

総説 (2020年度横浜市立大学医学会賞受賞研究)

市販医薬品の薬効成分を磁性化する画期的技術の開発

梅村 将就, 中鍛治 里奈, 永迫 茜, Md Rafikul Islam, 大竹 誠,
長尾 景充, 根本 寛子, 水野 雄斗, 石川 聡一郎, 鈴木 文菜,
石川 義弘

横浜市立大学医学部医学科 循環制御医学

要旨:我々は鉄錯体の一種である μ -oxo N, N-bis (salicylidene) ethylenediamine iron [以後, Fe(Salen) と呼ぶ] が有機化合物でありながら, 抗腫瘍効果を持ち, さらに磁性を持つ (磁石に付き, 強磁性の挙動を示す) ことを発見した. 無機化合物が磁性を持つことはよく知られるが, 有機化合物が常温で磁性を示すという報告は世界で初めてである. また, Fe(Salen)の磁場発生メカニズムの解析のため, 結晶構造解析を行ったことで「磁場発生の原因となる化学構造」を同定し, その磁場発生メカニズムを突き止めた. Fe(Salen)は磁性を持つため, 主に3つのユニークな特徴を持つ. 1) 磁力により体外から任意の場所にFe(Salen)を集積させること (ドラッグデリバリー) ができる. 2) 磁性を持つことでMRIのT2強調画像で低信号を示し, 局在や濃度の推定が期待できる. 3) 磁性体は交流磁場で発熱するという特徴 (IHクッキングヒーターと同じ原理) も持つため, 温熱療法への応用が期待できる.

我々は長年, Fe(Salen)のユニークな特徴を生かすべく, 治療法を検討してきた. その後, Fe(Salen)をバクリタキセルと共有結合させ, バクリタキセルの薬効成分の磁性化に成功した. 動物実験において磁力で磁性バクリタキセルを局所に集積させ, 薬剤濃度を高めることで, 治療効果が増強することを確認した. この磁性化技術が確立すれば, 様々な市販医薬品を磁性化することが期待でき, 薬剤単剤で複数の付加価値を得ることができる. 本総説では, 我々が10年以上取り組んで来た磁性抗がん剤についての研究内容についてまとめ, 今後の展望を試みる.

Key words: 磁性 (Magnetism), がん治療 (Cancer therapy), ドラッグデリバリー (Drug delivery system), 交流磁場 (Alternating magnetic field)

はじめに

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つが現在でも主流であることは変わらない. 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も多々認める. そこで, 臨床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. また, 様々な新しい治療法の開発も進められている. 我々は, 抗腫瘍効果と磁性という特徴を併せもつ鉄錯体の一種である有機化合物 μ -oxo

N, N-bis (salicylidene) ethylenediamine iron [以後, Fe(Salen) と呼ぶ] を発見した. 金属錯体とは, 分子の中心に金属もしくは金属イオンが存在し, それを取り囲むように非共有電子対を持つ配位子と呼ばれる原子, イオン, 分子または原子団で構成される化合物である. ヘモグロビンも錯体の一種である. このユニークな物質を, 磁性を持つ新しい抗がん剤としてがん治療に応用出来ないかと考え, 長年研究を続けてきた. そこで, 本総説では, 我々が10年以上取り組んできた磁性を持つ抗がん剤 (以後, 磁性抗がん剤) についての研究内容について解説し, 今後の展望を試みる.

抗腫瘍効果と磁性という特徴を併せもつ有機化合物 Fe(Salen) の発見

我々は(株)IHIとの医工連携により、鉄錯体の一種であるFe(Salen)が抗腫瘍効果のみならず、有機化合物でありながら、常温で磁性を持つ(磁石に付き、強磁性の挙動を示す)ことを発見した(図1)¹⁾。

