

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650279

研究課題名(和文)信頼性の高い細胞内抗ガン剤デリバリーの提案：2段階式細胞内分解型ナノキャリア

研究課題名(英文)Rational Design of Intracellular Anticancer Drug Delivery: Nanocarriers Bearing Two-step Degradation Mechanism

研究代表者

大谷 亨(Ooya, Tooru)

神戸大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10301201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内部にのみに見られるグルタチオン転移酵素(GST)に反応して2段階にて抗ガン剤放出場所とタイミングを制御するプロ(プロドラッグ)型インテリジェントナノキャリアを創製することを目的とした。GST存在下によって薬物を放出するプロドラッグの合成を確認した。さらに、ナノキャリアとしてポリグリセロール dendrimer (PGD)、PGDを表層に有するリポソーム、そしてビタミンEを疎水部に集積させた両親媒性ポリマーミセルをそれぞれ調製し、薬物を内包して細胞内へ取り込まれるナノキャリアとしての可能性を示した。これら2つを組み合わせることでプロ(プロドラッグ)型インテリジェントナノキャリアを創製が期待できる。

研究成果の概要(英文)：A glutathione-p-nitroaniline conjugate was synthesized and examined binding of the conjugate with glutathione S-transferase (GST). When the conjugate was titrated with GST, absorbance increased with increasing concentration of GST, suggesting the binding the conjugate with GST. In addition, p-nitroaniline release was observed in the presence of GST. As for the design of nanocarriers for the prodrug, polyglycerol dendrimers (PGDs) were subjected and examined to clarify their interaction with the anti-cancer drug, 5-fluorouracil (5-Fu). The results of ¹⁹F-, ¹H-NMR and fluorescence spectroscopy to confirm that PGD could encapsulate 5-Fu under aqueous conditions. Another examination of nanocarrier preparations, a liposome consisting of PGD-based phospholipids and a polymeric micelle consisting of vitamin E and a biocompatible polymer. Through these studies, novel smart nanocarriers in combination with the prodrug system toward GST targeting are feasible in near future.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体医工学・生体材料学

キーワード：ナノキャリア プロドラッグ グルタチオントランスフェラーゼ 抗がん剤 細胞内取り込み デンドリマー リポソーム ミセル

1. 研究開始当初の背景

ガン細胞への標的指向性に優れたナノキャリアは、高効率で抗ガン剤をガン細胞にのみ機能させるための精密な分子設計が必要である。研究代表者はこれまでに、細胞内にて生分解可能な薬物キャリアの分子設計に成功している (J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 3852)。また酵素分解によって薬物放出するプロドラッグ型の水溶性材料を設計した (J. Controlled. Rel. 1999, 59, 251)。一方、生体適合性の高いナノサイズキャリアについても基礎検討を重ねてきた (Bioconjugate Chem. 2004, 15, 1221)。従来のナノキャリアは、細胞内 pH もしくはプロドラッグの細胞内分解による抗ガン剤の放出のみであった。これまでの研究代表者の知見により、これら 2 つの細胞内応答性を融合することによって、細胞内で遊離の抗ガン剤を放出する場所とタイミングを精密に制御することを考案した。すなわち、細胞内部にのみ見られる低 pH 環境とグルタチオン転移酵素 (GST) に応答して 2 段階にて抗ガン剤放出場所とタイミングを制御するプロ (プロドラッグ) 型インテリジェントナノキャリアを創製することである。これにより、本来 GST が抗ガン剤を排泄する機構を回避する仕組みを実現できることが予想され、抗ガン剤の薬効を飛躍的に向上できることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに検討してきた水溶性薬物キャリアの基礎的知見と技術をもとに、細胞内部にのみ見られる低 pH 環境とグルタチオン転移酵素 (GST) に応答して 2 段階にて抗ガン剤放出場所とタイミングを制御するプロ (プロドラッグ) 型インテリジェントナノキャリアを合成する。GST により結合が切断される抗ガン剤プロドラッグを合成し、このプロドラッグを内包する数ナノメートルサイズのキャリアとして、 dendrimer 誘導体を調製する。細胞内低 pH による加水分解と、これに伴い放出されるプロドラッグの GST 触媒による遊離抗ガン剤の放出特性とその抗ガン効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) グルタチオントランスフェラーゼを標的としたプロドラッグの合成

