

201438125A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

口腔がんに対する磁性抗がん治療薬の実用化

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 石川義弘

平成27(2015)年3月

別紙 1

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

口腔がんに対する磁性抗がん治療薬の実用化に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 石川義弘

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、公立大学法人横浜市立大学が実施した平成26年度「口腔がんに対する磁性抗がん治療薬の実用化」の成果を取りまとめたものです。

委託業務成果報告書目次

目 次

I. 委託業務成果報告 (総括)	
1. 口腔がんに対する磁性抗がん治療薬 の実用化に関する研究	1
石川 義弘	
II. 委託業務成果報告 (業務項目)	
1. 口腔がん治療の臨床開発に関する研究	11
藤内 祝	
2. MR I 技術開発の推進に関する研究	21
青木 伊知男	
3. 磁場誘導に関わる技術開発に関する研究	26
江口 晴樹	
4. 産学医工連携検討会の実施	37
江口 晴樹	
5. 臨床試験に関わる諸問題の検討	57
浦野 勉	
III. 学会等発表実績	59
IV. 研究成果の刊行物・別刷	68
V. その他	

[ I ]

委託業務成果報告（総括）

平成 26 年度厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

口腔がんに対する磁性抗がん治療薬の実用化に関する研究  
業務主任者 石川義弘 横浜市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

舌がんは年間患者数が数千人の口腔がんであり、治療の中心は外科的切除である。わずか数センチの小さな器官だが、患者の多くは高齢者である。そのため切除後の合併症として、構音障害や嚥下障害は必発であり、誤飲性肺炎による死亡例も多い。放射線療法や化学療法が考えられるが、化学療法は全身副作用により強い制限をうける。このため頸動脈からの超選択的な、動注化学療法が行われるが、手技の困難さから合併症を伴うことも多い。

EI236 は横浜市立大学と I H I（株）（旧石川島播磨重工株式会社）の産学連携により、重工業における金属材料技術を、医療に転用して開発された化合物である。強い抗がん作用を有するだけでなく、化合物自身が強度の磁性を持つ。このため磁石で局所に集積させることが容易であり、MRI で画像化し、定量することが可能である。さらに EI236 の磁性メカニズムが結晶構造解析から解明され、この解析結果を利用して、既存の抗がん剤を磁性化する技術が開発された。

先行研究の結果から、EI236 の舌癌における治療有効性が実証されている。舌は突出した小器官であるため、磁石ではさみ、EI236 を磁場で舌に集積させることが容易である。ウサギ舌癌モデルによる検討では、同じ薬剤投与量で、治療効果を劇的に改善することが実証されている。本研究では、ウサギモデルによる検討結果をもとに、EI236 および類似の磁性抗がん剤を用いて、舌癌の安全な治療法を開発する。ヒト投与に向けた製剤化を検討すると同時に、磁場による集積条件やMRI による撮影条件の検討を進めた。

石川義弘	横浜市立大学大学院医学研究科 循環制御医学 教授
藤内祝	横浜市立大学大学院医学研究科 口腔外科学 教授
青木伊知男	放射線医学総合研究所 チームリーダー
江口春樹	横浜市立大学大学院 医学研究科 客員准教授
浦野勉	横浜市立大学大学院 医学研究科 客員教授

#### A. 研究目的

重工業における汎用技術を医療転用し、先進的ながん治療技術として再開発する。磁性の評価技術はIHI（株）では長年にわたり、ジェットエンジン材料の開発に利用してきた。その評価対象を金属から、医薬品化合物に応用して開発されたのがEI236である。EI236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。この技術は、これまでに多数の特許として申請され、また欧米においても広範囲な基本特許として成立しており、我が国独自の強力な特許技術である。

舌は突出したわずか数センチの構造物であるため、磁石で挟み込むことが容易である。ウサギ舌癌モデルでは、耳介静脈から投与したEI236を舌に集積させることが容易である。これはEI236の抗腫瘍効果を示唆する。全く同じ投与量で、薬剤の静注後に舌に電磁石を当てただけで、治療効果が顕著に増強することが推測された。これはEI236が電磁石によって舌に集められたことにより、局所の薬剤濃度が上昇したためと考えられる。

本申請では、磁性抗がん剤を静脈注射し、磁場で腫瘍部位に集積させ、MRIで集積を確認したうえで、化学療法を行う磁場誘導・MRI確認化学療法の開発を検討した。先行する研究成果では、EI236の磁性構造をタキソールに転居する事に成功した。これは結晶構造解析によ

って明らかとなったEI236の磁性中心をタキソール側鎖に修飾した磁性タキソールである。市販の永久磁石で集積が可能であり、EI236と同様にMRIで可視化できる。そこでEI236を磁性抗がん剤として用いて、舌癌に応用可能な治療法を確立するとともに、タキソールのより強力な磁性化を進め、磁場誘導とMRIによる可視化が可能な薬剤として開発することを目的とした。

