

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2013

課題番号：23850007

研究課題名(和文) 光重合型分子糊の開発と脳腫瘍治療への応用

研究課題名(英文) Development of Photo-polymerizable Molecular Glue for Brain Tumor Treatment

研究代表者

大黒 耕 (Okuro, Kou)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60614360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：生体高分子表面に接着するためのグアニジニウム基、フォトクリックケミストリーを利用した光重合における反応点であるテトラゾールおよびオレフィン分子内に有する分子糊モノマーを合成することに成功し、光照射によって接着性を発現する「光重合型分子糊」の開発に成功した。また、上記と類似の発想をもとに、光刺激によって接着性を永続的なものに変換する、「フォトクリックカブル分子糊」を開発した。さらに、上記とは異なる光応答性ユニットを導入し、機械的な力を生み出すことのできる「光応答性分子糊」を新たに開発した。

研究成果の概要(英文)："Photo-polymerizable molecular glue" having guanidinium ion, diaryltetrazole, and olefin was successfully synthesized. Photoirradiation to the monomeric glue resulted in the formation of polymeric molecular glue, which has high capability to adhere to the surface of biomacromolecules. In addition, based on a similar concept to the above, "photoclickable molecular glue", which can convert its non-covalent adhesion to covalent binding by light, was developed. Furthermore, another "photoresponsive molecular glue", which exerts mechanical force to the adhering surface, was also synthesized.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：機能物質化学

キーワード：分子糊 光応答性 フォトクリックケミストリー 抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

アルギニンの側鎖官能基として知られるグアニジニウム基は、カルボン酸などのオキシアニオン性官能基と塩橋を形成することで非共有結合的に相互作用する。申請者は、このグアニジニウム基を多数担持した一連の樹状高分子が多重の塩橋形成を介してタンパク質をはじめとする生体高分子表面に対して接着することを見出し、これらの高分子を『分子糊』と呼んでいる。分子糊の接着はタンパク質会合体の動的な挙動を凍結させることが明らかになっており、特に細胞分裂の駆動力となる微小管の重合・脱重合挙動を停止させる働きは、がん細胞の増殖を抑制する抗がん剤としての応用が強く期待できる。表面の接着安定化という作用機構は従来の微小管安定化剤の機構とは異なるため、薬剤耐性や免疫機構などの障害をクリアできる全く新しい抗がん剤となる可能性がある。

一方、分子糊の生体高分子への接着はほぼ無差別に行われるため、特定の細胞のみに作用させることが難しく、患部への選択性が医学的応用への課題となっている。本研究課題では、接着性のない低分子化合物から分子糊を特定の細胞内で選択的に構築することで、部位選択的に機能する新規抗がん剤を作り出すことに挑戦する。ここでは、細胞内で使用できる共有結合形成反応として光活性化ニトリルイミンとアクリル酸誘導体の1,3-双極子環状付加反応に着目している。この反応は『フォトリックケミストリー』とも呼ばれるほどに収率よく、かつ迅速に進行し、既に大腸菌内においても利用可能であることが報告されている。光照射は生体内の分子に働きかける最も簡便な方法の一つであり、二光子吸収過程を利用することで微細な領域に存在する分子を励起することができる。これは、複雑な生体組織の治療に極めて有効である。この性質を利用することで、光照射部位のみに作用し、副作用を全く示さない精緻な癌治療システムが構築可能となり、投薬治療が困難とされる脳腫瘍治療への応用が期待できるものである。

2. 研究の目的

(1) 光重合による分子糊の細胞内構築

フォトリックケミストリーでの反応点となるテトラゾール、アクリルアミドと、生体高分子への接着モチーフとなるグアニジニウム基を分子内に有する「分子糊モノマー」(図3)を合成する。反応後に生成するピラゾリン誘導体は蛍光性を示すため、細胞内での光重合反応の進行を蛍光顕微鏡で可視化し、フローサイトメトリーで定量することができる。細胞生存率、細胞周期への影響などを併せて調査することで、分子糊の光重合による抗がん活性とそのメカニズムを詳細に調べる。また、二光子励起による光重合の可否を調査する。二光子励起が適用可能であ

