

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月4日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18909

研究課題名(和文) がん選択的薬化学療法の実現を目指した細胞内滞留型プロドラッグの開発

研究課題名(英文) Development of anti-tumor prodrugs accumulating in tumor cells for tumor-selective chemotherapy

研究代表者

堂浦 智裕 (Doura, Tomohiro)

東京薬科大学・薬学部・嘱託助教

研究者番号：00745226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 研究代表者は、がん組織に対する「魔法の弾丸」の開発を目指し、3年間で beta-ガラクトシダーゼを標的分子とした卵巣がん細胞に対するプロドラッグ候補化合物の開発、がん組織への薬物運搬体となり得るグルタチオン応答分解性チオール有機シリカナノ粒子の開発を達成しました。これらの成果は、がん組織選択的な薬化学療法の実現に資するものであると考えています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的・社会的意義の一つ目は、beta-ガラクトシダーゼという酵素が卵巣がん細胞に対する薬化学療法において、薬の機能をオンにするスイッチとなり得ることを示した点です。この知見を基に、beta-ガラクトシダーゼをスイッチとする抗がん剤の研究開発が進展することが期待されます。二つ目は、チオール有機シリカナノ粒子の大きさを制御できる実用的な合成法を開発したことです。この成果は、本ナノ粒子をがん組織選択的に送り込む技術の開発に貢献するものです。三つ目はチオール有機シリカナノ粒子の詳細な化学構造に関するデータを得たことです。この結果、本ナノ粒子を論理的に機能化することが可能になりました。

研究成果の概要(英文)： I have my sights on the development of “Magic Bullet” for cancer tissues. I achieved 1) the development of a beta-galactosidase targeting prodrug candidate for ovarian cancer and 2) the development of glutathione-responsive degradable thiol-organosilica nanoparticles as a potential drug carrier for cancer tissues. I think that these accomplishments contribute the realization of selective chemotherapy for cancer tissues.

研究分野：メディシナルケミストリー、ケミカルバイオロジー

キーワード：プロドラッグ ドラッグデリバリーシステム ナノ粒子 ナノメディシン EPR効果 創薬化学 薬化学療法 魔法の弾丸

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞、あるいはがん組織に選択的に抗がん剤を作用させる「がん選択的化学療法」は古くからの人類の夢の一つであるが、現在においても完全な「魔法の弾丸」は存在しません。本研究を開始する時期に「魔法の弾丸」として最も注目されていたものは武装抗体とも呼ばれる抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugates: ADCs) でしたが、抗体の合成コストが高い、高分子薬物のためにがん組織内部への浸透性が乏しい、などの課題を抱えていました。筆者は、これらの課題を克服する方法の一つとして、がん細胞が持つ特徴を捉えてがん細胞に選択的に作用する小分子プロドラッグを開発することを考えました。小分子プロドラッグは有機化学的に合成可能であるため抗体の合成よりもコストを低くすることができ、また小分子であるため組織内部への浸透性が高いという特徴があります。また、がん細胞に特徴的に発現する酵素や受容体に関する情報が蓄積されていたため、これらをプロドラッグの薬理作用を発現させるスイッチや薬物送達の標的分子として利用できる環境が整っていました。

## 2. 研究の目的

がんの化学療法においては常に抗がん剤の副作用が問題視されます。がん組織以外の生体組織中に薬物が分布することが副作用の原因と考えられるため、光照射によって薬物の薬理作用を可逆的に制御する「光スイッチ型薬物 (photoswitchable drugs)」が提案されました<sup>1,2</sup>。これを使用すれば狙った組織に対してのみ薬理作用を及ぼすことができますが、治療を必要とする組織に十分な光を照射するシステムを備える必要があります。筆者は、光や熱のような外部からの物理的な刺激を必要とせずに狙った組織に対して選択的に薬理作用を及ぼすためには、狙った組織内で活性化されて薬理作用を示す薬物となり、さらにその薬物が半永久的に組織内に留まり組織外へ流出されないプロドラッグが必要ではないかと考え、その開発研究を目指しました。

