

201220063A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療の開発

平成24年度 総括・分坦研究報告書

研究代表者 石川義弘

平成25（2013年）年5月

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療 の開発に関する研究

平成24年度 総括・分坦研究報告書

研究代表者 石川 義弘

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療 の開発に関する研究 ----- 1

石川 義弘

II. 分担研究報告

1. 悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療 の開発に関する研究
(器械装置の開発) ----- 1 3

竹村泰司

2. 悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療 の開発に関する研究 ----- 3 3
(化学合成設計)

井上誠一

3. 悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療 の開発に関する研究 ----- 3 6
(MR I 技術の検討)

青木伊知男

4. 悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療 の開発に関する研究 ----- 4 1
(磁性設計の検討)

江口晴樹

5. 悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療 の開発に関する研究 ----- 5 5
(臨床試験の検討)

浦野 勉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 6 0

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 6 6

[I]

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
（総括担）研究報告書

悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん剤治療 の開発に関する研究

研究代表者 石川義弘 横浜市立大学大学院・教授

研究要旨

悪性中皮腫の発症は、石綿曝露後数十年を経ることが多いため高齢者が多く含まれる。早期診断は必ずしも容易でなく、診断時には腫瘍の進展から根治的外科手術の適応にならない症例も多い。この場合は放射線ないし化学療法の適応であるが、副作用の発現頻度の高い高齢者には化学療法は必ずしも推奨されておらず、高齢者にも安心して使用できる悪性中皮腫抗がん治療の開発が必要である。一部では補助療法として温熱療法（ハイパーサーミア）の有効性が報告されている。

我々の先行研究において、磁性を有する抗がん剤化合物が複数同定された。これは造船業界における物性材料の評価手法を医薬品化合物に応用したものであり、有機エレクトロニクス開発など一般業界ではすでに普及している技術である。磁性抗がん剤は、化合物自身が磁性体であり、かつ抗がん剤である。シスプラチンなどの抗がん剤と同等の抗腫瘍効果を持つだけでなく、磁場誘導を活用することにより、少量で強力な抗がん作用を示すことが期待されている。

本研究では、磁性抗がん剤の磁性特性を活用することにより、悪性中皮腫に対する有効性の高い治療法として開発することを検討した。我々の開発した新規磁性体抗がん剤は、悪性中皮腫細胞に対しても強い抗がん活性を示すことがわかった。さらに中皮腫細胞は、温熱療法との併用によって、細胞殺傷効果が亢進することが培養細胞実験から判明した。また動物モデルを用いた検討では、胸腔内に注入した磁性抗がん剤を、胸壁に植え込んだ永久磁石を用いて局所胸膜に集積できることを証明した。これらの結果は、旧来の抗がん治療に比して副作用の少ない薬剤量で効率的な治療が可能になることを意味する。また共同研究者の研究では、磁性抗がん剤による磁場発生メカニズムについて検討をおこない、理論的な磁性発生特性を検討した。さらに磁性体による交流磁場印加による温熱発生の最適化についての検討をおこなった。さらに磁性化合物の合成にかかわる諸条件について検討を加えるとともに、MRIによる磁性抗がん剤の可視化について、緩和時間の調節が必要であることが判明した。また磁性抗がん剤の臨床試験、実用化に向けた検討をおこなった。

このような結果から、これまでの抗がん療法では治療困難とされていた悪性中皮腫に対して、とりわけ高齢者でも安心して適応できる副作用の少ない、安全でかつ安心して抗がん治療を開発することが可能となると考えられる。本研究成果は、医工連携のみならず、多施設共同研究であり、さらに産学連携のプラットフォームを活用する事により、一般産業界の技術を医学応用する。また放医研を中心とした異分野による学際的な連携により、分子イメージングの画像診断技術を取り入れ、さらに臨床開発に向けた円滑な推進を進め、我が国から世界に向けて新規抗がん治療技術として悪性中皮腫の治療法を開発していくことが可能になると期待される。

分担研究者氏名

竹村泰司 横浜国立大学大学院 教授

井上誠一 横浜国立大学大学院 教授

青木伊知男 (独)放射線医学総合研究所
チームリーダー

江口晴樹 横浜市立大学大学院 客員准教授

浦野 勉 横浜市立大学大学院 客員教授

石川 義弘 (研究代表者)

A. 研究目的

本申請研究では悪性中皮腫に対する新規治療法の開発を目的とした。本研究の背景となる悪性中皮腫に関する課題は、下記のようにまとめることができると考えられる。

悪性中皮腫は胸膜中皮に由来する腫瘍であり、石綿曝露との関連が強く、今後10年間で倍増が予測される。石綿曝露から悪性腫瘍発生までに数十年を要するため、因果関係の証明が困難でもある。平均的な発症年数は25-50年であり、40年が目安とも言われているが、明らかになっていない。石綿の吸入は、労働作業に伴うもののみならず、石綿工場の近隣でも見られるため、はっきりとした因果関係を証明することが困難になるからである。

なお日本肺癌学会による「悪性胸膜中皮腫」の診療ガイドラインでは以下に記載されている。

中皮腫患者のうち70~80%にアスベスト吸入歴を持ち、高濃度アスベストの吸入歴を持つ者の個々の生涯リスクは最大20%とされる(III)。アスベスト曝露開始から中皮腫発生までの潜伏期間は25-50年とされる(III)。アスベスト鉱山の労働者が最大のリスクであるが、造船業やアスベストセメント、建物などの試用した絶縁体に関わる労働者のリスクも高いとされている。(III)

クロシドライト(青石綿)およびクリソタイル(白石綿)のいずれもがハザードとなる(III)。

自然界およびアスベスト関連施設やその近隣に存在する空気中のアスベスト繊維によってもアスベストの吸入がなされるが、低濃度アスベストの長期吸入のリスクは不明である(IV)。アスベスト吸入レベルの安全域は確定されていないが、25繊維・年/ml以上でリスクが増すと報告がある(IV)。Simian virus 40 (SV40)が中皮腫リスクを増加させるとの報告があるが、最近の報告ではない論文も少なくない(IV)。その他の危険因子として、金属、ゴム、ガラス、サトウキビの繊維、人工鉱物繊維、ゼオライトなどの吸入や、胸膜癒着、食事、呼吸器感染症、放射線などの報告があるが、症例数が少なく、さらなる研究が必要である(V)。不純物としてアスベストが混入していない限り、耐火セラミック繊維、タルクの吸入は中皮腫の発生に関連しないと報告がある(IV)。中皮腫は、50~70歳代に多く、男女比はおよそ4:1とされるが、日本では女性の比率がこれよりも高い(III)。

