

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K05761

研究課題名(和文) 薬剤の放出を蛍光で追跡するための多環状ホストの開発

研究課題名(英文) Synthesis of macrocyclic hosts having multiple cyclophanes for fluorescent detecting of drug release

研究代表者

林田 修 (Hayashida, Osamu)

福岡大学・理学部・教授

研究者番号：20231532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、還元応答的なゲスト放出と蛍光法による同時検出を目指した。そのために還元条件下で開裂するジスルフィド結合に着目し、シスチンを用いて2つのシクロファンを連結し2つのローダミン部位(蛍光基)を導入した還元応答性の2環状ホスト2を合成した。合成した2は蛍光基どうしの自己消光により蛍光強度が大きく抑えられていたが、ジチオトレイトールなどの還元剤の添加によりシクロファン単量体へ開裂し、ホスト由来の蛍光強度が大きく上昇した。さらに、2は還元剤の添加により捕捉したゲスト分子を放出できることを明らかにした。2環状ホスト2を用いて還元応答的なゲスト放出と蛍光法による同時検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研では“薬剤(ゲスト)を放出する”と同時に“光り出す”などの機能をもった多環状ホストを開発することに成功した。還元剤などの外部刺激に応じてゲストを放出し、ホストの蛍光強度が約3倍に上昇することがわかった。これらの結果は、分子認識化学の分野においてホスト分子の更なる機能化のための貴重な分子設計指針を与え、薬剤運搬システムの開発に繋がるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Cysteine-linked cyclophane dimer having two rhodamine moieties (2) was synthesized as a reduction-responsive host. Owing to self-quenching property of the two rhodamine moieties, cyclophane dimer 2 showed weak fluorescence intensity relative to that of the rhodamine B moiety itself. The cleavage of disulfide bond of 2 was performed by a treatment with reducing agents such as dithiothreitol, to give the corresponding monomeric cyclophanes having a rhodamine moiety. Such reductive degradation of 2 was detected by the increase on fluorescence intensity. As a host, cyclophane dimer 2 was found to show a stronger guest-binding affinity than the monomeric cyclophanes due to concentration effects of the macrocycles. In addition, reduction-responsive release of entrapped guest molecules by 2 was also monitored by fluorescence spectroscopy.

研究分野：ホストゲスト化学

キーワード：ホストゲスト化学 分子認識 ゲスト放出 薬物送達 ジスルフィド

### 1. 研究開始当初の背景

単環状ホストは、分子内ナノ空洞の精密設計が可能であることから、そのナノ空洞に種々のゲスト分子を捕捉することができる。しかし、分子サイズが大きい抗がん剤をゲストとする場合には、単環状ホストではゲストに対する捕捉力が不十分であることが課題であった。これまでに我々は複数個の単環状ホストを共有結合で連結した多環状ホストを独自に開発してきた。例えば、5個連結した5環状ホストなどを合成し、薬剤に対する捕捉力が単環状ホストに比べて約100倍に向上することを明らかにした。一方、薬剤送達システムでは、最少量の薬剤投与で最大の効果をあげるために、薬剤の放出場所と放出速度を分析することが重要である。つまり、薬剤が、いつ、どこで、どれくらい放出されるかを高コントラストで可視化することが必要である。本研究では、新規に精密設計した多環状ホストを開発し、薬剤を漏れなく捕捉しカプセル化させる。その後、細胞内に取り込まれると、細胞内の分解作用（弱酸性、酵素、還元性など）により多環状ホストがバラバラになり、“薬剤を放出する”とともに“光り出す”革新的分子技術の開発を着想した。

