

2013/3046B (2/2)

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24～25年度 総合研究報告書(2)

研究代表者 石川義弘

平成26 (2014年) 年5月

[IV]

研究成果の刊行物・別刷

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

公益財団法人 がん研究振興財団

平成24年度第三次対がん総合戦略研究事業

研究課題： 悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療の開発

課題番号： H24-3次がん一般-005

研究代表者：横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学

：石川義弘

1. 本年度の研究成果

悪性中皮腫は胸膜中皮に由来する腫瘍であり、石綿暴露との関連が強く、わが国では今後10年間で倍増が予測される。外科的根治術が困難であり、放射線や化学治療にも抵抗性が強いいため、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。また一部の大学病院では、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が、積極的な治療法として確立されているわけではない。

一般にがん細胞は、42度以上の温熱にさらされると、細胞死が亢進することが知られている。この性質を利用してがん組織を温熱に晒してがん治療を行う、いわゆる温熱療法が使用されている。しかるに本邦での多くは、がん局所に対する選択的な温熱ではなく、電磁波によって患部全体を温める、いわゆるマイルド温熱と称される全身温熱療法が主体となっており、抗がん剤による化学療法の補助療法としての役割が主体である。このため副作用は少ないが、治療効果としては必ずしも高くない。これに対して、欧米で開発実用化されている方法は、局所温熱療法であり、マグネタイトなどの磁性粒子をがん局所に直接注入し、外部からの交流磁場印加によって発熱させ、それによってがん細胞を殺傷するものである。しかしこの治療法で使用される磁性粒子は、発熱体として使用されるだけであり、磁性粒子自身に抗がん作用があるわけではない。そこで抗がん剤を同時注入する方法が考えられるが、磁性粒子による発熱のため、抗がん剤が熱変性してしまうため無効である。温熱治療と化学療法が同時併用できれば、悪性中皮腫の治療効果もさらに上昇すると考えられる。

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の「同時療法」を検討している。我々の開発した新規抗がん剤（E I 2 3 6）は、強い磁性特性を持った抗がん剤である。このため交流磁場印加によって強い発熱作用を持つと同時に、シスプラチン様の強い抗がん作用を有する。抗がん作用は耐熱性に優れ、繰り返しの交流磁場印加および発熱によっても、抗がん作用の減弱がないことが知られている。そこで中皮腫細胞が温熱に対して感受性を有し、本抗がん剤を磁場を用いて中皮腫局所に集積することができ、さらに交流磁場印加で発熱させることが可能ならば、温熱療法と化学療法の同時療法が可能となり、治療困難とされる悪性中皮腫に対しても極めて有効な治療法となることが期待できる。とりわけ欧米で実用化されている磁性粒子による局所温熱

療法を、はるかに凌駕する画期的ながん治療法として、本邦より発信することができると思われる。

平成24年度において、放射線医学研究所において収集されたヒト由来の悪性中皮腫細胞株を用いて、温熱に対する感受性を検討するとともに、EI236に対する感受性を検討した。EI236の存在下で、42度の温熱を加え、MTTアッセイによる細胞生存性を検討したところ、10 μ M前後において温熱刺激なしで50%程度の生存性が、温熱存在下においては最大30%以下に低下することがわかった。さらに薬剤濃度を高めると、細胞生存性は容量依存性に低下するが、温熱による細胞殺傷作用は低下することがわかった。これは高い濃度のEI236による抗がん作用が主体となるためと考えられた。これにより、EI236の抗がん作用は、低い濃度において、温熱によって最大限に増強されることがわかった。

つぎにEI236を細胞培養液中に添加し、交流磁場印加によって最適な温度上昇を発生させる条件を検討した。交流磁場印加装置としては、我々は試作したYOKI-1500を使用した。様々な出力条件、とりわけアンペア数および周波数の検討した結果、300Aおよび160KHzの出力条件下において、顕著な温度上昇が得られることがわかった。この温度上昇はEI236濃度依存的であり、1 mMを使用した場合は15分以内に45度まで、30 μ Mにても30分以内に42度まで上昇することがわかった。これは低濃度（数十 μ M）でも局所において有効な発熱作用を示すことを示す。中皮腫に対する温熱感受性は、EI236が10 μ M程度で最大を示すことから、発熱実験においても10 μ Mで十分な発熱作用を惹起することが確認された。

一方でEI236を培養液中において中程度の強度の永久磁石で集積させることが、これまでの実験でわかっているが、生体、とりわけ胸腔内において集積させることが可能かどうかは不明であった。悪性中皮腫に対して抗がん剤の胸腔内注入は現在の治療においても行われているが、必ずしも中皮腫局所に分布するわけではない。そこでEI236を用いることにより、磁場で中皮腫局所に集中させることができれば、既存の化学療法に比べて、はるかに少量で効果的な治療が可能となる。さらに交流磁場印加によって温熱療法を加えることができれば、化学療法と温熱療法の同時療法によって、相乗的な治療効果の増強が得られると考えられる。

予備実験において、マウス胸腔にEI236を注入し、胸壁外部からネオジウム棒磁石をあて、局所に誘導することが可能であるかを検討した。この検討においてはex vivoにおいて胸壁を摘出し、外部から棒磁石を当てることによってEI236がどの程度集中するかを検討したところ、棒磁石によるEI236の集積は肉眼的にも明らかであった。そこで生体マウスに対して同様の検討を行ったが、マウスにネオジウム棒磁石を長時間付加することが技術的に困難であることがわかった。そこで棒磁石を使用するのではなく、ビーズタイプの小磁性球を皮下に埋め込み、そこにEI236を集積させる方法を検討した。市販の磁性ビーズをマウス胸壁に植え込み、EI236を胸腔内に注入し、マウスを3日間自由行動とさせたあと、マウス胸壁を取り出した。さらにEI236を化学的に染色して、集積状況を検討したところ、磁性ビー