モデル薬物である p-nitroaniline と (2-bromoethyl) chloroformate を反応させた化合物と glutathione disulfide の アミノ基を Boc 保護し、還元剤である tributylphosphine によりジスルフィド結合

の還元を行うことで得た化合物を縮合させ、スルホン化、脱保護を行い、プロドラッグの合成を行った (Fig. 1)。得られたプロドラッグを溶解させたリン酸緩衝液に GST を加え、紫外・可視 (UV-Vis) スペクトル測定から p-nitroaniline の放出の経時変化を測定した。また、スルホン化前の前駆体を用いて GST との結合実験を行った。具体的には、前駆体

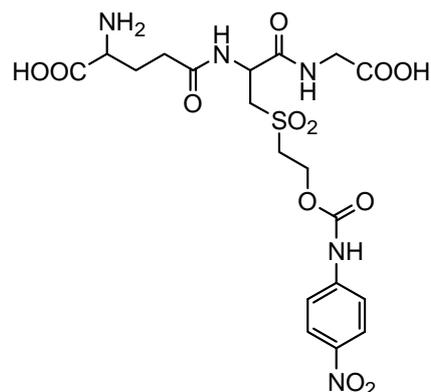


Fig 1. Chemical structure of a prodrug toward GST.

を溶解したリン酸緩衝液 (pH 6.3) に、GST ストック溶液を一定量ずつ添加し、滴定実験を行った。各添加濃度における UV-Vis スペクトルを測定し、最大吸収波長 400 nm における吸光度の変化を観察・定量した。

(2) ナノキャリアとしてのポリグリセロール dendrimer (PGD) の評価

ナノキャリアとしての第三世代のポリグリセロール dendrimer (PGD-G3) の可能性を検討するため、5-フルオロウラシル (5-Fu) をモデルとした場合の分子間相互作用を ^{19}F -NMR 解析と蛍光分析により検討した。

(3) PGD を表層に有するリポソームの調製

世代数 2 のグリセロール dendrimer (GD-G2) を既報 (Eur. J. Org. Chem., 2008, 22, 3845-3851) に従って合成し、末端アミノ化された 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DSPE) との縮合により DSPE-GD-G2 を合成した。L-Phosphatidylcholine、cholesterol、DSPE-GD-G2 を所定のモル比でクロロホルムに溶解し、超音波法により DSPE-GD-G2 を用いたリポソームを作製した (Fig. 2)。得られた各リポソームへの抗がん剤 (ドキシソルピシン: DOX) の導入を Mayer's リモートローディング法にて行った。これを HeLa 細胞を用いて取り込み実験を行った。

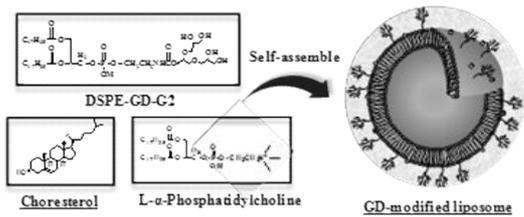


Fig.2 Preparation of GD-modified liposome containing L- -phosphatidylcholine, cholesterol, and DSPE-GD-G2

(4) ビタミン E を疎水部に集積させた両親媒性ポリマーミセル

ビタミン E と塩化メタクリロイルをトリエチルアミン存在下のもと塩化メチレン中で反応させ、ビタミン E モノマーを得た。これと、ポリエチレングリコール(PEG)マクロ開始剤を用いて原子移動ラジカル重合(ATRP)を行い、PEG-ビタミン E ジブロック共重合体を得た(Fig. 3)。得られたブロック共重合体を用いて高分子ミセルを透析法によって調製し、動的光散乱(DLS)測定により平均流体力学的半径の算出を行った。また、表面張力測定から臨界ミセル濃度(CMC)を算出した。さらに、Hela 細胞を用いた細胞毒性試験を行い、Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所)を用いた水溶性ホルマザンの発色から、450 nm での吸光度を測定し細胞生存率を算出した。

