

E. 結論

HA-g-PAA の細胞生存率に与える影響を検討し、高い生体適合性を示した。
今後 CDDP との錯体形成によって、その有用性を実証していく。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakai Y, Ishigami H, Isayama H, Sasaki T, Kawakubo K, Kogure H, Emoto S, Yamaguchi H, Kitayama J, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Tada M, Koike K. Role of intervention for biliary and gastric/intestinal obstruction in gastric cancer with peritoneal metastasis. *J Gastroenterol Hepatol.* 27 (121) 1796-800, 2012

2) Emoto S, Ishigami H, Yamaguchi H, Yamashita H, Kaisaki S, Kitayama J. Clinical significance of CA125 and CA72-4 in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer.* 15(2):154-161. 2012

3) Emoto S, Yamaguchi H, Kishikawa J, Yamashita H, Ishigami H, Kitayama J. Antitumor effect and pharmacokinetics of intraperitoneal NK105, a nanomicellar paclitaxel formulation for peritoneal dissemination. *Cancer Science.* 103(7): 1304-1310. 2012

4) Emoto S, Ishigami H, Hidemura A, Yamaguchi H, Yamashita H, Kitayama J, Watanabe T. Complications and management of an implanted intraperitoneal access port system for intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Japanese Journal of Clinical Oncology.* 42(11): 1013-1019.2012

5) Kitayama J, Ishigami H, Yamaguchi H, Yamashita H, Emoto S, Kaisaki S. S-1 plus intravenous and intraperitoneal Paclitaxel for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Gastrointest Cancer Res.* 3(Suppl1). S10-3. 2012

2. 学会発表

国際学会

1) H. Ishigami, S. Kaisaki, H. Yamaguchi, H. Yamashita, S. Emoto, J. Kitayama Phase I study of weekly intraperitoneal paclitaxel combined with S-1

and oxaliplatin for gastric cancer with peritoneal metastasis 2012 ASCO
Gastrointestinal Cancers Symposium. 19-Jan. 2012. San Francisco

2) H. Ishigami. Intraperitoneal Chemotherapy in Advanced Gastric Cancer Patients. 5th Annual SGCC meeting, 4th Asia-Pacific Gastroesophageal Cancer Congress. 4-Jul. 2012. Singapore

3) H. Ishigami. Intraperitoneal chemotherapy for advanced gastric cancer. 2012 Yonsei Gastric Cancer Symposium. 22-Sep. 2012. Seoul

4) H. Ishigami, J. Kitayama, H. Yamaguchi, S. Emoto, T. Watanabe. Phase II study of intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for gastric cancer with metastases to the distant peritoneum. 37th ESMO Congress 2012. 30-Sep. 2012. Vienna

国内学会

1) 江本成伸,山口博紀,山下裕玄,石神浩徳,北山丈二,渡邊聡明. 胃癌腹膜播種に対するナノミセル化抗癌剤 NK105 の腹腔内投与による治療効果. 第112回日本外科学会定期学術集会. 2012年4月14日.千葉.

2) 江本成伸,山口博紀,北山丈二,渡邊聡明. ナノミセル化パクリタキセルの腹腔内投与の腹膜播種への抗腫瘍効果と薬物動態. 第71回日本癌学会学術総会. 2012年9月19日. 札幌.

3) 江本成伸,北山丈二,山口博紀,山下裕玄,石神浩徳,渡邊聡明. 胃癌腹膜播種に対する腹腔内化学療法における Drug delivery system (DDS)の工夫. 第20回日本消化器関連学会週間. 2012年10月12日. 神戸.

