

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14491

研究課題名(和文) ガン細胞内亢進酵素と低分子ゲル化剤による選択的抗ガン活性の発現

研究課題名(英文) Anticancer activity created by low-molecular-weight gelators and enzyme related to cancer cells

研究代表者

丸山 達生 (Maruyama, Tatsuo)

神戸大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30346811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低分子化合物の集合体から成る超分子ゲルは、ゲル化剤が低分子であるため精密な分子設計が可能であり、様々な刺激応答性のゲル化剤を作製しやすいといった利点がある。本研究では、一部のガン細胞が過剰生産するマトリックスプロテイナーゼ(MMP)に反応して、抗ガン活性を発現するペプチド脂質の開発を行った。MMP認識配列および非認識配列を含むペプチド脂質を合成した。各種培養細胞を用いて細胞毒性を検討した結果、ある種のペプチド脂質でガン細胞種により細胞毒性が変わることが明らかになった。本研究で開発したペプチド脂質がMMPにより加水分解され、ガン細胞内側での自己組織化が細胞毒性につながっているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Molecular self-assembly provides diverse approaches to construct nanostructured or multifunctional materials at various scales and dimensions. We have studied peptide lipids that self-assemble to form nanofibers responsive to enzymes. Here we studied cancer cell death initiated by enzymatic transformation of a peptide lipid. The peptide lipids were designed to form cytotoxic surfactants via enzymatic transformation by an enzyme secreted from cancer cells. We adopted matrix metalloproteinase that is excessively produced by some of cancer cells. Peptide lipids, which were respond or non-respond to the enzyme, were synthesized. One of the peptide lipids exhibited remarkable cytotoxicity to some of cancer cell lines, indicating the cell-selective cytotoxicity. Microscope observation also revealed that the cancer cells were decomposed after the addition of the peptide lipids. These results indicate that MMP transformed the peptide lipids to cytotoxic surfactants in cancer cells.

研究分野：生物化学工学

キーワード：自己組織化 ペプチド脂質 ガン細胞 ゲル 酵素 細胞毒性

### 1. 研究開始当初の背景

ゲルとは、分散質によって液体が流動性を失った状態を指す。ゲルは、分散系の種類によって溶媒が水ならばハイドロゲル、有機溶媒・油の場合ではオルガノゲルに分類される。ハイドロゲルは少量で多量の水分を内包しながら、固体として扱うことが可能である。この特徴を利用した様々な応用が古くから展開され、生活・日用品から分析化学など分野を問わず、現代社会において必要不可欠な存在となっている。

ゲルは分散質の種類によって、高分子ゲルと超分子ゲル(低分子ゲル)に大別される。超分子ハイドロゲルでは、一般に低分子ゲル化剤といわれる小分子(高分子の場合もある)が非共有結合(静電相互作用、水素結合、疎水性相互作用等)により自己組織化し、絡み合うナノファイバーを形成する。この絡み合ったナノファイバーが液体を固めることによりハイドロゲルを形成するというものである(図1)。この超分子ハイドロゲルは、従来使用されてきた高分子ゲルと強度の点で劣るものの、ゲル化剤分子の構造と機能の制御が容易なため新たなソフトでウェットな材料として近年注目を浴びている。その機能の一つである酵素応答性を利用して、正常細胞と比べてガン細胞が過剰に生産する酵素 matrix metalloproteinase-7 (MMP-7)に反応し、ゲル化が誘導される超分子ゲル化剤前駆体を設計・合成し、その細胞に及ぼす影響を評価した。

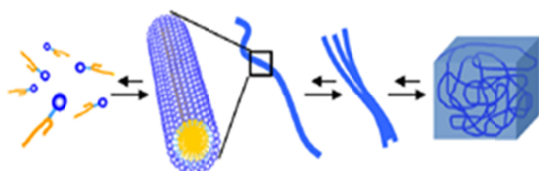


図1 超分子ハイドロゲル化剤によるゲル化の模式図(ナノファイバーの形成)

