

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05448

研究課題名(和文) 複数の外部刺激にตอบสนองして薬剤を放出すると共に蛍光を発する分解性多環状ホストの開発

研究課題名(英文) Development of degradable polycyclic hosts that releases drugs and emits fluorescence in response to multiple external stimuli

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、還元剤や pH 変化などの複数の外部刺激にตอบสนองして分解することで、がん細胞に対してより正確にゲスト(薬剤)を放出できるホストの開発を行った。pH 応答性の官能基を側鎖に、還元応答性のジスルフィドを分子骨格にもつ分解型ホスト1を合成した。1はpH変化に応じてゲスト捕捉能が変わり、pH変化と還元剤の添加という二つの刺激により、より効果的にゲストを放出することができた。さらに、還元剤としてグルタチオン(GSH)の添加に伴って蛍光を発する分解型ホスト2も合成した。GSHの添加により、2のジスルフィド結合が開裂し、放出したピレンチオラート体が自己会合してエキシマー蛍光を発することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、還元剤や pH 変化などの複数の外部刺激にตอบสนองして分解し、捕捉したゲストを放出できる分解型ホスト分子を開発した。さらに、還元剤としてグルタチオンの添加に伴って、ジスルフィド結合が開裂し、放出したピレンのチオラート体が自己会合してエキシマー蛍光を発する分解型ホスト分子も合成した。これら分解型ホスト分子の分子設計と合成は、ホストゲスト化学や超分子化学の学術分野の発展に貢献するものであり、がん細胞を標的とした薬物送達システムの開発への基礎的知見を与えるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed host molecules that can more accurately release guest molecules (drugs) to cancer cells by breaking down in response to multiple external stimuli such as reducing agents and pH changes. We synthesized degradable host 1, which has a pH-responsive functional group in its side chain and a reduction-responsive disulfide in its molecular skeleton. The guest-binding ability of 1 changed in response to changes in pH, and it was possible to release guest molecules more effectively with the two stimuli of pH change and addition of a reducing agent. Furthermore, we synthesized a degradable host 2 that emits fluorescence upon addition of glutathione (GSH) as a reducing agent. By adding GSH, the disulfide bond of 2 was cleaved, and the released pyrene thiolate self-associated, successfully emitting excimer fluorescence.

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

薬の効果を最大限に引き出し、かつ副作用を最小限に抑えることを目指して、必要な時に、必要な場所で、必要な量だけ薬剤を供給する薬剤送達システムの研究が活発に行われている。薬剤送達システムでは、標的のがん細胞のみに薬剤を作用させることが重要である。ちなみに、がん細胞は細胞内が比較的強い還元状態にあり、また正常細胞と比べてやや低い pH であることが知られている。それゆえ、還元剤や pH 低下などの外部刺激に応答して薬剤を放出可能な薬剤運搬体の候補として、これまでに高分子ミセルやリポソームなどが積極的に研究されてきた。還元剤に応答する薬物運搬体の研究は数多く存在するものの、がん細胞に対する選択性はまだ不十分である。すなわち、還元という一つの刺激に反応するための感度を高めたとしても、標的のがん細胞だけに薬剤を作用させることは困難である。通常の弱い還元状態である正常細胞でも緩やかに応答し、薬剤が放出されてしまうためである。そのため、一つの刺激に反応するための感度を上げるよりも、複数の刺激を同時に感知する方がより正確になるのではないかと考えた。そこで、還元に加えて pH 変化などの第二の刺激にも応答するように適切に分子設計すれば、より正確にがん細胞のみに薬を放出する薬剤送達システムが開発できるはずであると着想した。既に開発済みの蛍光基を有する環状ホストに複数の刺激に応答する官能基を導入することで、薬剤送達における放出挙動を高感度・高精度に可視化しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、還元剤や pH 変化などの複数の外部刺激に応答して分解することで、正常細胞と比べてがん細胞に対してより正確に薬剤を放出できる分解性 2 環状ホストを開発することとした。そこで、pH 変化と還元剤の両方の刺激に対する応答性を期待できるホスト分子として、pH 応答性のアンモニウム基とカルボキシ基を持つ側鎖、ならびに還元応答性のジスルフィドを分子骨格に組み込んだシクロファン 2 量体 1 を分子設計し、合成することを目的とした (図 1)。1 は酸性から塩基性の幅広い pH 条件下で水溶性ホスト分子として機能し、pH 変化に応じてゲスト捕捉能が変わることが期待される (図 2)。また、pH 変化と還元剤の添加という二つの刺激により、より効果的にゲスト放出できると期待される。さらに、グルタチオンなどの還元剤の添加に伴って蛍光を発するように分子設計した分解型アニオン性ホシクロファンに