### 2. 研究の目的

本研究では、薬物運搬体である多環状ホストが細胞内に取り込まれると、“薬剤(ゲスト)を放出する”と同時に“光り出す”分子技術を開発する。まず、複数個の単環状ホストを連結した多環状ホストを合成し、薬剤を捕捉(カプセル化)させる。次に、細胞内の分解作用により多環状ホストがバラバラに分解して、薬剤を放出すると同時に自ら光り出す“仕組み”を構築する。薬剤の放出場所や放出速度などを評価し、薬剤送達システムの効率化のための分子技術を開発する。また、ある種のがん細胞では細胞外部に比べてグルタチオンの濃度が高く保たれた還元雰囲気にある。ゆえに、還元条件下で開裂するジスルフィド結合に着目し、シスチンを用いて2つのシクロファンを連結したシクロファン2量体を分子基盤とした。さらに2つの蛍光基を導入することで還元応答的なゲスト放出と同時に蛍光検出が可能な新規ホストの開発を目指した(図1)。

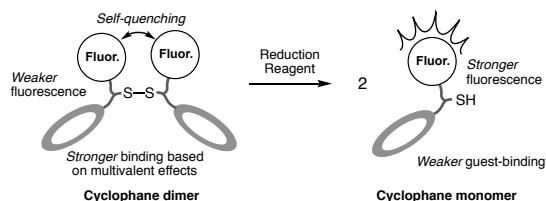


図1. 還元応答型シクロファン2量体による還元応答的なゲスト放出と蛍光検出

### 3. 研究の方法

シスチンで連結した蛍光性シクロファン2量体の合成法を確立し、ゲスト捕捉と放出を分析するために、以下の項目について検討を行なった。

#### 3-1. 合成

蛍光基としてローダミン部位を導入したシスチンをスペーサー部位に用いて2つのシクロファンを連結したシクロファン2量体2を分子設計し、合成を検討した。

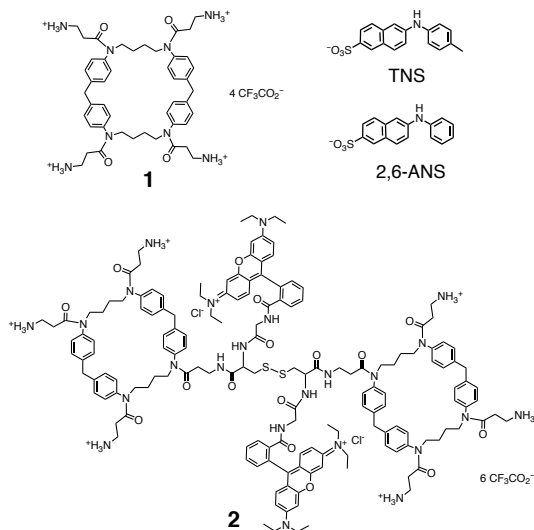


図2. 還元応答型蛍光性シクロファン2量体

### 3-2. 還元刺激への応答

シスチンで連結したシクロファン2量体2のDTTなどの還元剤添加に対するシクロファン単量体への開裂挙動をMALDI-TOF MSなどから評価した。さらに、蛍光強度の変化も追跡した。

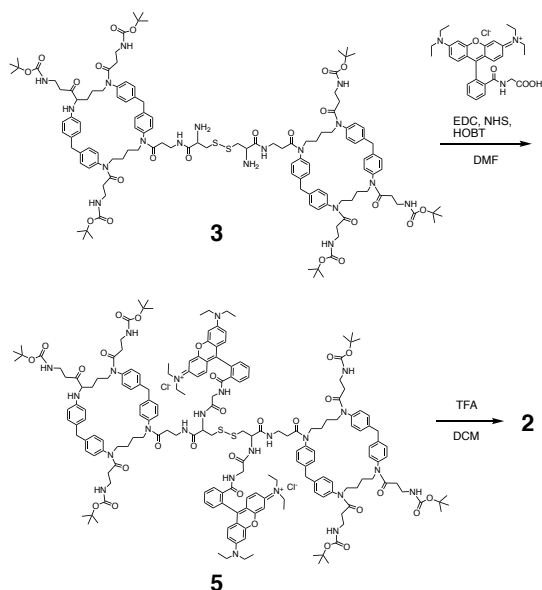
### 3-3. ゲスト捕捉と還元刺激による放出挙動

シクロファン2量体2のTNSや2,6-ANSなどの蛍光性ゲストに対する捕捉挙動を蛍光滴定実験により評価した。さらに、DTT添加に伴うゲスト放出挙動を蛍光スペクトル法から評価した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 合成