#### B. 研究方法

造船業者であるIHI（株）の材料技術の医療転用により、EI236(N,N'-bis(salicylidene)ethylenediamineiron)をはじめとする磁性薬剤化合物が開発された。EI236は金属錯体の一種であり、強い抗がん作用を持つだけでなく、マグネタイトに匹敵する強磁性を持ち、磁石で誘導が可能であり、交流磁場印加によって発熱する。さらにMRIの造影剤となることから、悪性黒色腫、骨肉種、扁平上皮癌などの動物癌モデルにおいて有効性が実証されている。本申請においては、EI236の誘導体である磁性タキソールを用いて、集めて（磁場誘導）、確認する（MRI）抗がん治療として開発することを試みた。これまでに舌癌治療に汎用されてきたタキソールの誘導体（磁性タキソール）を用いることにより、実用化を加速させる検討を行った。舌癌モデルにおいては先行化合物であるEI236を用いてウサギ舌癌モデルでの治療を検討した。また磁性化タキソールにおいては、細胞実験でタキソールとの比較を行った。さらにMRIにおける撮像実験では、EI236における撮像効果と磁性タキソールにおける撮像効果を比較検討した。さらに磁性タキソールの臨床開発を考えるうえでの諸問題について検討した。

## C. 研究結果

### 舌癌における化学療法の最適化の検討

先行する研究により、舌癌細胞に対して EI236 自身が高い抗がん活性を示すこと、動物モデルでも高い治療効果を示すことがわかった。MR I による画像解析が可能であること、市販の電磁石による磁場誘導が可能であることも示された。また EI236 の構造解析から明らかとなった磁性中心構造を側鎖に修飾した磁性タキソールが合成された。

EI236 を用いた実験では、舌癌モデルにおいて、EI236 自身が耳介静脈からの投与によって強い抗がん作用を示すことが分かった。これは EI236 において、口腔がん細胞に対する有効性があることを意味する。

さらに EI236 を投与後に、舌部に磁石を当て、磁場による EI236 の集積を試みたところ、局所に EI236 が集積することが確認できた。このことは磁場誘導によって薬物の物理的な誘導効果があることを意味する。またこの磁場誘導によって、EI236 による抗がん作用が増強することが確認された。これは同濃度の薬剤の投与によって、磁場誘導の有無によって治療効果が増強されたことを示し、このことは磁場誘導による抗がん作用の増強を意味する。

一方で EI236 の磁性構造を取り入れることによって磁性タキソールが合成された。磁性化タキソールはタキソールでありながら磁石につく特性を有する。このことは磁性タキソールによっても EI236 と同様の舌癌治療ができる可能性を示唆する。

我々はまず、磁性化タキソールは、タキソールとしての抗がん活性を有していることを細胞培養実験から確認した。これはがん細胞を培養したうえで、タキソールと磁性タキソールを添加し、細胞殺傷効果を比較したものである。この比較において、タキソールと磁性タキソールの細胞殺傷に必要な薬剤濃

度はほぼ同一であった。この結果から、磁性タキソールはタキソールと同程度の抗がん作用を有すると考えられた。

さらにタキソールに特徴的な細胞周期依存性を検討したところ、磁性タキソールとタキソールは細胞周期特性に極めて類似性を持つことが分かった。このことは、磁性タキソールとタキソールの細胞殺傷のメカニズムは類似することが推測された。磁性タキソールは、市販磁石に容易に吸着可能であることから、抗がん剤としての特性をそのまま有しながら、磁石に吸着するようになったタキソールが合成されたと考えられた。ただし磁場による誘導に関しては、磁場強度が EI236 に比べて弱い動物における誘導に比べてヒトにおける誘導では、移動距離が長いことが予測される。このため磁性強度を増強していくことが、今後の検討課題であることがわかった。

### MR I による画像解析

共同研究者の所属する放射線医学総合研究所では分子イメージング技術により、がんの早期診断システムの構築をおこない、EI236 のイメージング技術が検討された。そこで本技術による画像解析において、撮影条件検討を進めることにより、磁性タキソールの定量性の検討をおこなった。一般論においても動物モデルにおいて蓄積された知見は、ヒト MR I 定量技術へと応用検討が可能であるため、動物モデルでの検討の重要性を物語っている。これまでの検討によって、T2\*条件が可視化方法として適していることが分かった。

EI236 においても、また磁性タキソールにおいても動物体内において集積状態を検討できることが判明した。このことは EI236 における画像条件を応用することにより、磁性タキソールの MR I 撮像条件が検討可能であると結論付けられた。



## 臨床試験に向けた準備

臨床試験の最適化に向けた条件検討を行った結果、磁性タキソールの検討においては、タキソールの抗がん効果を参考にしながら、新薬としての申請が必要であることが確認された。このことは完全な新薬ではなくとも、磁性化により新規特性を獲得した薬剤として前臨床試験および臨床試験を検討する必要があると考えられた。

