

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870542

研究課題名(和文) 超分子ナノ抗癌剤：葉酸修飾メチル化シクロデキストリン分子ネックレスの構築

研究課題名(英文) Preparation of Folate-appended methylated cyclodextrin polyrotaxanes as novel biomaterials

研究代表者

東 大志 (Higashi, Taishi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20613409

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)：本課題では、シクロデキストリン分子ネックレスの誘導体を簡便に、高収率でしかも一段階で合成可能な方法を開発した。一般に分子ネックレスの誘導体を合成する際は多段階の合成反応が必要であるが、シクロデキストリン誘導体の一つであるジメチルシクロデキストリンを用いて、高温条件下で分子ネックレスを合成すると、わずか一段階で合成が進み、高収率で調製可能なことが明らかとなった。現在、本分子ネックレスの応用研究を展開している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared cyclodextrin molecular necklaces through one-pot synthesis. In general, multi-step synthesis is required to prepare the cyclodextrin molecular necklaces. 2, 6-Di-O-methyl cyclodextrins, one of the cyclodextrin derivatives, formed molecular necklaces at high temperature with high yield in one-pot. Currently, we perform the applied research of the molecular necklaces.

研究分野：物理系薬学

キーワード：シクロデキストリン ポリ擬ロタキサン ポリロタキサン ワンポット 超分子

1. 研究開始当初の背景

環状マルトオリゴ糖であるシクロデキストリン (CyD) は、内側の疎水性空洞内に種々のゲスト分子を取り込むことが知られ、比較的安価で機能性や生体適合性に優れることから、超分子の構成成分として汎用される。Harada らは、天然 CyD がポリエチレングリコール (PEG) やポリプロピレングリコール (PPG) などの直鎖状のポリマー分子とネックレス状の包接複合体、ポリ擬ロタキサンを形成することを報告した (図 1)。ポリ擬ロタキサンの構成成分は水溶性であるものの、これらが超分子複合体を形成すると、隣接する CyD 同士のヒドロキシル基が水素結合を形成し、水分子との水和が減弱する結果、難水溶性となる。さらに Harada らは、ポリ擬ロタキサンを単離し、有機溶媒に再分散させ、不均一状態を保ちながら、軸分子 (ポリマー) 末端に嵩高い置換基 (エンドキャップ) を導入すると、CyD をトラップしたポリロタキサン (図 1) を形成することを報告した。これらの報告を契機に、ポリ擬ロタキサンやポリロタキサンの合成・応用研究が飛躍的に発展し、分子スイッチや分子マシンなどへ応用展開されている。しかし、天然 CyD から成るポリロタキサンは、水に不溶であるため、医薬へ応用する際には制限がある。近年、ポリロタキサンの水溶性や機能性を向上させるため、ポリロタキサン誘導体の合成が行われるようになったが、その合成は多段階で収率も低い。一方、CyD の水酸基をメチル化したメチル化 CyD (M-CyD) は、細胞膜成分のコレステロールやリン脂質と相互作用し、細胞の機能変化を惹起する。M-CyD のポリロタキサンを調製可能であれば、非常にユニークな医療素材を開発できるもの考えられる。

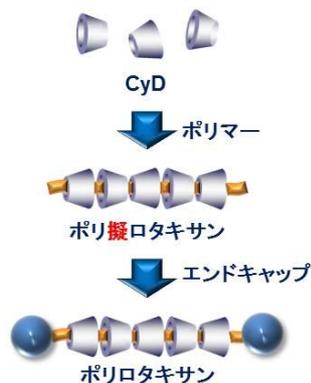


図 1. ポリ擬ロタキサンおよびポリロタキサンの合成スキーム

2. 研究の目的

本申請課題では、M- β -CyD ポリロタキサンの医薬への応用を最終目的とし、今回、高効率な M- β -CyD ポリロタキサンの合成法の開発を行った。M- β -CyD をポリロタキサン化すると、1) 分子量が増大し、血中滞留性が向上する、2) 軸分子により空洞が塞がれて

おり、それ自身で機能を発現しない、3) 一定の刺激でポリロタキサンが崩壊・分解する工夫を施すことにより、CyD の機能が発現する、などの特性が期待できる。しかし、M- β -CyD はポリロタキサンの前駆物質であるポリ擬ロタキサンを形成しないため、M- β -CyD ポリロタキサンを合成することは困難である。一方、CyD の 2 位と 6 位の水酸基をメチル化した 2, 6-ジ-O-M-CyD (DM-CyD) は、高温で脱水和し、分子会合しやすくなることが知られている。そこで本研究では、DM-CyD の温度依存的な会合特性を活用し、高温水中における DM- α -CyD および DM- β -CyD のポリ擬ロタキサン形成について検討した。さらに、これらのポリロタキサンの合成を行った。