シクロファン2量体2はスキーム1に従って合成した。ローダミン誘導体とシクロファン2量体をDMF中で縮合させ、前駆体を得た。さらにTFAによる脱保護を行うことで2の合成を行った。同定は<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MALDI-TOF-MS, 元素分析にて行った。



スキーム1. 還元応答型シクロファン2量体の合成

### 4-2. 還元刺激への応答

シクロファン2量体2の水溶液にDTTを添加すると容易にシクロファン単量体6へ開裂することがMALDI-TOF MS測定からわかった(図3)。また、DTT添加に伴って2のローダミン由来の蛍光強度が徐々に上昇し、およそ120分後には飽和に達することがわかった(図4)。2の2つのローダミンどうしによる

FRETによって消光されていた蛍光が、シクロファン単量体6へ開裂することでFRETの解消が起こったためと考えられる。

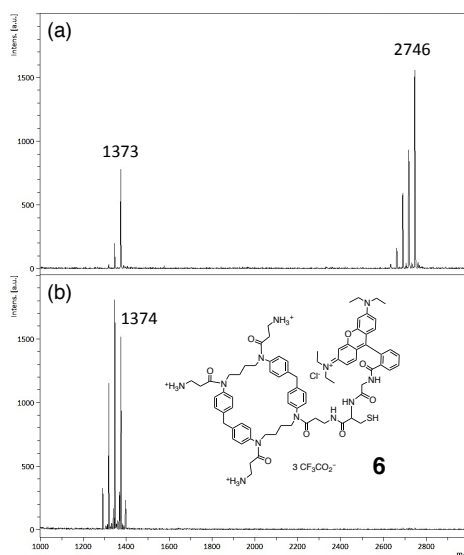


図3. DTT不在(a)および存在下(b)における2のMALDI-TOF MSスペクトル

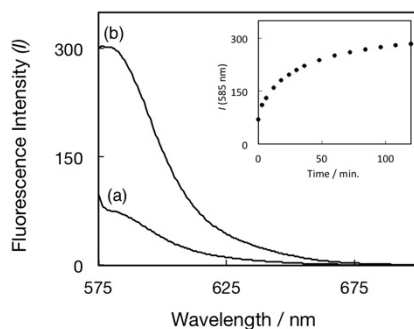


図 4. DTT 添加前(a)と 120 分後(b)の 2 の 蛍光スペクトルとその経時変化

#### 4-3. ゲスト捕捉と還元刺激による放出挙動

蛍光滴定実験をもとにシクロファン 2 量体 **2** の TNS や 2,6-ANS に対する結合定数 ( $K$ ,  $M^{-1}$ ) を Benesi-Hildebrand 解析から評価した (図 5)。その結果、それぞれ  $7.7 \times 10^4$  と  $8.3 \times 10^4 M^{-1}$  であった。これはシクロファン単量体 **6** の同一ゲストに対する  $K$  のおよそ 5 倍であった。それゆえ、**2** はシクロファンの集積によるクラスター効果によりゲストを強く捕捉できることがわかった。