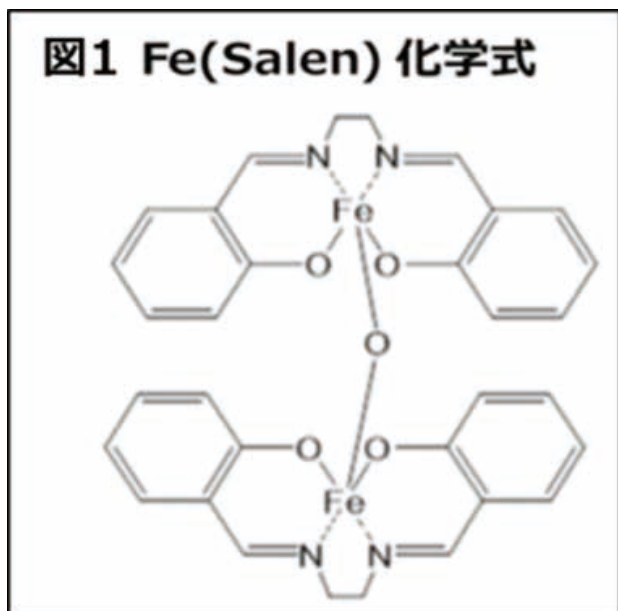


図1 Fe(Salen)化学構造式

1つの酸素原子が、2つのFe(Salen)の中央にあるそれぞれの鉄原子と結合し、2量体を形成する。

無機化合物が磁性を持つことはよく知られるが、有機化合物が磁性を示すという報告は世界で初めてである。Fe(Salen)は磁性を持つため、体外から磁石などを用いた磁力によりFe(Salen)を任意の場所に集積させること(ドラッグデリバリー)ができると期待される。さらにFe(Salen)はその磁性により核磁気共鳴画像法(Magnetic Resonance Imaging, MRI) T2強調画像により低信号を示す(黒く写る)。そのため、Fe(Salen)の局在や濃度の推定がMRIを用いて評価できると期待される。そこで我々はFe(Salen)のユニークな特徴を生かした新しいがん治療法を開発するために、詳細に検討を行った。

Fe(Salen)の磁性測定

まず、Fe(Salen)に対して、電子スピン共鳴装置(Electron Spin Resonance, ESR)を用いて、磁性を評価した。ESRは電子そのものの「ふるまい」を観察して、電子の置かれている環境を同定することで、様々な現象を解明する方法である。その結果、磁性を持つことが確認された¹⁾。さらにFe(Salen)に対して、超伝導量子干渉計(Superconducting quantum interference device, SQUID)を用いて磁性を測定

した。SQUIDは超伝導における磁束の量子化を利用した超高感度な磁気センサーであり、微磁界が測定できる。その結果、強磁性の性質を示す磁化曲線(ヒステリシスループ)を認め、Fe(Salen)は磁性、とりわけ強磁性の挙動を示すことが示唆された。強磁性か常磁性かについては、ヒステリシスループの存在から強磁性が疑われたが、引き続き様々な手法や条件で評価していく必要があると思われる。また、Fe(Salen)は粒子が大きい方が、磁性が強いことが分かった。

Fe(Salen)の抗腫瘍効果の評価

次にFe(Salen)の抗腫瘍効果を評価した。Fe(Salen)は、マウス由来悪性黒色腫細胞(Clone M3)、ウサギ由来扁平上皮がん細胞(VX2)、マウス由来骨肉腫細胞(POS-1)などの様々な培養がん細胞に濃度依存的に強い抗腫瘍効果を示した¹⁾。一方、ラット由来皮膚線維芽細胞(NHDF)、ラット胎仔由来大動脈平滑筋細胞、マウス由来血管平滑筋細胞などの正常細胞には、細胞増殖抑制効果を示さなかった。Fe(Salen)の抗腫瘍効果は、Fe(Salen)に内包する鉄イオンが細胞内の過酸化水素と反応することで発揮されると思われる。所謂、フェントン反応($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$)を起こし、活性酸素を産生させることで細胞増殖が抑制されるということが分かった。また、Fe(Salen)は粒子が小さい方が、抗腫瘍効果が強いことが分かった。

免疫不全マウスの皮下にラット由来前立腺がん細胞(MAT-Lu)を移植し、①生理的食塩水投与群(コントロール:Cont)、②Fe(Salen)(5 mg/kg/日)単独投与群、③Fe(Salen)(5 mg/kg/日)投与+永久磁石(630 mT)(Mag)によりFe(Salen)を腫瘍部位に集積させた群の3群で治療効果を14日間比較した(n=7-8)。その結果、治療開始14日後にはFe(Salen)単独投与でも治療効果を示したが($p < 0.05$)、磁石を併用することでFe(Salen)単独投与群と比較し、より強力な抗腫瘍効果を示した($p < 0.01$)(図2a)。以上より、体外から永久磁石による磁力を当てることでFe(Salen)を任意の場所に誘導し、局所濃度を高めることで、治療効果を増強できることを証明した。当然ではあるが、Fe(Salen)を投与せず、生理的食塩水を投与し磁石を当てた群では、生理的食塩水のみ投与群と腫瘍の大きさは変わりなかった(磁石だけでは効果がなかった)。

さらに、マウスの尾にマウス由来悪性黒色腫細胞(Clone M3)を移植し、担がんマウスを作成した。①生理的食塩水投与群(コントロール:Cont)、②Fe(Salen)(50 mg/kg/日)単独投与群、③Fe(Salen)(50 mg/kg/日)投与+永久磁石(630 mT)によりFe(Salen)を腫瘍部位に集積させた群の3群で、治療効果を検討したところ、治療14日後にはFe(Salen)単独投与より磁石で尾にFe(Salen)を集積さ