経年的な考察を行うと、国内の石綿使用は、平成16年に白石綿などの石綿を含有する石綿セメント円筒等の製品の製造等が禁止されたことにより、国内においては石綿使用量の大部分が削減された。従って新規石綿使用に関わる悪性中皮腫の発生は、今後40年を経て、大きく減少していくと考えられる。しかるにこれまでに建設業において使用された石

綿は、解体作業に際して被爆の対象となることが考えられる。この点からは、既存の石綿使用の建築物が全て建て替えられるまで、石綿被爆のリスクは続くと考えられる。

とりわけ建造物の解体作業に携わる労働者にとって、事業者に求める措置の内容が特定化学物質等障害予防規則に定める他の化学物質とは大きく異なることとなる。このため将来において、建築物の解体等の作業における曝露防止対策を図った単独の規則を制定し、石綿による健康障害防止対策の一層の推進を図ることが重要となると考えられる。

そこで悪性中皮腫に対する診断と治療の現状に関しては下記の点が重要になると考えられている。

(いずれも悪性胸膜中皮腫の診療ガイドラインによる)。

集団検診について、悪性胸膜中皮腫早期発見のために胸部単純X線を用いて集団検診をしたという報告は数少ない。アスベスト曝露労働者を対象とした胸部単純X線による経過観察調査では、悪性胸膜中皮腫による悪性胸水貯留患者を検出できるとしている (V)。悪性胸膜中皮腫死亡率の低下に触れたものは見出せず、死亡率の低下を目的として胸部単純X線を用いて集団検診を行うことを勧めるだけの根拠は見出せない。

悪性胸膜中皮腫の早期発見のために胸部CTを用いて検診をしたという報告は見出せない。肺癌発見のために、602人のアスベスト曝露労働者を対象として胸部CTによるスクリーニングを行ったフィンランドからの報告では、肺癌や胸膜プラークを発見したが悪性胸膜中皮腫を発見したという記述はみられなかった (V)。したがってX線被曝や発見頻度を考慮すると、CTを用いて悪性胸膜中皮腫発見のために検診を行うことを勧めるだけの根拠は現時点では見出せない。

また汎用される胸部写真については以下のエビデンスが記載されている。

胸部単純X線は、悪性胸膜中皮腫を画像上で検出する診断法のひとつであり、簡便さと侵襲度の低さからも勧めることができる。特にアスベスト曝露者に経時的に胸部単純X線を撮影して比較読影を行うことは胸膜中皮腫の検出に役立つ (V)。しかし同時に早期診断の点では限界もある (V)。CTは、単純X線では描出困難な胸膜肥厚、および少量の胸水貯留などの発見に優れていること、あるいは単純X線で既存構造との重なりのある部分における病変検出能が単純X線に比べて優れていることから、検出方法として勧めることができる。しかし単純X線とCTの診断能を比較した報告は1990年代以降、数少ないため、必ずしも検出方法の現状を反映しているとは言えない (V)。

単純X線およびCTで検出できる悪性胸膜中皮腫はある程度進行した症例であって、画像診断が悪性胸膜中皮腫の早期発見に役立つという証拠は見出せない。

また血液マーカーによる検出に関しては、SMRP (soluble mesothelin-related protein) を中皮腫の血清腫瘍マーカーとして用いた場合、感度84%、特異度98%、同様にOsteopontinが感度78%、特異度86%との報告がある。(エビデンスレベル：V) しかし、それらを検診に用いた報告はみられない。(エビデンスレベル：VI) Mesothelinおよびosteopontin以外の中皮腫の血清もしくは胸水腫瘍マーカーとしては、cyfra 21-1, tissue polypeptide antigen (TPA), hyaluronic acidが報告されているが、中皮腫における特異性は低い。(エビデンスレベル：V) また、血清もしくは、胸水中のCEA上昇は中皮腫を否定するひとつの根拠となる。(エビデンスレベル：V)

さらに複合的な画像診断については以下の記載が重要とされている。

CTは悪性胸膜中皮腫の質的診断あるいは病期診断に有用である。CTは良性胸膜腫瘍と悪性胸膜腫瘍の鑑別診断に役立つ。悪性胸膜中皮腫に優位に見られる所見は、葉間胸膜への浸潤と1cm以上の胸膜肥厚、肺を覆うような胸膜に沿った進展、縦隔側胸膜への浸潤、結節状の胸膜肥厚であり、これらの所見は他の胸膜疾患との鑑別に有効である

(V)。また胸壁や横隔膜への進展、リンパ節転移診断などの術前の病期診断に有用である(V)。また胸壁の厚みの定量化にもCTが用いられている(V)。

MRIは、悪性中皮腫の病期診断にはCTとほぼ同等であるが、費用の点を考えるとCTを標準的な画像診断法として用いることが勧められる(III)。一方で、MRIは横隔膜や縦隔への病巣の進展を評価したり、胸膜プラークとの鑑別診断に有用であるとする報告もある(V)が、術前の正確な病期診断には不十分であるとする報告もある(V)。CTは胸膜中皮腫の診断に標準的な画像診断法として勧められ、MRIはCTのみでは病変の評価が困難な場合に行うことが勧められる。

FDG-PETに関しては、胸膜悪性中皮腫の質的診断や進展範囲の診断に優れる、とする報告が多い

(V)。特に全身を一度に撮影できるため、遠隔転移の評価に優れるとの報告もある(V)。また最近の報告では、PETとCTの融合画像がCT単独による画像に比べて、縦隔リンパ節や遠隔臓器への転移を診断することに関して有用とされる。

FDG-PETで高いSUV値を示す悪性中皮腫は予後が悪いとする、FDG集積画像を用いた予後予測の報告もある(V)。

この事実からも悪性中皮腫の早期診断は必ずしも容易ではないことが、現況から推測されている。

さらにこれらの診断が確定した悪性中皮腫に対しての治療であるが、主流となる化学療法については以下の指針が出されている。

切除不能胸膜中皮腫および術後再発症例に対する主たる治療法は化学療法であり、腫瘍縮小、症状緩和、延命効果が期待される。悪性胸膜中皮腫は比較的稀な疾患であるため、対症療法と化学療法を比較した第III相試験は行われておらず、化学療法の生存期間延長効果は直接には証明されていない。

