

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560446

研究課題名(和文) X線照射下で抗癌活性を発現するスマートドラッグの開発

研究課題名(英文) Design of smart drugs that are activated upon X-irradiation

研究代表者

田邊 一仁 (Tanabe, Kazuhito)

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：40346086

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：内包した薬剤を患部まで送達し放出するナノキャリアシステムは、最小量の薬剤投与による最大の薬効発現ならびに副作用の低減が期待され、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、内包された薬剤の放出が不完全なために、患部への集積が達成されたにも拘らず、期待された薬効が得られない場合が多い。

本研究では外部刺激としてのX線照射および光照射に応答して薬剤を放出し得るナノドラッグキャリアシステムを構築することを試みた。具体的にはアゾベンゼン誘導体をX線応答部として、一方ニトロベンゼン誘導体を光応答部としてもつ両親媒性化合物を合成し、そのドラッグキャリアとしての特性と刺激応答特性を調べた。

研究成果の概要(英文)：We have designed a novel aggregate of DNA amphiphiles (DAM) that is sensitive to X-irradiation or photoirradiation. The DAM consists of alkyl chain as a hydrophobic unit and oligodeoxynucleotides as a hydrophilic unit, which are linked to a radiation-sensitive azobenzene derivative (DAM-Azo). The DAM-Azo self-assembled efficiently to form aggregates that encapsulated small molecules such as pyrene. X-irradiation could then induce reductive degradation of the DAM-Azo aggregates via degradation of the azobenzene unit to release guest molecules. We also prepared photo-responsive aggregate using photoreactive nitrobenzene unit. The nitrobenzene unit was introduced into oligonucleotide (P-ODN), whose reaction was characterized. P-ODN showed a proper function as photosensitive drug carrier.

研究分野：生物有機化学

キーワード：X線照射 ドラッグキャリア

1. 研究開始当初の背景

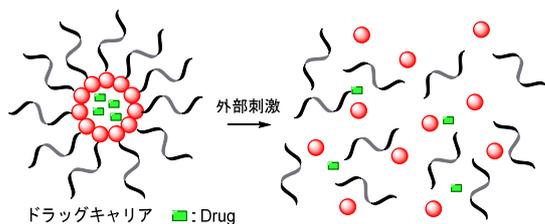
がんの治療では、より高い生存率が求められると共に、より高い機能温存と形態の保持が要求される。身体へのダメージが大きい手術と異なり、こうした障害が比較的少ない治療法の一つとして放射線療法が挙げられる。しかし、放射線療法は進行がんに対する治療成績があまり良くないことや、低酸素がん細胞等の固形がん組織の一部は、放射線感受性が低いといった欠点を持ち、最も望ましい形の治療法とは言い難い。このような背景の中で、近年新しいがんの治療法として注目されている方法が、抗がん剤と放射線療法を併用する化学放射線療法である。この手法は、手術に匹敵する治療成績が報告されていることから、がん治療におけるダメージの少ない新手法として期待されている。しかしながら、放射線を照射することにより、抗がん剤による体への副作用が強く発現するため、使用する抗がん剤の特性や患者の容態によっては適用できないといった問題点が指摘されていた。

2. 研究の目的

こうした課題を解決する目的で、本申請研究では、化学放射線療法に適用可能で、かつ副作用の軽い放射線活性化型プロドラッグを開発する。具体的には、抗がん活性を示す薬剤に置換基を導入することで不活性化(プロドラッグ化)する一方で、放射線(X線)照射により元の活性な構造に戻る機能性分子(プロドラッグ)の開発を行う。このプロドラッグを単に投与しただけでは何ら薬効を示さないが、X線を照射すると照射した部位でのみ活性化され、薬効を発現する。一方、X線非照射部には、ほとんど影響を及ぼさない。従って、プロドラッグは副作用が低く、かつ疾患部(X線照射部)を選択的に攻撃する薬剤となりうると考えた。

3. 研究の方法

本申請研究では以下に示した2つのテーマを進めた。まず、第一にX線照射によってより効果的に薬効発現するプロドラッグの開発を目指して、X線照射によって崩壊するドラッグキャリアを作成した。このキャリア分子は薬剤を内部に取り込み、一旦活性を不活性化する。一方、X線照射によって崩壊すると内包した薬剤が放出し、活性を発現する。第二に、X線の代替トリガーとして紫外線を用いて同様に崩壊するドラッグキャリアを作成した。いずれも、有機合成によって各キャリアを合成した後、各トリガーの照射下で