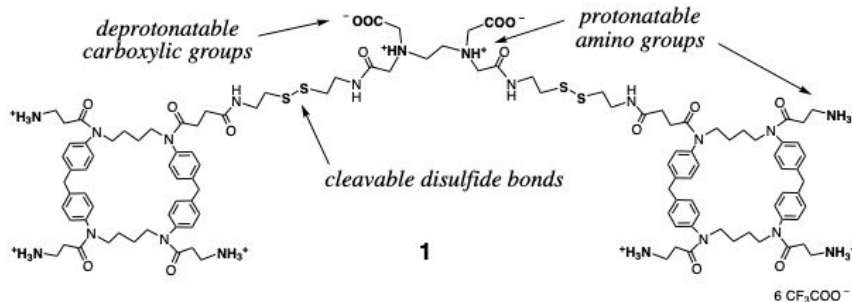


図 1. 還元応答性のジスルフィドを分子骨格に組み込んだシクロファン 2 量体 (1) ¹

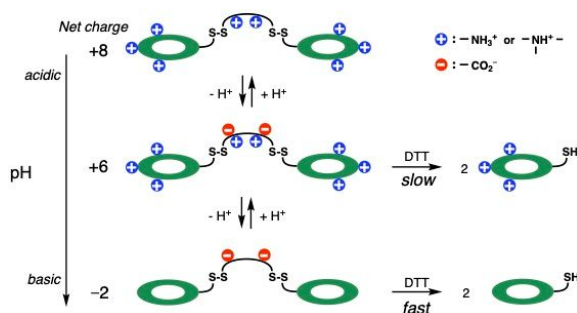


図 2. 酸性から塩基性の pH 条件下における 1 の電離平衡と還元剤による開裂 ¹

ついてもあわせて合成し、その機能を検討することを目的とした(図3)

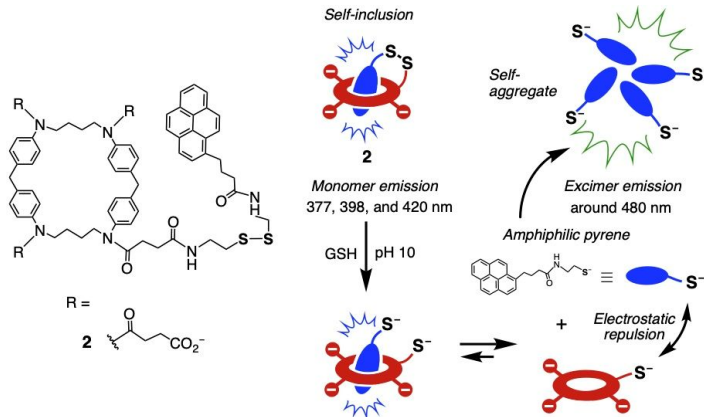
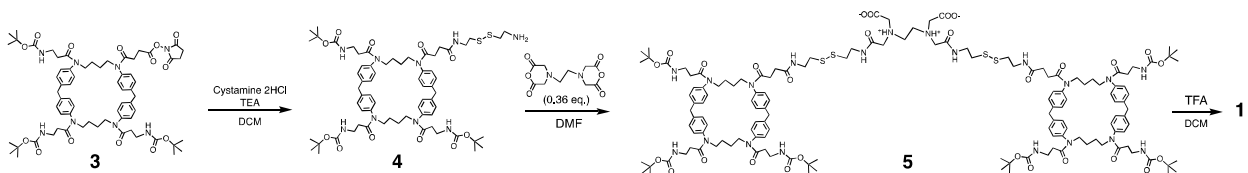


図3. 分解型アニオン性ホシクロファン(3)を用いたグルタチオンの蛍光検出の模式図²

3. 研究の方法

3-1. pH および還元応答性シクロファン2量体

i) 合成: pH 応答性のアンモニウム基とカルボキシ基を持つ側鎖と還元応答性のジスルフィドを分子骨格に組み込んだシクロファン2量体1を分子設計し、合成した。



スキーム1. 還元応答型シクロファン2量体の合成¹

ii) pH刺激に応答したゲスト捕捉: 環境応答性の蛍光性ゲストであるTNSを含む各緩衝液(pH 3.8, 7.4, 10.7)に1を添加して蛍光滴定実験を25で行い、得られた蛍光強度から線形解析により1のTNSに対する結合定数(K/M^{-1})を算出した。さらに測定温度を15, 35, 45にして蛍光滴定実験を行い、van't Hoff解析からエンタルピー変化(ΔH)とエントロピー変化(ΔS)を求めた。

iii) pHと還元剤の二重刺激によるゲスト放出: 1とTNSの複合体を含む各緩衝液に還元剤(DTT)を添加して、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。