3. 研究の方法

1) ポリ擬ロタキサンの調製

空洞径の小さな DM- α -CyD には PEG (M.W. 2,000) を、空洞径の大きな DM- β -CyD には PPG (M.W. 2,000) を混合し、水中に溶解した。結晶化温度の高い DM- α -CyD の場合は 70°C、結晶化温度の低い DM- β -CyD の場合は 40°C で 2 時間加熱した。

2) 構造解析

得られた沈殿物がポリ擬ロタキサンであることを確認するため、沈殿物を回収し、減圧乾燥後、粉末 X 線回折を測定した。さらに、化学量論比を求めるため、沈殿物を重水素置換 DMSO に溶解後、¹H-NMR を測定した。

3) ポリ擬ロタキサン形成機構の解明

一般に、CyD がポリ擬ロタキサンを形成するためには、軸分子の CyD への貫通や CyD 分子間での水素結合の形成が必要となる。そこで、両末端に嵩高い官能基 (Z-フェニルアラニン) を修飾し、軸分子が CyD に貫通できない条件下で、ポリ擬ロタキサン形成の可否を調べた。さらに、水素結合阻害剤である尿素存在時のポリ擬ロタキサン形成速度を濁度を指標に評価した。

4) ポリロタキサンの調製

上記方法でポリ擬ロタキサンを調製後、反応懸濁液にエンドキャップ分子 (トリニトロベンゼンスルホン酸, TNBS) を反応させ、ポリロタキサンを調製した。精製は洗浄あるいは透析で行い、調製の確認は ¹H-NMR で行った。

4. 研究成果

1) ポリ擬ロタキサンの調製

ポリ擬ロタキサンはその形成に伴い、沈殿を形成する。DM- α -CyD/PEG および DM- β -CyD/PPG の水溶液を 2 時間加熱すると、ポリ擬ロタキサン由来の沈殿を与えた (図 2)。重要なことに、各 DM-CyD 単独では沈殿を与えなかった。このように、DM-CyD を軸分子存在下で加熱すると、ポ

り擬ロタキサンを形成することが示唆された。

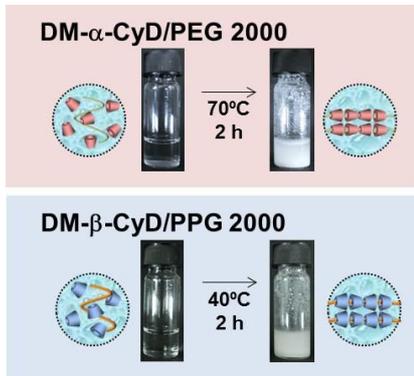


図 2. DM-CyD ポリ擬ロタキサン調製後の懸濁液

2) 構造解析

CyD がポリ擬ロタキサンを形成すると、その結晶構造ががご型構造から筒型構造に変化する。図 2 で得られた沈殿物の粉末 X 線回折を測定した結果、DM-α-CyD/PEG、DM-β-CyD/PPG のいずれの沈殿物も筒型構造由来の回折パターンを与えた。これらの結果は、図 2 の沈殿物がポリ擬ロタキサンであることを強く示唆する。

さらに、軸分子 1 本に対する CyD の貫通数を算出するため、¹H-NMR を測定した結果、DM-α-CyD、DM-β-CyD 共に約 12 個が軸分子を包接していることが示唆された。

3) ポリ擬ロタキサン形成機構の解明

両末端に高い官能基を修飾した PEG および PPG に、それぞれ DM-α-CyD および DM-β-CyD を加え、加熱してもポリ擬ロタキサン由来の沈殿を形成しなかった (図 3)。さらに、水素結合阻害剤である尿素存在下でポリ擬ロタキサンを調製したところ、尿素濃度依存的にポリ擬ロタキサンの生成速度が減少した。また、DM-CyD は加温すると脱水和し、分子間のメチル基同士の疎水性相互作用が増大することが知られている。これらの知見を基に DM-CyD のポリ擬ロタキサン形成過程を推測すると、軸分子を DM-CyD が包接し、集合した DM-CyD 間で水素結合 (水酸基) や疎水性相互作用 (メチル基) が形成されることが重要であると考えられる (図 4)。



