

BIOLOGY TOPICS

機能性自己集合化分子によるがん検出と アミロイドβ凝集阻害効果

からさわ さとる

唐澤 悟

昭和薬科大学薬学部 薬品分析化学



唐澤 悟
1999年九州大学大学院薬学研究科修了
博士(薬学)取得
同年九州大学薬学研究科 助手
2006年九州大学大学院薬学研究科
助教授
2007年九州大学大学院薬学研究科
准教授
2014年-2018年
JST さきがけ研究員兼任 (領
域:分子技術と新機能創出)
2017年より昭和薬科大学薬学部
薬品分析化学教室 教授 (現職)

Key words : 自己集合化, 機能性, がん診断,
アミロイドβ

Abstract

有機化合物から構成された自己集合化分子 UBD は、水溶液中で弱い分子間相互作用によって微粒子を形成し、温度を上げることで自己集合化が促進される温度応答性の特徴を有する。UBD に蛍光団を導入した TFMAQ-UBD を担癌マウスへ投与すると、がん組織が正常組織よりも若干高温である性質に感応し、温度応答的に腫瘍へ蓄積できることを蛍光イメージングにより明らかとした。また UBD に疎水性基を導入することで得られた UBD-X は、自身の自己集合化能を活かしてアミロイドβ凝集阻害効果を示すことが明らかとなった。

はじめに

様々な疾患を低分子薬剤で治療するアプローチは、薬物治療の根幹をなす重要な位置づけにある。一方近年、低分子薬剤よりも大きな分子や集合体を使つての治療薬が注目を集め、抗体医薬や核酸医薬などが急速に発展してきてい

る。筆者らは、自己集合体と呼ばれる低分子どうして結合し大きな分子量となる集合体を基盤として、今までに報告例のない機能性を自己集合体へ付与し、その機能性集合体を医療へ展開することを目的に研究を進めている。今回、自己集合化と機能性をキーワードに、①がんの高温性に感応したがん検出法、②アミロイドβを自己集合化分子で取り囲むことでのアミロイドβ凝集阻害効果、について報告する。

1. 自己集合化分子

自己集合化分子とは、分子量 2,000 以下の低分子が、溶液中で自分自身と分子間相互作用によって結合し、大きな分子量の集合体を形成する分子群の事であり、化学の分野では「超分子」の一種として分類される。ここで使われる分子間相互作用とは、薬物がタンパク質などと結合するための相互作用や、水分子の沸点が低分子のわりに高い現象を支配している水素結合と同類の分子と分子を繋ぐ比較的弱い力である。一般的に知られる高分子ポリマーは、分子の骨格を維持するため強い結合すなわち共有結合から

Tumor detection and inhibitory effect on Aβ aggregation using the functional self-assembly compounds
Satoru Karasawa, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Showa Pharmaceutical University

成るが、自己集合体はポリマーと同様に高分子を形成するものの、共有結合よりも弱い結合から成るため、身体に入れた後の分解性、すなわち生分解性が高く速やかに排泄されること、低分子であるため容易に様々な機能を付与できること、これらが利点としてあげられる。

2. ウレアベンゼン誘導体

筆者らは、自己集合化分子を使って、生体内の疾患の検出や治療へ応用展開する研究を行っている。自己集合化分子としては、マルチな分子間相互作用を生み出すことが可能なウレアベンゼン誘導体 (UBD) を基本骨格としている。UBD は水素結合、疎水性結合、ベンゼン環の π - π スタッキングにより自己集合化することが可能で、現在までに UBD を利用して、蛍光物質を導入した系^{1,2)}、MRI 造影剤の候補化合物であるガドリニウム製剤を導入した系、金属を含まないメタルフリー造影剤を導入した系を構築してきており^{3,5)}、これらを使って生体内の疾患の検出を目指している。今回は、UBD に蛍光団を導入した系による「がん検出」への展開と、UBD 中の疎水性基の長さを変えることによって生じた、「アミロイド β 凝集阻害効果」について概説する。