3-2. 分解型アニオン性シクロファン

i) 合成: 還元剤添加に伴って蛍光を発することを旨し、蛍光基およびゲスト部位としてはたらくピレンを導入したアニオン性シクロファン2を分子設計し、合成した。

ii) 還元刺激によるゲスト放出と蛍光検出: 還元剤としてグルタチオン(GSH)を用い、分解型アニオン性シクロファンの刺激応答性を蛍光スペクトルの変化により評価した。

4. 研究成果

4-1. pH および還元応答性シクロファン2量体

i) 合成: スキーム1に従ってpH 応答性のアンモニウム基とカルボキシ基を持つ側鎖と還元応答性のジスルフィドを分子骨格に組み込んだシクロファン2量体1を合成した。シクロファンの活性エステル体とシタミンを反応させて4を合成した後、EDTA酸無水物と反応させて前駆体5を合成した。5をTFAで脱保護して1を得た。同定は¹H-NMR, ¹³C-NMR, MALDI-TOF-MS, 元素分析にて行った。

ii) pH刺激に応答したゲスト捕捉: 蛍光滴定実験から求めた1のTNSに対する K は、pHが酸性になるほど蛍光強度と伴に増大した(図3, 表1)。pH 3.8, 7.4の場合には1の正味荷電がそれぞれ+4, +8のカチオン

性ホストとして機能するため、TNS に対して疎水性相互作用に加えて静電相互作用も強く作用したためと考えられる。一方 pH 10.7 では、アンモニウム基がアミンとなり 1 の正味荷電が -2 となってアニオン性ホストとして機能し、静電相互作用の影響が弱まり疎水性相互作用が強く作用するため K が小さくなったと考えられる。静電相互作用と疎水性相互作用が主な駆動力であることは、van't Hoff 解析から得られた ΔH および $T\Delta S$ の値からも示唆された (表 2)。

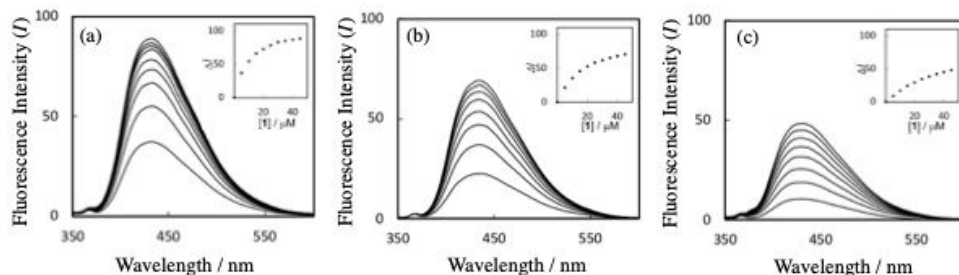


図 4. 1 の添加に伴う TNS の蛍光スペクトル変化: pH 3.8 (a) 7.4 (b) 10.7 (c) ¹

表 1. 各温度における pH 3.8, 7.4, 10.7 での 1 の TNS に対する結合定数 (K / M^{-1}) ¹

pH	T / K			
	288	298	308	318
3.8	1.6×10^5	9.6×10^4	4.9×10^4	2.4×10^4
7.4	1.0×10^5	6.0×10^4	4.0×10^4	2.3×10^4
10.7	3.3×10^4	2.4×10^4	1.7×10^4	1.2×10^4

