

③日本の医療技術を把握してもらう必要性（定期的な情報提供の必要性）

バーレーン保健省によれば、バーレーンでは日本の医療技術に関する情報はほとんど知られていないとの事であった。実際、弊コンソーシアムはバーレーンの医師を日本へ招待した事があるが、日本へ来たバーレーンの医師は日本の医療施設や技術の高さをよく認識してくれた。しかし、残念な事に一般にはほとんど知られていないのが現状である。知らなければ、医療機器、技術の購入先、治療先として選ばれる事もない。従って、日本の医療技術や医師、施設に関する情報を継続的に提供することが重要である。

⑥ 現地大使館との提携の必要性

今回の教育講座の実施にさいしては、現地日本大使館より多大なサポートを賜った。特に、バーレーンでは、浅子大使にも参加頂き開会の挨拶を頂く事ができた事が、当初都合により参加出来ないと言われていた保健大臣にも出席して頂く事になった大きな要因となったと考えられる。言うまでもなく、中東の人々は礼儀を非常に重んじる。友好関係を深めるためには、現地大使館のサポートがあればよいに越した事はない。

⑤粘り強い調整の必要性

今回教育講座の開催にあたっては、先方との調整に多くの時間がかかった。2014年9月にバーレーンを訪問し、教育講座の主旨、内容等を説明し、協賛者となってくれる適切な機関を探した結果、保健省のアワディ次官補より快諾を得たが、その後の担当者間同志の話し合いは非常に進展が遅れ、調整のためにアポイントが当日になってキャンセルされる事も何度かあった。幹部クラスで合意が取れても、実際の調整相手は担当者であり、幹部が合意したからと言って決してスムーズにはいかない。教育講座の開催場所に関しても、先方に費用の負担と選定を依頼し了承を受けていたのだが、なかなか決定せず、こちらが費用もちで、空いていた宿泊予定ホテルの施設を借りる事も考えた。こちらも相手の態度に関し、かなり懐疑的になった時期もある。しかし、その一方で、調整を繰り返すうちに、最後には信頼関係が構築でき、保健大臣のパトロネージもとれ、予定があり代理が参加すると聞かされていた保険大臣も教育講座に参加され、又、修了証も共同で発行する事が出来た。人集めにも先方の担当者が奔走してくれた。中東をカウンターパートとする際は、あせらず、それなりの時間をかけ信頼関係を構築し、粘り強く調整を続ける必要がある。

⑥キー・パースンの確保と信頼関係の継続の必要性

バーレーンの教育講座では、保健省のアワディ次官補がキー・パースンになってくれた。弊コンソーシアムとアワディ次官補とは、本事業をはじめ以前から既に関係があった。本事業がはじまってからも、弊コンソーシアムに係わるポルフィリン-ALA学会にご招待し、その際にも開催に向けた後押しをお願いした。今回、バーレーンでの催しが、保険大臣、次官、次官補にも参加頂く盛大な催し物とする事が出来た要因の一つは、アワディ次官補と深い信頼関係を築けたからである。一度築いた信頼関係が途切れる事なく、今後も継続的に接触を持ち続ける事が望まれる。

(2) バーレーンでの気づき点（バーレーンの医療機関間のライバル意識について）

バーレーンの医療組織は保健省管轄のキングハマド病院、軍管轄下の Bahrain Defense Force

Hospital、アイルランドの RSCI 等があり、互いにライバル意識が強く、会場選び、開会の挨拶を誰がするか等でも、かけひきがあった。当初、保健省のアワディ次官補が先に記した学会出席のための来日時に、比較的中立的な RCSI にする事で、各機関の医師も集まりやすいのではないかとのお話があったため、担当者へ連絡すると、そんな話は聞いていない、何故、RCSI なのかという話になった。当方としてはあくまで保健所の意向に従う旨、説明し、納得してもらったが、バーレーンの医療分野に進出する際には、複数の医療機関がある程度のライバル関係にある事に、気をつけるべきであろう。

(3) アブダビでの課題（アブダビの現地組織の役割と活動の把握の必要性）

アブダビでは、各機関の役割分担と活動、誰がキー・パースンなのか等がいまだに不明の状況である。今回、カウンターパート候補として、SEHA の 2 部門を訪問し交渉した。