3. 温度応答性 UBD を用いた 蛍光によるがん検出¹⁾

筆者らは TFMAQ と呼ぶアミノキノリン骨格を有する蛍光団を開発してきた⁶⁾。TFMAQ は水溶液中でも中程度の蛍光を発することができ、先に述べた UBD と連結させて得られた TFMAQ-UBD は、水中で発光する機能を保ちながら自己集合化によって 10 ナノメートル程度のナノ微粒子 NP を形成する。さらに NP は温

度に対して鋭敏に反応し、ある特定温度でさらに自己集合化して 1 マイクロメートル程度の大きな微粒子へサイズアップする特徴を持つ。この相転移温度を下限臨界溶液温度 LCST と呼び、NP の親水性基を変えることで LCST を制御することが可能である。一方がんは、微小環境下で正常組織と様々な点で違いがあり、①がんの血管内皮細胞が粗雑であるために間質に隙間が生じること⁷⁾、②過剰な乳酸発現のため pH が酸性⁸⁾、③正常組織より若干温度が高いこと⁹⁾、などが知られている (図 1)。①の特徴を応用して薬物を隙間へ運ぶドラッグデリバリーシステムは有名であり、この効果を Enhanced Permeability Retention (EPR) 効果と呼ぶ¹⁰⁾。②の酸性の特徴を使ったがん検出も多くの研究例が報告されているが、③の温度差を利用した研究例はほとんどない。その理由は正常組織とがん組織の温度差が 1 から 2°C 程度であり、その小さな温度差を認識できる物質が得られなかったことも一因と思われる。このような背景の中筆者らは、TFMAQ-UBD から成る NP の温度にตอบสนองしてサイズアップする性質を利用し、がんの温度差を認識してがんの隙間に能動的に滞留させることを試みた (図 1)。すなわち、がんと正常組織の違い①と③を組み合わせたアプローチによる展開である。まず、親水性基であるエチレングリコール鎖の長さ X を変えた三種類の NP-X である、NP-3、NP-4、NP-6 を準備した。それぞれ LCST 値が異なり、1 mM の溶液で NP-3、NP-4、NP-6 は 35、37、40°C を示し、エチレングリコール鎖が長くなるほど LCST 値は高温となった。この理由は、親水性基が長くなるほど水溶液中での溶解性が増し、高温にならないと凝集しないためと理解している。これら三種類の NP-X を用いて大腸がんを下肢に移植した担癌マウスへ投与し、*ex vivo* 蛍光イメージングを試みた。マウスには腫瘍の部分の局所的に 45°C

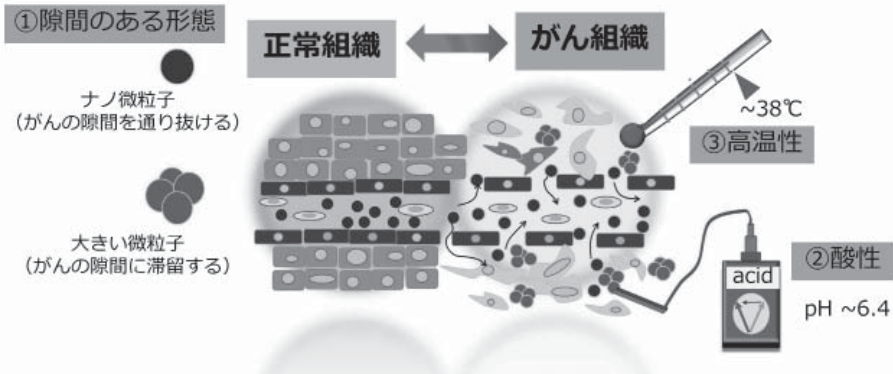


図1 正常組織とがん組織の微小環境での違い

がんは、①血管内皮細胞が粗雑であり、特定の大きなナノ微粒子が隙間に入り込むが、小さいと抜けていく。一方大きな微粒子となると隙間に入り滞留する。この現象を利用したのがEPR効果であり、多くのDDSでこの効果が利用されている。がんは②乳酸を多く発現するためpH～6.4程度である（正常組織はpH～7.4）。がん組織は③熱量が大きく、1～2℃程度正常組織よりも高温であることが報告されている（がんの大きさや種類で変化する）。