(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遂行した。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た。産学連携、他施設共同、臨床試験、薬事申請に当たっては、関係者および関連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遵守して行った。

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度にとどめるため、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受けつつ行った。

## D. 考察

本年度の研究結果より、タキソールを磁性化した磁性タキソールが合成可能であることが判明した。さらに EI236 における舌癌治療への応用結果から、磁性タキソールも同様の治療戦略によって舌癌への治療に応用できることが考えられた。

しかし、現段階での磁性タキソールの磁性強度には改善の余地があることが分かった。このことはさらに磁性特性を検討することによって、化合物の磁性強度を設計し、さらに強い磁性強度を有する磁性タキソールの合成を進めていく必要があると考えられた。

一方で磁性タキソールはタキソールに比べて磁性特性を持つ優位性があることが確認された。磁性タキソールの薬理活性は、タキソールと変わらないため、長年にわたって世界で蓄積されたタキソールの臨床経験および薬理実験結果が有効活用できることも考えられた。このことは、今後の前臨床試験および臨床試験を進めるうえで大きな利点となることが考えられた。

## E. 結論

磁性タキソールは EI236 の磁性特性を活用することにより、既存のタキソールを磁性化することによって得られた新規抗がん剤である。磁性特性などの改良を進めることにより、今後口腔がん治療に大きな進歩をもたらすことができると考えられた。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yokoyama U, Minamisawa S, Shioda A, Ishiwata R, Jin MH, Masuda M, Asou T, Sugimoto Y, Aoki H, Nakamura T, and Ishikawa Y: Prostaglandin E2 inhibits elastogenesis in the ductus arteriosus via EP4 signaling. *Circulation* 129:487-96, 2014

2. Ishiwata R, Yokoyama U, Matsusaki M, Yoshiya A, Kadowaki K, Ichikawa Y, Umemura M, Fujita T, Minamisawa S, Shimoda H, Mitsuru Akashi M, and Ishikawa Y: Three-Dimensional Multilayers of Smooth Muscle Cells as a New Experimental Model for Vascular

- Elastic Fiber Formation Studies. Atherosclerosis. 233:590-600, 2014
3. Umemura M, Baljinnyam E, Feske S, De Lorenzo MS, Lai-Hua Xie LH, Feng X, Ito K, Makino A, Fujita T, Yokoyama U, Iwatsubo M, Chen S, Goydos JS, Ishikawa Y, and Iwatsubo K: Store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE) Regulates Melanoma Proliferation and Cell Migration. PlosOne. 9(2):e89292, 2014
  4. Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Sakima M, Mamun, AA, Yamane Y, Fujita T, Yokoyama U, Okumura S, and Ishikawa Y: Protection of Cardiomyocytes from the Hypoxia-mediated Injury by a Peptide Targeting the Activator of G-Protein Signaling. PlosOne. 9(3):e91980, 2014
  5. Tsutsumi YM, Tsutsumi R, Hirokawa YT, Sakai Y, Hamaguchi E, Ishikawa Y, Yokoyama U, Kasai A, Kambe N, and Tanaka K: Geranylgeranylacetone protects the heart via caveolae and caveolin-3. Life Sciences. 101:43-48, 2014
  6. Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin HL, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita Km Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato M, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, and Ishikawa Y: Disruption of Epac1 decreases phosphorylation of phospholamban and protects the heart against stresses. J. Clin. Invest. 124:2785-2801, 2014
  7. Baljinnyam E, Umemura M, Chuang C, De Lorenzo M, Iwatsubo M, Chen S, Goydos J, Ishikawa Y, Whitelock J, Iwatsubo K: Epac1 increases migration of endothelial cells and melanoma cells via FGF2-mediated paracrine signaling. Pigment Cell & Melanoma Research. 27:611-20, 2014
  8. Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Kioi M, Nakashima H, Iwai T, Feng X, Oda K, Miyajima A, Makino A, Iwai M, Fujita T, Yokoyama U, Okumura S, Sato M, Eguchi H, Tohnai I, and Ishikawa Y: J Physiol Sci. 64:177-83, 2014
  9. Aoki R, Yokoyama U, Ichikawa Y, Taguri M, Kumagaya S, Ishiwata R, Yanai C, Fujita S, Umemura M, Fujita T, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Asou T, Masuda M, Iwasaki S, Nishimaki S, Seki K, Yokota S, and Ishikawa Y: Decreased serum osmolality promotes ductus arteriosus constriction. Cardiovasc. Res. 104:326-36, 2014
  10. Ohnuki Y, Umeki D, Mototani Y, Jin H, Cai W, Shiozawa K, Suita K, Saeki Y, Fujita T, Ishikawa Y, and Okumura S: Role of Cyclic AMP Sensor Epac1 in Masseter Muscle Hypertrophy and Myosin Heavy Chain Transition Induced by  $\alpha$ -Adrenoceptor Stimulation. J. Physiol. 592(Pt 24):5461-75, 2014