最初に訪れた、Academic Affair Divison の Corporate Clinical Education Manager である Dr. Zahra Baalawi 氏と、Corporate Research & Academic Affair Manager の Dr. Uche Udeozo 氏からは、非常に友好的に迎えられ、教育講座の実施についても賛同を受け、関係者と調整してくれるとの事であった。しかし、同じ日の午後に訪問した Corporate Medical Division の Group Chief of Staff である Dr. Mohamand Yaman 氏からは、教育講座は SEHA の管轄ではなく、Abu Dhabi Education council に連絡すべきとの一言で拒絶されてしまった。

その後の粘り強い交渉によって、今回 SEHA 傘下の一つの病院である Sheikh Khalifa Medical City で開催する事が出来たが、組織の役割分担等がはっきりしない。

これまでの、弊コンソーシアムの活動でも、アブダビはカウンターパートがころころ変わり、接点がとりにくかった。アブダビは、外国人をコンサルタントや実際に実務を遂行する担当者として雇うが、もはや自分達だけでも出来ると考え途中で契約を切る事があるが、その後は何をやっているか分からなくなってしまう事が多い。又、数年毎に組織が再編され動いており、同じ建物でも、違う組織に変わっていたりすることも頻繁にあり、体制と役割が把握しにくい。公的な病院は SEHA が管轄しているが、SEHA の幹部は個別の病院の幹部が兼務しており、実態が良く分からないところがある。又前述のように、アブダビには欧米が入っているが、どこが何をやっているかも分からない。しかし、これらの情報を把握しないと、戦略が練れないため、今後の情報収集は是非とも必要になる。弊コンソーシアムとしては、アブダビを切り崩していくため、今回の教育講座で司会をしてくれたリサーチ・ディレクターとコンタクトをとっていきたいと考えている。

2) 将来性

(1) バーレーン保健大臣からのご要望

バーレーンでは、本事業の遂行にあたって教育講座の前日に、保健大臣と面会する事が出来た。その際、大臣から、教育講座のみならず、今後の取り組みについて提案を出すよう強い要望があった。保健大臣からは、先方の課題として、脳神経外科医がいない事や、感染症のコントロールが出来ていない事、鎌形赤血球症患者が多い事などをうかがった。鎌形赤血球症に関しては、米国には 10 万人の患者、350 万人の遺伝子に差異のある人がおり、研究者からガイドラインやリコメンデーションが出ていて、救急体制が確立されており早い段階で処置出来れば生存できる可能性が高くなるとの報告がある。従って、米国もいれ、日米中東で共同研究を実施する事が考えられる。共同研究のカウウターパート候補はかなりある。弊コンソーシアムにとっても、ヘモグロビ

ンの代謝がかかわっているので、良い研究テーマになる。

(2) 教育講座から実践への展開

今回の教育講座では時間の関係上、ごく基礎的な部分のみに留まったが、治験の重要性と臨床研究の面白さを理解してもらい、いいきっかけにはなったと思われる。しかし、時間的な制約は大きく、今後も継続的に基礎講座を続ける事が必要である。又、今後は、治験責任者、コーディネーター、モニター等、実務を遂行する人材の育成のための講座も必要となってくる。又、講義だけで理解する事は不可能であり、実践も必要となってくる。実践に関しては、例えば、共同研究や、論文指導等が考えられる。治療の研究は一つのテーマとなりうるし、臨床研究は、対象は少数でも良いから、まずは始めて見るべきと思われる。我が国にとっても、中東の人は医学的に日本人に近く過食に弱いという性質があり、日本人も肥満になれば糖尿病が増え、日本と共同で治験をする事は意義がある。欧米のデータは日本人には使えない。がんに関しても同様なことが言える。臨床研究に関しては、バーレーンにもアラビアンガルフ大学内にそのセクションができたが、現状では、組織が出来ても実践の経験がないので研究が進んでいない状況にある。我が国の医師、研究者が共同研究という形で支援する事も考えられる。

(3) バーレーンの抱える課題の解決に向けた取り組み

バーレーンでは、法的には治験は必要ないものの、保健大臣のお話にもあったように、感染症の予防と治療が不十分であるという課題があり、その解決のためには治験や臨床研究が必要になる。現状、この地域の人々は治験の対象になっていないため、中東の人を対象としたデータの収集、蓄積と、それをもとにしたリサーチが考えられる。又、欧米の医薬品会社が手がけない、中東に特有な遺伝病等に関し、臨床試験をして欲しいという強い要望もある。又、実際に臨床研究が動いており、その中の課題等から次の提案をする事も考えられる。

