

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870366

研究課題名(和文) DDS応用を目的とした生体分子応答性ナノコンポジットの開発

研究課題名(英文) Biomolecule-responsible nanocomposite for DDS application

研究代表者

橋田 泰彦 (Hashida, Yasuhiko)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：30512462

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の酸化還元反応を利用した薬物放出技術のコンセプトを実証するために、モデル薬物-キャリアコンジュゲートを調製し、モデル薬物の放出を検討した。薬物キャリアとしてカーボンナノチューブ/ペプチド複合体を、モデル薬物としてフルオレセインを用い、これらをジスルフィド結合で結合させた。本複合体は、グルタチオンのような生体内に存在する還元性物質によってジスルフィド結合が開裂し、フルオレセインを放出した。また、酸化還元酵素による酸化還元反応によっても薬物放出を制御できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：To demonstrate the concept of drug release using oxidation-reduction reactions, the model drug-carrier conjugate was prepared and evaluated the release of the model drug. The carbon nanotubes/peptides composite and fluorescein were used as a model drug carrier and a model drug, respectively, and were conjugated via disulfide bond. This conjugate released fluorescein through the disulfide cleavage induced by bioreductive compounds such as reduced glutathione. The possibility that the drug release might be controlled by oxidoreductases was also suggested.

研究分野：農学

キーワード：カーボンナノチューブ ドラッグデリバリー 放出制御 薬物キャリア 酸化還元酵素 ペプチド ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム (DDS) は、薬物などの生理活性物質の体内分布を量的・空間的・時間的に制御することによりその効果を最大限に高め、副作用を最小限に抑えることを目的とした薬物送達技術である。この「量的・空間的・時間的な制御」を実現するためには、従来の DDS 研究の主役であった標的部位への効率的な薬物送達技術のほか、生体内の状況に応じた薬物放出などの技術の開発が不可欠である。近年、外的変化や刺激を検知し、その刺激に応答して機能を発揮するスマートマテリアルと呼ばれる機能性材料が注目を集めており、このような技術を利用して能動的に薬物放出を制御する DDS 研究も報告されている。しかし、これまでに DDS に応用されたスマートマテリアルは、その多くが pH や温度、光などの物理的刺激に応答するものであり、シグナル伝達物質のような特定の化合物濃度に応答するものはほとんど報告されていない。このことは、生体内における情報伝達が主にシグナル伝達物質などの濃度変化によって行われていることを考えると、その豊富な情報を利用していないことを意味している。将来的に DDS キャリアのさらなる高度機能化を考えるうえで、これらの物質濃度によって伝達される生体内情報を利用することは必要不可欠な技術であると考えられる。

そこで本研究では、還元性物質の濃度に依存して切断されるジスルフィド結合を利用した薬物放出技術の構築を目指した。ジスルフィド結合は2組のチオール基 (SH基) がカップリングした共有結合であり、タンパク質などの生体分子にも広くみられる共有結合である。この結合は、還元剤を用いることにより生理的条件のような温和な条件下でも容易に切断することが出来る。つまり、酸化還元反応を利用して生体内で切断することが可能な共有結合であると言える。従って、ジスルフィド結合を介して薬物を薬物キャリアに固定化することにより、酸化還元反応を利用してジスルフィド結合を切断し、薬物の放出を行うことが可能となる。

本研究では、薬物を固定化する薬物キャリアとして、単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の表面をペプチドで被覆した SWCNT/ペプチド複合体⁽¹⁾ を利用する。SWCNT は、1991年の発見以来、各分野で注目を集めているナノ炭素素材であり、医学・生化学分野においても数多くの応用研究がなされている。SWCNT は比表面積が極めて大きく、その広い表面積は化合物の固定化などの機能集積に向いている。また、電気伝導性に優れた特性を有しているため⁽²⁾、将来的に電子移動を利用したジスルフィド結合の切断へと研究を展開できる可能性を秘めており、本研究の目的に適した素材であると言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内で起こる酸化還元反応を利用して薬物を放出する DDS 技術の実証である。このために、酸化還元反応によるモデル薬物の放出を簡便に評価できる評価系を確立するとともに、いくつかの異なるメカニズムに基づく薬物放出技術についてその検証を行う。基本的な薬物放出のメカニズムは、ジスルフィド結合を介して薬物キャリアに薬物を固定しておき、還元反応によってジスルフィド結合が切断されることによって薬物が放出されるという仕組みである。

