

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410184

研究課題名(和文) 薬剤の捕捉や送達及び放出が制御できる新規分子システムの開発

研究課題名(英文) Development of the new molecular system which can control capture of drugs, a delivery and release

研究代表者

安東 勢津子 (Ando, Setsuko)

福岡大学・理学部・教育嘱託

研究者番号：20078562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：テトラペプチド有する水溶性シクロファン(ホスト:CP-N3-LKLA-Fmoc)を合成した。同定はHPLC, MALDI-TOF-MS, 1H-NMRで確認した。ホスト添加に伴ってゲスト(2,6-ANS)由来の蛍光強度が上昇したことから同ホストはゲストを捕捉できることが判った。またBenesi-Hildebrand解析からホスト-ゲストの結合定数($K=16,000/M^{-1}$)を算出した。

トリプシン分解後のFmoc-ALK-OHをHPLC, MALDI-TOF-MSで確認し経時に伴うゲストの蛍光強度の減少からゲストの放出が示唆された。反応速度の遅さを利用した徐放システムはDDSに有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Water-soluble cyclophane with tetrapeptide (host:CP-N3-LKLA-Fmoc) was synthesized and identified by HPLC, MALDI-TOF-MS, and 1H-NMR spectroscopy. Upon addition of the host to aqueous solutions containing the guests (2,6-ANS), a fluorescence intensity originated from the guest molecules was subjected to increase, was suggested that the guest molecules are incorporated into the hydrophobic cavity provided by the host. The host-guest binding constant (K) of the host toward 2,6-ANS was calculated to be $16,000 M^{-1}$ on the basis of Benesi-Hildebrand relationship.

Tryptic digestion of the host afforded the peptide fragments (Fmoc-ALK-OH), which was confirmed by HPLC and MALDI-TOF-MS measurements. Upon addition of trypsin to a buffer solution containing host-guest complexes, the fluorescence intensity originated from the guest molecules decreased gradually. The degradation of the present cyclophane and the slow guest-release under enzymatic conditions was thought to be useful for DDS systems.

研究分野：有機生物化学

キーワード：ホストゲスト化学 ペプチド化学 アシルヒドラゾン結合 ペプチド結合 クラスター効果 トリプシン トリプシン基質

f 1 . 研究開始当初の背景

薬による副作用を防ぐために、狙った場所(細胞や組織)に効率良く薬物を送り込む薬物送達システムの開発が注目されている。薬物送達システムに関する従来の研究は、高分子ナノミセルやリポソームを用いるものがほとんどであり、医学分野への応用として期待が高い。しかし、基礎科学の学術的な面からは高分子ナノミセルが分子量に分布をもつ高分子であるがゆえに、そもそも分子構造がはっきりと解析できない。また、高分子ナノミセルやリポソームは会合体を形成することで初めて機能を発揮するが、最適な粒径や官能基の数をもつ会合体を再現性よく調製することは困難である。そのため、分子構造がはっきりしている新規分子を用いて薬物の捕捉や放出の機構を詳細に解析でき、かつ制御できる薬物送達システムの開発が切望されている。親水性側鎖を導入した水溶性シクロファンは、その疎水性空洞の大きさや形状に適した疎水性のゲスト(薬物)を選択的に取り込む。一方、天然の細胞膜レセプターにおいては、レセプター単独のリガンドに対する結合力は弱いものの、数多く寄り集まることで結合力が飛躍的に増大する“クラスター効果”が知られている。すなわち、例えば2個のレセプターが集まれば、リガンドに対する結合力は2倍ではなくそれ以上に飛躍的に増大する。これに鑑みて、我々は5個のシクロファンを共有結合で連結したシクロファン5量体を合成することに成功している。人工宿主として疎水性ゲストに対する結合力は、単純シクロファンと比較して1200倍に増大した(5倍ではなく、1200倍である)。そこで、従来の強い共有結合を用いるのではなく、可逆的で弱い共有結合を用いてシクロファン多量体を合成し、外部刺激によってシクロファン多量体から単量体に解裂させることで薬物に対する結合力を低下させて放出させようと考えた。最終的には、細胞内への薬物導入とリソソ-

