

令和元年6月20日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01392

研究課題名(和文) 抗癌剤配糖体とバイオナノカプセルによる肝細胞癌治療のための能動的薬物送達システム

研究課題名(英文) Anticancer-agent glycoside conjugates incorporated in bio-nanocapsules for hepatocellular carcinoma treatment

研究代表者

下田 恵 (Shimoda, Kei)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40284153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトB型肝炎ウイルス表面抗原L蛋白質が酵母小胞体由来のリボソームに埋め込まれた構造のバイオナノカプセルは、肝細胞へ集積する特性をもつ、有用な薬物キャリアである。本研究では、バイオナノカプセルに抗癌剤誘導体を封入したDDS製剤の開発を行った。タキソールにグリコール酸を介してグルコシドを結合した配糖体誘導体を合成し、更にシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを用いるオリゴサッカライド合成により、タキソールのトリサッカライド誘導体を得た。バイオナノカプセルに、タキソールのトリサッカライド誘導体を封入した、肝癌細胞株に対する高い抗癌活性を持つ肝細胞癌治療用の薬物送達システム製剤の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトB型肝炎ウイルス表面抗原L蛋白質が酵母小胞体由来のリボソームに埋め込まれた構造のバイオナノカプセルは、肝細胞へ集積する特性をもつ有用な薬物キャリアであるが、抗癌剤を輸送することが困難な問題がある。本研究では、タキソール等の抗癌剤に、グリコシドを結合させた、タキソール誘導体を開発し、バイオナノカプセルへ封入した、肝癌細胞株に対する高い抗癌作用を持つ、肝細胞癌治療に有効な薬物送達システム製剤を開発した。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus surface antigen L particles (bionanocapsules) have been of use for a convenient drug delivery system. However, this system is not effective for delivering taxol. Taxol is one of the most potent anticancer agents used in the treatment of many kinds of solid tumors such as breast and ovarian cancers. It presents disadvantages such as low water-solubility and toxicity toward normal tissues. The glucoside derivative, 7-glycolyltaxol 2''-0-alpha-D-glucoside, was glycosylated by cyclodextrin glucanotransferase to 7-glycolyltaxol 2''-0-alpha-maltooligosides. The enzymatic hydrolysis of 7-glycolyltaxol 2''-0-alpha-maltooligosides gave 7-glycolyltaxol 2''-0-alpha-maltotrioside as a taxol-prodrug. We developed the new delivery system for taxol-prodrug using hepatitis B virus envelope L particles (bionanocapsules).

研究分野：薬物送達システム

キーワード：バイオナノカプセル タキソール誘導体 DDS製剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗癌剤の副作用を低減することを目的として、抗癌剤をピンポイントで輸送するための薬物送達システムの開発が盛んに行われている。ヒト B 型肝炎ウイルス由来の、Pre-S1 領域、Pre-S2 領域、S 領域から成る、表面抗原 L タンパク質は、3 回膜貫通型蛋白質であり、出芽酵母で発現させると、酵母小胞体膜由来のリポソームに埋め込まれた、中空のバイオナノカプセルを構成する。バイオナノカプセルは、粒子表面に、肝細胞認識部位を持つ、肝細胞集積性の高い薬物キャリアとして有用である。しかし、バイオナノカプセルは、タキソール等の抗癌剤を輸送するのが困難な問題がある。

これまでに、アルブミンを抗癌剤に結合させた親水性の製剤を開発する試みが行われているが、抗癌剤の誘導体を、薬物キャリアへ封入して、薬物送達システムに応用した例は無い。

(2) 研究代表者らは、酵素、培養細胞を利用した糖転移反応により、タキソール等の抗癌剤に、グルコースなどのグリコシドを結合させたタキソール誘導体を開発し、薬物送達システムへ応用する研究を行っている。

2. 研究の目的

抗癌剤にグルコース等のグリコシドを結合させた配糖体誘導体を調製する。さらに、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼによるオリゴサッカライドを生成する。オリゴサッカライドの鎖長が長いものは、物理的に、薬物キャリアの中空への封入に適さない可能性があるため、オリゴサッカライドの鎖長が 3 程度となるように、グルコシダーゼとともにインキュベーションを行い、抗癌剤の配糖体誘導体を調製する。

