスに応じてタンパク質合成を減弱するため、リン酸化された e I F 2 α のレベルを判定した。1 7 A A G による R M 1 腫瘍の処置は、未処置の対照における基礎レベルを超える e I F 2 α のリン酸化を誘発した。L O F U 処置は、結果として、リン酸化された e I F 2 α レベルのわずかな低下をもたらした。しかしながら、リン酸化された e I F 2 α の最も高いレベルが、L O F U + 1 7 A A G による併用療法を受けた腫瘍において見られ (図8のB)、これは、他の基と比較した、これらの腫瘍における P E R K リン酸化の最も高い活性化で確証している。

【0185】

リン酸化された e I F 2 α は、生存促進および抗アポトーシスのタンパク質を含む、ほとんどの細胞タンパク質の翻訳を減少させるが、C C A A T / エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質 (C H O P) などの、アポトーシス促進遺伝子の転写を誘発する原因である転写因子、A T F 4 の翻訳を増加させ、それによって、誤って折り畳まれたタンパク質が修復されず E R ストレスが持続する場合にプログラム細胞死に対して細胞を調製する [71]。予測通り、L O F U 処置は、未処置の対照にわたって C H O P レベル (1.6 ± 0.7 倍) を誘発することに失敗した。対照的に、1 7 A A G 単独による処置は、 14.8 ± 2 倍まで C H O P 転写レベルを誘発し、これはさらに、未処置の対照と比較して、L O F U + 1 7 A A G の併用療法の群において 25 ± 1.3 倍まで ($p < 0.006$) 増加した (図8のC)。

【0186】

下流のアポトーシス遺伝子が L O F U + 1 7 A A G の併用療法による C H O P 誘発後に発現されたかどうかを検査するために、マウスの U P R q R T - P C R A r r a y を、様々な処置群の腫瘍組織から単離された総 R N A 上で使用した。H e a t m a p 解析は、B a x、V c p、P d i a 3、A r m e t、D d i t 3、M a p k 8、M a p k 9、および M a p k 1 0 などの、アポトーシス促進性の標的遺伝子が、未処置の対照と比較して、L O F U + 1 7 A A G による併用療法後に数倍誘発されたことを実証した (図8のD)。L O F U 単独または 1 7 A A G 単独による処置でアポトーシス促進性の遺伝子の最小の誘発が生じた。この結果は、L O F U + 1 7 A A G の併用療法が、P E R K を活性化し、C H O P を誘発し、および U P R のアポトーシス促進性の経路上で切り替わることを示す。実際には、T U N E L 染色は、L O F U が未処置の対照にわたって最小のアポトーシスを

誘発することを実証した。17AAGによる処置は、前立腺腫瘍において有意なアポトーシスを誘発し、これは、LOFUによってさらに増加された ($p < 0.004$) (図8のE)。したがって、HSP90の17AAG媒介性の阻害およびLOFU+17AAGの併用によるCHOPの活性化は、前立腺腫瘍のアポトーシス細胞死上で切り替わった。LOFU+17AAGは、腫瘍細胞においてシャペロン介在性オートファジー (CMA) を阻害する。

【0187】

誤って折り畳まれたタンパク質の分解は、プロテオソーム経路およびオートファジーによって媒介される。オートファジーは、文脈依存的な役割において腫瘍形成プロセスに関係しており、ここで、それは、アミノ酸および他の必須栄養素を栄養不足である低酸素の腫瘍の代謝経路に提供するかもしれない [72]。実際には、CMA活性の増加は、種々様々なヒト腫瘍において見られ、CMAは腫瘍細胞の生存、増殖、および転移に関係している [73]。それ故、オートファジーに関与する2つの重要なタンパク質、即ち、マクロオートファジーのマーカーであるベクリン、および様々な処置コホートの腫瘍組織におけるCMAのマーカーであるLAMP-2 Aリソソーム受容体のレベルを定量化した。図10に示されるように、ベクリンのレベルは、LOFUまたは17AAG、あるいは併用療法では変化しないままであり (図9のAおよびC)、これは、マクロオートファジーが超音波療法で変更されなかったことを示している。しかしながら、LOFU単独または17AAG単独は、LAMP-2 Aの発現を誘発し (図9のAおよびB)、これは、ERにおいて誤って折り畳まれたタンパク質の負荷を増加させる治療後のCMAの代償的増加を示している。興味深いことに、LOFU+17AAGの組み合わせは、これらの腫瘍中に見られた基礎レベルより下のLAMP-2 Aのレベルを阻害した。これは、併用療法が、腫瘍細胞の増殖を低減し、CMAを抑制しながらERストレスを増大させることによってアポトーシスを誘発することを示唆している。

【0188】

LOFUは、ヒトおよびマウスの前立腺癌移植片を無毒な低用量の17AAGに感作する：LOFU単独または低用量の17AAG (25 mg/kg体重) 単独による処置は、正常組織の毒作用を示さなかったが、腫瘍増殖の阻害に失敗した。しかしながら、LOFU+17AAGの併用療法は、マウスRM1腫瘍の増殖を低減した (図10B)。平均の推測される腫瘍増殖は、対照群と比較して、LOFU、17AAGおよびLOFU+17AAGコホートにおいて5% ($p < 0.0001$)、9% ($p < 0.0001$)、および11% ($p < 0.0001$) 遅い。対照、LOFU、およびLOFU+17AAGにおいて腫瘍サイズ2000 mm³を達成するまでの中位時間は、それぞれ、18、22、および42日であった。17AAG群における動物はすべて、26-30日の時間間隔内でそのサイズを達成した。

【0189】

無毒な低用量の17AAG (体重の14 mg/kg) と一緒にLOFUを適用することで、BalbCnu/nuマウス中のヒトPC3腫瘍において、類似した程度の化学増感が観察され、即時の有害な副作用なしで有意な腫瘍増殖遅滞 ($p < 0.007$) が達成された (図5のC)。

【0190】

LOFU+17AAG処置は、腫瘍組織において前立腺癌幹細胞集団を減少させる：PC幹/前駆集団に対するLOFU+17AAG誘発性のERストレスの効果を、PC幹/前駆細胞表面マーカーのフローサイトメトリー解析によって評価した [24、25]。細胞表面SCA1 (図11のAおよびB) ($p < 0.004$)、CD44 (図11のAおよびC) ($p < 0.003$)、CD133 (図11のAおよびD) ($p < 0.007$)、および $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン ($p < 0.005$) (図11のAおよびE) を発現する細胞のパーセンテージは、対照または単一処置のコホートと比較して、併用療法の群において有意に低下した。これらのすべてのマーカーの平均の蛍光強度 (MFI) は、すべての3つの群において変更されないままであった。幹細胞転写因子のqRT-PCRアレイは、T

I x 3、Hoxa11、Pcna、Gli2、Runx1、Foxa2、Sp1、Tbx5、Hoxa10、Nfatc1、Gata6、およびNotch2のmRNAレベルの増加(>2倍)を実証し(図11のF)、これは、LOFUがPC幹細胞転写シグナル伝達を誘発することを示している。17AAGによる処置はまた、LOFU処置した腫瘍中に存在するFoxP1、Nrf2f、およびPou5f1などの、幾つかの転写因子mRNAの発現を増大させた。しかしながら、LOFU+17AAGにより処置した腫瘍は、これらの遺伝子の発現をダウンレギュレートし、これは、併用療法によるERストレスの最大化が、腫瘍中のPC幹／前駆細胞集団を減少させるかもしれないことを示唆している。

【0191】

<議論>

結果は、LOFUと化学療法の併用療法が、腫瘍中のアポトーシス促進性の遺伝子の発現を再プログラムし、腫瘍異種移植片中の広範なアポトーシスを誘発し、結果として、マウスおよびヒトのPC腫瘍の有意な腫瘍増殖遅滞をもたらすことを実証している。LOFUの効果は化学療法に対する耐性を改善することができ、化学増感を達成することができる。

【0192】

<方法および材料>

<動物>

5～6週齢の雄のC57Bl/6(NCI-Fort Dietrich, MD, USA)マウスおよび胸腺欠損ヌード(BalbCnu/nuマウス、Jackson Laboratory, Bay Harbor, ME, USA)マウスを、自由に維持し、すべての試験を、the Institutional Animal Care and Use Committee of the Albert Einstein College of Medicineのガイドラインおよびプロトコルの下で実行した。

【0193】

<腫瘍モデルおよび処置>

C57Bl/6およびBalbCnu/nuマウスの側腹部に、それぞれ、 1×10^5 RM-1(マウス前立腺癌細胞株)および 1×10^6 PC3(ヒト前立腺癌細胞株)の細胞を皮下注射した。およそ10日後に、腫瘍が触知可能になる(直径3-5mm)と、LOFU処置を開始した。マウスを、処置を受けない群、LOFU、17AAG(InvivoGen, San Diego, CA, USA)、および17AAG+LOFUを受ける群の4つの群(n=5/群)に分けた。触知可能な腫瘍を、2週間にわたって投与される5つの分画に対して3-4日ごとにLOFUにより処置した。動物は、この間に17AAGを1週当たり3回受けた。腫瘍体積の測定を、全身毒性の徴候(倦怠感および下痢)の同時の物理的評価とともに、ノギスを使用して週2回実行した。