の反応挙動を確認した。

4. 研究成果

(1) アゾベンゼン誘導体をもつX線活性化型ドラッグキャリアの開発

アゾベンゼン誘導体は還元反応によってアニリンへと開裂する。よってこの官能基を放射線応答部として持つ両親媒性化合物を合成し、水中に溶解すれば会合体を形成し、X線応答性の会合体(ドラッグキャリア)を形成する。会合体を形成する両親媒性化合物の親水性部と疎水性部をつなぐリンカーにアゾベンゼンを導入した。この化合物にX線を照射するとアゾベンゼン部で開裂し会合体を維持できなくなるため、内包した薬剤を放出できるものと考えた。本研究で設計した両親媒性化合物は親水部としてDNAオリゴマー、疎水部としてアルキル鎖をもつDAM-Azoである(Figure 1)。DNAを親水部として用いる利点は、DNA自動合成機により容易に合成できること、高い水溶性を持っていることに加えて、生体分子であることから高い生体適合性を持っていることが挙げられる。

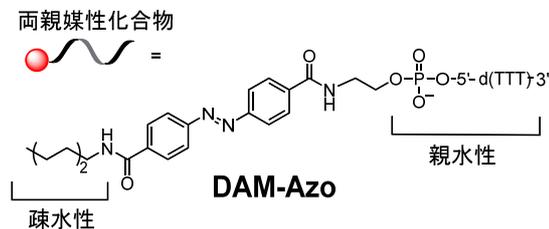
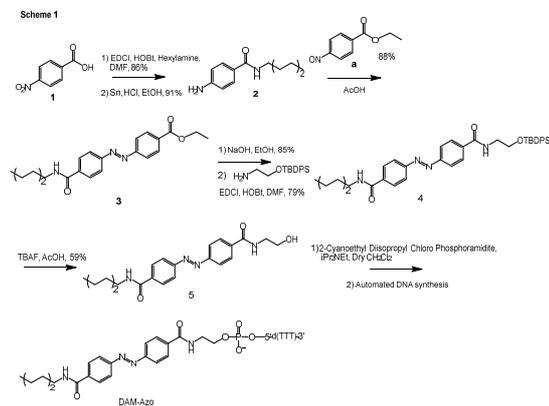


Figure 1. DAM-Azoの構造

設計した DAM-Azo の合成スキームを Scheme 1 に示す。ニトロ安息香酸 **1** を出発物質とし、アミド化、還元を経てアニリン誘導体 **3** を合成した。続いてアミノ基の酸化により **4** から合成した **5** と縮合してアゾベンゼン誘導体 **6** を導いたのち、加水分解、アミド化により **10** を得た。保護基を除去した一級アルコール **11** をアミダイト化し、続く DNA 自動合成により求める DAM-Azo を合成した。



また、デカノールをアミダイト化し DNA 自動合成によりアゾベンゼン部を持たない DAM-nol を合成した。

合成した DAM-Azo が水溶液中で会合体を形成し疎水性化合物を内包するかどうかを、ピレンを用いた蛍光スペクトル測定を用いて評価した。疎水性蛍光色素のピレンは疎水性環境に取り込まれることで、373 nm のピレンの蛍光強度が減少することが知られている。一方、384 nm の蛍光強度は周辺の環境に影響されずにほぼ一定の値をとる。373 nm の蛍光強度を I_1 、384 nm の蛍光強度を I_3 とし、 I_1/I_3 の値を追跡すると、ピレン周囲が疎水性環境か、あるいは親水性環境であるかを評価することができる。DAM-Azo が会合体を形成すれば、内部に疎水性のコアを形成し、ピレンを内包する。従って、会合体の形成の有無はピレンの蛍光挙動により評価することができる。

実際に蛍光スペクトルを測定すると、**Figure 2** に示す通りピレンの蛍光スペクトルは DAM-Azo の有無により大きく変化した。 I_1/I_3 の値を評価すると、DAM-Azo の非添加条件では 1.415 であった。一方 100 μM の DAM-Azo を添加すると I_1/I_3 は 0.851 に変化したことから、DAM-Azo は会合体を形成し、疎水性の内部にピレンを内包したことが示唆された。また、DAM-Azo を添加した場合、ピレンの長波長の発光が観測されこの一部はピレンエキシマーのものと考えられることから、ピレンは会合体内部で凝集していることが考えられる。また DAM-Azo 会合体のサイズを動的な光散乱 (Dynamic Light Scattering, DLS) 測定を用いて分析したところ、DAM-Azo は粒径 208.1 ± 15.9 nm の会合体を形成していることが分かった。

