

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810046

研究課題名(和文) 刺激応答性分子糊を用いた普遍的薬剤開発手法の開拓

研究課題名(英文) Universal Methodology for Drug Development Based on Stimuli-responsive Molecular Glues

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：分子糊に酵素阻害剤を連結することで、元の阻害剤の30倍以上の結合能および10倍以上の阻害活性を達成した。これは、接着という単純な方法でより強力な薬剤を得ることができるというコンセプトを支持するものである。また、当初の計画とは異なるが、刺激応答性を付与した分子糊の設計・合成に重点を置いて研究を行い、光重合性分子糊、酸化還元応答性分子糊、およびATP結合性分子糊を新たに開発した。それぞれが新たな化学療法へと繋がる発展性の高いものとなった。多様な外部刺激に応答する分子糊のライブラリーが構築されつつあり、当初の目的であった「アンメットニーズ疾患」の治療法開発に向けて大きく前進した。

研究成果の概要(英文)：By conjugation of a molecular glue with an enzyme inhibitor, >30-times binding affinity and >10-times inhibitory effect were achieved. The results support the concept that drug efficacy can be enhanced by simply introducing an "adhesive" moiety. In this research project, we had mainly focused on development of stimuli-responsive molecular glues, though different from the original plan, and succeeded in synthesis of "photo-polymerizable", "redox-responsive", and "ATP-binding" molecular glues. Each of the molecular glues demonstrates a remarkable properties to manipulate biological functions. The development of new stimuli-responsive molecular glues will definitely promote the project toward treatment of unmet-needs diseases.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：分子糊 刺激応答性 光重合 siRNA ATP 酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

薬剤開発の基本戦略は、疾患の原因となる生体分子（主としてタンパク質）に対して選択的に強く結合するリガンド分子を合成し、その機能を阻害することを期待するというものである。一般的には、既知のリガンド分子をもとに分子骨格や置換基を変換し、より結合能の高い化合物を探索する。しかし、この方法では膨大な数の候補化合物を合成・検討する必要があるため、効率的に新薬を開発することは困難であり、コストの面でも制約が大きい。また、探索の効率化を図るため、多くの場合、標的タンパク質の結晶構造情報に基づいた分子設計を行うが、これは必ずしも溶液中の立体構造とは一致せず、期待通りの結合能を示さないケースも多い。

研究代表者は、これまでにグアニジニウム (Gu^+) 基を多数担持した一連の高分子化合物を生体分子への『分子糊』として合成してきた。分子糊は、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し、タンパク質をはじめとする生体高分子表面に非共有結合的に接着する。研究代表者はこの分子糊の“接着性”を既存の薬剤（リガンド分子）に付与することで、標的タンパク質への結合能を飛躍的に増強できるのではないかと考えた。また、分子糊の接着は広範なタンパク質に対して有効であるため、本手法は標的タンパク質の立体構造に依存しない薬剤開発手法としても期待できる。

一方、分子糊をリガンド分子に連結させることで、標的タンパク質以外の物質への非特異的な接着が生じ、選択性の低下を招くという問題が生じてしまう。本研究課題では、外部刺激に反応して接着性を発現する『刺激応答性分子糊』を用いることで、この問題を解決する。研究代表者は既に分子糊（デンドリマー型）の Gu^+ 基に光開裂性保護基である 6-ニトロベラトリルオキシカルボニル基誘導体（図 1）を導入することで、その接着性を一時的に抑制することに成功している。