【0194】

<LOFUシステム>

治療および画像化プローブシステム(TIPS, Philips Research North America, Briarcliff Manor, NY, USA)を、すべての超音波照射に対して利用した。該システムは、8要素の球殻環状アレイトランスデューサー(8-element spherical shell annular array transducer)(80mmの曲率半径、80mmの開口部)の他に、トランスデューサーの移動および正確な位置決めを可能にする移動ステージも含む。トランスデューサーは1.0MHzで操作され、結果として、直径およそ1.5mmおよび長さ12mm(-6dBの圧力)の焦点がもたらされた[12、13]。

【0195】

<LOFU処置プロトコル>

処置日に、ケタミンおよびキシラジン(100l/マウスに対して7:1mg/ml、腹腔内(i.p.))で動物に麻酔をかけた。治療のために位置付けられると、腫瘍を脱

10

20

30

40

50

気水および超音波ゲルを使用してTIPSシステムに音響的に結合した。

【0196】

超音波照射パラメーターは以下の通りであった：0.5 dB cm⁻¹ MHz⁻¹の減衰係数を想定して[75]、組織中の3 mmの超音波処理深さで270 W/cm²のおよそのインサイツでの空間ピークの時間平均密度(Ispta)をもたらす[74]、3 Wの音響パワーおよび100%のデューティーサイクル。超音波照射を、全腫瘍体積にわたって伸長する2 mmのグリッドパターンを使用して、腫瘍に送達した。LOFU前に、腫瘍体積を、特定の処置に対するグリッドサイズを計算するために測定した。各グリッド点でのLOFU照射の持続時間は、1.5秒であり、その後、トランスデューサーは次のグリッド点上に自動的に位置付けられ、全腫瘍体積が覆われるまで手順を繰り返した。これは、腫瘍への不均一なエネルギー送達をもたらした。

10

【0197】

<インビトロでの温度上昇予測>

侵襲性の手段による腫瘍内の温度の予測は、併用療法の治療効果を不必要に変調し得る。それ故、上に記載されたセットアップおよび治療プロトコルを使用して腫瘍内の温度上昇を予測するために、超音波照射を、組織模倣ファントム内の6 mm×6 mmの領域内で実行し、[76]そこに、T型熱電対(直径200 μm)を3 mmの深さで埋め込んだ。これらのインビトロでの照射を5回繰り返し、結果を平均した。

【0198】

<インサイツでのアポトーシスの検出>

アポトーシス細胞を、TUNEL(TdT媒介性のジゴキシゲニン標識したdUTPニック末端標識)染色を行うことによってインサイツで検出した。簡潔には、パラフィン包埋の切片を、脱パラフィンし、段階的なアルコールによって再水和し、Apoptagキット(Intergen Co, Norcross, GA, USA)を使用して染色した。腫瘍細胞におけるアポトーシスの比率を、各々の高倍率視野におけるアポトーシス細胞のパーセントをカウントすることによって定量化した。

20

【0199】

<イムノブロット解析>

LOFUの24時間後に、腫瘍細胞を採取し、リン酸緩衝食塩水で洗浄し、TPER(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)を使用して溶解した。細胞溶解物を、SDS-PAGEにさらし、フッ化ポリビニリデン膜に移し、PERK、pPERK、eIF2、peIF2、ERp72、ERp44、ERp57、ベクリン(細胞シグナル伝達、Danvers, MA, USA)、Lamp2a(Abcam, Cambridge, MA, USA)に対する一次抗体、および西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合二次抗体でイムノブロットした。ブロットを、ECLキット(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)を使用して発展させた。各ブロットの免疫反応性バンドのデンストメトリー分析を撮影し、その後、画像をデジタル化し、Gel Doc XRシステム(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を使用することによって分析した。

30

【0200】

UPR標的遺伝子のリアルタイムPCR解析。LOFU処置の24時間後に、RM1腫瘍細胞を、RNeasy Miniキット(Qiagen, Valencia, CA, USA)から1%のβメルカプトエタノールと混合されたRLT緩衝液を使用して溶解した。

40

【0201】

オンカラムDNA消化を有するRNeasy MiniキットのためのQiagenのプロトコルを使用して、腫瘍溶解物からRNAを単離した。RNAサンプルを、さらなる使用前に-80℃で保存した。単離したRNAを、SuperScript(商標)First-Strand Synthesis System(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)を使用して、cDNA合成にさらした。XB

50

P1 RNAのスプライシングを、以下のプライマー対5'-ACTCGGTCTGGA
AATCTG-3' (SEQ ID NO:19) および5'-TAGCCAGGAAAC
GTCTAC-3' (SEQ ID NO:20) を使用して検出した (Fisher S
cientific, Pittsburg, PA, USA) [77]。リアルタイム
PCRを、標準のABgeneプロトコルに従って、Absolute QPCR SYB
ER Green Mix (ABgene, Rochester, NY, USA) を使用
して、Light CyclerリアルタイムPCR装置 (Bio Rad Labor
atories, Hercules, CA, USA) において実行した。プライマー
増幅の特異性を確認するために、PCRの終わりに融解曲線を生成し、同じプライマー対
を含有している異なるサンプルは、一致するアンプリコン融解温度を示した。

10

【0202】

リアルタイムPCRのために使用されるプライマーは、GRP78 5'-TTGCTT
ATGGCC TGGATAAGAGGG3' (SEQ ID NO:21) および5'-
TGTACCCCTTGTCTTTCAGCTGTCAC3' (SEQ ID NO:22) ;
EDEM' 5'-TCATCCGAGTTCCAGAAAGCAGTC' (SEQ ID N
O:23) 3' および5'-TTGACATAGAGTTGGAGGGTCTCCT3' (SE
Q ID NO:24) を含んだ (Fisher Scientific)。qRT-PC
RおよびリアルタイムPCR実験をすべて、3回繰り返した。アポトーシス遺伝子および
幹細胞転写因子に対するqRT-PCRおよびPCRアレイを、製造業者のプロトコルに
従って、SA Biosciences PCRアレイシステム (Frederick,
MD, USA) によって実行した。要するに、RT² First Strandキット
(Qiagen) を使用して、精製された総RNAからcDNAを調製し、その後、SA
Bioscience PCRアレイキットを使用して、PCRアレイを実行した。SA
BiosciencesからのウェブベースのPCRアレイデータ解析ソフトウェアに
よって、データを解析した。

20

【0203】

<フローサイトメトリー解析>

様々なコホートにおいて、LOFU、17AAG、およびLOFU+17AAGにより
、側腹部腫瘍を処置した。処置の24時間後に、腫瘍細胞を、コラゲナーゼ消化によって
分離し、前立腺癌幹細胞マーカー、SCA1、CD44、およびCD133の発現のため
にフローサイトメトリーによって分析した。単離した腫瘍細胞を、FITCと抱合した抗
SCA1 (BD Biosciences, La Jolla, CA, USA)、pa
cific blueと抱合した抗CD133 (eBioscience, San Di
ego, CA, USA)、およびPEと抱合した抗CD44 (BD Bioscien
ces, La Jolla, CA, USA) で染色した。LSRII (BD Bios
ciences) を使用して、データ取得を実行し、FlowJo v. 7.1 (Tre
estar Inc, Ashland, OR, USA) ソフトウェアによって分析した
。

30

【0204】

<カプラン・マイヤー法>

異なる処置群におけるマウス生存/死亡率を、Sigma-PlotおよびGraph
Pad Prism (version 4.0 for OS X, San Diego,
CA, USA) ソフトウェアを使用して放射線量に応じたカプラン・マイヤー法によっ
て分析した。

40

【0205】

<統計分析>

デジタル画像に関して、サンプリング領域を、データ定量化のためのデジタル取得に対
してランダムに選択した。デジタル画像データを、あらゆる処置に関して盲検方法で評価
した。両側スチューデントt検定を使用して、代表的な平均値の標準誤差 (SEM) を有
する実験コホート間の有意差 ($p < 0.05$) を判定した。

50

【0206】

図12は、本発明の典型的な実施形態による、参照符号(1)によって全般的に指定された、超音波刺激療法(APT)装置を示す。APT装置(1)は、電源(図示せず)によって動力を供給され、制御システム(10)、増幅器(12)、整合変成器(14)およびトランスデューサー(16)を含む。処置を提供するために、超音波トランスデューサー(16)は、患者の身体(1000)の領域の近く又はその領域内に位置付けられ得る。臨床医は、制御システム(10)で関数発生器を使用してトランスデューサー(16)によって送達される超音波パルスの周波数および持続時間に対する適切な調節を行ってもよい。超音波トランスデューサー(16)が励起されるときに、トランスデューサー素子の伝達面は、超音波トランスデューサー(16)を囲む体液中に圧力波を生成する。圧力波は、その後、患者の身体(1000)内の流体および組織に伝播し、最終的に標的部位に達して、それによって、標的組織に対する非切除性の音波ストレスを引き起こす。本明細書でさらに詳細に説明されるように、組織に送達された音波ストレスは、多くの治療用途を有し得、癌治療の場合には、例えば、腫瘍中の癌細胞のそのようなストレスは、結果として免疫原性の調節、放射線増感および化学増感につながり得る。超音波トランスデューサー(16)は、さらなる処置のために患者の身体の隣接領域に再配置されてもよい。