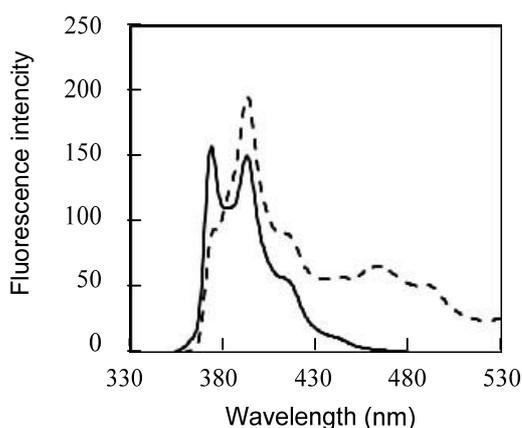


Figure 2. ピレンを内包した DAM-Azo の蛍光発光次に、DAM-Azo の水溶液に低酸素条件下で X 線を照射し、HPLC を用いて反応を追跡した。その結果、線量の増大に伴い原料 DAM-Azo が消失する一方、分解生成物が新たに確認された。原料の減少を線量に対してプロットし、反応効率を示す G 値を算出したところ低酸素条件下では 179.0 nmol/J となった。同じ実験を酸素の共存下でも行ったところ G 値は 19.6 nmol/J を示し、DAM-Azo の消失は大きく抑制されることが確認され

た。一般に酸素分子は水の放射線分解により生成する水和電子を捕捉する事が知られているため、本系において有酸素条件下で反応効率が大きく低下したことは DAM-Azo の分解反応には水和電子の還元作用が関係していることが示唆された。また DNA にデカノールを疎水部として付加させアゾベンゼン部を持たない化合物 DAM-nol を合成し、低酸素条件下で X 線を照射したところ G 値は 85.0 nmol/J とアゾベンゼン部を持つ DAM-Azo よりも低い値を示すことから、DAM-Azo の崩壊はアゾベンゼン部を持つことにより促進されていることが示唆された。さらに、X 線による DAM-Azo 会合体の崩壊に伴う薬剤放出特性を評価した。モデル薬剤として疎水性化合物であるピレンを内包させ、X 線を照射する前後の蛍光スペクトルを比較した。**Figure 2** に DAM-Azo にピレンを内包させて蛍光を測定したものを点線のスペクトル、その溶液に 100 Gy の X 線を低酸素条件下照射した後に測定したものを実線のスペクトルで示した。X 線の線量増加に伴い I_1 のピークが増加し、またエキシマーと思われる長波長のシグナルは減少した。このことは、DAM-Azo 会合体が X 線照射により崩壊し、内包したピレン分子を放出したことを示唆している。

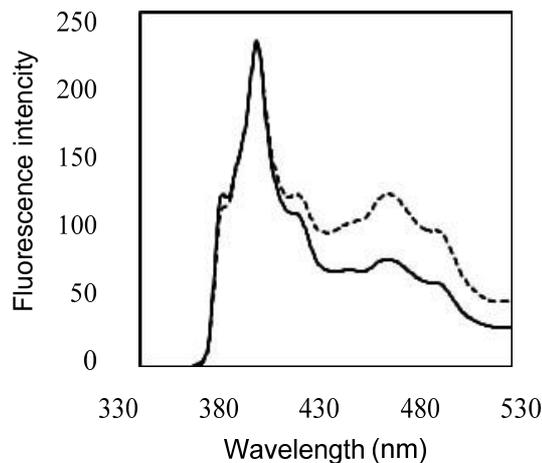


Figure 3. ピレン内包 DAM-Azo への X 線照射

(2) 光応答性ニトロベンジル基をもつドラッグキャリアの開発

ニトロベンゼン誘導体は光照射下で開裂反応を起こすことが知られている。そこで、本サブテーマでは、光応答部と疎水部を兼ねた官能基としてニトロベンゼン誘導体、親水部としてオリゴヌクレオチドをもつ両親媒性化合物 P-ODN を設計した (Figure 4)。すなわち、ニトロベンゼン誘導体の光反応を鍵反応としてキャリア分子となる会合体の構造を変換し、薬剤放出を制御する分子システムを考えたい。

