

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05541

研究課題名(和文) イオン性薬剤の膜表面・膜透過反応機構の解明と多分岐高分子による反応制御

研究課題名(英文) Mechanistic analysis and reaction control of ionizable drugs and their conjugates with dendritic polymers in a biomimetic membrane system

研究代表者

永谷 広久 (NAGATANI, Hirohisa)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：90346297

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)：アントラサイクリン系抗がん剤を含むイオン性薬剤の膜表面・膜透過反応機構について、混ざり合わない二種の液体の界面(液液界面)を生体膜のモデル反応場として利用することで分光電気化学的に研究した。また、液液界面やリン脂質膜表面で特異的に生じる水溶性テトラフェニルエテン誘導体の凝集誘起発光挙動を明らかにした。さらに、多分岐高分子とイオン性薬剤のイオン会合体形成や薬剤の膜反応挙動に対する影響を精査し、デンドリマーの薬剤キャリアとしての機能性を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデル反応場を用いてイオン性薬剤の生体膜における表面吸着や膜透過反応の機構を解析する方法論を示し、薬剤の分子構造と薬物動態の相関を検討する上で重要な知見を得た。また、多分岐高分子との複合化による薬剤の相間分配挙動の制御に限定的ながら成功し、多分岐高分子がドラッグデリバリーのための薬剤キャリアとして有用であること確認した。さらに液液界面や膜表面で選択的に生じる凝集誘起発光の反応系を見だし、膜表面を対象とした電位感受性蛍光プローブとして応用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The membrane surface and transmembrane processes of ionizable drugs including anthracycline antibiotics were studied spectroelectrochemically at liquid-liquid interfaces as a model of biomembrane. The aggregation-induced emission mechanism of water-soluble tetraphenyl ethene derivatives was also elucidated at liquid-liquid and biomimetic interfaces. The ion association of ionizable drugs with dendrimers and its interfacial mechanism were studied for evaluating the capability of dendrimers as functional drug carrier.

研究分野：界面分析化学，分光電気化学

キーワード：アントラサイクリン デンドリマー 液液界面 凝集誘起発光 分光電気化学

1 . 研究開始当初の背景

薬剤分子の多くは水溶液中でイオン種として溶存するため、薬剤の膜透過反応機構は溶液相の電解質組成や濃度差に起因する膜電位によって影響される。薬剤分子の中には、生体膜の表面における吸着や会合、集合体形成などの特異的な反応を生じるものが知られているが、薬剤のスクリーニングに用いられている既存の方法では、膜への滞留・濃縮や相間分配については検討されてきたものの、膜表面や膜内での反応過程を詳しく検討することは困難である。二種の混ざり合わない溶液の液液界面は、リン脂質の自己組織化膜を形成することにより、生体膜表面の模倣反応場として利用できる。このため、液液界面におけるイオン種の反応を電気化学的に制御することにより、様々な分極条件におけるイオン性薬剤の膜透過・相間分配反応が定量的かつ再現性良く研究できる。一方、膜表面における吸着状態や反応過程については、界面領域の化学種の高感度な状態分析が必要となり、一般的な電気化学測定法でも詳細な検討が難しい。また、規則的な三次元繰り返し構造を有する多分岐高分子は、ナノサイズの薬剤キャリアとして研究が進められてきたが、生体膜や生体膜模倣液液界面における薬剤分子の包接 - 放出機構の詳細は、研究手段が極めて限られるためにほとんど明らかにされていなかった。研究代表者は、機能性色素や薬剤分子、生理活性物質に対する多分岐高分子の包接挙動を独自に開発した分光電気化学測定法を用いて研究し、多分岐高分子とイオン種の相互作用は主として静電相互作用によって支配されることを明らかにしてきた。さらに、形成されたイオン会合体や複合体が液液界面の電位差に応答して解離し、イオン種の相間分配制御に利用できることなどを報告してきた。生体膜模倣界面におけるイオン性薬剤の反応制御と状態分析が同時に行える分光電気化学法を適用することにより、薬剤の膜表面・膜透過反応性を考慮した薬物動態の解明が期待できる。