10

【0207】

整合変成器(14)は、電源と超音波トランスデューサーとの間にインピーダンス変換を提供する。

20

【0208】

増幅器(12)は、制御システム(10)の出力信号に基づいてトランスデューサー(16)を駆動させるためのトランスデューサー駆動信号を生成する。典型的な実施形態では、増幅器(12)は、スイッチド共振型電力増幅器(switched resonant power amplifier)であり得、その一例は、米国特許第7,396,336号に開示され、その内容は、その全体が引用によって本明細書に組み込まれる。別の実施形態では、低インピーダンス超音波駆動トランスデューサーシステムが使用され得る[78]。

【0209】

トランスデューサー(16)は、処置領域において $10 \sim 1000 \text{ W/cm}^2$ の空間ピーク時間平均密度(I_{spta})の間の音響パワーを生成する。超音波は、0.5秒から5秒までの範囲内の時間の間継続的に適用され、ここで周波数は $0.01 \sim 10 \text{ MHz}$ の範囲内にある。幾つかの実施形態では、処置領域における超音波ビームの最小径は、約1cmである。

30

【0210】

図12に示される実施形態では、APT装置1によって生成された超音波の周波数は、約 10 kHz から約 300 kHz までの範囲内にある。しかしながら、本発明によるAPT装置は、例えば、約 300 kHz から約 3 MHz までの範囲内の周波数などの、より高い周波数を生成し得る。図13において示されるように、参照符号(100)によって全般的に指定された、そのようなAPT装置の一実施形態は、制御システム(110)、増幅器(112)、整合変成器(14)、およびトランスデューサー(116)を含み得、そのような構成要素は、図12に関連して記載された機能および構造と同じ機能および構造を有する。実施形態では、トランスデューサー(116)は、別のタイプのエネルギーを音響エネルギーに変換する単一または複数の要素で構成された平面または凹面のピストン式トランスデューサーであってもよい。

40

【0211】

図14に示されるように、APT装置(1)およびAPT装置(100)は、参照符号(200)によって全般的に指定された単一のシステムへと統合されて、効果の改善及び/又はより低い全体的なエネルギー入力をもたらし得る。総合システム(200)は、APT処置のための焦点式低周波および平行にされた(collimated)高周波ビー

50

ムを提供する。幾つかの実施形態では、低周波超音波は、与えられた周波数または周波数の範囲を達成可能であるものに従って実質的に集中され、中間周波数が平行にされる。幾つかの実施形態では、低周波数を生成するために使用されるトランスデューサーは凹面であり、中間周波数を生成するために使用されるトランスデューサーは平面である。

【0212】

図15-17に示されるように、A P T装置(1)、(100)、(200)は、参照符号(300)によって全般的に指定された超音波モニタリングシステムと協働し得る。超音波モニタリングシステム(300)は、電源(図示せず)によって動力を供給され得、制御システム(310)、増幅器(312)およびパルス受信システム(314)を含む。超音波モニタリングシステム(300)は、A P T処置の前、間、及び／又は後に標的組織をモニタリングする及び／又は標的組織の画像化を提供するために使用され得、特に、パルス受信システム(314)は、標的組織内から反射された、あるいは標的組織によって又は標的組織内から生成された圧力波を受信するトランスデューサーを含み得、および増幅器(312)は、受信した圧力波に対応する電気信号を生成する。制御システム(310)は、処置状態及び／又は他のパラメーターを判定するために臨床医によって使用され得る電気信号に基づいて出力を生成する。超音波モニタリングシステム(300)は、A P T装置(1)、(100)、(200)とは別の構成要素として示されるが、モニタリングおよびA P T送達、ユニタリシステムによって実行され得ることが認識されるべきである。

【0213】

幾つかの実施形態では、超音波モニタリングシステム(300)は、処置される組織の場所についての情報を提供するために使用される。1つ以上の非治療的な超音波送信および受信のサブシステムが、A P T処置および組織に対する処置の効果をモニタリングするために使用されてもよい。

【0214】

幾つかの実施形態では、放射線治療を計画するために収集される及び使用されるデータも、超音波処置を計画するために少なくとも部分的に使用される。

【0215】

幾つかの実施形態では、A P T処置の計画またはA P T処置のために収集されたデータは、放射線治療の計画に使用される。幾つかの実施形態では、放射線治療の計画のために収集されたデータは、A P T処置の計画のために使用される。幾つかの実施形態では、A P T処置の間に収集されたデータは、放射線治療の計画に使用される。

【0216】

幾つかの実施形態では、より高い周波数で実行される超音波画像化によって部分的に特定された特定の場所を処置するために、超音波がより低い周波数で適用される。

【0217】

A P T処置の間に組織中のパワー付与をモニタリングするために、様々な超音波ベースの画像化およびモニタリングのモダリティが使用されてもよい。幾つかの実施形態では、組織温度は、音響手段によってモニタリングされ得る[79]。

【0218】

幾つかの実施形態では、処置をモニタリングするために、超音波エラストグラフィが使用される。幾つかの実施形態では、処置をモニタリングするために、ハーモニック画像化が使用される。幾つかの実施形態では、熱ひずみが測定される。幾つかの実施形態では、システムは、組織のひずみ(st rain)を測定するために使用される、1つ以上の超音波送信および受信のトランスデューサーサブシステムで構成される。処置用の超音波ビームを望ましい組織に向けるために、および幾つかの実施形態において処置用のトランスデューサーに十分な処置パワーを適用する前に、組織のひずみ情報が使用されてもよい。例えば、一実施形態では、パワーが、意図された処置パワーの10~50%で処置用のトランスデューサーの1つ以上に適用され、標的組織のひずみが超音波フィードバックを使用して測定される。A P Tトランスデューサーが、ひずみの画像化に基づいて標的組織

に物理的にまたは電子的に再配置され得るか、またはそれに有効に配向され得る。幾つかの実施形態では、全出力が1つ以上のトランスデューサーから適用されるが、その時間は、望ましい標的化が確認されるまでのひずみの測定期間の間の治療効果に対して使用される時間よりも短い。

【0219】

幾つかの実施形態では、処置をモニタリングするために、検温が使用される。

【0220】

A P Tシステム(1)、(100)、(200)の各トランスデューサーは、単一のトランスデューサーまたは一連の複数のトランスデューサーであってもよい。図18は、本発明の典型的な実施形態による、参照符号(400)によって全般的に指定されたトランスデューサーの斜視図である。トランスデューサー(400)は、一連のトランスデューサー素子(402)を含む。あらゆる数のトランスデューサー素子(402)が、方位軸に沿って連続して配されてもよい。トランスデューサー素子(402)は、バックブロック(backing block)(404)上で支持される。信号リードは、周知のように、各トランスデューサー素子(402)の電極と連結し、回路網を送受信する。トランスデューサー素子(402)は、送信回路網によって提供された電気信号を圧力波に変換する。

【0221】

幾つかの中間周波数の実施形態(約300kHz~約3MHz)において、2つ以上の超音波トランスデューサーは、本明細書では交差ゾーンとして示される処置ゾーン内で交差する超音波ビームを生成し、各ビームは、 $10 \sim 500 \text{ W/cm}^2$ の範囲内で交差ゾーン中に I_{spta} を有している。実施形態では、2つのトランスデューサーは、処置ゾーン内で交差する超音波ビームを生成し、各ビームは、 $50 \sim 500 \text{ W/cm}^2$ の範囲内で交差ゾーン中に I_{spta} を有している。実施形態では、3つのトランスデューサーは、処置ゾーン内で交差する超音波ビームを生成し、各ビームは、 $50 \sim 500 \text{ W/cm}^2$ の範囲内で交差ゾーン中に I_{spta} を有している。

【0222】

幾つかの実施形態では、複数のビームが、互いに実質的に同位相である。幾つかの実施形態では、別の超音波トランスデューサーから放射される2つの超音波ビームは、実質的に同位相であり、処置ゾーン内で交差し、および各ビームは、 $70 \sim 100 \text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーン中に音響パワーの空間ピーク密度を有し、超音波は継続的に1~5秒適用される。幾つかの実施形態では、別の超音波トランスデューサーから放射される3つの超音波ビームは、実質的に同じ周波数および同位相であり、処置ゾーン内で交差し、および各ビームは、 $50 \sim 70 \text{ W/cm}^2$ の範囲で交差ゾーン中に音響パワーの空間ピーク密度を有し、超音波は継続的に1~5秒適用される。

【0223】

幾つかの実施形態では、別のトランスデューサーまたはトランスデューサー素子から生じるビームはそれぞれ、処置ゾーン中でおおよそ 300 W/cm^2 の I_{spta} を生成する。