4) 石神浩徳, 山口博紀, 北山丈二. 胃癌腹膜転移に対する集学的治療. 第20回日本消化器関連学会週間. 2012年10月13日. 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録
特になし

3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

分担研究報告書

マロン酸修飾ヒアルロン酸／CDDPナノゲルの開発に関する研究

研究分担者： 山口 博紀（東京大学医学部附属病院・助教）

【研究要旨】

我国の死亡原因の上位を占める胃がんの死亡原因で最も多いのが腹膜播種である。腹膜播種の効果的な治療法を確立することは、国民が希望を持って、充実した健康な生活を送る上で極めて重要な国家的課題である。近年胃がん腹膜播種に対し、タキソール腹腔投与の静脈投与に対する有効性が臨床試験で示された。しかしセカンドラインとして期待されるシスプラチン（CDDP）は動物実験レベルでも腹腔からのクリアランスが速く、投与方法が課題である。さらに診断には非侵襲的な腹腔鏡の使用が標準となり、腹腔鏡と連動した投与方法が期待されている。そこで我々は、新たにCDDP担持ヒアルロン酸（HA）ナノゲルの作製を行っている。加えてクリックケミストリーを架橋反応に利用した、腹腔鏡で注入しながら、生体内で迅速架橋する新規in situ架橋ゲルを開発する。最終的に両者を融合し、HAナノゲルを含有したin situ架橋ゲルをマウス腹膜播種モデルに適用し、腹腔中で1週間に渡りCDDPを徐放し、3回投与で播種単数を5%以下まで消失させ、臨床検討への基盤を作ることを目標としている。

本年度は、イミノ二酢酸よりもCDDPを強く配位するマロン酸をリガンドとして持つヒアルロン酸(HA-MA)の開発を行った。さらに腹膜播種細胞を用いてその生体適合性を検証した。

A. 研究目的

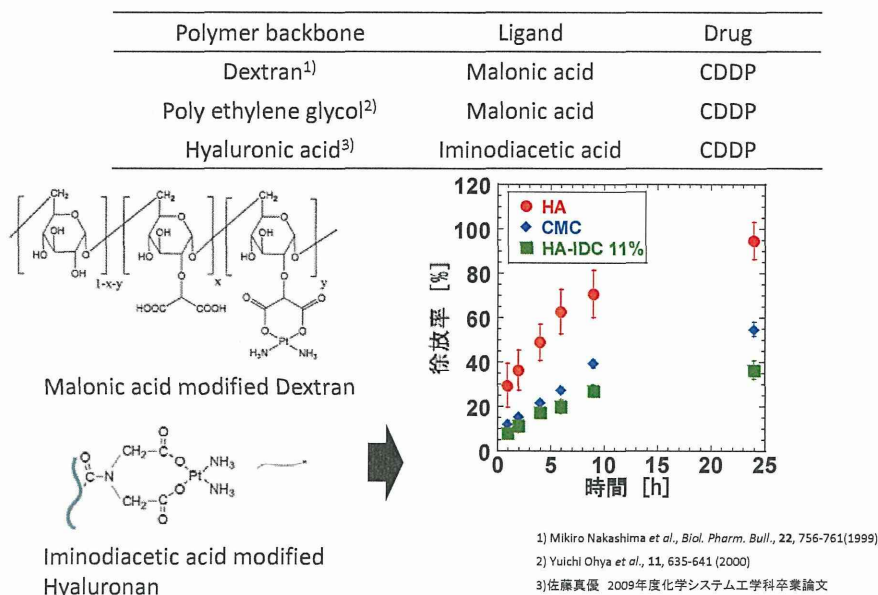


図1 CDDP 配位子を導入したポリマー：3)は本研究

本研究ではイミノ2酢酸 (IDA) を修飾した HA をナノゲル担体として用いてきた。しかし HA-IDA と CDDP 錯体形成定数をより向上させる必要性が示唆された。図1に示すように、マロン酸 (MA) はデキストランやポリエチレングリコールに導入して、CDDP との配位が検討されている。そこで本研究でもマロン酸に着目した。

すなわち本研究では、図2に示すようなマロン酸修飾ヒアルロン酸 (HA-MA) を合成し、CD44 と HA の相互作用を維持しながら、HA-IDA よりも安定なナノゲルの作製を目的とした。