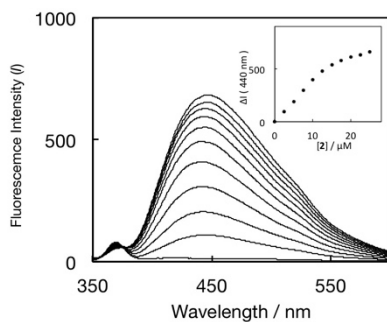


図 5. 2 の添加に伴う TNS の蛍光スペクトル変化

さらに、**2** と TNS を含む水溶液に DTT を添加したところ、TNS 由来の蛍光強度の現象が観測された (図 6)。すなわち、DTT によって **2** (シクロファン 2 量体) から **6** (シクロファン単量体) へ開裂したためにゲスト 捕捉力が低下し、**2** に捕捉されていたゲストがバルク水中へ放出されたためと考えられる。

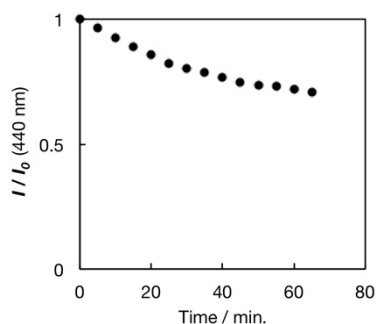


図 5. 2 存在下、DTT の添加に伴う TNS の蛍光スペクトル変化

まとめとして、本研究においてシスチンで連結した蛍光性シクロファン 2 量体 **2** の合成に成功した。合成した **2** は還元剤の添加によりシクロファン単量体への開裂し、その蛍光強度が大きく上昇した。さらに、**2** は還元剤の添加により捕捉したゲスト分子を放出できることを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Osamu Hayashida, Chihiro Nada, Shuhei Kusano  | 4. 巻<br>4               |
| 2. 論文標題<br>Synthesis of Branch-Type Cyclophane Tetramers Having a Multivalently Enhanced Guest-Binding Ability  | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Adv. Chem. Eng. Sci.  | 6. 最初と最後の頁<br>76-86     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4236/aces.2019.91006   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>O. Hayashida, K. Nishino, S. Kusano   | 4. 巻<br>87              |
| 2. 論文標題<br>Synthesis of a cysteine-linked cyclophane dimer having two rhodamine moieties and its reduction-responsive degradation as studied by fluorescence spectroscopy | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.   | 6. 最初と最後の頁<br>267-274   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s10847-017-0696-6   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>K. Nakamura, S. Kusano, and O. Hayashida  | 4. 巻<br>85              |
| 2. 論文標題<br>Synthesis of a water-soluble macrocyclic anthracenophane and its size-selective molecular Recognition  | 5. 発行年<br>2016年         |
| 3. 雑誌名<br>J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem  | 6. 最初と最後の頁<br>121-126   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>DOI: 10.1007/s10847-017-0696-6  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>O. Hayashida, T. Matsuo, K. Nakamura, and S. Kusano   | 4. 巻<br>81              |
| 2. 論文標題<br>Synthesis of water-soluble cyclophane hexamers having a triphenylene core and their enhanced guest-binding behavior  | 5. 発行年<br>2016年         |
| 3. 雑誌名<br>J. Org. Chem  | 6. 最初と最後の頁<br>4196-4201 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>DOI: 10.1021/acs.joc.6b00558  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>O. Hayashida, K. Matsushita, and S. Kusano  | 4. 巻<br>84            |
| 2. 論文標題<br>Synthesis and effect of linker length on guest-binding affinity of water-soluble tetraazacyclophane dimers | 5. 発行年<br>2016年       |
| 3. 雑誌名<br>J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem  | 6. 最初と最後の頁<br>237-243 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>DOI: 10.1007/s10847-016-0602-7  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>林田 修・柴田 佳奈・末岡 忠大・草野 修平       |
| 2. 発表標題<br>多量化した水溶性シクロファン類の合成とゲスト捕捉能の制御 |
| 3. 学会等名<br>第29回基礎有機化学討論会                |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中 陽菜・林田 修                                    |
| 2. 発表標題<br>感温性ポリマー(PNIPAM)を導入したシクロファンの合成と温度変化によるゲスト捕捉と分離 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第99春季年会2019                              |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>末岡 忠大・柴田 佳奈・田中 陽菜・林田 修           |
| 2. 発表標題<br>ジスルフィド部位を有する両親媒性シクロファンの会合挙動と還元応答 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第99春季年会2019                 |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>柴田 佳奈・林田 修   |
| 2. 発表標題<br>ジスルフィド結合を介してダブルシル部位を導入した水溶性シクロファンの会合体形成および刺激応答性の評価 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第99春季年会2019                                   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>末岡 忠大・草野 修平・林田 修                    |
| 2. 発表標題<br>ジスルフィド部位を有する両親媒性シクロファンの合成と還元応答的会合特性 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第98春季年会2018                    |
| 4. 発表年<br>2018年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>柴田 佳奈・草野 修平・林田 修                  |
| 2. 発表標題<br>ダブルシルスルフィド部位を有する水溶性シクロファンの合成と還元応答 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第98春季年会2018                  |
| 4. 発表年<br>2018年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Osamu Hayashida, Chihiro Nada, Tadahiro Sueoka, Shuhei Kusano          |
| 2. 発表標題<br>Syntheses and host-guest properties of functionalized cyclophanes      |
| 3. 学会等名<br>2017 GLOBAL RESEARCH EFFORTS ON ENERGY AND NANOMATERIALS (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>末岡 忠大・草野 修平・林田 修                  |
| 2. 発表標題<br>アルキルジスルフィド部位を有する水溶性シクロファンの合成と会合特性 |
| 3. 学会等名<br>第28回基礎有機化学討論会                     |
| 4. 発表年<br>2017年                              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>柴田 佳奈・草野 修平・林田 修                     |
| 2. 発表標題<br>ダブルジスルフィド部位を導入した水溶性シクロファンの合成とゲスト結合挙動 |
| 3. 学会等名<br>第28回基礎有機化学討論会                        |
| 4. 発表年<br>2017年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>消光性シクロファン四量体の合成と蛍光スペクトル法によるゲスト認識 |
| 2. 発表標題<br>灘 ちひろ・柴田 佳奈・草野 修平・林田 修           |
| 3. 学会等名<br>第53回化学関連支部九州大会シンポジウム             |
| 4. 発表年<br>2017年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>西野 加奈・草野 修平・林田 修                         |
| 2. 発表標題<br>ジスルフィドで連結したローダミン含有シクロファン2量体の還元刺激における蛍光応答 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第97春季年会2017                         |
| 4. 発表年<br>2017年                                     |