ズ植え込み部に一致して強い染色反応が見られた。このことは磁性ビーズによってEI236を局所に誘導することが実現できたことを示す。同様の実験を腹腔においても行ったところ、同様の強い集積を得ることができた。ヒトにおいて磁性ビーズの植え込みは、ペースメーカー植え込みと同様に施行出来ると考えられるが、侵襲性を考慮して、現在自生ビーズを装着したベストの試作を行っている。

上記の実験により、胸腔内の中皮腫に対してEI236を局所に集積させ、温熱によってがん細胞を殺傷することができる条件を検討することができた。ところがEI236による治療効果の評価においては、マウス胸壁を摘出せねばならず、時間経過による治療効果を実験的に評価することが困難である。そこで生体レベルで中皮腫組織の増減を観察できるよう、蛍光蛋白であるRFP遺伝子を導入した中皮腫細胞株を確立した(211H-RFP)。同中皮腫株をマウス皮下に移植し、2週間後にIVISを用いて生体レベルで中皮腫腫瘍の進展を観察したところ、赤色シグナルとして腫瘍のサイズが計測できることがわかった。同様の生体観察は、Xenolight Rediject 2-DG-750 Probe試薬を尾静脈から注入し、3時間後にIVISによる画像によっても可能であった。以上の実験結果から、蛍光遺伝子導入中皮腫細胞株を利用することにより、EI236による治療効果が生体レベルで観察できる手法が確立された。

一方で我々は、EI236の結晶構造解析に成功した。理研のSpring8を用いて単結晶構造解析を行い、第一原理計算によって磁性発生の分子メカニズムを検討したところ、EI236に含まれる部分結晶構造が、磁性発生に重要な役割を果たしていることが判明した。この部分構造は、磁性発生の原因構造として数十年前に発表されており、この古典的な磁性構造がEI236にも存在することがわかった。このことは、この部分構造を活用することによりEI236同様の磁性を、他の抗がん剤にも負荷できることを示す。またマイクロアレイ法を用いて、EI236によって引き起こされる細胞内シグナル伝達変化を中皮腫細胞において検討した。248種類の交代を搭載した網羅的な解析用のAntibody Arraysを用いて検討したところ、STAT系シグナルをはじめとした複数のシグナル系において顕著な亢進と抑制が観察された。このことはEI236による抗がん作用の分子メカニズムが明らかになると思われる。

以上の、平成24年度の実験結果から、1) 悪性中皮腫細胞はEI236に対して高い感受性を示すこと、2) EI236の抗がん効果は温熱によって顕著に増強されること、3) 交流磁場印加の最適条件が検討され、この条件下でEI236による発熱条件が決定したこと、4) マウス生体レベルで磁石によるEI236の集積方法が確立されたこと、5) EI236の治療効果を経時的に観察できる蛍光遺伝子導入中皮腫細胞株が確立され、マウス生体において計測可能であること、が判明した。これらの検討結果から、マウス中皮腫に対してEI236を用いた新規治療法の検討を、平成25年度に進めていく。

2. 研究成果の意義および今後の発展性

我々の開発した新規磁性抗がん剤化合物(EI236)はシスプラチン類似薬であり、I H I

(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独自開発薬である。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、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。工学部の専門家による温熱・磁場装置試作品YOKI-1500が完成しており、マウスにおける動物実験での有効性が証明されている。また放射医学総合研究所のMRI分子イメージ専門家が参画し、さらに我が国における迅速な臨床応用を進めるために抗がん剤の臨床試験の専門家が共同研究者として参加している。

一般に抗がん剤などの医薬品化合物は、有機化合物であるため磁性を持たないとされる。しかし鉄（磁性）粒子は磁石に付く。したがって鉄粒子を利用して温熱療法やドラッグデリバリーを行う研究が進められてきた。鉄粒子と抗がん剤を混合して脂質膜で包み、全体をミセルとして磁石で誘導する手法である（ミセル技術）。しかしながら、抗がん剤が必ずしもミセルに包埋されない、効率が低い、あるいは熱やpHによってミセル分解するため不安定、経口投与が困難などの問題がある。造船業における船舶の金属材料の開発には磁性の制御が不可欠である。このため石川島播磨重工の基盤技術研究所では高度な磁性制御の技術を開発してきた。すでにエレクトロニクス分野では同様の技術を有機ダイオードなどの開発に応用している。我々はそれを医薬品化合物に応用した。

過去7年間に及ぶ先行研究において、磁性を有する抗がん剤化合物が複数同定された。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ため、ミセルに包埋する必要がない。空気や液体中でも安定である。シスプラチンなどの抗がん剤と同等の抗腫瘍効果を持ち、磁場誘導によって、少量で強力な抗がん作用を示す。このことは、本技術は純国産技術であり、造船業の技術を医学に転用した、産学連携の象徴的な技術開発であると考えられ、今後の我が国の産業振興にも貢献できると考えている。

一方で悪性中皮腫の根治的治療法は胸膜肺全的術であるが、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。

そこで高齢者にも安心して適応できる悪性中皮腫の治療法が必要である。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、副作用の発現が予想が困難である。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。

本研究により、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、本申請の最大の目標であり社会貢献である。

3. 倫理面への配慮

本研究は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針及び横浜市立大学医学部で定めた倫理規定等を遵守して行う。動物を用いた実験は、動物実験の講習を修了し、十分な知識と経験を有するものだけに従事させる。産学連携、他施設共同、臨床試験、薬事申請に当たっては、関係者および関係施設における利益相反を中心に守秘義務など各種コンプライアンスを十分に順守して行う。また生物統計においては、動物愛護の観点から、必要とされる動物数などを最小限にとどめるため、本学臨床試験センターの指導下で生物統計の専門家の指導を受けつつ行う。