程度で加温した「加温マウス」と温めていない「非加温マウス」の二種類を準備した。生理食塩水で希釈したNP-X（200 μ M）を尾静脈投与し、数時間後腫瘍を取りだして蛍光により観察した結果が図2である。左側が「非加温マウス」で右側が「加温マウス」で、上からNP-3、NP-4、NP-6の結果である。「加温マウス」では、腫瘍部をLCST以上に加温しているため全てのNP-Xが腫瘍へ集積し滞留したことで強い蛍光を発した。この実験により、温度応答性分子であるNP-Xは体内の温度変化に感応して自己集合化でサイズアップして、がんの隙間に入り込み滞留することが示唆された。次に「非加温マウス」によって同様の蛍光観察を行った結果、違いが見いだされた。LCST35℃のNP-3は蛍光強度が強く、LCST37℃のNP-4はやや弱い蛍光で、LCST40℃のNP-6では腫瘍部への蛍光はほとんど観測されなかった。このことは腫瘍への集積には化合物依存性があり、LCSTが低いNP-3が最も沢山集積し、一番高いNP-6は集積しないことを示唆する。この理由は、腫瘍の温度がLCSTよりも高ければ温度応答的自己

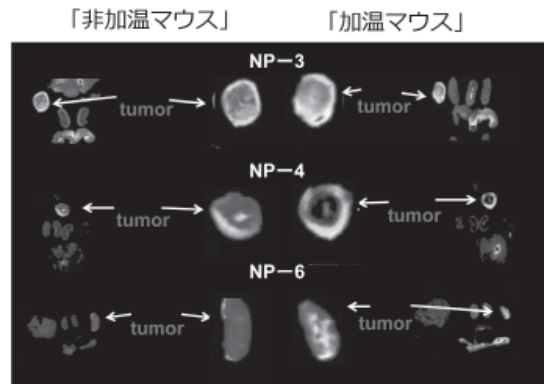


図2 NP-X投与後の担癌マウスの蛍光イメージング「非加温マウス」(左)と「加温マウス」(右)へNP-Xを尾静脈投与し、腫瘍を取り出し蛍光で観察。上からNP-3、NP-4、NP-6の結果。「加温マウス」では全ての腫瘍に強い蛍光が観察できるが、「非加温マウス」では、NP-3>NP-4>NP-6の順に蛍光が強くなった。

集合化によって腫瘍へ集積するが、腫瘍よりもLCSTの方が高ければサイズアップしないため腫瘍への蓄積は観測できないと考えることが出来る。言い換えると腫瘍の温度をNP-Xで確かめることが出来き、NP-Xの蓄積性の差から～39℃程度であることが推察できる。

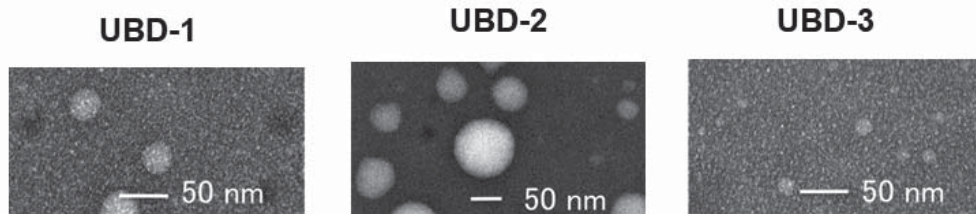


図3 UBD 誘導体のネガティブ染色で得られた TEM 画像
スケールバーは 50 nm を表す。(図は昭和薬科大学紀要より使用許諾を得て引用)