(4) アブダビでの将来性

アブダビは、サウジアラビアと並び我が国最大の原油輸入先であり、アブダビへの支援は原油権益の確保を通じて、我が国のエネルギーセキュリティの向上に大きく資する可能性がある。しかし、残念ながら、バーレーンに比べて、日本の医療分野での協力に関する関心はあまり高くない。そのため、アブダビの医療分野へ日本の医療技術を普及させるために、弊コンソーシアムとしては、既にある程度の関係が構築されているバーレーンでの活動をアブダビに示す事で、彼らの関心を励起しながら、アブダビへの直接的な働きかけを行なっている。今回の教育講座の協賛である SKMC との教育講座終了後の面談時にも、バーレーンでは既に弊コンソーシアムの支援の下で臨床研究が進行中である旨説明すると、先方は臨床研究の実施に高い興味を示した。もちろん市場規模としてもアブダビは非常に大きい。今後も、先行しているバーレーンでの活動を宣伝する事で彼らの関心をひくと共に、今回の教育講座で築いた人間関係を活用し交流を広げていき、日本の医療技術の認知度を高めていく活動を継続していきたい。

以上を踏まえ、今後はバーレーン保健大臣からのご要望、バーレーン、アブダビの抱える課題、先方のやりたい事などをヒアリング等によってリストアップし、各ステイク・ホルダーのインセンティブも考慮し、そのための知識と戦略をパッケージ化し、その中で対応出来る事を検討していきたい。

3-3. 本年度のまとめ

本事業では、中東地域への日本の医療技術普及のための環境整備の一環として、治験にかかわる教育講座をバーレーンとアブダビで実施した。又、並行して、中東が抱える医療課題、日本の医療技術普及にかかわる課題についても調査した。

バーレーンの教育講座では、バーレーン保健大臣、次官、次官補、日本大使他、約 80 名が参加する盛大なイベントとなり、両国間の関係強化につながった。又、治験に関しても、アンケート回答者 43 名中 36 名から「治験の実施に興味あり」との回答を得ることができ、治験の重要性の理解も深まったと考えられる。今後は、教育講座のみならず、共同研究の実施、臨床研究の指導等、実践が必要となる。

アブダビでの教育講座では、参加者は約 20 名と少数であったが、活発な質疑応答があり、参加者の治験への興味の高さが伺えた。アンケート結果でも、回答者 9 名中 7 名が治験の実施に興味がありとの事で、治験の重要性の理解も、ある程度深まったと考えられる。但し、アブダビでは、より多くの医師に治験の重要性や日本の医療技術の良さを理解してもらうための戦略と取り組みが必要である。

中東地域の抱える医療課題全般としては、食生活の向上による生活習慣病への対策が必要な事、医薬品の人種差による効果の確認が必要な事、欧米への過度の依存からの脱却が必要な事、医療システムの効率化及び医療費の抑制が必要な事、医療産業の育成に向けた戦略と取り組みが必要な事等があげられる。

バーレーンでは、保健大臣と面会する時間を頂き、バーレーンが抱える医療課題として、感染症対策が不十分であること、脳神経外科医が不足していること、鎌形赤血球症への対策が必要な事等をうかがった。又、今回の取り組みのフォローアップ計画を提出するよう要望も頂いた。先方が意識していないものも含め、抱える課題、他国との差別化、日本側が出来る事等を踏まえ、今後の取り組みについて提案したい。

日本の医療技術の普及にかかわる課題としては、日本の医療技術に関する情報が伝わっていないこと、欧米に比べ人材交流が少ないこと、戦略を練るために必要な海外勢の動向、医療機関の組織や役割に関する情報が不足している事等があげられる。今後も継続的な情報提供、人材交流、情報収集が望まれる。

【発表概要】*The 105 American Association for Cancer Research Annual meeting, San Diego, 2014,4*

A novel treatment for triple-negative breast cancer using intrinsic magnetized paclitaxel

Masanari Umemura, Ayako Makino, Itaru Sato, Xianfeng Feng, Maki Iwai, Kayoko Ito, Akiyoshi Miyajima, Makoto Otake, Akane Nagasako, Kosuke Matsuo, Haruki Eguchi, and Yoshihiro Ishikawa

Cardiovascular Research Institute, Yokohama City University, Yokohama 236-0004 Japan

Background: We previously reported the identification of a novel nano-organic compound, EI236, an anti-cancer agent with intrinsic magnetic property. In addition to anti-cancer effect, its ferromagnetic property contributes to unique features. 1) It can be attracted by a magnet. 2) It can be visualized by magnetic resonance imaging (MRI). Hereby, we have identified the key mechanism that contributes to magnetism by X-ray

crystallographic analysis, and succeeded in generating a novel paclitaxel with intrinsic magnetism; this is a single paclitaxel compound, and is *not* a paclitaxel encapsulated in micelle with magnetic particles. Our aim is to examine its effect on triple negative-breast cancer (TNBC) cells.