【0224】

幾つかの実施形態では、少なくとも1つのトランスデューサーの直径、およびこのトランスデューサーから放射される超音波ビームは、処置ゾーンより実質的に大きい。より小さなトランスデューサーと組み合わせた、そのような大きなトランスデューサーの1つ以上の使用は、有効な且つより速い処置を達成しながら、それほど正確でない高パワーの、大量のビームの照準を好都合に可能にする。

【0225】

幾つかの実施形態では、2つ以上のビームが互いに交差する、集中処置ゾーンが形成され、集中処置ゾーンは、送信されたエネルギーの方向に垂直に約1cm以上であり、送信された方向に平行に約1cm以上である。

【0226】

幾つかの実施形態では、各トランスデューサーから処置ゾーンに適用された音圧は、0.1～10MPaである。

【0227】

幾つかの実施形態では、集中超音波処置ゾーンを提供するトランスデューサーの数は、1から1000の間である。

【0228】

幾つかの実施形態では、1つ以上の中央周波数が、約100kHzから20MHzに範囲の中央周波数による処置の間に利用される。

【0229】

幾つかの実施形態では、与えられたトランスデューサーからの超音波は、継続的に適用される。幾つかの実施形態では、与えられたトランスデューサーから放射される超音波は、デューティーサイクルとして知られているオン時間単位およびオフ時間単位を繰り返すパルスで適用される。デューティーサイクルは、1オン時間単位からタイムユニットから9オフ時間単位までの範囲であり得る。

【0230】

幾つかの実施形態では、トランスデューサーは、単一周波音または多周波数チャープを送信する。

【0231】

幾つかの実施形態では、トランスデューサーは、適用の全経過の間に標的組織に送達された総エネルギーが、周囲の組織に対する総エネルギーより大きいように、連続して操作される。

【0232】

幾つかの実施形態では、周波数は適用中に掃引され、部分的にトランスデューサーの近くのゾーンに不必要に高密度のゾーンを減少させる。

【0233】

幾つかの実施形態では、治療ヘッド (treatment head) を含むトランスデューサーは、機械的に振動させられる。

【0234】

幾つかの実施形態では、トランスデューサーは、二次元フェーズドアレイ、環状アレイ及び／又は三次元フェーズドアレイで構成される。

【0235】

幾つかの実施形態では、1つ以上の超音波トランスデューサーは、1つ以上の内視鏡装置に組み込まれる。

【0236】

本明細書に開示されたAPT処置システムは、体温上昇およびアブレーション熱の (ablative thermal) 治療に共通の熱の投与スキームと比較して、温熱量が少ない。幾つかの実施形態では、処置ゾーン中で達した最高温度は、約2秒以下続く処置の間に45℃である。

【0237】

温熱量を考慮すると、治療効果が熱的機構によって得られることが予期される。理論によって縛られたくないが、熱効果と結び付けられた機械的效果は、開示された装置、システムおよび方法を使用して、処置の効果の観察を部分的に説明し得る。

【0238】

幾つかの実施形態では、接触媒質が、トランスデューサーと患者の身体との間で使用されて、超音波が効率的に送信され、幾つかの実施形態では、トランスデューサーと処置ゾーンとの間の望ましい距離が提供される。幾つかの実施形態では、接触媒質は循環されて、処置の間にトランスデューサーまたは患者の身体を冷却するか、またはその両方を冷却する。超音波を送信する、間隔を提供する、および患者およびシステムコンポーネントを冷却する目的のために、別の流体が使用されてもよい。

【0239】

10

20

30

40

50

理論によって縛られないが、本明細書に記載されるシステムを使用するA P T処置は、細胞間、および細胞とマトリックスタンパク質との間の相互作用を促進することができる。癌細胞と免疫細胞との間の相互作用および免疫細胞間、例えばT細胞とD Cとの間の相互作用。

【0240】

幾つかの実施形態では、A P T処置は、タンパク質複合体、例えばタンパク質フォールディングの複合体を破壊し得る。

【0241】

複数のモダリティによる処置から恩恵を得る疾患、標的とされた処置ゾーン全体の浸透およびこれらのゾーン内の病変を有する患者のために、各モダリティの適用および短期間の処置の緩和が望まれる。

【0242】

本発明の典型的な実施形態によるA P T処置装置およびA P T処置モダリティの様々な他の態様は、ここで記載される：

【0243】

<位置決め装置>

幾つかの実施形態では、トランスデューサーアプリケーターは、臨床医または介護者によって携帯され得るように設計されている。幾つかの実施形態では、アプリケーターは、図19に例証される位置決め装置(500)などの、機械的位置決め装置に取り付けられる。位置決め装置(500)は、手動で操作されるか、またはロボット制御され得る。本実施形態では、位置決め装置(500)は、トランスデューサーが移動する円弧状のレールであり、特に、トランスデューサーは、順にレールに載せられるケーブル駆動の運び台に取り付けられてもよい。トランスデューサーが三次元で位置決めされ得るように、レール自体は回転可能であってもよい。位置決め装置(500)は、トランスデューサーの下に及びその目標範囲内に患者が適合することができるよう十分に大きくあり得る。図19は、レール上に位置決めされた1つのトランスデューサーのみを示すが、1つを超えるトランスデューサーがレール上に配されること、及び／又は1つ以上の他のトランスデューサーを支持する他のレールが設けられてもよいことが認識されるべきである。幾つかの実施形態では、時にヘキサポッドと呼ばれる、スチュワートプラットホームが、位置決め装置において使用されてもよい。処置パラメーターを設定し、位置決め装置を操作するために、コンピュータープログラミングが使用されてもよい。

【0244】

<機器および患者の冷却>

幾つかの実施形態では、処置システムは、超音波エネルギーまたは他のエネルギーに暴露された皮膚を冷却するための患者冷却機構を含む。

【0245】

<引用文献>

1. Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E. M. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25:267-296.
2. Dougan, M., and Dranoff, G. 2009. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 27:83-117.
3. Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9:1269-12

74.

4. Thomas, D. A. , and Massague, J. 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8:369-380.
5. Gerlini, G. , Tun-Kyi, A. , Dudli, C. , Burg, G. , Pimpinelli, N. , and Nestle, F. O. 2004. Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. *Am J Pathol* 165:1853-1863. 10
6. Turk, M. J. , Guevara-Patino, J. A. , Rizzuto, G. A. , Engelhorn, M. E. , Sakaguchi, S. , and Houghton, A. N. 2004. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 200:771-782.
7. Huang, B. , Pan, P. Y. , Li, Q. , Sato, A. I. , Levy, D. E. , Bromberg, J. , Divino, C. M. , and Chen, S. H. 2006. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res* 66:1123-1131. 20
8. Sica, A. , and Bronte, V. 2007. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 117:1155-1166.
9. Curiel, T. J. , Coukos, G. , Zou, L. , Alvarez, X. , Cheng, P. , Mottram, P. , Evdemon-Hogan, M. , Conejo-Garcia, J. R. , Zhang, L. , Burow, M. , et al. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949. 30
10. van Elsas, A. , Hurwitz, A. A. , and Allison, J. P. 1999. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190:355-366. 40
11. Phan, G. Q. , Yang, J. C. , Sherry, R. M. , Hwu, P. , Topalian, S. L. , Schwartzentruber, D. J. , Restifo, N. P. , Haworth, L. R. , Seipp, C. A. , Freezer, L. J. , et al. 2003. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blo 50

ckade in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci USA 100:8372-8377.

12. Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., et al. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat Med 8:793-800.

13. Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N. W., Toscano, M. A., Ilarregui, J. M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O. L., and Rabinovich, G. A. 2004. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. Cancer Cell 5:241-251.

14. Troy, A. J., Summers, K. L., Davidson, P. J., Atkinson, C. H., and Hart, D. N. 1998. Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 4:585-593.

15. Staveley-O'Carroll, K., Sotomayor, E., Montgomery, J., Borrello, I., Hwang, L., Fein, S., Pardoll, D., and Levitsky, H. 1998. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A 95:1178-1183.

16. Willimsky, G., and Blankenstein, T. 2005. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. Nature 437:141-146.

17. Overwijk, W. W., Theoret, M. R., Finkelstein, S. E., Surman, D. R., de Jong, L. A., Vyth-Dreese, F. A., Delleman, T. A., Antony, P. A., Spiess, P. J., Palmer, D. C., et al. 2003. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells. J Exp Med 198:569-580.

18. Cuenca, A., Cheng, F., Wang, H., Brayer, J., Horna, P., Gu, L., Bien, H., Borrello, I. M., Levitsky, H. I., and Sotomayor, E. M. 2003. Extra-lymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T cell anergy: dominant role of cross-tolerance to tumor antigens. Cancer Res 63:9007-9015.