4. アミロイド β 凝集阻害¹¹⁾

先の報告より UBD は水溶液中自己集合化し、その程度は化合物の極性や温度刺激などに依存することが示された。そこで、UBD が自己集合化して微粒子を形成する際に、アミロイド β を取り込みことができれば、アミロイド β 凝集阻害薬として展開できるのではないかと考え、疎水性置換基の長さを変えた三種類の UBD-X である、UBD-1 (炭素 6 個から成るヘキシル鎖)、UBD-2 (炭素 7 個から成るヘプチル鎖)、UBD-3 (炭素 8 個から成るオクチル鎖) をそれぞれ準備した。アミロイド β は疎水性の高い物質と分子間相互作用することが知られており、最も疎水性の高い UBD-3 が高い凝集阻害効果を示すことを期待した。全ての UBD-X は先に述べた NP と同様に水溶液中自己集合化し、 ~ 50 ナノメートル程度の球状ナノ微粒子を形成した (図 3)。また LCST は 1 mM の溶液で、UBD-1, UBD-2, UBD-3 がそれぞれ 71°C, 29°C, 23°C を示し、疎水性が高いほど低温で凝集が始まることが分かった。

$A\beta_{1-42}$ ペプチドの凝集体形成に対する阻害効果を評価するため、UBD-X と $A\beta_{1-42}$ ペプチドを混合し、凝集の程度を化合物依存性と時間経過の観点から見積もった。この際、疎水性が非常に高い蛍光性チオフラビン T (ThT) を共存させた。ThT は水溶液中単分子での蛍光強度が弱いため、ThT 由来の蛍光が強ければ ThT と $A\beta_{1-42}$ ペプチ

ドとが結合したことを意味し、アミロイド凝集体が沢山生成している。一方弱ければ UBD-X の阻害効果によってアミロイド凝集体の生成が抑制されていることを示す。コントロールとして調整した $A\beta_{42}$ ペプチドのみで UBD-X を含まない溶液では、時間経過に伴いアミロイド凝集体が形成し ThT と結合したことを蛍光強度増加から確認した (図 4 濃いグレー)。UBD-1 共存下では 122 時間後において僅かに蛍光強度が減少し、若干の凝集体形成阻害効果が示唆された (図 4a)。UBD-2 共存下では 122 時間後において明らかな蛍光強度減少が観測され、阻害効果が強いことが示唆された (図 4b)。一方 UBD-3 共存下では、122 時間以上インキュベーションしてもコントロールとほとんど差がなく、阻害効果が弱いことが示唆された (図 4c)。

以上の結果より、凝集阻害効果が現れるには 122 時間程度が必要であり、化合物に依存することも明らかになった。凝集阻害効果が最も強いのは、疎水性が最も高い UBD-3 ではなく UBD-2 であったのは新しい知見であり、凝集阻害のためには疎水性の強さだけではない他の重要因子の存在が示唆された。この点については、今後様々な誘導体を合成することで明らかにしていきたい