Method: The magnetization of the magnetized paclitaxel was measured with a superconducting quantum interference device (SQUID) (Quantum Design MPMS7 system). Breast cancer cells, MDA-MB-453 (TNBC) and MCF7 (Non-TNBC), were obtained from RIKEN Bioresource center. Cell proliferation assay was performed using a commercially available kit, XTT Cell Proliferation Assay Kit. Apoptotic cells were stained with APC Annexin V and 7-AAD, and measured by fluorescence activated cell sorting (FACS), to evaluate early and late apoptosis. Cell cycle analysis was performed using The Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit and assessed using FACS.

Results: Plots of magnetization versus magnetic field revealed that the magnetized paclitaxel exhibits spontaneous magnetization in SQUID. Magnetized paclitaxel was easily attracted by a commercial bar magnet. Magnetized paclitaxel

exhibits greater anti-cancer effect than original paclitaxel in TNBC and Non-TNBC cells in a dose-dependent manner. Magnetized paclitaxel induced apoptosis and G2/M arrest in cell cycle analysis in a dose-dependent manner, suggesting that magnetized paclitaxel retained the original anti-cancer property. In MRI T2-weighted imaging, signal intensity was changed in a concentration-dependent manner with magnetized paclitaxel, but not with commercial available paclitaxel.

Conclusion: These results suggested that various conventional anti-cancer drugs might be similarly magnetized, leading to novel drug development in future cancer chemotherapy.

*The 105 American Association for Cancer
Research Annual meeting, San Diego, 2014,4*

**Development of thermochemotherapy using
cisplatin and ferucarbotran (Resovist®) in
head and neck cancer**

Itaru Sato^{1,2}, Masanari Umemura², Kenji
Mitsudo¹, Xianfeng Feng², Hideyuki
Nakashima¹, Mitomu Kioi¹, Haruki Eguchi³,
Iwai Tohnai¹ and Yoshihiro Ishikawa²

¹ Department of Oral and Maxillofacial surgery,
Yokohama City University, Yokohama
236-0004,
Japan

² Department of Cardiovascular Research
Institute, Yokohama City University School of
Medicine

³ IHI corporation, Yokohama, Japan

Background: Radical surgery for patients with
advanced head and neck cancer causes
dysfunctions as well as decreases quality of life.
To overcome this issue, we developed a new
combination therapy of cisplatin and inductive
hyperthermia using ferucarbotran (Resovist®).

Ferucarbotran, which is made of
superparamagnetic iron oxide, generates heat
when exposed to an alternating magnetic fields
(AMF). Herein, we explored whether
ferucarbotran could be used as a heat source for
hyperthermia upon exposure to AMF in the
presence of cisplatin. Our aim is to evaluate
the simultaneous therapeutic efficacy of
chemotherapy and inductive hyperthermia for
head and neck cancer.

Materials and Methods: OSC-19 and HSC-3,
human oral cancer cell lines, were used in this
study. Cell proliferation was assessed by
methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The
intracellular level of reactive oxygen species
(ROS) was measured using fluorescent dye 2',
7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate.
Apoptotic cells were stained with Annexin V,
allophycocyanin conjugate and
7-amino-actinomycin D, and measured by
fluorescence activated cell sorting (FACS), to
evaluate early and late apoptosis. Thermal
images and temperature were obtained by
thermography and thermometer. Alternating
magnetic fields were generated by a
transistor-driven vertical coil at a frequency of
308 KHz and electric current (EC) 250 A.

