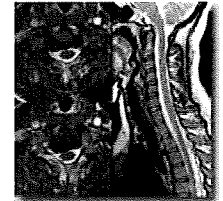


機能的MRI (fMRI) 磁気共鳴画像装置を用いた機能診断



BOLD (blood oxygen level dependent)法

酸化ヘモグロ빈は還元されると磁化率が低下することを利用。

血液中の酸化ヘモグロ빈の量の変化を磁気共鳴信号の強度変化として脳活動を判定。

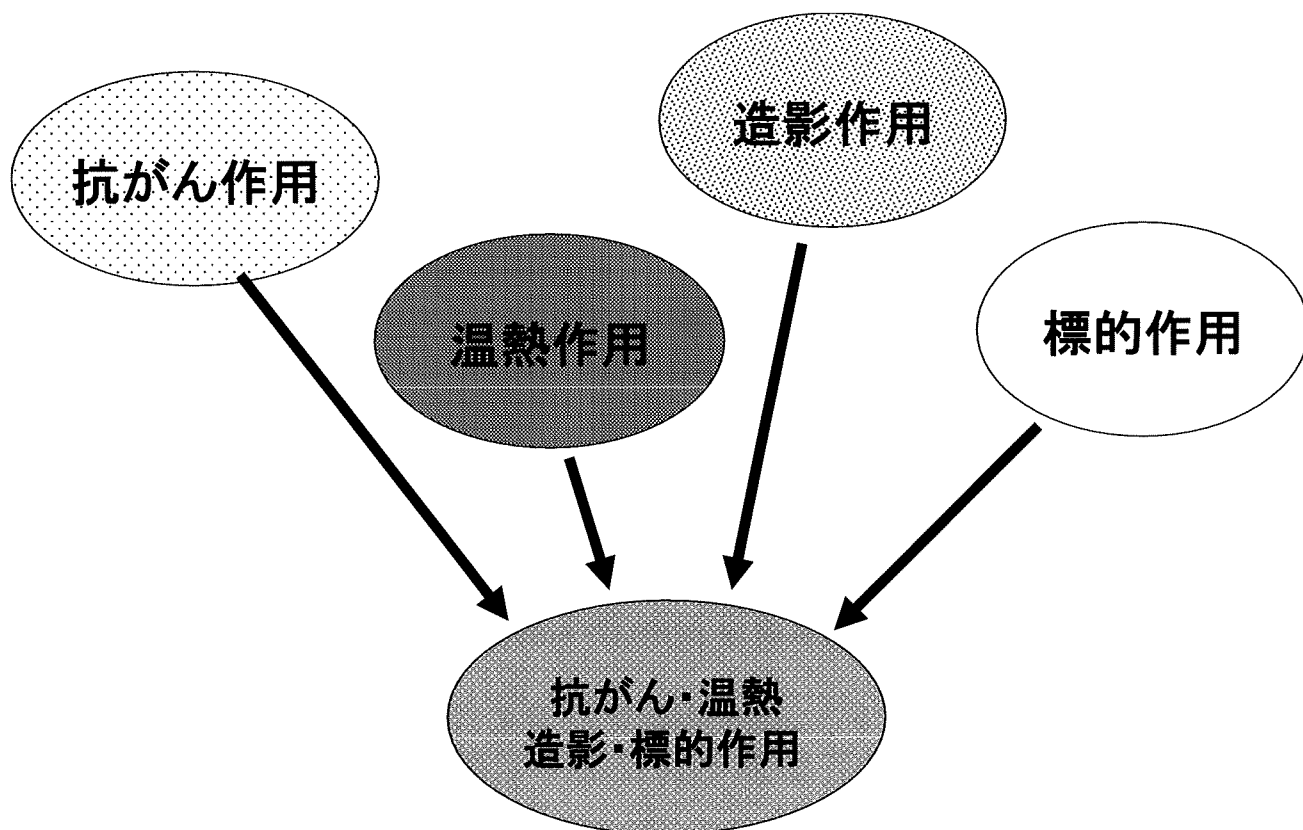
SPIO (super paramagnetic iron oxide) 法

磁性体である酸化鉄を直接利用したもの。

高分子化(デキストラン架橋複合体)させて、肝のKupffer細胞に取り込ませ、網内系を持つ肝腫瘍の質的診断に利用。

いずれも無機の磁性鉄を利用しただけの画像診断

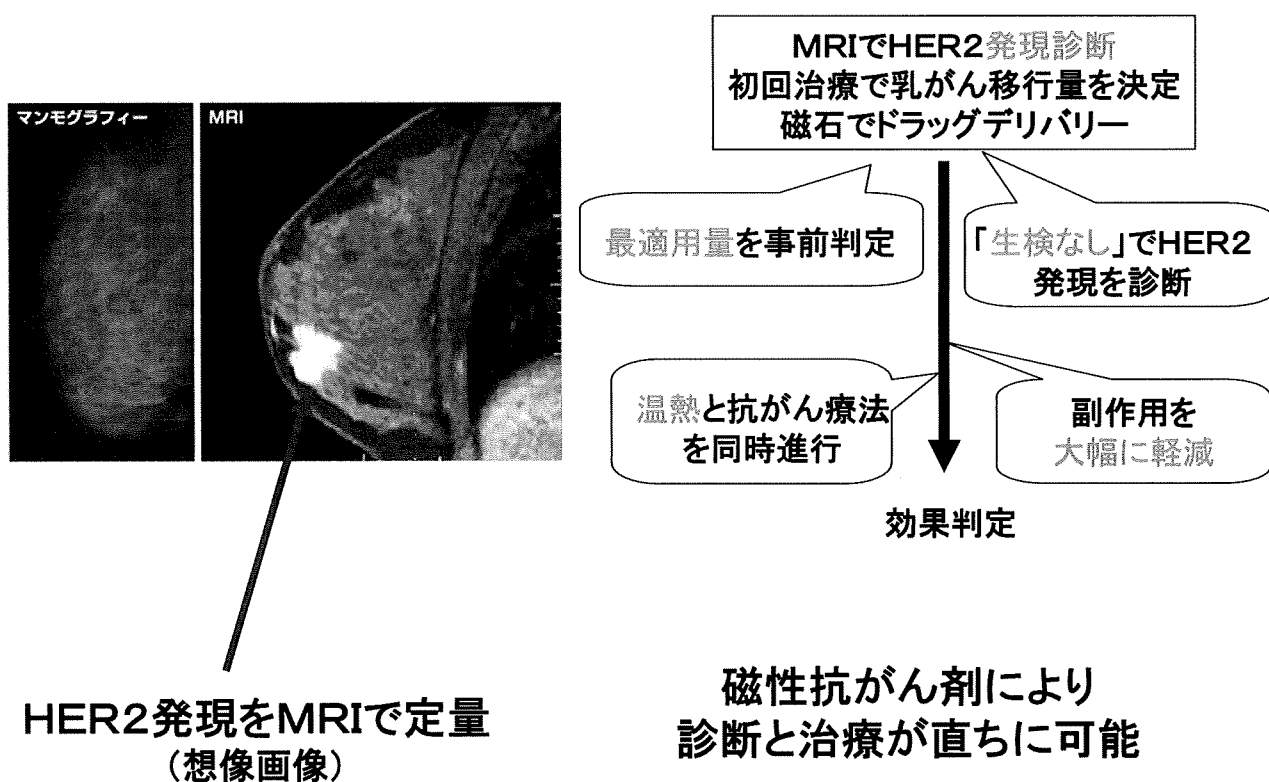
磁性体はすでにMRI診断において、とりわけ機能的なMRIにおいて使用されている。必ずしも機能を持った薬品化合物が磁性材料としてしようされているわけではない。かわって、オキシヘモグロ빈を利用したものや、酸化鉄を造影剤として用いたものが主流である。これらの事実から、磁性体がMRIに有用であることは明らかであるが、造影剤に機能を付加する必要性があり、それによって機能的MRIの応用が飛躍的に広がると考えられる。