10

20

30

40

50

19. Zheng, Y., Zha, Y., Driessens, G., Locke, F., and Gajewski, T. F. 2012. Transcriptional regulator early growth response gene 2 (Egr2) is required for T cell anergy in vitro and in vivo. *J Exp Med* 209:2157–2163.
31. Zhang, H. G., Mehta, K., Cohen, P., and Guha, C. 2008. Hyperthermia on immune regulation: a temperature's story. *Cancer Lett* 271:191–204.
32. Basu, S., and Srivastava, P. K. 1999. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med* 189:797–802.
33. Castelli, C., Ciupitu, A. M., Rini, F., Rivoltini, L., Mazzocchi, A., Kiessling, R., and Parmiani, G. 2001. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res* 61:222–227.
34. Haug, M., Dannecker, L., Schepp, C. P., Kwok, W. W., Wernet, D., Buckner, J. H., Kalbacher, H., Dannecker, G. E., and Holzer, U. 2005. The heat shock protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4+ memory T cells. *Eur J Immunol* 35:3163–3172.
35. Pawaria, S., and Binder, R. J. 2011. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat Commun* 2:521.
36. Gajewski, T. F., Woo, S. R., Zha, Y., Spapen, R., Zheng, Y., Corrales, L., and Spranger, S. 2013. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* 25:268–276.
37. Driessens, G., Kline, J., and Gajewski, T. F. 2009. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 229:126–144.
38. Leach, D. R., Krummel, M. F., and Allison, J. P. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734–1736.
39. Munn, D. H., and Mellor, A. L. 2007. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 117:1147–1154.
40. Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. 2009. Immunogenic and tol

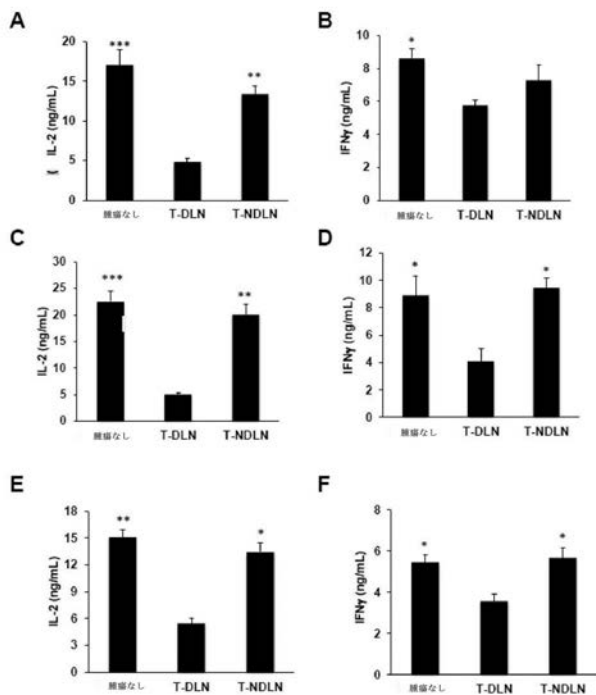
- erogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9:353–363.
41. Lee, P. P., Yee, C., Savage, P. A., Fong, L., Brockstedt, D., Weber, J. S., Johnson, D., Swetter, S., Thompson, J., Greenberg, P. D., et al. 1999. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med* 5:677–685.
42. Valdor, R., and Macian, F. 2013. Induction and stability of the anergic phenotype in T cells. *Semin Immunol* 25:313–320. 10
43. Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S. H., Horton, H. F., Byrne, M. C., and Rao, A. 2002. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109:719–731.
44. Safford, M., Collins, S., Lutz, M. A., Allen, A., Huang, C. T., Kowalski, J., Blackford, A., Horton, M. R., Drake, C., Schwartz, R. H., et al. 2005. Egr-2 and Egr-3 are negative regulators of T cell activation. *Nat Immunol* 6:472–480. 20
45. Soto-Nieves, N., Puga, I., Abe, B. T., Bandyopadhyay, S., Baine, I., Rao, A., and Macian, F. 2009. Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. *J Exp Med* 206:867–876.
46. Enk, A. H., Jonuleit, H., Saloga, J., and Knop, J. 1997. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* 73:309–316. 30
47. Marangoni, F., Murooka, T. T., Manzo, T., Kim, E. Y., Carrizosa, E., Elpek, N. M., and Mempel, T. R. 2013. The transcription factor NFAT exhibits signal memory during serial T cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunity* 38:237–249.
48. Srivastava, P. 2002. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:395–425. 40
49. Udono, H., and Srivastava, P. K. 1993. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. *J Exp Med* 178:1391–1396.
50. Udono, H., and Srivastava, P. K. 1994. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90 50

- , and hsp70. *J Immunol* 152:5398-5403.
51. Ullrich, S. J., Robinson, E. A., Law, L. W., Willingham, M., and Appella, E. 1986. A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3121-3125.
52. Somersan, S., Larsson, M., Fonteneau, J. F., Basu, S., Srivastava, P., and Bhardwaj, N. 2001. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 167:4844-4852. 10
53. Liu, B., DeFilippo, A. M., and Li, Z. 2002. Overcoming Immune Tolerance to Cancer by Heat Shock Protein Vaccines. *Mol Cancer Ther* 1:1147-1151.
54. Chen, X., Tao, Q., Yu, H., Zhang, L., and Cao, X. 2002. Tumor cell membrane-bound heat shock protein 70 elicits antitumor immunity. *Immunol Lett* 84:81-87. 20
55. Vega, V. L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., and De Maio, A. 2008. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J Immunol* 180:4299-4307.
56. Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M., and Srivastava, P. K. 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int immunol* 12:1539-1546. 30
57. Obeid, M., Panaretakis, T., Tesniere, A., Joza, N., Tufi, R., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. 2007. Leveraging the immune system during chemotherapy: moving calreticulin to the cell surface converts apoptotic death from "silent" to immunogenic. *Cancer Res* 67:7941-7944. 40
58. Hu, Z., Yang, X. Y., Liu, Y., Morse, M. A., Lyerly, H. K., Clay, T. M., and Zhong, P. 2005. Release of endogenous danger signals from HIFU-treated tumor cells and their stimulatory effects on APCs. *Biochem Biophys Res Comm* 335:124-131.
59. Hu, Z., Yang, X. Y., Liu, Y., Sankin, G. N., Pua, E. C., Morse, M. A., Lyerly, H. K., Cl 50

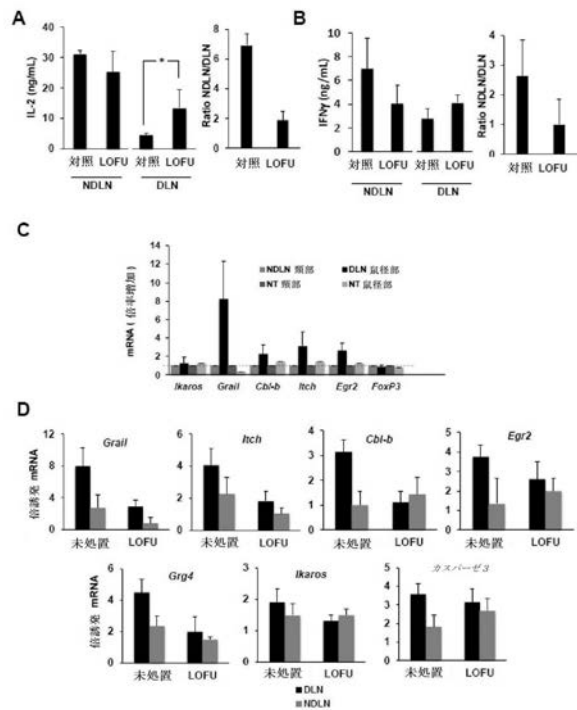
- ay, T. M. , and Zhong, P. 2007. Investigation of HIFU-induced anti-tumor immunity in a murine tumor model. *J Transl Med* 5:34-34.
60. Boussiotis, V. A. , Barber, D. L. , Nakarai, T. , Freeman, G. J. , Gribben, J. G. , Bernstein, G. M. , D'Andrea, A. D. , Ritz, J. , and Nadler, L. M. 1994. Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science* 266:1039-1042.
61. Dure, M. , and Macian, F. 2009. IL-2 signaling prevents T cell anergy by inhibiting the expression of anergy-inducing genes. *Mol Immunol* 46:999-1006. 10
62. Gao, B. , Kong, Q. , Kemp, K. , Zhao, Y. S. , and Fang, D. 2012. Analysis of sirtuin 1 expression reveals a molecular explanation of IL-2-mediated reversal of T-cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:899-904.
63. Gramaglia, I. , Weinberg, A. D. , Lemon, M. , and Croft, M. 1998. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 161:6510-6517. 20
64. Lathrop, S. K. , Huddleston, C. A. , Dullforce, P. A. , Montfort, M. J. , Weinberg, A. D. , and Parker, D. C. 2004. A signal through OX40 (CD134) allows anergic, autoreactive T cells to acquire effector cell functions. *J Immunol* 172:6735-6743.
65. Murata, S. , Ladle, B. H. , Kim, P. S. , Lutz, E. R. , Wolpoe, M. E. , Ivie, S. E. , Smith, H. M. , Armstrong, T. D. , Emens, L. A. , Jaffee, E. M. , et al. 2006. OX40 costimulation synergizes with GM-CSF whole-cell vaccination to overcome established CD8+ T cell tolerance to an endogenous tumor antigen. *J Immunol* 176:974-983. 30
66. Tsushima, F. , Yao, S. , Shin, T. , Flies, A. , Flies, S. , Xu, H. , Tamada, K. , Pardoll, D. M. , and Chen, L. 2007. Interaction between B7-H1 and PD-1 determines initiation and reversal of T-cell anergy. *Blood* 110:180-185. 40
67. Wilcox, R. A. , Tamada, K. , Flies, D. B. , Zhu, G. , Chapoval, A. I. , Blazar, B. R. , Kast, W. M. , and Chen, L. 2004. Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo. *Blood* 103:177-184.
68. Zhang, L. , Chen, X. , Liu, X. , Kline, D. E 50