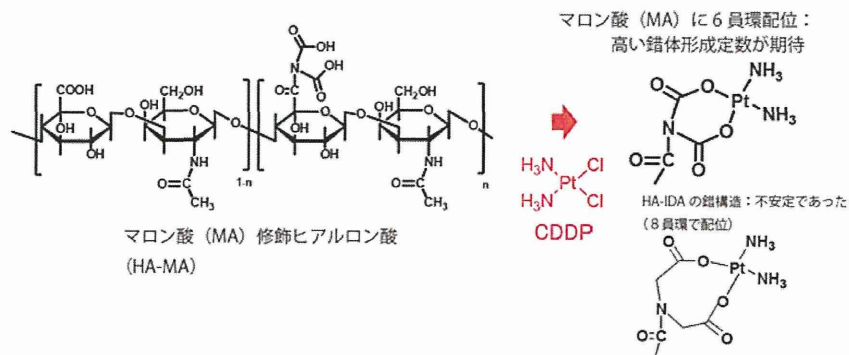


図2 HA-MA の開発

B. 研究方法

B-1. HA-MA の合成

下記の合成スキームで HA-MA の合成を行った。

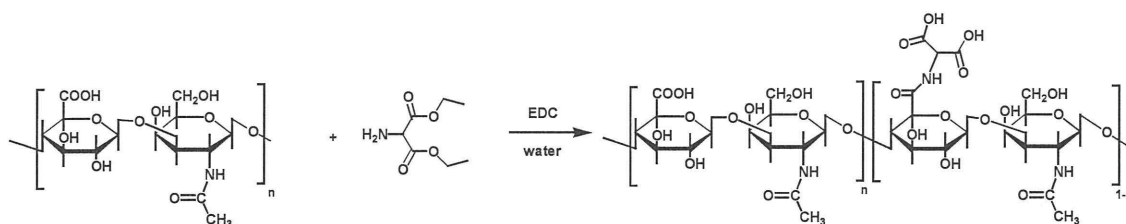


図3 HA-MA の合成スキーム

- 1) 200 mL ナスフラスコに HA (FCH-SU) 0.20 g (1 eq) を加え、milliQ 水 40 mL を注いで 2 h 攪拌、溶解後、pH を 7.0 に調節した。
- 2) EDC 0.28 g (3 eq) を milliQ 水 1.2 mL に溶解させパストゥールピペットを用い添加した。
- 3) 以降遮光下で行った。
- 4) アミノマロン酸ジエチル塩酸塩 0.34 g (5 eq) を 1 N NaOH 水溶液 4 mL に溶解し添加した。1 滴ごとに pH 5.0 前後に調整した。
- 5) 30 分おきに pH を 5.0 前後に調整した後、1 昼夜攪拌した。
- 6) 1N NaOH aq 15mL を添加し 2 日攪拌した。
- 7) 透析後、凍結乾燥を行った。

B-2. HA-MA の錯体形成挙動

HA-MA と CuCl₂ と錯体形成を行い、UV-vis スペクトル測定を行った。

B-3. HA-MA の細胞毒性の検証

石神の項と同様の方法で、HA-g-PAA の代わりに HA-MA を用いて、中皮細胞株 (CRL-9444) に対して、MTT assay を行った。

(倫理面への配慮)

特に必要なし。

C. 研究結果

C-1. HA-MA の合成結果

下図に合成した HA-MA の ^1H NMR を示す。a のピークの積分値が実験値 0.434 となりアセチル基の積分値との比から、43.4%の修飾率となった。