れば、生体による吸収が少ない長波長の光を利用することができ、より深部の組織への治療が可能になる。

(2) 光重合型分子糊の脳腫瘍治療への応用

脳毛細血管内皮細胞に存在する血液脳関門と呼ばれる異物排斥機構は、生命活動に必要な栄養素などを除く大部分の物質の通過を制限するため、脳腫瘍を始めとする脳疾患の投薬治療における最大の課題となっている。血液脳関門を通過し、脳組織へ到達するために必要とされる条件は明確には解明されていないが、一般的に(a)低分子量、(b)カチオン性の化合物が有効であるとされている。本研究課題で提案した分子糊モノマーが上記の性質を兼ね備えていることを利用し、血液脳関門を突破し、さらに光照射によって脳組織の特定部位に作用する新規脳腫瘍治療法の開拓に挑戦する。本研究では脳腫瘍移植マウスに対する抗腫瘍活性の評価までを行う。

3. 研究の方法

(1) 分子糊モノマーの合成

低分子量の分子糊前駆体として、テトラゾール、アクリルアミド、グアニジニウム基をもつ化合物(分子糊モノマー)を合成した。合成の容易さ、脳内輸送性の観点から、各機能団を短鎖アルキル基で連結した単純な分子設計を採用した。

(2) 緩衝溶液中での光照射による重合反応の評価

はじめに生理的な条件(pH、温度)において緩衝溶液中での光重合を試みた。反応の進行は、生成するピラゾリン誘導体の吸収および蛍光の変化から確認した。また、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)で高分子量化合物の生成を確認した。また、生体高分子への接着性発現を評価するために、モデル系としてデオキシリボ核酸(DNA)共存下での光重合を行い、アガロースゲル電気泳動で観察した。

(3) 分子糊の細胞内光重合による抗腫瘍活性評価

取扱いの容易な腫瘍細胞であるHep3Bを用い、分子糊モノマーを含む培地中で一定時間インキュベートした後に光照射を行った。生成するピラゾリン誘導体の蛍光を利用して細胞内重合を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。同時に、生細胞判定用の染色試薬を用いて細胞生存率を定量し、抗腫瘍活性を評価した。

以下、(4)(5)については当初の研究課題から発展した課題として取り組んだ。

(4) 生体高分子への接着を永続化する「フォトリックカプル分子糊」の開発

生体内において目的の部位に分子糊を作用させるというコンセプトを発展させ、非共有結合的な接着を共有結合的に固定化できる分子糊を合成に着手した。光反応部位であるベンゾフェノンとグアニジニウム基を一對として持つ機能団を末端に有する dendrimer を合成した。種々のタンパク質をモデルとして分子糊の接着と照射による固定化を電気泳動および顕微鏡観察によって行った。

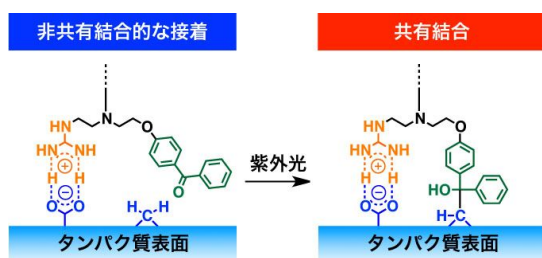
(5) 生体膜に機械的な摂動を与える「光応答性分子糊」の開発

光に応答して分子構造を変化させるアゾベンゼンをコアとした双頭性 dendrimer 型分子糊を合成した。卵黄ホスファチジルコリンからなるリポソームを調製し、これと上記の光応答性分子糊を混合した後に光照射を行い、リン脂質二重膜上のイオン透過を観察した。