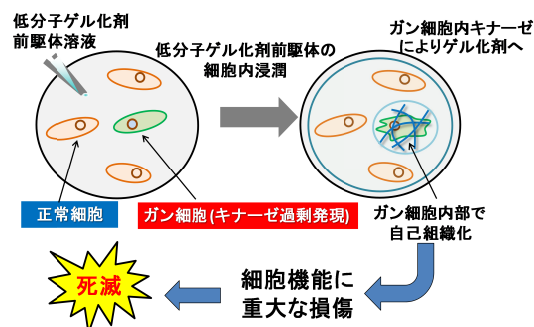


図2 低分子ハイドロゲル化剤前駆体による特定ガン細胞の殺傷

### 2. 研究の目的

本研究では、超分子ゲル化剤前駆体分子としてペプチド脂質を採用し、この分子構造にゲル化部位、MMP-7 切断部位、ゲル化阻害部位を作り込み、ガン細胞に及ぼす影響を調べた。ここではガン細胞内で過剰に発現・分泌

する酵素(MMP-7)の触媒作用により、前駆体分子が“活性状態”になり、ガン細胞内に取り込まれ、ゲル化剤分子の自己組織化を経て細胞死を誘導することをめざした。つまり精密に分子設計した合成ペプチド脂質をガン細胞に選択的に取り込ませ、ガン細胞内で巨大な自己組織体(ナノファイバー)を形成させ、このナノファイバー形成によりガン細胞の細胞死を制御することを目的とした。

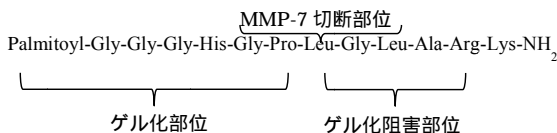


図3 超分子ゲル化剤前駆体 (Palmitoyl-GGGHGPLGLARK)の分子構造

### 3. 研究の方法

超分子ゲル化剤(Palmitoyl-GGGHGPLG)および超分子ゲル化剤前駆体(Palmitoyl-GGGHGPLGLARK)の物性評価(固相ペプチド合成法により、Palmitoyl-GGGHGPLG というアミノ酸配列と脂肪酸鎖を持つ超分子ゲル化剤の合成を行った。化合物の精製は高速液体クロマトグラフィー、同定は MALDI-TOF/MS を用いて行った。ゲル化の判断は試験管倒置法を採用した。示差走査熱量計(DSC) 電界放出型走査電子顕微鏡(FE-SEM)および透過型電子顕微鏡(TEM)によるハイドロゲルの観察・物性評価を行った。

超分子ゲル化剤前駆体を用いて、ガン細胞が分泌する酵素 matrix metalloproteinase-7 (MMP-7)存在下でゲル化試験を行った。さらに、この前駆体をモデルガン細胞およびモデルヒト正常細胞を用いて毒性評価および Live-Dead test を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 超分子ゲル化剤のゲル化試験

ゲル化試験では、試験管倒置法において溶媒はリン酸緩衝溶液(pH7.5)、E-MEM (L929細胞の培地)及びD-MEM(HeLa細胞の培地)を2 wt%でゲル化する事を確認した。

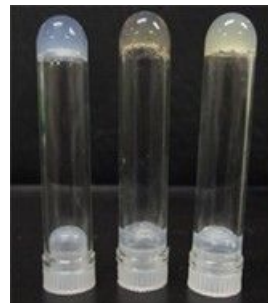


図3 ゲル化試験結果  
左)PBS buffer (50 mM pH 7.5)  
中)D-MEM(HeLa細胞の培養液)  
右)E-MEM(L929細胞の培養液)

(2) 示差走査熱量分析によるゲルの分析  
DSC (示差走査熱量分析) の結果から、このゲル化剤は、74 付近にゾル-ゲル転移点を持つことから(図4)、生体温度条件の37 付近でゲルの形成を維持できることがわかった。