4つの機能を持つがん治療

磁性医薬品化合物の医療応用の概念図をしめす。医療用の薬剤が磁性を持つ場合には、自身の持つ薬理作用に加えて（たとえば抗がん作用）、MRIにおける造影作用、磁場誘導を用いた標的作用、さらに交流磁場印加によって起される発熱作用がある。これらの様々な作用をひとつの薬剤化合物がすべて持つことにより、薬理作用の増強が得られることとなる。このことは、抗がん剤であるなら、極めて治療効果の高い安全ながん治療が可能になることを意味している。

磁性ハーセプチン治療



磁性化薬剤による診断と治療の可能性の概念図をしめす。例としてハーセプチンの磁性化化合物をあげる。ハーセプチンはHER2を認識して結合し、乳がんの進展を抑制する。しかるにHER2発現のない乳がん組織に対しては効果を持たない。しかるにHER2の発現は、組織生検によって判定せねばならないため、侵襲的な手術をとらねばならぬ。ハーセプチンを磁性化することにより、MRIにおけるプローブとして使用することが出来れば、磁性ハーセプチンを投与し、乳がん組織へどれだけ移行したかを判定することにより、乳がん組織におけるHER2の発現を定量することが出来る。これにより、生検を行わずにHER2の発現を判定することが出来る。

これまでの抗がん治療

生検によるがん組織診断
ハーセプチンの適応の決定



体重から投与量の決定



1クール後に投与量の再調節



温熱療法は別途施行

磁性ハーセプチン治療

磁性ハーセプチン投与後に
MRIでHER2発現量の決定



最適投与量も同時に決定
転移の有無も同時に決定
温熱療法も同時に開始
ドラッグデリバリーにより
副作用の軽減

診断と治療が
直ちに可能

磁性ハーセプチンによる治療を、既存の抗がん剤治療と比較した概念図である。これまでの抗がん剤治療では、体重から抗がん剤の投与量を決定し、1クール投与後に次回の投与量をきめていく。さらにハーセプチン治療の場合には、組織におけるHER2の発現を生検において決定せねばならないという煩雑さがあった。磁性ハーセプチンを用いることにより、HER2の発現量をMRIで決定すると共に、それに応じた投与量もMRIにおける各組織への移行量を決定して、決めることが出来る。さらに体外からの磁場を用いて、磁性ハーセプチンを乳がん組織に選択的に誘導することも可能となり、抗がん剤の使用量を減らすことが出来る。

トラスズマブの磁性化

HER2への結合を画像化(MRI)



HER2発現(悪性度)を画像診断
遠隔転移を早期診断

乳がんへドラッグデリバリー(磁石)



副作用を軽減

がん組織への移行を定量

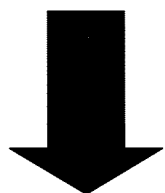


投与量の決定
治療効果の予測

磁性ハーセプチンの総合概念をまとめる。MRIにおいてHER2の結合を画像化できるため、HER2の発現の程度だけでなく、遠隔転移部も判定が可能である。さらに磁性を利用して乳がん組織を標的としたドラッグデリバリーを可能とする。これにより、副作用の軽減化が期待される。さらに組織移行量を判定することにより、各個人における最適投与量を決定することが出来る。いわゆるオーダーメイド抗がん治療が可能となる。