11. Oshiro H, Fukumura H, Nagahama K, Sato I, Sugiura K, Iobe H, Okiyama E, Nagao T, Nagashima Y, Aoki I, Yamanaka Y, Murakami A, Maegawa J, Chishima T, Ichikawa Y, Ishikawa Y, Nagai T, Nomura M, Ohashi K, and Okudela K: Establishment of successively transplantable rabbit VX2 cancer cells expressing enhanced green fluorescent protein. *Medical Molecular Morphology*. in press, 2015
12. Kamide T, Okumura S, Ghosh S, Shinoda Y, Mototani Y, Ohnuki Y, Jin H, Cai W, Suita K, Sato I, Umemura M, Fujita T, Yokoyama U, Sato M, Frutani K, Kitano H, and Ishikawa Y: Oscillation of cAMP and Ca<sup>2+</sup> in cardiac myocytes: a systems biology approach. *J. Physiol. Sci.* in press, 2015
13. Tsunematsu T, Okumura S, Mototani Y, Ohnuki Y, Jin H, Cai W, Suita K, Sato I, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Fujita T, and Ishikawa Y: Coupling of beta1-adrenergic receptor to type 5 adenylyl cyclase and its physiological relevance in cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press, 2015
14. Eguchi H, Umemura M, Kurotani R, Fukumura H, Sato I, Kim J-H, Hoshino Y, Lee J, Amemiya N, Sato M, Hirata K, Singh DJ, Masuda T, Yamamoto M, Urano T, Yoshida K, Tanigaki K, Yamamoto M, Sato M, Inoue S, Aoki I and Ishikawa Y: A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging. *Sci. Rep.* in press, 2015
2. 学会発表
  1. Ishiwata R, Yokoyama U, Ishikawa Y: Secretome-Based Identification of PGE2-EP4-Inducible Factors in Human Abdominal Aortic Aneurysm. 第91回日本生理学会大会, 鹿児島, 2014, 3月
  2. 石渡遼, 横山詩子, 荒川憲昭, 安田章沢, 郷田素彦, 鈴木伸一, 益田宗孝, 石川義弘: ヒト大動脈瘤組織における PGE2-EP4 誘導性分泌タンパク質の網羅的解析. 第35回日本循環制御医学会総会, 福岡, 2014, 7月
  3. Ishiwata R, Yokoyama U, Inoue S, Ichikawa Y, Ishikawa Y. Prostaglandin E2-EP4 plays a protective role against cardiac fibrosis. *European Society of Cardiology (2014. 8. 30-9. 3, Barcelona, Spain)*
  4. Kajimura I, Yokoyama U, Ishikawa Y, Minamisawa S. Nuclear Factor kappa B Inhibition Promotes Closure of the Rat Ductus Arteriosus. *Experimental Biology Annual Meeting (2014. 4. 26-30, San Diego, USA)*
  5. Ichikawa Y, Yokoyama U, Ishikawa Y. Prostaglandin E2 receptor EP4 signaling in vascular smooth muscle cells decreases aortic elasticity. *Experimental Biology Annual Meeting (2014. 4. 26-30, San Diego, USA)*

6. Yokoyama U, Ishiwata R, Yasuda S, Goda M, Suzuki S, Masuda M, Ishikawa Y. Innovative pharmacological therapy for Abdominal Aortic Aneurysm by inhibition of PGE2-EP4 signaling. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2014. 3. 21-23, Tokyo)
7. Ichikawa Y, Yokoyama U, Minamisawa S, Ishikawa Y. Prostaglandin E2 Receptor EP4 Signaling in Vascular Smooth Muscle Plays a Role in Arterial Elasticity. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (2014. 3. 21-23, Tokyo)
8. Ishiwata R, Yokoyama U, Ishikawa Y. Secretome-Based Identification of PGE2-EP4-Inducible Factors in Human Abdominal Aortic Aneurysm. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2014. 3. 16-18, Kagoshima)
9. Kumagaya S, Yokoyama U, Minamisawa S, Inoue T, Ishikawa Y. Prostaglandin E2-EP4 signaling-induced fibulin-1 may play a role in intimal thickening in the ductus arteriosus. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2014. 3. 16-18, Kagoshima)
10. Ichikawa Y, Yokoyama U, Ishikawa Y. Prostaglandin E2 Receptor EP4 Signaling in Smooth Muscle Cells Regulates Arterial Elasticity. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2014. 3. 16-18, Kagoshima)
11. Minamisawa S, Yokoyama U. Extracellular matrix remodeling is critical for closure of the ductus arteriosus. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2014. 3. 16-18, Kagoshima)
12. 佐藤格, 光藤健司, 梅村将就, 宮島章嘉, 中島英行, 來生知, 石川義弘, 藤内 祝. 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. 第 38 回 日本頭頸部癌学会, 東京, 2014, 6.
13. Umemura M, Makino A, Sato I, Xianfeng Feng, Iwai M, Ito K, Miyajima A, Otake M, Nagasako A, Matsuo K, Eguchi H, and Ishikawa Y. A novel treatment for triple-negative breast cancer using intrinsic magnetized paclitaxel. The 105 American Association for Cancer Research Annual meeting, San Diego, 2014, 4.