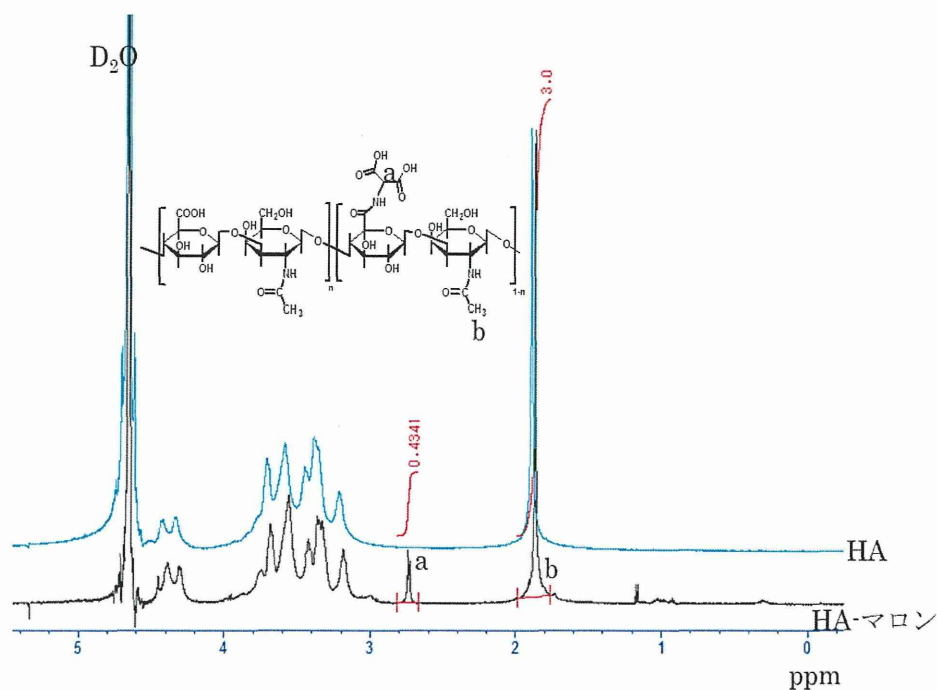


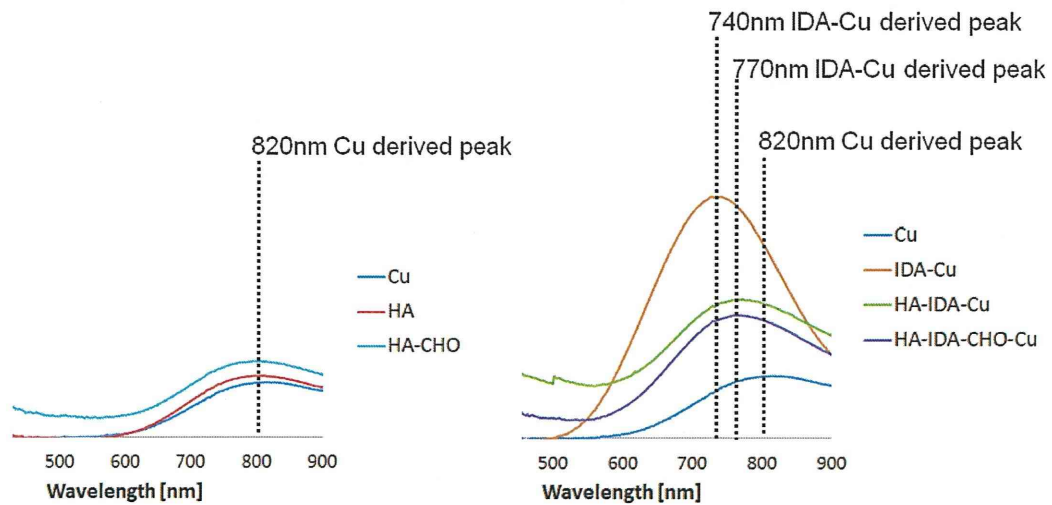
図4 HA-MA の ^1H NMR

C-2. UV-vis 測定による錯体形成能の確認

UV-vis スペクトルは金属イオン錯体の構造を反映する。ゆえに UV-vis 測定によって、錯配位が起きているかを検証できる。

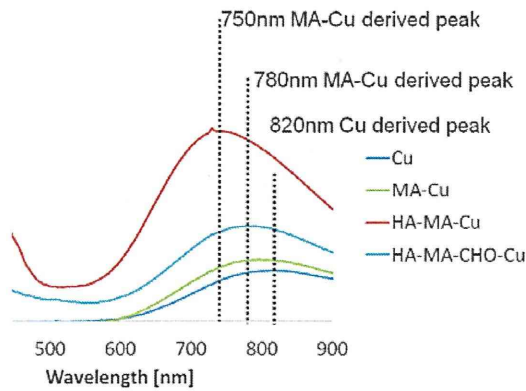
まず HA あるいは HA-CHO (HAX ゲルのアルデヒド修飾 HA) と CuCl_2 を混合しても、スペクトルの変化が起きない一方で、HA-IDA と HA-MA では、最大波長が低波長側へシフトしている。HA-IDA-CHO と HA-MA-CHO (HA-IDA、HA-MA を HA-CHO と同様の過ヨウ素酸酸化でアルデヒド化したもの) も同様に Cu イオンと錯体を形成しているが、その挙動は HA-IDA や HA-MA と異なることもわかる。