|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>灘 ちひろ・草野 修平・林田 修                         |
| 2. 発表標題<br>ダブルシル基を有する水溶性シクロファン四量体の合成と蛍光性ゲストに対する分子認識 |
| 3. 学会等名<br>日本化学会第97春季年会2017                         |
| 4. 発表年<br>2017年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>西野 加奈,・草野 修平・林田 修                  |
| 2. 発表標題<br>シスチンを有する還元応答型シクロファン二量体の合成とホスト機能の評価 |
| 3. 学会等名<br>有機合成化学協会九州山口支部第28回若手研究者のためのセミナー    |
| 4. 発表年<br>2016年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>西野 加奈・草野 修平・林田 修                   |
| 2. 発表標題<br>シスチンを有する還元応答型シクロファン二量体の合成とホスト機能の評価 |
| 3. 学会等名<br>第53回化学関連支部九州大会シンポジウム               |
| 4. 発表年<br>2016年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小島 実和・草野 修平・林田 修                  |
| 2. 発表標題<br>ピオチンを側鎖に導入したシクロファンの合成とアビジンとの複合体形成 |
| 3. 学会等名<br>第53回化学関連支部九州大会シンポジウム              |
| 4. 発表年<br>2016年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                      | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                                      | 備考 |
|---------------|--|--|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 草野 修平<br><br>(Kusano Shukei)<br><br>(80759291) | 国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究セン<br>ター・研究員<br><br><br><br>(82401) |    |