

令和 3 年 4 月 15 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06751

研究課題名(和文) 高活性かつ副作用の少ない抗癌剤としてのシクロデキストリン超分子の可能性評価

研究課題名(英文) Design and Evaluation of Cyclodextrin-based Supermolecules as Antitumor Agents

研究代表者

東 大志 (Higashi, Taishi)

熊本大学・大学院先端機構・准教授

研究者番号：20613409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、複数の環状分子を軸分子に閉じ込めたインターロック超分子が注目を集めている。複数の環状分子の穴に軸分子を貫通させた化合物(ポリ擬ロタキサン)の両末端に高いキャップ分子を結合させたものをポリロタキサンといい、ポリ擬ロタキサンの両末端を接合して環化させたものをポリカテナンと呼ぶ。本研究課題ではこれらインターロック超分子を抗癌剤として応用する研究を実施した。環状分子にシクロデキストリンを用いてインターロック分子を構築した結果、シクロデキストリン単体よりも優れた抗癌活性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、医薬品候補化合物が低分子化合物からタンパク質や抗体のような高分子にシフトしている。また、遺伝子、機能性核酸および細胞を用いた治療も台頭している。本研究では、超分子が抗癌剤として機能する知見が得られ、上記医薬品の推移のメインストリームとは異なる視座から新たな医薬品を創出したものであると考える。したがって本研究成果は、新しい医薬品化合物を創出するための基礎資料になり得ると考える。

研究成果の概要(英文)：In recent years, interlocked-supermolecules have attracted attention. Polyrotaxanes and polycatenanes are obtained by endcap reaction and cyclization of polypseudorotaxane, respectively. In this research project, we developed cyclodextrin (CyD)-based interlocked-supermolecules, and utilized them as antitumor agents. As a result, CyD-based interlocked-supermolecules exhibited higher antitumor activity than CyD.

研究分野：医療系薬学

キーワード：シクロデキストリン 抗癌剤 超分子 ポリロタキサン ポリカテナン

## 1. 研究開始当初の背景

### 1.1. 研究背景

近年の医薬品開発において、低分子薬物が飽和し、バイオ医薬品が台頭しているものの、バイオ医薬品は高額であり、我が国の経済を圧迫している。核酸医薬も注目を集めているが、デリバリー技術が乏しく、現在のところ発展途上である。ここで、これらに代わる全く新しい概念の医薬品原薬を創製することができれば、我が国の創薬研究は世界を牽引できるものと確信する。

申請者は最近、製剤添加物であるシクロデキストリン (CyDs) やその誘導体が、それ自体でニーマンピック病 C 型 (申請者ら, *Mol. Genet. Metab.*, 2016, 他、他者, *Lancet*, 2017, 他)、遺伝性 ATTR アミロイドーシス (申請者の研究室, *Biochem. J.*, 2011, 他)、白血病 (申請者ら, *PLoS One*, 2015)、固形癌 (申請者ら, *Sci. Rep.*, 2013, 2014, 他) などの難治性疾患に対して治療効果を示し、新たな医薬品原薬になり得る可能性を明らかにした。とりわけ、CyDs の抗癌活性は、ドキソルピシンなどの既存の抗癌剤よりも優れており、新たな抗癌剤としての注目度が高い。CyDs の抗癌活性は、CyDs の空洞と生体膜成分 (特にコレステロール) が相互作用することに起因する。

しかし、CyDs は、静脈内投与後、1 時間以内に速やかに腎排泄され、癌組織への移行性が低いことから、高用量の投与が必要であることが課題となっている。さらに、腎・肺障害や難聴などの副作用も懸念されている (他者, *Lancet*, 2017, 他)。したがって、CyDs の血中滞留性や癌組織移行性を改善すると共に、正常組織への作用を軽減できれば、高活性かつ副作用の少ない、新規抗癌剤の創製が期待できる。

