

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870481

研究課題名(和文)画期的技術を用いて合成した自己磁性タキソールを用いた新しい乳がん治療

研究課題名(英文)A novel treatment for breast cancer using intrinsic magnetized taxol

研究代表者

梅村 将就 (UMEMURA, Masanari)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50595353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは長年、有機化合物そのものに磁性と抗がん作用を持つ鉄錯体であるFe(Salen)の研究を行い、結晶構造解析により同定した磁場発生構造を、市販医薬品であるタキソールに化学結合させることで、「市販のタキソール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。この磁性タキソー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、且つ市販のタキソール同様の抗腫瘍後果作用を持つ。本申請では医工連携から生まれた市販医薬品の薬効成分を磁性化した磁性タキソールを用いて乳がんをはじめとしたがんに対する新規治療法を開拓する。

研究成果の概要(英文)：We previously reported a novel magnetic organic compound, N,N'-bis(salicylidene)ethylenediamine iron Fe(Salen), as an anti-cancer agent with intrinsic magnetic property. We identified the magnetic chemical key structure of Fe(salen) generating the magnetic property using Super Photon ring-8 GeV (Spring 8) (RIKEN). Here, we have designed specific covalent linkage of the Fe(Salen), to a commercial available drug, such as PTX. Fe(Salen) serves as a magnetically-responsive scaffold, generating the magnetic property in addition to the classic cytotoxic property of PTX. Our aim is to developing a novel treatment using M-PTX on cancer including breast cancer.

研究分野：創薬

キーワード：磁性 乳がん がん治療 ドラッグデリバリー MRI

1. 研究開始当初の背景

申請者らは長年、有機化合物そのものに磁性と抗がん作用を持つ鉄錯体である Fe(Salen) の研究を行い、結晶構造解析により同定した磁場発生構造を、市販医薬品であるタキソールに化学結合させることで、「市販のタキソール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。この磁性タキソー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、且つ市販のタキソール同様の抗腫瘍後果作用を持つ。

2. 研究の目的

本申請では医工連携から生まれた市販医薬品の薬効成分を磁性化した**磁性タキソールを用いて乳がんをはじめとしたがんに対する新規治療法を開拓する。**

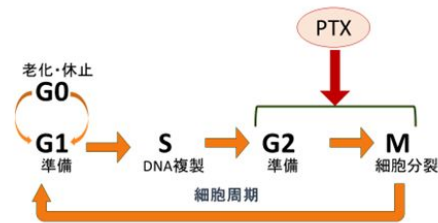
3. 研究の方法

4つの事項について検討を行った。一つ目は磁性化に成功したタキソール(以下、磁性タキソール)が磁性を有するかの検討を行った。二つ目に磁性タキソールの抗腫瘍効果の検討、三つ目に磁性タキソールの作用機序を市販タキソールとの比較検討を行った。四つ目にモデル疾患動物を使用した磁性タキソールの効果の評価を行った。

まず、一つ目の磁性タキソールの磁性を評価した。電子スピン共鳴(ESR: Electron Spin Resonance)と超伝導量子干渉計(superconducting quantum interference device, SQUID)で実際に磁性を有することを確認した。また、磁性タキソールの希釈液をMRIで撮影した。

2つ目の抗腫瘍効果の検討では既存のタキソールとの効果の比較をするために XTT assay を用いて薬剤をヒト乳がん細胞、ヒトもしくはウサギ舌がん培養細胞に投与し、一定時間後の生細胞の割合を比較した。トリプルネガティブの乳がん細胞の育ちが悪く実験に支障をきたしたため、各項目の検討は扱いやすい口腔がん細胞でやることとし、その結果を踏まえ、乳がん細胞に適應させる方針にした。アポトーシス誘導効果の比較を行った。具体的には、磁性タキソールを舌がん細胞に投与して一定時間後にどのくらいの割合の細胞がアポトーシス誘導されたかを Flow cytometry (FACS) を用いて比較した。

3つ目の、磁性タキソールの作用機序の比較検討では、既存のタキソールは微小管の脱重合阻害であり、細胞周期において、G2/M 期に集束するという報告があることから、磁性タキソールでも同じ時期に細胞周期変化が起こるか FACS を用いて検討した。また、磁性タキソールが、実際に微小管の脱重合阻害をもたらしているか、抗チューブリン抗体を用いて、がん細胞のチューブリンに対して、免疫染色を行って検討した。



四つ目のモデル疾患動物を用いた磁性タキソールの効果の検討では、ヒト舌がんモデルマウスの作成のため舌がん細胞を、免疫不全ヌードマウスの背部皮下に移植し、4~5日後に腫瘍が5mm前後に形成されていることを確認した。生体内で実際に磁石により、静脈投与した薬剤が集められるかの検討をこのヒト舌癌モデルマウスを用いて検討した。具体的には、舌がんモデルマウスに磁石のついた特殊ジャケットを着せ、磁性タキソールを尾静脈から連日静脈投与して、一週間後に腫瘍部の標本を作成し鉄染色により薬剤の集積を確認した。