2 . 研究の目的

本研究では、薬剤分子の構造変化に起因する生体膜表面における反応挙動を明らかにするため、生体膜模倣液液界面を用いてイオン性薬剤の膜透過機構を解明する。研究代表者が独自に開発した分光電気化学測定法を適用することにより、pH 条件や膜電位に応じて変化する反応機構を選択的かつ高感度に解析し、薬剤分子の膜表面における反応性を包括的に評価する。また、研究代表者が様々なイオン種に対する包接・会合特性を研究してきたデンドリマーなどの多分岐高分子は、界面電位差や pH に応答してイオン性分子との相互作用（包接 - 放出）が変化する。多分岐高分子を薬剤キャリアとして用いることにより、pH や膜電位に応答するドラッグデリバリーシステムへの応用の基礎検討を行う。本研究により、従来法では実現が困難な、イオン性薬剤の膜表面・膜透過反応機構の解明と多分岐高分子による膜反応制御の実現を目指す。

3 . 研究の方法

アントラサイクリン系抗生物質（図1）は、アミノ糖のプロトン付加によって中性から酸性の水溶液中では1価の陽イオンとなり、僅かな分子構造の差異によって有効性を発揮するがんの種類や条件が異なる。そこで、アントラサイクリン系抗がん剤の中でも多くの研究例があるダウノルビシン（DNR）とドキシソルビシン（DOX）を主要なターゲットとし、イオン性薬剤の研究で実績のある水と1,2-ジクロロエタン（DCE）界面および両性グリセ

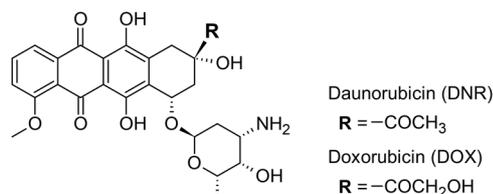


図1 アントラサイクリン系抗生物質の分子構造。

ロリン脂質を吸着させた生体膜模倣液液界面における界面・膜透過反応機構を分光電気化学的に解析した。イオン性薬剤には、アントラキノン系抗生物質やテトラサイクリン系抗生物質も併せて検討を行った。また、イオン性薬剤の界面・膜表面の反応制御に用いる多分岐高分子には、水相の pH に依存して帯電状態が正（酸性）から負（中性～塩基性）の間で変化し、イオン種との静電相互作用が変化するカルボキシ末端ポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマーを選択し、イオン性薬剤を取り込むための内部空孔が比較的大きな第 3.5 世代（G3.5）を中心に研究した。

測定法には、イオン種の相間分配挙動の平衡論的な検討にはイオン移動ポルタンメトリー、液液界面や膜表面におけるイオン移動・吸着反応機構の詳細な解析には、独自に開発した電位変調蛍光（PMF）分光法を用いた。

4 . 研究成果

(1) イオン性薬剤の液液界面および生体膜模倣界面における反応挙動

水 | DCE 界面において, DOX と DNR のイオン移動電位の pH 依存性を測定してイオンパーティションダイアグラムを作成するとともに, 電位や pH に依存して変化するイオン種と中性種の相間分配に関する平衡論的パラメータを決定した (図 2)

次にドラッグデリバリーシステム (DDS) における薬剤キャリアとして期待される PAMAM デンドリマーとの相互作用を PMF 分光法で解析し, 薬剤の相間分配機構への影響を評価した。G3.5 PAMAM デンドリマーを用いた場合, カチオン性のアントラサイクリン系薬剤との相互作用は薬剤の官能基の僅かな違いで変化した。水相中では, 生体内の正常組織の条件に近い pH 7.4 付近においてデンドリマーと薬剤の明瞭なイオン会合体形成が生じるのに対し, 弱酸性条件下では会合体形成が抑制された。水 | DCE 界面におけるイオン性薬剤のイオン移動電位の変化からデンドリマーとの相互作用エネルギーを定量的に評価することができ, 中性条件下で負に帯電するデンドリマーがカチオン性薬剤とイオン対形成して安定化 (相間移動を阻害) した。一方, pH 低下を伴う腫瘍近傍に近い弱酸性条件下ではカチオン性を示すデンドリマーと薬剤が容易に解離し, 薬剤の相間移動が比較的容易に生じることを確認した (図 3)。これら結果は, PAMAM デンドリマーが pH 条件や膜電位に応答する刺激応答性薬剤キャリアとして機能する可能性を示すものであり, 特定の条件で選択的に薬剤を放出する DDS への応用が期待される。さらに生体膜模倣界面では, アントラサイクリン系薬剤がリン脂質との相互作用によって促進移動されることなどを見いだした。このほか, アントラキノン系抗がん剤やテトラサイクリン系抗生物質などのカチオン性薬剤について界面反応機構の分光電気化学解析を進め, 相間分配に関する平衡論パラメータの決定やデンドリマーとの相互作用などに関する基礎検討を終えることができた。

