

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25630380

研究課題名(和文) 合成分子の細胞内自己組織化を利用した選択的ガン細胞殺傷

研究課題名(英文) Cancer-cell death induced by intracellular molecular self-assembly of synthesized organic molecules

研究代表者

丸山 達生 (Tatsuo, Maruyama)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30346811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低分子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易いといった利点がある。そこで我々は、ガン細胞のみをゲル化によって死滅させることのできる超分子ゲル化剤の開発を行った。ガン細胞が過剰に分泌する酵素MMP-7に反応してゲル化が誘導される超分子ゲル化剤を設計し、その細胞毒性を測定した。その結果、このMMP-7応答性超分子ゲル化剤前駆体がガン細胞に毒性を示す一方、正常細胞には毒性を示さないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We report cancer cell death initiated by the intracellular molecular self-assembly of a peptide lipid, which served as a gelator precursor. The gelator precursor was designed to form nanofibres via molecular self-assembly, after cleavage by a cancer-related enzyme (matrix metalloproteinase-7, MMP-7), leading to hydrogelation. The precursor exhibited remarkable cytotoxicity to 5 different cancer cell lines, while it exhibited low cytotoxicity to normal cells that secreted small amounts of MMP-7. Cancer cells secrete excessive amounts of MMP-7, which converted the precursor into a supramolecular gelator prior to its uptake by the cells. Once inside the cells, the supramolecular gelator formed a gel via molecular self-assembly, exerting stress upon the cancer cells. The present study thus describes a new drug where molecular self-assembly acts as the mechanism of cytotoxicity.

研究分野：生物化学工学

キーワード：自己組織化 ナノファイバー 細胞内送達 ガン細胞 選択的殺傷 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

水をゲル化可能な超分子ゲル化剤(低分子ゲル化剤)は、ここ 10 年で主に開発されてきた新しい材料である。高分子ゲル化剤と大きく異なり、超分子ゲル化剤と呼ばれる比較的分子量の小さな分子が自己組織化によりナノファイバーを形成し、水をゲル化する (Fig. 1)。この超分子ゲル化剤は、低分子であるが故に、その分子構造を精密にデザインし、合成することができる。申請者は、ある特殊な分子構造を有する超分子ゲル化剤が、ガン細胞内に取り込まれ、ガン細胞を死滅させることを見出した。現在考えているこの殺傷機構は、細胞内に取り込まれた小さな超分子ゲル化剤分子が、細胞内でナノファイバーを形成・ゲル化し、細胞の生命機能に致命的なダメージを及ぼすというものである。このガン細胞殺傷機構は「細胞内での人工合成分子の自己組織化」という、従来の抗ガン剤と全く異なる作用機構である。申請者は、さらにこの超分子ゲル化剤を意図的にゲル化しない分子構造に設計し(超分子ゲル化剤前駆体)、そのままでは水中でゲル化しないが、特定のガン細胞が分泌する酵素にのみ応答して、ゲル化機能を発現させることに成功した。

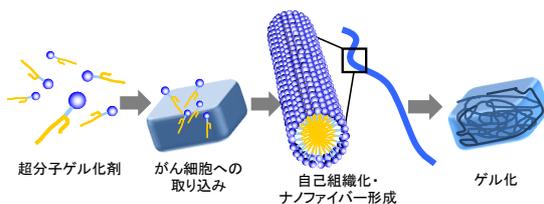


Fig. 1 Schematic illustration of gelation by supramolecular gelator.

2. 研究の目的

上記の発見を踏まえて、本研究では、適切に分子設計した小さな超分子ゲル化剤前駆体分子が、ガン細胞の機能により“活性状態”になり、ガン細胞内に輸送され、自己組織化を経て細胞死を引き起こすという、これまでにないメカニズムに基づくガン細胞殺傷システムの開発およびそのメカニズム解明に挑戦する。ここでは、ガン細胞が分泌する特定の酵素 (MMP) をターゲット酵素とし、正常細胞には影響せず、MMP 分泌量が多いガン細胞のみを選択的に死滅させることに挑戦した。