本研究では、単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の表面をペプチドで被覆した SWCNT/ペプチド複合体を薬物キャリアとして用い、モデル薬物として蛍光により簡便に検出できるフルオレセインを用いて薬物キャリア-モデル薬物複合体を合成し、実際に薬物放出が起こるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) ペプチドの合成

SWCNTの分散に用いるペプチドはFmoc固相合成法により合成した。固相にはNovaSyn TGA樹脂 (Novabiochem社)を用い、ジメチルホルムアミド (DMF)に溶解した3等量のFmoc保護アミノ酸、3等量のN,N'-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC)、および3等量の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)を加え、2時間振とう攪拌することにより縮合反応を行った。Fmoc基の脱保護は、20%ピペリジンを含むDMFによる5分間の処理を3回繰り返すことにより行った。

合成の完了した保護ペプチドは、95%トリフルオロ酢酸 (TFA)で2時間処理することにより樹脂から切り離しと脱保護を行い、氷冷したジエチルエーテル中にペプチド溶液を滴下することによりペプチドを析出させた。これをデシケーターで乾燥させ、逆相クロマトグラフィーにより精製した。

本研究で合成したペプチドの種類とそのアミノ酸配列は以下のとおりである。

SGKWSG₄ ペプチド

N-SGKWSGSGKWSGSGKWSGSGKWSG-C

SGKWSG₄+C ペプチド

N-SGKWSGSGKWCWSGSGKWSGSGKWSG-C

(2) SWCNT 分散液の調製

本研究では、SWCNTとしてUnidym社のHiPcoを用いた。1 mgのSWCNTにペプチド2 μmol (約5 mg)添加し、重水5 mlを添加して1時間超音波処理することによりSWCNT分散液を調製した。これに重水8 mlを加えて全量を13 mlとした後、20,000×gで150分間遠心することによりバンドル化したSWCNTを除去した。遠心後、分画分子量100,000の透析チューブを用いて透析を行い、過剰量のペプチドを除去した。これによってSWCNT/ペプ

チド複合体を得た。

(3) SWCNT/ペプチド複合体のフルオレsein修飾

本研究では、モデル薬物としてフルオレseinを用いた。調製した SWCNT/ペプチド複合体と MTS-4-フルオレsein (Tront research 社製、Fig. 1) を 10 mM HEPES-Na 緩衝液 (pH7.5) で混合し、2 時間 25 °C でインキュベートした。反応後、溶液を分画分子量 100,000 の透析チューブに移し、10 mM HEPES-Na 緩衝液に対して透析を行い、未反応の MTS-4-フルオレsein を除去した。これにより、フルオレsein 標識 SWCNT/ペプチド複合体を得た。

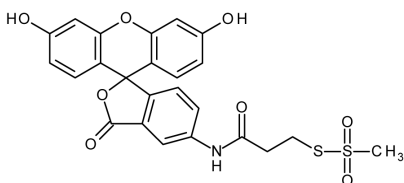


Fig. 1. MTS-4-フルオレsein.