4. 発表論文など

- ① 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
 - ② 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
 - ③ 日刊工業新聞 平成24年11月8日 「有機化合物の磁性 立体構造解析で証明」
 - ④ 日刊工業新聞 平成24年11月14日 「潜在能力引き出せ」
- なお、平成24年度においては本研究関連の特許申請を10件行った（うちPCT4件）。

平成25年度第三次対がん総合戦略研究事業

研究課題： 悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療の開発

課題番号： H24-3次がん一般-005

研究代表者： 横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学

： 石川義弘

1. 本年度の研究成果

石綿による健康被害（石綿症）は1900年代から知られていたが、我が国で法規制が開始されたのは75年以降であり、本格的な労働者に対する規制は2005年以降である。悪性中皮腫は胸膜中皮由来の腫瘍であり石綿暴露との関連が強いが、発症まで20-50年を要する。このため今後十数年間は我が国の患者数の増加が予測される。発見時には外科的根治術が困難であり、放射線や化学治療にも腫瘍としての抵抗性が強く、極めて低い治療成績である。化学療法としてシスプラチン、或はペメトレキセド併用療法が基本だが、薬剤の投与量は、副作用の発現によって制限を受ける。また一部の先進医療機関では、温熱療法が併用されているが、症状緩和に有効ではあるが、積極的な治療法ではない。

悪性腫瘍に対する温熱療法の歴史は19世紀と古いが、現代的な治療に応用されたのは60年代からである。細胞実験ではがん細胞は42.5度以上になると細胞死を起こしやすくなる。そこで電磁波を用いてがん組織全体を暖め、化学療法の効果の増強を狙ったマイルド温熱による全身温熱療法が採用されている。これはあくまでも化学療法の補助療法であり、副作用は少ないが治療効果も高度ではない。近年欧米で実用化された方法は、局所温熱による積極的な治療法である。鉄などの磁性微粒子を腫瘍組織に直接注入し、交流磁場印加によって発熱させ、がん細胞を殺傷する仕組みである。然るに使用されるのは抗がん作用を持たない鉄粒子を発熱体として使用するのみである。抗がん剤を腫瘍組織に同時注入すると、磁性粒子による発熱のため抗がん剤が変性してしまうからである。温熱治療と化学療法が同時施行できれば、治療効果は画期的に増強することが期待できる。

我々の研究では、これまで治療困難とされる悪性中皮腫に対して、化学療法と温熱療法の「同時施行」を検討した。このためには既存の抗がん剤や鉄粒子ではなく、新規磁性抗がん剤（E1236）を用いる。シスプラチン様の強い抗がん作用を有するだけでなく、交流磁場印加によって強い発熱作用を持つ。このため抗がん作用が熱変性することがなく、反復性の交流磁場印加・温熱治療が可能であることが分かった。中皮腫細胞が温熱感受性をもち、本抗がん剤を中皮腫局所に磁場誘導することができ、さらに交流磁場印加で発熱できれば、温熱・化学療法の同時施行ができるようになり、悪性中皮腫に対して有効性を高めた治療法として開発ができると考えられた。とりわけ欧米で先鞭をつけられた鉄微粒子による局所温熱療法に対して、それを凌駕する画期的ながん治療法を日本から世界に向けて発信することができると思われる。

昨年度からの継続実験において、ヒト由来の悪性中皮腫細胞における温熱感受性を検討した。ヒト由来の細胞株は複数種確立されており、これらの異なった株種に対して同様の検討を行った。温熱感受性については株間でも類似し、42度で効果を示すが、43度程度にまで上昇させても温熱感受性を示すことが分かった。温熱感受性は狭い温度域でのみ有効なわけではなく、他の癌細胞腫と同様に比較的ひろい温度枠を設定することができることが分かった。またこの温度枠において、EI236との併用によりいずれも抗がん活性が亢進することが確認された。昨年度の実験結果から、EI236が10 μ M前後において温熱刺激なしで50%程度の生存性が、温熱存在下においては最大30%以下に低下し、さらに薬剤濃度を高めると、細胞生存性は容量依存性に低下するが、温熱による細胞殺傷増強作用は低下することがわかっている。本年度の結果と合わせて、温熱効果が最大限に発揮できる抗がん剤濃度を検討し、最低量の治療濃度で治療を行うことが、効果的な治療法に結びつくことが確認された。

EI236の発熱特性の制御には、薬剤濃度以外に、交流磁場発生装置の性能が重要な役割を果たすことが分かった。これは出力だけの問題ではなく、使用する周波数と電力によって規定されることが分かった。さらに周波数特性によって、深部到達度を調節できることがわかり、これは悪性中皮腫の治療にあたって、皮膚からの深度により、周波数特性を変化させることによって発熱効果を最適化できることが分かった。我々の試作機であるYOKI-1500は単一条件でEI236に高い発熱を起こさせるが、さらに、周波数特性変換機能を持たせた機械によって、発熱や深部を調節できることがわかった。悪性中皮腫においても胸腔内での発現部位や深度が異なることから同機能は重要であると考えられた。

昨年度の研究結果から、マウス生体レベルで胸腔内において集積させることが可能であることがわかったが、これには大型棒磁石を体表面から当てるか、特殊小型磁石を胸腔皮下に埋め込むことが必要であった。然るに、ヒト応用にあたっては実用的ではない。そこでピップエレキ盤様の小型磁石を衣料ベストに縫込み、動物に磁石入りベストを着用させることで胸腔部分への集積が可能であるかを検討した。市販の小型磁石を縫い込んだベストを作成し、EI236を胸腔内に注入した後に、磁石部分がマウス胸壁にあたるようにベストを装着させ、マウスを3日間自由行動とさせた。マウス胸壁を取り出し、EI236を特殊染色したところ、ベスト磁石装着部に一致して強い集積反応が見られた。このことは磁石ベスト装着によってEI236を局所に誘導できたことを示す。同様の実験を腹腔においても行ったところ、強い集積を得ることができた。ヒトにおいてはさらに強力な小型磁石が複数必要になると考えられるが、極めて低い侵襲性で、体表面から磁場誘導を胸壁に対してかけることが可能と考えられる。