確かに配位子として MA が導入されていることが示された。



HA 及び HA-CHO (対照実験)

IDA、HA-IDA、HA-IDA-CHO (対照実験)



MA、HA-MA、HA-MA-CHO

図5 HA-MA と CuCl₂ (モル比 1 : 1) 水溶液の UV-vis スペクトル

C-3. 中皮細胞への生体適合性

中皮細胞株の生存率の HA-MA 濃度依存性を図 6 に示す。

HA-MA-CHO が濃度 1wt% (10mg/mL) で毒性が見られているが、HA-MA は前年度までに報告した HA-IDA と同様に、生体適合性は良好であった。

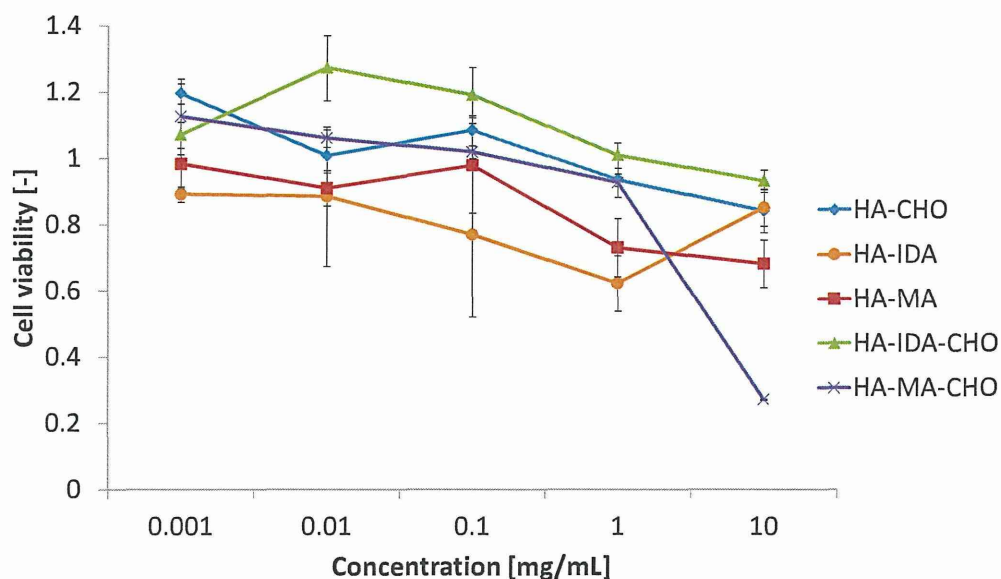


図6 HA-MA 及び HA-MA-CHO の MTT assay 結果

D. 考察

HA-MA、HA-IDA の錯体形成定数は新規な物質であるために、CDDP を含めた金属イオン、あるいは金属錯体との、錯体形成定数や配位子交換反応の速度定数等が未知である。今後、滴定実験等によって錯体形成定数を評価する必要がある。