4. 研究成果

(1) ジスルフィド結合を介して蛍光標識された SWCNT/ペプチド複合体の調製

SWCNT を SGKWSG₄ ペプチドと SGKWSG₄+C ペプチドを 9:1 で混合したペプチド溶液で分散させ、これを MTS-4-フルオレsein 溶液とインキュベートした後に透析によって未反応の MTS-4-フルオレsein を除去した。修飾後の SWCNT 分散液の吸収スペクトルを測定したところ、490nm 付近にフルオレsein に由来する吸収の増加が観察され、SWCNT/ペプチド複合体にフルオレsein が標識されていることが確認された (Fig. 2)。フルオレsein 標識 SWCNT/ペプチド複合体と未標識 SWCNT/ペプチド複合体の差スペクトル (Fig. 3) は、フルオレsein の吸収スペクトルの形と若干の違いが見られたものの概ね一致していた。

このフルオレsein 標識 SWCNT/ペプチド複合体の蛍光スペクトルを測定したところ、興味深いことにフルオレsein の蛍光強度は非常に弱く、その蛍光は SWCNT 表面に固定していない場合の 8%程度であった (Fig. 4)。

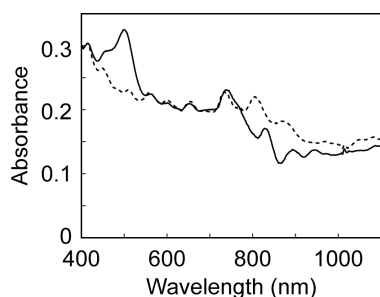


Fig. 2. フルオレsein 標識 SWCNT/ペプチド複合体の吸収スペクトル。実線はフルオレsein 標識体を、破線は未標識体を示す。

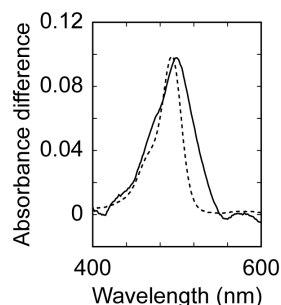


Fig. 3. フルオレsein 標識 SWCNT/ペプチド複合体と未標識体の吸収差スペクトル。実線は差スペクトルを、破線は同濃度のフルオレsein の吸収スペクトルを示す。測定は pH7.5 の 50 mM HEPES-Na 緩衝液中で行った。

このような現象は、蛍光プローブをテトラメチルローダミン (蛍光強度は 28%まで減少) や BODIPY TMR 色素 (蛍光強度は 37%まで減少) に変えた場合にも観察された。

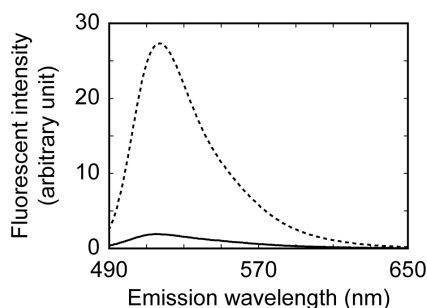


Fig. 4. フルオレsein 標識 SWCNT/ペプチド複合体の蛍光スペクトル。実線はフルオレsein 標識体、破線は同濃度のフルオレsein の蛍光スペクトルを示す。測定は pH7.5 の 50 mM HEPES-Na 緩衝液中で行い、励起波長は 480 nm で行った。

SWCNT は紫外領域から近赤外領域まで、幅広い領域に吸収を持つため、この蛍光強度の減少は SWCNT による消光によるものである可能性が考えられた。そこで、蛍光プローブと SWCNT の間にポリエチレングリコール (PEG) スパースを導入し、蛍光プローブと SWCNT の距離を変化させてその蛍光スペクトルを測定した (Fig. 5)。この検討には、蛍光標識試薬として MTS-4-フルオレsein の代わりに BODIPY TMR NHS ester (Invitrogen 社製) を用いた。

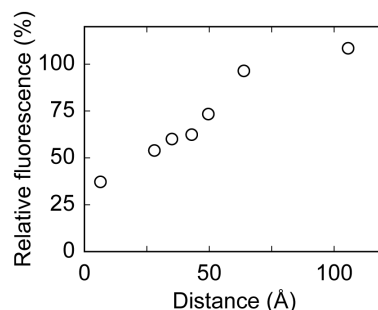


Fig. 5. SWCNT からの距離と蛍光強度の関係

この結果、SWCNT からの蛍光プローブの距離が遠くなるほど蛍光プローブの蛍光強度は強くなり、60~70Å 程度の距離まで離れると消光はほぼ解消されることが分かった。一般に蛍光のエネルギー移動は 100Å 以内で起こると言われており、この結果はそれとよく一致していると言える。

