

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22499

研究課題名（和文）分子標的素子の集積化によりがん細胞を見分ける細胞標的高分子薬の開発

研究課題名（英文）Development of a Polymeric Inhibitor of Co-localized Enzymes for Synergistic Inhibition of Cancer Cell Metabolism

研究代表者

仲本 正彦（Masahiko, Nakamoto）

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：30883003

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん細胞表面では、複数種の特徴的な膜タンパク質が過剰発現している。これらのタンパク質の協同的な働きが、がんの異常な増殖、浸潤および転移といった特徴的なふるまいを維持するのに重要な役割を担う。本研究では、がん細胞膜に近接して共局在する複数種の酵素それぞれに対する阻害能を有するリガンドを高分子に導入することで、ヘテロリガンド相互作用を介してがん細胞の機能（生存、増殖、遊走）を相乗的に阻害する細胞標的高分子を作製した。更に、阻害剤の導入量および導入比率が阻害能に与える影響についての詳細も検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療において、がん細胞上の過剰発現タンパク質を選択的に阻害する分子標的薬が比較的副作用の少ない療法として利用されている。しかしながら、これら薬剤は正常細胞に発現した標的タンパク質の阻害も引き起こしてしまう。そのため、薬効の向上および副作用の低減の両立は依然として創薬における大きな課題である。本研究では、がん細胞膜に近接して共局在する複数種の酵素群を標的とすることでがん細胞の機能（生存、増殖、遊走）を相乗的に阻害する細胞標的高分子を作製した。

研究成果の概要（英文）：A poly-L-glutamate-based polymer inhibitor that simultaneously targets co-localized transmembrane enzymes under hypoxia was developed. A polymer incorporating two types of inhibitors more effectively inhibited the proliferation of human breast cancer cells. Synergistic inhibition of cancer cells occurred owing to the hetero-multivalent interactions of the polymer with proximate enzymes on cancer cell membrane.

研究分野：高分子化学

キーワード：高分子阻害剤 ポリ-L-グルタミン酸 がん細胞阻害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がん治療における分子標的薬

がんは治療の困難な病であり、革新的な治療法の開発が望まれている。がん細胞表面では、複数種の特徴的な膜タンパク質が過剰発現している。これらのタンパク質の協同的な働きが、がんの異常な増殖、浸潤および転移といった特徴的なふるまいを維持するのに重要な役割を担う。そこで、これらの過剰発現タンパク質を選択的に阻害することでがんを治療する分子標的薬が比較的副作用の少ない療法として利用されている。しかしながら、これら薬剤は正常細胞に発現した標的タンパク質の阻害も引き起こしてしまう。そのため、薬効の向上および副作用の低減の両立は依然として創薬における大きな課題であり、より高いがん細胞親和性、選択性および阻害能を併せ持つ薬剤開発が必要とされている。

(2) 高分子担体への分子標的リガンドの集積

分子標的リガンドを多価的に提示することで標的生体高分子や細胞に対する結合性を有する高分子やナノ粒子は、人工抗毒素、医薬品および薬剤送達システム(DDS)の担体として幅広く研究されてきた。中でも、分子標的リガンドで修飾された DDS 担体は抗がん剤の腫瘍選択的な送達を実現する技術として着目されている。しかしながら、がん細胞膜上で近接して共局在する酵素群に対するヘテロリガンド相互作用を介して、直接かつ相乗的にがん細胞の生存、増殖および遊走能を阻害する高分子材料の例は少ない。

2. 研究の目的

本研究では、がん細胞膜に近接して共局在する複数種の酵素に対するリガンドを高分子構造に集積することで、ヘテロリガンド相互作用を介してがん細胞の機能(生存、増殖、遊走)を相乗的に阻害する細胞標的高分子を作製した(図 1a)。更に、阻害剤の導入量および導入比率が阻害能に与える影響についての詳細も検討した。

3. 研究の方法

炭酸脱水酵素 IX (CAIX) は低酸素状態下のがん細胞で過剰発現し、がん細胞の増殖、浸潤および転移において重要な役割を担うことから、有望な創薬標的としてみなされている。近年 CAIX の機能が MMP14 や ADAM17 などの金属プロテアーゼと密接に関連することが明らかになっている。細胞外マトリックスを分解することによって癌細胞の転移と浸潤を促進する MMP14 は CAIX とヘテロ酵素複合体を形成することによって活性化されることが報告されている。また、ADAM17 は CAIX のシグナールとして機能することが報告されている。

これらの報告に基づいて、CAIX および金属プロテアーゼ (MMP および ADAM17) を標的酵素として選択した。生体適合性の α -ポリ L グルタミン酸 (分子量 120 kDa) に対して、CAIX 阻害剤である U-104 および金属プロテアーゼ (MMP14 および ADAM17) 阻害剤である TAPI-2 をアミド縮合により導入した。作製した高分子阻害剤の乳がん細胞 (MDA-MB-231 細胞株) に対する阻害能を細胞増殖アッセイおよび遊走アッセイにより評価した。低分子リガンドおよび、一種のリガンドのみを導入した高分子との比較により、細胞標的高分子の細胞機能阻害における相乗的効果を検証した。更に、様々な量および比率で U-104 および TAPI-2 を導入した細胞標的高分子のライブラリを作製し、細胞増殖阻害能を評価することで、高分子に導入するリガンド量および比率が相乗的細胞機能阻害活性に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 細胞標的高分子の作製