つまり悪性中皮腫症例に対して、外科的根治が困難であり、放射線や化学治療にも抵抗性が強い症例については、治療成績は極めて低い。抗がん剤としてシスプラチン、ないしペメトレキセドとの併用療法が主体だが、抗がん剤の投与量は、副作用の発現によって制限される。とりわけ石綿被爆から数十年を要するために、患者の年齢層が高くなり、このことは高齢者を対象とした悪性中皮腫の治療法を確立する必要があることを意味する。

また一部の大学病院では、対症療法の一部として、温熱療法の併用が施行されており、症状の緩和には極めて有効とされる。しかるにこの治療上の現状も、必ずしも科学的な検証データに基づいたものではない。

本申請では治療困難とされる悪性中皮腫に対して、新規抗がん剤を用いた化学療法と温熱(ハイパーサーミア)の「同時療法」を検討することを目的とした。とりわけ我々の開発した新規抗がん剤は、強い磁性特性を持ち、体表面からの磁場誘導が可能であることが予測される。これにより少量投与で胸膜病変部への抗がん剤の磁場集積が可能とする。この特性は、とりわけ今後症例数が増加すると考えられる高齢者に対しては重要になると考えられる。

さらに交流磁場印加にて温熱作用を持つため、抗がん治療と温熱治療を同時に施行することができる。このため旧来の温熱治療では得られなかった、強い相乗治療効果を得ることが期待される。また磁性特性を利用したMRIによる定量が可能であり、胸壁の腫瘍への集積だけでなく、肝腎への移行が定量できるため、治療効果と副作用の発現を、客観的に予測することができる。

B. 研究方法

磁性抗がん剤はシスプラチン類似の抗がん剤化合物であり、マグネタイトに匹敵する磁性を持ち、磁石で誘導が可能である。シスプラチンに匹敵する抗がん作用を有して、様々な腫瘍に対して抑制作用を示す。交流磁場印加によって発熱作用を示す。MRIの造影剤として機能する、などの特性が知られている。すでに様々な動物モデルにおいて、悪性黒色腫、骨肉種、扁平上皮癌において有効性が検討されている。本研究においては、複合特性を持つ新規磁性抗がん剤を、悪性中皮腫に対する単剤で多機能をもつ抗がん治療薬として開発し、高齢者にも安心して使える抗がん治療法を開発することとして検討を行った。

中皮腫細胞における薬理実験

これまでのがん治療では、抗がん剤治療と温熱治療（ハイパーサーミア）を同時に行うことは困難であった。しかし磁性抗がん剤は化合物自身が、抗がん剤であり発熱体である。そのために、交流磁場印加によって容易に発熱し、温熱療法を同時に加えることができる。培養細胞を用いた実験では扁平上皮癌では抗がん作用と温熱作用を同時に加えることにより、圧倒的な抗がん作用の増強が得られることがわかった。そこで実験動物において抗がんと温熱の同時療法により、効果的ながん治療を確立することを狙った。

すでにマウスやウサギを使った実験では、様々な腫瘍モデル（マウス尾部の悪性黒色腫、マウス下肢の前立腺転移癌、ウサギ下肢の骨肉種、ウサギ舌の扁平上皮癌）において磁場誘導、抗がん作用、温熱作用による相乗効果を検証している。とりわけヒト悪性黒色腫を免疫不全マウス皮膚に移植したモデルにおいて、腫瘍退縮効果の磁場による増強と、MRIによる薬剤の定量を検証させた。

そこで悪性中皮腫に対する磁性抗がん剤の薬理効果を、放医研において維持されたヒト由来の悪性中皮腫細胞を用いて、様々な培養環境を検討し、磁性抗がん剤がどのような抗がん作用を示すのかを検討した。

さらに温熱療法が、一部の高度医療機関において、悪性中皮腫に対して施行されているが、必ずしも実験的なエビデンスに基づくものではない。症状の緩和には極めて有効であるとの報告もあるが、果たして細胞レベルでどのような効果があるのかは不明である。そこで我々の実験系において、培養悪性中皮腫細胞に対して、様々な温熱刺激を施工し、細胞の生存性を検討した。

磁場誘導実験

同様に日本人ヒト悪性中皮腫を免疫不全マウスに移植したモデル（理化学研究所バイオリソースセンター・中皮腫モデル動物）において、新規磁性抗がん剤による磁性抗がん治療（化学療法・温熱療法・磁場誘導）を開発することを目標とした。

特に本年度は、このような動物モデルにおいて、磁場誘導による磁性抗がん剤の局所集積が可能であるかの検討を初年度は行った。悪性中皮腫は、胸膜由来のガンであるために、すい臓がんや肝癌などと比較して、胸壁に近い部位に発生することが主である。いわゆる体表からの距離で考えると

数センチ以内であることがほとんどであり、このような至近距離に対しては、体表からの磁場誘導が強力に作用することが知られている。

さらに使用する誘導磁場の性能についても検討を行った。一般に磁場形成は、磁石が強力であることが必須とされ、これには超伝導体を使用した大掛かりな磁場発生装置から、中型の電磁石が相当する。

さらに極めて汎用性の高いのが、永久磁石である。永久磁石にも極めて汎用性の高い市販品から、特殊鋼を用いた強力な永久磁石まで様々である。しかるに本年度の研究においては、できる限り汎用性の高い、一般的に入手可能である永久磁石を用いての誘導が可能であるかを中心に検討を行った。

また永久磁石を用いた誘導も、磁石自身を胸腔内に設置する侵襲的な方法の検討を進めるとともに、可動性の少ない皮下植え込み法や、さらには汎用性および安全性が高いと考えられる装着型の設置方法に関する検討を行った。これらの設置に関しては、あらかじめ物理的な磁場強度を、それぞれの永久磁石において検討し、磁性抗がん剤の磁場強度における誘導の容易性を、検討項目のパラメータとして設定した。本検討の準備検討として、SQUID等の磁場磁化曲線による物理特性のデータを元とし、磁性抗がん剤の汎用性の検討に応用した。

胸壁近くこれまでの検討では、皮膚などの浅部がんに対しては、市販の棒磁石あるいは電磁石で効率的なドラッグデリバリーが達成できることを検証しており、これらの結果を活用した。

MR Iによる分子イメージング

放医研ではPET等を用いた分子イメージング技術により、中皮腫の早期診断システムの構築研

究をおこなってきた。そこで蓄積された知見を、磁性抗がん剤のMR I定量技術へと応用することを検討した。PETによる分子イメージング技術で中皮腫の早期発見を行い、磁性抗がん剤を用いたMR Iによって薬剤集積を評価する手法を開発した。