Results: Ferucarbotran generated heat in a dose- and time-dependent manner when exposed to an AMF, suggesting that ferucarbotran could be used as a heat source for hyperthermia. As we expected, Cisplatin suppressed proliferation of OSC-19 and HSC-3 cells in a dose-dependent manner, not only ferucarbotran. First, we performed MTT assay and ROS generation assay to evaluate whether hyperthermia effect enhanced anti-cancer effect in the presence of cisplatin. Simply incubation at 42 °C for one hour enhanced the anti-cancer effect and ROS generation in the presence of cisplatin. Cisplatin induced apoptosis of OSC-19 and HSC-3 cells in a dose-dependent manner. Ferucarbotran further promoted cisplatin-induced apoptosis compared to cisplatin alone, when exposed to an AMF for an hour. Thus, the combination of cisplatin with ferucarbotran /AMF was more effective than cisplatin alone, suggesting that we could reduce the amount of cisplatin in clinical usage.

Conclusion: Our findings suggest that combination therapy of cisplatin and ferucarbotran in an AMF may be used to develop a new combination therapy for head and neck cancer.

第38回日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6

MRI 造影剤フェルカルボトランを用いた新しい温熱化学療法の開発

佐藤 格^{1,2}, 光藤健司¹, 梅村将就², 宮島章嘉^{1,2}, 中島英行¹, 來生 知¹, 石川義弘², 藤内 祝¹

1 横浜市立大学大学院医学研究科 顎顔面口腔機能制御学

2 横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学

【目的】 現在臨床で使用されているMRI造影剤フェルカルボトランは、強力な磁性を有することから交流磁場下で火炎を使用せず速やかに温度上昇を示し、組織内加温が可能な薬剤である。本研究では、頭頸部癌細胞に対してフェルカルボトランを用いた温熱療法とシスプラチンとの相乗効果について検討したので報告する。

【方法】 ヒト由来頭頸部癌細胞（OSC-19、HSC-3）を用いて実験した。抗腫瘍効果は、

細胞毒性試験を用いて評価した。抗癌剤や温熱によって増強される活性酸素 Reactive Oxygen Species（以下 ROS）を ROS アッセイで評価した。アポトーシスの評価は、フローサイトメトリーを用いて測定した。われわれが開発した交流磁場発生装置を用いて、高周波誘導加熱方式でフェルカルボトランの温度上昇を検討した。**【結果】** 交流磁場下で培養細胞に添加したフェルカルボトランは、42° C以上まで温度上昇を示した。頭頸部癌細胞において、シスプラチンに交流磁場を用いたフェルカルボトランによる温熱作用を併用することでアポトーシスは増強した。また、温熱療法とシスプラチンとの相乗効果で ROS の産生が増強した。

【結語】 フェルカルボトランは、交流磁場下で発熱し、温熱療法のための熱源物質として応用が可能である。また、シスプラチンと併用することで抗腫瘍効果の作用を増強させ新しい頭頸部癌の治療法となることが示唆された。

**Development of combination therapy with
cisplatin and hyperthermia generated with
ferucarbotran (Resovist[®]) in an alternating
magnetic field for oral cancer**

Itaru Sato^{1,2}, Kenji Mitsudo¹, Masanari
Umamura², Hideyuki Nakashima¹, Mitomu
Kioi¹, Haruki Eguchi³, Yoshihiro Ishikawa² and
Iwai Tohnai¹

¹ Department of Oral and Maxillofacial surgery,
Yokohama City University, Yokohama
236-0004
Japan

² Department of Cardiovascular Research
Institute, Yokohama City University,
Yokohama 236-0004
Japan

³ IHI corporation, Yokohama, Japan

Background: Radical surgery for patients with
advanced oral cancer causes dysfunctions as
well as decreases quality of life. To overcome
this issue, we developed a new combination

therapy of cisplatin and inductive hyperthermia
using ferucarbotran (Resovist[®]). Ferucarbotran,
which is made of superparamagnetic iron oxide,
generates heat when exposed to an alternating
magnetic fields (AMF). Herein, we explored
whether ferucarbotran could be used as a heat
source for hyperthermia upon exposure to AMF
in the presence of cisplatin. Our aim is to
evaluate the simultaneous therapeutic efficacy
of chemotherapy and inductive hyperthermia
for oral cancer.

Materials and Methods: OSC-19 and HSC-3,
human oral cancer cell lines, were used in this
study. Cell proliferation was assessed by
methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The
intracellular level of reactive oxygen species
(ROS) was measured using fluorescent dye 2',
7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate.
Apoptotic cells were stained with Annexin V,
allophycocyanin conjugate and
7-amino-actinomycin D, and measured by
fluorescence activated cell sorting (FACS), to
evaluate early and late apoptosis. Thermal
images and temperature were obtained by
thermography and thermometer. AMFs were
generated by a transistor-driven vertical coil at
a frequency of 308 KHz and electric current

(EC) 250 A.