高分子に導入する酵素阻害剤 (U-104) の合成、および α -ポリ L グルタミン酸への阻害剤の導入における最適な反応条件を検討した。4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) を縮合剤として、反応 pH、温度などの種々の条件検討により、二種の阻害剤を任意の導入率で有する高分子ライブラリを作製した(図 1b)。動的光散乱法により、作製した高分子はリン酸緩衝液中 37°C において、いずれも 10 nm 程度の分子サイズを有することが分かった。

(2) 細胞標的高分子のがん細胞阻害能評価

二種類の阻害剤を導入した α -ポリ L グルタミン酸 (PGA-UT) は、阻害剤を一種類しかもたない高分子 (PGA-U および PGA-T) と比較して、乳がん細胞 (MDA-MB-231) に対して高い細胞増殖阻害能を示すことが明らかとなった(図 1c)。PGA-UT と同程度の分子サイズをもつ PGA-U および PGA-T の阻害能は対応する小分子阻害剤 (U-104 および TAPI-2) と同程度であったことから、PGA-UT の高い増殖阻害能は、細胞表面の局所的に近接した酵素群に対する相互作用に基づいていることが示唆された。また PGA-UT は細胞増殖阻害に加えて、がん細胞の遊走も効果的に阻害することが明らかとなった。加えて、多重染色アッセイにより PGA-UT は細胞死を優位に促進していることも示唆された。これまでに CAIX の阻害によるがん細胞のアシドーシス誘導が報告されてい

ることから、PGA-UT が共局在酵素群に対する多価ヘテロリガンド相互作用を介してがん細胞のアシドーシスを誘導したと考えられる。

(3) がん細胞阻害における相乗的効果の検証

PGA-UT は二種類の低分子阻害剤 (U-104 および TAPI-2) の混合物および一種の阻害剤を導入した高分子 (PGA-U および PGA-T) の混合物と比較して優位な阻害能を示した。同様に、細胞遊走阻害においても相乗的な阻害効果が得られた。以上の結果より、PGA-UT は細胞膜上に近接して共局在した酵素群に対する多価ヘテロリガンド相互作用により相乗的に細胞機能を阻害することが示唆された。

(4) 細胞標的高分子のリガンド導入量および導入比が阻害能に与える影響評価

様々な量および比率で U-104 および TAPI-2 を導入した細胞標的高分子のライブラリを作製し、細胞増殖阻害能を評価した。阻害剤の導入量を増やしても阻害能は向上せず横ばいとなることが分かった。これは、阻害剤修飾量の増加が結合の多価性の向上に寄与する一方で、立体障害もしくは高分子運動性の低下による結合効率の低下をもたらしたためであると考えられる。また、阻害剤の導入比率と阻害能の関係を解析したところ、阻害能は特定の比率において極大点を示すことが分かった。これらの結果から、細胞膜上に近接した酵素群への効果的なヘテロリガンド相互作用を達成するためには、阻害剤の組み合わせのみではなく、導入比率の最適化が重要であることが示唆された。