E. 結論

本研究で目指す CDDP 徐放ハイブリッドゲルシステムのナノゲル担体、あるいは *in situ* 架橋ゲル担体として期待される HA-MA の合成と *in vitro* での生体適合性を、中皮細胞株の MTT assay によって示した。今後 CDDP 担持と徐放特性の評価等を行い、動物実験レベルでの評価をすすめていく。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakai Y, Ishigami H, Isayama H, Sasaki T, Kawakubo K, Kogure H, Emoto S, Yamaguchi H, Kitayama J, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Tada M, Koike K. Role of intervention for biliary and gastric/intestinal obstruction in gastric cancer with peritoneal metastasis. *J Gastroenterol Hepatol.* 27 (121) 1796-800, 2012

2) Emoto S, Ishigami H, Yamaguchi H, Yamashita H, Kaisaki S, Kitayama J. Clinical significance of CA125 and CA72-4 in gastric cancer with peritoneal dissemination. *Gastric Cancer.* 15(2):154-161. 2012

3) Emoto S, Yamaguchi H, Kishikawa J, Yamashita H, Ishigami H, Kitayama J. Antitumor effect and pharmacokinetics of intraperitoneal NK105, a nanomicellar paclitaxel formulation for peritoneal dissemination. *Cancer Science.* 103(7): 1304-1310. 2012

4) Emoto S, Ishigami H, Hidemura A, Yamaguchi H, Yamashita H, Kitayama J, Watanabe T. Complications and management of an implanted intraperitoneal access port system for intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Japanese Journal of Clinical Oncology.* 42(11): 1013-1019.2012

5) Kitayama J, Ishigami H, Yamaguchi H, Yamashita H, Emoto S, Kaisaki S. S-1 plus intravenous and intraperitoneal Paclitaxel for gastric cancer with peritoneal metastasis. *Gastrointest Cancer Res.* 3(Suppl1). S10-3. 2012

2. 学会発表

国際学会

1) H. Ishigami, S. Kaisaki, H. Yamaguchi, H. Yamashita, S. Emoto, J. Kitayama Phase I study of weekly intraperitoneal paclitaxel combined with S-1

and oxaliplatin for gastric cancer with peritoneal metastasis 2012 ASCO
Gastrointestinal Cancers Symposium. 19-Jan. 2012. San Francisco

2) H. Ishigami, J. Kitayama, H. Yamaguchi, S. Emoto, T. Watanabe. Phase
II study of intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for
gastric cancer with metastases to the distant peritoneum. 37th ESMO Congress
2012. 30-Sep. 2012. Vienna

国内学会

1) 江本成伸,山口博紀,山下裕玄,石神浩徳,北山丈二,渡邊聡明. 胃癌腹膜播
種に対するナノミセル化抗癌剤 NK105 の腹腔内投与による治療効果. 第 112
回日本外科学会定期学術集会. 2012 年 4 月 14 日. 千葉.

2) 江本成伸,山口博紀,北山丈二,渡邊聡明. ナノミセル化パクリタキセルの
腹腔内投与の腹膜播種への抗腫瘍効果と薬物動態. 第 71 回日本癌学会学術総会.
2012 年 9 月 19 日. 札幌.

3) 江本成伸,北山丈二,山口博紀,山下裕玄,石神浩徳,渡邊聡明. 胃癌腹膜播
種に対する腹腔内化学療法における Drug delivery system (DDS)の工夫. 第 20
回日本消化器関連学会週間. 2012 年 10 月 12 日. 神戸.