EI236による治療効果の評価においては、動物モデルでは胸壁を摘出せねばならず、時間経過による治療効果を実験的に評価することが困難である。そこで生体レベルで中皮腫組織の増減を観察できるよう、MRIによる画像診断の手法を開発した。先行研究から、マウスに中皮腫を移植して、マウス悪性中皮腫モデルを作成することが可能であることが分か

っている。このモデルにおいて、MRIの撮影条件を検討することにより、中皮腫のMRIによる非侵襲的な形態観察が可能であることがわかった。さらに確立された悪性中皮腫マウスモデルにおいて、EI236を投与し、体表面から磁場誘導をかけた。このMRI画像モデルにおいても、EI236がMRIシグナルとして検出できることが分かった。このことは、悪性中皮腫患者にEI236を投与した場合に、薬剤が腫瘍部位にどの程度到達したかを判定する可能性を強く示すものである。さらに磁場誘導をかけた後に、腫瘍部位への集積の程度を非侵襲的に定量する可能性を示す。

さらに我々は、理研のSpring8を用いたEI236の結晶構造解析結果から、数十年前に開発され、現在世界で幅広く使用されている既存の抗がん剤を磁性化した。この磁性抗がん剤は、抗がん作用として基本的な薬理学的な特徴を維持しながら、磁場誘導によって局所に誘導させることが可能であることが分かった。さらにMRIにおいて画像測定が可能であることも分かった。

以上の平成25年度の実験結果から、1) 多数のヒト悪性中皮腫細胞株はEI236に対して高い薬剤感受性と温熱感受性を示すこと、2) 交流磁場印加装置の最適化により、組織における磁場印加の条件が検討され、この条件下でヒトへの応用性が高まること、3) マウス生体レベルで非侵襲的に磁石によるEI236の集積方法が確立されたこと、4) EI236の治療効果を経時的に観察できるマウス悪性中皮腫モデルが確立され、マウス生体において磁場誘導をMRIで評価することができること、5) 既存の抗がん剤の磁性化ができること、が判明した。これらの検討結果は、EI236を用いた悪性中皮腫の新規治療法の開発が極めて有望なものになる可能性が示された。今後はさらにヒト臨床応用を目標に、研究を進展させていきたい。

2. 研究成果の意義および今後の発展性

抗がん剤に限らず一般の医薬品化合物は、磁場誘導に対して十分な磁性を持たないとされる。しかしコバルトや鉄（磁性）粒子は磁石に付く。そこで磁性鉄粒子を利用して温熱療法や磁場誘導を行う研究が60年代より進められてきた。一般的な手法は、鉄粒子と抗がん剤を混ぜ合わせてリポソームに包み、全体を磁石で誘導する。しかしながら、合成段階において抗がん剤と鉄粒子の両方が確実にリポソームに包埋されているのか、あるいは比率が1:1で常に包埋されるかなどの問題があった。さらには空リポソームの存在や、熱やpHによってリポソームが変性分解するため不安定、経口投与が困難などの諸問題がある。とくに温熱療法との併用においては、熱によってリポソームが分解してしまうため、施行が困難である。

造船業における船舶の金属材料の開発には磁性の制御が必須であり、IHI（株）の基盤技術研究所では高度な磁性評価の技術を有する。エレクトロニクス分野ではこの技術を有機ダイオードなどの開発に応用している。我々はそれを医薬品化合物に応用し、新規磁性抗がん剤化合物（EI236）が開発された。本抗がん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)の造船業におけるエンジンの金属材料開発技術を、医薬品化合物開発に応用して開発された。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、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。本研究は学際的な共同研究者よりなる。本研究で対をなす温熱・磁場装置に関しては、横浜国大をはじめとする工学研究者(竹村泰司教授)との協力を得て試作品 YOKI-1500 による検討を繰り返してきた。本年度の研究成果から、本試作品をどのように改良していくかの道筋が示された。また放射医学総合研究所のMRI分子イメージ専門家(青木伊知男チームリーダー)による悪性中皮腫の検討においては、生体レベルで EI236 を可視化することに成功している。これは画像化可能な抗がん剤として重要な役割を果たすことができると考えられる。

過去8年間に及ぶ先行研究において、磁性を有する抗がん剤化合物が複数同定された。本年度の研究成果から、新規磁性抗がん剤を見つけるだけでなく、既存の抗がん剤に対して磁性特性を付与することが可能であることが示された。同様の手法を用いることにより、抗がん剤のみならず、他分野の医薬品化合物を磁性化する可能性が生まれた。これは患部への集積が望ましいと考えられる医薬品すべてに磁性化特性を与えることにより、磁場誘導により局所化できる可能性をしめす。さらにMRIによる生体レベルでの画像化が可能であることから、生体内に投与した後どのような分布を示すのかを画像診断することが可能になると期待される。本技術は純国産技術であり、学際技術であるとともに、造船業の技術を医学に転用した、産学連携の象徴的な技術開発であると考えられ、今後の我が国の産業振興にも貢献できると考えている。

今後数十年間にわたって患者が増大すると考えられる悪性中皮腫の根治的治療法は胸膜肺全摘術であるが、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ことが多い。外科治療は侵襲的であり、死亡率は高齢者ほど高いため、好発する高齢者でむしろ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化学療法としては、国民的な解決課題と考えられる。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、テイラーメイ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。今回の検討結果から、その実用化への可能性が強く示された。

本研究により、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、本申請の最大の目標であり社会貢献である。