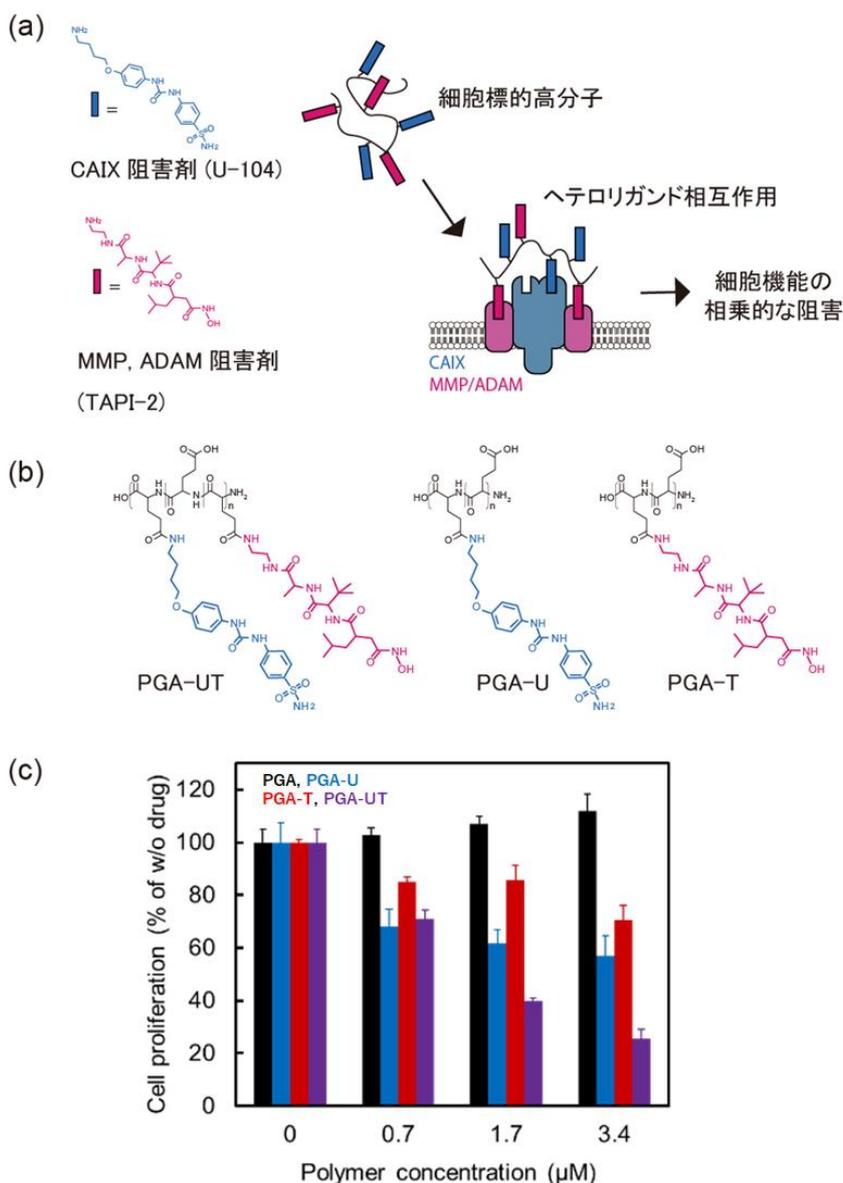


図 1. (a) 細胞標的高分子の概要 (b) 本研究で作製した高分子 PGA-U、PGA-T および PGA-UT (c) PGA-U、PGA-T および PGA-UT の MDA-MB-231 増殖阻害能

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masahiko Nakamoto, Moe Noguchi, Akihiro Nishiguchi, Joao F. Mano, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Fabrication of highly stretchable hydrogel based on crosslinking between alendronates functionalized poly- γ -glutamate and calcium cations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials Today Bio	6. 最初と最後の頁 10225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mtbio.2022.100225	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 Masahiko Nakamoto, Shiro Kitano, Michiya Matsusaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Biomacromolecule-fueled Transient Volume Phase Transition of a Hydrogel	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	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） 10.1002/anie.202205125	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 Masahiko Nakamoto, Teresa Escalante, Jose M Gutierrez, Kenneth J. Shea	4. 巻 21
2. 論文標題 A Biomimetic of Endogenous Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Inhibition Mechanism and Contribution of Composition, Polymer Size, and Shape to the Inhibitory Effect	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 5663-5670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.nanolett.1c01357	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11件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 仲本正彦、Shea Kenneth J.、松崎典弥
2. 発表標題 メタロプロテアーゼ阻害因子模倣高分子ナノ粒子の開発
3. 学会等名 第66回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲本正彦、Shea Kenneth J.、松崎典弥
2. 発表標題 メタロプロテアーゼ阻害高分子の分子サイズが 酵素阻害能に与える影響
3. 学会等名 第66回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲本正彦、松崎典弥、Shea Kenneth J.
2. 発表標題 マトリックスプロテアーゼ阻害因子を模倣した合成高分子酵素阻害剤の設計
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲本 正彦、木場勇希、松崎典弥
2. 発表標題 共局在した酵素クラスターの相乗的阻害により がん細胞増殖を阻害する高分子の開発
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲本 正彦、木場勇希、松崎典弥
2. 発表標題 Engineering of the cancer cell targeted polymer drug that inhibit the enzyme cluster on the cell membrane
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木場勇希、仲本 正彦、松崎典弥
2. 発表標題 がん細胞膜表面の酵素クラスターを阻害するポリグルタミン酸誘導体の創製
3. 学会等名 第67回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲本正彦、木場勇希、Kenneth J Shea、富田俊介、松崎典弥
2. 発表標題 生体の分子認識に学んだ高分子酵素阻害剤の分子設計戦略
3. 学会等名 第67回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲本 正彦、松崎典弥
2. 発表標題 標的ポリペプチドに応答して動的な体積変化を生じるハイドロゲル - 酵素複合材料の開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木場勇希、仲本 正彦、松崎典弥
2. 発表標題 がん細胞上の膜型酵素クラスターを相乗的に阻害するポリグルタミン酸誘導体の創製
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲本正彦
2. 発表標題 Development of Bio-inspired Polymers for the Control of the Biological Process
3. 学会等名 2022 YONSEI-CBE International Workshop Series: Polymers (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲本正彦
2. 発表標題 Development of Dynamic Functions of Polymer Materials Based on Engineered Affinity for Biomacromolecules
3. 学会等名 2022 International Conference on Modern Challenges in Polymer Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ハイドロゲルの体積を変化させる方法及びハイドロゲル	発明者 仲本正彦、北野史郎、松崎典弥	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P2021-213677	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------