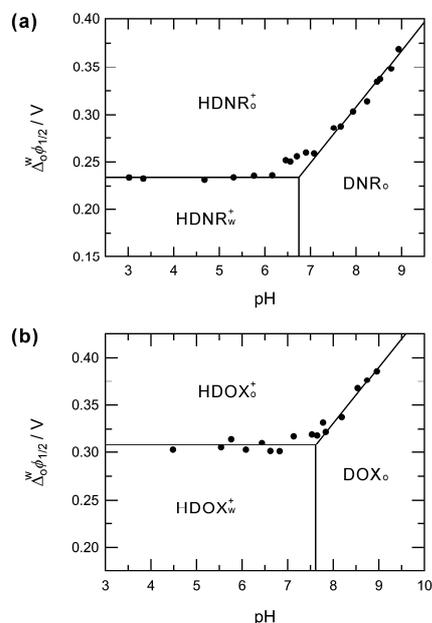


図 2 DNR と DOX の水 | DCE 界面におけるイオンパーティションダイアグラム。

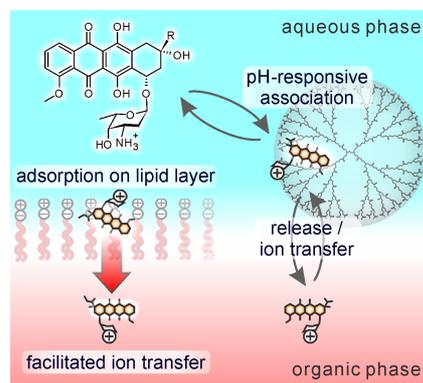


図 3 生体膜模倣液液界面におけるアントラサイクリン系抗生物質の促進移動と PAMAM デンドリマーとの相互作用。

(2) 生体膜模倣界面におけるテトラフェニルエテン誘導体の凝集誘起発光挙動

細胞膜や生体組織の蛍光イメージングなどへの応用が期待されている凝集誘起発光 (AIE) 色素の一種である水溶性テトラフェニルエテン (TPE) 誘導体の界面領域における AIE 特性について研究した。蛍光物質の多くは, 濃度が高い条件で凝集体を形成すると発光特性を消失 (凝集起因消光) するため, 発光材料としての用途には大きな制限がある。一方, AIE 色素は高濃度条件や凝集状態において発光特性を示すことから, がん細胞や薬剤キャリアの蛍光イメージングへの応用が期待されている。水溶液中ではほとんど発光特性を示さない水溶性 TPE 誘導体を分光電気化学的に研究することにより, 水 | DCE 界面および生体膜模倣液液界面における AIE 機構を明らかにした (図 4)。TPE 誘導体の AIE 特性は電気化学的な刺激に対して可逆的に応答し, 界面特異的に AIE 特性を発揮することを見いだした。また, 生体膜模倣液液界面では, 脂質膜との相互作用によって AIE 特性が変化することを明らかにした。これらの結果は, 単純な構造の TPE 誘導体が, 液液界面や脂質膜表面の分極状態に応答して特異的な発光特性を生じることを示したものであり, DDS で薬剤の輸送手段として利用されるリポソームや細胞間の物質輸送を担うエクソソームの選択的な蛍光標識, 物質輸送やシグナル伝達の駆動力となる膜電位に応答する機能性蛍光プローブなどへの応用が期待される。