C. 研究結果

このように、研究手法としては、我々の開発する新規磁性抗がん剤化合物をすべての実験において使用した。同薬剤はシスプラチン類似薬であり、IHI（株）（旧石川島播磨重工業）の造船業における材料開発技術を、医薬品化合物開発に応用して開発された基盤研究に基づく（産学連携）。横浜市立大学先端医科学研究センターの援助を受けて実用化の検討段階に移行しており、すでに多数の国内・国際特許によっても支持された独占的な先進技術である（独占的技術）。工学部の専門家による温熱・磁場装置の試作を検討している（医工連携）。

中皮腫細胞における薬理実験

悪性中皮腫に対する磁性抗がん剤の薬理効果を、放医研において維持されたヒト由来の悪性中皮腫細胞を用いて、様々な培養環境を検討し、磁性抗がん剤がどのような抗がん作用を示すのかを検討した。

磁性抗がん剤は、これまでに様々な培養がん細胞において、その治療効果が検討されており、ヒト由来の悪性中皮腫細胞においても、同様の強い殺傷効果が実証された。細胞障害性は、培養時間および薬剤濃度依存性であり、これはこれまでに検討された他のがん細胞と類似する。いわゆる細胞死の誘導に関してもファックスを利用した細胞周期ごとの検討もなされ、これらの実験結果では

強い細胞毒性があることが明らかとなった。

いわゆるがん細胞を温熱に晒してがん細胞の殺傷を強めるという温熱療法が、一部の高度医療機関において、悪性中皮腫に対して施行されているが、必ずしも細胞実験的なエビデンスに基づくものではない。

ヒトにおいては症状の緩和には有効であるとの報告もあるが、果たして細胞レベルでどのような効果があるのかは不明である。そこで我々の実験系においても、培養悪性中皮腫細胞に対して、様々な温熱刺激を施工し、細胞の生存性を検討した。

悪性中皮腫細胞の温度感受性を検討したところ、通常の42度以上の温度曝露によって、細胞活動性が低下することがわかった。これは41.5度以上の比較的高温下において、がん細胞が特異的に細胞生存性を低下させるという事実と一致することがわかった。

さらに温熱曝露によって、磁性抗がん剤自体の抗がん作用がどのように変化するかをの検討をおこなった。いわゆる常温下における抗がん剤の治療効果が、温熱刺激によって加速される可能性の検討をおこなった。悪性中皮腫細胞を用いて、温熱刺激の存在および非存在下で、磁性抗がん剤の細胞殺傷効果を検討したところ、温熱刺激の併用によって、細胞毒性が亢進することがわかった。このことは、磁性抗がん剤は単独においても抗がん細胞作用を持つが、温熱療法との併用によって、その効果が増強することが明らかとなった。

本年度の検討結果では、培養温度を上昇させた場合での検討であり、今後は磁性抗がん剤自体を発熱させた場合の殺傷効果についての検討も必要と思われる。しかるに自家発熱と温度性の温熱変化では、同様の結果が得られることが期待される。

磁場誘導実験

磁性抗がん剤による磁場誘導を検討するために、動物モデルにおいて、磁場誘導による磁性抗がん剤の局所集積が可能であるかの検討を行った。悪性中皮腫は、胸膜由来のガンであるために、肺がんや食道がんなどと比較して、胸壁に近い部位に発生する。いわゆる体表からの距離で考えると数センチ以内であることがほとんどであり、このような至近距離に対しては、体表からの磁場誘導が強力に作用することが理論上可能である。しかるに生体レベルでの検討は十分でない。

誘導磁場の性能については、市販の永久磁石の磁場性能からの検討を行った。一般に磁場形成は、磁石が強力であることが必須とされているが、実用性を考えると超伝導体を使用した大掛かりな磁場発生装置は不適格である。さらに運搬性を考えると、中型の電磁石であっても重量の点で不便と考えられる。これは磁場誘導による局所集積には数時間以上の磁場誘導が有効であると考えられるからである。従ってこのような観点から考察を進めた結果、極めて汎用性の高いのが、小型永久磁石であると考えられた。永久磁石にも汎用性の高い小型市販品から、特殊鋼を用いた強力な永久磁石まで様々である。しかるに医療費に対するコストを考慮すると、できる限り汎用性の高い、一般的に入手可能である永久磁石を用いての誘導が適当であるとの結論に至った。

永久磁石を用いた誘導も、磁石自身の設置方法について検討した。永久磁石自体を胸腔内に設置する方法が考えられたが、極めて侵襲的であり、高齢者に対しては手術の適応性を検討せねばならない。また胸腔内の永久磁石を固定するための装置を考案せねばならない。専門家との検討の結果、可動性の制御が最大の課題となることがわかった。

そこで非侵襲的な方法の検討を進めるとともに、低侵襲性でありかつ、可動性の少ない皮下植え込み法や、さらには汎用性および安全性の高いと考えられる装着型の設置方法の検討を行った。

それぞれの永久磁石において検討し、設置に関しては、あらかじめ物理的な磁場強度と、磁性抗がん剤の磁場強度における誘導の容易性を、患部からの距離の物理的パラメータとして設定した。本検討の準備検討として、磁性抗がん剤に対するSQUID等の磁場磁化曲線による物理特性のデータを再検討した。

第一の検討においては、マウスの胸壁を摘出し、摘出臓器として胸腔内壁に磁性抗がん剤を添加し、この抗がん剤は胸壁外側からの永久磁石で固定できるかを検討した。また永久磁石を固定した条件したで、時間依存的に磁性抗がん剤が胸壁組織に取り込まれるかも検討した。この結果、600ミリテスラ以下の市販磁石での集積が可能であり、3時間の磁場誘導によって、局所への集積が容易に観察できた。

次に生体マウスモデルにおいて、胸壁に永久磁石の植え込みを試みた。植え込みにあたっては、胸壁内に永久磁石が埋込みが可能な、小型磁石が最適と考えられた。そこでベアリング型の直径2mm程度の小球磁石を植え込んだ。植え込んだ動物モデルにおいて、胸腔内に磁性抗がん剤を注入し、自由行動下において48時間後に解剖を行った。胸腔内を開放、摘出し、磁性抗がん剤の分布を組織染色において検討した。この結果、小球磁石の植え込み部位に一致して、磁性抗がん剤の胸壁組織への取り込みが確認された。

