

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04529

研究課題名(和文) ボロン酸の特異な分子認識を活用した「人工トランスポーター」の開発

研究課題名(英文) Development of artificial transporter making use of boronic acid molecular recognition

研究代表者

松元 亮 (Matsumoto, Akira)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：70436541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：ピリジル系ヘテロ環含有ボロン酸誘導体の一部が、従来知られる水準と比べて数十倍強力かつ選択的にシアル酸と結合し、さらに、この挙動は、腫瘍内低酸素環境に特徴的な弱酸性条件下においてのみ顕在化することを発見した。この発見を基に、白金系製剤搭載型ポリマーミセルによるがん幹細胞への標的性、複数のがん幹細胞エピトープに対する並列的な標的性、シアリル化の関連する血中タンパク質マーカーや細胞表面シアル酸検出システムへの応用、ホウ素中性子捕捉療法への応用が可能な新規ボロン酸含有化合物の合成等の成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ボロン酸リガンドの重要な利点の一つに、シアリル化に依存する複数タイプのがん幹細胞エピトープを並列的に標的可能なことが挙げられ、事実このような複数エピトープの発現は膵臓CSC等において知られている。抗体リガンドではこれらを独立に標的する必要があるが、我々の手法により、これらを並列的にターゲティング可能なことを明らかにした。また、ホウ素中性子捕捉療法(BNCT)においては、現在、チロシン擬似体であるステポロニン(BPA)が唯一臨床試験で用いられており、溶解性と腫瘍特異性が課題である。我々が開発した新規化合物はこれら課題解決につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We discovered some pyridyl-containing heterocyclic boronic acid derivatives are able to bind to sialic acids tens of times more potent and selectively than previously known levels. Furthermore, this behavior was found to manifest only under weakly acidic conditions that are relevant to the low-oxygen environment within tumors. Based on this discovery, achievements were made in the synthesis of novel boronic acid-containing compounds that have applications in targeted delivery to cancer stem cells using platinum-based formulation-loaded polymeric micelles, parallel targeting of multiple cancer stem cell epitopes, application to detection systems for sialylation-related blood protein markers and cell surface sialic acids, and potential applications in boron neutron capture therapy.

研究分野：高分子材料

キーワード：ボロン酸 シアル酸 がん幹細胞 弱酸性化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、糖鎖シアル酸 (N-Acetylneuraminic acid: Neu5Ac) に対して強い親和性を示すフェニルボロン酸を表面修飾した高分子ミセル型抗がん剤デリバリーシステムを開発し、血漿や正常組織の中性環境 (pH7.4) では不活性でありながら、腫瘍環境に特徴的な弱酸性下 (pH6.5) でのみがん細胞を特異的に標的し、優れた抗腫瘍効果を獲得する手法を開発してきた。シアル酸を含む糖鎖抗原はほぼ普遍的にがん細胞で過剰発現することが知られ、当該「完全合成型シアル酸リガンド」のアプローチは、抗体リガンドでは得られない「免疫認識からの回避」および「標的腫瘍の一般性」を達成するアプローチとして国際的に注目されつつあった。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが発見した「ピリジル系ヘテロ環含有ボロン酸にまつわるユニークな分子認識機能」を活用し、内因性のトランスポーターに依存せず、合成化学的に幅広く制御可能な分子機序に基づく万能型「人工トランスポーター」材料学のコンセプト実証を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) PBA を表面呈示させた高分子ミセル型抗がん剤デリバリーシステム：

ダハプラチン系抗がん剤とポリ-L-グルタミン酸-*b*-ポリエチレングリコールの自己会合により得られる高分子ミセルの表層に各種ボロン酸をシアル酸リガンドとして導入した。ミセルのがん細胞および腫瘍への標的性を、頭頸部腫瘍モデルである HSC2 細胞株を用いて比較した。この細胞株には、頭頸部腫瘍特異的な CSC マーカーとして知られる CD44 変異体 (CD44v9) を発現する細胞が多く含まれる。また、種々ボロン酸と含ローダミン構造からなる蛍光標識体を合成し、pH 依存的な結合特性とシアル酸発現との相関を明らかにするため、サイトメトリーにより膀胱 CSCs 上における共局在化評価を行った。膀胱がん細胞上のシアル酸発現レベルを FITC 標識レクチンを用いて評価した。膀胱がん細胞中の CD44 陽性または CD133 陽性の亜集団におけるシアル酸発現レベルを Alexa647 標識抗 CD44 または抗 CD133 抗体を用いて調べた。CD44 陽性細胞と CD133 陽性細胞を同定し、両亜集団とも FITC と Alexa647 の二重陽性(共局在化)領域が増加し、シアリル化が促進されていることを確認した。上記の蛍光標識体 5-BPA による CSCs への標的性を調べた。