ムの弱酸性環境下に応じた薬物

放出が可能な分子システムを構築しようと考えた。

2 . 研究の目的

薬物の捕捉や放出が自在に制御でき、狙った細胞内に薬物を効率よく送り届ける分子システムを開発することが目標である。具体的には、可逆的で“弱い共有結合”を利用して複数個のシクロファンを連結したシクロファン多量体(宿主)を合成し、クラスター効果を反映して薬物(ゲスト)を強く捕捉させる。次に、ホストゲスト複合体のまま細胞内へ薬物を送達させる。細胞内リソソムの弱酸性環境下においてシクロファン多量体が加水分解され単量体に解裂することで、クラスター効果の解消とともに薬物が細胞内に放出される分子システムを構築する。

3 . 研究の方法

(1) 可逆的で弱い共有結合で連結したシクロファン多量体の合成

ペプチドで連結したシクロファン多量体の合成:

先ず中心となる水溶性シクロファンを合成し、そのシクロファンとタンパク質分解酵素であるトリプシンの作用を受けると考えられるテトラペプチド(Fmoc-Ala-Ala-Lys(BOC)-Ala-OH)とペンタペプチド(Fmoc-Ala-Ala-Ala-Lys(BOC)-Ala-OH)を固相合成法で合成し、シクロファンの4箇所これらペプチドを、スペーサーとして導入する。ペプチドの末端にシクロファンを結合させシクロファン五量体合成する。消化酵素により分解を受けるペプチドを連結部に用いたシクロファン多量体を合成する。例えば、消化酵素の一つであるトリプシンに認識され切断されるリジンを含むペプチドを固相合成法により合成し、このペプチドを用いてシクロファンを連結したシクロファン多量体を合成する。細胞内では消化酵素により分解を受け、薬物をより素早く

放出することができるものと期待できる。

ターゲティング能を有するシクロファン多量体の合成：

標的細胞に薬物を送達させるために細胞膜に親和性のあるカチオン性の側鎖や糖鎖を導入したシクロファン多量体を合成する。一方、細胞内に送り込む薬物に関しては、核内においてトポイソメラーゼ阻害活性を示す抗がん剤などを想定している。それゆえ、核移行シグナルとして知られるペプチド（PKKKRKV など）を導入したシクロファン多量体を合成する。ペプチドの合成はFmoc 法による固相合成機を用いる。

(2) シクロファン多量体から単量体への解離および薬物に対する結合力の制御

消化酵素によるシクロファン多量体から単量体への分解：

シクロファン多量体を含む水溶液に消化酵素を添加して、シクロファン多量体から単量体への解離を促し、その過程を評価する。具体的な実験例としては、基質ペプチドで連結したシクロファン多量体の水溶液にトリプシンを添加して単量体への分解過程をMALDI-TOFMS, 1H-NMR, HPLC などを用いて追跡し解離速度についての定量的な評価を行う。

シクロファン多量体及び単量体の薬物に対する結合能の評価：

合成したシクロファン多量体およびその分解産物であるシクロファン単量体の薬物に対する結合定数をそれぞれ評価する。はじめに、モデル薬物として蛍光性プローブを用いた蛍光滴定実験などからそれぞれの結合能を算出し比較する。次に、具体的な薬物として抗がん剤であるカンプトテシンなどを用いてシクロファン多量体やシクロファン単量体が表示薬物捕捉能を1H-NMR などから評価し比較する。クラスター効果を反映してシクロファン多量体では薬物を捕捉できるが、シクロファン単量体では薬物に対する結合能が大きく低下することを確認する。

外部刺激によるシクロファン多量体の薬物に対する結合力の制御：

上記の結果を踏まえて、外部刺激などによるシクロファン多量体から単量体への解離、つまりクラスター効果の解消に伴う薬物の放出について検討する。

出来た分子システム用いて薬物の送達、輸送をめざす。検出には蛍光法や、細胞死の検出には、MMT法を用いる。

薬物を内包したシクロファン多量体の細胞内への取り込み：

薬物を内包したシクロファン多量体の細胞内への取り込み過程は蛍光顕微鏡観察および共焦点レーザー顕微鏡などにより評価する。まず、ローダミン基などで蛍光標識した薬物をシクロファン多量体に内包させる。この薬物を内包したシクロファン多量体の水溶液を細胞に一定時間を接触させる。その後、洗浄操作を繰り返した後に蛍光顕微鏡もしくは共焦点レーザー顕微鏡により細胞内での薬物の動態を観察する。