小球型の磁石の植え込みは、低侵襲的ではあるが、いわゆるペースメーカー植え込みのようなストレスはともなう。悪性中皮腫の末期患者を対象として考えたときに、侵襲性はできる限り小さく

したほうが望ましいとの結論に達した。そこで、磁石を皮下に埋め込むのではなく、ジャケットに磁石を縫い込んで、磁性ベルトとして動物に装着させる方法を検討した。この方法ではジャケットに植え込み可能なサイズのボタン型の永久磁石を縫い込み、そのベストをマウスに装着させた。

磁性抗がん剤の胸腔内への注入は、植込み型磁石と同条件で行った。またマウスは自由行動下に置かれ、48時間後に同様に胸壁組織を取り出して、磁性抗がん剤の組織染色を行った。この検討においても、ベスト内における磁石相当部位に、磁性抗がん剤の局所集積を確認することができた。

この結果からも、マウス胸腔内に磁性抗がん剤を注入し、マウスを自由に行動させた条件で、市販の磁石で効率的なドラッグデリバリーが達成できることが考えられた。

MRIによる分子イメージング

放医研で蓄積された知見を、磁性抗がん剤のMRI定量技術へと応用した。MRIの撮影条件、特に緩和時間の設定において、定量性の環境を整えることが確認できた。

D. 考察

磁性抗がん剤は有機構成による抗がん剤化合物であり、マグネタイトに匹敵する磁性をもつ。この磁性特性を利用して、磁石で誘導が可能であることが検討されてきた。抗がん作用を利用して、様々な腫瘍に対して抑制作用を示すことがわかっている。また交流磁場印加によって発熱作用を示すため温熱療法との併用が可能になると考えられた。さらにMRIの造影剤として機能するため、局所への集積を画像化することが可能と考えられる。すでに様々な動物モデルにおいて、悪性黒色腫、骨肉種、扁平上皮癌において有効性が検討されているが、悪性中皮腫においても、複合特性を持つ

本抗がん剤を、単剤で多機能をもつ抗がん治療薬として開発し、高齢者にも安心して使える抗がん治療法を開発することが可能と考えられた。

これまでの悪性中皮腫のがん治療では、抗がん剤治療と温熱治療（ハイパーサーミア）を同時に行うことは困難であった。これは中皮腫細胞の温熱特性が十分に検討されていないことと、化学療法と温熱療法が物理的に単剤での施行が困難であることによる。しかし磁性抗がん剤は化合物自身が、抗がん剤であり発熱体であるために、交流磁場印加によって容易に発熱し、温熱療法を同時に加えることができ、そのために併用単剤療法が可能になると考えられる。培養細胞を用いた実験では抗がん作用が確認され、さらに温熱作用を同時に加えることにより、抗がん作用の増強が得られることが、悪性中皮腫細胞を用いた実験からわかった。

現段階では、温熱の発生源として、培養温度の上昇を用いたが、交流磁場印加においても同様の温度上昇が得られることが、これまでの実験から確認されている。そこで次年度は交流磁場印加によって引き起こされる温熱と、磁性抗がん剤による抗がん効果の併用効果の検討が必要になると考えられる。

温熱療法が、一部の高度医療機関において、悪性中皮腫に対して施行されているが、必ずしも実験的なエビデンスに基づくものではない。我々の実験系において、培養悪性中皮腫細胞に対して、様々な温熱刺激を施工し、細胞死の増強を確認できたことから、これらの温熱療法に対する培養実験レベルでのエビデンスが提供できたと考えられている。

本年度の動物モデルにおいて、磁場誘導による磁性抗がん剤の局所集積が可能であるかの検討において、その可能性が強く推測された。磁場誘導はこれまでに検討されている超伝導体などの大規

模な設備を使用する必要がなく、まだ電磁石のような重装備も必要ない可能性が強く示された。我々の検討結果では、小球磁石で十分であり、胸腔内に注入された磁性抗がん剤の集積が達成できることが判明した。悪性中皮腫は、胸膜由来のガンであるために、内蔵がんなどと比較して、体表に近い部位に発生する。いわゆる表面からの距離が極めて短い。このような至近距離に対しては、体表からの磁場誘導が十分であるかは不明瞭であったが、我々の検討から、少なくともマウスなどの小動物での条件下では十分であることがわかった。今後、ヒトなどの大型動物において、どのような磁場条件が必要になるかの検討が必要であると思われる。

使用する磁石の性能についても検討結果を得ることができた。一般に磁場形成は、磁石が大型であることが必須とされ、小型磁石で達成しようと思えば、超伝導体を使用した複雑な磁場発生装置から、高電力を用いた電磁石が必要である。これらの汎用性は極めて低いのが現状である。しかるに本年度の研究結果から、汎用性の高い、一般的に入手可能である永久磁石を用いての誘導が可能であることが判明した。

さらに磁石自身の設置方法に関しても有意義な検討結果が得られた。胸腔内に設置する侵襲的な方法だけでなく、可動性の少ない皮下植え込み法や、さらには汎用性及び安全性が高いと考えられる装着型の設置方法に関しても検討結果を得ることができた。あらかじめ物理的磁場強度をそれぞれの永久磁石において検討し、磁性抗がん剤の磁場強度における誘導の容易性を検討項目のパラメータとして設定する事が重要であると再認識された。このような条件下で、ベストに埋め込んだ永久磁石での活用が有意義であることが判明した。

E. 結論

悪性中皮腫の根治的治療法は胸膜肺全摘出であるが、診断時にはすでに広範に進展していることが多く、外科手術の適応とならない症例が多い。また外科治療の死亡率は高齢者ほど高いため、慎重な対応が必要である（日本肺癌学会ガイドライン）。手術不適応例に対しては放射線療法や化学療法がおこなわれるが、抗がん剤による治療は75歳以上の高齢者には推奨されていない。そのため今後増加が予測されている高齢者に対する悪性中皮腫の抗がん治療は、国民的な解決課題と考えられる。

高齢者にも安心して適応できる悪性中皮腫の治療法は、石綿による悪性中皮腫の増加が予測されるわが国では必須の課題である。高齢者は抗がん剤に対して副作用の発現が高いため、少量で有効な抗がん剤が必要である。また肝腎機能の低下により、副作用の発現の予想が困難である。そこで体表面積から類推するだけでなく、テイラーメード的な投与量の決定が必要である。さらに症状緩和だけを目的とした温熱療法ではなく、治療効果の増強が期待できるハイパーサーミア療法の確立が必要である。