14. Makino A, Umemura M, Sato I, Oda K, Otake M, Nagasako A, Eguchi H, Ishikawa Y. A novel paclitaxel with intrinsic magnetism. 第73回日本癌学会学術総会, 横浜, 2014, 9.
15. Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Xianfeng Feng, Nakashima H, Kioi M, Eguchi H, Tohnai I and Ishikawa Y. Development of thermochemotherapy using cisplatin and ferucarbotran (Resovist®) in head and neck cancer. The 105 American Association for Cancer Research Annual meeting, San Diego, 2014, 4.
16. Sato I, Mitsudo K, Umemura M, Nakashima H, Kioi M, Eguchi H, Ishikawa Y and Tohnai I. Development of combination therapy with cisplatin and hyperthermia generated with ferucarbotran (Resovist) in an alternating magnetic field for oral cancer. The 6th Asian Congress of Hyperthermic Oncology (ACHO), Fukui, 2014, 9.
17. 吹田憲治, 藤田孝之, 奥村敏, 石川義弘: 抗ヘルペス薬による心房細動抑制. 第131回日本薬理学会関東部会, 横浜, 2014, 10.
18. Suita K, Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Jin H, Jin M, Okumura S, Ishikawa Y: Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, prevents catecholamine-induced atrial fibrillation in mice. European Society of Cardiology Congress, Barcelona, 2014, 8-9.
19. 吹田憲治, 藤田孝之, 蔡文倩, 金慧玲, 奥村敏, 石川義弘: 心臓型アデニル酸シクラーゼの選択的阻害剤ビダラビンによる心房細動抑制. 第35回日本循環制御医学会総会, 福岡, 2014, 7.
20. Suita K, Cai W, Jin H, Jin M, Fujita T, Okumura S, Ishikawa Y: Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, attenuates Ca<sup>2+</sup> leak from sarcoplasmic reticulum in cardiomyocytes and prevents atrial fibrillation in mice. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Fukuoka, 2014, 7.
21. Cai W, Fujita T, Hidaka Y, Jin H, Ishikawa Y: Doxorubicin-induced Down-regulation Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) is an Important Mechanism in the Development of Heart Failure. The 78th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Tokyo, 2014, 3.
22. Cai W, Fujita T, Hidaka Y, Jin H, Sagara S, Kubota K, Suita K, Ishikawa Y. Chronic Treatment with Dihydroartemisinin, a Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) Down-regulating Agent, Results in Cardiac Dysfunction in Mice. ESC Congress 2014, Barcelona, 2014, 9.

23. 青木理加：出生後の血清浸透圧低下は動脈管収縮を促進させる～未熟児動脈管開存症への新たなアプローチの提案～。横浜循環器セミナー，横浜，2014，1.

24. Cai W, Fujita T, Hidaka Y, Jin H, K. Sagara S, Kubota K, Suita K, Ishikawa Y. Cardiac overexpression of ure. Chronic Treatment with Dihydroartemisinin, a TCTP Down-regulating Agent, Results in Cardiac Dysfunction in Mice. ESC (european society of cardiorogy) Congress. Barcelona, 2014, 9.

25. Sujita K, Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Jin H, Jin M, Okumura S, Ishikawa Y. Vidarabine, an anti-herpesvirus agent, prevents catecholamine -induced atrial fibrillation in mice. ESC (european society of cardiorogy) Congress. Barcelona, 2014, 9.

26. Jin H, Fujita T, Cai W, Hidaka Y, Sagara S, Kubota K, Suita K, Ishikawa Y. EPAC1 plays an important role in regulation of renin and AQP2 expression in the kidney of mice. ESC (European society of cardiorogy) Congress. Barcelona, 2014, 9.

27. 矢内千春：プロスタグランディンE-EP4はfibulin-1を介して生理的・病的血管内膜肥厚の形成に関与する。第13回日本心臓血管発生研究会。福島，2014，10.