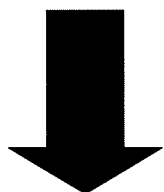
磁性医薬化合物

抗がん剤



MRIで見える

**がん組織への分布
(早期診断)
がん組織への誘導
(早期治療)**

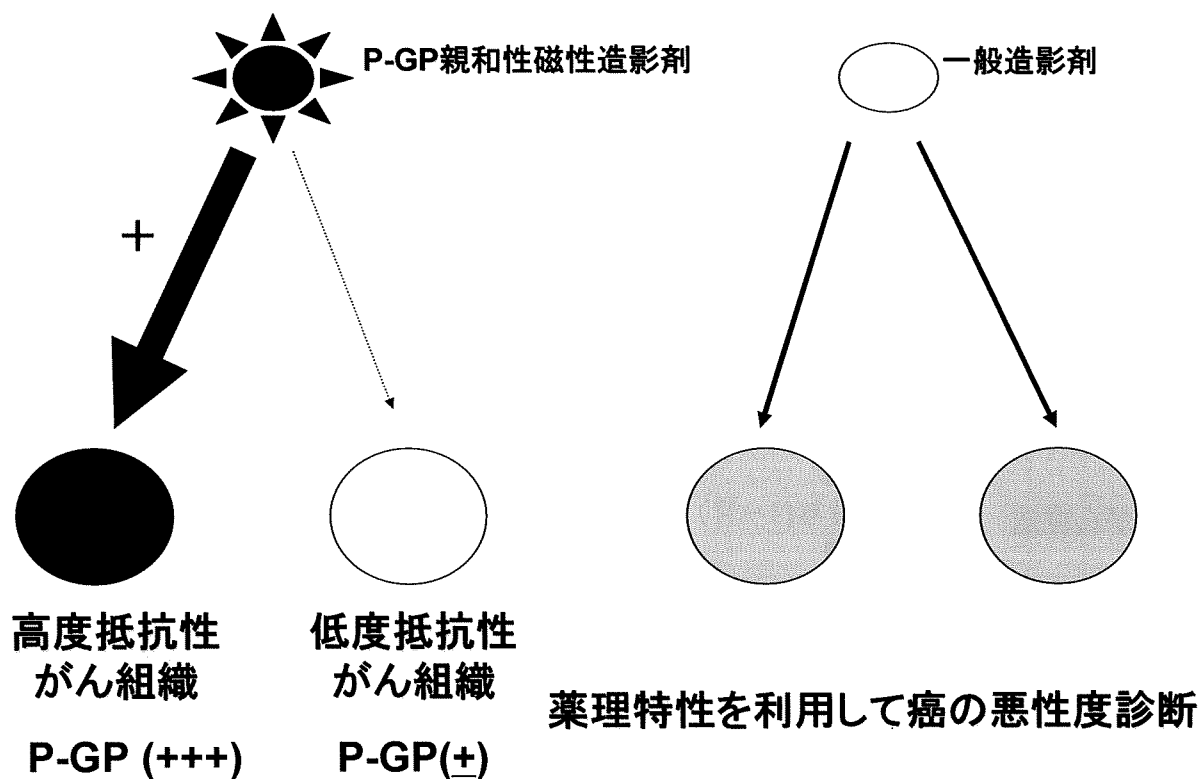


定量・誘導・治療

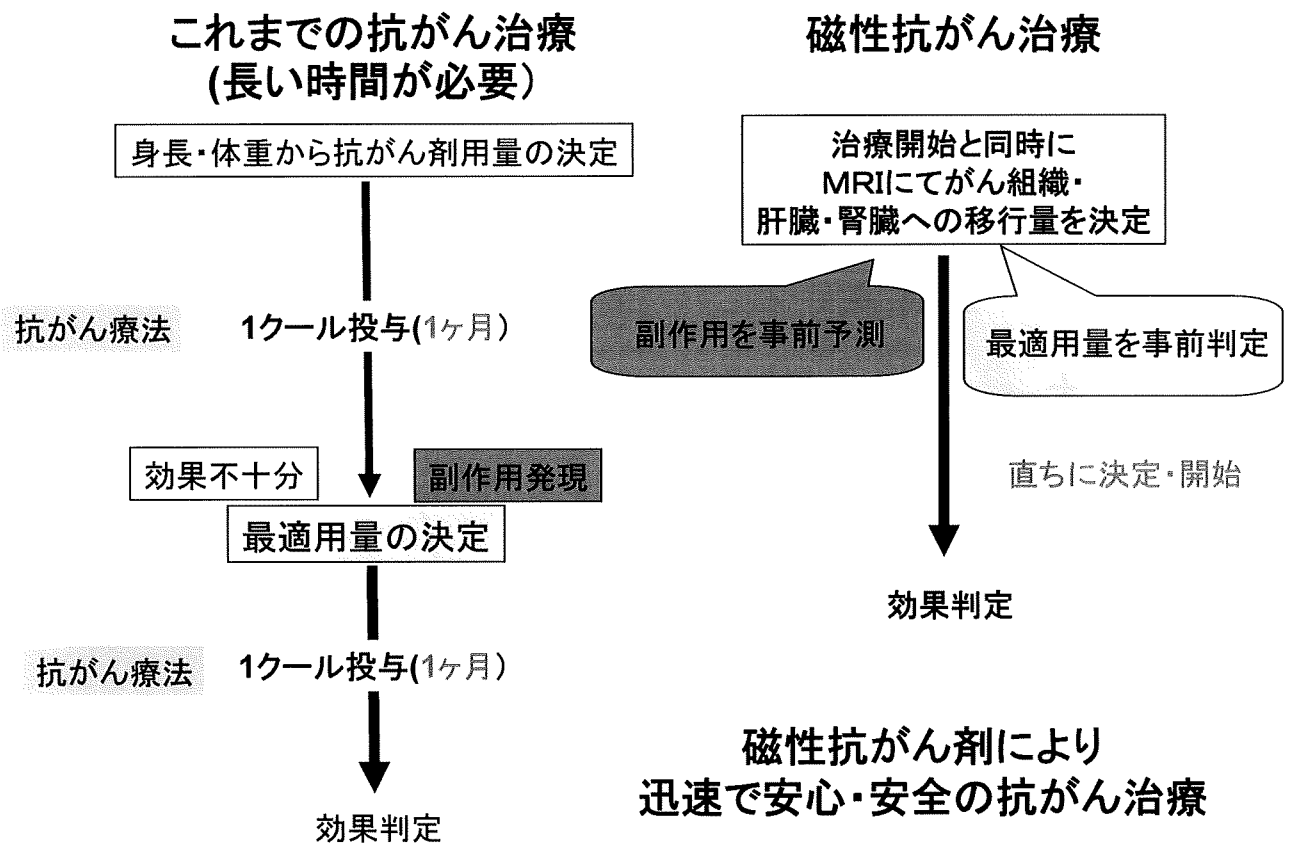
早期診断と治療の一体化

ハーセプチンに限らず、一般的な磁性抗がん剤の利用の概念図である。すべからず抗がん剤を磁性化することが出来れば、がん組織への分布をMRIで判定するだけでなく、がん組織への移行を誘導できる。これによって、早期診断と治療の一体化が可能となる。

機能を有する有機磁性体



推定上の磁性抗がん剤診断約の概念図を示す。P糖蛋白質は抗がん剤の薬剤抵抗性を決定する因子である。この分子蛋白はフォルスコリンと呼ばれる物質を結合することが知られている。そこで、フォルスコリンを磁性化することにより、P糖蛋白質を定量化することができる。すでに既知のがん組織におけるP糖蛋白質の発現量を定量することが出来れば、抗がん剤に対する抵抗性を判定することが出来るため、手術や放射線などの、抗がん治療の選択にも役に立つことが考えられる。



磁性抗がん剤によって、旧来の癌治療がどのように変化するかをまとめたものである。これまでのがん治療は、身長体重から投与量を決定していた。このため年齢や性別あるいは臓器機能を考慮に入れることがないため、しばしば抗がん剤の過量あるいは過少投与を引き起こす。しかるに抗がん剤の効果判定は一般に1クール終了後まで待つことが多いため、クール終了時まで適切な抗がん剤の投与量が決まらない。これががん治療の遅れと不成功の原因となりうる。磁性抗がん剤の使用により、いわゆるクール待ち時間が解消されるため、抗がん剤の投与量の適切な決定が迅速に行われる。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>石川義弘</u>	新規磁性薬剤化合物の画像診断への応用	ナノメディシン研究成果発表会要旨集		35-36	2009
<u>石川義弘</u>	抗がん作用が期待される磁性化合物の磁場による薬剤誘導システムの開発と抗がん剤作用機序の解明	医療機器開発推進研究（ナノメディシン研究）推進事業事業実績報告書		146-149	2009
<u>江口晴樹、石川義弘</u>	第一原理計算による有機機能材料の解析	IHI技報	49	15-21	2009
<u>石川義弘</u>	新規磁性薬剤化合物の画像診断への応用	ナノメディシン研究成果発表会要旨集		33-34	2010
<u>Eguchi H, Iwatsubo K, and Ishikawa Y</u>	Isoform-selective regulation of adenylyl cyclase by forskolin derivatives: Prediction of selectivity by computer-based analysis.	<i>Letters in Drug Design & Discovery</i>	4	434-441	2007
<u>Ishikawa Y, Suzuki S, Ohtsu K, Coskun Ulucan, Iwatsubo K, and Eguchi H:</u>	cAMP-mediated regulation of CYP enzyme and its application in chemotherapy.	<i>Drug and Metabolism Letter.</i>	1	176-178	2007