磁性抗がん剤はそのいずれにも対応できる抗がん治療が可能であり、とりわけ「胸膜は胸壁から浅い」ため、磁場による誘導（ドラッグデリバリー）が可能となり、磁性抗がん剤の適応である。

本年度の研究成果から、磁性抗がん剤による高齢者に向けた安心・安全な悪性中皮腫の抗がん治療を開発することが、実現可能であることが強く示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

1. Jiao Q, Takeshima H, Ishikawa Y, and Minamisawa S. Sarcocalumenin plays a critical role in age-related cardiac dysfunction due to decreases in SERCA2a expression and activity. *Cell Calcium* 51:31-9, 2012
2. Umemura M, Ho D, Nozawa N, Balginnyam E, Iwatsubo K, Saito T, Endo T, Ishikawa Y, Umeura S, and Kimura K. Acute pulmonary embolism induced by renal obstruction with benign prostatic hyperplasia; Case Report *Journal of Cardiology Cases* 5: e39-343, 2012
3. Umemura M, Ho D, Nozawa N, Balginnyam E, Iwatsubo K, Saito T, Endo T, Ishikawa Y, Umemura S, Kimura K: Acute myocardial infarction with isolated conus branch occlusion. *J Electrocardiol.* 45:285-7, 2012
4. Kobayashi Y, Hirawa N, Tabara Y, Muraoka H, Fujita M, Miyazaki N, Fujiwara A, Ichikawa Y, Yamamoto Y, Ichihara N, Saka S, Wakui H, Yoshida S, Yatsu K, Toya Y, Yasuda G, Kohara K, Kita Y, Takei K, Goshima Y, Ishikawa Y, Ueshima H, Miki T, and Umemura S. Mice Lacking Hypertension Candidate Gene ATP2B1 in Vascular Smooth Muscle Cells show Significant Blood Pressure Elevation. *Hypertension* 59:854-60, 2012
5. Fukumura H, Sato M, Kezuka K, Sato I, Feng X, Okumura S, Fujita T, Yokoyama U, Eguchi H, Ishikawa Y, ad Saito T: Effect of ascorbic acid on reactive oxygen species production in chemotherapy and hyperthermia in prostate cancer cells. *J. Physiol. Sci.* 59:854-60, 2012
6. Yokoyama U, Ishiwata R, Jin M-H, Kato Y, Suzuki O, Jin H, Ichikawa Y, Kumagaya S, Katayama Y, Fujita T, Okumura S, Sato M, Sugimoto Y, Aoki H, Suzuki S, Masuda M, Minamisawa S, and Ishikawa Y: Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm formation. *PlosOne* 7(5):e36724, 2012
7. Iwatsubo K, Bravo C, Uechi M, Baljinnyam E, Nakamura T, Umemura M, Lai L, Gao S, Yan L, Park M, Qiu H, Okumura S, Iwatsubo M, Vatner DE, Vatner SF, and Ishikawa Y: Prevention of heart failure in mice by an antiviral agent that inhibits type 5 cardiac adenylyl cyclase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 302:H2622-8, 2012

8. Ichikawa Y, Yokoyama U, Iwamoto M, Oshikawa J, Okumura S, Sato M, Yokota S, Masuda M, Asou T, and Ishikawa Y: Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Dilates the Rat Ductus Arteriosus without Inducing Intimal Thickening. *Circ J* 76; 2456-64, 2012

9. Bai Y, Tsunematsu T, Jiao Q, Jin M, Cai W, Kurotani R, Yokoyama U, Sato M, Iwatsubo K, Ishikawa Y, and Okumura S: Increased activity of type 5 adenylyl cyclase stabilizes heart rate not only under microgravity but also under hypergravity induced by parabolic flight. *J Pharmacol Sci* 119, 381 – 389, 2012

10. Lai L. , Yan L, Gao S, Hu CL, Hui G, Davidow A, Park M, Bravo C, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Auwerx, J, Sinclair D, Vatner SF, and Vatner DE. Type Type 5 Adenylyl Cyclase Increases Oxidative Stress by Transcriptional Regulation of MnSOD via the Sirt1/FoxO3a Pathway. *Circulation* in press, 2013

11. Eijkelkamp N, Linley JE, Torres JM, Bee L, Dickenson AH, Gringhuis M, Minett MS, Hong GS, Lee E, Oh U, Ishikawa Y, Zwartkuis FJ, Cox JJ, Wood, JN. A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. *Nature Commun* in press, 2013

和文

1.石川義弘「急性心不全の新しい薬物療法 今後の展開」セフィーロ NO. 15 ; 32-35、2012

2.石川義弘「心不全の分子機構における交感神経とRASのかかわり」Angiotensin Research 9; 24-27, 2012

3.横山詩子、石渡遼、大島登志男、南沢享、石川義弘「三次元血管モデルを用いた動脈硬化性疾患の機序解明」科学と工業 86;329-335, 2012

4.石川義弘「国民皆保険を守れ！命より収支優先の医療になっていいのか」現代農業 No.4 338-342,2012

5.石川義弘「TTP問題の核心 公平な医療を受けるため「国民皆保険」守れ」—まだ知らされていない壊国TTP—主権侵害の正体を暴く—創森社 192-193, 2012

6. 石川義弘、江口晴樹「切らずに治すがん治療薬の開発」化学工業 64:1-5,2012

7. 石川義弘「悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療の開発」平成24年度第3次対がん総合戦略研究事業研究報告抄録集

8.石川義弘 「TTPが医療にもたらすもの—自由主義型医療とはなにか 全国厚生連病院長会ニュース No.89 PP1-10,2012

9.石川義弘 丸中良典「アメリカ生理学会は学会危機をどう乗り切ったか」日本生理学会雑誌 74:110-112

10.日本工業新聞「有機化合物の磁性 立体構造解析で証明」平成24年11月8日

11.日刊工業新聞「潜在能力を引き出せ」平成24年11月14日

2. 学会発表

1.石川義弘：物理的作用を活用した高機能ドラッグデリバリーシステム「磁性抗がん剤を用いた癌治療」第51回日本生体医工学会大会 2012. 5 (招待講演)

2.Yoshihiro Ishikawa : Hyperthermia and nano technology/nanomedicine Magnetic anti-cancer compound in hyperthermic therapy. 11th International Congress of Hyperthermic Oncology 29th Japanese Congress of Thermal Medicine 2012,8. (招待講演)

3.石川義弘：循環器医とアメリカの医療事情 第13回多摩川フォーラム, 東京, 2012, 5.

