

# 研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

## 1. 研究課題名

ホストゲスト化学に基づく薬物送達システムの開発

## 2. 研究代表者

林田 修（福岡大学・理学部・教授）

## 3. 研究シーズ探索成果の概要

本研究課題では、薬物を細胞に効率よく送り届ける分子システムを構築するための革新的技術の開発に取り組んだ。そのため、薬物モデル(ゲスト)を捕捉し、細胞内に送り届けることができるホストの合成を主な戦略とした。具体的には、蛍光性のピレン基を有するカチオン性シクロファン(ホスト)の合成を行った。カチオン性シクロファンは HepG2 ヒト肝ガン細胞内に効率よく取り込まれることがわかった。さらに、単独では細胞に取り込まれにくい薬物モデルがカチオン性シクロファンとホストゲスト複合体を形成することで細胞内へ効率的に取り込まれることを見出した。一方、シクロファンをペプチド結合で連結したシクロファン多量体も合成し、シクロファン多量体が薬物モデルを捕捉したまま細胞内へ移行し、さらにゲストを放出できる可能性が示された。将来的に抗がん剤などに応用できる分子システムを開発するための重要な指針を与えることができた。

## 4. 研究シーズ探索のねらい

狙った細胞に薬物を効率よく送り届ける分子システムを開発することが目的である。具体的には、可逆的で“弱い共有結合”を利用して5個のシクロファンを連結したホストを合成し、クラスター効果を反映して薬物(ゲスト)を強く捕捉させる。さらに、細胞内へ送達させ、リソソームの弱酸性環境下においてホストが酸加水分解され単量体に解裂することで、クラスター効果の解消と共に薬物が放出される薬物送達システムを構築する。

## 5. 研究シーズ探索の方法と成果

### 5.1 方法

#### 5.1.1 蛍光基を有するシクロファンによる細胞内への取り込み<sup>1</sup>

薬物を細胞に効率よく送り届ける分子システムを開発するために、ピレン基を有するカチオン性シクロファン(1)を分子設計し、合成した(図1)。シクロファン 1(ホスト)の薬物モデル ANS (ゲスト)に対する包接挙動を蛍光滴定実験から評価し、ホストゲスト複合体生成定数( $K$ )を算出した。シクロファン 1 の HepG2 ヒト肝ガン細胞内への取り込み挙動を蛍光顕微鏡観察により評価した。さらに、シクロファン 1 の HepG2 細胞内での局在に関して、リソソームを選択的に染色できる LysoTrackerRed を用いた二重染色実験により評価した。また、シクロファン 1 の存在下および不在下における薬物モデル ANS の HepG2 細胞内への取り込み挙動についても蛍光顕微鏡観察により検討した。

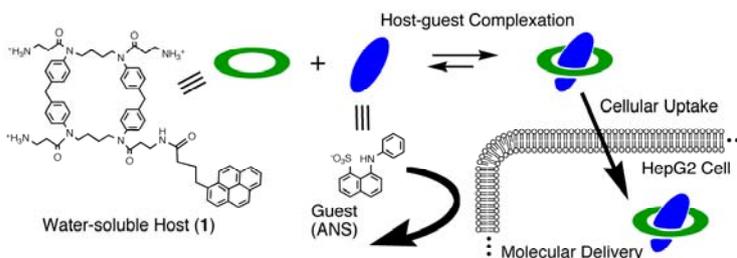


Figure 1. Schematic representation for guest binding, cellular uptake, and molecular delivery of water-soluble cyclophanes having a pyrene moiety

#### 5.1.2 ペプチドを分子基盤としたシクロファン多量体の合成<sup>2</sup>

ペプチドを分子基盤にしたシクロファン2量体(C2)を Fmoc 法により合成した(図2)。単環性シクロファン(C1)も合成した(図2)。シクロファン C2 および C1(ホスト)の薬物モデル TNS および 2,6-ANS (ゲスト)に対する包接挙動を蛍光滴定実験から評価し、ホストゲスト複合体生成定数( $K$ )を算出した。シクロファン C2 のゲスト捕捉能におけるクラスター効果を評価した。