シクロファン多量体を用いた細胞内での薬物の放出

細胞内に取り込まれた後にシクロファン多量体から単量体への解離に伴って、薬物が放出される過程は蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)法を利用して評価する。具体的には、ローダミン基で蛍光標識した薬物とフルオレセイン基を有するシクロファン多量体の間でのFRET 効率を蛍光顕微鏡により評価する。薬物がシクロファン多量体に内包された状態では FRET が観測されると考えられる。一方、シクロファン多量体がりソソームの酸性条件下においてシクロファン単量体へ解離され薬物の捕捉能が低下し、薬物が放出されると FRET が解消されるものと期待できる。

薬物の放出による薬理活性の評価
細胞内で薬物放出に伴う細胞死を検討する。具体的にはMTT アッセイにより細胞の増殖活性や細胞死について定量的に評価する。正常

細胞とがん細胞との比較なども検討する。

4. 研究成果

水溶性シクロファン合成は割とうまく合成できたが、タンパク質分解酵素であるトリプシンの基質（テトラあるいは、ペントペプチド）の、水溶性シクロファンへの導入が厳しかった。水溶性シクロファンには、ペプチドを導入できるサイトが4カ所あるが、導入出来た箇所が1箇所から4箇所での4種が混合物として得られ、すべてに導入された目的物がなかなか得られなかった。

水溶性シクロファンにトリプシン基質が導入できたのではないかという推測はESI-Massで確認できたのであるが、それは3種が混合の状態を検出した。全てに導入できたとすれば、それはイオン化できない。それでリジン残基の側鎖保護基であるBOC基を脱離した後、TOF-Massを測定した。HPLCで2ピーク検出できたのでそれをゲルろ過して分取して、そのTOF-Massを測定した。

今回反応混合物を脱保護してTOF-Massを測定した結果、テトラペプチドの導入が確認できた。ペプチド結合の解離を確認することができた。

シクロファンの側鎖に、消化酵素の作用を受ける塩基性アミノ酸含有テトラペプチド(ALKL)を導入した。そしてトリプシンの加水分解作用による分解挙動、及びそれに伴うゲストの結合力の変化によるゲストの捕捉及び放出について検討した。本研究では疎水性ゲストの捕捉及び、トリプシンを用いたゲストの放出能を評価した。

合成して得られたホスト(CP-N3-LKLA-Fmoc)はHPLC、MALDI-TOF-MSで確認した。また¹H-NMRでは主要なピークも帰属できた。これらの結果より目的物の合成に成功したと考えている。ホスト添加(2,6-ANS)に伴うゲスト由来の蛍光強度の上昇を確認することができた。したがって、ホストに取り込まれることによって、ゲストのマイクロ環境が

親水性から疎水性へ変化したことが示唆された。また蛍光スペクトル変化からゲストに対する結合定数($K = 1.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)を算出した。これらの結果から、ゲストを捕捉することができたと考えている。トリプシンを用いた蛍光追跡実験では、経時に伴うゲスト由来の蛍光強度の減少が見られた。トリプシン酵素分解はHPLC、MALDI-TOF-MSで確認し、分解後のFmoc-A-L-K-OHを確認できた(下図)。

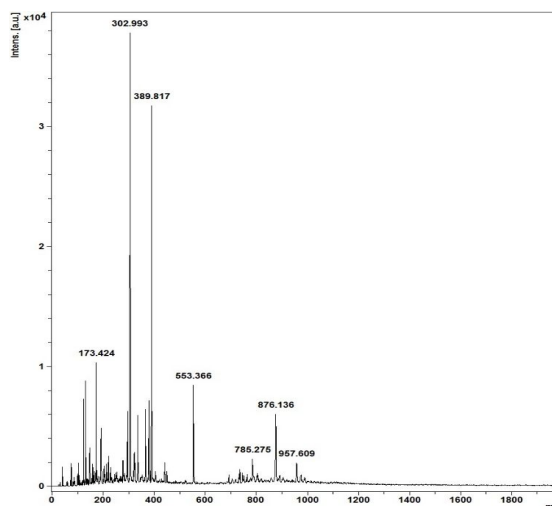
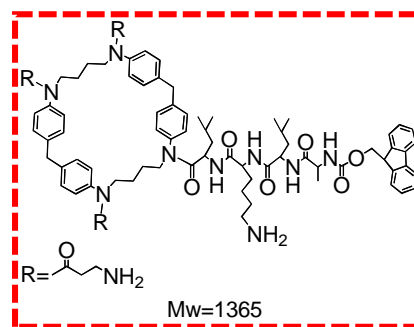
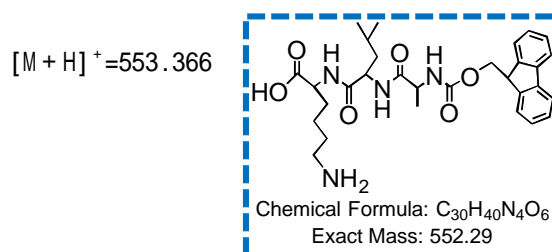