この結果を踏まえ、乳がん細胞での追試を行う。

4. 研究成果

磁性タキソールは磁場発生構造をタキソールに付加することで、磁性という特徴が得られたことにより、磁石で集積させることができる。このことは本研究で *in vitro*, *in vivo* においても証明することができたため、生体内でもその磁力を失わず効果を発現できると考えられる。*in vivo* において生体内で磁石に集積したことはより薬剤を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の磁石印加が効果的か、などの条件検討が必要だと思われた。

ESRの結果では磁性タキソールは実際に磁性を持つことが確認できた。また、SQUIDでは磁性タキソールは常磁性であることが判明した。磁性タキソールの希釈液は、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、磁性タキソールは MRI での撮像により、局在の確認や濃度の推定が期待できることがわかった。

また、磁性タキソールの抗腫瘍効果に関しては既存のタキソールに遜色ない効果を示しており、効果に関しても同様の腫瘍抑制効果があることが示唆された。

また、FACS を用いて舌がん細胞に投与した磁性タキソールが、細胞周期にどのような影響を及ぼしているかを確認した。その結果、G2/M 期で集積することがわかり、これは市販のタキソールが示す以前の論文報告と傾向が一緒であった。これにより得られた結果からタキソールと同様の機構で抗腫瘍効果が得られることが分かった。このことは既存のタキソールと同様の用途によって、磁性を持つ分、市販のタキソール以上の効果を期待して用いることができることを示唆している。

また、ヒトがん細胞を免疫不全マウスに移植したモデル動物での、磁性タキソールの評価では、磁石により、腫瘍に磁性タキソールが集まり、磁石がない時と比較し、より強い抗腫瘍効果を示すことが確認できた。このころにより、磁性タキソールは磁性を持つために磁石を用いたドラッグデリバリーに応用できることが示唆された。

温熱に関しては、当初、磁性タキソールに交流磁場を当てること、IHクッキングヒーターと同様の原理で発熱し、温熱効果が得られることを期待していた。しかし、磁性タキソールの磁性を詳細に検討すると、SQUIDの結果も踏まえて、やはり常磁性である可能性が高く、交流磁場を印加しても十分温度が上がらなかった。しかし、本研究の過程で、磁性抗がん剤のミセル化技術を確認し、磁性を増強することができるようになり、論文報告した(業績論文 2; *NPG Asia Materials*, 2017)。このミセル化技術を磁性タキソールに応用し、磁性を強くすることで温熱治療への応用も期待できるため、引き続き研究を行っていく。

タキソー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。この制限以内でより効率的に抗腫瘍効果を発現することができれば、患者への全体的負担を大きく軽減することにつながると考えている。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、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がある。そのためにはMRIでの局所の濃度推定や分布推定システムの確立が必要になってくる。この点については、今後も検討が必要である。

磁性タキソールのがん細胞に対する効果は確認できたがトリプルネガティブ乳がんに対する検討はまだ必要である。今後も継続して研究を行っていく。

また、付加した磁場発生構造が市販タキソールにはない副作用や体内動態への悪影響がないかなども、さらに評価していく必要があると思われる。

以上のことより、磁性タキソールは既存のタキソールの機能を有し、さらには磁石に集積するためより効率的ながん治療薬として利用できることが期待できることがわかった。現在、磁性タキソールについての論文を投稿中である。

発表論文リストにあるように、Fe(Salen)や磁性薬に関する4本の論文及び2本の投稿中の論文は、すべて申請者が筆頭著者、共著者もしくは責任著者として参画したものであり、継続的な研究結果を得ることができた(業績論文 1, 2, 3, 10; *Scientific Reports*, 2015, 2016, 2017; *NPG Asia Materials*, 2017)。これらの研究データが基盤になり、磁性タキソールの合成の成功につながった。本

申請内容は磁性タキソールを用いて「市販の医薬品の磁性化技術」を確立し、臨床応用へつなげる基盤となる研究である。将来的にはタキソールのみならず、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。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11件)

1. Ohtake M, Umemura M, Sato I, (他 17名) Hyperthermia and chemotherapy using Fe(Salen) nanoparticles might impact glioblastoma treatment, *Scientific Reports*, (査読あり), 7, 42783, 2017. (IF=5.228) (, correspondence)

2. Kim J-H, Eguchi H, Umemura M, Sato I (他 8名). Magnetic metal complex-conducting copolymer core-shell nanoassemblies for single-drug anticancer platform, *NPG Asia Materials*, (査読あり) 9, e367, 2017. (IF=8.772)

3. Sato I, Umemura M, Mitsudo K, Fukumura H, (他 13名) Simultaneous hyperthermia-chemotherapy with controlled drug delivery using single-drug nanoparticles. *Scientific Reports*, (査読あり) 6:24629, 2016. (IF=5.578) (, correspondence)