得られた抗癌剤の配糖体誘導体を、薬物送達システムへ応用するため、肝細胞へ集積する特性を持つ薬物キャリアである、バイオナノカプセルの中空へ、抗癌剤の配糖体誘導体を封入する。本研究により、抗癌剤の肝細胞癌への能動輸送が可能な、新規な肝細胞癌治療用製剤を開発することを研究目的としている。

3. 研究の方法

(1) 抗癌剤のグリコシド誘導体の合成

有機溶媒-水の二層系において、グリコール酸と、グルコースを溶解したのち、38 °C で、グルコシダーゼを作用させた。

生成したグリコール酸のグリコシド誘導体に、ジメチルホルムアミドと共に、ベンジルプロマイドを反応させて、テトラベンジルグリコール酸グリコシドを調製した。

抗癌剤としてタキソールを使用し、これに、ジイソプロピルエチルアミンおよびクロロトリエチルシランを、ジクロロメタン中で、作用させた。得られる 2'-タキソールを、ジクロロメタン中で、テトラベンジルグリコール酸グリコシドと EDCI / DMAP 存在下で反応させた。エタノール、ジオキサン中で、Pd/C を用いて還元的に加水分解させることで、グリコール酸を介して、タキソールにグルコースを結合させた、親水性の誘導体を合成した。

(2) 抗癌剤のトリサッカライド誘導体の合成

抗癌剤のタキソールのグリコシド誘導体の親水性を、更に向上させる目的で、タキソールのオリゴサッカライド誘導体を調製した。タキソールのグリコシド誘導体に、糖供与体として、水溶性の寒天を加え、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを触媒として、pH 7.0 のリン酸緩衝溶液中で反応させた。得られたタキソールのオリゴサッカライド誘導体の鎖長が 3 である誘導体を優先的に生成させるため、グルコシダーゼを使用した加水分解反応を行った。

(3) バイオナノカプセルを利用した肝細胞癌治療用の DDS 製剤の開発

バイオナノカプセルの発現酵母を、ガラスビーズによって破碎し、熱処理を行うことにより、酵母由来の夾雑タンパク質を除去した。クロマトグラフィーにより、バイオナノカプセルを精製した。抗癌剤タキソールのトリサッカライド誘導体を、エレクトロポレーションにより、このバイオナノカプセルに封入した。

4. 研究成果

(1) 抗癌剤のグリコシド誘導体の合成

グルコシダーゼが触媒する逆加水分解反応を利用して、グリコール酸のグリコシド誘導体の合成を行った。ジメチルスルホキシド-水の溶媒中において、グルコシダーゼを加え、グリコール酸をグリコシド化した。得られたグリコール酸グリコシドに、ジメチルホルムアミド存在下、ベンジルプロマイドを作用させることにより、テトラベンジルグリコール酸グリコシドを得た。ジクロロメタンを溶媒として使用し、ジイソプロピルエチルアミン、クロロトリエチルシランと、タキソールを反応させ、タキソールの 2' 位に TES 基を結合した。2'-タキソールと、テトラベンジルグリコール酸グリコシドを、ジクロロメタンを溶媒として用いて EDCI / DMAP を触媒として、ベンジル化タキソール-グリコシド誘導体を得た。エタノールとジオキサンの溶媒中で、Pd/C と反応させ、グリコール酸をスパーサーとする、タキソールの親水性のグリコシド誘導体を調製した。

(2) 抗癌剤のトリサッカライド誘導体の合成

pH 7.0 のリン酸緩衝溶液中で、水溶性寒天由来のグルコースと、タキソールのグリコシド誘導体を、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼで反応させることにより、タキソール

ルにオリゴサッカライドが結合した誘導体が生成した。その結果、鎖長の順に、n が 2 の生成物 : n が 3 の生成物 : n が 4 の生成物 : n が 5 の生成物 = 15 : 10 : 7 : 5 であった。次に、グルコシダーゼで長鎖のオリゴサッカライドを加水分解したところ、鎖長の順に、n が 2 の生成物 : n が 3 の生成物 : n が 4 の生成物 : n が 5 の生成物 = 29 : 18 : 2 : 1 の生成物が得られた。この結果から、タキソールのオリゴサッカライド誘導体のグルコシダーゼ処理により、タキソールのトリサッカライドが優先的に得られることが明らかとなった。