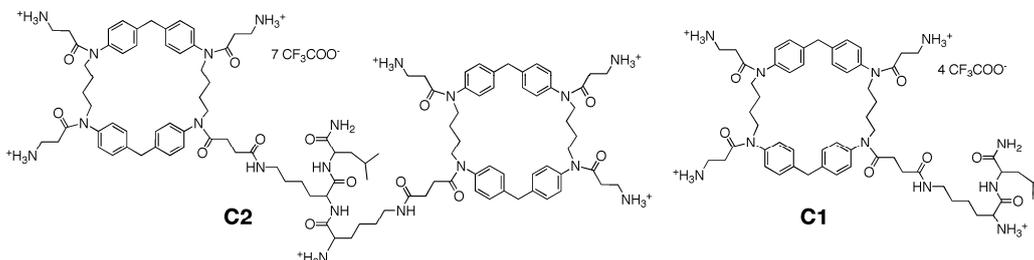
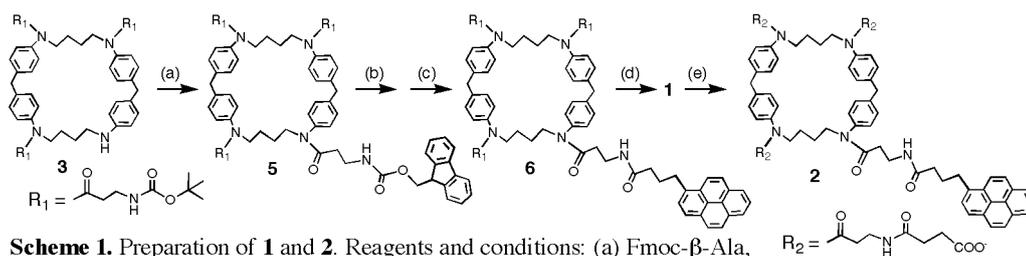


Figure 2. Water-soluble cyclophanes (C2 and C1).

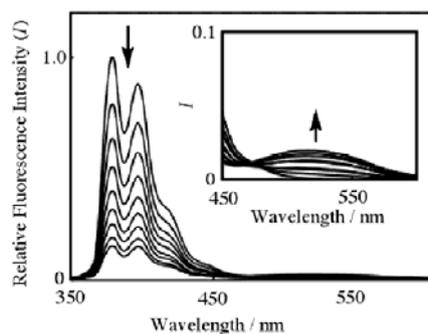
### 5.2 成果

#### 5.2.1 蛍光基を有するシクロファンによる細胞内への取り込み<sup>1</sup>

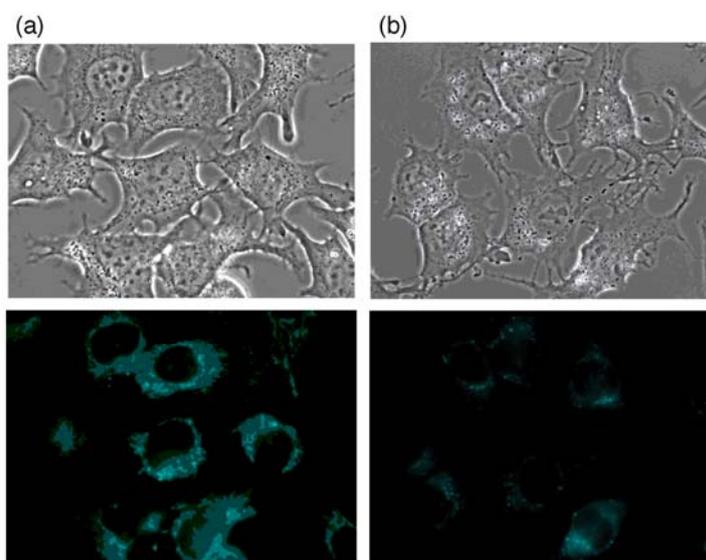
ピレン基を有するカチオン性シクロファン(1)をスキーム1により合成した。細胞内取り込みにおける側鎖の電荷の影響を調べるためにピレン基を有するアニオン性シクロファン(2)も合成した。シクロファン1および2は薬物モデル ANS を強く捕捉できることがわかった(図3、 $K=7.2 \times 10^4$  および  $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ )。これらの  $K$  は従来の単環性シクロファンが示す  $K$  よりも一桁大きいことから、ゲスト捕捉の主な駆動力はシクロファンの分子内空洞およびピレン基による協同的な疎水性相互作用であると考えられる。また、シクロファン 1 および 2 の HepG2 細胞内への取り込みにおいて、カチオン性の 1 がアニオン性の 2 よりも細胞内により効率的に取り込まれることがわかった(図4)。細胞内への取り込み過程では、負電荷を帯びている細胞表層とシクロファンの間での静電的相互作用が重要な役割を果たしていると言える。また、1 の HepG2 細胞内での局在を調べるために LysoTrackerRed を用いて行った二重染色実験から、1 はリソソームに局在していることがわかった(図5)。細胞内への取り込みはエンドサイトーシスによるものと考えられる。さらに、単独では細胞に取り込まれにくい ANS が 1 とホストゲスト複合体を形成することで細胞内へ効率的に取り込まれることがわかった(図6)。細胞に薬物モデルを効率よく送り届ける分子システムを開発することに成功した。