4. *Oda K, *Umemura M, Nakakaji R, (他 16名) Transient receptor potential cation 3 channel regulates melanoma proliferation and migration, *The Journal of Physiological Sciences*.(査読あり) 2016 DOI:10.1007/s12576-016-0480-1(*Kayoko Oda and Masanari Umemura contributed equally to this work.) (IF=2.165) (, correspondence)

5. Cai W, Fujita T, Jin H, Suita K, Liang C, Prajapati R, Hidaka Y, Umemura M, (他 4名) Y. Disruption of Epac1 protects the heart from adenylyl cyclase type 5-mediated cardiac dysfunction *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, (査読あり). 475: 1, 1-7, 2016. (IF=2.371)

6. Fujita S, Yokoyama U, Ishiwata R, Aoki R, Nagao K, Masukawa D, Umemura M, (他 9名) Glutamate promotes contraction of the rat ductus arteriosus, *Circulation Journal*, (査読あり) 25;80(11):2388-23986, 2016. (IF=4.214)

7. Nakamura T, Fujita T, Kishimura

M, Suita K, Hidaka Y, Cai, W, Umemura M, (他 3 名) Vidarabine, an anti-herpes virus agent, protects against the development of heart failure with relatively mild side effects on cardiac function in canine model of dilated cardiomyopathy, *Circulation Journal*, (査読あり) in press, 2016. (IF=4.214)

8. Huiling Jin, Fujita T, Jin M, Kurotani R, Hidaka Y, Cai W, Suita K, Prajapati R, Liang C, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y. Epac activation inhibits IL-6-induced cardiac myocyte dysfunction, *The Journal of Physiological Sciences*. (査読あり) in press, 2016. (IF=2.165)

9. Fujita T, Umemura M, Yokoyama U, Okumura S and Ishikawa Y. The role of Epac in the heart. *Cellular and Molecular Life Sciences*, (査読あり) 74 (4), 591-606, 2016. (IF=5.694)

10. Eguchi H, Umemura M, Kurotani R, Fukumura H, (他) 18 名. A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging, *Scientific reports*. (査読あり) 5 : 9194, 2015. (IF=5.578)

11. Tsunematsu T, Okumura S, Mototani Y, Ohnuki Y, Jin H, Cai W, Suita K, Sato I, Umemura M, (他 4 名). Coupling of β 1-adrenergic receptor to type 5 adenylyl cyclase and its physiological relevance in cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*. (査読あり) 458(3):531-5, 2015. (IF=2.371)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Nakakaji R, Umemura M, Ohtake M, Oda K, Kioi M, Eguchi H, Tohnai I, and Ishikawa Y. An application of a novel intrinsic magnetized paclitaxel for oral cancer. 日本癌学会学術大会、パシフィコ横浜医 (横浜)、2016.10.

2. Kim JH, Eguchi H, Umemura M, and Ishikawa Y. Anticancer anomagnet-loaded Smart Nano-Ensembles for Magneto-Drug Delivery, MRI, and Hyperthermal Cancer Targeting, *AsiaNano*, 2016, 10, 札幌.

3. Ohtake M, Umemura M, Sato I (他 5 名). Simultaneous hyperthermic-chemotherapy using a single anti-cancer compound with intrinsic magnetism in glioblastoma animal model. The 18th ECCO European Cancer Organisation- 40th ESMO

European Cancer Congress Scientific Committee, 2015.9, Vienna, Austria.

4. Sato I, Umemura M, Mitsudo K, (他 8 名). Novel thermo-chemotherapy for oral cancer using a new magnetic anti-cancer drug. The 18th ECCO European Cancer Organisation- 40th ESMO European Cancer Congress Scientific Committee, 2015. 9, Vienna, Austria.

5. 梅村将就, 勝亦真弓, 小田香代子, 佐藤格, 大竹誠, 青山春樹, 江口晴樹, 石川義弘. 市販医薬品の薬効成分の磁性化にむけて. 遺伝子・デリバリー研究会 第 15 回 シンポジウム, 2015.5, 京都薬科大学(京都), 依頼講演.

6. Umemura M, Katsumata M, Sato I, (他 10 名) Methotrexate derivative with intrinsic magnetism. The 106 American Association for Cancer Research Annual meeting, 2015. 4, Philadelphia.

7. Ohtake M, Umemura M, Sato I, (他 8 名) Simultaneous hyperthermic-chemotherapy for glioblastoma using a single anti-cancer compound with magnetism. The 106 American Association for Cancer Research Annual meeting, 2015. 4, Philadelphia.

〔その他〕
ホームページ等
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seiri1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
梅村 将就 (UMEMURA, Masanari)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号 : 50595353

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()

研究者番号 :

(4) 研究協力者
()