

学位論文の要旨

Hyperthermia and chemotherapy
using Fe(Salen) nanoparticles might impact
glioblastoma treatment

(神経膠芽腫に対する Fe(Salen) を用いた化学温熱同時療法)

Makoto Ohtake

大竹 誠

Department of Neurosurgery

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 脳神経外科学

(Deputy Doctoral Supervisor : Fumiaki Tanaka)

(代行指導教員 : 田中 章景 教授)

(Research Supervisor : Cardiovascular Research Institute,

Yokohama City University Graduate School of Medicine,

Masanari Umemura, Assistant Professor, Yoshihiro Ishikawa, Professor)

(研究指導教員 : 横浜市立大学 大学院医学研究科 循環制御医学

梅村 将就 助教, 石川 義弘 教授)

学位論文の要旨

Hyperthermia and chemotherapy using Fe(Salen) nanoparticles might impact glioblastoma treatment

(神経膠芽腫に対する Fe(Salen) を用いた化学温熱同時療法)

【序論】

神経膠腫(Glioma)は、成人の脳半球実質内に好発する浸潤性悪性脳腫瘍である。Gliomaの悪性度の指標として、良性の grade I から悪性度に応じて gradeIVまでの4段階に分類するWHO grade が用いられるが、その中でも gradeIVの腫瘍である神経膠芽腫(Glioblastoma: GB, グリオブラストーマ)は5年生存率が10%に満たない極めて予後不良な疾患である(Dolecek et al., 2012)。現在の標準的治療として外科治療に加え、放射線治療およびアルキル化剤であるTemozolomide(TMZ)を用いた化学療法が挙げられるが、平均生存期間は14.6ヶ月と非常に悪く、予後の劇的な改善に至っていないのが現状である(Stupp et al., 2009)。近年、放射線治療や化学療法抵抗性の強い神経膠芽腫に対して、温熱療法を治療選択肢の一つとして研究が進められている。European Union (EU)で施行されている治療であるMagforceは、磁性体粒子を腫瘍内に注入して交流磁場をかけることで温熱作用を加える神経膠芽腫の新しい治療法であるが、平均生存期間が23.2ヶ月(Phase II study)と、これまでの報告と比較して有意な延長を認めている(Maier-Hauff et al., 2011)。既存の治療方法である化学放射線療法に加え、温熱療法を行うことによる追加効果により、さらなる予後延長を期待して臨床試験が進められている。

我々はIHI株式会社との医工連携の中で、N,N'-bis(salicylidene)ethylenediamine iron (Fe(Salen))が有機磁性体化合物でありなおかつ抗がん活性をもつことを発見し、2015年に報告した。(Eguchi et al., 2015)。発見した化合物であるFe(Salen)は、プラチナ製剤に類似する抗腫瘍効果を有しており、さらに磁性を持つことから交流磁場をかけることで薬剤自体が発熱し、局所的な温熱療法が同時に行える。そのため、Fe(Salen)による治療は1剤で「抗腫瘍効果+温熱効果」の2つの効果を同時に期待することができる。Fe(Salen)はMagforceで使用した磁性体粒子のように磁性を持ち、なおかつ抗腫瘍効果も併せ持つため、Magforceと比較して更なる予後延長効果を得られる可能性が期待される。我々は、神経膠芽腫を対象として、Fe(Salen)を腫瘍内局所注射することによる化学・温熱同時療法へ応用することを最終目標として研究を進めている。

そこで我々は、ヒトグリオブラストーマ細胞株に対するFe(Salen)の抗腫瘍効果、温熱効

果を検討することとした。比較対象として、既存の神経膠芽腫治療薬である Temozolomide (テモダール ; TMZ) と Carmustine (ギリアデル ; BCNU) を使用した。Fe (Salen) の正常細胞への影響について、正常ヒトアストロサイト (NHA) を用いて検討を行った。Fe (Salen) の抗腫瘍効果と温熱効果の相互作用についてマウスの臀部にヒトグリオブラストーマ細胞株を移植した腫瘍モデルマウスを用いて腫瘍縮小効果の検討を行った。

【方法】

ヒトグリオブラストーマ細胞株 (U251, U87, YKG) と正常ヒトアストロサイト (NHA) を用いて実験した。薬剤は Fe (Salen), TMZ, BCNU を用いた。抗腫瘍効果は、2,3,-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium inner salt (XTT) アッセイ を用いて評価した。抗がん剤によって増強される活性酸素 Reactive Oxygen Species (ROS) の産生を fluorescent dye 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate を用いて、ROS アッセイを行い検討した。アポトーシスの評価は、Annexin V と 7-amino-actinomycin D (7-AAD) にて染色し、フローサイトメトリーを用いて測定した。温熱作用の評価は、37°C, 43°C, 47°C における腫瘍殺傷率を Calcein AM と Propidium Iodide を用いた蛍光染色で検討した。マウスを用いた Fe (Salen) の効果検討では、脳腫瘍モデルで Fe (Salen) の抗腫瘍効果について、臀部モデルで抗腫瘍効果と温熱効果を併せた作用について、それぞれ腫瘍体積の退縮率を *In vivo* imaging system (IVIS) を用いて時系列に検討した。交流磁場は周波数 280KHz 電流 335.4Arms の条件で刺激を行った。