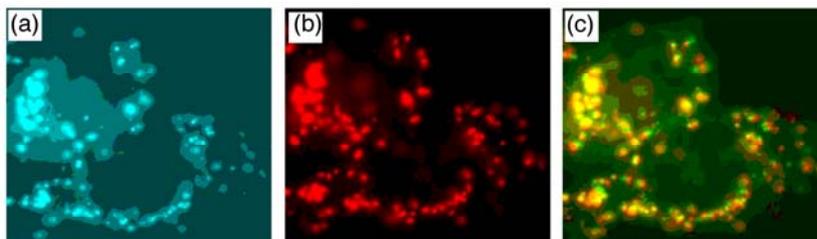
**Scheme 1.** Preparation of **1** and **2**. Reagents and conditions: (a) Fmoc- $\beta$ -Ala, DCC, DCM; (b) piperidine, DCM; (c) 1-pyrenebutyric acid, DCC, DCM; (d) 30 % TFA; (e) succinic anhydride, DCM.



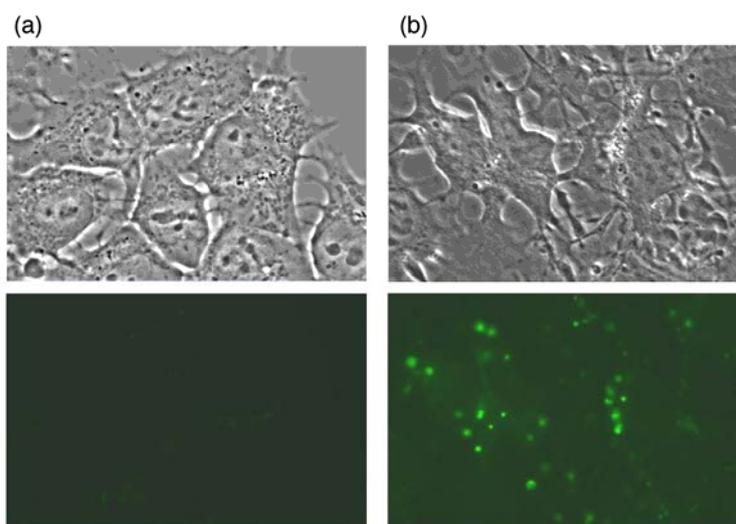
**Figure 3.** Fluorescence spectral changes for aqueous solution of **1** upon addition of ANS in HEPES buffer (0.01 M, pH 7.4, 0.15 M with NaCl) at 298 K.  $[I] = 1.0 \mu\text{M}$ ,  $[\text{ANS}] = 0, 5.0, 10, 15, 20, 25, 30, 35,$  and  $40 \mu\text{M}$  (from top to bottom at 379 and 396 nm). Ex 322 nm.