図 3. 両末端に高い官能基を修飾した軸分子と DM-CyD とのポリ擬ロタキサン形成の可否

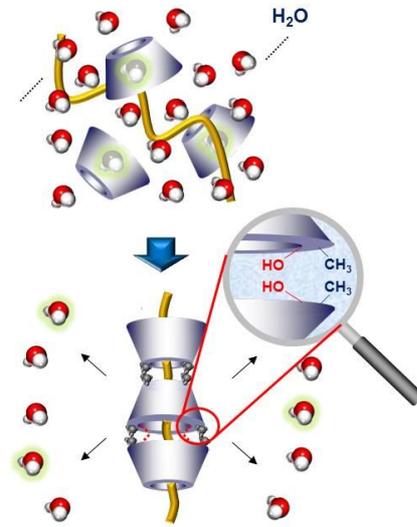


図 4. DM-CyD ポリ擬ロタキサン形成機構の推定図

4) ポリロタキサンの調製

図 2 で得られた懸濁液にエンドキャップ分子である TNBS を反応させ、DM-CyD をトラップし、ポリロタキサンを調製した (図 5)。なお、DM-β-CyD の空洞径は大きく、1 分子の TNBS では DM-β-CyD をトラップすることは困難であったため、PPG の両末端をテトラアミノ化し、片末端あたり 2 分子の TNBS を修飾できる工夫を施した。DM-α-CyD 系において、約 13 個の DM-α-CyD が貫通したポリロタキサンを収率約 23% で調製することに成功した。DM-β-CyD 系の場合は、約 5 個の DM-β-CyD が貫通したポリロタキサンを収率約 90% で調製することに成功した。これらのことから、DM-CyD ポリロタキサンの合成に one-pot で成功した。

これまで、DM-CyD はポリ擬ロタキサンを形成しないと考えられており、ポリロタキサンの調製も困難であった。本研究で得られた知見は、ポリロタキサン誘導体を簡便かつ高収率で調製する際の有益な基礎資料になるものと確信する。現在、より水溶性に優れた新規 DM-CyD ポリロタキサンの合成を検討中であり、今後、これらポリロタキサンのバイオマテリアルへの応用を検討する。

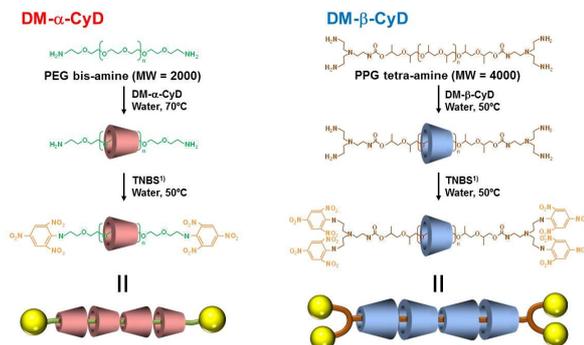


図 5. DM-CyD ポリロタキサンの調製
1) TNBS: トリニトロベンゼンスルホン酸

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1) Thermoresponsive formation of dimethyl cyclodextrin polypseudorotaxanes and subsequent one-pot synthesis of polyrotaxanes, T. Higashi, J. Li, X. Song, J. Zhu, M. Taniyoshi, F. Hirayama, D. Iohara, K. Motoyama, H. Arima, ACS Macro Lett., 5, 158-162 (2016).

〔学会発表〕(計 7 件)

1) メチル化シクロデキストリンポリ擬ロタキサンおよびポリロタキサンの高効率な合成法の開発、東大志、Li Jun、Song Xia、Zhu Jingling、谷吉雅俊、平山文俊、本山敬一、有馬英俊、日本薬学会第 136 年会、神奈川、3/26-29 (2016)

2) 新規バイオマテリアルの構築を企図したジメチルシクロデキストリンポリロタキサンの合成、江頭聡樹、東大志、Jun Li、Xia Song、Jingling Zhu、谷吉雅俊、本山敬一、有馬英俊、第 3 回熊本医工連携フォーラム、熊本、12/14 (2015)

3) 新規バイオマテリアルの構築を企図したジメチルシクロデキストリンポリロタキサンの調製、江頭聡樹、東大志、Jun Li、Xia Song、Jingling Zhu、谷吉雅俊、本山敬一、有馬英俊、第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、熊本、11/19-20 (2015)

4) メチル化シクロデキストリンポリ擬ロタキサン/ポリロタキサンの高効率な合成法の開発、東大志、Jun Li、Xia Song、Jingling Zhu、谷吉雅俊、平山文俊、本山敬一、有馬英俊、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、京都、11/9-10 (2015)

5) ジメチルシクロデキストリンを環状分子としたポリロタキサンの調製、江頭聡樹、森田健太郎、谷吉雅俊、Jun Li、Jingling Zhu、Xia Song、東大志、本山敬一、有馬英俊、熊本大学拠点 B シンポジウム、熊本、9/1-2 (2015)

6) One-pot synthesis of dimethyl cyclodextrin polyrotaxanes through thermoresponsive formation of polypseudorotaxanes, S. Egashira, T. Higashi, J. Li, X. Song, J. Zhu, M. Taniyoshi, F. Hirayama, K. Motoyama, H. Arima, Asian Federation for Pharmaceutical Sciences (AFPS) Conference, Bangkok, Thailand, November 25-27 (2015)

7) Thermoresponsive formation of dimethyl cyclodextrin polypseudorotaxanes and one-pot synthesis of polyrotaxanes, T. Higashi, J. Li, X. Song, J. Zhu, M. Taniyoshi, F. Hirayama, K. Motoyama, H. Arima, Joint Conference of 8th Asian Cyclodextrin Conference and 32nd Cyclodextrin Symposium, Kumamoto, Japan, May 14-16 (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件を出願準備中)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/seizai/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

東大志 (HIGASHI TAISHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：20613409