- . , Teague, R. M. , Gajewski, T. F. , and Kline, J. 2013. CD40 ligation reverses T cell tolerance in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 123:1999-2010.
69. Anelli T, Alessio M, Mezghrani A, Simmen T, Talamo F, Bachi A and Sitia R. ERp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family. *EMBO J.* 2002 ; 21 (4) :835-844.
70. Jessop CE, Chakravarthi S, Garbi N, Hammerling GJ, Lovell S and Bulleid NJ. ERp57 is essential for efficient folding of glycoproteins sharing common structural domains. *EMBO J.* 2007 ; 26 (1) :28-40. 10
71. Ron D and Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 ; 8 (7) :519-529.
72. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012 ; 12 (6) :401-410. 20
73. Kon M, Kiffin R, Koga H, Chapochnick J, Macian F, Varticovski L and Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Sci Transl Med.* 2011 ; 3 (109) :109ra117.
74. Haar G, Shaw A, Pye S, Ward B, Bottomley F, Nolan R and Coady AM. Guidance on reporting ultrasound exposure conditions for bio-effects studies. *Ultrasound Med Biol.* 2011 ; 37 (2) :177-183. 30
75. Duck FA. (1990). *Physical properties of tissue: a comprehensive reference book: Academic Press*).
76. Partanen A, Tillander M, Yarmolenko PS, Wood BJ, Dreher MR and Kohler MO. Reduction of peak acoustic pressure and shaping of heated region by use of multifoci sonications in MR-guided high-intensity focused ultrasound mediated mild hyperthermia. *Med Phys* 40 2013 ; 40 (1) :013301. 40
77. Back SH, Schroder M, Lee K, Zhang K and Kaufman RJ. ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods.* 2005 ; 35 (4) :395-416.
78. Lewis and Olbricht, *Review of Scientific Instruments* 80, 114704 (2009).
79. Pouch et al. *Ultrasound Med* 2010 ; 29 :1595-1606.
80. Sahu et al. *Scientific Reports* 2014 『t (Dec 50