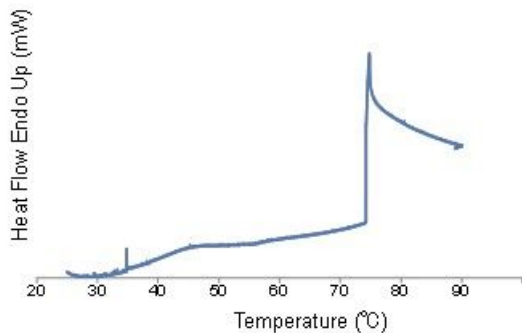


図4 リン酸緩衝液で作成したゲル (Palmitoyl-GGGHGPLG) の熱吸収挙動 (DSC 測定)

### (3) 電子顕微鏡観察

超分子ゲル化剤 Palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Leu-Gly で形成させたキセロゲル(凍結乾燥させたハイドロゲル)を観察したところ、図5左に見られるような SEM 画像得られ、ファイバーが互いに絡まり合っていることが観察できた。TEM 画像(図5右)を見ると、何本かの細いファイバーが集合してバンドル化した一本の太いファイバーを形成していると考えられた。これらのファイバーは、超分子ゲル化剤が自己組織化して形成したものだと思われる。

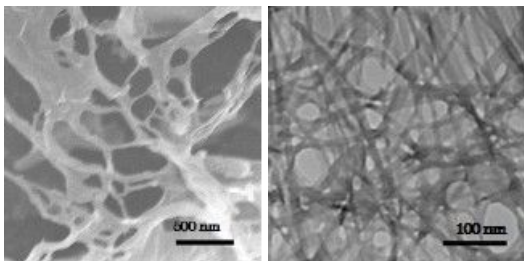


図5 超分子ゲル(キセロゲル)のFE-SEM 観察(左)とTEM 観察画像(右)

### (4) 酵素によるゲル化剤前駆体の分解

超分子ゲル化剤部位 palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His に対し MMP-7 認識配列およびゲル化阻害部位を導入した前駆体 palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg-Lys-NH<sub>2</sub> の *In vitro* における酵素応答性ゲル化試験を行った。0.2 wt% 前駆体溶液に対して、MMP7 を終濃度 2 μg/ml に調整し 1 日放置したところ、視覚的にゲル形成を確認した(図6左)。

また、MMP-7 による加水分解反応が進行していることを確認するために、0.2 wt% 前駆体溶液に MMP-7 を添加後、形成されたゲルをボルテックスで粉碎し、これを高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により分析した。

保持時間 13.2 min に見られた前駆体のピークに対し、16.7 min に新たなピークが観測された(図7)。このフラクションを分取し、MALDI-TOF-MS を用いて分析した結果、 $m/z = 899$  にピークが観測された。この結果は、palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Leu-Gly が生成していること、すなわち前駆体が MMP-7 の Gly-Leu 間で加水分解されていることを示している。これは MMP-7 の基質特異性 (Pro-Leu-Gly-Leu) を認識し、Gly-Leu 間で加水分解) と合致する結果であり、MMP-7 の酵素反応が進行していることが明らかになった。24 時間後における反応率を算出したところ、39 %の前駆体が加水分解されていることが分かり、前駆体全てが反応しなくても、ゲル形成は進行することが示唆された。MMP-7 添加によるゲル形成が、その反応の進行に伴うものであることを確認するため、前駆体の酵素認識部位 (Pro-Leu-Gly-Leu) を変換し、新たに (Ala-Ala-Gly-Ala) を導入した非応答性前駆体でのゲル化を検討した。その結果、非応答性前駆体において、MMP-7 添加後 24 時間後も溶液状態が保たれ、ゲルは形成されなかった。(図6右) さらに、HPLC による分析を行ったところ、13.7 min の前駆体由来のピークのみが観察され、酵素認識部位のアミノ酸配列を変換することで、非応答性前駆体の加水分解反応が抑制されたことが明らかとなった。