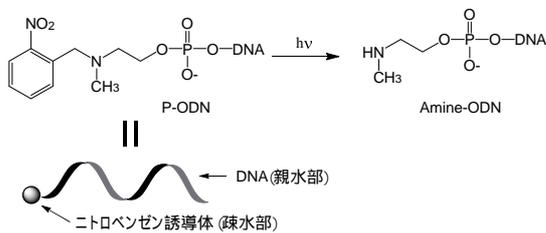
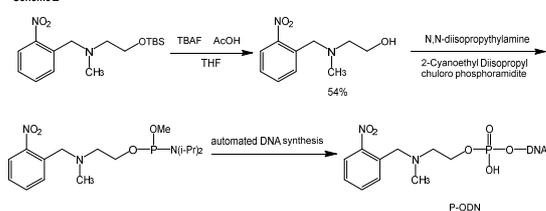


Figure 4. ニトロベンゼン部をもつDNAオリゴマー

まず、DNA鎖長の異なる2種類のP-ODNを合成した(Scheme 2)。まず、**1**のヒドロキシ基をtert-ブチルジメチルシリル(TBS)基で保護し、プロモメチルを2位を持つニトロベンゼン誘導体**3**とカップリングした。続いて、保護基の除去とホスホロアミダイト化を行った後、DNA合成機を使用してP-ODNを得た。5量体のチミジンを持つものをP-ODN 5、10量体のチミジンを持つものをP-ODN 10とした。合成したP-ODNをそれぞれHPLCで分取し、分子量をMALDI-TOF MSによって確認した。

Scheme 2



まず、合成したP-ODNの会合体形成能について、疎水性蛍光色素ナイルレッドを用いて評価した。薬剤のモデルとして用いたナイルレッドは、500-600 nmに吸収領域、600-700 nmに発光領域を持つ。また、疎水性であるため、単独ではほとんど水に溶けず、水中ではわずかにのみ蛍光を発する。一方、両親媒性化合物と共存させると、両親媒性化合物の会合体形成に伴い、ナイルレッドが会合体内部の疎水部に取り込まれ、水溶液中に可溶化されるため蛍光を発する。従って、ナイルレッドの蛍光の挙動を観測すれば、両親媒性化合物の会合体形成を評価することができる。結果をFigure 4に示した。P-ODN 5、10を

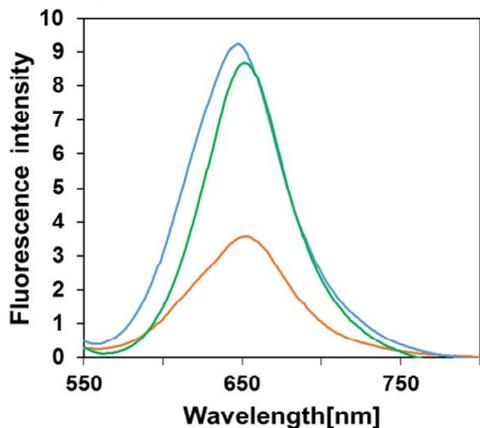


Figure 5. P-ODN存在下でのナイルレッドの蛍光発光 赤：P-ODN非存在下 青：P-ODN 5添加時 緑：P-ODN 10添加時

それぞれ添加すると、P-ODN 10の場合にのみ650 nm付近に強い蛍光が観測された。また、参照実験として、チミジン10量体とナイルレッドの水溶液それぞれについても、蛍光スペクトルを計測したが、強い発光は認められなかった。よって、P-ODN10は会合体を形成し、ナイルレッドを内包したことがわかった。

次に、会合体ができる最小濃度である臨界会合体形成濃度(critical aggregation concentration, CAC)について調べた。その結果、P-ODN 5のCACが92.8 μM、P-ODN 10のCACは4.95 μM、チミジン10量体のCACが15.6 μMとなった。すなわち、P-ODN 10はP-ODN 5やチミジン10量体よりも会合体を形成しやすいことが示された。