【結果】

XTT アッセイにおいて、Fe (Salen) は濃度依存性にヒトグリオブラストーマ細胞株に対する抗腫瘍効果 (IC_{50} 29.9-38.9 μ M) を示した。TMZ や BCNU と比較してより低濃度で抗腫瘍効果を認めた。さらに、濃度依存性にアポトーシスを生じる細胞の増加と ROS の産生増加を認めた。ヒトグリオブラストーマ細胞株、正常ヒトアストロサイトに温熱刺激を加えたところ、43°C の温熱は神経膠芽腫細胞株に対して時間依存性に殺細胞効果を示した。一方、正常細胞には大きな影響を与えない温熱であることが分かった。マウス脳腫瘍モデルでの検討では、Fe (Salen) 群は BCNU 群とほぼ同程度の腫瘍縮小効果を認めた。脳内に注入可能な Fe (Salen) の濃度と容量では温熱作用に十分な発熱 (43°C) を得ることができないため、抗腫瘍効果と温熱効果を併せた作用については、より高容量を注入可能なスペースのあるマウス臀部腫瘍モデルで検討を行った。マウス臀部腫瘍モデルにおける検討では、Fe (Salen) に交流磁場印加による 43°C の温熱を加えた群は、コントロール群と比較して有意な腫瘍縮小を認め ($p < 0.001$), Fe (Salen) 単独群と比較しても有意差はないものの、より腫瘍が縮小する結果となった。

【考察】

Fe(Salen)は交流磁場印加で発熱し, Magforce と同様, 温熱療法による殺細胞効果が期待できる. さらに, BCNU と同程度の抗腫瘍効果を認めており, Fe(Salen)は Magforce と BCNU に類似する効果を単剤で併せ持つ可能性を有した画期的な薬剤である. 現在, 臨床応用に向けて, 溶解度の向上と副作用の軽減を目標とする薬剤のミセル化, 再現性のある合成プロトコルの作成, ヒトへの印加を念頭においたより大きい頭蓋容積に対応可能な交流磁場機器の開発を進めている. 今後さらに研究を継続することにより, 化学温熱療法という新たな神経膠芽腫の治療法確立が期待される.

引用文献

- Dolecek, T. A., et al. (2012), "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009." *Neuro Oncol*, 14 Suppl 5, v1-49.
- Eguchi, H., et al. (2015), "A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging." *Sci Rep*, 5, 9194.
- Maier-Hauff, K., et al. (2011), "Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme." *J Neurooncol*, 103(2), 317-24.
- Stupp, R., et al. (2009), "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." *Lancet Oncol*, 10(5), 459-66.

論文目録

I. 主論文

Makoto OHTAKE, Masanari UMEMURA, Itaru SATO, Taisuke AKIMOTO, Kayoko ODA, Akane NAGASAKO, Jeong-Hwan KIM, Takayuki FUJITA, Utako YOKOYAMA, Tomohiro NAKAYAMA, Yujiro HOSHINO, Mai ISHIBA, Susumu TOKURA, Masakazu HARA, Tomoya MURAMOTO, Sotoshi YAMADA, Takatsugu MASUDA, Ichio AOKI, Yasushi TAKEMURA, Hidetoshi MURATA, Haruki EGUCHI, Nobutaka KAWAHARA and Yoshihiro ISHIKAWA (2017), "Hyperthermia and chemotherapy using Fe(Salen) nanoparticles might impact glioblastoma treatment." *Scientific Reports*. (in press)

II. 副論文

なし

III. 参考論文

Kayoko ODA, Masanari UMEMURA, Rina NAKAKAJI, Ryou TANAKA, Itaru SATO, Akane NAGASAKO, Chiaki OYAMADA, Erdene BALJINNYAM, Mayumi KATSUMATA, Lai-Hua XIE, Masatoshi NARIKAWA, Yukie YAMAGUCHI, Taisuke AKIMOTO, Makoto OHTAKE, Takayuki FUJITA, Utako YOKOYAMA, Kousaku IWATSHUBO, Michiko AIHARA and Yoshihiro ISHIKAWA (2016), "Transient Receptor Potential Cation 3 Channel Regulates Melanoma Proliferation and Migration." *The Journal of Physiological Sciences*, doi:10.1007/s12576-016-0480-1

Ayako HINO, Ukihide TATEISHI, Hirofumi SHIBATA, Tomohiro YPNEYAMA, Toshiaki NISHII, Ikuo TORII, Kensuke TATEISHI, Makoto OHTAKE, Nobutaka KAWAHARA, Tomio INOUE (2014), "Tumor hypoxia and microscopic diffusion capacity in brain tumors: A comparison of ^{62}Cu -Diacetyl-Bis (N4-Methylthiosemicarbazone) PET/CT and diffusion-weighted MR imaging." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 41(7): 1419-27.