

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659020

研究課題名（和文） 外部刺激に応答して崩壊するナノキャリアシステムの設計

研究課題名（英文） Design of X-ray responsive drug carriers composed of oligodeoxynucleotides

研究代表者

田邊 一仁 (TANABE KAZUHITO)

京都大学大学院工学研究科・准教授

研究者番号：40346086

研究成果の概要（和文）：

薬剤を病変した組織にだけ選択的に運搬し、局所的に機能させるドラッグターゲティングが有害な副作用を減らし、飛躍的に治療効果を向上させる有効な手法として注目されている。本研究では、DNA を基盤とした新しいキャリアシステムを構築すると共に、X 線をトリガーとして薬剤を放出する分子システムを構築した。

研究成果の概要（英文）：

Stimuli-responsive nanocarriers offer favorable properties for target-specific delivery of drugs. The carriers keep the toxic drugs encapsulated in their hydrophobic core, while the drugs can be readily released and exhibit their original toxicity once appropriate stimuli are applied. Here, we prepared novel drug carriers consisted of DNA oligomer and radiation-activated carriers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー・生物有機化学

1. 研究開始当初の背景

薬剤を病変した組織にだけ選択的に運搬し、局所的に機能させるドラッグターゲティングが有害な副作用を減らし、飛躍的に治療効果を向上させる有効な手法として注目されている。中でも、薬剤を内包し、病変部まで運搬して放出するナノキャリアシステムは、最少量の薬剤投与による最大の薬効発現と副作用低減が期待され、がん代表される重篤な疾患の治療に応用されつつある。しかしながら、現状では、内包された薬剤の放出が不完全なため、病変部への集積が達成されたにも拘らず、期待された薬効が発現しない場合も多い。

このような背景の中、病変部に確実に薬剤を運搬し、放出も制御可能なナノキャリアシステムが求められていた。

申請者はこれまで、X 線照射下で活性を発現するプロドラッグの開発を行い、その過程で数種類の X 線応答性置換基を見出してきた。この置換基は、X 線照射下で結合開裂反応を起こす機能をもつ。本研究では、X 線応答性置換基を両親媒性化合物に導入し、薬剤を内包するナノキャリアを作成することを目指した。このキャリアは、X 線を照射されたときに、導入された X 線応答部が化学反応を起こす結果、ミセルは崩壊し、薬剤が放出される。

他方、申請者はこれまで光機能性人工核酸の開発に関する研究を行い、メチル化シトシンを光酸化反応を活用して検出するシステムの開発に取り組んできた。その過程で、種々の人工核酸の合成法を確立した。本研究ではその知見を基に、新たなナノキャリアシステムをデザインする。

2. 研究の目的

本研究では、現行のナノキャリアが持つ課題を克服すべく、効果的に会合体を形成し、薬剤を内包する両親媒性化合物を設計・合成すると共に、X線照射をトリガーとして速やかに薬剤を放出するナノキャリアシステムを構築することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では計画の実現のために下記に示す2つの研究テーマを進めた。

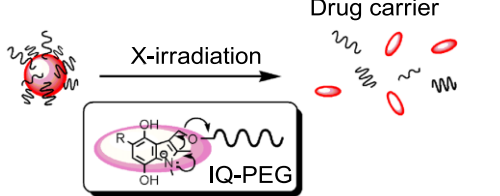
(1) 新規 DNA 型ドラッグキャリアの開発

近年、様々な機能を示す修飾DNAが盛んに研究され、新しいバイオ材料として注目されている。そこで、DNAオリゴマーのドラッグキャリアとしての可能性を調べるため、リン酸部にアルキル鎖を介してアセチレン部位を導入した両親媒性DNAオリゴマーを合成し、会合体形成能および内包特性を調べた。

(2) X線照射による薬剤放出システム

X線照射によって崩壊し、内包した薬剤を放出するドラッグキャリア分子の開発を進めた。親水性化合物PEGの末端に疎水性の放射線応答分子インドールキノ誘導体を導入した両親媒性化合物IQ-PEGを合成し、物性及びX線照射下における反応特性を調べた。

Drug carrier



4. 研究成果

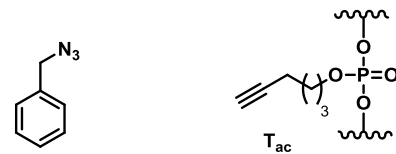
(1) 新規 DNA 型ドラッグキャリアの開発

5つのアルキルアセチレン部を連続したリン酸部に導入した11量体のDNAオリゴマー(ODN 1)を合成した後、ベンジルアジド、アスコルビン酸ナトリウム、Cu-TBTAを添加し、クリック反応による化学修飾を行った。反応後HPLCで生成物を分取し、MALDI-TOF MSで分析したところ、5つのアセチレン部すべてにベンジル基が導入されたODN 2が生成したことがわかった。