#### (2) ホウ素中性子捕捉療法のための新規化合物の開発

がん細胞表面で高発現するアミノ酸トランスポーターの一種である LAT-1、およびシアル酸を標的可能な新規ボロン酸低分子化合物を合成した。細胞取り込み評価のために、KPC 細胞を培養皿に播種し、24 時間培養した。阻害試験として、細胞をシアリダーゼで 3 時間処理したものと比較した。細胞を生理食塩水で洗い流し、トリプシン/EDTA 溶液 (1 mL) を浸透させて細胞を取り出した。遠心分離により細胞を回収後、70 %の硝酸 (1 mL) で細胞を溶解し、90 度で熱処理した。試料は水で希釈し、体積を 10 mL に調整し、注射器フィルター (0.2 μm) を使用してろ過した。ろ過された試料中のホウ素量を ICP-MS を使用して定量化した。

### (3) 血中バイオマーカー検出、細胞膜イメージング

アルキン基を有する  $\omega$ -テザリングユニットを持つフェニルボロン酸 (PBA) 末端官能化 PEG と PBA-PEG-b-p (AlkyneAc-co-AcetoIAc) を合成した。BA 末端官能を持たないコントロールポリマーである HO-PEG-b-p (AlkyneAc-co-AcetoIAc) も準備した。まず、金電極表面へアジド基を提示する自己組織化膜 (SAM) を形成するために 11-アジド-ウンデカチオールで処理し、上記ブロック共重合体を銅触媒アジド-アルキン環化付加反応またはクリックケミストリーによって電極表面に導入した。同様の手順で金スパッタリング基板上で行い、水接触角、分光測光法、赤外線反射吸収分光法による表面解析を行った。上記により調製された金電極を用い、種々 pH 条件下で、fetuin および asialofetuin との結合挙動を電位計測により評価した。同様のポリマーを原子間力顕微鏡 (AFM) のカンチレバーに導入し、細胞表面シアル酸の直接マッピング能を検討した。シアル酸を高発現するヒト乳癌細胞 (MCF7) と低発現するヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) を細胞モデルとして使用した。これらの実験モデルの妥当性を検証するため、細胞表面糖鎖発現解析の標準技術である共焦点レーザー顕微鏡による光学的評価をまず実施した。シアル酸に特異的な FITC 標識のレクチン Sambucus nigra (SNA-1 FITC) を使用してシアル酸を染色した。MCF-7 細胞に SNA-1 FITC とヘキスト (細胞核の染色) および PKH26 (細胞膜の染色) を同時に染色すると、SNA-1 FITC と PKH26 からの蛍光強度が共局化したことから、SNA-1 FITC のシアル酸特異性を確認した。また、フローサイトメトリー解析により、MCF7 のシアル酸陽性分画の増加を確認した上で実施した。

## 4. 研究成果

(1) 標準的なフェニルボロン酸 (PBA) と、我々が見出した誘導体の一つである 5-boronopicolinic acid (5-BPA) をそれぞれリガンドとする白金系製剤搭載型ポリマーミセルを調製し、比較した。白金製剤に耐性があり、かつシアル酸を高発現するがん幹細胞様細胞 (CSC) が存在する頭頸部の同所性腫瘍に対する評価を行なった。5-BPA リガンドは、腫瘍内の pH (およそ 6.5) でポリマーミセルの腫瘍内での蓄積を高め、細胞内への移行を促進し、悪性 CSC を効果的に除去することを確認した。その結果、腫瘍の成長を抑制し、マウスの生存期間を顕著に延長することを示した。ボロン酸リガンドの重要な利点の一つに、シアル化に依存する複数タイプのエピトープ (CSC の亜集団) を並列的に標的可能なことが挙げられる。実際、このような複数のエピトープが発現する事象は、膵臓 CSC において知られている。抗体リガンドではこれらを独立に標的する必要があるが、最近我々は、5-BPA リガンドにより複数の膵臓 CSC 亜集団を同時にターゲティング可能なことを見出した。