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許申請

(名称、発明者、申請場所、申請日)

#### 金属サレン錯体化合物

発明者

江口晴樹 石川義弘

申請場所 申請日

128184371 (EU) 2014/06/18

14/234, 801 (米国) 2014/06/17

14/349, 730 (米国) 2014/06/18

2012800372198 (中国) 2014/06/24

671/DELNP/2014 (インド) 2014/06/24

2014005995 (シンガポール) 2014/06/23

#### 新規抗がん剤解毒剤

発明者

江口晴樹 石川義弘

申請場所 申請日

3220/DELNP/2014 (インド) 2014/07/09

2014117713 (ロシア) 2014/07/09

11201401289Y (シンガポール)

2014/07/03

#### 自己磁性金属サレン錯体

発明者

江口晴樹 石川義弘

申請場所 申請日

201280049389.8 (中国) 2014/07/01

128382611 (EU) 2014/07/01

3221/DELNP/2014 (インド) 2014/07/09

11201401288U (シンガポール)

2014/07/09

14/349, 730 (US) 2014/07/09

ラジカル生成抑制剤

発明者

江口晴樹 石川義弘

申請場所 申請日

14/354, 379 (US) 2014/07/09

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新規抗がん剤解毒剤

発明者

江口晴樹 石川義弘

申請場所 申請日

128382165 (EU) 2014/08/27

薬、薬の誘導装置誘導システム、  
並びに磁気検出装置

発明者

江口晴樹 石川義弘

申請場所 申請日

14/209, 466 (US) 2014/08/27

ラジカル生成抑制剤

発明者

江口晴樹 石川義弘

申請場所 申請日

128444429 (EU) 2014/08/05

11201401814Y (SG) 2014/10/10

自己磁性抗がん剤化合物

発明者

江口晴樹 石川義弘

申請場所 申請日

PCT/JP2014/075745 2014/10/02

[ II ]

委託業務成果報告（業務項目）



厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

口腔がんに対する磁性抗がん治療薬の実用化に関する研究（舌癌治療の検討）

担当責任者 藤内祝 横浜市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

頭頸部癌のなかでもとりわけ口腔癌は、手術療法によって、顔面の変形による審美障害、口腔機能低下による摂食・嚥下障害、構音障害が少なからず生じるため、患者の術後の Quality of life (QOL) 低下が問題になる。そこで我々は、進行口腔癌に対し、超選択的動注化学放射線療法を治療戦略としており、手術回避することによって機能温存療法を行っている (Mitsudo K et al, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012)。しかしながら、進行癌や再発症例においては放射線治療・化学療法に対して抵抗性を示すものがある。そこで、放射性治療や化学療法に対して抵抗性を示す症例に対し、温熱療法を治療法の選択肢の1つとして着目している。また、癌治療法の主流である手術療法、化学療法、放射線療法に温熱療法を併用し作用を増強させ治療による負担を軽減させることが可能である。頭頸部癌における温熱療法の応用を目指すために研究を行った。温熱療法は、近年抗がん治療の補助療法として研究や臨床の場で進歩を遂げてきた。そして、その抗腫瘍効果は大きな成果をあげている。臨床では、放射線化学療法と併用し治療に用いられることが多い。そこで、現在 MRI 造影剤として使用されているフェルカルボトラン (Resovist®) に着目した。フェルカルボトランは、交流磁場下で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、現在臨床で頭頸部癌の治療で使用されているシスプラチンとフェルカルボトランでの温熱効果の併用による抗腫瘍効果の増強を検討した (Sato I et al, *J. Physiol. Sci.* 2014)。

ヒト由来 SCC (OSC-19) 細胞を用いて実験した。抗癌剤は、シスプラチンを用いた。抗腫瘍効果は、細胞毒性試験を用いて評価した。アポトーシスの評価は、APC Annexin V と 7-AAD を使用しフローサイトメトリーを用いた。温度上昇の評価は、サーモグラフィーとサーモメーターを使用した。交流磁場発生装置は、HOT SHOT で 電圧 308 KHz 電流 250A の条件で行った。

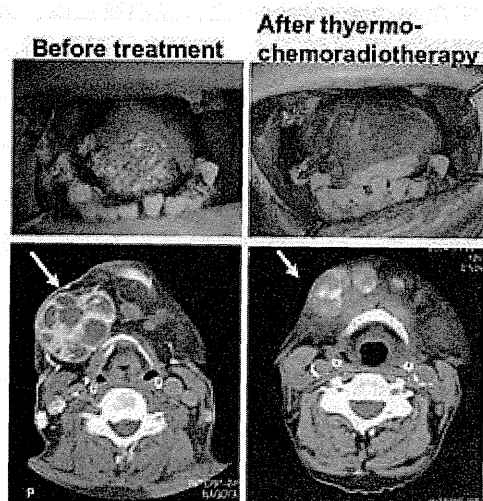
実験結果から、シスプラチンはヒト由来 SCC である OSC-19 細胞に対して濃度依存的に抗腫瘍効果を示した。シスプラチンに温熱療法 (42° C) を併用することで抗腫瘍効果の増強を示した。交流磁場下で培養細胞に添加したフェルカルボトランは、42° C 以上まで温度上昇を示した。シスプラチンにフェルカルボトランによる温熱を併用することでアポトーシスは増強した。

