

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670048

研究課題名(和文) ファゴサイトーシス誘発作用に基づく制がん性PS二量等価体の創製

研究課題名(英文) Design and synthesis of phosphatidylserine dimers with antitumor effect via the phagocytosis-inducing property

研究代表者

周東 智 (shuto, satoshi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70241346

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)：本研究では、“ホスファチジルセリン(PS)を二量化すればセリンリン酸部が常に細胞表面に露出してファゴサイトーシスを誘発する”との作業仮説に基づき、PS二量等価体を設計・合成し、実際にファゴサイトーシス誘発作用を有することを明らかにすることを期待した。その結果、合成したPS二量体含有リポソームをがん細胞へ取り込ませた結果、期待した通りにPS自体よりも効果的にPSを露出させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：We designed and synthesized dimer derivatives of phosphatidylserine as phagocytosis inducer via exposure of phosphor-serine polar-head moieties on cell surface, which are potentially used in immune cancer therapy. We successfully synthesized these dimer derivatives. We demonstrated that the liposomes containing the synthesized dimer derivatives of phosphatidylserine actually exposed the phosphor-serine polar-head moieties on cell surface in the evaluation with tumor cells.

研究分野：創薬化学

キーワード：ホスファチジルセリン ファゴサイトーシス 二量等価体 クアトロフェニル

1. 研究開始当初の背景

がんワクチン療法とは、樹状細胞にがん抗原を取り込ませ、免疫系を活性化することでがんを治療する方法である。この方法はがん細胞特異的なので副作用が少なく、新たながん治療法として発展が期待されている。がん抗原を取り込ませるために、がん細胞そのものを貪食（ファゴサイトーシス）させる方法があるが、その効果的な方法は未だ研究開発段階である。細胞膜脂質二重層の構成成分であるホスファチジルセリン（PS）は外膜に露出すると貪食シグナルとして働くが、通常はPS輸送酵素によって細胞内膜に偏在している。そのため樹状細胞による貪食を意図して、がん細胞にPSを投与しても持続的に外膜に露出できず、効果的に貪食させることはできない。

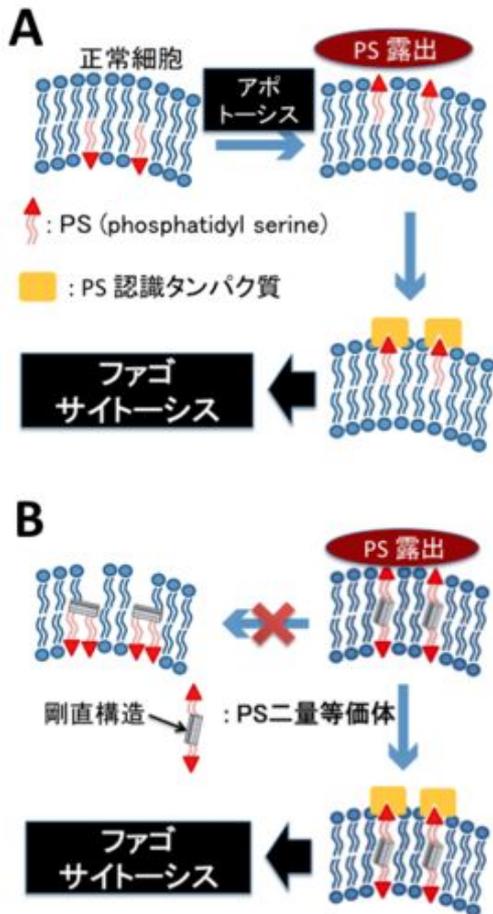


Figure 1. アポトーシス/ファゴサイトーシス機構 (A) と PS 二量等価体によるファゴサイトーシス誘発

以上を考慮し、本研究は、“PSを二量化すればセリンリン酸部が常に細胞表面に露出してファゴサイトーシスを誘発する”との作

業仮説に基づき、PS二量等価体を設計・合成し、実際にファゴサイトーシス誘発作用を有することを明らかにする。開発するPS二量等価体は、アポトーシス/ファゴサイトーシス機序の解析のための薬理ツールとして有用であり、さらに、新規作用機序に基づく制がん薬創出の端緒となることを期待し、研究を実施した。

2. 研究の目的

正常細胞の脂質二重層はAPTLによって非対称状態が保たれており、ほとんどのPSは細胞内側に配向している (Figure 1-A)。申請者は、効果的にPSのセリンリン酸部を細胞表面に提示する分子を創製できれば、ファゴサイトーシスを介する強力な制がん活性を発現し得ると考え、PS二量等価体を着想した。即ち、図1-Bに示すように、二量体の両末端の極性頭部にセリンリン酸が存在するならば、その一方は細胞表面に配向するはずである。しかし、PSを単に二量化したのみでは、立体的自由度の大きい脂肪酸部が折曲ることができるので、AMTLの基質となった場合には二つのセリンリン酸部がともに細胞内側に配向する可能性もある (Figure 1-B, 左方向)。そこで、二量体脂肪酸部に剛直構造を組み込むことによって、脂肪酸部が折れ曲がらないPS二量等価体を発想した (Figure 1-B, 右方向)。