## 3. 研究の方法

上記のようなプロドラッグを開発するためには、薬物として適切な分子を選択すること、がん細胞またはがん組織に選択的に発現し、プロドラッグの薬理作用を発現させるスイッチとなる標的分子の探索すること、がん細胞やがん組織内に薬物が滞留するシステムを開発すること、が必要であると考えました。また、プロドラッグをがん細胞やがん組織へ選択的に送達するシステムを開発することも補助的に必要であると判断しました。

研究を開始する際、<sup>3</sup> に関しては強いチューブリン重合阻害活性を示す天然物であるコンブレタスタチン A4 (CA4) に着目しました。CA4 の構造活性相関は解明されていたため、これに基づき CA4 のプロドラッグを設計しました。については卵巣がん細胞において高い活性を示すβ-ガラクトシダーゼに着目し、この酵素を利用したプロドラッグの設計を行いました。については酵素による代謝を受けて生成する薬物が電子求引性のキノンメチド誘導体となり、これが近傍の分子と結合することにより細胞や組織内に固定化される仕組みを考案しました。またについては EPR (enhanced permeability and retention) 効果によるがん組織への薬物送達を目指して有機シリカナノ粒子の薬物運搬体への応用について検討することにしました。

## 4. 研究成果

### (1) β-ガラクトシダーゼを標的分子とした卵巣がんに対する化学療法に有用なプロドラッグの開発

卵巣がん細胞中のβ-ガラクトシダーゼ活性が亢進していることが以前より知られており、この性質を利用して卵巣がん細胞の術中蛍光イメージングを実現した研究が浅沼らによって報告されていました<sup>3</sup>。この知見に基づき、卵巣がん細胞のβ-ガラクトシダーゼを標的分子とするプロドラッグの開発研究を開始しました。CA4 のヒドロキシ基が薬理作用の発揮に重要であることが知られていたため、このヒドロキシ基に置換基を導入することにより CA4 の薬理作用を抑制し、プロドラッグ化することにしました。また、自己解離性スパーサーが酵素反応速度に与える影響について検討するため、CA4 とβ-ガラクトシル基との間にスパーサーが存在しない CA4-βGal-1、CA4 とβ-ガラクトシル基の間に自己解離性スパーサーを挿入した CA4-βGal-2 をそれぞれ設計、合成しました。

酵素反応について検討した結果、これらの分子はいずれもβ-ガラクトシダーゼの基質になりましたが、CA4-βGal-2 の方が酵素に代謝される速度が速いという結果になりました。これはスパーサーが挿入されることによってβ-ガラクトシル基の周囲の込み合いが解消され、酵素が基質に結合しやすくなるからではないかと考えられます。卵巣がん細胞にこれらの分子を加えて細胞毒性試験を実施した結果、半数効果濃度 (EC<sub>50</sub>) は CA4-βGal-1 が数十から数百 nM を示したのに対し、CA4-βGal-2 は 2-3 nM を示す結果となりました。この CA4-βGal-2 の EC<sub>50</sub> は CA4 の EC<sub>50</sub> と同等であり、CA4-βGal-2 は卵巣がん細胞に対して十分な細胞傷害活性をもつことが

明らかとなりました。また、分子の疎水性の指標となるオクタノール/水分配係数 ( $\log P$ ) をそれぞれの分子について見積もった結果、CA4- $\beta$ Gal-1 は 1.5、CA4- $\beta$ Gal-2 は 3.1 であったことから CA4- $\beta$ Gal-2 は CA4- $\beta$ Gal-1 よりも疎水性が高いことが明らかとなりました。そのため、CA4- $\beta$ Gal-2 は CA4- $\beta$ Gal-1 よりも細胞膜透過性が高く、細胞内へ浸透しやすいことが示唆されました。上記の酵素反応速度の差だけではなく、細胞内への透過性の差もこれらの分子の卵巣がん細胞に対する EC<sub>50</sub> の差を生み出した要因だと考えています。また、細胞内の $\beta$ -ガラクトシダーゼに対する阻害剤である $\beta$ -GA を使用して卵巣がん細胞内の $\beta$ -ガラクトシダーゼを阻害すると、これらの分子の卵巣がん細胞に対する細胞毒性が低下したことから、これらの分子が細胞毒性を示す過程に $\beta$ -ガラクトシダーゼによる代謝が関与していることが明らかになりました。さらに、これらの分子を加えて 24 時間インキュベーションした卵巣がん細胞の細胞核と微小管の構成分子の一つである $\alpha$ -チューブリンを免疫組織化学的に蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、CA4 を加えた卵巣がん細胞と同様に細胞核の細分化や微小管構造の崩壊が観察されたことから、これらの分子が卵巣がん細胞内で $\beta$ -ガラクトシダーゼによって代謝されて CA4 を生成することにより細胞毒性を発揮することが明らかとなりました。