(2) ジスルフィド結合の還元切断による消光の解消

SWCNT/ペプチド複合体への固定化によってフルオレセインが消光していることが確認されたことから、ジスルフィド結合の切断によってフルオレセインが SWCNT/ペプチド複合体から遊離することにより、その蛍光が回復することが考えられた。そこで、還元剤であるトリカルボキシエチルホスフィン塩酸塩(TCEP·HCl)を添加してジスルフィド結合を還元切断し、溶液の蛍光スペクトルを測定した。この結果、フルオレセインの蛍光強度は TCEP·HCl の添加によって大きく上昇し、同濃度の遊離フルオレセインと同程度まで蛍光強度が回復することが示された(Fig. 6)。

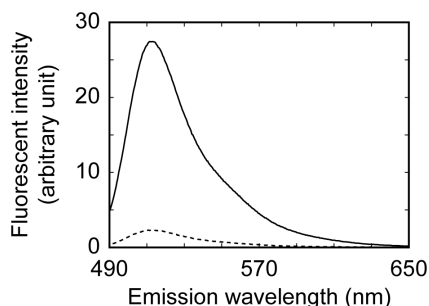


Fig. 6. TCEP·HCl の添加に伴うフルオレセイン標識 SWCNT/ペプチド複合体溶液の蛍光スペクトル変化。実線は TCEP·HCl 添加後のスペクトルを、破線は TCEP·HCl 添加前のフルオレセイン標識 SWCNT/ペプチド複合体の蛍光スペクトルを示している。測定は pH7.5 の 50 mM HEPES-Na 緩衝液中で行い、励起波長は 480 nm で行った。

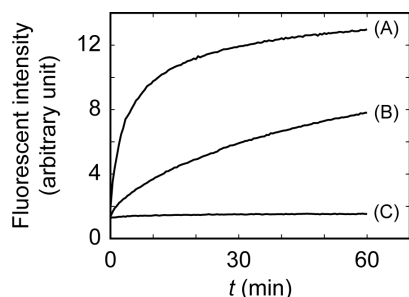


Fig. 7. 還元剤の添加に伴う蛍光強度の経時変化。(A) 1 mM TCEP·HCl を添加したフルオレセイン標識 SWCNT/ペプチド複合体。(B) 1 mM 還元型グルタチオンを添加したフルオレセイン標識 SWCNT/ペプチド複合体。(C) 還元剤を添加していないフルオレセイン標識 SWCNT/ペプチド複合体。測定は pH7.5 の 50 mM HEPES-Na 緩衝液中で行い、励起波長は 480 nm、測定波長は 512 nm で行った。

蛍光強度の経時変化を観察したところ、還元剤を添加しない場合には蛍光強度に変化は見られなかったが、1 mM TCEP·HCl の添加により経時的に蛍光強度の増加が観察された。生体内で還元性物質として働く還元型グルタチオンでも同様の蛍光強度の増加が観察され、生体内においても酸化還元反応によってジスルフィド結合が切断され、薬物放出が行われると期待された。また、還元型グルタチオンによるジスルフィド結合の切断速度は TCEP·HCl と比べると遅いことが分かった。

これらの結果から、ジスルフィド結合を介して薬物をキャリアに結合することにより生体内の還元性物質による薬物放出が可能であることが示唆された。また、今回調製したフルオレセイン標識 SWCNT/ペプチド複合体は、蛍光を追跡することによりモデル薬物(フルオレセイン)の放出を非常に簡単に評価できるという点で優れており、今後の検討においても重要な役割を果たしていくものと考えられた。

(3) 酸化還元酵素を利用したジスルフィド結合切断の検討

酸化還元酵素は生体内で起こる酸化還元反応を触媒する酵素であり、その反応をジスルフィド結合の切断に利用できれば様々な生体分子に反応して薬物放出を行うキャリアのデザインが可能となる。そこでグルコースオキシダーゼ(GOD)およびグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)をモデル酵素として、これらの酸化還元酵素を用いたジスルフィド結合の還元切断について検討を行った。

