

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12650

研究課題名(和文)ハイブリッドバイオナノカプセルと配糖体プロドラッグによる輸送効率の高いDDS技術

研究課題名(英文)Efficient DDS using biological nanoparticles hybridized with gluco-prodrugs

研究代表者

下田 恵 (Shimoda, Kei)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40284153

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)：DDSの開発において、バイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)の使用は、薬物との低い親和性のため、DDSの輸送効率の低下を引き起こす問題がある。本研究では、この問題を解決するため、バイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)と配糖体プロドラッグを組み合わせたハイブリッドな薬物送達システムの開発を検討した。抗腫瘍性化合物について、各種の配糖体プロドラッグを開発する事に成功し、脂質二重膜から成るバイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)への使用について良好な結果が得られたことから、効率的なDDSの開発に貢献する成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、薬物の副作用を抑えるため、DDSの開発が盛んにおこなわれている。しかし、脂質二重膜から成るバイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)の使用は、薬物との低い親和性のため、DDSの輸送効率の低下を引き起こすことから、この問題の解決策が求められてきた。本研究では、バイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)と配糖体プロドラッグを組み合わせたハイブリッドな新規な薬物送達システムを開発する成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Utility of carriers of lipid bilayer membrane has become issue in development of efficient drug delivery system. To solve the problem, production of prodrugs and their hybridization with carriers of lipid bilayer membrane for generation of a new drug delivery system were examined. Prodrugs were successfully synthesized from anti-cancer compounds. They showed satisfactory fitting with lipid bilayer membrane-carriers. These results contribute to the development of an efficient drug delivery system.

研究分野：DDS

キーワード：バイオナノカプセル プロドラッグ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、薬物を投与した際の副作用を抑えるため、薬物送達システムの開発が盛んにおこなわれている。しかし、脂質二重膜から成るバイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)の使用は、薬物との親和性の問題により薬物送達システムの輸送効率の低下を引き起こすため、この問題点に関する解決策が求められている。

### 2. 研究の目的

薬物送達システム(DDS)の開発において、脂質二重膜から成るバイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)の使用は、薬物との親和性の問題があるため、薬物送達システムの効果が低減されてしまう。本研究では、この問題を解決するため、脂質二重膜から成るバイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)と配糖体プロドラッグを組み合わせたハイブリッドな新規な薬物送達システムの開発を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 1-フェニルエタノールの配糖体プロドラッグの酵素を利用した合成法の開発

配糖体プロドラッグの合成における反応条件の検討を行った。合成法として生体触媒である酵素を用いる手法を試みた。

合成原料として、医薬品デノパミンと同じ構造骨格を持つアナログである1-フェニルエタノールを使用した。糖供与体としてグルコースを用いた。1-フェニルエタノール存在下、酵素と糖供与体のグルコースを加え、有機溶媒と水の二層系により反応を行った。二層系としてはアセトニトリルと水を反応に使用した。

攪拌反応を行い、反応終了後にデカンテーションを行い酵素エマルジョンと溶媒層を分離した。溶媒層を、エバポレーションを行い留去濃縮し、乾固させた。

反応混合物を含む沈殿物を酢酸エチルおよびメタノールにより再溶解した。生成物を含む酢酸エチル層およびメタノール層を、シリカゲルを使用したカラムクロマトグラフィーを用いることにより精製を行った。生成化合物は、薄層クロマトグラフィーを使用し、アニリンとジフェニルアミンによる検出を行った。

基質である1-フェニルエタノールを、酵素を生体触媒として用いて配糖体プロドラッグを合成する際の至適温度について、反応温度を変化させた反応層を用いることにより調べた。

反応に用いる反応溶媒について検討した。有機溶媒と水の二層系として用いた、アセトニトリルと水において、水に対するアセトニトリルの比率を変化させた反応層を使用して、反応の最適な溶媒混合条件を調べた。

同様に、酵素を使用して、1-フェニルエタノールのガラクトシドの調製を行った。生体触媒としてグルコシダーゼ、糖供与体としてガラクトースを用いた。

原料の1-フェニルエタノールの存在下、酵素のグルコシダーゼと糖供与体のガラクトースを加え、アセトニトリルと水の二層系により反応を行った。

30時間、反応を行い反応の終了後にはデカンテーションを行い酵素と有機層を分離した。

有機層を現有機器であるロータリーエバポレーターにより濃縮し、乾固させた。

沈殿物を酢酸エチルおよびメタノールにより再溶解した。

生成物を含む酢酸エチル層およびメタノール層を、シリカゲルを使用したシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いることにより精製した。化合物は、薄層クロマトグラフィーを使用し、アニリンとジフェニルアミンによる検出を行った。

1-フェニルエタノールのガラクトシド化の反応の至適温度について、反応温度を変化させた反応層を使用することにより調べた。また、反応に用いる反応溶媒について検討した。アセトニトリルと水の二層系において、水に対するアセトニトリルの比率を変化させた反応層を使用して、反応の最適な反応溶媒を調べた。