図6 (左) 超分子ゲル化剤前駆体水溶液に MMP-7 添加後の様子、(右) MMP-7 で分解されない超分子ゲル化剤前駆体(非応答性前駆体)に MMP-7 添加後の様子

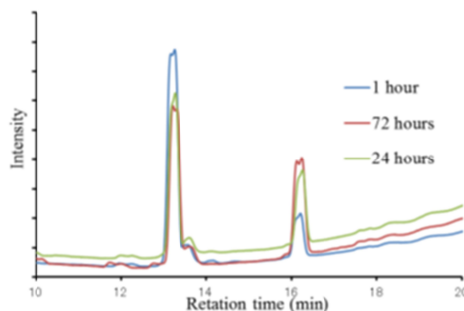


図7 超分子ゲル化剤前駆体水溶液に MMP-7 添加後の高速液体クロマトグラフィ(HPLC)分析

### (5) 超分子ゲル化剤前駆体の細胞毒性

Live-Dead Test(細胞毒性試験)の結果、本研究で合成した酵素応答性前駆体: Palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg-Lys-NH<sub>2</sub> がガン細胞である HeLa 細胞に対し

とともに毒性があり、0.02 wt%で完全に死滅させることが可能であることが判明した。赤色の蛍光を発しているものが死んでいる細胞を、緑色が生きている細胞を表している。

一方、ヒト正常細胞である正常ヒト皮膚毛細血管内皮細胞(MvE 細胞)を用いて、酵素応答性前駆体が正常細胞に対して毒性の影響を与えるのかを検討した。ガン細胞では0.02 wt%で全細胞を死滅させていたのに対して、正常細胞では赤色の死細胞がわずかに確認できるが、観察されたのはほとんどが緑色の生細胞であった。このことにより、本研究において開発した酵素応答性前駆体はガン細胞に対して毒性、正常細胞に対しては毒性が低いことが明らかとなった。これは、正常細胞における酵素 MMPs の分泌量が少ないことから、酵素応答性前駆体からゲル化剤部位が細胞を死滅させるよりも低い濃度でしか生成されず、細胞が死滅しなかったと考えられる。また、対照実験としてゲル化剤部位のみを添加したところ、正常細胞も全滅した。このように、パルミチン酸にアミノ酸が結合した分子(酵素応答性前駆体)が細胞液中でミセルを形成していても、細胞に対して無毒性であり、超分子ゲル化剤を生成することで細胞に対して毒性を示すことがわかった。また超分子ゲル化剤前駆体が加水分解された際に生じるペプチド断片(Leu-Ala-Arg-Lys-NH<sub>2</sub>)の毒性も調べた結果、有意な細胞毒性は観察されなかった。

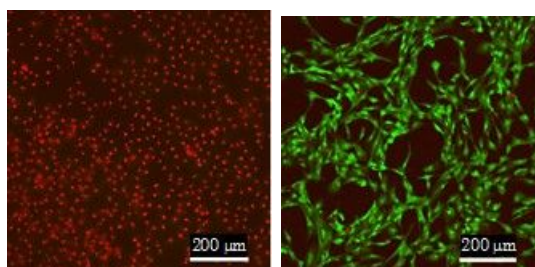


図8 超分子ゲル化剤による細胞毒性評価  
(左) HeLa 細胞 (ガン細胞)、(右) MvE 細胞 (正常細胞)  
(赤: 死細胞、緑: 生細胞)

#### (6) 生存率測定 (HeLa 細胞)

トリパンプルー染色法を用いて、合成したペプチド添加後の細胞の生存率を測定した。超分子ゲル化剤前駆体とゲル化剤部位で検討を行った結果、ともに濃度を  $1.7 \times 10^{-5}$  wt% から増加させていくと、生存率が減少していく傾向が明らかとなった(図9)。また、超分子ゲル化剤前駆体がゲル化剤部位よりも各濃度において生存率が高いことがわかった。