(2) ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) とは、ホウ素 ( $^{10}\text{B}$ ) と低速 (熱) 中性子の核反応によって放出されるヘリウム核 ( $^4\text{He}$  原子核 :  $\alpha$  線) とリチウム核 ( $^7\text{Li}$  原子核) によってがん細胞を破壊する治療法である。現在、チロシン擬似体であるステボロニン (BPA) が唯一臨床試験で用いられているが、溶解性と腫瘍特異性が課題である。そこで、ステボロニン中のボロン酸をピリジルボロン酸に置換した新規ボロン酸化合物 (BAPA) を合成することで、水溶性と腫瘍集積性の向上を図った。BPA は、がん細胞表面で高発現するアミノ酸トランスポーターの一種である LAT-1 による取り込みに依存している。したがって、BAPA の構造により、LAT-1 とシアル酸の二重ターゲティングが可能と考えた。この仮説に基づき、KPC 膵がん細胞を用いて評価した結果、腫瘍集積性が劇的に向上することを確認した。親水性ピリジン環により水溶性が増大したため、フルクトースなどの添加剤を用いることなく薬剤投与が可能となり、すい臓がんなどの難治性がんの

効果的な治療が期待される。

(3) 同様のケミストリーを応用し、ポリエチレングリコール(PEG)の末端にボロン酸を導入した分子を修飾した金電極を用いることで、がん、糖尿病、非アルコール性脂肪肝疾患を含む種々病態の血中マーカである fetuin (および asialofetuin) を電位計測的に定量することに成功した。血中存在濃度を十分にカバーする 100nM オーダーの検出感度を達成した。さらに、原子間力顕微鏡(AFM)のカンチレバーに導入することで、シアル酸特異的な細胞膜イメージング法を開発した。この技術を用いて、シアル酸の発現レベルを、タンパク質装飾した基板上のみならず、細胞表面で直接ヒートマッピングすることに成功した。しかも、脂質ラフト形成の可視化に必要なサブミクロンレベルの分解能を達成した。本成果は、生理学から病理学にいたるまで、シアル酸が関与するさまざまな糖鎖ダイナミクスを評価するための非侵襲的な手段となる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsumoto Akira, Osawa Shigehito, Arai Takahiro, Maejima Yukie, Otsuka Hidenori, Miyahara Yuji	4. 巻 32
2. 論文標題 Potentiometric Determination of Circulating Glycoproteins by Boronic Acid End-Functionalized Poly(ethylene glycol)-Modified Electrode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 239 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00657	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 Osawa Shigehito, Matsumoto Akira, Maejima Yukie, Suzuki Toshihiro, Miyahara Yuji, Otsuka Hidenori	4. 巻 92
2. 論文標題 Direct Observation of Cell Surface Sialylation by Atomic Force Microscopy Employing Boronic Acid?Sialic Acid Reversible Interaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 11714 ~ 11720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c01705	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 Tanaka Miyako, Saka-Tanaka Marie, Ochi Kozue, Fujieda Kumiko, Sugiura Yuki, Miyamoto Tomofumi, Kohda Hiro, Ito Ayaka, Miyazawa Taiki, Matsumoto Akira, Aoe Seiichiro, Miyamoto Yoshihiro, Tsuboi Naotake, Maruyama Shoichi, Suematsu Makoto, Yamasaki Sho, Ogawa Yoshihiro, Suganami Takayoshi	4. 巻 217
2. 論文標題 C-type lectin Mincle mediates cell death?triggered inflammation in acute kidney injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	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) 10.1084/jem.20192230	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 -
1. 著者名 Miyazaki Takuya, Uchida Satoshi, Hatano Hiroaki, Miyahara Yuji, Matsumoto Akira, Cabral Horacio	4. 巻 140
2. 論文標題 Guanidine-phosphate interactions stabilize polyion complex micelles based on flexible cationomers to improve mRNA delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 110028 ~ 110028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eurpolymj.2020.110028	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 Osawa Shigehito, Matsumoto Akira, Maejima Yukie, Suzuki Toshihiro, Miyahara Yuji, Otsuka Hidenori	4. 巻 92
2. 論文標題 Direct Observation of Cell Surface Sialylation by Atomic Force Microscopy Employing Boronic Acid?Sialic Acid Reversible Interaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 11714 ~ 11720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c01705	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 Khan Thahomina, Igarashi Kazunori, Tanabe Ami, Miyazawa Taiki, Fukushima Shigeto, Miura Yutaka, Matsumoto Yu, Yamasoba Tatsuya, Matsumoto Akira, Cabral Horacio, Kataoka Kazunori	4. 巻 3
2. 論文標題 Structural Control of Boronic Acid Ligands Enhances Intratumoral Targeting of Sialic Acid To Eradicate Cancer Stem-like Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 5030 ~ 5039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.0c00530	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 Matsumoto Akira, Kuwata Hirohito, Kimura Shinichiro, Matsumoto Hiroko, Ochi Kozue, Moro-oka Yuki, Watanabe Akiko, Yamada Hironori, Ishii Hitoshi, Miyazawa Taiki, Chen Siyuan, Baba Toshiaki, Yoshida Hiroshi, Nakamura Taichi, Inoue Hiroshi, Ogawa Yoshihiro, Tanaka Miyako, Miyahara Yuji, Suganami Takayoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Hollow fiber-combined glucose-responsive gel technology as an in vivo electronics-free insulin delivery system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	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) 10.1038/s42003-020-1026-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 -