GOD と GDH はグルコースを酸化してグルコノラクトンに変換する反応を触媒するが、その際に補酵素としてそれぞれフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)とニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)を必要とする。これらの補酵素は、その触媒反応において基質グルコースから電子を受け取る役割を担っており、電子を受け取ることによってそれぞれ還元状態の FAD₂ および NADH となる。従って、これらの電子を適切にジスルフィド結合に渡すことが出来れば、その結合が還元切断されることが期待できる。

GOD によるジスルフィド結合の還元切断に関しては、ジスルフィド結合を有する 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB)をリンカーとしてペプチドを GOD 表面に固定化した場合に、グルコース酸化したによって DTNB のジスルフィド結合が切断されることが報告されている⁽³⁾。そこで、DTNB および DTNB と同様にジスルフィド結合の導入できる 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸 N-スクシンイミジル(SPDP)を用いて GOD 表面のアミノ基を標識し(Fig. 9)、グルコースの酸化反応によってこれらのジスルフィド結合が還元切断されるかどうかを検討した。

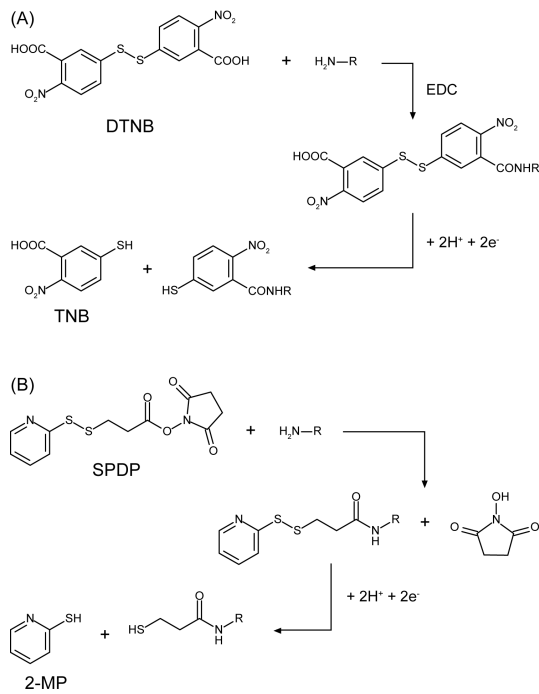


Fig. 8. DTNB および SPDP によるアミノ基の標識とその還元切断.

GOD 表面への DTNB の標識は、縮合剤として 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC)を用い、SPDP による標識は、pH7.5 の 50 mM HEPES-Na 緩衝液中で GOD と SPDP を混合することにより行った。未反応の DTNB および SPDP は透析により除去した。これにより得られた DTNB 標識 GOD

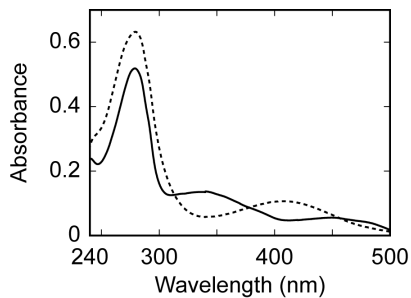


Fig. 9. DTNB 修飾 GOD の吸収スペクトル. 実線は DTNB 修飾 GOD の吸収スペクトルを、破線は DTT で還元処理した DTNB 修飾 GOD の吸収スペクトルを示す。

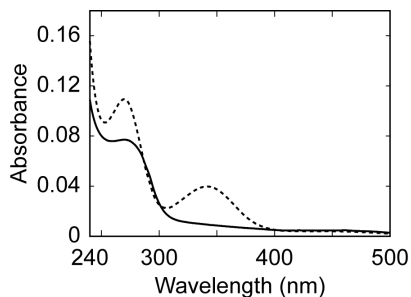


Fig. 10. SPDP 修飾 GOD の吸収スペクトル. 実線は SPDP 修飾 GOD の吸収スペクトルを、破線は DTT で還元処理した SPDP 修飾 GOD の吸収スペクトルを示す。