3. 研究の方法

固相ペプチド合成法を用いて酵素応答性超分子ゲル化剤前駆体 (palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg-Lys-CONH₂, Fig. 2) を合成した。このゲル化剤前駆体の精製には高速液体クロマトグラフィーを用い、MALDI-TOF/MS によって同定を行った。このゲル化剤前駆体の細胞毒性を確認するため、ヒト由来ガン細胞(HeLa, MIAPaCall,

SKBR3, MCF-7, A431 細胞), ヒト由来正常細胞(MvE, PE 細胞)を用いて生存率測定を行った。またこの抗ガン機構を解明するため、7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD)で蛍光ラベル化したゲル化剤 (NBD-C₁₂-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Leu-Gly-COOH)を新たに合成し、ゲル化剤の細胞内への取り込みや細胞内での自己組織化を観察した。



Fig. 2 Structure of the supramolecular gelator precursor.

4. 研究成果

・超分子ゲル化剤の物性評価

設計したゲル化剤前駆体 palmitoyl-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg-Lys-CONH₂ が酵素反応により加水分解され、生成する Palmitoyl-GGGHGPLG を、ゲル化能を評価するために合成した。これをリン酸緩衝液に、濃度 2 wt%となるようにとこし、これを凍結乾燥して、キセロゲルを作製した。このキセロゲルを TEM 観察したところ、太さ数十 nm のナノファイバーを観察できた (Fig. 3)。このナノファイバーがゲル化に大きく関与していることが示された。また DSC 測定の結果、Palmitoyl-GGGHGPLG は 74 °C 付近に sol-gel 転移温度を持つことが分かり、将来的なアプリケーションとして考えている生体温度 37 °C 下ではゲルの状態を維持できることが示された。

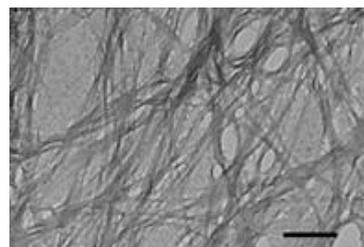


Fig. 3 TEM image of hydrogel (PBS buffer, pH7.5). Palmitoyl-GGGHGPLG was used at concentrations of 2.0 wt%.

・酵素応答性を有する超分子ゲル化剤前駆体

合成したゲル化剤前駆体水溶液(0.2 wt%)に、酵素 MMP-7 (2 µg/ml)を添加するとゲル化することを確認した (Fig. 4)。このゲル化剤前駆体は、強力な超分子ゲル化剤である Palmitoyl-GGGH とゲル化を阻害するペプチド部位により構成されている。プロリン(Pro)の「屈曲効果」とカチオン性アミノ酸配列による静電反発をゲル化の阻害要因として利用しており、MMP-7 の作用で Gly-Leu 間で結合が切断されると Palmitoyl-GGGHGPLG を主体にゲル化が誘導される。



Fig. 4 Photo of hydrogel induced by MMP-7 (2 $\mu\text{g/ml}$) in Tris-HCl buffer solution (pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2). The precursor concentration was 0.2 wt%.

合成したこのゲル化剤前駆体を、マウス由来ガン細胞である L929 cells とヒト由来ガン細胞である HeLa cells(共に濃度は 1.0×10^5 cell/ml)に投与したところ、終濃度 0.1 wt%で全て死滅させることに成功した (Fig. 5)。つまり、ガン細胞に対して強い毒性を示すこと

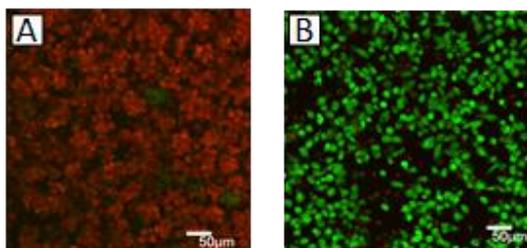


Fig. 5 Confocal laser scan microscope (CLSM) images of L929 cells adding the precursor solution (A) and MilliQ water(B).