おわりに

今回、自己集合化と機能性をキーワードにが

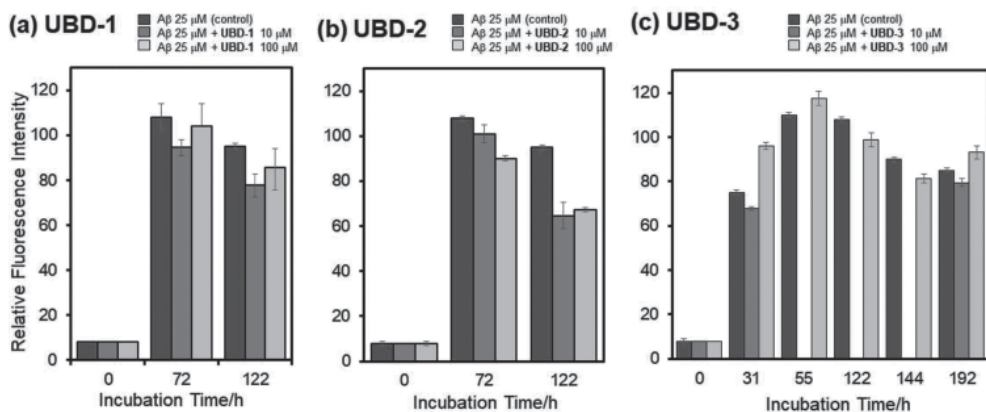


図4 UBD-XによるAβ凝集体形成阻害評価

(a) UBD-1 共存下, (b) UBD-2 共存下, (c) UBD-3 共存下における各時間のチオフラビン T 蛍光強度比較。(図は昭和薬科大学紀要より使用許諾を得て引用)

んへの蓄積性とアミロイドβ凝集阻害について述べた。がん検出については、微小環境下、正常組織よりも若干高温のがん組織へUBDが集積蓄積することが明らかとなり、今後は蛍光よりも身体の深部透過性の高い電磁波を利用するMRIなどで検出できるUBD構築を目指していく。またUBDに制がん剤を導入した分子も共同研究先と進めており、がんの治療と診断が可能となるセラノスティック剤の開発へ展開させたい。一方アミロイドβ凝集阻害については、まだまだ明らかになっていないことが多いが、今回得られた結果から、UBDがある程度凝集抑制効果を持つことが明らかになり道筋は見えたと考えている。今後様々な誘導体を合成することにより、画期的な抑制効果を示す阻害剤開発を目指したい。

文献

- Araki T, Usui K, Karasawa S, *et al.* Self-Assembly behavior of emissive urea benzene derivatives enables heat-induced accumulation in tumor tissue. *Nano Lett.* 2017, 17, 2397-2403.
- Araki T, Fuchi Y, Karasawa S, *et al.* Fluorescence tumor-imaging using a thermo-responsive molecule with an emissive aminoquinoline derivative. *Nanomaterials* 2018, 8, 782.
- Morishita K, Ueki S, Karasawa S, *et al.* Self-Assembled biradical urea benzene nanoparticles for magnetic resonance imaging. *ACS Applied Nano Materials* 2018, 1, 6967-6975.
- Morishita K, Okamoto Y, Karasawa S, *et al.* Water-Proton relaxivities of radical nanoparticles self-Assembled via hydration or dehydration processes. *Langmuir* 2017, 33, 7810-7817.
- Morishita K, Murayama S, Karasawa S, *et al.* Thermal- and pH-dependent size variable radical nanoparticles and its water proton relaxivity for metal-free MRI functional contrast agents. *J. Org. Chem.* 2016, 81, 8351-8362.
- Abe Y, Karasawa S, Koga N, Crystal structures and emitting properties of trifluoromethylaminoquinoline derivatives: Thermal single-crystal-to-single-crystal transformation of polymorphic crystals that emit different colors. *Chem Eur. J.* 2012, 18, 15038-15048.
- Nakanishi T, Fukushima S, Kataoka K, *et al.* Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J. Controlled Release* 2001, 74, 295-302.
- Gerweck L.E, Seetharaman K, Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.*,1996, 56, 1194-1198.
- Monti M, Brandt L, Olsson H, *et al.* Microcalorimetric investigation of cell metabolism in tumour cells from patients with non - Hodgkin lymphoma (NHL) *Scand. J. Haematol.* 1986, 36, 353-367.
- Fang J, Nakamura H, Maeda H, The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2011, 63, 136-151.
- 淵 靖史, 小林茂樹, 唐澤 悟, ウレアベンゼン誘導体の自己集合化挙動とアミロイド凝集体形成阻害効果、昭和薬科大学紀要 2019 ; 53: 21-30