および SPDP 標識 GOD の吸収スペクトルを Fig.9 および Fig. 10 に示す。還元剤ジチオスレート(DTT)を用いてこれらを還元すると、それぞれジスルフィド結合の開裂によって生じる 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸 (TNB)および 2-メルカプトピリジン(2-MP)に由来する吸収ピークが現れ、標識が成功していることが確認された。

DTNB 修飾 GOD および SPDP 修飾 GOD の溶液に、グルコースおよび還元剤であるジチオスレート(DTT)を添加し、その吸光度変化を測定した結果を Fig. 10 に示す。DTT を添加した場合には、それぞれ 412 nm (DTNB 修飾 GOD)と 343 nm (SPDP 修飾 GOD)の吸光度が急激に上昇しており、これはジスルフィド結

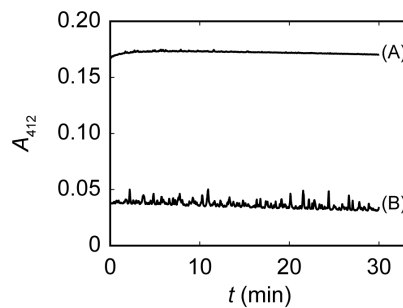


Fig. 11. DTNB 修飾 GOD の吸収の経時変化. (A) 1 mM DTT を添加した DTNB 修飾 GOD. (B) 20 mM グルコースを添加した DTNB 修飾 GOD.

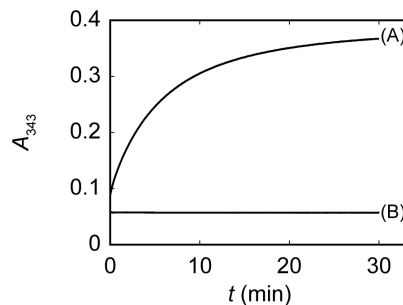


Fig. 12. SPDP 修飾 GOD の吸収の経時変化. (A) 1 mM DTT を添加した SPDP 修飾 GOD. (B) 20 mM グルコースを添加した SPDP 修飾 GOD.

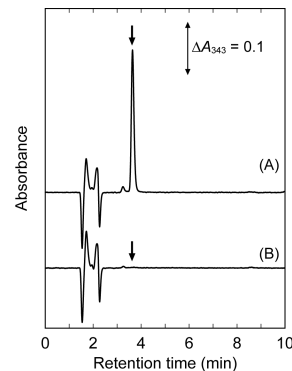


Fig. 13. HPLC による SPDP 修飾 GOD のジスルフィド結合開裂確認. 矢印はジスルフィド結合の還元切断生成物である 2-MP のピークを示す。(A)は SPDP 修飾 GOD と DTT をインキュベートしたもの、(B)は SPDP 修飾 GOD とグルコースをインキュベートしたものを分析した結果を示す。

合が切断されて TNB または 2-MP が放出されたことを示している。一方、グルコースを添加した場合には吸光度の変化が観察されず、ジスルフィド結合が切断されていないことが示唆された。念のため、SPDP 修飾 GOD に関しては HPLC でも確認を行ったが (Fig. 13)、やはり 2-MP のピークは観察されず、やはりジスルフィド結合が切断されていないことが確認された。以上の結果だけでは GOD の表面を介した電子移動によるジスルフィド結合の還元切断が不可能であると結論付けられないが、その達成が困難であることが示された。

次に、酸化還元酵素としてグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を用い、FAD をメディエーターとして用いる方法を検討した。これまでに、一つの担体に GDH と NAD、FAD、ジスルフィド化合物を一緒に固定化したときに、グルコースの添加によりジスルフィド結合が切断されるということが報告されているが⁽⁴⁾、本研究では NAD と FAD の固定化がうまく出来なかったため、SWCNT/ペプチド複合体に NAD や FAD を固定化して検討することは断念し、遊離の NAD や FAD を用いて予備的検討を行うこととした。この検討では、基質ジスルフィド分子として 4,4'-ジチオピリジン (4-PDS) を用いた (Fig. 14)。

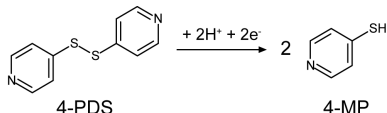


Fig. 14. 4-PDS のジスルフィド還元切断.