3. 倫理面への配慮

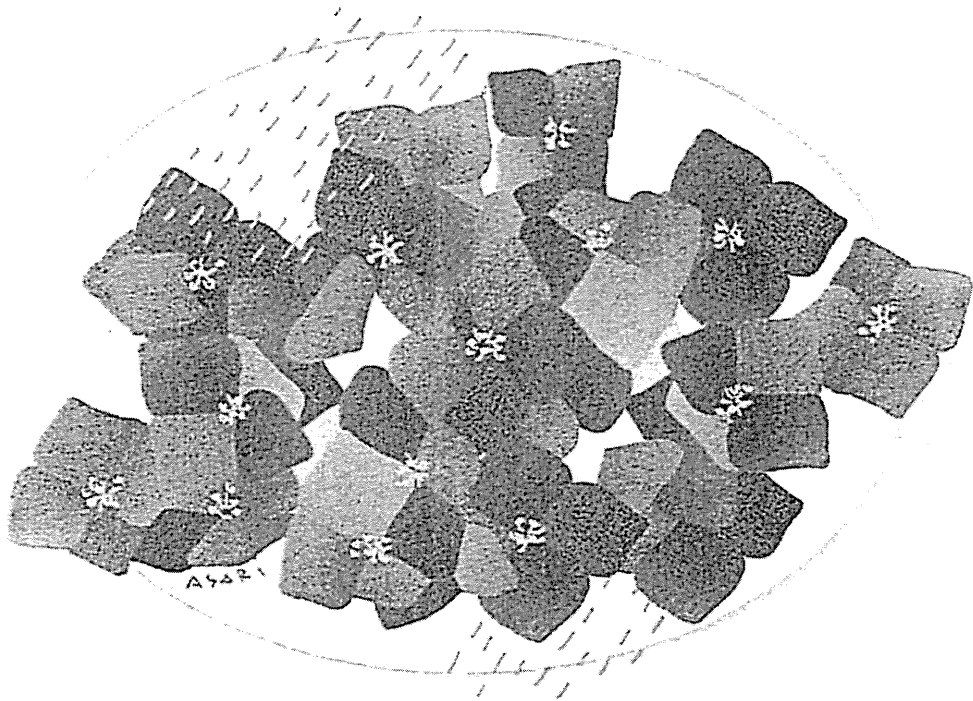
本研究は、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針及び横浜市立大学医学部で定めた倫理規定等を遵守して行う。動物を用いた実験は、動物実験の講習を修了し、十分な知識と経験を有するものだけに従事させる。産学連携、他施設共同、臨床試験、薬事申請に当たっては、関係者および関係施設における利益相反を中心に守秘義務など各種コンプライアンスを十分に順守して行う。また生物統計においては、動物愛護の観点から、必要とされる動物数などを最小限にとどめるため、本学臨床試験センターの指導下で生物統計の専門家の指導を受けつつ行う。

4. 発表論文など

1. Okamoto Y, Hirota M, Monden Y, Murata S, Koyama C, Mitsudo K, Iwai T, Ishikawa Y, and Tohnai I: High-dose zoledronic acid narrows the periodontal space in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 42:627-631, 2013
2. Saito S, Hasegawa S, Sekita A, Bakalova R, Furukawa T, Murase K, Saga T, Aoki I: Manganese-enhanced MRI reveals early-phase radiation-induced cell alterations in vivo. *Cancer Res.* 73:3216-24, 2013.
3. Sawada K, Horiuchi-Hirose M, Saito S, Aoki I: MRI-based morphometric characterizations of sexual dimorphism of the cerebrum of ferrets (*Mustela putorius*). *Neuroimage.* 2013 *in press*
4. Ota S, Takahashi Y, Tomitaka A, Yamada T, Kami D, Watanabe M, Takemura Y: Transfection efficiency influenced by aggregation of DNA/polyethylenimine max/magnetic nanoparticle complexes *J Nanoparticle Res.* 15:1-12, 2013.
5. Song Z, Yamada T, Shitara H and Takemura Y: Quantitative Analysis of Transverse Cracking of Rail using Eddy Current Non-Destructive Testing *Appl Mechan Mat.* 249-250:70-75, 2013.
6. 神奈川新聞 平成25年11月8日 「未来医療への架け橋 がん治療 磁石の力応用試みる」
7. なお、平成25年度においては本研究関連の特許申請(PCT)を5件行った。

C e f i r o

特集 ◆ 変わりつつある
急性心不全の診療



急性心不全の新しい薬物療法 —今後の展開



石川 義弘 (いしかわ よしひろ)

横浜市立大学大学院医学研究科循環制御医学 教授
ニュージャージー州立大学医学部附属病院 指導医

Q はじめに

急性心不全は先進国において臨床上の問題となるだけでなく、疫学的かつ医療経済的にも重要な疾患であり、その重要性は過去数十年間変化していない。例えば、米国においてはメディケア（老人医療保険）における入院原因の最多疾患であり、入院中の死亡者数の多さはもちろん、頻回の入院を繰り返す原因としても悪名をはせている。500万人ともいわれる心不全入院患者にかかる治療費は、アメリカの国家医療費の押し上げの最大の原因である。よく知られたように、米国では医療費のGDPに占める比率は世界最高であり、その原因となっているのが心不全といっても過言でない。

一方で米国における診療報酬支払いはDRG・PPS制度（疾患別包括支払方式）に基づいており、わが国のDPC制度（診断群分類別包括制度）と異なり、入院治療に対しては厳密な定額制が敷かれている。このため、入院日数が短いほど病院側に収益をもたらす。したがって、病院にすれば効率的に急性心不全を治療し、患者をどれだけ早期に退院させるかが病院経営上も重要な戦略となる。つまり、医療費を引き下げたい国家的な要請と、収益を向上させたい病院側

の要望が合致しており、この点でも急性心不全の治療法には大きな関心が寄せられている。しかし、残念ながら、急性心不全の治療自体には過去20年間で画期的な進歩が見られたわけではない。