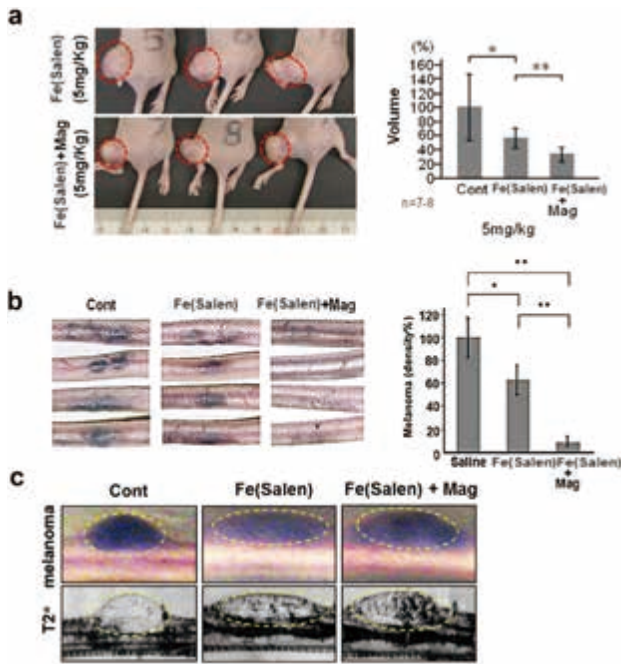


図2 マウス皮下腫瘍モデルでのFe(Salen)投与と磁石の効果の検討

- 免疫不全マウスの皮下にラット由来前立腺がん細胞 (MAT-Lu) を移植し、生理的食塩水投与群 (Cont), Fe(Salen) (5 mg/kg/日) 単独投与群, Fe(Salen) (5 mg/kg/日) 投与+永久磁石 (Mag) による局所集積群での比較を行った。Fe(Salen) 単独でも治療効果を示したが、磁石を併用することでより強力な抗腫瘍効果を示した (n=7-9, *p<0.05, **p<0.01)。
- 悪性黒色腫細胞を移植したマウスの尾の写真 (左写真) と腫瘍面積を定量したグラフ (右グラフ)。生理的食塩水投与群 (Cont), Fe(Salen) (50mg/kg/日) 単独投与群, Fe(Salen) 投与+永久磁石 (Mag) による局所集積群の3群で、治療効果を検討したところ、Fe(Salen) 単独より、永久磁石 (630mT) で尾にFe(Salen) を集積させた群が最も高い治療効果を示した (n=8, *p<0.05, **p<0.01vs. control)。
- マウスの尾に移植した腫瘍写真 (上段: 黄色破線) 及び MRI T2強調画像 (下段: 黄色破線)。Fe(Salen) 単独投与でも、腫瘍部位にT2強調画像 (下段) でシグナルを一部検出したが、Fe(Salen) を投与し永久磁石 (Mag) で局所に集積させることで、より強いシグナルを確認できた (黒い部分) (文献1より改変)。

せた群が最も強い治療効果を示した (図2b)。さらにMRIを用いてマウスの尾を撮像したところ、Fe(Salen) 単独投与でもT2強調画像で腫瘍部位に低信号を一部検出したが、Fe(Salen) を投与し、永久磁石で局所に集積させることでより強い信号を確認した (図2c)。このFe(Salen) がMRIのT2強調画像で黒く写るという性質により、MRIを用いることでFe(Salen) の集積の確認や、濃度の推定に応用できる可能性がある。

Fe(Salen) の磁場発生メカニズムの解析

Fe(Salen) を同定した当初、Fe(Salen) には抗腫瘍効果と磁性があることは分かっていたが、「なぜ、有機化合物が磁性を持つのか?」については全く分かっていなかった。そこで、Fe(Salen) の磁性のメカニズムを解明するため、理化学研究所との共同研究により大型放射光施設

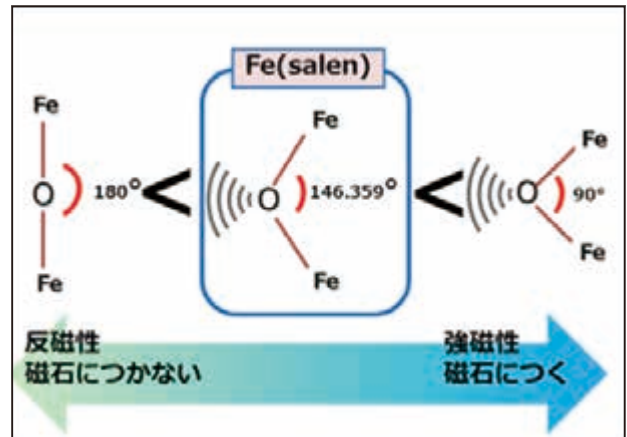


図3 Fe(Salen) が磁性を持つ原理

酸素原子を介した2つの鉄イオンの角度が90°に近い (右) ほどその化合物の磁性が強くなり、180°に近い (左) ほど弱くなる。Fe(Salen) は1つの酸素原子を仲立ちとした2量体であり、O原子を中心とした2つのFe(Salen) の構成する角度は146°であった (中央)。

(Spring-8) にて、Fe(Salen) に対して結晶構造解析を行った。その結果、「磁場発生の原因となる化学構造」を同定し、その磁場発生メカニズムを突き止めた¹⁾。具体的には、この磁場発生の原因は古典的な物理理論であるGoodenough-Kanamori-Anderson (GKA) 則 (GKAルール) で説明できることが分かった。この理論は「酸素原子を介した2つの鉄イオンの角度が、90°に近いほどその化合物の磁性が強くなり、180°に近いほど弱くなる」というものである²⁾。今まで、Fe(Salen) は1量体であると思われていたが、実は1つの酸素原子を仲立ちとし、その酸素原子が2つのFe(Salen) の鉄原子と結合した2量体であることがわかった。加えて、酸素原子を中心とした2つのFe(Salen) の構成する角度は146°であり、まさにこの角度がFe(Salen) の磁場発生に重要であることが分かった (図3)。

口腔がんに対するFe(Salen) の温熱療法効果

温熱療法は、古くは1970年代より臨床応用されており、全身を加温する誘電加熱法と局所を加温する誘導加熱法とに大別される^{3,4)}。通常のがん治療においては、前者は治療効果が期待できない遠隔転移を有する進行例が対象であり、後者は原発を含む局所の治療を標的にするものである。温熱療法とは、人為的に腫瘍部を42.5℃に上昇させることにより抗腫瘍効果を得る治療法である。温熱療法は治療法としては非常に合理的な手段であるにもかかわらず、実際の臨床の現場では、正常部位も温度が上がってしまうことで、その熱さのために治療を断念する患者さんも多い。そのため、広い普及には至っていない。しかしながら、近年、ナノ粒子の発見をきっかけに磁性を有する化合物 (磁性体) を利用し、選択的に局所のみ温度を上げる方法が開発されるようになり、装置の開

発を含め、新しい温熱療法の開発が進められている。

我々が検討している有機磁性化合物であるFe(Salen)は磁性体であることから、交流磁場により発熱するという特徴を持つ(IHクッキングヒーターと同じ原理)。この現象を利用し、2T(テスラ)の磁場を発生する電磁石(EM-30200V)でFe(Salen)を患部に集積させた後に、交流磁場を当てることでFe(Salen)を発熱させ温熱療法も同時にできないかという発想に至った。そこで、口腔がん細胞及びウサギ舌がんモデルを用いて検討した⁵⁾。その結果、Fe(Salen)は、他のがん細胞と同様にヒト由来舌がん細胞(HSC-3, OSC-19)やウサギ由来扁平上皮がん細胞(VX2)にも強い抗腫瘍効果やアポトーシス誘導効果を示した。また、電子顕微鏡でFe(Salen)粒子ががん細胞に取り込まれていることを確認した。さらに、ウサギの舌にVX2細胞を移植することで作成したウサギ舌がんモデルに対して、抗腫瘍効果、ドラッグデリバリー、交流磁場による温熱効果が単剤で得られるかを検討した(n=6)。その結果、治療開始7日後にはFe(Salen)(5 mg/kg/日)単独投与群では、未治療群と比較し、腫瘍体積は約1/3になった(p<0.001)。また、電磁石(1時間/日)による磁場誘導をFe(Salen)投与に連日加えることにより、Fe(Salen)が局所に集積し、抗腫瘍効果が増強することでFe(Salen)単独群と比較し効果が高まった(p<0.05)。さらにFe(Salen)投与+電磁石に交流磁場(308 kHz, 250 A)(1時間/回, 2回/週)を当てることでFe(Salen)が発熱し、腫瘍部位での温熱効果も得られた。その結果、Fe(Salen)投与+電磁石群と比較し、Fe(Salen)投与+電磁石+交流磁場群はさらに強い治療効果を示した(p<0.01)。これにより、Fe(Salen)は電磁石や交流磁場を組み合わせることで、単剤で3つの効果(化学療法、ドラッグデリバリー、温熱療法)が同時に得られ、より効果を発揮することがわかった。

神経膠芽腫治療に対するFe(Salen)の局所投与による治療効果の評価

今までの動物実験では、Fe(Salen)は静脈投与を基本にしていたが、局所投与での効果について予後が最も悪い悪性脳腫瘍の一つである神経膠芽腫を用いて検討した⁶⁾。Fe(Salen)を脳に局所注射し、交流磁場をFe(Salen)に当てることでFe(Salen)そのものを発熱させ、温熱治療効果を誘導することを試みた。それにより、Fe(Salen)の抗腫瘍効果に加え、温熱効果が得られることで、より強い効果を示すのではないかという発想のもと、神経膠芽腫培養細胞及び担がんマウスを用いて検討を行った。ヒト由来神経膠芽腫細胞(U251, U87, YKG)に対して、Fe(Salen)の抗腫瘍効果は、臨床で用いられているテモゾロミド(Temozolomide, TMZ)やカルムスチン(Carmustine, BCNU)といった治療薬と同等、もしくはそれ以上であ

ることを確認した。また、ヒト由来神経膠芽腫培養細胞(U251)をマウスの脳に移植した脳腫瘍マウスを用いて、Fe(Salen)(0.066 mg/体)の抗腫瘍効果を生理的食塩水投与群と比較したところ、治療開始28日後には脳腫瘍の体積はFe(Salen)投与群では生理的食塩水投与群の半分以下になった(n=4, p<0.001)。また、Fe(Salen)の抗腫瘍効果は臨床において神経膠芽腫の治療で用いられるカルムスチン(0.021 mg/体)と同等であった。

次に、交流磁場により誘導されるFe(Salen)の温熱効果の評価を行った。免疫不全マウスの大腿部皮下にU251細胞を移植し、神経膠芽腫皮下腫瘍マウスを作成した。①腫瘍部位に生理的食塩水の局所投与群(コントロール)、②Fe(Salnc)(50 mM)を局所投与群、③カルムスチン(50 mM)の局所投与群、④Fe(Salen)の局所投与投与に加え、交流磁場(280 kHz, 335.4 Arms)を当てた群の4群で腫瘍体積を中心に28日間評価した(n=6)。

その結果、Fe(Salen)局所投与群及びカルムスチン局所投与群では生理的食塩水投与群と比較し、腫瘍退縮率を2倍以上認めた。さらに、交流磁場を用いてFe(Salen)を発熱させたところ、Fe(Salen)の局所投与のみで交流磁場を用いなかった群と比較し、より高い治療効果を認めた。また、脳内投与した後の体内分布をラジオアイソトープで標識したFe(Salen)を用いて体内分布を観察したところ、時間とともに肝臓と腎臓から分泌され24時間後にはほぼ消失した。さらに、脳内投与したFe(Salen)がMRIで撮影できることも確認することが出来た。

Fe(Salen)のミセル化技術を用いた溶解度とがん選択性改善への試み

臨床応用を念頭に、Fe(Salen)の水への溶解度をより高め、効率よく目的の場所に薬剤を到達させるための検討を行った。Fe(Salen)を2種類の性質の異なる特殊なポリマーで包み込みミセル化することで、より溶解度とがん選択性を高める技術の開発を目指した。pH感受性ポリマーと温度感受性ポリマーの2種類のポリマーでFe(Salen)を包みミセル化することで、ミセルによるFe(Salen)の溶解度と磁性を高めるだけでなく、さらに環境によりポリマーの状態を意図的に変える技術の開発に成功した⁷⁾。本技術の特徴は、pHが低くなると壊れる性質を持つポリマーと、高い温度になると壊れるポリマーの2種類でFe(Salen)を包みミセル化するところにある。がんの微小環境では、pHは低い場合が多い。そのため、我々の技術を用いてミセル化したFe(Salen)は、がんが存在する低pH環境下ではpH感受性ポリマーが壊れる。一方、正常部位ではpHが低くないため、ポリマー構造は保たれる。実際の使い方としてはまず、体外から磁石を用いて腫瘍部位にミセル化Fe(Salen)を集める。ミセル化Fe(Salen)は腫瘍部位に集積することで低pH環境によりpH

感受性ミセルが崩壊する。さらに、体外から交流磁場を当ててミセル化Fe(Salen)を内部から発熱させ、温度を上げることで、温度感受性ミセルが崩壊し、内包されていたFe(Salen)が腫瘍部位に放出され効果を発揮する。実際に培養がん細胞に対してこのミセル化Fe(Salen)を用いて、有効性を実証した。

Fe(Salen)の抗腫瘍効果のメカニズム解析、投与方法及び有害事象の検討

Fe(Salen)の有効性は確認できたものの、抗腫瘍効果のメカニズムについてはあまりよくわかっていなかった。そこで、メカニズムの解明のためさらなる検討を行った。その結果、Fe(Salen)はExtracellular Signal-regulated Kinase (ERK)のリン酸化を増強し、Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT3)のリン酸化を抑制することがわかった⁸⁾。また、ミトコンドリアの膜電位を低下させることがわかった。

加えて、静脈投与、局所投与のデータが蓄積したため、従来の静脈投与や局所投与に加えて、カテーテルを用いた選択的動脈投与の効果を検討した。ウサギの足にVX2細胞を移植し作成したウサギ骨肉腫モデルを用いて、①未治療群(コントロール)、②メトトレキサート(Methotrexate, MTX) (5 mg/kg/日)の静脈投与群、③Fe(Salen) (5 mg/kg/日)の静脈投与群、④大腿動脈から透視下でカテーテルを用いて選択的に腫瘍を栄養する動脈にFe(Salen) (5 mg/kg/日)を投与した群、⑤Fe(Salen) (5 mg/kg/日)の選択的動脈投与に交流磁場を当てた群の5群で治療効果の比較検討を7日間行った (n=5)。メトトレキサートは骨肉腫の治療で使われているため効果の比較対象として用いた。結果、Fe(Salen)の選択的動脈投与群はFe(Salen)の静脈内投与やメトトレキサート静脈投与群より強い抗腫瘍効果を示した。加えてカテーテルによるFe(Salen)の選択的動脈投与群に交流磁場を当てて局所でFe(Salen)を発熱させることで温熱効果を誘導した群では、Fe(Salen)の選択的動脈投与群(交流磁場なし)と比較し、さらに治療効果が高かった ($p < 0.01$)。また、適正投与量決定のためにラットを用いた反復投与試験を行い、安全性試験を行い詳細なデータを得た。

Fe(Salen)の解毒方法の開発

臨床でFe(Salen)の副作用が認められた時のことを考慮し、解毒剤の開発を行った。複数の薬剤をスクリーニングし、臨床で鉄中毒の治療に用いられるデフェロキサミン(Deferoxamine, DFO)がFe(Salen)にキレートすることで解毒剤として使用できることを突き止めた⁹⁾。複数の培養がん細胞に、それぞれFe(Salen)で刺激し、濃度を変えたDFOを加えることで、DFO濃度依存的にFe(Salen)の抗腫瘍効果がキャンセルされた。また、半数致死量

(LD₅₀)である200 mg/kgのFe(Salen)をマウスに投与し、DFOを300 mg/kgを同時に投与し、24時間後の生存率を確認したところ、Fe(Salen)のみ投与した群では55%のマウスが死亡したが、DFOをFe(Salen)と同時に投与した群では100%が生存した (n=20, $p < 0.01$)。このことから、Fe(Salen)を臨床で将来使用し、有害事象が出た場合にDFOが解毒剤として使える可能性が示唆された。

市販医薬品の磁性化技術の確立にむけて

今までの我々の研究を発展させ、市販化医薬品をFe(Salen)のように磁性化出来ないかという発想に至った。そこで古くから臨床で用いられている市販抗がん剤の一つであるパクリタキセルとFe(Salen)を共有結合させることで、パクリタキセルの薬効成分の磁性化を試みた¹⁰⁾。パクリタキセルは、化学合成の分野では側鎖を置換し性質を変えるような検討が多数行われており、知見が豊富であることも選んだ理由の一つである。

実際に、パクリタキセルが薬剤そのものの性質を保ったまま、磁性化されたかどうかを4つの事項について検討を行った。まず、磁性化したパクリタキセル(以下、磁性パクリタキセル)が実際に磁性を有するかの検討を行った。2つ目に磁性パクリタキセルの抗腫瘍効果の評価、3つ目に磁性パクリタキセルの作用機序を市販パクリタキセルと比較した。4つ目に担がんマウス(口腔がん)を使用して磁性パクリタキセルの抗腫瘍効果の評価を行った。

まず、磁性パクリタキセルの磁性を評価した。Fe(Salen)と同様、ESRとSQUIDで実際に磁性を有することを確認した。ESRの結果では磁性パクリタキセルは実際に磁性を持つことが確認できた。また、残念ながらSQUIDでは磁性パクリタキセルは強磁性ではなく、常磁性であることが判明した。磁性パクリタキセルの希釈液をMRIで撮影したところ、濃度依存的にT2強調画像にて低シグナルを示した。このことにより、磁性パクリタキセルはMRIで視覚化でき、薬剤の局在の確認や濃度の推定ができることがわかった。

次に、磁性パクリタキセルの抗腫瘍効果の検討をXTT (2, 3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)アッセイを用いてヒト由来口腔がん培養細胞(OSC-19, HSC-3)を用いて行った。磁性パクリタキセルは市販パクリタキセルと遜色ない抗腫瘍効果を示した (n=4, $p < 0.001$)。また、磁性パクリタキセルは濃度依存的に活性酸素を増加させ、アポトーシスも増加させた (n=4, $p < 0.05$)。

また、市販パクリタキセルの抗腫瘍効果のメカニズムの一つは微小管の脱重合阻害であり、細胞周期において、G2/M期に収束するという報告があることから、磁性パクリタキセルでも細胞周期に変化が起こるか評価した。そ

の結果, フローサイトメトリーでの評価では, 磁性パクリタキセルは市販パクリタキセルと同様に, OSC-19細胞とHSC-3細胞においてG2/M期の割合を増加させた ($n=4$, $p<0.05$). また, 市販パクリタキセルは α チューブリンをアセチル化し, 脱重合を阻害することが知られている^{11, 12)}. OSC-19細胞を用いたウエスタンブロッティング法において, 磁性パクリタキセルは濃度依存的にアセチル化 α チューブリンの蛋白発現を増やした. 磁性パクリタキセル $3.8 \mu\text{M}$ においては, 非刺激群 (コントロール) と比較し, 発現量が約 4 倍増加した ($p<0.001$). 最後に動物実験で磁性パクリタキセルの効果と市販パクリタキセルの効果を比較した. ヒト由来舌がん細胞 (OSC-19) を, 免疫不全ヌードマウスの背部皮下に移植し, 担がんマウスを作成した. 14日後には, 生理的食塩水投与群では腫瘍体積は移植した時と比べ約12倍になった. 一方, 磁性パクリタキセル (12 mg/kg/日) 単独投与及び市販パクリタキセル (12 mg/kg/日) 単独投与の腫瘍体積は生理的食塩水投与群と比べ半分程度であった ($n=4$, $p<0.001$).

さらに磁性パクリタキセルに対する永久磁石の効果を確認するため, 磁性パクリタキセルを静脈投与した後, 磁力で局所に集め治療効果を高められるかを検討した. 具体的には, 担がんマウスに永久磁石 (383 mT) のついた特殊ジャケットを着せ, 磁性パクリタキセルを尾静脈から連日静脈投与して, 1 週間後に腫瘍部の標本を作成した. 腫瘍切片を鉄染色し, 磁性パクリタキセルの集積を確認した. また, 磁性パクリタキセルの治療効果の評価では①生理的食塩水投与群, ②磁性パクリタキセル (12 mg/kg/日) 投与群, ③市販パクリタキセル (12 mg/kg/日) 投与群, ④磁性パクリタキセル (12 mg/kg/日) + 永久磁石 (特殊ジャケット) の 4 群で治療効果を19日間評価した. 磁性パクリタキセルもしくは市販パクリタキセル単独投与でも治療効果を認めたが, 磁性パクリタキセルを投与し, 永久磁石付き特殊ジャケットをマウスに着せた群は, より強い治療効果を示すことが確認できた ($n=7-8$, $p<0.05$). このことにより, 磁性パクリタキセルは市販パクリタキセルの薬効成分に磁性を付加したことで, 磁石を用いたドラッグデリバリーが可能になり, 薬剤を集積させることにより抗腫瘍効果を高められることが示唆された.

これらの実験より, 磁性パクリタキセルは化合物自体が磁性体 (磁石に引き寄せられる) の性質を持ちながら, 且つ市販のパクリタキセル同様の抗腫瘍効果を維持していることが分かった. 生体内で磁石に集積し, 効果が増強した事実より, この磁性化技術を用いれば他の様々な薬剤に対しても, 磁力を用いて目的とする局所に集中的に奏功させることが期待できる. ただし, 今後もどのような形で磁力を当てるのが効果的かなどの条件検討が今後必要だと思われた.

パクリタキセルにおいて問題となっているのは静脈投与した際の神経障害による投薬制限である. この磁性化技術でより効率的に抗腫瘍効果を発現することができれば, 患者さんへの副作用を減らし, 全身の負担を大きく軽減することにつながる. そのためには磁石によって集積した薬剤の抗腫瘍効果を客観的に数値化して評価する必要がある. また, 磁石を用いることで, 用いない時と比べてどれくらいの薬剤が減量できるか数値化して示していく必要もある. また, MRIでの局所の濃度推定や分布推定システムの確立も必要になってくる. 加えて, 付加した磁場発生構造が市販パクリタキセルにはない副作用や体内動態への悪影響の有無や, 磁場発生構造を改良することで磁場をより強力にすることなども, 今後さらに検討していく必要がある.

今後の課題と展望

我々の研究は「市販の医薬品の薬効成分の磁性化技術」を確立し, 臨床応用へつなげることが最終目標である. 将来的にはパクリタキセルのみならず, 他の抗がん剤や, 鎮痛薬や抗体薬など様々な市販医薬品の磁性化を目指す. この技術により様々な市販医薬品を磁性化することが期待でき, 磁石を用いたドラッグデリバリーにより患部に集積させることで, 薬剤の使用量や副作用を少なくすることが期待できる. また, 交流磁場を使った温熱効果や, MRIを用いた磁性化薬剤の視覚化なども期待できる. 我々は (株) IHI と「市販医薬品に磁性を付与する化合物」の特許出願を行った (特願2018-233877).

近年, 交流磁場や交流電場など物理的な刺激を医療に用いた治療が考案されてきている. 我々の今までの医工連携・産学連携で得られた知見を活かし, 今までの概念を覆すような新しい治療法の開発を今後も目指していく.

謝 辞

横浜市立大学医学会賞に選出いただき, 選考委員の先生方ならびに横浜市医学会の関係者のみなさまに心より感謝致します. また, 日頃よりご指導いただいております横浜市立大学大学院 医学研究科 循環制御医学教室の石川義弘教授, 教室員の方々, 並びに (株) IHI 江口春樹先生をはじめ共同研究者の先生方に感謝申し上げます.

また, これらの研究の一部は基盤研究 (C), 臨床薬理研究振興財団, 上原記念生命科学財団, 武田科学振興財団, SGH 財団による支援で行いました.

文 献

1. Eguchi H, Umemura M, Kurotani R, et al.: A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and

- magnetic resonance imaging. *Sci Rep*, **5**: 9194, 2015.
2. Goodenough J. B: Theory of the Role of Covalence in the Perovskite-Type Manganites [La, M(II)] MnO₃. *Phys Rev*, **100**(2): 564–573, 1955.
 3. Abe M, Hiraoka M, Takahashi M, et al.: Multi-institutional studies on hyperthermia using an 8-MHz radiofrequency capacitive heating device (Thermotron RF-8) in combination with radiation for cancer therapy. *Cancer*, **58**(8): 1589–1595, 1986.
 4. Suit H.D, Shwayder M: Hyperthermia: potential as an anti-tumor agent. *Cancer*, **34**(1): 122–129, 1974.
 5. Sato I, Umemura M, Mitsudo K, et al.: Simultaneous hyperthermia-chemotherapy with controlled drug delivery using single-drug nanoparticles. *Sci Rep*, **6**: 24629, 2016.
 6. Ohtake M, Umemura M, Sato I, et al.: Hyperthermia and chemotherapy using Fe (Salen) nanoparticles might impact glioblastoma treatment. *Sci Rep*, **7**: 42783, 2017.
 7. Kim J-H, Eguchi H, Umemura M, et al.: Magnetic metal-complex-conducting copolymer core-shell nanoassemblies for a single-drug anticancer platform. *NPG Asia Mater*, **9**(3): e367–e367, 2017.
 8. Umemura M, Islam M.R, Fukumura H, et al.: Simultaneous hyperthermia-chemotherapy effect by arterial injection of Fe (Salen) for femur tumor. *Cancer Sci*, **110**(1): 356–365, 2019.
 9. Umemura M, Kim J.H, Aoyama H, et al.: The iron chelating agent, deferoxamine detoxifies Fe (Salen)-induced cytotoxicity. *J Pharmacol Sci*, **134**(4): 203–210, 2017.
 10. Nakakaji R, Umemura M, Mitsudo K, et al.: Treatment of oral cancer using magnetized paclitaxel. *Oncotarget*, **9**(21): 15591–15605, 2018.
 11. Piperno G, LeDizet M, Chang X.J: Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol*, **104**(2): 289–302, 1987.
 12. Bonezzi K, Belotti D, North B. J, et al.: Inhibition of SIRT2 potentiates the anti-motility activity of taxanes: implications for antineoplastic combination therapies. *Neoplasia*, **14**(9): 846–854, 2012.

Abstract

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR NOVEL COMMERCIALY AVAILABLE COMPOUNDS
WITH INTRINSIC MAGNETIC PROPERTIES

Masanari UMEMURA¹⁾, Rina NKAKAJI^{1, 2)}, Akane NAGASAKO¹⁾,
Md Rafikul Islam¹⁾, Makoto OHTAKE³⁾, Kagemichi NGAO^{1, 3)},
Hiroko NEMOTO⁴⁾, Yuto MIZUNO¹⁾, Soichiro ISHIKAWA^{1, 2)},
Fumina SUZUKI¹⁾, Yoshihiro ISHIKAWA¹⁾

Department of Cardiovascular Research Institute (CVRI), Yokohama City University Graduate School of Medicine
Department of Dentistry/Oral and Maxillofacial Surgery/
Orthodontics, Yokohama City University Graduate School of Medicine
Department of Neurosurgery, Yokohama City University Graduate School of Medicine
Department of Surgery, Yokohama City University Graduate School of Medicine

We previously identified a novel magnetic organic compound, N,N'-bis(salicylidene)ethylenediamine iron [Fe(Salen)], as an anti-cancer agent with intrinsic magnetism. In addition to the anticancer effect, Fe(Salen) exhibited the following unique characteristics. 1) It can be attracted by a permanent magnet. 2) It per se generates cytotoxic heat when exposed to an alternating magnetic field (AMF), similar to the principle of an induction cooker. 3) It can be visualized by magnetic resonance imaging (MRI). Indeed, Fe(Salen) exhibited an anti-cancer effect in various cancer cell lines.

We found the magnetic chemical key structure of Fe(Salen) generating the magnetic property using Super Photon ring-8 GeV (Spring 8) (RIKEN) crystal structure analysis. This result showed that the unique angle configuration of Fe-O-Fe (146.359°) in the crystal structure of Fe(Salen) plays an important role in generating magnetism. This angle is well known as the Goodenough-Kanamori rule. Based on the proven magnetic performance of Fe(Salen) that is attributed to its specific molecular structure, we hypothesized that the Fe(Salen) molecule can endow a commercially available anti-cancer drug, paclitaxel (PTX), with an intrinsic magnetic property by chemically tethering the drug counterpart. PTX is one of the most studied chemotherapeutic molecules in the history of medicinal chemistry. In this study, we covalently linked Fe(Salen) to PTX to obtain a magnetized PTX conjugate (M-PTX), which exhibited magnetic characteristics for magnet-guided drug delivery and MRI visualization. M-PTX exhibited its anti-cancer effect in various cancer cell lines. In a mouse oral cancer model, a permanent magnet placed on the body surface adjacent to the tumor showed an accumulation of M-PTX. Moreover, the magnet greatly increased the anti-cancer effect of M-PTX. Therefore, such a covalent coupling technique can be an effective method for improving the therapeutic index of clinically used agents. Our aim is to develop novel magnetic compounds and to apply them in a drug delivery system with a permanent magnet or alternating magnetic fields.