4) 石神浩徳, 山口博紀, 北山丈二. 胃癌腹膜転移に対する集学的治療. 第
20 回日本消化器関連学会週間. 2012 年 10 月 13 日. 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
伊藤大知	ヒアルロン酸の活用と研究開発テーマの発掘	春日務	技術シーズを活用した研究開発テーマの発掘	株式会社技術情報協会	東京	2013	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
山口 博紀, 北山 丈二, 名川 弘一	【播種治療の展望】胃癌播種病変に対する腹腔内化学療法効果発現の根拠	Surgery Frontier	19巻2号	139-143	2012.06
江本 成伸, 山口 博紀, 石神 浩徳, 山下 裕玄, 北山 丈二	胃癌腹膜播種に対するナノミセル化抗癌剤NK105の腹腔内投与による治療効果	日本外科学会雑誌	113巻臨増2	436	2012.03
山口 博紀, 江本 成伸, 山下 裕玄, 石神 浩徳, 北山 丈二	パクリタキセル腹腔内投与の基礎研究と臨床応用 胃癌腹膜播種克服に向けて	日本外科学会雑誌	113巻臨増2	437	2012.03
石神 浩徳, 北山 丈二, 山口 博紀, 江本 成伸, 渡邊 聡明	【Stage IV 胃癌に対する治療戦略】腹膜播種陽性胃癌に対する集学的治療	癌と化学療法	39巻13号2	2460-2463	2012.12
江本 成伸, 石神 浩徳, 山口 博紀, 北山 丈二, 渡邊 聡明	腹腔内化学療法を含む集学的治療により5年生存が得られた胃癌腹膜播種の1例	日本臨床外科学会雑誌	73巻増刊	991	2012.10

江本 成伸, 山口 博紀, 亀井隆雄, 須原 宜史, 鈴木 幸光, 伊藤 大知, 石神 浩徳, 北山 丈二, 渡邊 聡	腹膜播種に対するシスプラチン担持 in situ 架橋ゲルを用いた腹腔内化学療法	日本癌治療学会誌	47巻3号	2684	2012. 10
山口 博紀, 石神 浩徳, 江本 成伸, 北山 丈二, 渡邊 聡	パクリタキセル腹腔内投与併用化学療法 of 肉眼的腹膜播種陽性胃癌に対する高度医療制度下第 2 相臨床試験	日本臨床外科学会雑誌	73巻増刊	550	2012. 10
石神 浩徳, 北山 丈二, 山口 博紀, 江本 成伸, 渡邊 聡	【腹膜播種陽性胃癌に対する集学的治療戦略	日本臨床外科学会雑誌	73巻増刊	547	2012. 10
山口 博紀, 北山 丈二, 江本 成伸, 石神 浩徳, 渡邊 聡	胃癌腹膜播種の手術適応判定における腹腔洗浄液中 CEA mRNA 定量の有用性	日本癌治療学会誌	47巻3号	1466	2012. 10
石神 浩徳, 北山 丈二, 山口 博紀, 江本 成伸, 渡邊 聡	腹膜播種陽性胃癌に対する腹腔内投与併用療法 新規集学的治療体系の確立を目指して	日本癌治療学会誌	47巻3号	930	2012. 10
山口 博紀, 江本 成伸, 山下 裕玄, 石神 浩徳, 北山 丈二	胃癌腹膜播種腹腔洗浄液中 CEA mRNA 定量値と細胞診の比較検討 腹膜播種の早期診断に向けて	日本胃癌学会総会記事	84回	228	2012. 02
石神 浩徳, 山口 博紀, 山下 裕玄, 江本 成伸, 北山 丈二	Stage IV 胃癌に対する集学的治療 腹膜播種陽性胃癌に対する集学的治療	日本外科学会雑誌	113巻臨増2	193	2012. 03

山口 博紀, 北 山 丈二, 渡邊 聡明	Stage IV 胃癌に対す る化学療法と手術 の役割 胃癌腹膜播 種に対する腹腔内 化学療法後の手術 適応の判定におけ る腹腔洗浄液中 CEA mRNA 定量の意義	日本消化器 病学会雑誌	109巻臨増	A682	2012. 09
----------------------------	--	----------------	--------	------	----------