(3) バイオナノカプセルを利用した肝細胞癌治療用の DDS 製剤の開発

ヒト B 型肝炎ウイルス由来の L タンパク質を出芽酵母で発現させると、酵母の小胞体由来の脂質二重膜を取り込みながら自己凝集することにより、中空のバイオナノカプセルを形成する。このバイオナノカプセルに、タキソールのトリサッカライド誘導体存在下で、エレクトロポレーションを行うことにより、効率的に中空へタキソールのトリサッカライド誘導体を封入した、肝細胞癌治療薬を調製することに成功した。本 DDS 製剤は、肝癌細胞株 NuE に対する高い抗癌活性を示した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Shimoda K., Kubota Naoji, Hamada H, Doi S, Ishihara K, Hamada H, Fujitaka Y, Ono T, Araki M, Ferulic acid, methyl ferulate, and ferulic acid glucopyranosyl ester isolated from cultured cells of *Phytolacca americana*, *Natural Product Communications*, 査読有, 13 巻, 2018, 67-68
Hamada H, Shimoda K., Saitoh Y, Doi S, Fujitaka Y, Ono T, Hamada H, Araki M, Resveratrol oligosaccharide induces mRNA expression for *SIRT*, *Natural Product Communications*, 査読有, 13 巻, 2018, 455-456

Uesugi D, Hamada H, Shimoda K., Kubota N, Ozaki S, Nagatani N, Synthesis, oxygen radical absorbance capacity, and tyrosinase inhibitory activity of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and pinostilbene, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 81 巻, 2017, 226-230
Hamada H, Shimoda K., Horio Y, Ono T, Hosoda R, Nakayama N, Urano K, Pterostilbene and its glucoside induce type collagen expression, *Natural Product Communications*, 査読有, 12 巻, 2017, 85-86

Fujitaka Y, Shimoda K., Kubota N, Araki M, Onishi T, Nakayama N, Ishihara K, Tanigawa M, Hamada H, Hamada H, Glycosylation and methylation of quercetin and myricetin by cultured cells of *Phytolacca americana*, *Natural Product Communications*, 査読有, 12 巻, 2017, 523-524

〔学会発表〕(計 25 件)

濱田博喜、下田恵、小崎伸一、中山亨、井上豪、培養細胞による物質変換に関する研究、第 98 回 日本化学会春季年会、2018 年、日本大学理工学部 (神奈川)

柳正義、藤高侑也、上杉大介、土井翔太、下田恵、小崎伸一、濱田博喜、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるレスペラトロール誘導体の物質変換、第 98 回 日本化学会春季年会、2018 年、日本大学理工学部 (神奈川)

Yuya Fujitaka, Kei Shimoda, Naoji Kubota, Daisuke Uesugi, Manami Inoue, Shin-ichi Ozaki, Hiroki Hamada, Biotransformation of foreign substrates by cultured plant cells, The 15th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2018 年、京都大学 (京都)

濱田博喜、藤高侑也、井上豪、小崎伸一、下田恵、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞による配糖化反応と配糖化酵素、第 36 回日本植物細胞分子生物学会、2018 年、金沢商工会議所会館 (石川)

井上真奈美、藤高侑也、中山亨、小崎伸一、下田恵、濱田博喜、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるメチル化反応とメチル化酵素、第 36 回日本植物細胞分子生物学会、2018 年、金沢商工会議所会館 (石川)

濱田博喜、井上真奈美、柳正義、下田恵、植物培養細胞によるモノテルペン類の配糖化、第 62 回テルペンおよび精油化学に関する討論会、2018 年、長崎大学 (長崎)

濱田博喜、井上真奈美、柳正義、上杉大介、藤高侑也、下田恵、小崎伸一、植物培養細胞による水酸化反応、第 51 回酸化反応討論会 2018、2018 年、九州大学 (福岡)

濱田博喜、土井翔太、上杉大介、小崎伸一、下田恵、小崎伸一、明条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるフェルラ酸誘導体の生産、第 97 回 日本化学会春季年会、2017 年、慶應義塾大学 (神奈川)