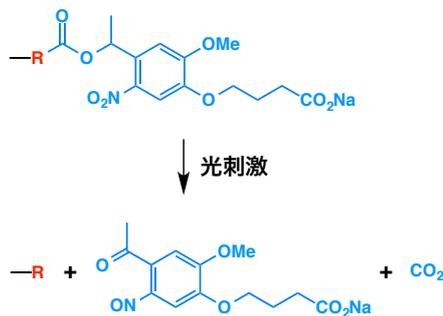


図 1. 6-ニトロベラトリルオキシカルボニル誘導体の光開裂反応。

このような刺激応答性保護基を用いることで、非特異的な接着によって生じる患部以外への副作用を最小限に抑えけるとともに、薬剤活性の発現部位を制御することが可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、生体高分子に普遍的に接着する『分子糊』を既存の薬剤（リガンド分子）に連結することで、標的タンパク質への結合能を増強させるという全く新しい薬剤開発手法を提案する。本手法は、従来の薬剤開発の弱点とも言える煩雑な化合物合成やスクリーニングのプロセスを必要としない、簡単かつ効率的な薬剤開発の方法論になりうる。分子糊の非特異的な接着によって生じる患部以外への副作用は、外部刺激に反応して接着性を発現する「刺激応答性分子糊」を利用することで解消する。本手法を用いて、これまで決定的な治療薬の開発が達成されていない『アンメットニーズ疾患』の治療薬開発を目標とする。

3. 研究の方法

はじめに、コンセプトの実証を目的とし、加水分解酵素の一つであるトリプシンを標的モデルタンパク質と設定した。連結するリガンド分子への立体障害の影響を最小化するため、直鎖型の分子糊を用いた。分子糊の末端にトリプシンの阻害剤であるベンズアミジンを導入し、結合能・酵素阻害活性が増強されるかを確認した。また、外部刺激に反応して接着性を発現する『刺激応答性分子糊』として、光刺激、酸化還元刺激およびアデノシン三リン酸 (ATP) のそれぞれに反応するものを設計・合成した。

4. 研究成果

(1) 分子糊の接着作用による薬剤の結合能・酵素阻害活性の増強

ベンズアミジンに直鎖状分子糊を連結することで、30 倍以上の結合能および 10 倍以上のトリプシン阻害活性を達成した（図 2）。これは、複雑な分子設計を必要としない非常に単純な方法でより強力な薬剤を得ることができるというコンセプトを支持するものであり、高分子薬剤の実用性を高める結果である。また、分子糊の構造によって、この薬剤増強効果は大きく異なることが明らかとなり、高分子薬剤の分子設計指針に重要な知見を与えるものとなった。

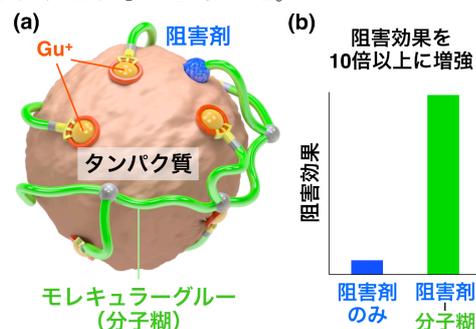


図 2. (a) モレキュラーグルーの接着作用による阻害剤分子の結合能増強。 (b) モレキュ

ラーグルーの連結による阻害効果の増強。

(2) 光重合性分子糊による部位選択的化学修飾

当初予定していた「光開裂性保護基」による分子糊の接着性発現とは異なり、「系中で光刺激によって分子糊を作り出す」という戦略に基づいて分子設計を行った。生体直交反応である「フォトクリックケミストリー」を介して重合する分子糊モノマーを合成した。興味深いことに、分子糊の光重合は「接着しうるアニオン性表面」が存在する場合でのみ、これを鋳型とし、効率良く進行することが明らかとなった（図3）。これを利用し、光照射刺激を与えた細胞でのみ生理活性を阻害し、細胞死を誘導することに成功した。