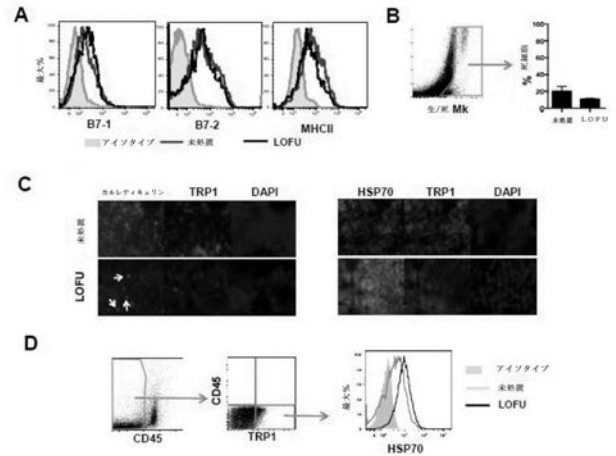
【 図 1 】



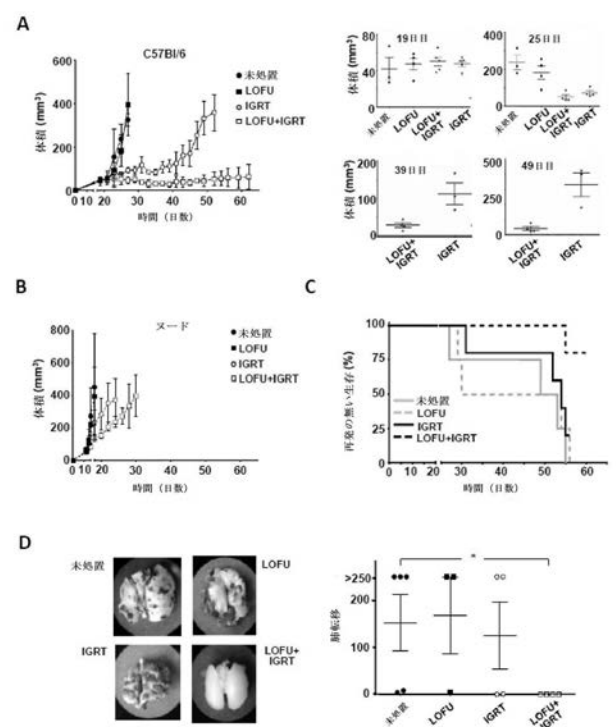
【図 2】



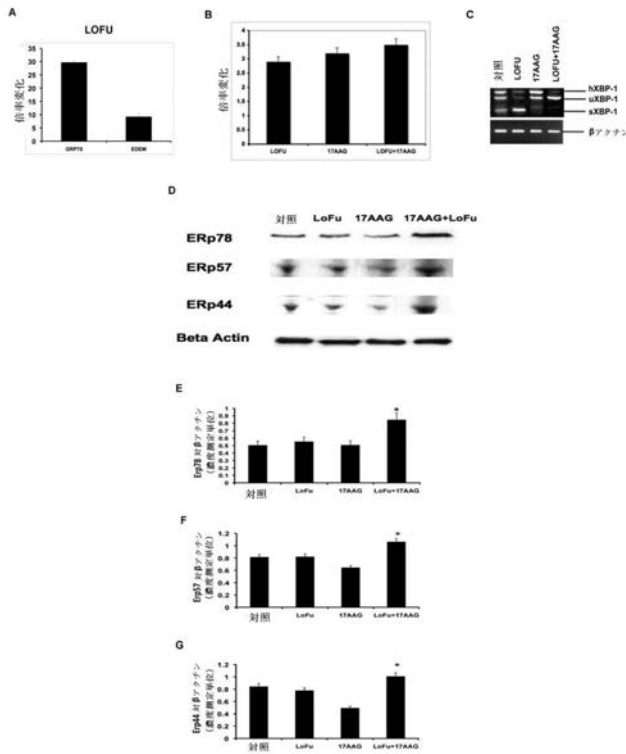
【図 4】



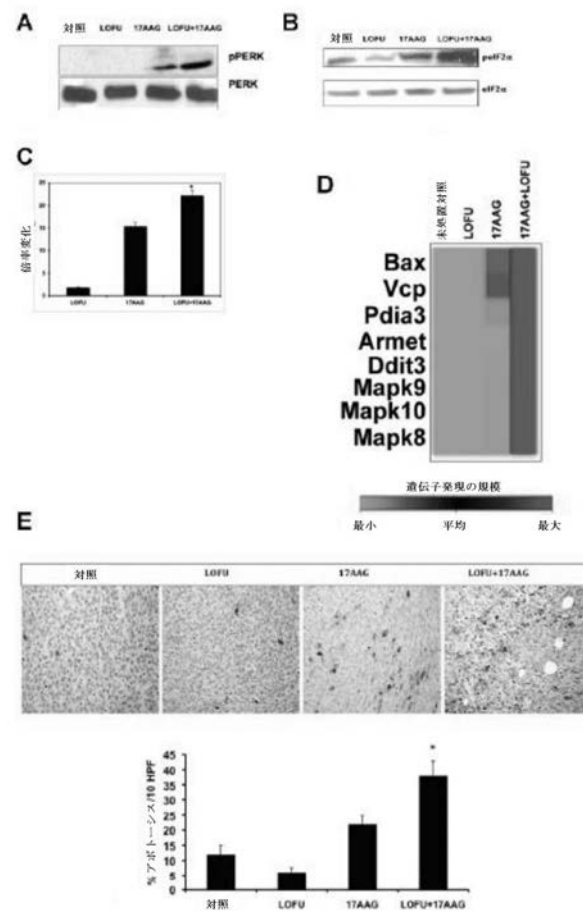
【图 6】



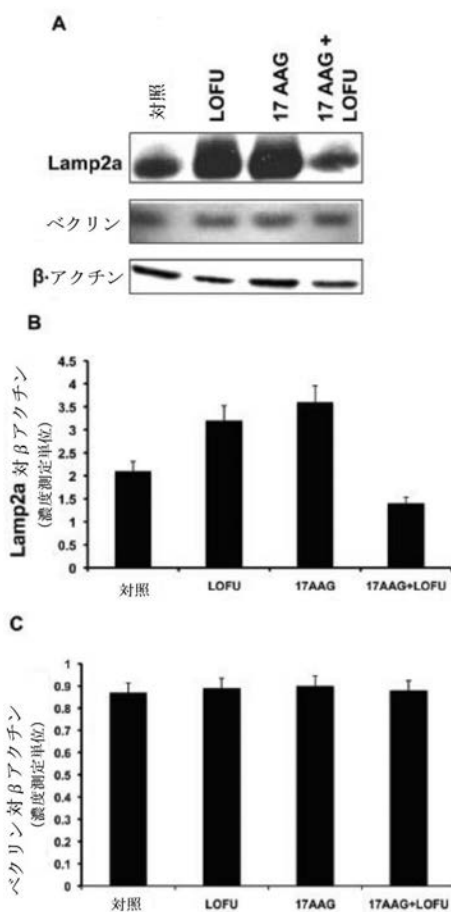
【図 7】



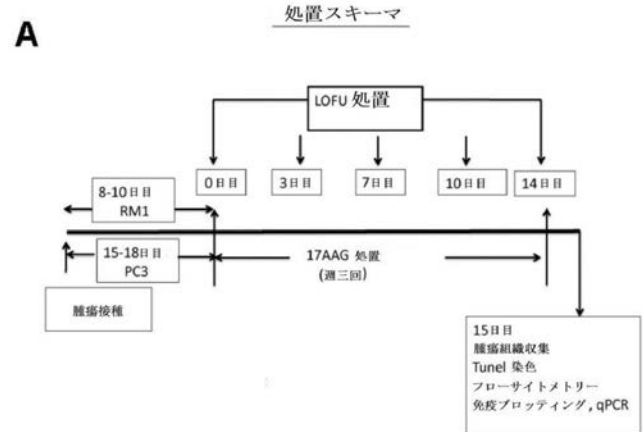
【図 8】



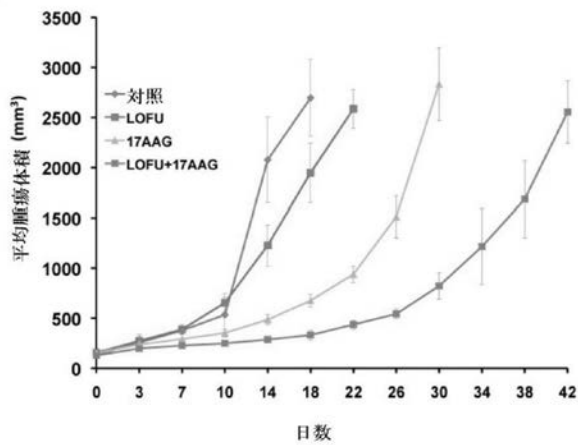
【図 9】



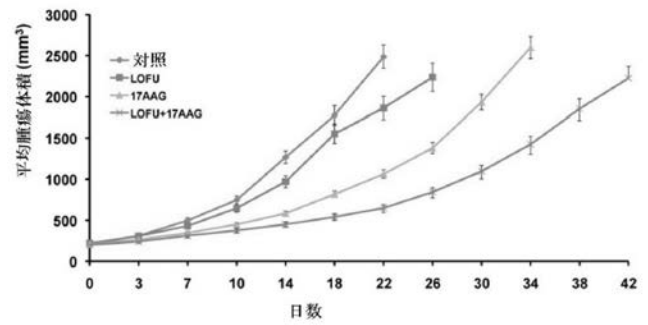
【図 10 A】



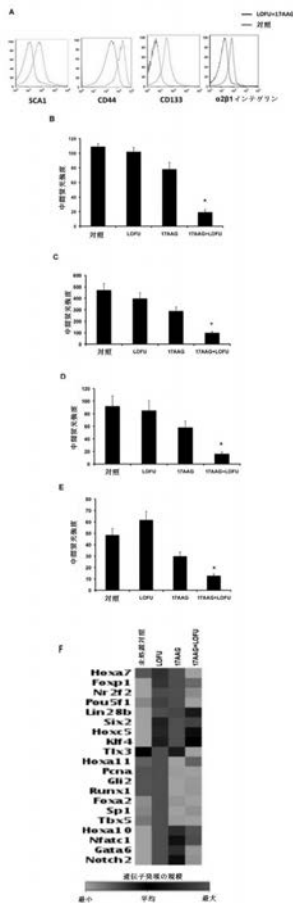
【図 10 B】

B

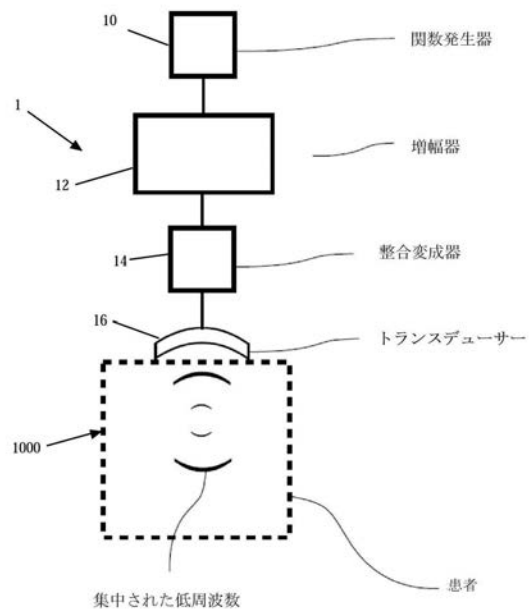
【図 10 C】

C

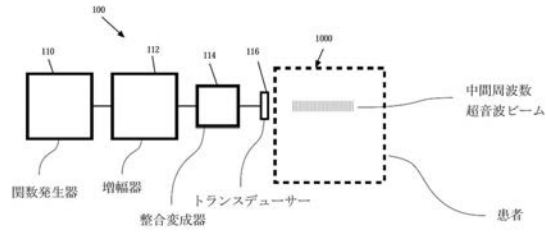
【図 11】



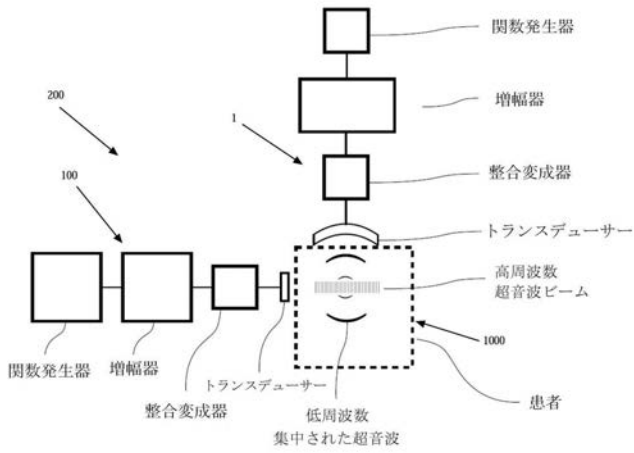
【図 12】



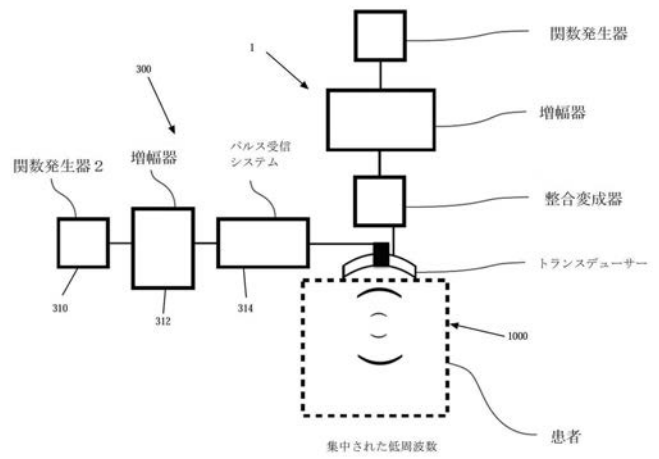
【図 1 3】



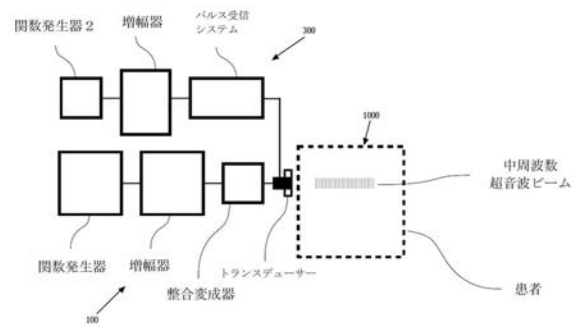
【図 1 4】



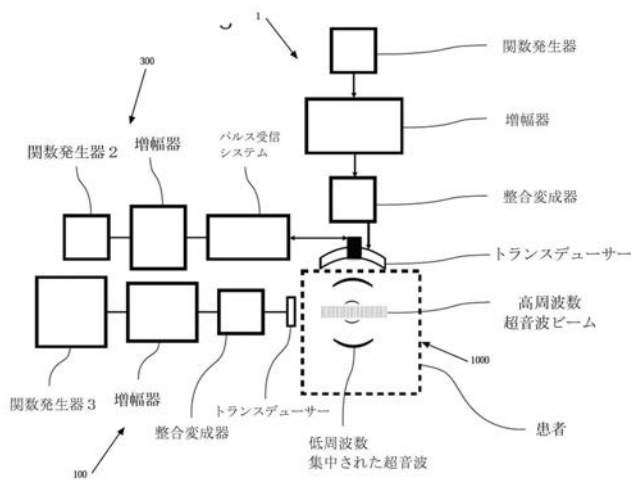
【図 1 5】



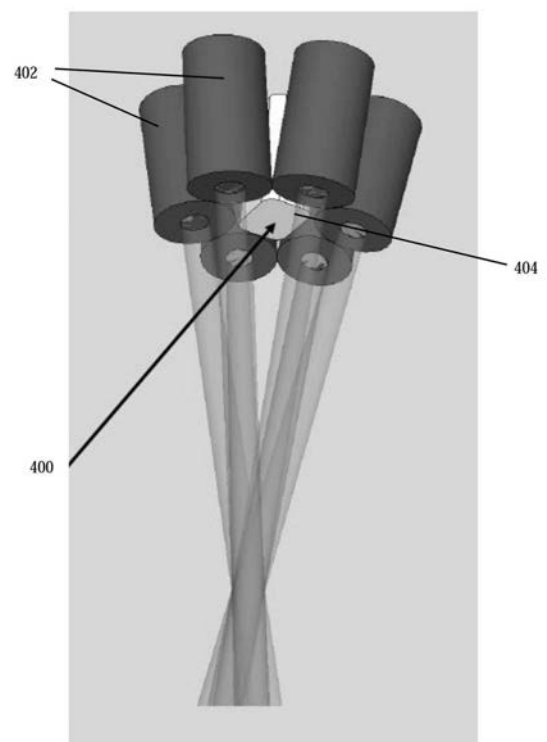
【図 1 6】



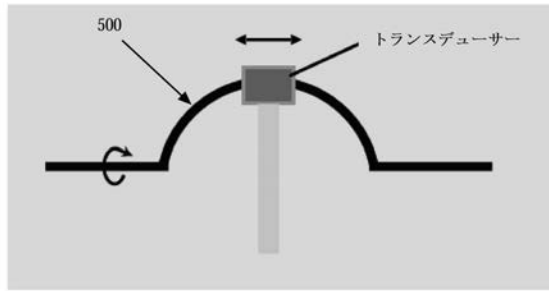
【図 1 7】



【図 1 8】



【図 19】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/35440

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☒ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/35440

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-11, 18, 20-36, 40-79, 81
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

--Please See Supplemental Page---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I, Claims 1-7, 12-17, 19, 80, and 82

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US16/35440

-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-7, 12-17, 19, 80, and 82 are directed toward methods of increasing the efficacy of a chemotherapy in a subject; treating a tumor in a subject, and a system therefor.

Group II, Claims 37-39 are directed toward methods of sensitizing a tumor to an anti-cancer therapy and reducing the effective dose of an anti-cancer chemotherapy required to treat a tumor.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include wherein the chemotherapeutic drug effects endoplasmic reticulum (ER) stress, not present in Group II; the special technical features of Group II include reducing the effective dose of a chemotherapy, not present in Group I.

Groups I and II share the technical features including: administering to a subject undergoing anti-cancer chemotherapy an amount of low intensity focused ultrasound (LOFU); and an anti-cancer chemotherapy to treat a tumor.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2015/077005 A1 to Sonify Biosciences, LLC (hereinafter 'Sonify').

Sonify discloses administering to a subject undergoing anti-cancer chemotherapy an amount of low intensity focused ultrasound (LOFU) (administering to a subject undergoing anti-cancer chemotherapy an amount of low intensity focused ultrasound (LOFU); abstract; paragraph [0037]); and an anti-cancer chemotherapy to treat a tumor (anti-cancer chemotherapy to treat skin cancer (a tumor); paragraph [0037]).

Since none of the special technical features of the Groups I and II inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Sonify reference, unity of invention is lacking.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/35440

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61B 5/06, 8/08; A61K 47/42, 49/22 (2017.01) CPC - A61B 5/061, 5/066, 8/0825, 8/085; A61K 47/42, 49/22 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61B 5/06, 8/08; A61K 47/42, 49/22, 6/00, 39/395; A61P 31/12, 31/18, 35/00; G01N 33/574; C12Q 1/68; C07K 16/18 (2017.01) CPC: A61B 5/061, 5/066, 8/0825, 8/085, 18/20; A61K 47/42, 49/22, 45/06, 38/00; C12N 2799/D4, 9/1029; A61F 9/0079; A61N 5/062 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google Scholar; Pubmed; EBSCO; IEEE Keywords: cancer, tumor, acoustic, ultrasound, radiation, immunotherapy, chemotherapy, treat*		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	(SAHA, S et al.) Low Intensity Focused Ultrasound (LOFU) Modulates Unfolded Protein Response and Sensitizes Prostate Cancer to 17AAG. <i>Oncoscience</i> . 