CyD 誘導体の 1 つであるメチル-β-CyD (M-β-CyD) は、数ある CyD 誘導体の中でコレステロールに対する親和性が強く、強力な抗癌活性を示す (申請者の研究室, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2009)。しかし、M-β-CyD も静脈内投与後、速やかに腎排泄され、さらに正常細胞にも障害性を示すため、M-β-CyD 自体を抗癌剤として利用することは困難であった。したがって、M-β-CyD の血中滞留性を向上させ、さらに正常組織では細胞障害活性を示さず、癌組織で抗癌活性を發揮するシステムを構築できれば、ユニークな抗癌剤の開発が期待できる。

## 2. 研究の目的

近年、複数の環状分子を軸分子に閉じ込めたインターロック超分子が注目を集めている。複数の環状分子の穴に軸分子を貫通させた化合物 (ポリ擬ロタキサン) の両末端に高いキャップ分子を結合させたものをポリロタキサンといい、ポリ擬ロタキサンの両末端を接合して環化させたものをポリカテナンと呼ぶ (図 1)。CyD を用いたポリロタキサンに関する報告も多数存在する。ここで、M-β-CyD をポリロタキサンにすると、1) 高分子量になるため血中滞留性が向上する、2) 空洞が閉塞しているためポリロタキサンの状態では細胞障害活性を示さない、3) ポリロタキサンの分子内に、癌の環境あるいは細胞内環境で選択的に切断される結合様式を導入すると、癌組織・癌細胞選択的にポリロタキサンが崩壊し、M-β-CyD が放出され、腫瘍選択的な抗癌活性を示す、などの利点が期待できる (図 2)。

そこで本研究では、M-β-CyD ポリロタキサンを調製し、その抗癌活性を評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3.1. M-β-CyD ポリロタキサンの調製

まず、軸分子にポリエチレングリコール-ポリプロピレングリコール-ポリエチレングリコール共重合体 (PEG-PPG-PEG) を用いて、β-CyD とのポリ擬ロタキサンを形成させ、トリニトロベンゼンスルホン酸でキャップした。この β-CyD ポリロタキサンをメチル化し、M-β-CyD ポリロタキサンを得た。さらに、癌細胞へのアクティブターゲティング能を付与するため、癌リガンドとして汎用される葉酸を修飾した。なお、本ポリロタキサンには、軸分子に細胞内のカルボキシエステラーゼで切断されるカルバメート結合が含まれており、カルボキシエステラーゼは癌細胞に高発現していることが報告されている。したがって、本ポリロタキサンは癌細胞表面の葉酸受容体を介して細胞内に取り込まれた後、カルボキシエステラーゼで分解され、M-β-CyD を放出することが期待できる。