Shimada C, <u>Kurotani R</u> , Fukumura H, Ono S, <u>Egushi H</u> , <u>Ishikawa Y</u>	Drug Delivery System Using Magnetic Materials	日本病態生理 学会雑誌	第 1 8 卷 第1号	2 1 - 2 4	2 0 0 9
---	---	----------------	----------------	-----------	---------

新規磁性薬剤化合物の画像診断への応用

研究代表者：横浜市立大学大学院 医学研究科長 教授 石川 義弘

研究目的：

磁性物質は無機化合物（いわゆる磁石）というのが旧来の常識であった。ところが、エレクトロニクス材料分野では、理論物理学的な手法を用いて、「磁性を持った有機化合物」が多数研究され、合成・報告されている。しかるにこれらはまだ医療に応用されていない。そこで本研究では、MR等の画像診断に有効な薬剤化合物を対象として、磁性の検討をおこない、同定された磁性薬剤化合物をMR画像診断における“機能を持った造影剤”として開発し、ハード面を含めて新しい機能画像診断法として確立していくことを目的とする。

方法：

- 1) 超伝導の金属材料などの評価に使用されている第一原理解析法を用いることにより、一般有機化合物の磁性評価を可能にする技術を検討し、一般化合物の磁性分析を行うとともに、磁性化合物を設計する方法を開発した。
- 2) 同定された磁性化合物の中から薬理作用（抗がん作用）を有するものを用いて（EI236）、細胞および動物実験で薬理効果を検討した。
- 3) 同様に磁性を利用して永久磁石による誘導が可能であるかを、細胞および動物実験で検討した。
- 4) MR造影剤機能を検証するために、ファントム実験および動物モデルにおいて造影効果を検討した。

結果：

- 1) 第一原理解析法の応用により、既存の医薬品を含めた設計ライブラリーから、複数の磁性化合物が選定された。同化合物に対して、超伝導量子干渉素子を用いて、広範な温度環境下において磁性測定を施行して磁場磁化曲線を作成、極低温状況のみならず37度を中心にマグネタイトに匹敵する磁性強度をもつことを確認した。
- 2) 培養がん細胞およびマウスに移植した腫瘍に対して、磁性化合物 EI236 を投与し、がん細胞の増殖抑制を確認した。
- 3) さらに培養液中に同化合物を添加し、局所的に永久磁石を作用させることにより、同化合物の持つ薬理効果が、磁石を作用させた局所に集積することを増殖抑制効果によって確認することができた。また、マウス生体の尾部に腫瘍を移植し腫瘍モデルを作成し、同化合物を経静脈的に投与を行うとともに、尾部に永久磁石を作用させることにより、腫瘍の退縮を得ることに成功した。
- 4) いっぽうでMRにおけるファントム実験において、同化合物のMRシグナルが濃度依存的に上昇することを確認すると共に、T1およびT2などの測定の諸条件の検討を行った。これらの検討結果を元に、前述の尾部腫瘍モデルにおいて、マウスに同化合物を経静脈的に全身投与した後に、永久磁石を尾部腫瘍に作用させたところ、マウス尾部に同化合物が集積し、MRシグナルの増強として造影された。

以上の結果から、同化合物は磁場によって誘導可能な抗がん剤であり、MRの造影剤として機能することがわかった。

考察：

一般材料化合物の分野ではすでに多数の有機磁性体の報告があるが、我々は薬理作用を有する有機磁性体の設計・選定をおこない、医療における実用化の検討を行った。同化合物における物理的特性としての磁性は、超伝導量子干渉素子によって詳細に検討され、37度という高温状態においても磁性を失わないことが証明されたことは特筆に価すると考えている。さらに同化合物が、単に物理的に磁性体と同定されただけでなく、抗がん剤としての薬理効果を持ち、その効果が磁性によって制御可能であることが培養細胞のみならず生体においても実証された。このことは生体に応用可能な薬理機能を有した磁性化合物であることを示している。

最も重要な本研究プロジェクトの目的である MR 造影剤の開発に際して、同化合物がファントム実験および動物実験によってMR造影剤として作用することが実証されたことは、機能をもった磁性有機化合物が、薬理機能を有したまま MR 造影剤として機能しうることを実証したことにもなる。このことは生体内における抗がん剤の局所集積を MR によって定量できる可能性を意味する。

本研究は3年目を迎えようとしているが、初年度は概念的な物理事象にすぎなかったものが、本年度には、少なくとも動物モデルにおいては、実現可能な抗がん剤兼 MR 造影剤であることがわかってきた。このことは現在の体表面積のみで決定されている抗がん剤の治療戦略にも大きな進歩をもたらす可能性があるとともに、同様の薬剤開発によって今後の薬物治療自体にも大きな影響を及ぼす可能性がある。

研究実績〔中間〕報告書

1. 流動研究員氏名 大津 恒治
2. 流動研究員期間
 平成 20年 7月 1日 ～ 平成 21年 3月 31日
3. 受入機関
 名 称：公立大学法人 横浜市立大学
 所在地：神奈川県 横浜市 金沢区 福浦3-9
4. 受入研究者
 所 属：公立大学法人 横浜市立大学 医学部 循環制御医学
 職 名：教授
 氏 名：石川 義弘
5. 研究課題：抗がん作用が期待される磁性化合物の磁場による薬剤誘導システムの開発と抗がん作用機序の解明
6. 研究活動の概要

平成20年7月1日より上記4の研究指導者の下において抗がん作用が期待される磁性化合物の磁場による薬剤誘導システムの開発と抗がん作用機序の解明に関する研究課題に関し、特に動物に接種した腫瘍への磁性化合物の磁場による誘導とその腫瘍縮小効果の検討に関する研究を開始した。

背 景

磁性を有する薬剤の発見と医学分野への応用は、これまでの磁性物質をキャリアーとして使用するドラッグターゲッティング法の問題点である分子サイズの巨大化やキャリアーと薬物との結合性・親和性の問題を解決する画期的な方法である。

そこで、横浜市立大学循環制御医学講座では第一原理を用いた分子モデルのスピン電荷密度分析により、物質の磁性強度を予測する計算式を確立した。第一原理解析法とは量子力学を厳密に適用した解析法であり、原子レベル(オングストローム： 10^{-10}m)の解析法を用いて、原子位置と電子構造を同時にかつ動的に解析するものである。確立された計算式によって物質の磁性強度予測、および酵素蛋白と化合物の相互作用の予測が可能となった。これにより、低コストで迅速な新規化合物の活性予測が可能になった。既にこの計算式によって、2,000の