フェルカルボトランは、交流磁場下で発熱し温熱療法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。以上から、新しい温熱療法での口腔癌治療が、将来的に臨床応用されれば治療における後遺症や副作用を最小限に抑える事のできる新たな治療法となることが示唆された。また、今回の実験結果から口腔癌に対する磁性タキソールの抗腫瘍効果についても検討を行っていく予定である。

## A. 研究目的

現在、がん患者における治療法として、外科的治療、化学療法、放射線療法の3者が主流となっている。近年は、各々の治療法が目覚ましい進歩を遂げ、それに伴い生存率の増加も著しい。しかし、がん患者といってもその状態は多様であり、実際の臨床においては、解決できないケースとなることも多々認める。そこで、臨床の現場ではがん治療を目的とした集学的治療、すなわち、多種の治療法を併用し、効果を高める工夫がなされている。われわれは、従来では手術療法しか治療法が選択出来なかった症例に対し超選択的動注化学放射線療法を用いることで原発部位の手術回避、臓器温存を可能としてきた (Mitsudo K et al, Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012)。

(図 1)



(図 1)

癌細胞は熱を加えた場合、 $42.5^{\circ}\text{C}$  を過ぎると、急激に死滅するようになる。また、正常細胞よりがん細胞が熱に弱いことが示されている。よって、この性質を利用し正常細胞にはダメージを与えず癌細胞のみを選択的に死滅させるのが温熱療法の考え方である。

温熱療法の歴史は古く、紀元前 2000 年からありヒポクラテスも支持したといわれる。近代になって温熱療法が癌治療として注目されたのは、肉腫の患者が 2 回の発熱によって肉腫が消失したという 1866 年ドイツの医師 W.Busch の報告によるものである。1960 年代から細胞および実験腫瘍を用いて抗腫瘍効果が定量的に分析され多くの研究がなされた。実験腫瘍については、1975 年 Suit によってマウスの下肢に移植した腫瘍に温熱を加えたところ、 $42.5^{\circ}\text{C}$  以上で腫瘍が消失したことを報告している。1970 年代より臨床応用されるようになった。

このような背景とともに温熱療法が癌治療に用いられる生物学的根拠として 3 つが挙げられる。

- 1) 人体に適用可能な温度で殺細胞効果が認められる。細胞の生存率は加温時間の延長とともに指数関数的に減少し、加温温度が高くなるほど、生存率の低下が急峻となる。 $42.5^{\circ}\text{C}$  以上に加温すると急激に温熱療法による抗腫瘍効果が増大することで、この温度領域は人体に適用可能である。
- 2) 腫瘍組織のほうが正常組織より加温されやすい。同じ様に加熱しても、癌細胞は正常な細胞に比べて、 $1-2^{\circ}\text{C}$  高くなるために、正常な組織を破壊することなく、癌細胞を死滅させることができる。人間の体には、体温を調節し、一定に保つ働きがあり体内の正常な組織に熱が加わると血管が広がり、その部分に血流量が多くなる。その結果、熱が体外に放出されるので、体温を一定に保つことができる。ところが、癌細胞を通る血管は、正常な組織にある血管とは異なり、温めても血管が拡張しないので、血流量が増えない。その結果、熱を体外に放出することができず周りの組織に比べて温度が高くなる。

3) 細胞の pH が低下すると温度感受性が高まる。培養液の pH を低下させると、細胞の生存率が著明に低下する。癌組織の pH は嫌氣的解糖が強く起こるので正常組織に比較すると低いことは知られている。温熱により腫瘍血流量の低下を起し、嫌氣的解糖がさらに増加するために pH が一層低下する。そのために酸ホスファターゼ活性が高められ、熱によって損傷の修復が阻害され、細胞死が促進される。従って、熱に対して弱いと考えられる。

臨床において温熱療法に用いる装置としては、高周波（以下 RF）誘電加温装置やマイクロ波加温装置が用いられている。しかし、口腔癌原発巣は可動性に富んでいる部位で、特に口腔癌の中で1番多い舌癌は著明である。RF 誘電加温装置においてアプリケーションの固定が困難であることなどから、温熱療法は不応とされている部位である。そこで、口腔内用のアプリケーションのさまざまな工夫や組織内加温法の開発なども行われ口腔癌の原発巣にも温熱療法を取り入れようとする試みがなされている。そこで、磁性体を用いた磁場誘導組織内加温法が考案され、臨床的にも試みられた。しかし、磁性体を用いた組織内加温法は腫瘍内への刺入方向により安定した温度が得られないため、磁性微粒子を用いた組織内加温法に注目した。

われわれはその1つとしてMRI造影剤であるフェルカルボトランを用いた温熱療法の抗腫瘍効果、および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併用療法について検討した。