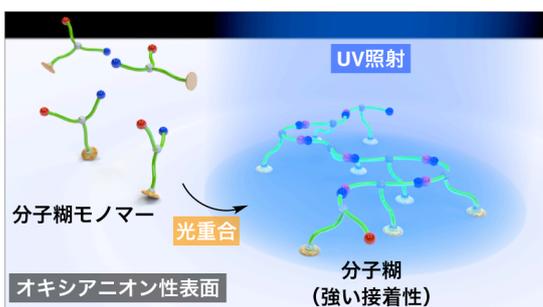


図3. 分子糊の系中での光重合. オキシアニオン性表面を鋳型とすることで重合が促進される。

本手法は、生体内で人工的に高分子化合物を合成するための基盤的技術となりうるものである。また、将来展望として、モノマー（低分子量）とポリマー（高分子量）を変換することで血液脳関門（blood-brain barrier; BBB）などの高分子量化合物を排除する仕組みを突破できる、新たな高分子薬剤への応用が期待できる。

(3) 酸化還元条件に反応する分子糊と細胞内 siRNA デリバリー

上記のオキシアニオン性表面を鋳型とする分子糊の重合から着想を得て、siRNA を鋳型とし、酸化還元条件に応じて可逆的に重合する分子糊を設計した。ここで分子糊モノマーは、2つのチオール基を有しており、酸化条件下においてジスルフィド結合を形成することで重合する。siRNA 存在下で分子糊を重合することで、siRNA を1分子内包した siRNA-分子糊ナノカプセル（粒径 10 nm 以下）を得ることに成功した（図4）。この siRNA-ナノカプセルは、細胞内のような還元的環境下で速やかに解重合され、siRNA を放出する（図4）。

この siRNA-ナノカプセルは、効率よく細胞内に取り込まれることが明らかとなった。その結果、細胞内で siRNA を放出し、RNA 干渉を誘導することで遺伝子発現をノックダウ

ンすることにも成功した。

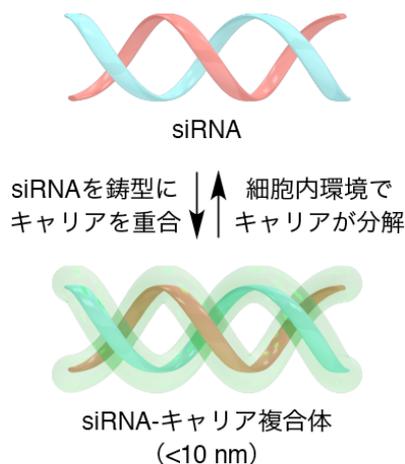


図4. 分子糊を用いた siRNA-ナノカプセルの調製. 細胞内の還元的環境に反応して siRNA を放出する。

siRNA を用いた遺伝子治療は、通常の低分子医薬では克服できない疾病治療への応用も期待されるものであるが、「いかに患部に運搬するか」が大きな課題とされている。本手法によって調製される siRNA-ナノカプセルは、一般に用いられるリポソームやミセルのような数十～数百 nm サイズのキャリアと全く異なる生体内分布を示すことが期待できる。また、そのサイズの小ささから、前述の血液脳関門を突破できる可能性もあり、脳疾患治療への応用も期待できる。

(4) ATP 応答性分子糊の開発と ATP 依存的酵素活性制御

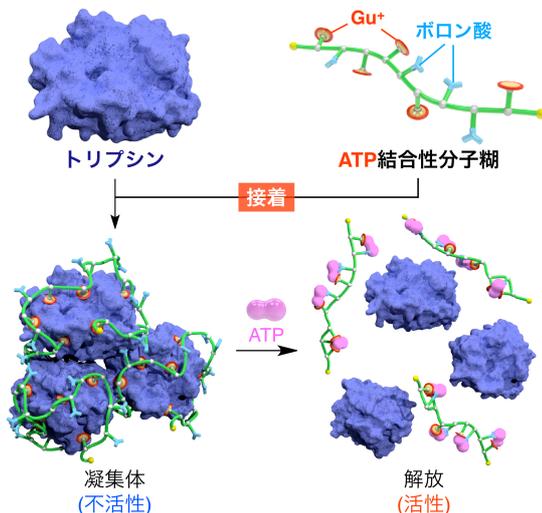


図5. ATP 結合性分子糊を用いた酵素（トリプシン）活性制御. 接着時には凝集体を与え、酵素活性が抑制されるが、ATP 添加によって分子糊が解離し、酵素活性が回復する。