これまでの疫学的な調査結果からも急性心不全の大半は慢性心不全の急性増悪であり、心機能低下から体液貯留をきたし、全身の浮腫とともに心原性肺水腫による呼吸困難を生ずる。近年では左室収縮能が保たれた症例も増加しており、左室拡張障害に基づく心不全が新しい疾患群として認識されている。古典的な収縮能低下による血圧低下や、末梢循環不全を伴う症例はむしろ減ってきた印象すら受けるが、どちらにしても症状としては容量負荷の増悪によるうっ血症状が前面に現れる。心不全の急性増悪期における死亡率は慢性期における死亡率よりもはるかに高いため、急性心不全の治療はもちろん、慢性心不全をいかに急性増悪させないかのコントロールが重要な課題となっている。

Q 心不全の病態生理

過去50年間における心不全研究の進歩はその病態生理の理解の変遷でもあった（表1）。半世紀前の「腎性心不全」の時代には、心不全の原因は「腎における

表1 心不全モデルの変遷

モデル	重視年代	病因	治療法
腎性心不全	1940～ 1960年代	腎の低灌流	ジギタリスと 利尿剤
血行力学的 な心不全	1960～ 1980年代	心室壁応力 の増大	血管拡張剤または 陽性変力剤
神経内分泌 性心不全	1980～ 1990年代	神経内分泌 の亢進	ACE阻害薬または β 受容体遮断薬

心不全の病態生理の理解は、治療法の変化とともに数十年間で大きく変化した。現在の主流は神経内分泌因子の亢進であり、さらに遺伝的背景やサイトカインの関与などの研究が進んでいる。

低灌流]であった。そのため、利尿剤とジギタリスによる治療が主流であった。1960年代から始まった「血行力学的心不全」の時代には、「心室壁応力」がストレスとして注目されるようになり、このため血管拡張剤と陽性変力作用を持つ薬剤が主流となった。さらに1980年代からは、多数の大規模臨床試験の結果を踏まえて、「神経内分泌性心不全」の時代となり、神経内分泌活動の異常亢進が心不全の原因をなしていることがさまざまな基礎研究からも明らかとなった。さらに β 遮断薬やRAS阻害薬を中心とした大規模臨床試験により、心不全の予後が著明に改善したことから、現在の心不全治療の主流となっている。今後はサイトカインや遺伝子情報などの検討が進むと考えられる。現在の理解では、神経内分泌因子の異常亢進は心機能を低下させるだけでなく、心筋組織自体のリモデリングを加速し、心筋代謝効率の増悪をきたし、急性増悪をきたしやすくしている。いかに効率的に交感神経活動やレニン-アンジオテンシン系の活動を抑制するかが慢性期の治療のポイントとなっている。

しかしながら、いったん急性増悪を起こしてしまうと、先に述べたような体液貯留症状が前面に出てしまい、これに用いられる利尿剤や強心薬、あるいは血管拡張剤に関してはあまり大きな進歩が見られていないのが現状である。古典的なループ利尿剤に加えてネシリチド(BNP製剤)の使用頻度が上がっている(わが国ではhANP)が、基本的に過剰な体液貯留に対して利尿作用を増強するという基本戦略は変わっていない¹⁾。

心不全治療のパラドックス

慢性心不全の急性増悪としての急性心不全を考えると、パラドックスとして存在するのが交感神経である。交感神経活動の慢性的な異常亢進が心不全の増悪をきたすため、 β 遮断薬が用いられる。しかるに β 遮断薬を使用すれば、心筋における交感神経刺激が減弱し、心機能が低下してしまう。したがって、急性増悪時には強心剤としてカテコラミン製剤を使用しなければならない場合がある。つまり、本来抑制しなければならない交感神経活動を逆に強化してしまうことになる。つまり、交感神経活動の抑制が心機能低下に結びついているために、心機能を亢進させなければならない場合には、交感神経刺激を活性化せねばならないというジレンマがある。そこで、交感神経刺激によらない強心剤が開発されている。

新しい心不全治療薬(図1)

ミルリノンに代表されるPDE阻害薬やカテコラミンなどの β 受容体刺激薬による心機能変化は陽性変力および変時作用に代表される。しかし、近年開発されているミオシン活性化剤はこれとまったく異なるメカニズムで心機能を強化する²⁾。心筋の収縮能はミクロ的にはアクチンやミオシンなどのサルコメアの収縮に依存する。低カルシウム状態ではミオシンとアクチンは結合しないが、高カルシウム状態では結合してサルコメア収縮を引き起こす。このことから、心筋収縮はカルシウムに依存する。しかしながら、カルシウムに依存せずに、ミオシンを活性化できる化合物があれば、カテコラミンとは異なるメカニズムで心機能を亢進させることができるはずである。Omecavtiv mecarbivは心臓ミオシンATP分解酵素をツールとしてスクリーニングされた化合物であり、ミオシンを強力に活性化することが報告されている。ミオシンとアクチンの結合を安定化させるメカニズムが提唱されているが、動物実験ではdp/dtを亢進させることなく駆出時間を増加させることにより心機能が亢進した。

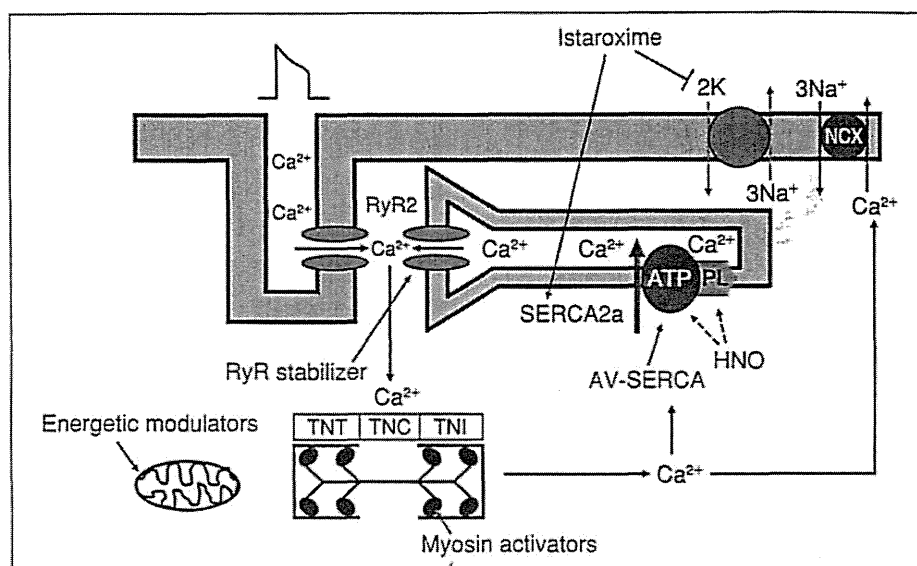


図1 心不全の新しい治療標的(文献3より抜粋して引用)