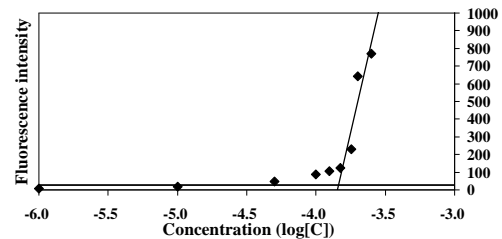
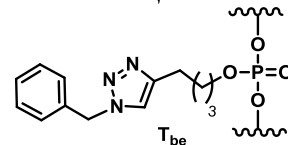
次に、ODN 1とODN 2の会合体形成能を疎水性の蛍光色素ナイルレッドを用いて調べた。各種濃度のODN 1とODN 2共存下でのナイルレッドの蛍光強度を測定し、臨界会合体形成濃度(CAC)を求めたところ、それぞれ169 μM (ODN 1)、146 μM (ODN 2)であった。このことからODN 1およびODN 2は水溶液中で会合体を形成し、ナイルレッドを内包できることがわかった。

た。

ODN 1 : 5'-T_{ac}T_{ac}T_{ac}T_{ac}T_{ac}T_{ac}TTTTTT-3'



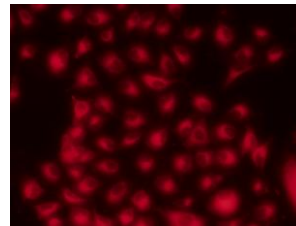
ODN 2 : 5'-T_{be}T_{be}T_{be}T_{be}T_{be}TTTTTT-3'



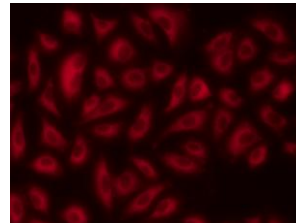
Plot of Fluorescence intensity of Nile red (10 μM) vs ODN 2.

さらに、ナイルレッドを薬剤に見立て、細胞内への運搬実験を行った。ODN 1及びODN 2会合体にナイルレッドを内包させた後、A549細胞に投与したところ、細胞内からナイルレッドの強い発光が確認できた。すなわち、両親媒性DNAはドラッグキャリアとして駆動することが示された。

ODN 1

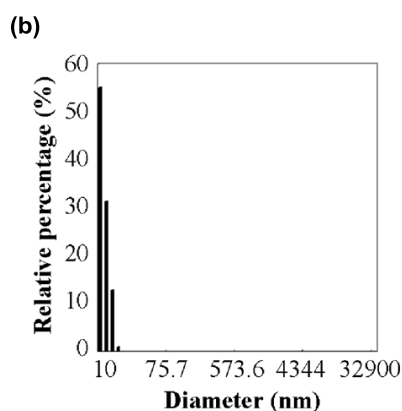
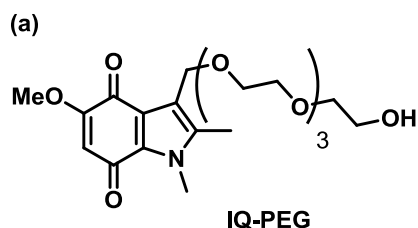


ODN 2



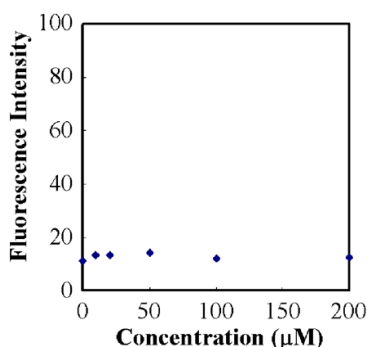
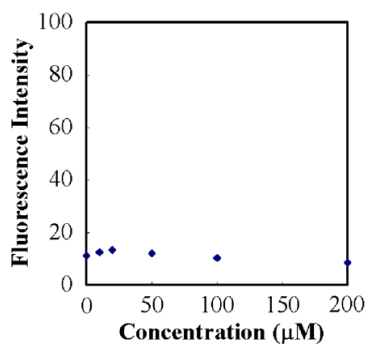
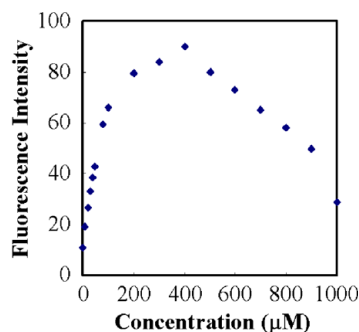
Fluorescence emission from A549 cells. The cells were incubated with ODNs encapsulating Nile red. After washing, the cells were observed by fluorescent microscopy.