研究代表者は、腫瘍組織を高い精度で認識できる分子糊を開発しようと考え、腫瘍組織に豊富に存在する ATP に応答性を示す「ATP 結合性分子糊」を設計した。この分子糊は、ATP 非存在下ではタンパク質表面に強く接着

するが、ATP を添加すると容易に解離する。この接着/解離を介して、接着しているタンパク質の酵素活性をスイッチングすることに成功した (図 5)。

一般に、腫瘍組織と正常組織の識別は pH の差や腫瘍組織で亢進的に発現する受容体などを利用して達成されるが、これらは数十倍～数百倍の濃度差の物質を識別することに相当する。一方、ATP は両者の間に濃度にして 10,000 倍もの差があることが知られており、腫瘍認識の優れた指標となる。本研究で確立された基盤技術は、副作用を最小化した腫瘍治療へと応用できる可能性を秘めたものである。

(5) 研究成果のまとめ

当初の計画とは異なり、刺激応答性分子糊の設計・開発に重点を置いたが、それぞれが応用性の高い基盤技術へと結びつくものとなった。多様な外部刺激に応答する分子糊のライブラリーが構築されつつあるため、当初の目的である「アンメットニーズ疾患」の治療法開発に向けて大きく前進したものと考えている。

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 6 件)

(1) Boronic Acid-Appended Molecular Glues for ATP-Responsive Activity Modulation of Enzymes. Kou Okuro, Mizuki Sasaki, Takuzo Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5527-5530.

DOI: 10.1021/jacs.6b02664

(2) Photoinduced Bioorthogonal 1,3-Dipolar Polycycloaddition Promoted by Oxyanionic Substrates for Spatiotemporal Operation of Molecular Glues. Junichi Hatano, Kou Okuro, Takuzo Aida, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 193-198.

DOI: 10.1002/anie.201507987

(3) Reductively Cleavable Nanocaplets for siRNA Delivery by Template-Assisted Oxidative Polymerization. P. K. Hashim, Kou Okuro, Shigekazu Sasaki, Yasutaka Hoashi, Takuzo Aida, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15608-15611.

DOI: 10.1021/jacs.5b08948

(4) Molecular Glues for Manipulating Enzymes: Trypsin Inhibition by Benzamidinium-Conjugated Molecular Glues. Rina Mogaki, Kou Okuro, Takuzo Aida, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2802-2805.

DOI: 10.1039/C5SC00524H

他 2 件

[学会発表] (計 26 件)

(1) 茂垣里奈, 大黒 耕, 相田卓三, 生体

分子機能の制御を実現する刺激応答性分子糊 (2): タンパク質の機能制御, 2016/3/26, 同志社大学 (京都府, 京田辺市)

(2) 茂垣里奈, 大黒 耕, 相田卓三, 生体分子機能の制御を実現する刺激応答性分子糊 (1): 分子設計戦略, 2016/3/26, 同志社大学 (京都府, 京田辺市)

(3) 大黒 耕, 佐々木みず葵, 相田卓三, Adhesive ATP-Switch for Modulation of Bimolecular Functions, 日本化学会第 96 春季年会, 2016/3/24, 同志社大学 (京都府, 京田辺市)

(4) Chienyu Chen, Junichi Hatano, Kou Okuro, Takuzo Aida, "Caged" molecular glue uncaged by cancer specific signals, Pacificchem 2015, 2015/12/20, Honolulu, USA

(5) P. K. Hashim, Kou Okuro, Takuzo Aida, Reductively cleavable Nanocaplets for gene and protein delivery by template assisted oxidative polymerization, The 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, 2015/10/22, パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)

(6) 陳 建宇, 波多野淳一, 大黒 耕, 相田卓三, がん細胞選択的に接着性を発現するケージド分子糊の設計と合成, 第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015, 2015/10/13, タワーホール船堀 (東京都, 船堀市)