Fig. MALDI-TOF-MS 測定データ (Fmoc-ALK-OH)



また、ペプチド鎖末端のFmoc基の蛍光スペクトルを測定したところ、蛍光強度の上昇が見られた。以上の結果から、トリプシン酵素分解によるゲストの放出が示唆された。トリプシンの反応速度が遅いことから(半減期

一日)、リジン残基の C 末端側がシクロファン近傍に位置しているため、シクロファンの立体障害が要因だと考えている。しかし、このトリプシンの反応速度の遅さを利用した徐放システムは DDS に有用ではないかと考えている。

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 3 件)

D.M.D. Rasika, Toshihisa Ueda, L.N. Jayakody, L.D.B. Suriyagoda, K.F.S.T. Silva, S. Ando and J.K. Vidanarachchi, ACE-inhibitory activity of milk fermented with *Saccharomyces cerevisiae* K7 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC 12007, *J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka*, 査読有, 2015, 43 (2): 141-151

M. Matsuki, O. Hayashida, S. Ando, Synthesis of Water-Soluble Cyclophane Derivatives Having Four Peptide Chains, *Peptide Science* 2014, 査読有, 2015, 351-354

S. Toyofuku, H. Morita, S. Ando, K. Okuma, N. Nagahora, Y. Aizawa, H. Nakagawa, K. Shioji, Synthesis and Analysis of the Intracellular Molecular Dynamics of a Novel Fluorescent Probe Having a Myristoylated Peptide, *Peptide Science* 2014, 査読有 2015, 289-292

〔学会発表〕(計 6 件)

繁富 駿、安東 勢津子、草野 修平、林田 修、アシルヒドラゾン結合を有するシクロファン 2 量体の合成と pH 刺激による自己分解挙動、日本化学会 第 96 春季年会(2016)2016 年 3 月 24 日~2016 年 3 月 27 日同志社大学理工学部京田辺キャンパス

繁富 駿・林田 修・安東 勢津子、シクロファンを担持したポリアクリル酸の合成と性質、日本化学会 第 95 春季年会(2015)2015 年 3 月 26 日~3 月 29 日、日本大学理工学部船橋キャンパス

M.Matsuki, O.Hayashida, S.Ando, Synthesis and Characterization of Water-soluble Cyclophane Having Substrate Peptide Chains
日本化学会 第 95 春季年会(2015)2015 年 3 月 26 日~3 月 29 日、日本大学理工学部船

橋キャンパス

M.Matsuki, O.Hayashida, S.Ando, Synthesis of Water-Soluble Cyclophane Derivatives Having Four Peptide Chains
The Japanese of Peptide Society、2014 年 10 月 22 日~10 月 24 日、徳島大学大塚講堂

S. Toyofuku, H. Morita, S. Ando, K. Okuma, N. Nagahora, Y. Aizawa, H. Nakagawa, K. Shioji, Synthesis and Analysis of the Intracellular Molecular Dynamics of a Novel Fluorescent Probe Having a Myristoylated Peptide, The Japanese of Peptide Society、2014 年 10 月 22 日~10 月 24 日、徳島大学大塚講堂

松木宏太郎、林田修、安東勢津子、トリプシン基質で連結されたシクロファン五量体の合成、第 51 回化学関連支部合同九州大会、2014 年 06 月 28 日、北九州国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安東 勢津子 (Ando Setsuko)

福岡大学 理学部化学科 教育嘱託

研究者番号：20078562