これらの結果より、CA4- $\beta$ Gal-1 と CA4- $\beta$ Gal-2 は共に $\beta$ -ガラクトシダーゼを標的分子とした卵巣がんに対する化学療法に有用なプロドラッグの候補化合物となりますが、特に CA4- $\beta$ Gal-2 は卵巣がん細胞に対する EC<sub>50</sub> が CA4 と同等であり、プロドラッグ候補化合物として有望であると考えています。

## (2) アニオン性界面活性剤によるチオール有機シリカナノ粒子の小型化効果の発見とアニオン性界面活性剤を使用したチオール有機シリカナノ粒子の粒径制御合成法の開発

プロドラッグをがん細胞やがん組織へ選択的に送達するため、ナノ材料の一つであるチオール有機シリカナノ粒子にプロドラッグを担持させ、EPR 効果により標的部位へ送達するドラッグデリバリーシステム (DDS) について検討しました。チオール有機シリカナノ粒子はチオールプロピル基とシロキサンから成る有機-無機ハイブリッド化合物であり、チオールプロピル基を持つためにチオールを介した機能性分子の修飾が容易、粒子の表面および内部が無機シリカナノ粒子よりも疎水的であるため、疎水性分子を吸着しやすい、等の特徴を有しています。このような特徴は DDS に有用であるため、チオール有機シリカナノ粒子は薬物運搬体の候補材料の一つです。一方、EPR 効果はナノ材料のサイズ (ナノ粒子の場合は粒径) に依存することが知られており、粒径 200 nm 以下のナノ粒子が EPR 効果を明確に示します<sup>4</sup>。従来のチオール有機シリカナノ粒子の合成法では粒径 200 nm 以下のナノ粒子を効率的に合成できなかったため、初めに効率的な合成法の開発研究に取り組みました。

シリカナノ粒子のコロイド溶液を用いた合成法においては、界面活性剤が合成されるシリカナノ粒子の形状や大きさに影響を与えることが知られています。チオール有機シリカナノ粒子の合成は高濃度アンモニア水溶液を用いたコロイド溶液系で実施するため、合成されるチオール有機シリカナノ粒子の形状や大きさに対する界面活性剤の効果について検討しました。その結果、アニオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を系中に加えて合成したチオール有機シリカナノ粒子の粒径は小さくなる傾向を示したのに対し、電荷をもたない中性界面活性剤である Triton X-100 や Tween 20 を系中に加えて合成したチオール有機シリカナノ粒子は凝集しやすく、粒径は大きくなる傾向を示しました。また、カチオン性界面活性剤であるヘキサデルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB) を系中に加えて合成したチオール有機シリカナノ粒子は凝集性と粒径が増大する傾向を示しました。これらの結果より、アニオン性界面活性剤をコロイド溶液系に添加することによって粒径の小さいチオール有機シリカナノ粒子を合成できる可能性が示唆されました。

アニオン性界面活性剤によるチオール有機シリカナノ粒子の小型化効果について検討を進めた結果、原料であるチオール有機シランの濃度が高いほど、またアニオン性界面活性剤の濃度が高いほど小型化効果が強くなることを見出しました。また、使用するアニオン性界面活性剤についての検討から、SDS より疎水性部位が小さい 1-オクタン硫酸ナトリウム (SOS) は全く小型化効果を示さなかったのに対し、SDS より疎水性部位が大きいドデシルベンゼン硫酸ナトリウム (SDBS) は SDS よりも強い小型化効果を示しました。この結果より、小型化効果にはアニオン性界面活性剤の疎水性部位が関与していることが明らかになりました。高濃度アンモニア水溶液中でチオール有機シランは加水分解されてアニオン性の両親媒性分子になり、ミセル様の分子会合体を形成します。この分子会合体とアニオン性界面活性剤が疎水的相互作用・静電相互作用することにより分子会合体が小さくなり、この分子会合体を構成する分子が重合することにより小型化されたチオール有機シリカナノ粒子が生成すると考えています。