表 2. pH 3.8, 7.4, 10.7 緩衝液中での 1 の TNS に対するホストゲスト複合体形成におけるギブズ自由エネルギー変化 (ΔG , kJ mol^{-1}) および熱力学的パラメーター (ΔH , kJ mol^{-1}) (ΔS , $\text{kJ mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) ¹

pH	ΔG , kJ mol^{-1}	ΔH , kJ mol^{-1}	$T\Delta S$, kJ mol^{-1}
3.8	-28.4	-75.2	-46.8
7.4	-27.2	-64.3	-37.1
10.7	-25.0	-49.9	-24.9

iii) pH と還元剤の二重刺激によるゲスト放出: 1 と TNS からなる複合体を含む緩衝液 (pH 7.4) に還元剤 (ジチオトレイトール, DTT) を添加したところ、蛍光強度が減少した (図 5a)。これは DTT によって 1 のジスルフィド結合が開裂して単量体 6 が生成し (図 5)、捕捉能が低下したことで捕捉されていた TNS が放出されて蛍光強度が減少したと考えられる。また、緩衝液の pH を 10.7 にして同様の実験を行ったところ蛍光強度が減少しきるまでの時間は pH 7.4 の場合に比べて 10 分の 1 にまで短縮した (図 5b)。1 のゲスト放出能の向上は正味荷電が -2 となったことに加え、DTT 由来のチオールがチオラートとなり反応性が高くなったためと考えている。以上の実験より、1 は pH 変化と還元剤添加の二重刺激を加えることでより効果的にゲスト分子を放出できることがわかった。

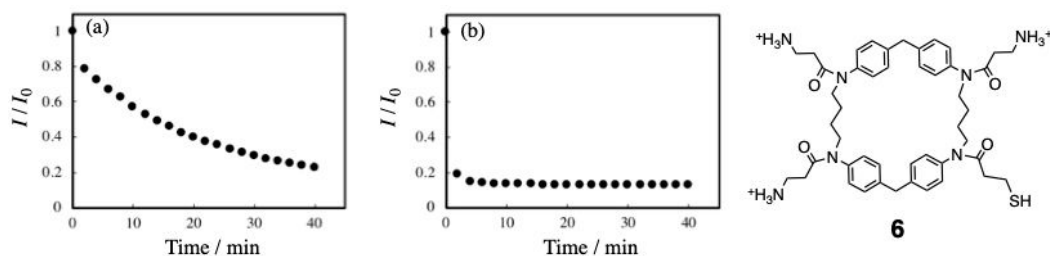
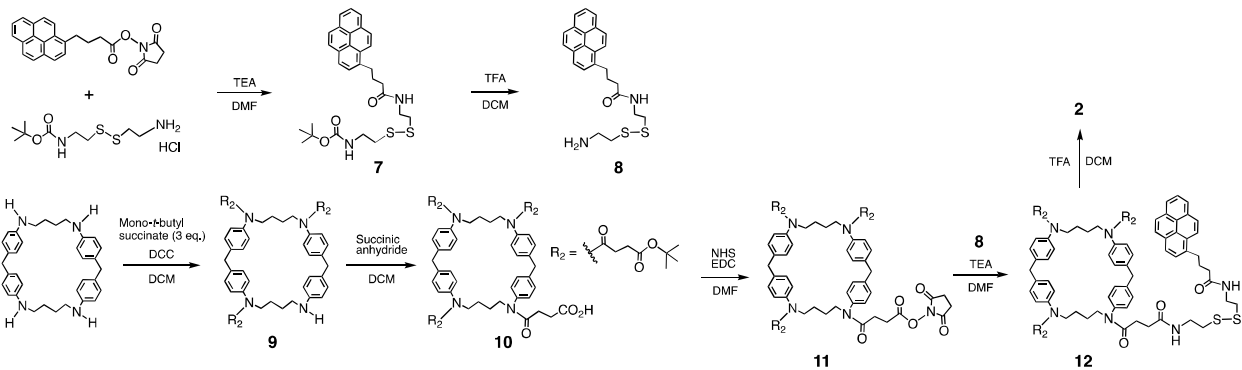


図 5. 1 と TNS からなる複合体に DTT を添加してからの蛍光強度の経時変化: pH 7.4 (a) 10.7 (b). 1 のジスルフィド結合が開裂して生成した単量体 6 ¹

4-2. 分解型アニオン性シクロファン

i) 合成: スキーム 2 に従って分解型アニオン性シクロファン **2** を合成した。最終工程では、シクロファンのモノスクシンイミジルエステル体 **11** とピレンのモノアミン **8** を反応させ、シクロファンの側鎖を *tert*-ブチルエステル基で保護した前駆体 **12** を得た。TFA によって脱保護し、**2** を得た。同定は ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MALDI-TOF-MS, 元素分析にて行った。



スキーム 2. 分解型アニオン性シクロファンの合成²

ii) 還元刺激によるゲスト放出と蛍光検出: 塩基性条件下 (pH 10) において **2** の水溶液に GSH を添加した場合は、モノマー蛍光が減少し、エキシマー蛍光が増加した。これは GSH により **2** のジスルフィド結合が開裂し、生じたチオラート体 (**13**) による会合体形成のためと考えられる。