#### (2) 1-フェニルエタノールを用いた配糖体プロドラッグの化学合成法の開発とタキサン、クルクミン、プテロスチルベンの配糖体プロドラッグの合成

テトラアセチルグルコシルプロマイドを用いて化学的なグルコシド誘導体の合成法の検討を行った。原料としてデノパミンのアナログである1-フェニルエタノールを使用してグルコシドの合成を行った。

1-フェニルエタノールに糖供与体であるテトラアセチルグルコシルプロマイドとモレキュラーシープスおよび炭酸銀を加え、有機溶媒であるジエチルエーテル溶媒における反応を行った。

窒素置換を行ったのち20時間反応させ、デカンテーションと濾過により、有機層を得た。

分液ロートに有機層を加え、飽和した炭酸水素ナトリウム溶液を加え、震盪後に飽和した塩化ナトリウム溶液を加え、震盪を行った。

有機層を、硫酸マグネシウムを使用して室温に置いて静置することにより水分を除去し、ロータリーエバポレーターにより濃縮し、乾固させた。

沈殿物をメタノールにより再溶解し、炭酸カリウムを加えた。窒素置換を行ったのち4時間反応させ、ロータリーエバポレーターにより濃縮し、乾固させた。

沈殿物を酢酸エチルにより再溶解し、分液ロートに有機層に移して飽和した塩化ナトリウム溶液を加え、震盪した。

有機層を、硫酸マグネシウムを使用して乾燥させ、薄層クロマトグラフィーを使用し、アニリンとジフェニルアミンによる検出を行った。

同様に、輸送効率の高いDDSの開発を行うため、脂質二重層から成るバイオナノカプセルに親和性の高い配糖体プロドラッグの調製を行った。タキサン類を合成原料に用い、合成のための触媒（生体触媒）としてグルコシダーゼを利用してタキサンのグルコシド誘導体の合成について検討を加えた。

タキサンを使用して、酵素的にグルコシドの合成を行い、糖供与体としてグルコースを用いた。タキサンにグルコシダーゼとグルコースを加え、アセトニトリルと水の二層系によりインキュベーションを行った。

酵素反応停止後にデカンテーションにより、酵素と有機層を分離した。有機層を現有機器であるロータリーエバポレーターにより濃縮し乾固させ、生成物を酢酸エチルおよびメタノールにより再溶解した。

得られた酢酸エチル層およびメタノール層を、硫酸マグネシウムを使用して室温で静置させ、生成物を得た。化合物はクロマトグラフィーを利用してアニリンとジフェニルアミンによる検出を行った。

生体触媒を用いて糖部分としてキシロシドを結合した新規な配糖体プロドラッグを合成する手法に検討を加えた。医薬品のアナログ化合物であるフェニルエタノールを使用した。糖供与体としてキシロースを用いた。フェニルエタノールにグルコシダーゼとキシロースを加え、アセトニトリルと水の二層系により反応させ、生成物を得た。

生成物はクロマトグラフィーを利用して検出を行った。

更に、テトラアセチルガラクトシルプロマイドを用いてクルクミノイド類のガラクトシド誘導体の化学的な合成法の検討を行った。原料としてクルクミンを使用してガラクトシド誘導体の合成を行い、触媒としてモレキュラーシーブス、および炭酸銀を用いた。

原料のクルクミノイド化合物であるクルクミンに糖供与体のテトラアセチルガラクトシルプロマイドとモレキュラーシーブスおよび炭酸銀を加え、有機溶媒としてジエチルエーテルを使用した。

窒素で置換した混合物を20時間反応させたのち、デカンテーションおよび濾過により、有機層を得た。分液ロートを用いて飽和した炭酸水素ナトリウム溶液を加えて中和反応を行った。

飽和した塩化ナトリウム溶液を加えて震盪を行った。有機層を分離した後、硫酸マグネシウムを加えて室温で静置することにより脱水を行い、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、乾固させた。

沈殿物をメタノールにより再溶解したのち炭酸カリウムを加えた。窒素により置換を行い4時間反応させてロータリーエバポレーターにより濃縮し、乾固させた。

沈殿物を、酢酸エチルを用いて再溶解して分液ロートに有機層を移して飽和した塩化ナトリウム溶液を加えた。有機層を硫酸マグネシウムにより水分除去し、薄層クロマトグラフィーを用い、アニリンとジフェニルアミンによる検出を行った。

テトラアセチルグルコシルプロマイドを用いてスチルベノイド類のグルコシド誘導体の化学的な合成法の検討を行った。原料としてペテロスチルベンを使用して、触媒としてモレキュラーシーブス、および炭酸銀を用いグルコシド誘導体の合成を行った。

### (3)脂質二重膜から成るバイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)と配糖体プロドラッグとのハイブリッドな薬物送達システムの開発

合成により得られたペテロスチルベン配糖体について、薬物送達システムに使用される脂質二重膜から成るバイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)へ適用の検討を行った。内部環境がバイオナノカプセルと同じ条件で研究に使用するための試料の調製を行い、配糖体プロドラッグとの薬物送達システムの開発を行った。