本研究の結果、アニオン性界面活性剤のコロイド溶液への添加がチオール有機シリカナノ粒子を小型化する効果を見出し、粒径 200 nm 以下のチオール有機シリカナノ粒子の効率的合成法の開発に成功しました。この研究成果はチオール有機シリカナノ粒子を使用する DDS の実現に向けた確かな一歩と位置付けています。

## (3) グルタチオン応答性チオール有機シリカナノ粒子の開発

様々なナノ材料の中で、シリカナノ粒子は粒子表面が親水性であること、毒性が低いこと、化学修飾が容易であること、などの理由から DDS への応用などのナノ材料を用いた医療である「ナノメディシン」への利用が期待されている材料の一つとなっています。しかしながら、シリカナノ粒子には人体に対する健康上のリスクがあると言われており、シリカナノ粒子を肝臓に存在するマクロファージであるクッパー細胞が貪食すると、クッパー細胞は活性化し、珪結節の形成を促進します。電子顕微鏡を用いた観察より、活性化したクッパー細胞内にはシリカナノ粒子が分解されずに残っていることが判明しています。一方、DDS における薬物運搬体が高い治療効果を生み出すためには、薬物を放出する場所やタイミングを制御することが重要です。これら 2 つの課題は、シリカナノ粒子に刺激に応じて分解する性質を付与することにより克服することが可能です。刺激に利用される物質の一つにグルタチオン (GSH) があります。GSH は細胞内で最も多量に存在する抗酸化剤であり、細胞の酸化還元状態の恒常性維持に貢献しています。GSH の細胞外濃度は 2-20  $\mu\text{M}$  ほどですが、細胞内濃度は 1-10 mM (一般的には 1-2 mM) であり、細胞外濃度と細胞内濃度に大きな差があるため、この濃度差を利用した GSH 応答分解性シリカナノ粒子に関する研究が進められてきました。GSH はジスルフィド結合やポリスルフィド結合とチオール交換反応する性質があるため、GSH 応答分解性シリカナノ粒子はジスルフィド結合やポリスルフィド結合を持つという特徴があります。チオール有機シリカナノ粒子は多数のチオール基を持つため、ジスルフィド結合を形成している可能性があります。上記の背景から、各種のチオール有機シリカナノ粒子の構造解析を行い、GSH 応答分解性のチオール有機シリカナノ粒子の探索を実施しました。

2 種類のチオール有機シラン、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン (MPMS) と 3-メルカプトプロピル(ジメトキシ)メチルシラン (MPDMS) を原料として、MPMS ナノ粒子と MPDMS ナノ粒子を合成し、透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察、動的光散乱法 (DLS)、核磁気共鳴法 (NMR)、ラマン分光法、Ellman's test などを用いて構造解析を行いました。その結果、MPMS ナノ粒子にはジスルフィド結合がほとんど存在しないのに対し、MPDMS ナノ粒子にはジスルフィド結合が豊富に存在する、という結果が得られました。MPDMS ナノ粒子にジスルフィド結合が存在するという結果は軟 X 線を用いた光電子分光法による解析結果とも一致しており、またジスルフィド結合が豊富に存在するため MPDMS ナノ粒子は GSH と反応して分解されることが示されています<sup>5</sup>。しかし、MPDMS ナノ粒子は MPDMS がメチル基を持つために疎水的であり、そのために凝集性を示しました。凝集性のナノ粒子は医療応用に適していないため、粒子の分散性を向上させる必要が生じました。もう一方の MPMS ナノ粒子はジスルフィド結合には乏しいものの、水中での分散性は良好でした。以上の結果より、MPMS と MPDMS を混合して MPMS-MPDMS ハイブリッドナノ粒子を合成しました。合成した MPMS-MPDMS ハイブリッドナノ粒子について構造解析した結果、予想どおりに MPMS ナノ粒子と MPDMS ナノ粒子の性質を併せ持つことが判明し、ジスルフィド結合を持ちつつもある程度の分散性をもつナノ粒子を合成できたことが示されました。