4. 研究成果

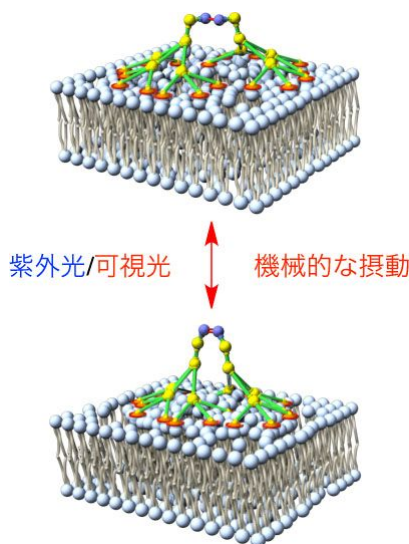
(1) 光重合型分子糊モノマーの合成に成功した。光照射に応答して速やかに重合し、接着性を発現することを DNA との相互作用解析によって確認した。また、分子糊モノマーが弱く接着するオキシアニオン性の表面が共存する場合、この重合が促進されることが明らかとなった。細胞内での分子糊の光重合にも成功し、光照射の有無で細胞死を誘導することにも成功した。これは、部位選択的に癌治療を行うための基本的技術となりうる。

(2) 接着ユニットであるグアニジニウム基と近接する位置にベンゾフェノンを導入することで、光刺激に応答して接着対象との間に共有結合を形成し、その接着を永続的に固定化することができる「フォトクリッカブル分子糊」の合成に成功した。モータータンパク質であるキネシンの微小管上における滑り運動を光刺激で永続的に固定化することに成功した。微小管-キネシンが生み出す運動は、細胞内物質輸送や細胞運動などに重要な役割を担うため、これらの生体機能制御を可能にする分子ツールとして期待できるものである。



(3) アゾベンゼンをコアにもつ双頭性 dendrimer 型の「光応答性分子糊」の合成に成功した。アゾベンゼンの光異性化に伴う構造

変化が機械的な力として接着表面であるリン脂質二重膜に伝達し、膜のイオン透過性を向上させることを見出した。光刺激に応答してイオン透過を制御できるため、シグナル伝達などの生理現象の制御へと繋がり、新経験の疾患治療への応用が期待される。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

内田紀之、大黒 耕、新谷大和、凌霄、有賀隆行、富重道雄、相田卓三、Photoclickable Dendritic Molecular Glue: Noncovalent-to-Covalent Photochemical Transformation of Protein Hybrids, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, Vol. 135, 2013, pp. 4684-4687 DOI: 10.1021/ja401059w

鈴木雄士、大黒 耕、竹内 工、相田卓三、Friction-Mediated Dynamic Disorder of Phospholipid Membrane by Mechanical Motions of Photoresponsive Molecular Glue: Activation of Ion Permeation, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, Vol. 134, 2012, pp. 15273-15276 DOI: 10.1021/ja3074424

[学会発表](計 3 件)

大黒 耕、鈴木雄士、竹内 工、相田卓三、光応答性モレキュラグルー：機械的な力で生体膜構造に摂動を与える接着性パッチの開発、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 23 日、立命館大学 びわこ・くさつキャンパス、滋賀

大黒 耕、根本葉玲、鈴木雄士、竹内 工、金原 数、片岡一則、相田卓三、Dendritic Molecular Glues - Adhesive Interface for Biomacromolecules、International Conference on Emerging Advanced

Nanomaterials 2012, 2012年10月23日、
Brisbane, Australia
大黒 耕、根本葉玲、金原 数、大庭 誠、
西山伸宏、片岡一則、相田卓三、生体高
分子表面へと接着するモレキュラーグル
ーの開拓とタンパク質・核酸デリバリー
への応用、第61回高分子年次大会、2012
年5月31日、パシフィコ横浜、神奈川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://macro.chem.t.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大黒 耕 (OKURO, Kou)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：60614360