濃度を 0.02 wt% で固定し、さらにペプチド断片(図中表記、カチオニック部位)、酵素非応答性前駆体(Arg)、酵素非応答性前駆体(Ala)で検討を行った結果、応答性前駆体では20%、ゲル化剤部位では7%と低い生存率に対して、カチオニック部位では94%、非応答性

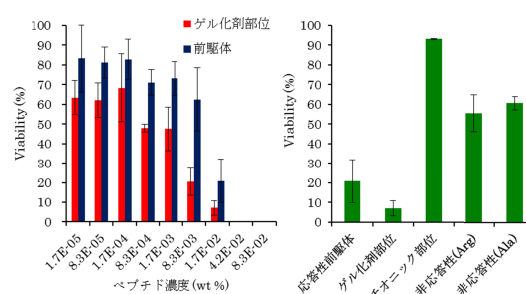


図9 (左) 酵素応答性前駆体及びゲル化剤部位が及ぼす HeLa 細胞生存率への影響 (右) 超分子ゲル化剤前駆体およびその類縁体が細胞生存率に及ぼす影響 (それぞれ 0.02 wt% で添加)

前駆体(Arg)と非応答性前駆体(Ala)は共に約70%と高い生存率を示した。

#### (7) まとめ

以上の結果より、「ガン細胞が過剰に分泌する酵素に反応する超分子ゲルによる選択的ガン細胞死滅システムの創製」が一定程度可能である結果が示された。つまり、本研究では、自己組織化能をプログラムされた合成分子が、その分子構造に書き込まれたもう一つのプログラムに基づき特定のガン細胞を“選んで”、細胞内で自己組織化し、細胞毒性を発現するという、全く新しい薬理活性コンセプトを世界に提案した。これにより創薬分野およびケミカルバイオロジーにおいて、従来に全くない薬理活性発現の方法論につながると考えている。本研究ではガン細胞をターゲットとしたが、本研究の概念を拡張し、病原性微生物等に対しても応用可能である。分子の自己組織化がこれまでナノ・マイクロ構造物作製の手段として主に用いられていたが、それにとどまらず生理(薬理)活性発現手段としても利用可能であることを、本研究を通じて世界に提案する。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- 1) K. Nishimori, S. Kitahata, T. Nishino, T. Maruyama,\* Controlling surface-segregation of a polymer to display carboxy groups on an outermost surface using perfluoroacyl group. Langmuir doi: 10.1021/acs.langmuir.8b00638 (2018).
- 2) H. Iguchi, K. Miyahara, C. Higashi, K. Fujita, N. Nakagawa, S. Tamba, A. Mori, H. Yoshitani, A. Nakasuga, T. Maruyama,\* Preparation of uncurled and planar multilayered graphene using polythiophene derivatives via liquid-phase exfoliation of graphite. FlatChem 10.1016/j.flatc.2018.03.003 (2018).
- 3) T. Matsuura, E. Tsuchiya, Y. Fukui, T. Maruyama,\* Electrospun polymeric short microfibers with surface-selective functionalization. Colloid Polym. Sci. 296,