荒木美奈実、中山騎維、小野翼、下田恵、小崎伸一、濱田博喜、クワ培養細胞によるクルクミン誘導体の還元反応、第 97 回 日本化学会春季年会、2017 年、慶應義塾大学 (神奈川)

大西達也、下田恵、小崎伸一、濱田博喜、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるフラボン類の物質変換、第 97 回 日本化学会春季年会、2017 年、慶應義塾大学 (神奈川)

小野翼、荒木美奈実、川村章悟、杉山葵、下田恵、小崎伸一、濱田博喜、生体触媒を活用した capsaicin の更なる有用化、おかやまバイオアクティブ研究会 第 51 回シンポジウム、2017 年、株式会社林原 (岡山)

- 柳正義、上杉大介、藤高侑也、大西達也、井上真奈美、下田恵、小崎紳一、濱田博喜、植物培養細胞によるレスベラトロール誘導体の物質変換、おかやまバイオアクティブ研究会第51回シンポジウム、2017年、株式会社林原（岡山）
- 濱田博喜、藤高侑也、荒木美奈実、上杉大介、下田恵、小崎紳一、井上豪、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞由来糖転移酵素を用いたスチルベン誘導体の配糖化、第35回日本植物細胞分子生物学会、2017年、大宮ソニックシティ（埼玉）
- 濱田博喜、荒木美奈実、小野翼、下田恵、小崎紳一、井上豪、植物培養細胞によるモノテルペン類の配糖化と配糖化酵素に関する研究、第61回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2017年、金沢工業大学（石川）
- 濱田博喜、上杉大介、藤高侑也、下田恵、小崎紳一、中山亨、中山泰亮、井上豪、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞による配糖化と糖転移酵素の結晶構造解析、第59回天然物有機化合物討論会、2017年、札幌市民ホール（北海道）
- 濱田博喜、上杉大介、下田恵、小崎紳一、中山亨、植物培養細胞による水酸化、第50回酸化反応討論会、2017年、神奈川大学（神奈川）
- 荒木美奈実、小野翼、下田恵、小崎紳一、濱田博喜、植物培養細胞によるカプサイシン誘導体の合成、第50回酸化反応討論会、2017年、神奈川大学（神奈川）
- 小野翼、小崎紳一、下田恵、濱田博喜、植物培養細胞によるカプサイシンの物質変換、第19回生体触媒化学シンポジウム、2017年、長崎県立大学（長崎）
- 下田恵、大西達也、土井翔太、上杉大介、小崎紳一、濱田博喜、植物培養細胞によるフラボン類の物質変換、第34回日本植物細胞分子生物学会、2016年、信州大学（長野）
- 荒木美奈実、川村章吾、中山騎維、小野翼、真鍋光一、下田恵、小崎紳一、濱田博喜、植物培養細胞による*N*-グリコシル化、第34回日本植物細胞分子生物学会、2016年、信州大学（長野）
- ⑳ 上杉大介、川村章吾、土井翔太、中山騎維、岡田祥太、下田恵、小崎紳一、濱田博喜、植物培養細胞による配糖体とメチル化、第58回天然有機化合物討論会、2016年、東北大学（宮城）
- ㉑ 下田恵、小野翼、荒木美奈実、小崎紳一、濱田博喜、植物培養細胞によるモノテルペン類の配糖化、第60回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2016年、東京農業大学オホーツクキャンパス（北海道）
- ㉒ 真鍋光一、中山騎維、荒木美奈実、下田恵、小崎紳一、濱田博喜、植物培養細胞を用いた*N*-グリコシル化、2016年度日本化学会中国四国大会、2016年、愛媛大学城北キャンパス（香川）
- ㉓ 真鍋光一、川村章吾、中山騎維、荒木美奈実、小野翼、下田恵、小崎紳一、濱田博喜、植物培養細胞によるカプサイシンの物質変換、第49回酸化反応討論会、2016年、徳島大学（徳島）
- ㉔ 荒木美奈実、上杉大介、中山騎維、小野翼、下田恵、小崎紳一、濱田博喜、植物培養細胞によるテトラヒドロクルクミンの物質変換、第18回生体触媒化学シンポジウム、2016年、明星大学（東京）

〔図書〕(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：濱田 博喜

ローマ字氏名：HAMADA Hi roki