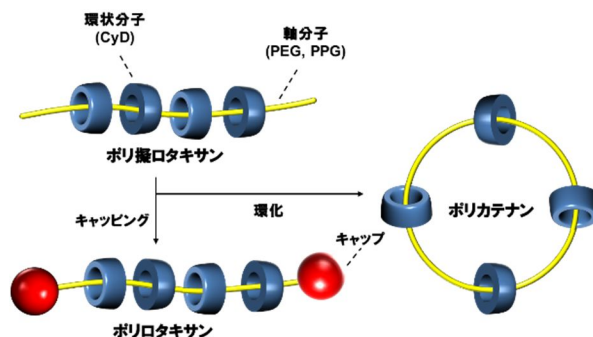


図 1. ポリ擬ロタキサン、ポリロタキサンおよびポリカテナンの模式図

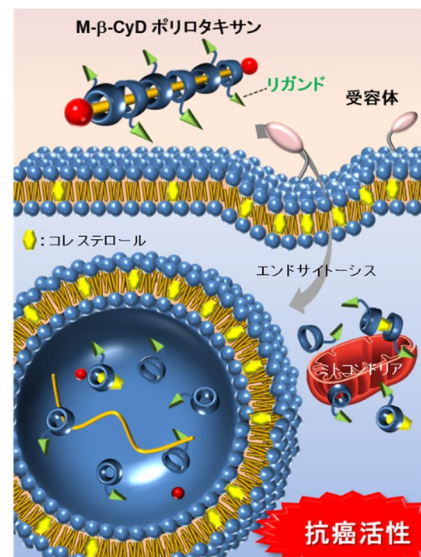


図 2. M-β-CyD ポリロタキサンの抗癌活性誘導機構

### 3.2. *In vivo* 抗癌活性ならびに安全性評価

マウス大腸癌由来 Colon-26 細胞 (葉酸受容体発現細胞) を移植した担癌マウスに、M-β-CyD ポリロタキサンを静脈内投与後、腫瘍サイズを測定することにより、抗癌活性を評価した。また、各種血液生化学検査値を測定し、安全性を見積った。

## 4. 研究成果

### 4.1. M-β-CyD ポリロタキサン

PEG-PPG-PEG の両末端の水酸基を CDI で活性化し、過剰量の tris(2-aminoethyl)amine を反応させることにより、カルバメートを介して軸分子をアミノ化した。本軸分子をアジ化 β-CyD と反応させ、ポリ擬ロタキサンを得た。さらに、トリニトロベンゼンスルホン酸でキャップすることにより、ポリロタキサンを調製し、塩基条件下でヨウ化メチルを反応させ、ポリロタキサンの水酸基をメチル化した。アルキン修飾した葉酸を銅触媒下で反応させ、葉酸修飾 M-β-CyD ポリロタキサンを得た。

<sup>1</sup>H-NMR の結果より、ポリロタキサン 1 分子中の β-CyD 数は約 14 個、β-CyD 1 分子あたりの葉酸修飾数は約 1 個、メチル基修飾数は、約 9 個であることが確認された。上記結果を基に、本ポリロタキサンの分子量の理論値を算出したところ、約 30 kDa であった。

葉酸受容体発現 Colon-26 細胞をマウスに移植し担癌マウスを作成後、M-β-CyD ポリロタキサンを静脈内投与 (5 日間に 1 回、合計 3 回) すると、葉酸修飾 M-β-CyD よりも強い抗癌活性が認められた。さらに、M-β-CyD ポリロタキサンはマウスの生存率も延長させた。

M-β-CyD ポリロタキサンあるいは葉酸修飾 M-β-CyD を、健常マウスに単回投与しても、血液生化学検査値の異常値は認められなかった。一方、5 日間に 1 回、合計 3 回静脈内投与すると、葉酸修飾 M-β-CyD 投与群において、LDH 値の上昇が認められた。しかし、M-β-CyD ポリロタキサン投与群では、異常値が認められなかったことから、M-β-CyD ポリロタキサンは安全性に優れる可能性が示唆された。

このように、M-β-CyD をポリロタキサン化すると、抗腫瘍効果が増大し、安全性が向上する可能性が示唆された。

### 4.2. ポリカテナン

ポリロタキサンとともに代表的なインターロック分子として、ポリカテナンが知られている。ポリカテナンはポリロタキサンに比べ、キャップ分子フリーで調製できるため、水溶性の向上、分解後の安全性の向上、製造性の向上、コストの軽減などが期待できる。しかし、CyD ロタキサン、ポリロタキサンに比べて、CyD カテナン、ポリカテナンの合成は困難と言われており、その報告例も極めて少ない。そこで本研究では、新規 CyD 超分子としてポリカテナンの調製を試みた。