- 239-244 (2018).
- 4) Y. Nishida, A. Tanaka, S. Yamamoto, Y. Tominaga, N. Kunikata, M. Mizuhata, T. Maruyama. \* In-situ synthesis of supramolecular hydrogelator at an oil/water interface for stabilization and stimuli-induced fusion of microdroplets. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 9410-9414 (2017).
  - 5) T. Matsuura, T. Maruyama. \* Hollow phosphorylcholine polymer vesicles prepared by a coaxial electrospray technique. *Colloid Polym. Sci.*, 295, 1251-1256 (2017).
  - 6) W. K. Restu, Y. Nishida, T. Kataoka, M. Morimoto, K. Ishida, M. Mizuhata, T. Maruyama. \* Palmitoylated amino acids as low-molecular-weight gelators for ionic liquids. *Colloid Polym. Sci.* 295, 1109-1116 (2017).
  - 7) Y. Eguchi, T. Kato, T. Tanaka, T. Maruyama. \* DNA-gold nanoparticle hybrid hydrogel network prepared by enzymatic reaction. *Chem. Commun.* 53, 5802-5805 (2017).
  - 8) T. Matsuura, T. Maruyama. \* Calcium phosphate-polymer hybrid microparticles having functionalized surfaces prepared by a coaxially electrospray technique. *Colloids Surf. A* 526, 64-69 (2017).

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) Witta Kartika Restu, Y. Nishida, T. Kataoka, T. Maruyama: Supramolecular gelators based on an amino acid-conjugated fatty acid for ionic liquids, 第 66 回高分子学会年次大会、千葉市、2017.5】
- 2) Witta Kartika Restu, Y. Nishida, T. Kataoka, T. Maruyama: Self-assembly of pentapeptide-based hydrogelators for encapsulation and release of functional compounds, 第 49 回化学工学会秋季大会、名古屋市、2017.9
- 3) 山本翔太, 西田雄貴, 森元智行, 丸山達生: ガン細胞を選択的に殺傷する超分子ゲルの開発、第 66 回高分子学会年次大会、千葉市、2017.5 【国内会議】
- 4) 山本翔太, 西田雄貴, 森元智行, 丸山達生: ガン細胞殺傷を目的とした pH 応答性超分子ゲル化剤の開発、第 63 回高分子研究発表会 (神戸)、神戸市、2017.7
- 5) 山本翔太, 西田雄貴, 森元智行, 丸山達生: ガン細胞に選択的な毒性を發揮する pH 応答性ペプチド脂質の開発合成と同時に溶媒をゲル化可能なペプチド系超

分子ゲル化剤の開発、化学工学会第 49 回秋季大会、名古屋市、2017.9

- 6) 丸山達生: 合成低分子の自己組織化によるガン細胞の死滅: 日本セラミックス協会第 30 回秋季シンポジウム、神戸市、2017.9 【国内会議】
- 7) 丸山達生、西田雄貴、田中暁子、山本翔太、富永雄大: 超分子ゲル化剤の in-situ 合成によるエマルションの安定化と融合の制御、第 66 回高分子討論会、松山市、2017.9】
- 8) 西村香音、山本翔太、青井貴之\*; 丸山達生: 培養細胞に対するペプチド脂質の毒性評価、化学工学会第 20 回化学工学会学生発表会、東広島市、2018.3
- 9) 富永雄大、山本翔太、西田雄貴、丸山達生: 動的共有結合を用いた超分子ゲルへの熱不可逆性付与、化学工学会第 20 回化学工学会学生発表会、東広島市、2018.3
- 10) 山本翔太, 西田雄貴, 森元智行, 丸山達生: 超分子ゲル化剤の in-situ 合成による刺激 応答性マイクロリアクターの作製、化学工学会第 83 年会 (大阪)、2017.3
- 11) 永口侑香、加藤智晴、田中勉、丸山達生: DNA ポリメラーゼ連鎖反応を用いた金ナノ粒子/DNA ゲルの作製。化学工学会第 83 年会 (大阪)、2017.3

〔図書〕(計 1 件)

丸山達生、ゲル化・増粘剤の使い方、選び方事例集 (共著)、「低分子ゲル化剤の自己組織化を利用した細胞の死滅」、459-463、技術情報協会 (2018).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

なし。

○取得状況 (計 0 件)

なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 達生 (MARUYAMA, Tatsuo)  
神戸大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 30346811

(2)研究分担者

なし。

(3)連携研究者

なし。