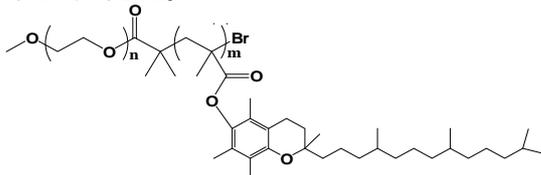


Fig. 3 Chemical structure of a carrier consisting of vitamin E-based monomer and PEG

4. 研究成果

(1) グルタチオントランスフェラーゼを標的としたプロドラッグの合成

¹H-NMR スペクトル測定、MALDI-TOF-MS 測定の結果よりプロドラッグの合成を確認した。UV-Vis スペクトルの結果、p-nitroaniline の吸収極大波長 380nm が 320nm 付近にブルーシフトした。このことから、p-nitroaniline にグルタチオンが導入されたことが示された。

プロドラッグ前駆体と GST との結合を滴定実験から評価したところ、最大吸収波長 400 nm での吸光度が一定濃度以上で増加し、GST 添加濃度に対してシグモイダル曲線を示した。このプロットを解析ソフト ORIGIN Pro 8J を用いて非線形カーブフィッティングしたところ、Hill の式が適用でき、非線形カーブフィッティングの結果、GST と前駆体は協同

的に結合すると考えられ、GST の二量体に存在する 4 つの結合部位が関与していることが示唆された。

得られたプロドラッグからの p-nitroaniline の放出の経時変化を測定したところ、放出が確認された(Fig. 4)。GST 非存在下では放出が見られなかったことから、GST の触媒作用による放出であることが確認された。

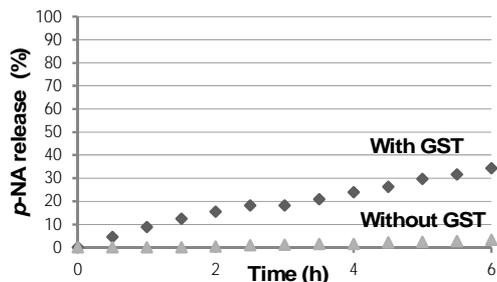


Fig. 4 Release of the model drug in the presence of GST

(2) ナノキャリアとしてのポリグリセロールデンドリマー(PGD)の評価

PGD 存在下における 5-Fu の蛍光スペクトル変化から、PGD-G3 内部のエーテル酸素による 5-Fu のイミプロトンとの相互作用によって 5-Fu の共役系が拡張されることが見いだされた(Fig. 5)。したがって、PGD は 5-Fu のカプセル化に寄与しており、この空間内のエーテル酸素は、5-Fu のイミプロトンとの相互作用を増大させる効果があるものと示唆された。また、¹⁹F-NMR 測定からは、PGD を 5-Fu に対して当モル以上添加すると、シグナルが消失したことから、5-Fu と PGD の相互作用が認められた。これにより、PGD は抗がん剤のキャリアとしても応用できる可能性が示された。

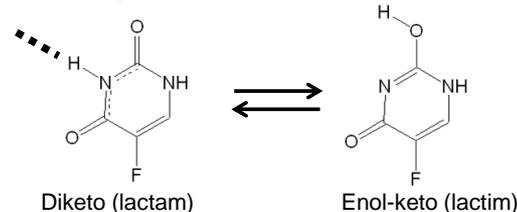


Fig. 5 Possible formation of 5-Fu in the presence of PGD

(3) PGD を表層に有するリボソームの調製

DSPE-GD-G2 リボソーム調製後に TEM 観察を行ったところ、球状の半透明な画像が得られたことから、中空状の構造であることが示唆された。このことから、DSPE-GD-G2 はリボソームを構成可能な両親媒性脂質として機能することが示された。