(2) X線照射による薬剤放出システム
IQ-PEGの会合体形成挙動を動的光散乱(DLS)を用いて観察した。その結果、2mMの濃度でIQ-PEGは会合体を形成し、11.3 nmの粒径を持つことがわかった。分子模型から算出したIQ-PEGの分子長は1.2-1.5 nmであることから、この化合物は球状ミセルのような明確な構造とは異なるやや複雑な構造をもつ会合体を形成していると考えられる。



(a) Chemical structure of IQ-PEG. (b) Size distribution of the assembly of 2 mM IQ-PEG obtained from histogram analysis of dynamic light scattering (DLS).

次に、1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH)を用いて臨界ミセル濃度 (CMC) 測定を試みた。DPHは、疎水的環境下では高い量子収率で蛍光を発する一方で、親水的環境下の蛍光量子収率は大きく低下する。すなわち、両親媒性化合物が会合体を形成すると、会合体内部の疎水環境下にDPHが包接され、強い蛍光を発するように発光挙動が変わる。DPH水溶液にIQ-PEGを加えたところ、いずれの場合も両親媒性化合物の濃度が高くなるに従い、低濃度側ではDPHの蛍光強度が増加した。しかしながら、一定の濃度より高濃度になると、蛍光強度は減少に転じることがわかった。一方、参照実験としてインドールキノン (IQ) およびトリエチレングリコールを用いて、同様の実験を行なった。しかし、蛍光強度に変化は見られなかった。これらの結果は、測定用の蛍光試薬と両親媒性化合物間にCMC計測に不都合な消光作用があることを示しており、結果的にIQ-PEG会合体のCMCを算出できなかった。

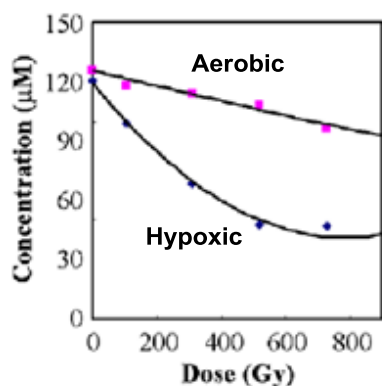


Fluorescence emission intensity of DPH in the presence of IQ-PEG (a), indolequinone (b) triethyleneglycol (c). All samplex contained 1 μ M DPH.

次に、IQ-PEGの放射線一電子還元反応特性を調べた。2-methyl-2-propanolを含有する希薄水溶液の放射線分解により水和電子が選択的に生成し、高い還元反応特性を示すことから、同水溶液にIQ-PEGを溶解し、低酸素条件下でX線を照射した。反応をHPLCで追跡した結果、IQ-PEGは効率よく分解することがわかった。続いて、有酸素条件下で同様にX線を照射したところ、低酸素条件下と比べて分解が顕著に抑制された。溶存酸素は水和電子の捕捉作用をもつことが知られていることから、IQ-PEGの分解反応は水和電子による一電子還元反応を経て進行することがわかった。なお、低酸素および有酸素条件下におけるIQ-PEGの消失G値はそれぞれ269.0nmol/J、44.9 nmol/Jであった。

以上のように、IQ-PEGは想定通りの機能を持ち、X線照射によって崩壊することがわかった。

今後、各種薬剤を内包させると共に、がん細胞や担癌マウスに投与し、実際に生体内で駆動するかを確認する予定である。



Decomposition of 0.12 mM IQ-PEG by the hypoxic or aerobic X-irradiation (0, 300, 500, 700 and 900 Gy). Sample solution contained 20 mM 2-methyl-2-propanol.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

Radiolytic Reduction Characteristics of Artificial Oligodeoxynucleotides Possessing 2-Oxoalkyl Group or Disulfide Bonds, Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S. *J. Nucleic Acids*, **2011**, ID816207.

Aggregate formation and radiolytic degradation of amphiphilic DNA block copolymer possessing disulfide bond, Tanabe, K.; Asada, T.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 7045–7047.

Radiolytic reduction characteristics of drug-encapsulating DNA aggregates possessing disulfide bond, Tanabe, K.; Asada, T.; Ito, T.; Nishimoto, S. *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23, 1909–1914.

〔学会発表〕 (計 3 件)

X-ray sensitive nanosize drug carrier composed of DNA amphiphiles, 浅田拓海・田邊一仁・西本清一 国際核酸化学シンポジウム 2011年11月 北海道大学

リン酸部にアルキン部位を持つDNAの特性評価及びクリック反応による機能化 安藤雄一郎・西本清一・田邊一仁 第6回バイオ関連化学シンポジウム 2012年9月 北海道大学

リン酸部にアルキン部を導入した人工核酸の機能 安藤雄一郎・西本清一・田邊一仁

第 93 日本化学会春季年会 2013 年 3 月 立命館大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ehcc.kyoto-u.ac.jp/eh32/home/web-content/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊一仁 京都大学大学院工学研究科

研究者番号：40346086