既存の薬剤の磁性強度をスクリーニングし、その中から特に磁性強度の高い物質を見出している。

目 的

抗がん剤は両刃の剣であり、癌組織を殺すこともできるが、正常組織にもダメージを与えて副作用を引き起こし、癌患者は抗がん剤の副作用で死ぬことがある。もしも癌組織だけに抗がん剤を狙い定めることができ（たとえば磁石を用いて）、正常組織には行かないようにできれば、抗がん剤による副作用を軽減できる。つまり磁場を用いたDDSが可能となる。

横浜市立大学循環制御医学講座は「薬を磁性化する技術」（薬が磁石にくっつくようにする）を持ち、この技術の開発と応用は横浜市立大学循環制御医学講座の石川義弘教授と外部企業の物理学者が長年開発してきた研究テーマであり、すでに多数の独占的技術特許を生み出している（国際特許出願を含めて9件）。この技術および研究成果を癌治療薬への応用を目的とし、「安心安全の医療開発」および「大学の研究成果の社会還元」を理念として本研究は開始された。

活動内容

私は、活動開始以前から既にこの磁性を有する化合物の抗がん効果を細胞培養系において確認しており、目的の磁性化合物を培地中に添加後、培養皿の一点に磁石で誘導した時、磁石の近傍磁界に存在する細胞の増殖抑制を確認した。そこで、増殖抑制メカニズムを解明するために、9種の細胞株（メラノーマ、前立腺癌、肉腫など）に対する増殖抑制効果を細胞培養系にて明らかにし、磁性化合物がアポトーシスを誘導することを明らかにした。同時に確立した腫瘍モデルマウスを利用して目的の磁性化合物が磁場誘導により腫瘍細胞に集積されることを、MRIやESRで検出するとともに、抗がん効果として腫瘍の有無とサイズを肉眼的、および病理学的に解明する為の研究が進んできている。

1) 増殖抑制メカニズムの解明

培養細胞系において磁性化合物による細胞傷害性を、MTTアッセイによる細胞数の計測により評価した。1mg/ml Poly-L- Lysine (Wako, 大阪) で 24時間コートした24 穴プレートに、各細胞を1穴当たり 2×10^4 個播種した。R3327-MAT-Lu、R3327-AT2.1、R3327-AT6.1、VX2、SK-MEL-24、Pos-1、AJ750を37℃、5% CO₂条件下で24時間培養し、R3327-G、Clone M3を48時間培養した。磁性化合物刺激群として1.8 μ M、3.6 μ M、7.5 μ M、15 μ M、30 μ Mの磁性化合物で細胞を刺激した。この時に対照群として10 μ Mの磁性化合物類似構造体で刺激した。R3327-AT2.1、R3327-AT6.1、VX2、SK-MEL-24は12時間、R3327-MAT-Lu、R3327-G、Clone M3、Pos-1、AJ750は24時間の刺激後、MTT アッセイを行った。

また、磁性化合物によるDNA断片化の検討をDNAのニックを検出するTUNEL法にて行った。各細胞を8穴ガラスチャンバースライド（ヌンクインターナショナル、東京）の各穴に 1×10^4 個播種し、24時間培養後、1.8 μ M、3.6 μ M、7.5 μ M、15 μ M、30 μ Mの磁性化合物で24時間刺激し、その後核染色を行い蛍光顕微鏡にて無作為に12視野を選び3000-5000個の細胞数を計測し、アポトーシスの割合を測定した。

MTT アッセイによる細胞数の計測によって磁性化合物の細胞傷害性を検討した結果、前立腺癌細胞株では、磁性化合物の感受性が高い細胞株と感受性が低い2種類の細胞株の存在が明らかになった。R3327-MAT-Lu (MAT) と R3327-G (G) は磁性化合物感受性細胞株であり、生細胞率が50%であるIC₅₀値は、MATで4.37-6 μ M、Gでは8-9 μ Mであり、1.8-30 μ Mの磁性化合物で

24 時間刺激した時、濃度依存的に生細胞率が減少した。さらに、その細胞傷害性が磁性化合物の類似構造体の影響でない事を明らかにするため、 $10\mu\text{M}$ の類似構造体での影響を検討した。この結果、MAT では 95.5%、G では 87.9% の生細胞率が確認され、類似構造体による有意な生細胞率の減少は認められなかった。一方、R3327-AT2.1、R3327-AT6.1 に対し、 $1.8\mu\text{M}$ - $30\mu\text{M}$ の磁性化合物では 80% 以上の生細胞率が確認され、この濃度域における細胞傷害性は認められなかった。

さらに、Clone M3、VX2、Pos-1、AJ750 細胞では磁性化合物の感受性が認められた。しかし、SK-MEL-24 では磁性化合物感受性は認められなかった。Clone M3、VX2、Pos-1、AJ750 の IC_{50} 値は、それぞれ $40\text{--}50\mu\text{M}$ 、 $5\text{--}6\mu\text{M}$ 、 $12.5\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ であったことから、AJ750 が最も高い磁性化合物感受性細胞株である事が明らかになった。さらに、 $10\mu\text{M}$ の類似構造体での刺激により、Clone M3、VX2、Pos-1、AJ750 での個々の生細胞率は 90%、99.65%、88.73%、83.09% であり、類似構造体による有意な生細胞率の減少は認められなかった。

加えて、DNA 断片化を検出する目的で TUNEL を行った結果、濃度依存的に TUNEL 陽性細胞数は増加した。また、DAPI の核染色の結果、核の多形化や異型化が観察された。

2) 腫瘍モデルマウスにおける磁性化合物の磁場誘導の検討

生理食塩水で調製した磁性化合物をラット及び、マウスの尾静脈より投与 (50mg/kg) し、磁場印加 (650mT) によりマウスの尾に磁性化合物を集積させた。具体的には直径 20mm の平面をもつ円柱形のネオジウム磁石 (650mT) をマウスの尾に固定し、10 分毎に 5mm ずつ移動して計 6 回移動の後、1 回目に局所集積していた部位に戻り同方向に再び 6 回移動する方法で計 3 時間磁場を印加した。

磁性化合物投与後、磁場印加後に切断したマウスの尾を 4%PFA にて 4°C で 17 時間固定し、自動固定包埋装置とパラフィン溶解/包埋装置を用いてパラフィnbロックを作製した。滑走式 (ユングの) ミクロトーム (Leica Microsystems Japan, 東京) で尾組織表面を削ぎ、 65°C の条件でパラフィンを除去した。続いてレモゾール A で尾組織内のパラフィンを溶解し各 2 時間 (3 回)、100% エタノールで 1 時間 (2 回)、70% エタノールで 1 時間浸水させ、超純水で洗浄した。その後、特殊染色液で反応させた結果、強磁場な部位に顕著な陽性反応が検出された。そこで、上記の方法を用いて Clone M3 細胞をマウス尾の皮下に移植して作製した腫瘍モデルを用い、磁性化合物 (50mg/kg) を静脈より投与後、磁場印加による薬剤送達を 12 日間行ったところ一様な腫瘍の縮小効果を認めた。