03 June, 2014; Vol. 1, No. 6; pages 434-445; abstract; page 435, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 2; page 440, column 1, paragraph -column 2, paragraph 1; page 441, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 2; 442, column 1, paragraphs 1-4	1-2, 4, 5/4, 12, 15, 19, 82 3, 5/3, 6-7, 13-14, 16, 17/12-14
Y	(YU, KD et al.) Identification of Prognosis-Relevant Subgroups in Patients with Chemoresistant Triple Negative Breast Cancer. <i>Clinical Cancer Research</i> . 15 May, 2013; Vol. 19, No. 10; pages 1-18; abstract; page 2, paragraph 2; page 7, paragraph 4; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2986.	3, 5/3, 6-7
Y	(CANCER RESEARCH INSTITUTE) Focused Ultrasound and Immunotherapy Workshop. New York; 11 February, 2015; pages 1-13; page 5, paragraph 1; downloaded from the Internet < https://d3nqfqaqtaonl.cloudfront.net/images/pdf/FUS_Immunotherapy_Workshop_Summary.pdf >.	13, 17/13
Y	(LAN, J et al.) Ablative Hypofractionated Radiotherapy Normalizes Tumor Vasculature In Lewis Lung Carcinoma Mice Model. <i>Radiation Research</i> . 12 March, 2013; Vol. 179, No. 4; pages 458-464; abstract; page 461, column 2, paragraph 2; DOI: 10.1667/RR3116.1.	14, 17/12-14
Y	US 2010/0092424 A1 (SANGHVI, NT et al.) 15 April, 2010; paragraph [0081].	16
A	(JEONG, JS et al.) Ultrasound Transducer and System for Real-Time Simultaneous Therapy and Diagnosis for Noninvasive Surgery of Prostate Tissue. <i>IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control</i> . September, 2009; Vol. 56, No. 9; pages 1-20; page 3, paragraphs 1, 5	80
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 February 2017 (14.02.2017)		Date of mailing of the international search report 17 MAR 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/35440

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	(SEN, HT et al.) A Cooperatively Controlled Robot for Ultrasound Monitoring of Radiation Therapy. Proceedings of the IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems. November, 2013; Vol. 2013; pages 1-20; abstract; page 2, paragraph 3.	80
P, X	WO 2016/196741 A2 (MONTEFIORE MEDICAL CENTER) 08 December, 2016; whole document	1-4, 5/3-4, 6-7, 12-16, 17/12-14, 19, 80, 82

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100082072

弁理士 清原 義博

(72)発明者 グハ, チャンダン

アメリカ合衆国 1 0 5 8 3 ニューヨーク州 スカーズデール スプレイン・ロード 3 5 0

(72)発明者 バリー, ステファン

アメリカ合衆国 0 8 0 3 3 ニュージャージー州 ハドンフィールド コロニアル・リッジ・ドライブ 4 5

(72)発明者 マシアン, フェルナンド

アメリカ合衆国 1 0 4 6 4 ニューヨーク州 ブロンクス フォードハム・ストリート 1 9 0
アパートメント 1 0

Fターム(参考) 4C096 AA18

4C160 JJ33 JJ34 JJ35 JJ36 MM32

专利名称(译)	低密度聚焦超声治疗癌症和转移		
公开(公告)号	JP2018517495A	公开(公告)日	2018-07-05
申请号	JP2017563052	申请日	2016-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	Montefiore医疗中心 蒙特法沃医疗中心 阿尔伯爱因斯坦医科叶希瓦大学		
申请(专利权)人(译)	Montefiore医疗中心 医学爱因斯坦医学院，Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	グハチャンダン バリーステファン マシアンフェルナンド		
发明人	グハ,チャンダン バリ-,ステファン マシアン,フェルナンド		
IPC分类号	A61N7/00 A61B5/055		
CPC分类号	A61N7/02 A61B2018/00005 A61B2018/00023 A61N5/10 A61N2007/0073 A61N2007/0078		
FI分类号	A61N7/00 A61B5/05.390		
F-TERM分类号	4C096/AA18 4C160/JJ33 4C160/JJ34 4C160/JJ35 4C160/JJ36 4C160/MM32		
优先权	62/170378 2015-06-03 US 62/204312 2015-08-12 US		
其他公开文献	JP2018517495A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于治疗癌症并且使用低密度聚焦超声与抗癌疗法相结合来预防转移的系统和方法。[选择图]图10A