まず、PEG-PPG-PEG の両末端をチオール化し β-CyD を混合すると、β-CyD が PPG 部を選択的に包接し、ポリ擬ロタキサンを形成した。これにより、両末端の PEG 鎖がフリーとなり、環化反応がスムーズに進行できる。ポリ擬ロタキサンの懸濁液に、過酸化水素水を添加すると、ジスルフィド結合が形成され、ポリカテナンを得ることができた。なお、反応物中にはポリ擬ロタキサンが直鎖状に連結したポリ-ポリ擬ロタキサンも含まれていたため、調製物を DMSO に溶解し、未反応のポリ擬ロタキサンやポリ-ポリ擬ロタキサンを解離させ、水やアルコールで洗浄することにより、ポリカテナンのみを単離することに成功した。大変ユニークなことに、本ポリカテナンは分子内にジスルフィド結合を有しているため、還元環境中で分解し、β-CyD を放出する特性を示した。

上記方法を用いると、キャップ分子フリーで CyD 超分子を構築できるため、ポリカテナンを用いた抗癌剤を構築できると考えた。しかし、上記ポリカテナンは、化学的に不安定なジスルフィド結合を介して環化されているため、水中および還元環境下において分解しやすく、水溶性や機能性の向上を企図した誘導体化を施す際には注意が必要である。CyD ポリロタキサンやポリカテナンは極めて水に溶けにくいいため、誘導体化反応は必須であり、誘導体化反応にも耐えうる安定なポリカテナンの開発が求められる。そこで次に、化学的に安定な結合様式でポリカテナンを調製し、水溶性ポリカテナン誘導体を調製した。

まず、軸分子の PEG-PPG-PEG の両末端をエチレンジアミンによりアミノ化し (PEG-PPG-PEG-NH<sub>2</sub>)、β-CyD と混合することによりポリ擬ロタキサンを調製した。次に、塩基条件下、テレフタロイルクロリドを用いて軸分子の両末端のアミノ基を接合し、環化反応を行った。生成物を DMSO に溶解し、未反応のポリ擬ロタキサンを解離させ、アセトンおよび水で洗浄することにより遊離の PEG-PPG-PEG-NH<sub>2</sub>、β-CyD および未反応のテレフタロイルクロリドを除去した。さらに 3 日間透析し、凍結乾燥することにより本品を得た。本ポリカテナン 1 分子中の β-CyD 数は約 11 個であり、収率は 4.6% であった。次に、本ポリカテナンに 1,2-bis(aminoethoxy)ethane、無水コハク酸およびプロピレンオキシドを反応させることにより、アミノ化、カルボキシル化およびヒドロキシプロピル化された水溶性のポリカテナン誘導体を得ることができた。いずれのポリカテナン誘導体も 10 mg/mL 以上の溶解性を示し、水溶性に優れることが確認できた。

以上のように、ポリカテナンおよび水溶性ポリカテナン誘導体の調製に成功した。今後、ポリカテナンを用いた抗癌剤の構築を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Higashi Taishi, Morita Kentaro, Song Xia, Zhu Jingling, Tamura Atsushi, Yui Nobuhiko, Motoyama Keiichi, Arima Hidetoshi, Li Jun	4. 巻 2
2. 論文標題 One-pot synthesis of cyclodextrin-based radial poly[n]catenanes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-019-0180-x	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 東 大志	4. 巻 56
2. 論文標題 シクロデキストリンから成る超分子ネックレス「ポリカテナン」の調製	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 754-756
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kentato Morita, Keiichi Motoyama, Ayako Kuramoto, Risako Onodera, Taishi Higashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis of cyclodextrin-based radial polycatenane cyclized by amide bond and subsequent fabrication of water-soluble derivatives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東 大志
2. 発表標題 大腸がん治療薬としての葉酸修飾メチル-β-シクロデキストリン/アダマンタン修飾
3. 学会等名 第35回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 東 大志
2. 発表標題 腫瘍選択的超分子抗がん剤としての葉酸修飾メチル-β-D-シクロデキストリンポリロタキサンの可能性評価
3. 学会等名 第 35 回日本 DDS 学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部製剤設計学分野 <a href="http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/seizai/index.html">http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/seizai/index.html</a>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------