PSを恒常的に外膜に露出させることで樹状細胞による貪食が効果的に誘導できるとの作業仮説に基づき、両端にPS構造を有し、かつ中央に剛直構造であるクアトロフェニル基を導入した二量体等価体 (PS dimer) を設計した (Figure 2)。二量体化することでPS輸送酵素による反転が起きても常に外膜にPSが露出し、また、中央を剛直にすることでPS輸送酵素による内膜への折れ曲がりを防ぐことができると期待した。

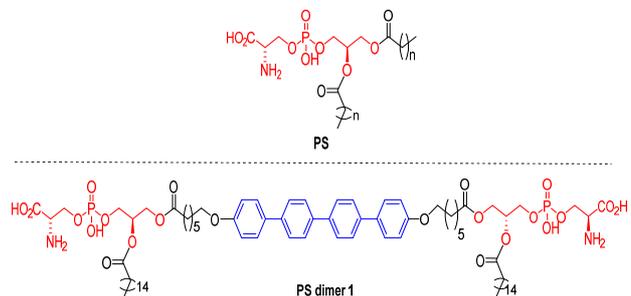


Figure 2. PS 二量等価体の設計

3. 研究の方法

目的化合物には極めて疎水性の高い膜貫通部位と2つの極性頭部(リン酸セリン)が共存することから、界面活性剤様の劣悪な物性になることが予想されたので、高極性リン酸セリン部を合成最終盤に導入することにした。また、グリセロール部分の隣接した3つの水酸基は互いにアシル鎖が転位しやすいので、合成順序や反応条件に留意して合成を進めた。最終段階でリン酸セリン部の6つの保護基を全て脱保護しようと試みたが、高極性の副生成物を多数生じ、最終的には不溶性の固体が得られるのみとなった。そこで標的化合物を変更することにした。

溶解性が悪化した原因として、中央のクアトロフェニル基部分が平面に並んだときの、 π スタッキングによる分子間力が非常に強いことが考えられた。そこで、中央2つのフェニル基のオルト位にメチル基を導入し、立体障害を持たせることで4つのフェニル基が平面に並ばないようにし、 π スタッキングの減弱を図ることにした(Figure 3)

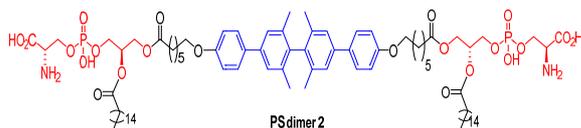


Figure 3. 改良型 PS 二量体の設計

同様の経路で改良型 PS 二量体の合成を進めた。最終ステップの脱保護は溶解性の問題もなく進行し、目的の PS dimer2 を得ることができた

本 PS 二量体のように両端に極性基をもつ化合物は膜融合が起こりにくいことに加え、水に溶けないため、リポソーム(リン脂質二重膜小胞)を作製した。作製方法として一般的なバンガム法を採用し、リポソームを構成するリン脂質の種類や比率を種々検討したところ、卵黄由来のホスファチジルコリン(Egg PC)を基質に対し5倍量用いることで、基質を含むリポソームを作製することができた。

4. 研究成果

本 PS 二量体リポソームをがん細胞へ取り

込ませた結果、期待した通りに PS 自体よりも効果的に PS を露出させることに成功した(Figure 4)。

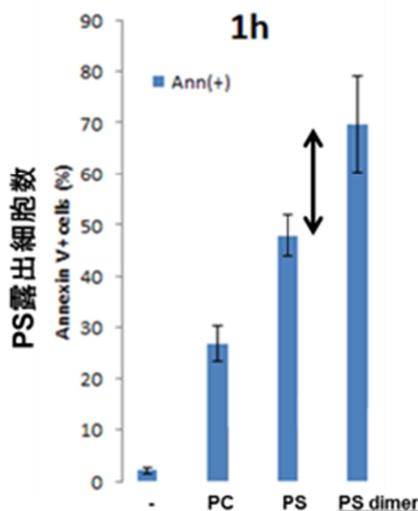


Figure 4. PS 二量等価体含有リポソームによる PS 露出細胞数

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

佐藤 耀、川村 周平、平尾 徹、室元 竜太、福田 隼、阿部 洋、松田 正、周東 智、細胞表面のホスホセリン提示可能なホスファチジルセリン二量体の設計と合成、第27回万有札幌シンポジウム、2015/7/4、北海道大学(北海道・札幌市)

佐藤 耀、川村 周平、平尾 徹、室元 竜太、福田 隼、阿部 洋、松田 正、周東 智、ファゴサイトーシス誘導性ホスファチジルセリン二量体類縁化合物の創製研究、日本薬学会第135年会、2014/3/28、兵庫医療大学(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

周東 智 (SHUTO, Satoshi)
北海道大学・薬学研究科 (研究院)・教授
研究者番号：70241346

(2) 研究分担者

福田 隼 (FUKUDA, Hayato)
北海道大学・薬学研究科 (研究院)・助教
研究者番号：30434450

(3) 連携研究者

浅井章良 (ASAI Akira)
静岡県立大学大学院薬学研究科・教授
研究者番号：60381737

松田 正 (MATSUDA Tadashi)
北海道大学・薬学研究科 (研究院)・教授
研究者番号：20212219