最後に、P-ODNが内包した薬剤を光照射下で放出できるかを調べた。薬剤のモデルとしてピレンを用いた。373 nmの蛍光強度 I_1 と384 nmの蛍光強度 I_3 の比を求めて、会合体形成の有無を判別した。その結果、サンプル水溶液に365 nmの光を0、30、60、90、120分での蛍光強度を測定したところ、照射時間が長くなるにつれ、 I_1/I_3 の値の減少が観測された。参照実験として、ニトロベンゼン部を持たないチミジン10量体の水溶液についても、光照射を行い、蛍光スペクトルを計測したが、P-ODN 5やP-ODN 10を添加したときのような I_1/I_3 値の大きな減少は観測されなかったことから、P-ODNから成る会合体は光照射によって崩壊したことが示された。(Figure 6)

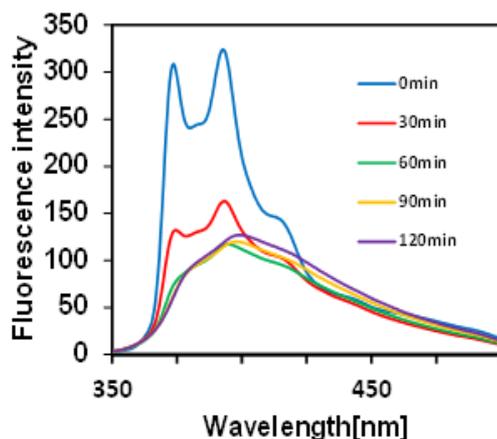


Figure 6. 光照射したP-ODN存在下でのピレンの蛍光発光

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Phosphorescent Ruthenium Complexes with Nitroimidazole Unit that Image Oxygen Fluctuation in Tumor Tissue, Son, A.; Kawasaki, A.; Hara, D.; Ito, T.; **Tanabe, K.** *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 2527-2536. (査読有り)

Hypoxic X-irradiation as an external stimulus for conformational change of oligodeoxynucleotides

that possess disulfide bond and regulation of DNAzyme function. **Tanabe, K.**; Okada, K.; Sugiura, M.; Ito, T.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 310–312. (査読有り)

Controlling localization and excretion of nanoparticles by click modification of the surface chemical structures inside living cells. Ito, T.; Nakamura, T.; Kusaka, E.; Kurihara, R.; **Tanabe, K.** *ChemPlusChem*, **2015**, 80, 796–799. (査読有り)

Water-soluble phosphorescent ruthenium complex with a fluorescent coumarin unit for ratiometric sensing of oxygen levels in living cells. Hara, D.; Komatsu, H.; Son, A.; Nishimoto, S.; **Tanabe, K.** *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26, 645–649. (査読有り)

Synthesis of meso-(4'-cyanophenyl)porphyrins: efficient photocytotoxicity against A549 cancer cells and their DNA interactions Kumar, D.; Mishra, B.; Chandrashekar, K. P.; Khandagale, S. B.; Tantak, M. P.; Kumar, A.; Akamatsu, K.; Kusaka, E.; **Tanabe, K.**; Ito, T. *RSC advances* **2015**, 5, 53618–53622. (査読有り)

Synthesis of meso-(4'-cyanophenyl)porphyrins: efficient photocytotoxicity against A549 cancer cells and their DNA interactions Kumar, D.; Mishra, B.; Chandrashekar, K. P.; Khandagale, S. B.; Tantak, M. P.; Kumar, A.; Akamatsu, K.; Kusaka, E.; **Tanabe, K.**; Ito, T. *RSC advances* **2015**, 5, 53618–53622. (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

Monitoring of oxygen levels in tumor tissue by phosphorescent ruthenium complexes with hydrophobic ligands
Kazuhi to Tanabe
The 7th Asia and Oceania Conference of Photobiology
2015 年 11 月

少ないことを可視化する：低酸素化しかプロ
ープの設計 **田邊一仁**
青山学院大学物理・数理学科コロキウム
2015 年 7 月

X線照射下で駆動する生体関連材料を設計
する **田邊一仁**
第 27 回生体機能関連化学部会サマースク
ール
2015 年 7 月

〔図書〕(計 1 件)

X線照射下で駆動する生体関連材料を設計
する **田邊一仁** Drug Delivery System 特
集 プロドラッグ・アンテドラッグによる
DDS 創薬 2015 年 30 巻 5 号 pp.

446-453

〔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://tanabe-lab.parallel.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊一仁 (Kazuhi to Tanabe)
青山学院大学・理工学部・教授
研究者番号：40346086