4. Ishiwata R, Yokoyama U, Kadowaki K, Matsusaki M, Akashi M, Ishikawa Y, Minamisawa S: Rat SMCs within 3D Cellular Multilayers Exhibit Contractile Phenotypes and Layered elastic fibre. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Seoul, 2012, 5.

5.Ichikawa Y, Yokoyama U, Masuda M, Asou T, Ishikawa Y: Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor, Milrinone, Dilates the Rat Ductus Arteriosus without Inducing Intimal Thickening. The 8th Congress of Asian Society for Pediatric Research, Seoul, 2012, 5.

6. Aoki R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Minamisawa S, Ishikawa Y: Plasma Hypoosmolarity after Birth Promotes Closure of the Ductus Arteriosus. American heart association basic cardiovascular science 2012 Scientific session, New Orleans, 2012.7.

7.石川義弘：cAMP シグナルとニコチン受容体 第27回喫煙科学研究財団平成23年度助成研究発表会,東京, 2012, 7.

8.石川義弘：CaとcAMPシグナル 平成24年度新学術領域研究 領域全体会議 「統合的多階層生体機能学領域の確立とその応用」福岡, 2012, 7.

9.石川義弘：日本人がアメリカで医者をやるとどうなるかー医療のカルチャーショックとは循環器診療ステップアップセミナー，大阪，2012，8.

10. Feng X, Fukumura H, Sato I, Eguchi H, **Ishikawa Y**: A new cancer treatment strategy with magnetic anti-cancer compound with hyperthermia. The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology, The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine, Kyoto, 2012, 8.

11. Kumagaya S, Yokoyama U, Iwai K, Nishihara H, Inoue T, Mimamisawa S, **Ishikawa Y**. Prostaglandin E2 receptor EP4 in coronary smooth muscle cells may play a role in intimal thickening that precedes atherosclerosis. 第2回生命医科ポスター交流会，東京，2012，8.

12. Umemura M, Erdne B, Lai-Hua X, Marianas D.L, **Ishikawa Y**, Umemura S, Iwatsubo K: Store-operated Ca²⁺ entry regulates proliferation and cell cycle in melanoma. 第71回日本癌学会学術総会，札幌，2012,9.

13. 石川義弘：オバマケアを見据えたアメリカ医療の現状 医療関連サービス振興会セミナー，東京，2012. 9

14. Ichikawa Y, Yokoyama U, Masuda M, Asou T, **Ishikawa Y**: Inhibition of Phosphodiesterase Type 3 Dilates the Rat Ductus Arteriosus without Inducing Intimal Thickening, The 86th American Heart Association Scientific Sessions, Los Angeles, 2012,11.

15. Jin MH, Yokoyama U, Ishiwata R, Minamisawa S, **Ishikawa Y**. Oxygenation-induced postnatal remodeling of the ductus arteriosus. The 86th American Heart Association Scientific Sessions, Los Angeles, 2012, 11.

16. Okumura S, Jin M, Ohnuki Y, Namekata I, Kurotani R, Fujita T, Jin HL, Cai W, Bai Y, Suita K, Tsunematsu T, Tanaka H, **Ishikawa Y**: Disruption of Epac1 decreases phosphorylation of phospholamban and protects the heart against stress. The 86th American Heart Association Scientific Sessions, Los Angeles, 2012, 11.

17. 石川義弘：「心臓血管系のシグナル制御」イオンチャネル・トランスポーターと心血管機能：細胞機能の分子機序とその統合的理解，岡崎生理研究所研究会，岡崎，2012，11

18. 石川義弘：細胞内酵素を標的にした不整脈治療 防衛医大バイオの会，所沢，2012. 11

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

江口晴樹、石川義弘、谷垣勝己「抗がん薬」
特許5167481号 2013. 1. 11

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

[II]

分坦研究報告

研究分担者

竹村泰司 横浜国立大学・教授

A. 研究目的

局所加温が可能なハイパーサーミアの発熱源としては、針状磁性体や感温磁性体といった磁性材料を使用したものや、共振回路を用いたものが研究されている。本研究では磁性ナノ粒子を発熱源として用いたハイパーサーミアの実現に向け、磁性ナノ粒子の発熱機構の解明を行うことを目的とする。本研究を実施することにより、磁気ハイパーサーミアの励磁装置を設計試作するための知見や、磁性抗癌剤の特徴を顕在化させ、それを実用するための知見を得るものと期待される。

B. 研究方法

マグネタイト (Fe_3O_4) ナノ粒子に、ポリエチレンイミン (PEI) をコーティングさせて分散させたサンプルの発熱特性を評価することで、発熱のメカニズム、最適な励磁条件を考察した。発熱特性の評価において、印加する磁界の強度、周波数などの依存性を、実際の発熱温度の実測に加え、直流・交流ヒステリシスを測定し、その面積から発熱量を解析した。

(倫理面への配慮) 本分担研究においては関係しない。

C. 研究結果

測定した試料の発熱量の周波数特性から、周波数が高いほど発熱量も高くなったが、交流磁界1周期あたりの発熱効率は周波数が低いほど高くなった。発熱効率が最も高くなるのは周波数を100 Hz前後としたときと推定される。また、発熱量の磁界強度特性を測定したところ、今回測定した最大磁界強度300 Oeまでは磁界強度の増加に対して発熱量が2乗で増加しており、発熱量が飽和する様子は見られなかった。

D. 考察

直流磁化曲線の測定より、液中に分散した強磁性ナノ粒子は、磁界を印加されると粒子内の磁化が回転する前に粒子自体が回転す

ることで磁化反転を行うと考えられる。交流磁化曲線は直流磁化曲線と比較して面積が大幅に拡大した。これは磁気緩和が原因であり、また粒子自体が回転しているため Brownian 緩和が支配的であるといえる。

H f積、磁界強度特性の飽和を考慮すると、粒子の平均二次粒径をさらに小さくし、周波数 10 kHz 程度で発熱効率がピークを持つ粒子を作製できれば、より発熱量が向上すると考えられる。

E. 結論

磁気緩和はこれまで報告されている理論式では記述できない特性があることを実験的に明らかにした。磁性ナノ粒子の発熱を温度計測からではなく、交流ヒステリシスから求める手法を確立した。これはハイパーサーミアの研究、特に磁性体や印加磁界条件の最適化において極めて有効な手段である。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表 今後発表予定
2. 学会発表 今後発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