口腔癌の場合は頸部リンパ節転移がみられる症例が多く、この頸部リンパ節転移の制御が予後を大きく左右する。この頸部リンパ節転移の治療には温熱療法が有用であり放射線療法や化学療法と併用し治療を行っている。現在では口腔癌と大きな頸部リンパ節転移に対し超選択的動注化学放射線療法と温熱療法を併用し良好な結果を得ている。このように、化学療法と温熱療法が併用される理由として、熱により細胞膜の透過性が亢進し細胞内薬剤濃度が高まること、熱により薬剤と DNA との化学的相互作用が増強されること、細胞の抗癌剤による損傷からの回復が熱によって阻止されることが挙げられる。化学療法と温熱療法の併用において抗腫瘍効果の増強作用は、薬剤の種類によって異なってくる。また、すべての抗癌剤の抗腫瘍効果が温熱療法により作用を増強するとは限らない。口腔癌に対しては、白金製剤を使用した化学療法が著効しており、温熱療法と併用することで抗腫瘍効果を増強させるシスプラチンに着目した。

フェルカルボトラン(ferucarbotran)とは、ドイツのシエーリング社 Schering AG (現 Bayer Schering Pharma) で開発されたカルボキシデキストランで被覆された SPIO(Superparamagnetic iron oxide:超常磁性酸化鉄)の親水性コロイドからなる造影剤である。2010年4月現在、リゾビスト(Resovist®)の商品名・商標でスウェーデンおよび日本で製造販売されている。臨床においてリゾビストは、本剤は静脈内投与後、主として肝臓の細網内皮系細胞であるクッパー細胞に取り込まれることにより、MRI画像上、クッパー細胞を有さない肝臓の悪性腫瘍とのコントラストを向上させる肝特異性MRI造

影剤として応用されている。磁性体とは、磁性を帯びる事が可能な物質の総称であり、反磁性体・常磁性体・強磁性体の3つに分けられる。代表的な磁性体に酸化鉄・酸化クロム・コバルト・フェライトなどがある。フェルカルボトランは強磁性体のナノ粒子である。磁性ナノ粒子は、磁化の向きが温度の影響でランダムに反転しうる。この反転が起こるまでの時間をネール緩和時間という。外場の無い状態で、磁性ナノ粒子の磁化測定時間がネール緩和時間よりもずっと長い時、磁化は平均してゼロであるように見える。この状態を超常磁性という。超常磁性体は、外場によって磁化できる点で常磁性体と似ているが、その磁気感受率は常磁性体よりもずっと大きい。よって、交流磁場下で発熱しやすい物質であるといえる。村瀬らは、シミュレーションと実験においてフェルカルボトランの交流磁場下での温度上昇を検討し温熱療法の有用性を報告している(Murase et al, Radiological Physics and Technology, 2011)。シミュレーションにおいて、温度上昇率はフェルカルボトランの粒子の大きさ、交流磁場の発生条件である周波数、電流に依存していた。通常、リゾビストの投与量は成人に対し投与量は 1.4mL までとし、濃度 0.016mL/kg (鉄として 0.45mg/kg = 8  $\mu$  mol/kg) を静脈内投与としている。われわれが開発した交流磁場発生装置において、十分な温度上昇が確認できたため本薬剤に着目し実験を行った。本研究の目的は、口腔癌細胞に対して、シスプラチンによる抗癌活性とフェルカルボトランの温熱効果での併用による抗腫瘍効果の増強を頭頸部癌細胞で検討すること。また、口腔癌原発巣における新たな温熱療法の開発することである。

## B. 研究方法

口腔癌治療の適応があるシスプラチン(Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan)を使用した。抗腫瘍効果は、the ATCC® XTT Cell Proliferation Assay Kit (ATCC, Virginia, U.S.A.)を使用して 2,3,-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium inner salt (XTT) assay を行った。アポトーシスの評価は、APC Annexin V (BD Biosciences, CA, U.S.A.) と 7-AAD (BD Biosciences, CA, U.S.A.)を使用した。温熱療法の熱源物質には、フェルカルボトラン(Resovist®) (FUJIFILM Pharma Co., Ltd, Tokyo, Japan)を使用。細胞は、ヒト由来扁平上皮癌細胞種 (OSC-19, Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resources Bank から購入)を使用した。温熱における温度上昇画像は、サーモグラフィ(InfReC R300SR, Nippon Avionics Co., Tokyo Japan)を使用した。温熱における温度上昇測定は、サーモメーター(hand-held thermometer HA-200, Anritsu Meter Co., Tokyo Japan)を使用した。磁性体粒子が発熱することを証明するために、以下の交流磁場発生装置の開発を行った。アロニクス(株)の協力を得て、コイル内径の異なる仕様のものを作製し、電源装置(HOT SHOT, Ameritherm Inc., New York, U.S.A.)を購入した。ヒト由来扁平上皮癌細胞のシスプラチンと温熱併用における抗腫瘍効果の検討では、シスプラチンと温熱併用による抗腫瘍効果を測定するため、the ATCC® XTT Cell Proliferation Assay Kit (ATCC, Virginia, U.S.A.)を使用し 2,3,-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfoph