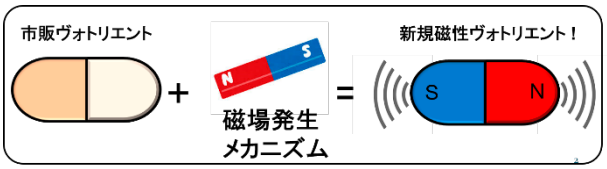
74　医工連携から生まれた市販医薬品の磁性化技術の開発	梅村　将就

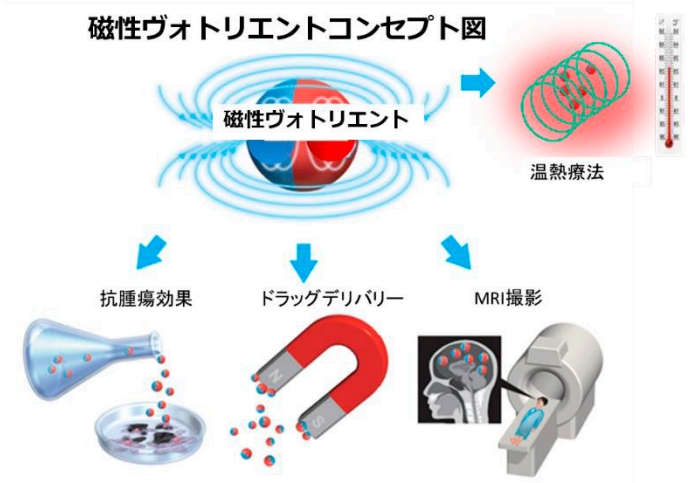
【目的】我々は先行研究により確立した「医薬品の薬効成分の磁性化技術」により、市販医薬品であるヴォトリエントの磁性化に成功した（以後、磁性ヴォトリエントと呼ぶ）。先行実験において磁性ヴォトリエントに磁性があること、悪性軟部腫瘍の培養細胞（HS-SY-Ⅱ）に対して、強い抗腫瘍効果を示すことはすでに確認済である。そこで、ヴォトリエントが磁性化する前と同じ薬効や性質を持っているかの確認を行う。また、骨肉腫動物モデルを用いて、磁石付ジャケット（磁気サポーター）を使用して磁石によるドラッグデリバリーを行うことで腫瘍部での磁性ヴォトリエントの集積を高め、より高い治療効果が得られることを確認する。

【方法】1. ヴォトリエントが磁性化されたことから、交流磁場を印加することで薬剤自体が熱を発するかについて検討した（IH クッキングヒーターの原理）。2. ヴォトリエントは Extracellular Signal-regulated Kinase（ERK）のリン酸化を抑制するという報告があるため、磁性ヴォトリエントも磁性化された後も市販のヴォトリエントと同じ性質を保持できているかをウエスタンブロッティングで確認した。3. 磁性ヴォトリエントを MRI で撮影し、画像による視覚化が可能かどうかを確認した。4. 骨肉腫動物モデルを用いて、磁石付ジャケット（磁気サポーター）を使用することで、磁場により薬剤を集積させ、実際に腫瘍内の磁性ヴォトリエントの薬剤濃度を高めることができ、より高い治療効果が得られるかを確認した。

【結果】1. 交流磁場印加前は薬剤の温度は 23.3℃だったのが、交流磁場を印加することで、IH クッキングヒーターの原理で、磁性ヴォトリエント自体が発熱することで交流磁場印加 20 分後には 38.2℃まで上昇した。その後、60 分間観察したが、温度は 38.2℃からプラトーを示し、変化は認めなかった。2. 磁性ヴォトリエントは市販のヴォトリエントと同様に、ERK のリン酸化を抑制した。3. 磁性ヴォトリエントは MRI の撮像により、T2 強調画像で濃度依存的に低信号を示した。4. 悪性軟部腫瘍内の磁性ヴォトリエントの集積有無の評価は、磁性ヴォトリエントの磁性が弱いのか、磁石付きのジャケットでの集積が弱いのかは不明だが、コントロールと比較し、より集積している結果は得られなかった。

磁性ヴォトリエントコンセプト図





74. 医工連携から生まれた市販医薬品の磁性化技術の開発

梅村　将就

横浜市立大学 医学部 循環制御医学

Key words：ヴォトリエント，磁性ヴォトリエント，ドラッグデリバリー，磁性化，MRI

緒　言

我々は先行研究により確立した「医薬品の薬効成分の磁性化技術」により、市販医薬品であるヴォトリエントの磁性化に成功した（以後、磁性ヴォトリエントと呼ぶ)。先行実験において、我々は（株）IHI との医工連携により、有機化合物でありながら磁石に集積する性質（磁性）を持つμ-oxo N、N-bis（salicylidene）ethylenediamine iron（以後、Fe（Salen）と呼ぶ）という鉄錯体の一種を同定した［1]。これ以前に、室温下で有機物が磁性を持つという報告はない。また、Fe（Salen）が磁性を持つことだけでなく、様々な癌腫に対して強い抗癌活性を有することも発見した。我々は Fe（Salen）が磁性を持つという特徴から「磁石によるドラッグデリバリー」が可能であり、「磁気共鳴画像（MRI）に写るため、局在や濃度が推定できる」という、一剤で多機能な新規抗癌剤として有用であることを報告した［1]。さらに、Fe（Salen）の磁場発生メカニズムを解析するため、理化学研究所との共同研究により、大型放射光施設（SPring-8）を用いて結晶構造解析を行った。その結果、Fe（Salen）の化学構造の一部が「磁場発生化学構造」を持つことを発見し、その磁場発生メカニズムを突き止めた。また、キレート剤を用いることで、Fe（Salen）の磁性や抗腫瘍効果が弱まることも発見した［2]。また、ウサギ口腔がんモデルに対して、交流磁場を印加することで、IH クッキングヒーターの原理で薬剤自体が発熱し、温熱療法としても有用であることが分かった[3]。また、脳腫瘍モデルマウスでも Fe（Salen）の有用性を確認した［4]。また、Fe（Salen）をウサギに動脈投与した際と静脈投与した際では動脈投与の方が有意に効果があることがわかった［5]。

我々はこの結晶構造解析の結果から、同定した磁場発生化学構造を他の市販薬剤に化学結合することで、磁性化できないかと考えた。そこで、市販のパクリタキセルへこの磁場発生化学構造をアミド結合させ、磁性化に成功した（磁性化パクリタキセル)。本技術は市販医薬品にミセル化などではなく、磁場発生構造を薬剤に直接化学的に結合させている。我々の磁性化技術は薬理活性そのものを磁性化するものであり、安定している。この磁性化パクリタキセルの多機能性を、口腔がん細胞を用いて評価した。磁性パクリタキセルの抗腫瘍効果、及び磁石による薬剤集積効果と抗腫瘍効果の増強に関して評価を行い、市販パクリタキセルに対する優位性を示した［6]。これら磁性化関連技術を本学では国内外で 100 件以上の特許として出願済である。

さらに、今回、我々は今までの知見を活かし、この磁性化技術を市販の分子標的薬に応用した。磁場発生構造を分子標的薬であるヴォトリエント（パゾパニブ）に化学合成することで、「市販のヴォトリエントの薬効成分自体を磁性化すること」に世界で初めて成功した。ヴォトリエントは悪性軟部腫瘍の治療に用いられる薬剤である。本研究では医工連携の過程で生まれた、市販抗がん剤の薬効成分を磁性化した抗がん剤である「磁性ヴォトリエントを用いた　悪性軟部腫瘍に対する新規治療法」を開発し、最終的には抗がん剤に限らずあらゆる市販医薬品を磁性化できる技術の確立を目指す。

悪性軟部腫瘍とは、軟部腫瘍のなかでも腫瘍が発生した部位で発育するばかりでなく、肺、骨、リンパ節などに転移をおこす可能性をもったものをいう。悪性軟部腫瘍の治療は、標準治療の外科手術が困難な場合は、化学療法を行なうこともあり、分子標的薬のヴォトリエントもその中の 1 つである。ドラッグデリバリーで腫瘍部位に薬剤を集積させ、局所での抗腫瘍効果を高め全身的な副作用を軽減することができれば薬剤の有用性がさらに高まると予想される。本研究では、磁性ヴォトリエントを磁石によるドラッグデリバリーで腫瘍部に集積させることで、磁性ヴォトリエントのもつ抗腫瘍効果を高め、副作用の軽減ができると考え、磁性ヴォトリエントの生体内投与時の評価を行った。

今後これらの知見の蓄積により、抗がん剤に限らず様々な薬剤の磁性化が期待できる。

方　法

先行実験において磁性ヴォトリエントに磁性があること、悪性軟部腫瘍の培養細胞（HS-SY-Ⅱ）に対して、強い抗腫瘍効果を示すことはすでに確認済であった。そこで、ヴォトリエントが磁性化する前と同じ薬効や性質を磁性化後も、保たれているかの確認を行う。また、骨肉腫動物モデルを用いて、磁石付ジャケット（磁気サポーター）を使用することで、実際に磁石で集積させた腫瘍の磁性ヴォトリエントの薬剤濃度が高まり、より高い治療効果が得られるか確認した。

1.　交流磁場により磁性ヴォトリエントが発熱するかの確認

ヴォトリエントが磁性化されたことから、交流磁場をかけると薬剤自体が熱を発するかについて検討した。温度の測定は、サーモグラフィー（InfReC R300SR；Nippon Avionics、Tokyo、Japan）で行った。印加してから、60 分後までの温度の測定を行った。交流磁場の機械はアロニクス社の HOT SHOT（Ameritherm、New York、USA）を用いた。

2.　磁性化の前後で、磁性ヴォトリエントの性質に変化がないかの確認

ヴォトリエントは ERK のリン酸化を抑制するという報告があるため［7］、磁性ヴォトリエントも磁性化された後も市販のヴォトリエントと同じ性質を保持できているかをウエスタンブロッティングで確認した。非刺激群、市販ヴォトリエント（10μM）、磁性ヴォトリエント（10μM）で比較した。

3.　MRI 撮影による磁性ヴォトリエントの視覚化

市販ヴォトリエントと磁性ヴォトリエントの濃度を 0 mM、1.3 mM、2.5 mM、5 mM と希釈列を作製し、7T MRI （JASTEC-Kobelco、Tokyo、Japan）で撮影し、画像による視覚化が可能かどうかを確認した。

4.　悪性軟部腫瘍モデル動物を用いた磁石による磁性ヴォトリエントのドラッグデリバリーの治療効果の評価

免疫不全マウス（Bulb/c Slc-nu/nu）の皮下にヒト悪性軟部腫瘍腫細胞（HS-SY-Ⅱ）を移植し、ヒト由来悪性軟部腫瘍のヌードマウスモデルを作製した。腫瘍が直径 5 mm になった時点で 4 群に分けて治療効果の評価を行った。モデルマウスの腫瘍部位に磁石が当たるように磁石付ジャケット（磁気サポーター）を付け（図 1）、磁性ヴォトリエントもしくは生理的食塩水を連日尾静注し、治療効果を評価した。観察は 2 週間行った。① 未治療群、② 市販ヴォトリエント尾静注投与群、③ 磁性ヴォトリエント尾静注投与群、④ 磁性ヴォトリエント尾静注投与及び磁石付属の特殊ジャケット（磁気サポーター）による磁場誘導を加えた群において治療効果を比較検討した。

5.　抗腫瘍効果の評価

①～④群に関して、毎日、腫瘍の写真撮影し、大きさを記録するとともに、マウスの行動性の観察による活動低下の有無や食欲低下の有無などの諸条件も検討した。腫瘍サイズから腫瘍体積や特殊染色による磁性ヴォトリエントの集積の確認を行った。

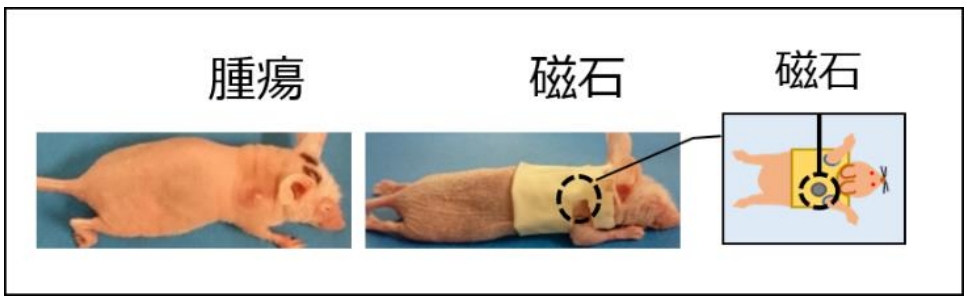


図 1.　磁石付きジャケット（磁気サポーター）
マウスの皮下に作製した腫瘍部に常時磁石が当たるように、ジャケット内部に磁石が内蔵されている。

結　果

1.　磁性ヴォトリエントは、交流磁場により化合物自体が発熱した

交流磁場印加前は薬剤の温度は 23.3℃だったのが、交流磁場を印加することで、IH クッキングヒーターの原理により、磁性ヴォトリエント自体が発熱することで交流磁場印加 20 分後には 38.2℃まで上昇した。その後、60 分間観察したが、温度は 38.2℃からプラトーを示し、変化は認めなかった。

2.　磁性ヴォトリエントは、磁性化後も、市販ヴォトリエントと同様の性質を保持していた

磁性ヴォトリエントは市販のヴォトリエントと同様に、ERK のリン酸化を抑制した。Total ERK の発現は変わらなかった。コントロールはリン酸化の変化は認めなかった。

3.　磁性ヴォトリエントは、MRI の T2 強調画像で視覚化が可能であることを確認した

磁性ヴォトリエントが磁性を持つことで、本当に MRI に写ることを確認するため、まず磁性ヴォトリエントのみを用いて MRI 撮影を行った。その際に溶媒による写り方の違いについても確認する必要があり、生理食塩水（Saline）と、有機溶媒のジメチルスルホキシド（DMSO）を用いて MRI 撮影画像の比較を行った（図 2）。

その結果、DMSO で磁性ヴォトリエントを溶解させた場合は、T1W 像でも T2W 像でも濃度依存的な変化を認めた。T1W 像では磁性ヴォトリエントの濃度依存的に信号強度が強くなっている。T2W 像では濃度依存的に信号強度が弱くなっている。一方、生理食塩水で磁性ヴォトリエントを溶解させた場合は T1W 像では濃度に関係なく一様に信号強度が弱く、T2W 像では濃度に関係なく信号強度が均一に強くなっている。これらの結果より、磁性ヴォトリエントを溶解させる場合は DMSO によって溶解することが適していると判断した。

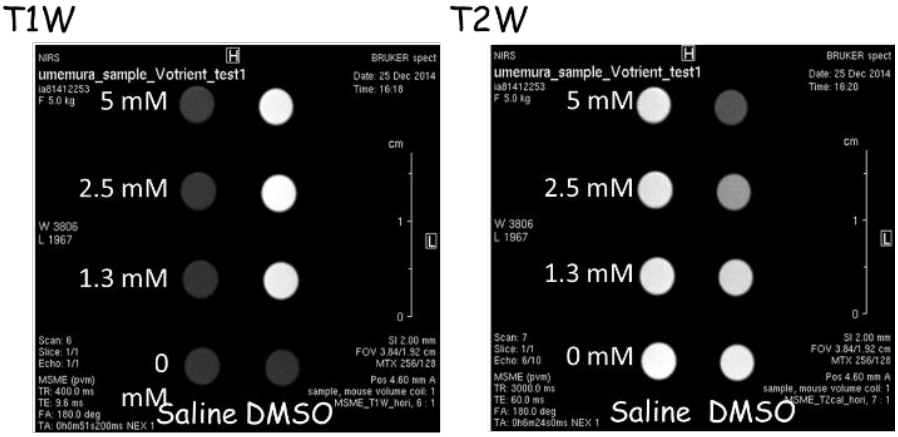


図 2.　生理食塩水もしくは DMSO に溶解させた磁性ヴォトリエントの MRI 撮影像
T1W 像では DMSO に磁性ヴォトリエントを溶解することによって濃度依存的に信号強度が強く検出されている。一方、T2W 像では DMSO に溶解させた場合、磁性ヴォトリエントの濃度依存的に信号強度が弱くなっているが、生理食塩水に溶解させた場合は濃度依存的な変化を認めない。

4.　担癌マウスを用いた動物実験では、磁石を用いた腫瘍への磁性ヴォトリエントの集積は明らかではなかった

悪性軟部腫瘍内の磁性ヴォトリエントの集積有無の評価は、磁性ヴォトリエントの磁性が弱いのか、磁石付きのジャケットでの集積が弱いのかは不明だが、コントロールと比較し、より集積している結果は得られなかった。

考　察

市販ヴォトリエントを磁性化することで、磁石に集積するだけでなく、交流磁場を印加することで発熱し、ヴォトリエントの抗腫瘍効果のみならず、温熱効果が同時に期待できる可能性を示した。また、MRI で撮影することで、磁性ヴォトリエントは特に T2 強調画像で顕著に濃度依存的に低信号を示した。よって、磁性ヴォトリエントは、生体に投与した際に、薬剤の局在や濃度が画像により非侵襲的に推定できる可能性を示した。

悪性軟部腫瘍モデル動物を用いた、磁石による磁性ヴォトリエントのドラッグデリバリーの治療効果の評価では、磁石付きジャケットを用いて薬剤の集積を試みたがコントロールと比較して、現在のところはっきりとした集積を観察できなかった。今後は、磁性ヴォトリエントの磁性を強化する化学合成方法を検討する必要がある。また、磁石付きジャケットに用いている磁石を強力にすることで集積能力を改善できる可能性もある。引き続き検討を行う。

また、磁性ヴォトリエントは磁性をもつことから交流磁場を印加することで薬剤自体が発熱した。今後は、この性質を利用し、化学療法効果に加え、温熱療法を同時にすることも可能かもしれない。市販医薬品に磁性を付与することで、様々な付加価値が期待でき新しい治療方法に応用できる可能性があると思われる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学医学部医学科循環制御医学教室の中鍛治里奈、永迫茜である。

文　献

1） Eguchi H, Umemura M, Kurotani R, Fukumura H, Sato I, Kim H. J, Hoshino Y, Lee J, Amemiya N, Sato M, Hirata K, Singh J.D, Masuda T, Yamamoto M, Urano T, Yoshida K, Tanigaki K, Yamamoto M, Sato M, Inoue S, Aoki I and Ishikawa Y. (2/22) A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging. Scientific reports. 5, 9194, 2015.

2） Umemura M, Kim JH, Aoyama H, Hoshino Y, Fukumura H, Nakakaji R, Sato I, Ohtake M, Akimoto T, Narikawa M, Tanaka R, Fujita T, Yokoyama U, Taguri M, Okumura S, Sato M, Eguchi H, Ishikawa Y. The iron chelating agent, deferoxamine detoxifies Fe(Salen)-induced cytotoxicity. Journal of Pharmacological Sciences. 2017 Aug 134(4):203-210. Epub 2017 Jul 25. PMID: 28779994 DOI: 10.1016/j.jphs.2017.07.002

3） Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Fukumura H, Kim J, Hoshino J, Nakashima H, Kioi M, Nakakaji R, Sato M, Fujita T, Yokoyama U, Okumura S, Oshiro H, Eguchi H, Tohnai I and Ishikawa Y. Simultaneous hyperthermia-chemotherapy with controlled drug delivery using single-drug nanoparticles. Scientific Reports. 2016 Apr 22;6:24629. EPub 2016 Apr 22. PMID: 27103308 DOI: 10.1038/srep24629

4） Ohtake M, Umemura M, Sato I, Akimoto T, Oda K, Nagasako A, Kim J, Fujita T, Yokoyama U, Nakayama T, Hoshino Y, Ishiba M, Tokura S, Hara M, Masuda T, Aoki I, Takemura Y, Eguchi H, Kawahara N and Ishikawa Y. Hyperthermia and chemotherapy using Fe(Salen) nanoparticles might impact glioblastoma treatment., Scientific Reports. 2017 Feb 20;7:42783.EPub 2017 Feb 20. PMID: 28218292 DOI: 10.1038/srep42783

5） Umemura M, Islam R, Fukumura H, Sato I, Kawabata Y, Matsuo K , Nakakaji R, Nagasako A, Ohtake M, Fujita T, Yokoyama U, Nakayama T, Eguchi H, and Ishikawa Y. Simultaneous hyperthermia-chemotherapy effect by arterial injection of Fe(Salen) for femur tumor. Cancer Science. 110, 1, 356-365, 2019. DOI: 10.1111/cas.13851

6） Nakakaji R, Umemura M, Mitsudo K, Kim JH, Hoshino Y, Sato I, Masuda T, Yamamoto M, Kioi M, Koizumi T, Fujita T, Yokoyama U, Iida M, Sato M, Sato H, Murofushi S, Shibata S, Aoki I, Eguchi H, Tohnai I, Ishikawa Y. Treatment of oral cancer using magnetized paclitaxel. Oncotarget. 2018. Feb 26;9(21):15591-15605. eCollection 2018 Mar 20. PMID: 29643995 DOI: 10.18632/oncotarget.24570.

7） Klaus Podar, Giovanni Tonon, Martin Sattler, Yu-Tzu Tai, Steven LeGouill, Hiroshi Yasui, Kenji Ishitsuka, Shaji Kumar, Rakesh Kumar, Lini N. Pandite, Teru Hideshima, Dharminder Chauhan, and Kenneth C. Anderson The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma PNAS December 19, 2006 103 (51) 19478-19483 doi.org/10.1073/pnas.0609329103