Results: Cisplatin inhibited proliferation of OSC-19 and HSC-3 cells in a dose-dependent manner. Simply heating the medium to 42.5 °C enhanced the effect of cisplatin. Similarly, ROS production was increased in the presence of cisplatin, and was further increased upon heating. Heating to 42.5 °C was also achieved in cell culture medium to which ferucarbotran had been added and then exposing the medium to alternating magnetic fields.

Ferucarbotran-induced heating enhanced both early and late cellular apoptosis. Cell cycle analysis demonstrated that cisplatin decreased G0/G1, and increased G2/M accumulation. However, no further changes in cell cycle were induced when ferucarbotran-induced heating was observed.

Conclusion: Our findings suggest that combination therapy of cisplatin and ferucarbotran in an AMF may be used to develop a new combination therapy for oral cancer.

*The 73rd Annual Meeting of the Japanese
Cancer Association, Yokohama, 2014,9*

A novel paclitaxel with intrinsic magnetism

Ayako Makino¹, Masanari Umemura¹, Kayoko
Oda¹, Makoto Ohtake¹, Haruki Eguchi²,
Yoshihiro Ishikawa¹

¹ Cardiovascular Research Institute,
Yokohama City University, Yokohama
236-0004
Japan

² IHI corporation, Yokohama, Japan

Background: We succeeded in generating a novel paclitaxel with intrinsic magnetism. This is a single paclitaxel compound, and is not a paclitaxel encapsulated in micelle with magnetic particles. Our aim is to examine its effect on breast cancer cells.

Method: MDA-MB-453, MDA-MB-231 and MCF7 were used. Cell proliferation was assessed by XTT assay. Apoptosis and cell cycle were analyzed by fluorescence activated cells sorting (FACS). To examine the feasibility of magnetized paclitaxel for magnet-guided

delivery, we used a mouse model, in which MCF7 were grafted onto the legs. The accumulation of this compound by a permanent magnet was examined.

Result: We found that magnetized paclitaxel inhibited the proliferation of all cell lines and also increased apoptosis. This compound retained the characteristic anti-cancer mechanism of paclitaxel itself, i.e., induction of G2/M arrest. When a magnet was used, the accumulation of magnetized paclitaxel was further increased in tumor by histological evaluation.

Conclusion: Magnetized paclitaxel may enable us to develop novel strategies in breast cancer treatment, i.e. chemotherapy with controlled drug delivery with a single-drug compound.

The 88th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Nagoya, 2015,3

Magnetized paclitaxel derivative for novel triple negative breast cancer therapy

Ayako Makino¹, Masanari Umemura¹, Itaru Sato¹, Mayumi Katsumata¹, Akane Nagasako¹, Kayoko Oda¹, Makoto Ohtake¹, Haruki Aoyama¹, Haruki Eguchi², Yoshihiro Ishikawa¹

¹ Cardiovascular Research Institute, Yokohama City University, Yokohama 236-0004 Japan

² IHI corporation, Yokohama, Japan

Background: Recently we generated a novel paclitaxel (PTX) with intrinsic magnetism (Magnetized-paclitaxel: M-PTX). M-PTX is a single PTX compound, and is not a PTX encapsulated in micelle with magnetic particles.

In this study, we are developing a novel treatment with controlled drug delivery in triple negative breast cancer (TNBC).

Material and Method: MDA-MB-453 and MCF7 were used. Cell proliferation was assessed XTT Cell Proliferation Assay.

Immunohistochemistry was performed to evaluate depolymerization of microtubules with anti-alpha-tubulin antibody in the presence of M-PTX or PTX. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. To examine the feasibility of M-PTX for magnet-guided delivery in tumor, we used a TNBC mouse model.

Result: We found that M-PTX exhibited anti-cancer property and inhibited the depolymerization of microtubules. Also M-PTX induced G2/M arrest in cell cycle and cellular apoptosis with similar efficacy to PTX, suggesting that M-PTX retained the characteristic anti-cancer mechanism of PTX itself. M-PTX was accumulated by a magnet in vitro and in vivo.

Conclusion: M-PTX may enable us to develop novel treatment for TNBC, i.e. chemotherapy with controlled drug delivery with a single-drug compound.