磁性化合物は、磁性体であるため MRI での薬剤送達の検出が可能である。そこで、動物に移植した腫瘍への磁場印加によって、送達された磁性化合物を検出するために MRI 撮影を行った。MRI 撮影は NMR (AV300M&AV400M デジタル NMR) (ブルカー・バイオスピン株式会社、茨木) を用いて $\text{T1} : \text{TE/TR} = 8.2/700\text{ms}$ 、 $\text{T2} : \text{TE/TR} = 12.5/2000\text{ms}$ 、 $\text{T2}^* : \text{TE/TR} = 8/200\text{ms}$ の条件で行った。具体的にはマウス尾に磁場を印加後、 150mg/kg の磁性化合物を静脈投与して局所集積させた。対照群として同時刻にマウス尾静脈から生理食塩水を投与した群と、先述と同濃度の磁性化合物をマウス尾静脈より投与後、磁場印加を行わない群を作製した。局所集積後、尾を結紮し切断後、

切断面を接着剤で止血した。撮影の為に、マウス尾をプラスチック板に固定して1.5%アガロースゲルで包埋後、撮影した。その結果、磁性化合物のファントム像からは、T1とT2のどちらの条件でも同様な撮影像が得られた。また、緩和時間は磁性化合物の0-1.25mg/mlの濃度範囲でT1: TE/TR=8.2/700ms、T2: TE/TR=12.5/2000ms、T2*: TE/TR=8/200msを決定した。また、磁性化合物はT2強調で低調な信号として検出された。上記の撮影条件下で、150mg/kgの磁性化合物を1回尾静脈よりマウスに投与し、移植した腫瘍への磁場印加によって磁性化合物を集積させ、MRI撮影を行った結果、特にT2*の撮影像で印加磁束密度が最も高い領域と接触させた腫瘍部位に顕著な低調な信号を観察することが出来た。

今後さらに磁性化合物を開発を進めて行くためには、磁性化合物の単結晶構造解析等を終了させ、構造の改良を行わなければならないなど課題は多い。細胞系の実験結果より、他の抗癌剤同様、細胞種によっては磁性化合物の感受性が認められなかったことから、その原因を解明する必要もある。また、磁性化合物が他の抗癌剤と併用した場合に相加・相乗効果が見られるので、磁性化合物を担体として利用する事で、DDSの他、結合した薬剤との相加、相乗作用による効果的な癌治療薬として利用可能であると考ええる。

現在実験に使用している永久磁石は、一般に使用されている磁石と比較すると強力であるが、動物実験で使った永久磁石の磁束密度ではマウス深部癌へのDDSは困難であることが明らかになっており、臨床応用には、安全に使用でき、深部癌に薬剤を送達可能な磁石の開発も必須であると考えられ、これらの開発については外部の大学の磁場の専門家と共同研究という形で協力を得て、横浜市立大学病院の整形外科により臨床的な立場からの意見を取り入れながらの研究が現在進められている。

7. 当該年度の流動研究員期間中に学会誌等に発表した論文(Publication List)

なし

第一原理計算による有機機能材料の解析

Analysis of Organic Functional Materials by First Principles Calculations

江 口 晴 樹 技術開発本部基盤技術研究所応用理学研究部 主幹 博士 (工学)

石 川 義 弘 横浜市立大学大学院医学研究科 教授 医学博士

ニュージャージー州立大学医学部客員教授・同大学附属病院指導医

物理化学で標準的に使われている第一原理計算を有機機能材料分野に適用した。最初に自律神経調整薬、フォルスコリン誘導体の活性評価を行い、負の静電ポテンシャルが薬剤探索の期間短縮に重要であることを明らかにした。次に、磁場誘導ドラッグ・デリバリー・システムに用いる有機磁性体の解析と実証実験を行った。本解析で見いだした EI236 は、磁場誘導可能な抗がん剤として機能するだけでなく MRI 造影剤としても機能する。第一原理計算による材料解析技術は、有機機能材料の分野にも適用可能である。

First principles calculations, such as the standard method of designing functional materials, are applied to an organic functional material. Firstly, activity evaluations of an autonomic nerve controlled drug, such as forskolin derivatives, can be predicted by the distribution of the negative electrostatic potential of each derivative. The method can dramatically shorten drug screening time. Secondly, an organic magnetic material for the magnetic targeted drug delivery system is identified through first principles calculations. Our identified compound, such as EI236, acts as both an anti-tumor drug and an MRI contrast medium, and has pharmacological effects that can be delivered in a controlled manner. Therefore, materials analysis technology using first principles calculations can be also applied to organic functional materials.

1. 緒 言

すべての原子は原子核とそれを取り巻く電子から構成されており、材料の性質は電子の分布とそのエネルギー状態で決定される。そのため、電気を通す、または光を発する有機機能材料などの特殊な機能をもった材料開発では、それらの機能を十分に発揮させるため原子レベルから材料設計を行うことが重要である。したがって、従来の経験的な方法に代わり量子力学が有効なツールとなる。なぜなら、材料の電気的特性、磁性、光学特性などを支配する原理は原子レベルの世界を記述できる量子力学だからである。

上記の方法は物理化学の世界では標準になっている第一原理計算と呼ばれ、実験パラメータなどを一切参照せずに物質の特性を解析する方法である。しかし、量子力学の基本方程式であるシュレディンガー方程式を直接解くことは困難であるため近似法を用いる必要がある。私たちが身近に接する材料は 1 モル程度の数（たとえば 10^{23} 個）の原子核とそれを取り囲む電子から構成され、物質構造や性質はこれらの電子の運動状態によって支配される。しかし、 10^{23} 個の原子を取り巻く電子状態をすべて知る必要はない。シュレディンガー方程式に近似を導入することによって、注目する電子とそれ以外の全電子とすべての原子

核がつくる場を考えることができる。これは、密度汎関数法と呼ばれ、1998 年に W. Kohn がこの理論の提唱と発展でノーベル化学賞を受賞している。当社ではこのような機能材料の探索と改良を効率的に行うため、密度汎関数法に基づく第一原理計算に基づき硬質材料の設計、次に熱電材料、発光素子、光触媒に取り組んできた。本方法はもともと無機機能材料と呼ばれている分野を中心に使われている方法であったが、コンピュータの能力向上とアルゴリズムの高速化によって最近では計算する原子数が多い有機機能材料の分野でも使われるようになり始めた。本稿では有機機能材料分野の解析の一例としてコンピュータ解析の導入が最も進んでいる創薬分野への適用について述べる。

新薬開発プロセスにおいては、迅速かつ低コストで、薬候補化合物の検索をしていくことが鍵である。特に、特定のリードコンパウンド（新薬）がすでに存在する場合、それを基に多数の類似化合物を合成し、その活性をさらに比較検討することによって、より効果の高い化合物（改良新薬）を決定していくことになる。製薬企業にとって、改良新薬の開発は、独自の新薬の開発よりは低リスクであるが、多大なる開発コストが必要になる。これは現在の改良新薬スクリーニングにおいて、数百におよぶ改良新薬の候補化合物を実際にスクリーニングしなければならないか