MPMS-MPDMS ハイブリッドナノ粒子の GSH 応答分解性について検討するため、GSH と MPMS-MPDMS ハイブリッドナノ粒子をインキュベーションし、ナノ粒子の形態変化について TEM を用いて調査しました。また、Ellman's test より反応により消費された GSH について定量しました。その結果、MPMS-MPDMS ナノ粒子は MPDMS ナノ粒子と同程度 GSH による分解を受けることが明らかとなりました。さらに、蛍光色素ローダミン B を含む MPMS-MPDMS ナノ粒子を合成し、GSH とインキュベーションしたところ、ローダミン B の粒子からの放出が観測されました。GSH を加えずにインキュベーションした場合にはローダミン B が放出されなかったことから、ローダミン B の放出は GSH と粒子の反応により引き起こされたことが証明されました。

上記の結果は、MPMS-MPDMS ハイブリッドナノ粒子が GSH 応答分解性ナノ粒子であり、薬物の細胞内送達のための運搬体として有望であることを示しています。GSH とナノ粒子の反応は粒子表面で起こるため、反応を促進させるためにはナノ粒子の表面積を大きくする必要があります。そのため、DDS における薬物運搬体として使用するには、より小さい粒径の MPMS-MPDMS ハイブリッドナノ粒子の合成や、メソポーラス構造を持つ MPMS-MPDMS ハイブリッドナノ粒子の合成が必要であると考えています。

以上の研究成果を総括すると、卵巣がんに対する化学療法への応用を目指した  $\beta$ -ガラクトシダーゼ応答性のプロドラッグ候補化合物を開発し、それをがん組織へ効率的に送達するための薬物運搬体候補ナノ材料として MPMS-MPDMS ハイブリッドナノ粒子を見出しました。がん組織に対する「魔法の弾丸」を開発するには道半ばではありますが、目標に向けた一定の成果は得られたものと考えています。今後は研究を通して判明した問題を解決していくことで、「魔法の弾丸」の実現に向け、さらなる努力を続けていく所存です。

#### < 引用文献 >

- 1) M. Borowiak, *et al.* Photoswitchable inhibitors of microtubule dynamics optically control mitosis and cell death. *Cell* **2015**, *162*, 403-411.
- 2) A. J. Engdahl, *et al.* Synthesis, characterization, and bioactivity of the photoisomerizable tubulin

polymerization inhibitor azo-combretastatin A4. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4546-4549.

3) D. Asanuma, *et al.* Sensitive  $\beta$ -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal tumors *in vivo*. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6463.

4) E. Blanco, *et al.* Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 941-951.

5) H. Mekar, *et al.* Biodegradability of disulfide-organosilica nanoparticles evaluated by soft X-ray photoelectron spectroscopy: cancer therapy implications. *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, *2*, 479-488.

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

1) T. Doura, T. Nishio, F. Tamanoi, M. Nakamura.

Relationship between the glutathione-responsive degradability of thiol-organosilica nanoparticles and the chemical structures.

*J. Mater. Res.* **2019**, *34*, 1266-1278. DOI: 10.1557/jmr.2018.501

2) T. Doura, F. Tamanoi, M. Nakamura.

Miniaturization of thiol-organosilica nanoparticles induced by an anionic surfactant.

*J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *526*, 51-62. DOI: 10.1016/j.jcis.2018.04.090.

3) T. Doura, K. Takahashi, Y. Ogra, N. Suzuki.

Combretastatin A4- $\beta$ -galactosyl conjugates for ovarian cancer prodrug monotherapy.

*ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 211-214. DOI: 10.1021/acsmchemlett.6b00427.

### 〔学会発表〕(計2件)

(1) 堂浦 智裕、安藤 英紀、中村 教泰

チオール有機シリカナノ粒子の新規サイズ制御合成法の開発と蛍光性ナノ粒子合成への応用  
第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年

(2) 堂浦 智裕、高橋 一聡、小椋 康光、鈴木 紀行

卵巣がん化学療法を指向したコンブレタスタチン A4 プロドラッグの開発

日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会、2017年