が明らかになった。

この超分子ゲル化剤前駆体のガン細胞への毒性を確認するため、ヒト由来ガン細胞 (HeLa, MIAPaCall, SKBR3, MCF-7, A431 細胞), ヒト由来正常細胞 (MvE, PE 細胞) を用いて細胞毒性試験を行った。その結果、ゲル化剤前駆体はガン細胞に対して強い毒性を示すが、正常細胞に対してはそれほど毒性を示さないことが明らかとなった (Fig. 6a)。また本研究で用いているゲル化剤前駆体は細胞から分泌される MMP-7 によって、細胞毒性のあるゲル化剤へと変換される。そこで各細胞の MMP-7 活性量を測定したところ、ガン細胞が正常細胞に比べて高い MMP-7 活性を示した (Fig. 6b)。このことから MMP-7 活性と細胞毒性に相関があり、生成するゲル化剤の量が細胞毒性に関連があることが示唆された。

またこの酵素応答性超分子ゲル化剤前駆体の細胞毒性機構を解明するために、蛍光ラベル化したゲル化剤を HeLa 細胞培地に添加した。その結果、HeLa 細胞内部で蛍光物質由来の蛍光が観察された。更にその蛍光物質の一部に強いレーザー光を当てて消光させ、その蛍光物質が時間経過と共に拡散するか確認した (光褪色後蛍光回復法: FRAP)。その結果、蛍光褪色後 40 分が経過しても細胞内部の蛍光が回復しなかった (Fig. 7)。このことから細胞内部は流動性の低い状態、つま

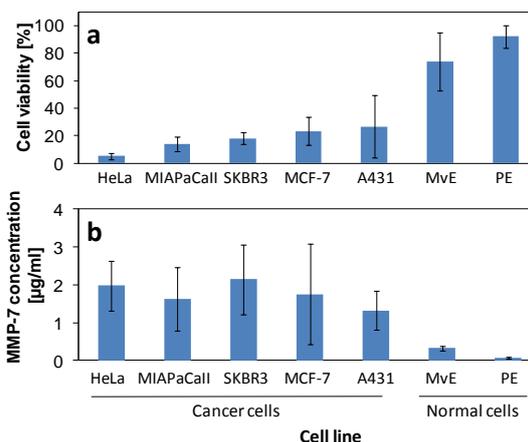


Fig. 6 (a) viability assays of cancer cells and normal cells after incubation with the precursor (0.025 wt%). (b) MMP-7 concentration in the culture media after culturing the cells.

りゲル化した状態であることが示唆された。

また超分子ゲル化剤前駆体により死滅後の細胞破砕液を用いたゲル化試験でゲルの形成を確認した (Fig. 8)。このゲル化試験溶液を MALDI-TOF/MS で分析したところ、MMP-7 により加水分解後のゲル化剤由来の MS スペクトルが観測された。このことから酵素応答性超分子ゲル化剤前駆体がガン細胞の分泌する MMP-7 によって加水分解され、ガン細胞内部で自己組織化することで細胞毒性を示していることが示唆された。

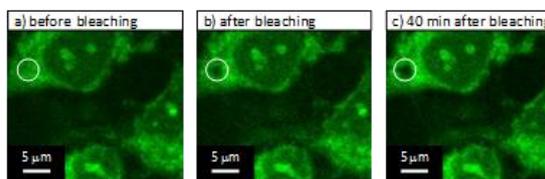


Fig. 7 CLSM images of HeLa cells after adding the supramolecular gelator (Pamitoyl-GGGHGPLG) and the gelator analog with fluorophore (NBD- C_{12} -GGGHGPLG). Fluorescence recovery after photobleaching was monitored.

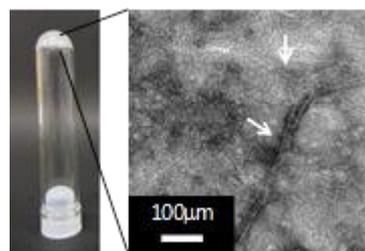


Fig. 8 Photograph and TEM image of the HeLa cell lysate gel after adding the supramolecular gelator precursor (the concentration: 0.025 wt%).