3-1. 実験結果等

磁気緩和損失

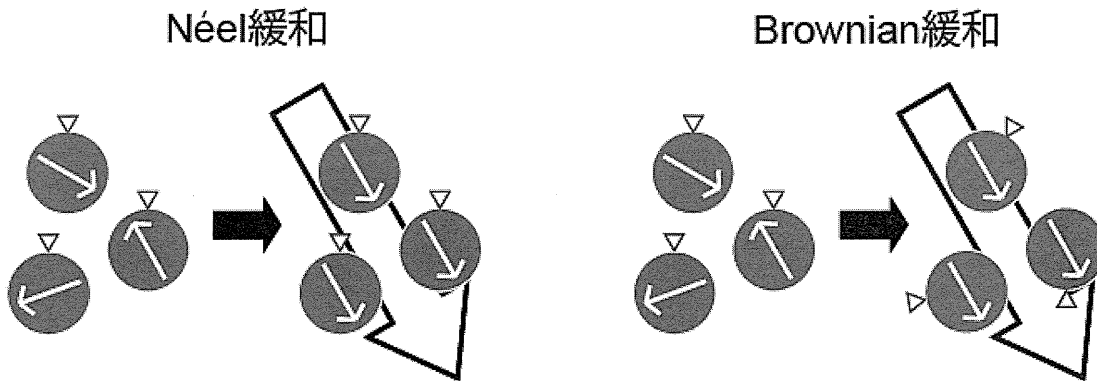
磁界に対する磁化の遅れは、粒子の緩和時間 τ と周波数 f とによって決定される。この緩和時間は Néel 緩和と Brownian 緩和それぞれ τ_N, τ_B として次式のように定義されている。

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{4\pi r^3 K}{3k_B T}\right)$$

$$\tau_B = \frac{4\pi R_H^3}{k_B T} \eta$$

$$\frac{1}{\tau_{eff}} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B}$$

τ_0 は時定数 (10^{-9} s)、 r は粒子の半径、 K は異方性定数、 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 R_H は粒子の流体力学半径、 η は液体の粘度、 τ_{eff} は実効的緩和時間である。Brownian 緩和は粒子自体の回転によって起こるため、緩和時間を決定するうえで重要となるのが一つの粒子の半径ではなく、回転する物体全体の半径となる。つまり粒子がいくらか凝集している場合は R_H の値は大きくなる。また τ_{eff} は Néel 緩和と Brownian 緩和が同時に起こっているとき、より短いほうの緩和時間が支配的となって決まる。

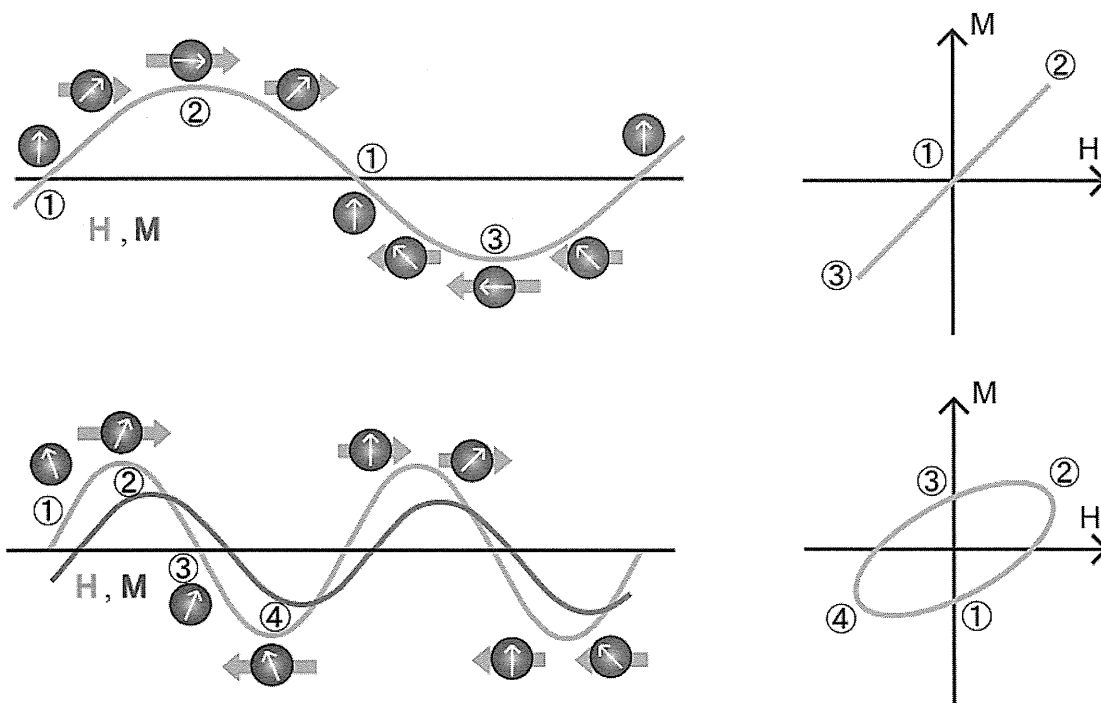


Néel 緩和と Brownian 緩和

緩和時間 τ の磁性ナノ粒子に交流磁界を印加した場合、励磁周波数 f によって磁化曲線に変化が生じる。一般にヒステリシスを持たない超常磁性体で考えると、下図(a)のように $\tau \ll 1/2\pi f$ のときは磁化が十分に追従しているため磁化曲線は面積を持たない。周波数が増加し、 τ の値が $1/2\pi f$ に近づくと磁化の遅れが現れはじめ、同図(b)のように磁化曲線の面積が拡大する。これらを考慮した磁気緩和損失の発熱量は、

$$P = \pi\mu_0\chi_0 H_0^2 f \frac{2\pi f\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2}$$

となる。磁化曲線の面積はある特性周波数 f_c においてピークとなるが、磁化曲線の面積は1周期あたりの発熱量を示すものであり、実際の発熱量はこの面積に周波数を掛け合わせたものとなる。このように磁気緩和損失が支配的となる磁性体を発熱させる場合、その磁性体に合わせた最適な周波数を選ぶ、もしくは使用に最適な周波数において発熱量が最大となる緩和時間を持った磁性体を選ぶ必要がある。



磁化の位相遅れ