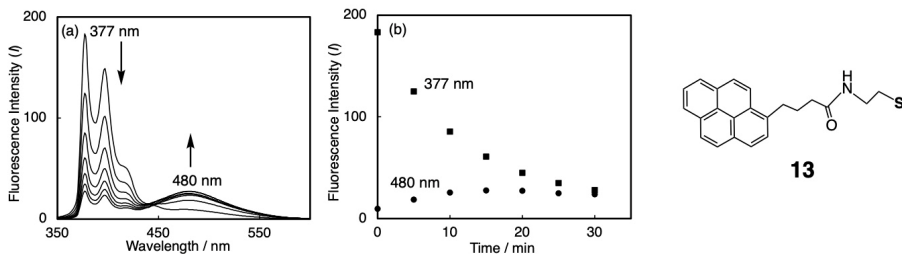


図 6. **2** の炭酸緩衝液に GSH を添加してからの蛍光スペクトルの経時変化²

まとめとして、pH 変化と還元剤の両方の刺激に対する応答性を期待できるホスト分子として、pH 応答性のアンモニウム基とカルボキシ基を持つ側鎖、ならびに還元応答性のジスルフィドを分子骨格に組み込んだシクロファン **2** 量体 **1** の合成に成功した。**1** は酸性から塩基性の幅広い pH 条件下で水溶性ホスト分子として機能し、pH 変化に応じてゲスト捕捉能が変わることを見いだした。また、pH 変化と還元剤の添加という二つの刺激により、より効果的にゲスト分子を放出することにも成功した。さらに、グルタチオンなどの還元剤の添加に伴って蛍光を発するように分子設計した分解型アニオン性シクロファン **2** の合成にも成功した。還元剤として GSH の添加により、**2** のジスルフィド結合が開裂し、放出したピレンのチオラート体が自己会合することでエキシマー蛍光を観測することができた。すなわち、還元剤や pH 変化などの複数の外部刺激に応答して分解することにより、ゲスト分子をより効果的に放出でき、かつ蛍光強度の変化として検出する機能性分子の開発に成功した。

参考文献

- Osamu Hayashida, Yudai Tanaka, Takaaki Miyazaki, *Molecules*, **2021**, 26, 3097-3106.
- Osamu Hayashida, Satoru Imamura, Takaaki Miyazaki, *Chem. Lett.*, **2022**, 51, 859-861.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osamu Hayashida; Yuumi Hayashida; Takaaki Miyazaki	4. 巻 52
2. 論文標題 Thiol-reactive pyrene dimer having a disulfide linkage as a ratiometric fluorescence probe to thiol-containing biomolecules	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 128-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.220521	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 -

1. 著者名 Osamu Hayashida; Satoru Imamura; Takaaki Miyazaki	4. 巻 51
2. 論文標題 A fluorescence study on guest release of reduction-responsive host-guest conjugates having a disulfide bond	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 859-861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.220259	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 -

1. 著者名 Osamu Hayashida, Tensho Tomita, Takaaki Miyazaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Self-aggregation, temperature-responsive agglutination, and pH-induced disaggregation of amphiphilic cyclophane dimer having a PEG linkage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 1611-1613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.210348	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 -

1. 著者名 Osamu Hayashida, Yudai Tanaka, Takaaki Miyazaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Synthesis and guest-binding properties of pH/reduction dual-responsive cyclophane dimer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 3097-3106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26113097.	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 -

1. 著者名 Osamu Hayashida, Kana Shibata	4. 巻 85
2. 論文標題 Stimuli-Responsive Supramolecular Coaggregation and Disaggregation of Host-Guest Conjugates Having A Disulfide Linkage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 5493-5502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c00237	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 -