(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 4 件)

- 1) Y. Ishioka, N. Minakuchi, M. Mizuhata, T. Maruyama, Supramolecular gelators based on benzenetricarboxamides for ionic liquids. *Soft Matter*, 査読有, 10, 2014, 965-971.
DOI: 10.1039/C3SM52363B
<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2014/SM/C3SM52363B#!divAbstract>
- 2) T. Maruyama, Y. Fujimoto, T. Maekawa, Synthesis of gold nanoparticles using various amino acids. *J. Colloid Interf. Sci.*, 査読有, 447, 2015, 254-257.
DOI:10.1016/j.jcis.2014.12.046
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979714009990>
- 3) A. Tanaka, Y. Fukuoka, Y. Morimoto, T. Honjo, D. Koda, M. Goto, T. Maruyama, Cancer-cell death induced by the intracellular self-assembly of an enzyme-responsive supramolecular gelator. *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 137, 2015, 770-775.
DOI: 10.1021/ja510156v
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja510156v>
- 4) S. Yamamoto, S. Kitahata, A. Shimomura, K. Tokuda, T. Nishino, T. Maruyama, Surfactant-induced polymer segregation to produce anti-fouling surfaces via dip-coating with an amphiphilic polymer. *Langmuir*, 査読有, 31, 2015, 125-131.
DOI: 10.1021/la5043712
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la5043712>

[学会発表] (計 件)

- 1) 北畑繁、田中暁子、福岡佑記、丸山達生、「ペプチド誘導体の細胞内取り込み挙動の評価」、第 63 回高分子学会年次大会 (名古屋)、2014.5.28
- 2) 田中暁子、福岡佑記、森本祐加、本庄崇文、香田大輔、後藤雅宏、丸山達生、「酵素応答性低分子ゲル化剤によるガン細胞の殺傷」化学工学会第 80 年会 (東京)、2015.3.21
- 3) 片岡稔和、石岡佑美、水畑穰、丸山達生、「イオン液体をゲル化可能な新規低分子ゲル化剤の開発」、第 63 回高分子学会年次大会 (名古屋)、2014.5.
- 4) 片岡 稔和、石岡 佑美、水畑 穰、南 秀人、

丸山 達生、「低分子・高分子共存型新規ヘテロダブルネットワークゲルの開発」第 60 回高分子研究発表会(神戸)、2014.7.13.

- 5) 片岡 稔和、石岡 佑美、水畑 穰、南 秀人、丸山 達生、「低分子ゲル・高分子ゲル共存型新規ヘテロダブルネットワークイオン液体ゲルの開発」、化学工学会 第 46 回秋季大会 (福岡)、2014.9.
- 6) 片岡 稔和、石岡 佑美、水畑 穰、南 秀人、丸山 達生、「低分子ゲル・高分子ゲル混在型新規ヘテロダブルネットワークイオンゲルの調製」第 63 回高分子討論会(長崎)、2014.9.
- 7) 田中暁子、福岡佑記、本庄崇文、香田大輔、後藤雅宏、丸山達生、「酵素応答性超分子ゲル化剤の自己組織化が誘導する選択的なガン細胞死滅」第 63 回高分子討論会(長崎)、2014.9.
- 8) 田中暁子、福岡佑記、本庄崇文、香田大輔、後藤雅宏、丸山達生、「ガン細胞選択的に毒性を示す酵素応答性超分子ゲル化剤の開発」第 63 回高分子学会年次大会(名古屋)、2014.5.30
- 9) 田中暁子、福岡佑記、本庄崇文、香田大輔、後藤雅宏、丸山達生、「酵素応答性超分子ゲル化剤を用いたガン細胞の選択的な死滅」第 60 回高分子研究発表会(神戸)、2014.7.13.
- 10) 田中暁子、福岡佑記、本庄崇文、香田大輔、後藤雅宏、丸山達生、「超分子ゲル化剤の自己組織化を利用したガン細胞の選択的な死」化学工学会 第 46 回秋季大会 (福岡)、2014.9.
- 11) 丸山達生、田中暁子、福岡佑記、本庄崇文、香田大輔、後藤雅宏、「合成低分子の自己組織化によるガン細胞の死滅」第 63 回高分子討論会 (長崎)、2014.9.25
- 12) 田中暁子、福岡佑記、本庄崇文、香田大輔、後藤雅宏、丸山達生、「酵素応答性低分子ゲル化剤によるガン細胞の殺傷」化学工学会 第 80 年会(東京)、2015.3.20

[図書] (計 0 件)

なし。

[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。