*The 88th Annual Meeting of The Japanese
Pharmacological Society, Nagoya, 2015,3*

**Magnetized methotrexate derivative for
novel anti-cancer therapy**

Mayumi Katsumata¹, Masanari Umemura¹,
Itaru Sato¹, Makoto Ohtake¹, Kayoko Oda¹,
Akane Nagasako¹, Ayako Makino¹, Haruki
Aoyama¹, Haruki Eguchi², Yoshihiro Ishikawa¹

¹ Cardiovascular Research Institute, Yokohama
City University, Yokohama 236-0004
Japan

² IHI corporation, Yokohama, Japan

Background: We previously reported the generation of a novel paclitaxel derivative with intrinsic magnetism. Similarly, we have synthesized a novel derivative of methotrexate, a conventional drug for cancer and rheumatic diseases, with intrinsic magnetism (M-MTX). This is a single methotrexate paclitaxel compound and is not a methotrexate encapsulated in micelle with magnetic particles. We have examined whether M-MTX has both

the magnetic and the anti-cancer property with similar efficacy to methotrexate.

Materials & Methods: The magnetic property of M-MTX was measured by Electron Spin Resonance (ESR) and Superconducting Quantum Interference Device (SQUID). MCF7, breast cancer cells were used. Cell proliferation was assessed by a commercially available kit, XTT Cell Proliferation Assay Kit (ATCC). Apoptosis was analyzed using fluorescence activated cell sorter (FACS).

Results: M-MTX was easily attracted by a neodymium magnet. Both ESR and SQUID showed that M-MTX has an intrinsic magnetism. Furthermore, M-MTX inhibited cell proliferation and induced cellular apoptosis in MCF7 cell lines.

Conclusion: M-MTX may provide us a new strategy for cancer therapy, i.e., chemotherapy with magnetic drug delivery with a single agent.

The 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, Kobe, 2014,3

A novel methotrexate derivative with intrinsic magnetism

Mayumi Katsumata¹, Masanari Umemura¹,
Itaru Sato¹, Makoto Ohtake¹, Kayoko Oda¹,
Akane Nagasako¹, Ayako Makino¹, Haruki
Aoyama¹, Haruki Eguchi², Yoshihiro Ishikawa¹

¹ Cardiovascular Research Institute, Yokohama
City University, Yokohama 236-0004
Japan

² IHI corporation, Yokohama, Japan

Background: We have recently reported a novel anti-cancer compound with intrinsic magnetism (EI236). In addition to anti-cancer effect, EI236 has three features 1) EI236 is attracted by a magnet, i.e., magnetic drug delivery, 2) generating heat in an alternating current magnetic field, i.e., hyperthermic effect, and 3) a new contrast agent in magnetic resonance imaging (MRI), because of its magnetism.

Based on these properties of EI236, we succeeded in generating a novel methotrexate

derivative with intrinsic magnetism (m-MTX).

It is well known that MTX is a commercially available and has been used as conventional drug for cancer and rheumatic diseases. In this study, we examined whether m-MTX has an intrinsic magnetism and the anti-cancer effect.

Materials & Methods: The magnetic property of m-MTX was measured by ESR (Electron Spin Resonance) and SQUID (Superconducting Quantum Interference Device). VX2, rabbit squamous cancer cells and MCF7, breast cancer cells, were used. To evaluate the m-MTX-induced cytotoxicity, cell proliferation was measured using commercially available kit (ATCC).

Results: M-MTX was easily accumulated by a permanent magnet in water. ESR and SQUID showed that m-MTX has an intrinsic magnetic property. Furthermore, m-MTX inhibited cell proliferation in both cells in a dose dependent manner.

Conclusion: M-MTX may enable us to develop novel strategies in cancer treatment, i.e., chemotherapy with controlled drug delivery with a single drug compound.

The 92nd Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, Kobe, 2014,3

Transient receptor potential cation channel 3 (TRPC3) regulates proliferation and migration via phosphorylation of STAT5 in human melanoma

Kayoko Oda^{1,2}, Masanari Umemura¹, Erdene Baljinntam³, Mayumi Katsumata¹, Yukie Yamaguchi², Michiko Aihara², Kousaku Iwatsubo³, Yoshihiro Ishikawa¹

¹ Cardiovascular Research Institute, Yokohama City University, Yokohama 236-0004 Japan

² Department of Environmental Immuno-Dermatology, Yokohama City University, Yokohama 236-0004, Japan

³ Department of Cell Biology and Molecular Medicine, New Jersey, Medical School, Rutgers, The State University of New Jersey

Background: It is well known that melanoma has a poor prognosis due to its rapid progression and high metastatic ability. TRPC

is activated upon changes in temperature or membrane voltage, and thus triggers various intracellular responses via cationic flux. Here, we have investigated whether TRPC3, which is universally expressed in human melanoma cells, regulates proliferation and/or migration of human melanoma cells.