1. 著者名 Chen Siyuan, Miyazaki Takuya, Itoh Michiko, Matsumoto Hiroko, Moro-oka Yuki, Tanaka Miyako, Miyahara Yuji, Suganami Takayoshi, Matsumoto Akira	4. 巻 2
2. 論文標題 Temperature-Stable Boronate Gel-Based Microneedle Technology for Self-Regulated Insulin Delivery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Polymer Materials	6. 最初と最後の頁 2781 ~ 2790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsapm.0c00341	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16件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 「貼るだけ人工膵臓」技術の社会実装を目指して
3. 学会等名 先端ナノデバイス・材料テクノロジー第151委員会 / 令和2年度 第4回研究会：「ナノバイオテクノロジーの社会実装、ベンチャー創出へ」 （オンライン開催）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 「貼るだけ人工膵臓」で世界の糖尿病患者に希望の光を届けよう！
3. 学会等名 RINK FESTIVAL 2021（オンライン開催）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 高分子ゲルを応用した完全合成型人工膵臓デバイスの開発
3. 学会等名 旭化成株式会社講演会（オンライン開催）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 <糖尿病>機械を使わず、安く、痛みのない治療を目指して
3. 学会等名 第7回COINSシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 非機械型で完全合成型「貼るだけ人工膵臓」開発の最前線
3. 学会等名 第58回人工臓器学会大会、特別企画「日本から発信する人工臓器学」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 合成分子のみで完結した「インスリンがやってくる」技術
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020(オンライン)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 高分子ゲルを応用した完全合成型人工膵臓デバイスの開発
3. 学会等名 第69回高分子討論会(オンライン会議)(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 拡散制御性におけるゲルのやわらか機能デザインを通じた「人工膵臓」の開発
3. 学会等名 第69回高分子討論会(オンライン会議)(招待講演)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 革新的な高尿酸治療を実現する「貼るだけ人工膵臓」の開発
3. 学会等名 有機機能材料のリソグラフィ加工コンソーシアム・第36回定例会（オンライン会議）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松元亮
2. 発表標題 「貼るだけ」人工膵臓」開発の最前線
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taiki Miyazawa, Akira Matsumoto, Ayano Mukaida, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Simplest and label-free determination of intra- and extra-cellular vitamin C dynamics by HPLC-DAD
3. 学会等名 4th International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment 2020, Costa de Caparica, Portugal, December 1-3, 2020, Oral (13B, Online) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akira Matsumoto, Chen Siyuan, Takuya Miyazaki, Michiko Ito, Hiroko Matsumoto Yuki Moro-oka, Miyako Tanaka, Takayoshi Suganami, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Polymer gel-based totally synthetic pancreas device
3. 学会等名 The 30th Frontier Scientists Workshop, Recent Advances in Medical Polymers for Therapeutic Applications (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤美智子 (金井紗綾香、金森耀平、田中都、松元亮、宮原裕二、小川佳宏、菅波孝祥)
2. 発表標題 NASH発症過程における死細胞貪食障害の病態生理的意義
3. 学会等名 第41回日本肥満学会学術集会 (オンライン会議)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎拓也 (Chen Siyuan、伊藤美智子、松元亮、諏澤杏香、宮原裕二、松本裕子、金井紗耶香、菅波孝祥)
2. 発表標題 吸水性と力学的強度を向上させるポリグリセロール融合型ゲルマイクロニードルの設計と評価
3. 学会等名 第32回高分子ゲル研究討論会 (オンライン開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向田彩乃、宮澤大樹、松元亮、宮原裕二
2. 発表標題 抗がん作用に及ぼすビタミン酸化体の存在意義の解明
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayano Mukaida, Taiki Miyazawa, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara
2. 発表標題 Elucidation of the anticancer mechanism of vitamin C
3. 学会等名 4th International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment 2020, Costa de Caparica, Portugal, December 1-3, 2020, Oral (13B, Online) (国際学会)
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
---------	---------