ミオシン活性化剤はアクチン・ミオシンの安定性を向上させ、サルコメアの機能を亢進させる。また、IstaroximeはSERCA2aやNa/K/ATPaseの調節により、細胞内カルシウム動態を加速して心機能を改善する。

すでに臨床試験が開始されており、第I相試験において成人男子に投与した検討から、1回拍出量の上昇、駆出時間の延長、さらに心房収縮能の亢進が観測された。また第II相試験では、NYHAクラスIないしII度の心不全患者(平均EF値32%)において検討された。第I相試験と同様の変化が見られたが、特に心拍数は軽度低下したことが特徴的である。注目すべきは、ほぼ全員の患者がβ遮断薬を内服していた状態でこのような変化が観測されたことである。一部の患者において心電図上虚血性変化が見られたが、これは拡張時間の相対的短縮による冠血流の低下が原因と思われる。今後の臨床試験の動向が注目されている。

細胞内のカルシウム動態を制御することによって心機能を亢進させる新薬も開発されている³⁾。上記の薬剤がカルシウムシグナルの標的であるアクチン・ミオシンを制御するのに対して、カルシウム動態そのものを制御する薬剤である。一般に収縮に必要なカルシウムはL型カルシウムチャネルを介して細胞外から流入し、リアノジン受容体からカルシウムの流出を引き起こす。いわゆる「カルシウムによるカルシウムの放出(CICR)」を引き起こすが、この細胞内カルシウム濃度の上昇がアクチン・ミオシンを通じ

て心筋収縮を引き起こす。放出されたカルシウムはNa/Ca ExchangerとSERCA2aを通じて細胞外とSRへの再取り込みが行われる。このカルシウム動態の変調が不全心ではよく知られており、例えば細胞質内へのカルシウムの漏れは、心不全時の不整脈の原因としてもよく知られている。そこで、Na/K/ATPaseとSERCA2aを同時に制御することにより、カルシウムの放出と取り込みを促進し、心筋細胞内のカルシウム動態を向上させることが考えられる。

IstaroximeはSERCA2aとNa/K/ATPaseを同時に制御することにより心機能を高める。収縮期におけるNa/K/ATPaseの阻害により、細胞内カルシウム濃度を上昇させて変力効果を高め、SERCA2aの刺激によってカルシウムのSRへの再取り込みを促進して、変弛緩性効果(弛緩を早める)を起こす。この組み合わせによって、心筋の収縮能と拡張能がともに改善すると考えられている。カルシウムの再取り込みを促進することによって、似たような薬であるジギタリスに見られるような催不整脈作用が、本薬剤では少ないことも報告されている。動物実験による確認を経て、臨床試験が進んでいる。NYHA I~III度の患者を対象とした臨床試験では(HORIZON-HF)、同薬剤は心係数を上昇させ、左室拡張末期容積を低下

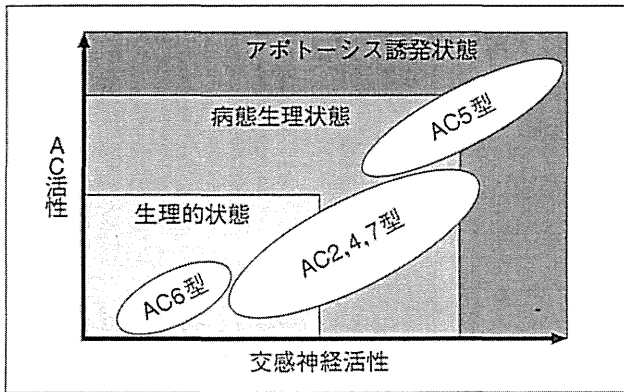


図2 心臓型(5型)アデニル酸シクラーゼの役割

心臓型サブタイプは定常状態の心機能維持には関与しないが、病的状態時に発現および活性の亢進が起こり、心筋細胞死を引き起こす。同酵素サブタイプの選択的阻害(ビダラビン)は心機能を落とさずに心筋保護作用を示す。

させた。さらに拡張能の亢進も見られた。さらに特徴的な所見は、神経内分泌因子の亢進が見られなかったことである。

それではさらに視点を変えた薬剤はないだろうか。冒頭に述べた心不全治療のパラドックスでは、交感神経を抑制した状態で急性心不全が起こると、交感神経を刺激しなくてはならなくなる。これは β 遮断薬が交感神経の抑制を介して、心機能を低下させるからである。それでは心機能を低下させない β 遮断薬があればよい。

β 遮断薬は β 受容体の下流にあるアデニル酸シクラーゼ活性を低下させる⁴⁾。アデニル酸シクラーゼはcAMPを産生する酵素であり、このため心筋細胞内cAMP濃度が減ることによって心機能が低下する。しかるにアデニル酸シクラーゼには多数のサブタイプがあることがわかっており、とりわけ心臓には心臓型(5型)アデニル酸シクラーゼが高度に発現することがわかっている。同サブタイプを欠損させたマウスでは心機能の低下が予測されたにもかかわらず、機能低下は見られなかった。心肥大などの病的な所見も見られないが、慢性カテコラミン負荷あるいは圧負荷による心肥大は起こるが、心筋細胞死が顕著に低下し、心不全の発症が予防された。つまり、心筋ストレスに対して心筋保護効果を示した(図2)。