ナノカプセルの原料となるプレソームを、官能基部位と水分子との相互作用ならびに疎水性部位の集積による二重膜の生成を促進するため、膜フィルムを形成させた。プレソームに有機溶媒としてエチルアルコール、アセトン、クロロホルムを使用して完全に溶解させ、溶液状態にした。

溶液をナス型フラスコへ移し、ロータリーエバポレーターを使用して、有機溶媒を除去し、均一に広がった膜フィルムを作成した。

有機溶媒の完全な除去のためナス型フラスコを、真空ポンプを使用して減圧し、窒素による置換を行った。

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオールと塩酸を使用して調製した緩衝溶液を加えて最適温度に調節した恒温槽によりインキュベーションを行った。

ボルテックスミキサーを用いて攪拌する事によりナス型フラスコの壁面から機械的にフィルムを剥がして水和させ、プテロスチルベン配糖体を加えた。

現有機器である超音波発生器を使用してナノカプセルを形成させた。

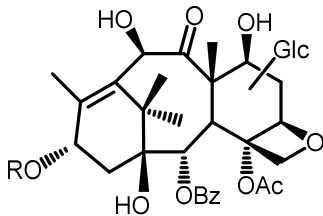
溶液をSephadex G-50を使用するゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行い、形成されたナノカプセルと低分子化合物群に分離した。

低分子化合物群にプテロスチルベン配糖体が含まれるか、薄層クロマトグラフィーを用い、アニリンとジフェニルアミンによる検出を行い、低分子化合物群には配糖体が含有されないことが確認された。

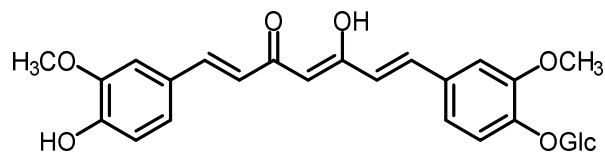
#### 4. 研究成果

薬理活性化合物であるタキサン、クルクミン、プテロスチルベンについて、以下の図に示す配糖体プロドラッグを開発する事に成功した。合成手法としては、酵素を使用する配糖体プロドラッグの合成法の開発と、化学的な合成手法による配糖体プロドラッグの合成法の開発に成功している。酵素を使用した手法の場合、酵素の基質特異性により、原料として使用できる抗腫瘍性化合物が制限されるが、有機試薬を使用しない為、環境の汚染を抑える事が出来る手法といえる。一方、化学的な合成手法では、有機試薬を使用するが、合成に供する原料は幅広い化合物を使用する事が出来るため、合成の観点からは配糖体プロドラッグの開発に適した手法であった。

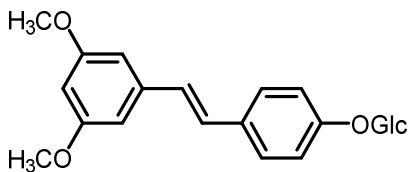
また、脂質二重膜から成るバイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)と配糖体プロドラッグとのハイブリッドな薬物送達システムの開発について良好な結果が得られたことから、効率的な薬物送達システムの開発に貢献する成果が得られた。このような薬物送達システムはこれまでに報告例が無く、今後は、更に多種類の薬理活性化合物についても、本研究で開発した合成法により配糖体プロドラッグの開発を行い、更に、脂質二重膜から成るバイオナノカプセル(脂質二重膜リポソーム)とのハイブリッドな薬物送達システムの開発についても検討していくことで、効果的な薬物送達システムの開発が可能になると期待される。



タキサン配糖体プロドラッグ



クルクミン配糖体プロドラッグ



プテロスチルベン配糖体プロドラッグ

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikuo Nakanishi, Yoshimi Shoji, Kei Ohkubo, Megumi Ueno, Kei Shimoda, Ken-ichiro Matsumoto, Kiyoshi Fukuhara, Hiroki Hamada	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of magnesium ion on the radical-scavenging rate of pterostilbene in an aprotic medium: mechanistic insight into the antioxidative reaction of pterostilbene.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11020340	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 Kei Shimoda, Tsubasa Ono, Hiroki Hamada	4. 巻 85
2. 論文標題 Regioselective hydroxylation and dehydrogenation of capsaicin and dihydrocapsaicin by cultured cells of <i>Phytolacca americana</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 103-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbaa004	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 Hiroki Hamada, Hatsuyuki Hamada, Kei Shimoda	4. 巻 16(5)
2. 論文標題 Resveratrol oligosaccharides (gluco-oligosaccharides) effectively inhibit SARS-CoV-2 infection: Glycoside (polysaccharide) approach for treatment of COVID-19.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1934578X211012903	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中西 郁夫、荘司 好美、大久保 敬、上野 恵美、下田 恵、小澤 俊彦、福原 潔、濱田 博喜、松本 謙一郎
2. 発表標題 プテロステルベンのラジカル消去反応に対するマグネシウムイオンの効果
3. 学会等名 第141回 日本薬学会年会
4. 発表年 2021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
研究協力者	濱田博喜 (Hamada Hiroki)	岡山理科大学  (35302)	

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
---------	---------