(7) P. K. Hashim, Seunghyun Sim, Kou Okuro, Daigo Miyajima, Takuzo Aida, Self assembly of siRNA embedded protein GroEL for artificial viruses, Gordon Research Conference (Artificial Molecular Switches and Motors), 2015/6/9, Easton, USA

(8) Rina Mogaki, Kou Okuro, Takuzo Aida, Adhesive Photoswitch for Intracellular Control of Protein Functions, Gordon Research Conference (Self-Assembly & Supramolecular Chemistry), 2015/5/20, Lucca, Italy

(9) 波多野淳一, 大黒 耕, 相田卓三, Oxyanionic Template-Assisted Photopolymerization for Site-selective Adhesion of Molecular Glue, 日本化学会第 95 春季年会, 2015/3/28, 日本大学船橋 (千葉県, 船橋市)

(10) 内田紀之, 大黒 耕, 富重道雄, 相田卓三, GTP-Responsive Tubulin Vesicles with a Photoreactive Molecular Glue for DDS Carrier, 日本化学会第 95 春季年会, 2015/3/27, 日本大学船橋 (千葉県, 船橋市)

(11) 大黒 耕, 佐々木みず葵, 相田卓三, ATP に応答して酵素活性を制御するモレキュラーグルー, 日本化学会第 95 春季年会, 2015/3/27, 日本大学船橋 (千葉県, 船橋市)

(12) 茂垣里奈, 大黒 耕, 相田卓三, 細胞内でのタンパク質機能制御を実現する接着

性光スイッチの開発, 日本化学会第 95 春季年会, 2015/3/26, 日本大学船橋 (千葉県, 船橋市)

(13) 佐々木みず葵, 大黒 耕, 相田卓三, Design of ATP-responsive Molecular Glue, The 10th SPSJ International Polymer Conference, 2014/12/3, つくば国際会議場 (茨城県, つくば市)

(14) 内田紀之, 大黒 耕, 富重道雄, 相田卓三, 光反応性分子糊を利用した GTP 応答性チューブリンベシクルの開発, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, 2014/11/18, タワーホール船堀 (東京都, 江戸川区)

(15) 佐々木みず葵, 大黒 耕, 相田卓三, ATP に応答して接着性を変化させるモレキュラーグルーの開発, 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014, 2014/10/16, タワーホール船堀 (東京都, 江戸川区)

(16) Junichi Hatano, Kou Okuro, Takuzo Aida, Photoactivatable Molecular Glues for In Situ Activation of Adhesion, NanoBio Australia 2014, 2014/7/7, Brisbane, Australia

(17) Rina Mogaki, Kou Okuro, Takuzo Aida, Affinity Molecular Glue: Adhesion-mediated Enhancement of Ligand-Protein Binding, NanoBio Australia 2014, 2014/7/7, Brisbane, Australia

(18) Junichi Hatano, Kou Okuro, Takuzo Aida, Photoactivatable Molecular Glues for in situ Activation of Adhesion, The 9th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry, 2014/6/7, 上海, 中国

(19) 柳沢 佑, 大黒 耕, 相田卓三, Aquamaterial with a Molecular Glue Containing Adhesive Units in Its Main Chain, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014/5/30, 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市)

(20) 茂垣里奈, 大黒 耕, 相田卓三, 特定タンパク質を認識するリガンドを導入したアフィニティモレキュラーグルーの開拓, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014/5/29, 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市)

(21) 大黒 耕, 有坂暁雄, 相田卓三, ケージドモレキュラーグルー: 光に応答して接着性を発現する分子糊, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014/5/28, 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市)

(22) 波多野淳一, 大黒 耕, 相田卓三, Photo-polymerizable Molecular Glue for Site-selective Adhesion in Cell Engineering, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014/5/28, 名古屋国際会議場 (愛知県, 名古屋市)

他 4 件

[その他]
ホームページ
<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