1. 著者名 Osamu Hayashida, Haruna Tanaka	4. 巻 49
2. 論文標題 Guest Capture and Separation by Temperature Responsive Cyclophane-PNIPAM Conjugates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 605-608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200135	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24件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 大熊 春菜, 宮崎 隆聡, 林田 修
2. 発表標題 複数のカチオン性側鎖と蛍光性のピレン部位を有する水溶性シクロファンの合成
3. 学会等名 日本化学会 第104春季年会(2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Osamu Hayashida, Shouta Minami, Haruna Okuma, Yuya Araki, Takaaki Miyazaki
2. 発表標題 Synthesis and Multivalently Enhanced Guest-binding Properties of Functionalized Azacyclophanes
3. 学会等名 CEMsupra 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuya Araki, Takaaki Miyazaki, Osamu Hayashida
2. 発表標題 Synthesis of PDI-cyclophane Conjugates and Their Self-aggregation and Guest-induced Agglutination Behavior
3. 学会等名 CEMsupra 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 荒木 優弥, 宮崎 隆聡, 林田 修
2. 発表標題 ペリレンジイミドで連結した水溶性シクロファン2量体の合成と会合挙動
3. 学会等名 第60回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林田 有未; 宮崎 隆聡; 林田 修
2. 発表標題 ジスルフィド結合で連結したピレン二量体のレシオ型蛍光応答とシクロファンからなる超分子会合挙動
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒木 優弥; 宮崎 隆聡; 林田 修
2. 発表標題 ペリレンジイミド部位で連結した水溶性シクロファン 2 量体の合成と自己会合挙動
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林田 有未; 宮崎 隆聡; 林田 修
2. 発表標題 ジスルフィド連結型ピレン二量体の合成とシステインの蛍光検出
3. 学会等名 第59回 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Osamu Hayashida, Kana Shibata, Yudai Tanaka, and Takaaki Miyazaki
2. 発表標題 Stimuli-responsive supramolecular system using cyclophanes having a disulfide linkage
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村 悟, 宮崎 隆聡, 林田 修
2. 発表標題 ホストゲストコンジュゲートの合成と超分子集合体の構築
3. 学会等名 有機合成化学協会九州山口支部第33回若手研究者のためのセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林田 有未, 宮崎 隆聡, 林田 修
2. 発表標題 ジスルフィド結合で連結したピレン2量体の合成と還元刺激によるレシオ型蛍光
3. 学会等名 第58回 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村 悟, 宮崎 隆聡, 林田 修
2. 発表標題 ホストゲストコンジュゲートの合成と超分子集合体の構築
3. 学会等名 第58回 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 優大・宮崎 隆聡・林田 修
2. 発表標題 pHおよび還元応答性をもつシクロファン二量体の合成とゲスト捕捉挙動
3. 学会等名 2020日本化学会九州支部秋期研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富田 天翔・宮崎 隆聡・林田 修
2. 発表標題 親水性スパーサーで連結したシクロファン2量体の合成と超分子会合挙動
3. 学会等名 2020日本化学会九州支部秋期研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林田 修・柴田 佳奈・末岡 忠大・田中 優大
2. 発表標題 ジスルフィド部位を有する水溶性シクロファン類の合成と還元刺激による機能制御
3. 学会等名 第17回 ホスト・ゲスト化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 陽菜・林田 修
2. 発表標題 PNIPAMポリマーを導入した感温性シクロファンの合成と温度応答的なゲスト捕捉挙動
3. 学会等名 第17回 ホスト・ゲスト化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田 佳奈、田中 優大、林田修
2. 発表標題 ダブルシルジスルフィド部位を有する刺激応答型シクロファンの合成と会合特性の評価
3. 学会等名 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 優大、柴田 佳奈、林田修
2. 発表標題 pH応答性と還元応答性を持つシクロファン2量体の合成とホスト機能の評価
3. 学会等名 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 陽菜、林田修
2. 発表標題 PNIPAMを導入した感温性シクロファンの合成と温度刺激によるゲスト捕捉と分離
3. 学会等名 化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田 佳奈・田中 陽菜・林田 修
2. 発表標題 ダブルシ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会合特性の評価
3. 学会等名 第30回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 陽菜・柴田 佳奈・林田 修
2. 発表標題 PNIPAM を導入したシクロファンの合成と LCST 挙動によるゲスト捕捉と分離
3. 学会等名 第30回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 HAYASHIDA, Osamu; SHIBATA, Kana; NISHINO, Kana
2. 発表標題 Synthesis and Reduction-responsible Host-guest Properties of Functionalized Water-soluble Cyclophanes
3. 学会等名 CEMsupra 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 HAYASHIDA, Osamu; SHIBATA, Kana; NISHINO, Kana
2. 発表標題 Supramolecular properties of reduction-responsible water-soluble cyclophanes
3. 学会等名 The Asian Conference on Supramolecular Chemistry (ACSC2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 優大・林田 修 ,
2. 発表標題 pHおよび還元応答性のシクロファン 2 量体の合成とゲスト捕捉挙動
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富田 天翔・林田 修
2. 発表標題 PEG鎖で連結したシクロファン 2 量体の合成と超分子会合挙動
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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