GDH と NAD、FAD、4-PDS を混合し、これにグルコースを添加したところ、生成物である 4-メルカプトピリジン (4-MP) のピークが現れた (Fig. 15)。このピークは、グルコースを添加しない場合や FAD を添加しない場合にはそのピークが優位に小さくなっており、GDH、NAD、FAD、グルコースの 4 つが揃った時に最もよくジスルフィド結合が分解され

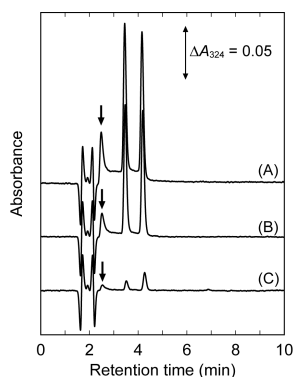


Fig. 15. HPLC による 4-PDS のジスルフィド結合開裂確認.

矢印は 4-PDS の還元切断生成物である 4-MP のピークを示す。(A)は 4-PDS と FAD、GDH、NAD、グルコースをインキュベートしたもの、(B)は 4-PDS と FAD、GDH、NAD をインキュベートしたもの、(C)は 4-PDS と GDH、NAD、グルコースをインキュベートしたものをそれぞれ分析した結果を示す。

ていると言える。一方で、4-MP の生成は基質である 4-PDS がまだほとんど消費されていないにもかかわらず頭打ちになる傾向があり、何らかの副反応によりジスルフィド結合の還元切断が阻害されている可能性が考えられた。

(4) 総括

本研究では、生体内に存在する分子の濃度に応じて薬物を放出する DDS キャリアのモデル実証を目的としていた。残念ながら、酸化還元酵素を利用した薬物リリースが可能であることの証明には至らなかったが、本研究で構築したモデル薬物キャリアのように、ジスルフィド結合によってキャリアに薬物を結合することにより、グルタチオンのような生体内の還元性物質によって薬物リリースが可能であることを証明することが出来た。また、酸化還元酵素を用いた薬物リリースについても、FAD をメディエーターとして用いることにより、GDH によるグルコースの酸化反応をジスルフィド結合の還元切断に利用可能である可能性が示された。ただし、この一連の反応についてはまだ不明な部分も多く、今後さらなる検討が必要であろう。

(参考文献)

- (1) *J. Pharm. Sci.* **101**, 3398 (2012)
- (2) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 2408 (2003)
- (3) *Bioconj. Chem.* **5**, 84 (1994)
- (4) *J. Controlled Release* **18**, 45 (1992)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

- (1) Yasuhiko Hashida, Hironori Tanaka, Shuwen Zhou, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Tatsuya Murakami, Tomokazu Umeyama, Hiroshi Imahori, Mitsuru Hashida. Photothermal ablation of tumor cells using a single-walled carbon nanotube-peptide composite. *Journal of Controlled Release*, 査読有, **173**, 59-66 (2014).

[学会発表](計 1 件)

- (1) カーボンナノチューブを自己組織的に被覆するペプチド分散剤の設計
橋田泰彦, 梅山有和, 三原潤也, 今堀博, 辻本将彦, 磯田正二, 高野幹夫, 橋田充
日本生化学会 2015 年度近畿支部例会 (滋賀)
発表年月日: 2015 年 5 月 16 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋田 泰彦 (HASHIDA, Yasuhiko)
京都大学・物質・細胞統合システム拠点・
研究員
研究者番号: 30512462