心臓型アデニル酸シクラーゼの立体構造をツール

に阻害化合物をスクリーニングしたところ、帯状疱疹の治療薬として数十年間使用されているビダラビン(アラセナ[®])が同定された。薬理実験によっても、心臓型サブタイプに対する強い抑制効果を示すことがわかった。さらに動物実験においても、心機能低下を起こさずに心不全の進行を強く阻止する作用があることがわかった。また、交感神経刺激がきっかけとなって起こる不整脈の発症が予防されたことから、現在、ビダラビンの抗不整脈効果を中心に臨床試験が開始されている。かつてわが国で開発された抗ウイルス薬が、数十年をへて心疾患治療薬としてカムバックするかもしれない。これはかつてアスピリンが鎮痛解熱薬として開発され、その後数十年をへて抗血小板薬として復活したことによく似ている。

おわりに

心不全は数十年間におよぶ多数の研究者や臨床医の努力にもかかわらず、いまだに人類を脅やかす最大疾患である。とりわけわが国のような高齢化社会では、心不全のコントロールは単に疾患制御だけではなく、患者のQOLを維持する治療法が開発されなければならない。ここに述べた新しい薬物療法は、いずれも心不全ないし心筋収縮のメカニズム研究から開発されたものであり、基礎研究がどれだけ重要な役割を果たすのかを物語っている。しかるに実際の治療において主役となるのは現場の医師であり、この点においても医療現場と研究現場との情報交換が重要となるだろう。

文献

- 1) Albert NM, et al : HFSA 2010 comprehensive heart failure practice guide line. J Cardiac Failure 16 : 475-539, 2010
- 2) Malik FI, et al : Cardiac myosin activation : A potential therapeutic approach for systolic heart failure. Science 331 : 1439-1443, 2011
- 3) Hasenfuss G G, Teerlink JR : Cardiac inotropes ; Current agents and future directions. Eur Heart J 32 : 1838-1845, 2011.
- 4) Okumura S, Suzuki S, Ishikawa Y : Effect of targeted disruption of type 5 adenylyl cyclase gene. J Pharmacol Sci 109 : 354-359, 2009

Angiotensin Research

Journal of Angiotensin Research

特集 交感神経とRASは
どのようにかかわるか

Vo.9
No.3

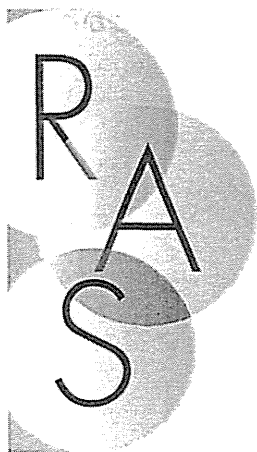
Jul 2012



連載
RASのトピックス



先端医学社



Renin- Angiotensin System

特集◇交感神経とRASは
どのようにかわるか

心不全の分子機構における 交感神経とRASのかかわり

石川義弘

横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学

交感神経によるレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の制御は、垂急性的にさまざまな心血管機能を調節する。交感神経刺激はレニン分泌を高めるが、この調節過程には、いわゆる「レニン分泌のCaパラドックス」が存在する。一般にCaは分泌を亢進させるが、レニン分泌に関しては低下させるからである。近年の遺伝子操作動物を用いた知見から、Caによって抑制される細胞内酵素 (アデニル酸シクラーゼ) の重要性が注目されている。アデニル酸シクラーゼの特定のサブタイプが腎臓に発現することから、そのサブタイプを標的にしたレニン分泌制御が考えられる。さらに本酵素を標的にした心不全治療薬が開発段階に入っており、新しい心不全治療薬として注目されている。

Key words

cAMP, Ca, レニン分泌, アデニル酸シクラーゼサブタイプ

交感神経によるRASの調節

交感神経によるレニン・アンジオテンシン系 (RAS) の制御は、いふなれば交感神経による心血管制御の垂急性効果といえるかもしれない。交感神経を刺激すると、腎臓における傍糸球体装置の顆粒細胞からレニン分泌が促される。この過程では、顆粒細胞表面の β_1 アドレナリン受容体が刺激され、G蛋白質・アデニル酸シクラーゼ系の活性化を受けて分泌が起こる。血中に分泌されたレニンからRASの活性化がはじまり、副腎皮質からのアルドステロン分泌を促してNaの再吸収を起こし、アンジオテンシンII (AII) による血管の収縮などを経て、最終的に循環血漿量の増大と血圧の上昇が起こる。そもそも傍糸球体装置からのレニン分泌刺激の主体は、腎の圧受容器が腎糸球体濾過量の低下を感知することである。しかし交感神経活動の亢進は、このプロセスを増強することができる。心臓においても交感神経刺激がない

と拍動が起らないわけではないが、交感神経刺激があれば心拍数の亢進がみられる。腎臓におけるレニン分泌も、これに似たような仕組みであるといっていだろう。いずれにせよ、交感神経刺激でレニン分泌は亢進する¹⁾。

交感神経とRASのかかわり

交感神経活動がRASを強く制御することが、臨床成績だけでなく、動物モデルを用いた実験から明らかにされている。交感神経支配を薬理的に抑制、あるいは神経除去すると、レニン分泌制御が欠落することが知られている。レニン分泌の分子メカニズムを調べると、傍糸球体装置細胞内の2つの細胞内セカンドメッセンジャーが関与していることがわかってきた。レニン分泌の主たる刺激作用を示すのはcAMPであり、逆に抑制作用を示すのが、細胞内Caである。cAMPに関していえば、カテコラミンはもちろん、プロスタグランジンE₂などのホルモンが、G蛋白質共役型受容体を活性化して、その下