らである。そこで、数百におよぶ改良新薬候補化合物を、共通特性に応じて 10 分の 1 以下に短縮できれば、スクリーニングの速度は 10 倍に加速されと考えられる。したがってその共通特性をどのような解析方法によって決定するか、あるいはそのような解析方法が存在するかという問題があった。これらの問題を解決するため第一原理計算を用いて酵素蛋白を制御する化合物であるフォルスコリン誘導体の活性評価の解析を行った。

次に、磁場誘導によるドラッグ・デリバリー・システム (DDS) に必要な有機磁性体の探索と発見した有機磁性体の評価試験を実施した。薬の投与においては、体全体すなわち患部だけではなく健全なところにも作用するため副作用が発生する可能性がある。この問題の解決策の一つとして、薬を患部にだけ選択的に運搬して作用させる手法、DDS がある。DDS が実現すれば、現在は副作用が大きくて使用が難しい薬も、安全に使用できる可能性が高まり、さらに薬剤を患部へ効果的に運び、かつ薬剤濃度を局所的に高めることで薬理効果を向上することができる。磁場誘導による DDS の研究は古く約 30 年前から行われている。従来の DDS は薬と担体であるキャリア (例えば、ナノサイズの微粒子に薬を混合したもの) のシステムであるが、分子サイズの巨大化、あるいはキャリアと薬との結合性や親和性に問題があった。そこで、キャリアを使わず、かつ薬効を落とさない DDS を検討し、有機磁性薬について解析的検証と新規候補剤の分子設計を試みた。可能性が出てきたのでその成果について報告する。

2. 自律神経調節薬 (フォルスコリン誘導体) の活性評価⁽¹⁾

フォルスコリンはインド地方にあるシソ科の植物である。古代ヒンズー医学書には心臓病、呼吸疾患、腹痛、排尿病、また不眠やひきつけなどの中枢神経系の病気にも効果があるとされている。近年になってこの生薬はアデニル酸シクラーゼと呼ばれる酵素蛋白質に結合することで活性化する⁽²⁾ことが分かってきた。石川ら⁽³⁾は、フォルスコリンの生理活性の向上と疎水性から親水性へ性質を変えるため側鎖修飾を行い、それらを「心不全治療薬」、「やせ薬」などへの開発を行っている。従来の方法は酵素蛋白とその制御化合物の相互作用を古典的な方法 (多数の化合物をランダムに合成し、それを酵素反応実験でスクリーニング) で検索することを行い、得られた計算結果をもとに、コンピュータで立体構造を解析し、化合物と酵

素蛋白とのフィッティング・シミュレーション (ドッキング・シミュレーションとも呼ばれる) によって、リードコンパウンド (新薬) の決定を行ってきた。

ところがこれらの方法では、初期リードコンパウンドの決定は行えるが、そこからさらに複数の類似化合物の合成を行い、より有効な化合物 (改良新薬) を検索するプロセスは極めて困難である。これは現在の創薬プロセスの共通問題点であり、標的酵素蛋白を効果的に制御し得る化合物は、どのような化学的あるいは構造的共通特性があるかを検討する方法の開発が必要とされている。

これに対して、標的酵素蛋白の結晶立体構造を利用したコンピュータ・フィッティングの技術が浸透しつつあるが⁽³⁾、これは立体構造からの解析であり、かならずしも正確な予測が可能ではない。なぜなら標的酵素蛋白と目的化合物の相互作用の近似が十分でないからである。したがって改良新薬の開発においては、コンピュータ・フィッティングの有効性が限定されるという欠点がある。改良新薬の候補化合物を同定するに当たっては、従来と異なった手法の導入が必要とされている。

従来法では種類の異なるアデニル酸シクラーゼを選択的に刺激し活性化することで自律神経を調節するためのフォルスコリン側鎖の同定は可能であるが、側鎖修飾の種類解析には不適であった。そこで化学的な側鎖修飾が異なる場合、これらの間にどのような共通性があるのかを第一原理計算で行った。静電ポテンシャルの分布、HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) と LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) の波動関数分布、福井関数の分布を調べた結果、静電ポテンシャルがフォルスコリン誘導体の薬理活性に大きく影響を及ぼしていることが明らかになったので報告する。

本研究で用いた第一原理計算はすべて密度汎関数法によるものである。電子とイオンの相互作用についてはすべての電子を考慮する全電子法 (All electron method) を用いている。波動関数はスピン分極型の線形結合型の原子軌道 (Liner Combination of Atomic Orbitals : LCAO) で分極関数を追加した 2 重数値基底関数 (Double Numerical basis-set including Polarization function : DNP) を使用し、計算精度を損なうことなく計算速度の高速化をするため上記基底関数のカットオフは 0.4 nm に設定している。交換相互作用項は、Becke, Lee, Yang, Parr^{(4),(5)}によるものを用い、使用ソフトはアクセルリス社の DMol3⁽⁶⁾を用いた。

計算を行ったフォルスコリン誘導体の化学構造式を第 1 表に示す。アデニル酸シクラーゼは構造と機能が異なる 9 種類のサブタイプが存在し肺の自律神経の制御に関係している酵素蛋白を II 型アデニル酸シクラーゼと呼び、それを選択的に刺激し活性化する化合物として FD1 と FD2 を解析した。同様に嗅覚の自律神経の制御に関係している III 型アデニル酸シクラーゼを刺激し活性化する化合物としては FD3 と FD4、心筋の自律神経の制御に関係している V 型アデニル酸シクラーゼを刺激し活性化する化合物としては FD5 と FD6 を解析した。

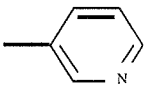
9 種類あるサブタイプのアデニル酸シクラーゼの中から特定のものを識別し酵素反応を起こすフォルスコリン誘導体の活性度、すなわち特異性を調べるため、フォルスコリン誘導体の静電ポテンシャルを計算した。静電ポテンシャルは負の電荷と正の電荷で表される。たとえば、正の電荷部分をもつフォルスコリン誘導体は負の電荷部分をもつアデニル酸シクラーゼと結合する。

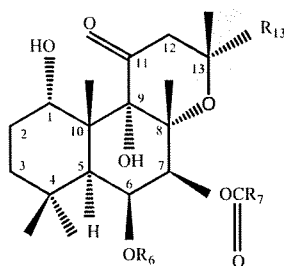
静電ポテンシャルの等電位面を第 1 図に示す。正の等

電位ポテンシャルは青色、負の等電位ポテンシャルは黄色であらわされている。図示した電位面は正の等電位ポテンシャルは -5.880×10^{-4} eV、負の等電位ポテンシャルは -5.880×10^{-4} eV である。