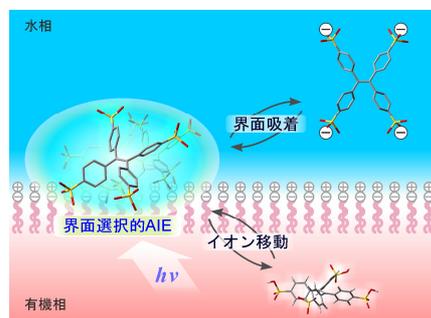


図 4 生体膜模倣液液界面における水溶性 TPE 誘導体の特異的 AIE 挙動

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nabara Makoto, Yamamoto Sho, Nishiyama Yoshio, Nagatani Hirohisa	4. 巻 36
2. 論文標題 Aggregation-Induced Emission of Water-Soluble Tetraphenylethene Derivatives at Polarized Liquid Liquid Interfaces	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 10597 ~ 10605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c01962	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 Sho Yamamoto, Shohei Kanai, Marie Takeyama, Yoshio Nishiyama, Hisanori Imura, Hirohisa Nagatani	4. 巻 856
2. 論文標題 Ion transfer and adsorption of water-soluble metal complexes of 8-hydroxyquinoline derivatives at the water 1,2-dichloroethane interface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Electroanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 113566 ~ 113566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jelechem.2019.113566	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 Sakae Hiroki, Takasuga Koji, Yokoyama Takashi, Nagatani Hirohisa	4. 巻 888
2. 論文標題 Interfacial association of ferritin with anionic fluorescent probe at the 1,2-dichloroethane/water interface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Electroanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 115175 ~ 115175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jelechem.2021.115175	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 Molina-Osorio Andres F., Yamamoto Sho, Robayo-Molina Ivan, Gamero-Quijano Alonso, Nagatani Hirohisa, Scanlon Micheal D.	4. 巻 12
2. 論文標題 A soft on/off switch based on the electrochemically reversible H-J interconversion of a floating porphyrin membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 10227 ~ 10232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC05786J	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 Takami Toshinari、Kanai Shohei、Nishiyama Yoshio、Lee Hye Jin、Nagatani Hirohisa	4. 巻 in press
2. 論文標題 Transfer Mechanism of Anthracycline Antibiotics and Their Ion Association with PAMAM Dendrimer at Liquid Liquid Interfaces**	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemElectroChem	6. 最初と最後の頁 e202200359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cefc.202200359	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 該当する

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hirohisa Nagatani
2. 発表標題 Direct Characterization of Water-Soluble AIEgens at Liquid Liquid Interfaces
3. 学会等名 Asian Conference on Analytical Sciences 2021 (ASIANALYSIS XV) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirohisa Nagatani
2. 発表標題 Specific Aggregation Behavior of Water-Soluble AIEgens at Liquid Liquid Interfaces
3. 学会等名 72th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuto Mashita, Yoshio Nishiyama, Hirohisa Nagatani
2. 発表標題 Spectroelectrochemical Analysis of Mitoxantrone across a Biomimetic Liquid Liquid Interface
3. 学会等名 72th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山村 康志郎, 西山 嘉男, 永谷 広久
2. 発表標題 液液界面におけるテトラサイクリン系抗生物質の分光電気化学解析
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真下 隆都, 西山 嘉男, 永谷 広久
2. 発表標題 PAMAMデンドリマー共存下の液液界面におけるミトキサントロンのイオン移動反応挙動
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 リン脂質吸着液液界面におけるミトキサントロンの分光電気化学解析
2. 発表標題 真下 隆都, 西山嘉男, 永谷広久
3. 学会等名 第66回ポーラログラフイーおよび電気分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金井 祥平, 高見 俊成, 西山 嘉男, 永谷 広久, 井村 久則
2. 発表標題 液液界面におけるアントラサイクリン誘導体とデンドリマーの吸着反応挙動
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永谷 広久
2. 発表標題 多分岐高分子を用いた液液界面における電荷移動反応の動的制御
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学理工研究域物質化学系分析化学研究室 http://chem.s.kanazawa-u.ac.jp/anal/
--

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		
韓国	Kyunpook National University		
アイルランド	University of Limerick		