DOX 内包後 DSPE-GD-G2 リボソームの内包率

を 498nm の吸光度から算出したところ、83% となった。DSPE-PEG2000 リポソームでは 78% であったことから、DOX 内包時における脂質二重膜への DOX 透過性に GD が関与し、さらにリポソーム内での DOX 保持においても GD 修飾が PEG 修飾よりも有利である可能性が示唆された。

DOX 含有 DSPE-GD-G2 リポソームの細胞内取り込みを蛍光顕微鏡から観察したところ、24 時間取り込み後に HeLa 細胞が球状に変化し、かつ細胞内に DOX 由来の赤いスポットが観察された (Fig. 6)。このことから、DOX 含有 DSPE-GD-G2 リポソームが細胞内へ取り込まれ、細胞毒性を示すことが考えられた。

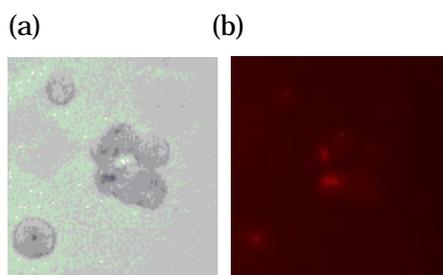


Fig. 6 Cellular uptake of DOX-loaded DSPE-GD-G2 liposome: (a) microscope, and (b) fluorescent microscope images after 24h

(4) ビタミン E を疎水部に集積させた両親媒性ポリマーミセル

得られたミセルの DLS 測定の結果から平均流体力学的半径は約 10 nm と算出された (Fig. 7)。さらに、TEM 画像から 10 nm の球形の凝集体が確認され、ミセルを形成していることが示唆された。界面張力測定を行ったところ、CMC は 6×10^{-6} M と見積もられ、ミセル形成能を有していることが示された。

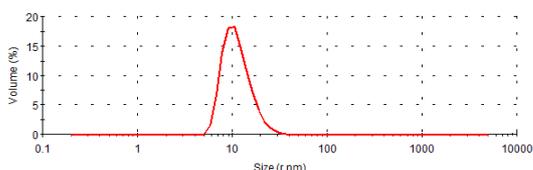


Fig. 7 z-Average size distribution of the VE micelle obtained by DLS measurements

HeLa 細胞を用いた細胞毒性試験の結果、得られたミセルの IC_{50} は 1 mg/mL 以上と算出された (Fig. 4)。このことから、細胞内へ投与しても問題ないレベルにあった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

H. J. Lee, T. Ooya, ^{19}F -NMR, 1H -NMR, and fluorescence studies of interaction between 5-fluorouracil and polyglycerol dendrimers, *Journal of Physical Chemistry B*, 2012, 116, 12263-12267. (査読有), DOI: 10.1021/jp307710b.

[他 1 件]

[学会発表] (計 18 件)

板倉幸枝、山崎 智哉、大谷 亨、グルタチオントランスフェラーゼを標的とした薬物誘導体の合成、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 30 日、名古屋
山崎 智哉、大谷 亨、ビタミン E モノマーと PEG とからなるジブロック共重合体ミセルの特性、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 28 日、名古屋
川島 裕司、大谷 亨、両親媒性 dendritic 脂質からなる自己集合体の調製、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 28 日、名古屋

T. Ooya, Effect of Nano-sized Polyols on Cell Death and Cellular Activation, *International Symposium on Nanomedicine Molecular Science (NMMS2013)* 2013/10/8, 東京.

山崎智哉、大谷 亨、グルタチオントランスフェラーゼを標的としたプロドラッグの合成、第 8 回日本バイオマテリアル関西若手研究発表会、2013 年 8 月 31 日、大阪

大谷 亨、低分子と高分子の狭間の分子設計：ポリグリセロール dendrimer は両親媒性？、第 80 回高分子若手研究会（関西）招待講演、2013 年 7 月 27 日、大阪

[他 1 2 件]

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~ooya/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 亨 (Tooru Ooya)
神戸大学大学院工学研究科 准教授

研究者番号：10301201