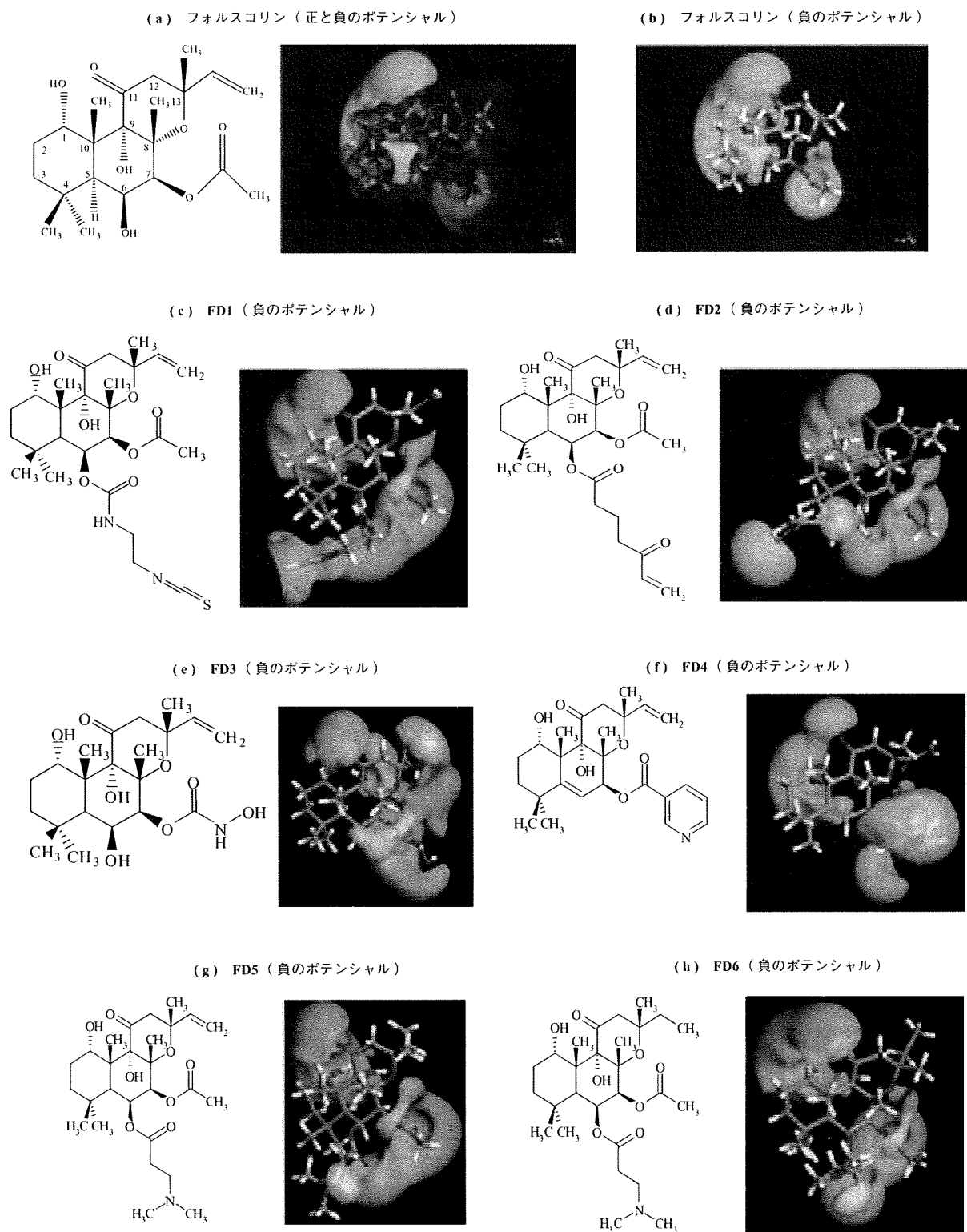
第 1 図 - (a) にあるように計算したすべてのフォルスコリン誘導体の正の静電ポテンシャルは分子全体に広がるのが特徴であり、負の静電ポテンシャルは二つの領域に分かれているのが特徴である。正の静電ポテンシャルについてはどのフォルスコリン誘導体についても同じであった。これは正の静電ポテンシャルがアデニル酸シクラーゼの選択性に影響を与えていないことを示唆する。しかし、負の静電ポテンシャルについては大きく異なることが明らかになった (第 1 図 - (c) ~ - (h))。たとえば、II 型のアデニル酸シクラーゼを刺激する FD1 と FD2 の負の静電ポテンシャルは第 1 図 - (c)、- (d) にある C6、C7 (第 1 図 - (a) の化学構造式の 6 員環の内側にある数字を指す) の裏側に広がっているのが特徴である。しかし、C7 部分の表側に少し分布しているのも特徴である。これは、II

第 1 表 フォルスコリン誘導体の化学構造式
Table 1 Chemical structure of forskolin and its derivatives

化合物名	位 置			選択性
	R ₆	R ₇	R ₁₃	
Forskolin	H	CH ₃	CH=CH ₂	無
FD1	CONHCH ₂ CH ₂ NCS	CH ₃	CH=CH ₂	Type II AC
FD2	COCH ₂ CH ₂ CH ₂ COCH=CH ₂	CH ₃	CH=CH ₂	Type II AC
FD3	H	NHOH	CH=CH ₂	Type III AC
FD4	5,6-dehydroxy		CH=CH ₂	Type III AC
FD5 NKH477	COCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	CH ₃	CH=CH ₂	Type V AC
FD6	COCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	CH ₃	CH ₂ CH ₃	Type V AC



(注) 本文使用したフォルスコリン誘導体の側鎖の R₆, R₇, R₁₃ の略語は表に示しているとおりである。
 FD1, 6-[N-(2-isothiocyanatoethyl) aminocarbonyl] forskolin;
 FD2, 6-(4-acrylbutyryl) forskolin;
 FD3, 7-deacetyl-7-hydroxamylforskolin;
 FD4, 5,6-dehydroxy-7-deacetyl-7-nicotinoylforskolin;
 FD5, 6-[3-(dimethylamino) propionyl] forskolin (NKH477);
 FD6, 6-[3-(dimethylamino) propionyl] -14 15-dihydroforskolin.
 R₆, R₇, R₁₃ の各位置は表の下の方の化学構造式のとおりである。



第 1 図 フォルスコリンとその誘導体の静電ポテンシャル図
Fig. 1 Isosurface of electrostatic potential of forskolin and its derivatives

型アデニル酸シクラーゼの正の静電ポテンシャルと FD1 と FD2 の C6, C7, R₇ の裏側と相互作用していることを意味している。III 型のアデニル酸シクラーゼを刺激する

FD3 と FD4 は第 1 図 - (e), - (f) にあるように負の静電ポテンシャルは C7 の全体を覆うように広がっている。これは III 型アデニル酸シクラーゼの正の静電ポテンシャル