Material: C8161 cells, a BRAF wild type human melanoma cell line, were used in this study. TRPC3 was inactivated either genetically by siRNA encoding TRPC3 or pharmacologically by Pyr3, a pyrazole compound that is known to selectively inhibit TRPC3.

Result: Genetical knockdown of TRPC3 significantly inhibited proliferation of C8161 cells ($p < 0.0001$). Pharmacological inhibition with Pyr3 suppressed cell proliferation with a IC_{50} value of $12.99 \mu M$. Both knockdown of TRPC3 and Pyr3 significantly decreased path length of cell migration ($p < 0.01$, $p < 0.01$ respectively). Pyr3 also inhibited phosphorylation of signal transducer and activators of transcription (STAT) 5, suggesting that TRPC3-induced proliferation and migration were regulated by, at least in part, the JAK/STAT signaling pathway.

Conclusion: Inhibition of TRPC3 suppressed cell proliferation and migration in C8161 cells, suggesting that TRPC3 may be a novel target in human melanoma therapy in the future.

科研費報告書 必要書類

磁性パクリタキセル 使用実験まとめ

2014年4月～2015年3(2)月分

M2 牧野紋子

2015/02/27

実験種類(2014, 4~2015, 3)

① 磁性パクリタキセルの実験 乳がん

※使用細胞 MCF7, MDA-MB-453, MDA-MB-231

- ・ XTT assay…濃度・時間依存的に抗腫瘍効果あり。
- ・ Apoptosis 誘導評価…濃度依存的に誘導効果あり。(MCF7 だけ評価し難い結果)
- ・ Cell cycle 変動評価…G2/M 期で細胞分裂が停止した。
- ・ チューブリン蛍光染色…チューブリンが脱重合手前で停まっているのを観察。
- ・ チューブリンアッセイ…重合度は上がったが、DMSO と同程度。手技ミス発見。
- ・ 磁石集積 in vivo…磁石に集まることが示唆された。

② 磁性パクリタキセルの実験 舌癌

※使用細胞 OSC-19

- ・ XTT assay…濃度依存的に抗腫瘍効果あり。しかし、市販パクリタキセルと比較すると、その効果はとても低い。

1. 磁性パクリタキセルの 抗腫瘍効果

※使用細胞: MDA-MB-453 (ヒト由来トリプルネガティブ乳がん細胞), MDA-MB-231 (ヒト由来トリプルネガティブ乳がん細胞), MCF7 (ヒト由来エストロゲン受容体陽性乳がん細胞), OSC-19 (ヒト由来扁平上皮癌細胞)

<背景>

先行実験に於いて、ヒト由来トリプルネガティブ乳がん細胞である MDA-MB-453、MDA-MB-231 とヒト由来エストロゲン受容体陽性 (非トリプルネガティブ) 乳がん細胞である MCF7 に対して、磁性パクリタキセルの抗腫瘍効果が XTT assay を用いて示されている。

<目的>

ヒト由来の乳がん細胞 (トリプルネガティブのセルラインも非トリプルネガティブのセルラインも含める) に対する磁性パクリタキセルの抗腫瘍効果を示す。同時に、比較対象の市販のパクリタキセルの抗腫瘍効果と有意な差がないことを示す。(磁性化してもパクリタキセルの性質を保持できていることの証明)

磁性パクリタキセルの濃度や刺激時間を他の細胞種と揃えた実験を行い、論文の figure 用にする。

また、ヒト由来扁平上皮癌細胞 OSC-19 を用いて、乳がんだけでなく、舌癌にも効くことを証明する。

<方法>

MDA-MB-453、MDA-MB-231、MCF7 の細胞を 96well plate に撒いた (n=4)。翌日、磁性パクリタキセルとパクリタキセルを細胞に投与した。その 24~48 時間後、activated-XTT 試薬を加え、2 時間後にプレートリーダーで吸光度を測定した。

実験は複数回に分けて行い、濃度・時間・細胞数を検討した。