**Figure 4.** Microphotographs (top) and their fluorescence images (bottom) of HepG2 cells after a 60 min incubation with an aqueous solution (pH 7.3 with PBS) of (a) **1** (5 nM) and (b) **2** (5 nM) at 37 °C, followed by washing twice the PBS buffer.



**Figure 5.** Cellular distribution of **1** (blue, a) and LysoTracker Red (red, b) in HepG2 cells after incubation in the presence of **1** (5 nM) for 1h and then, LysoTracker RED (50 nM) for 10 min at 37 °C. The image shown in c is the overlay of the green (a) and red (b) image.



**Figure 6.** Microphotographs (top) and their fluorescence images (bottom) of HepG2 cells after a 60 min incubation with an aqueous solution (pH 7.3 with PBS) of (a) ANS (5 nM) and (b) ANS (5 nM) + **1** (5 nM) at 37 °C, followed by washing twice the PBS buffer. The cells were then incubated for 6 h and analyzed by fluorescence microscopy.

### 5. 2. 2 ペプチドを分子基盤としたシクロファン多量体の合成<sup>2</sup>

Fmoc 法によりペプチドを分子基盤にしたシクロファン2量体の **C2** と単環性シクロファンの **C1** を合成した。シクロファン **C2** の TNS および 2,6-ANS に対する捕捉力はそれぞれ  $K = 7.8 \times 10^4$  および  $7.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  であり、単環性シクロファン **C1** が示すゲスト捕捉力 ( $K = 5.1 \times 10^3$  および  $5.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) と比較して、それぞれ 15 倍および 13 倍に増大した。ゲスト捕捉部位であるシクロファン環が2つある **C2** は単環性シクロファン **C1** と比較して、ゲスト捕捉能が 2 倍ではなく、桁違いに増大するクラスター効果の発現に成功した。

#### 参考文献

- 1) O. Hayashida, C. Eguchi, K. Kimura, Y. Oyama, T. Nakashima, K. Shioji, *Chem. Lett.*, **39**, 1321–1322 (2010).
- 2) O. Hayashida, T. Nakashima, *Chem. Lett.*, **40**, 134–135 (2011).

## 6. 自己評価

本研究課題では、細胞に薬物を効率よく送り届ける分子システムを開発することが目的であったので、手始めに、薬物モデルを捕捉できてかつ細胞に効率よく取り込まれるシクロファンを分子設計し合成した。蛍光顕微鏡での観察を容易に行うために蛍光性のピレン基をシクロファンの側鎖に組み込んだが、ピレン基の疎水性のために期待以上のゲスト捕捉能が得られた。また、細胞内への送達が生体膜の電荷に依存することを見出したことも望外の成果であった。単独では細胞に取り込まれにくい薬物モデルがカチオン性シクロファンと宿主ゲスト複合体を形成することで細胞内へ効率的に取り込まれることを実証することに成功した。さらに、シクロファンをペプチド結合で連結したシクロファン多量体の合成にも成功した。これらシクロファン多量体はクラスター効果を発現しゲストを強く捕捉することが実証できた。シクロファン多量体が薬物モデルを捕捉したまま細胞内へ移行し、さらにゲストを放出する様子を観察することにも成功した。これらの成果は、将来的に抗がん剤などに応用できる分子システムを開発するための重要な指針を与えるものと考えられる。

## 7. POの見解

本研究は分子構造がはっきりしているシクロファンを宿主として、薬剤(ゲスト、今回は ANS)を効率よく癌細胞に取り込ませる研究であり、細胞内に取り込まれた薬剤分布の状況から有効性を示すことができた。細胞表面とシクロファンの静電的相互作用により、細胞内への取り込みが行われることを明らかにした。また、シクロファンの多量体のゲスト捕捉能力はクラスター効果により非線形的に大きくなることを示し、加水分解酵素により多量体を単量体に変えることで、薬剤放出できることを示した。

様々な薬剤に対応するシクロファン誘導体の設計手法を明らかにし、細胞特異性を持つようシクロファンに糖鎖や抗体などを付加できるようになれば極めて有効な薬物伝達手法となり、薬学、医学、化学の融合となる。サイズ、静電相互作用以外にも「化学者としての視点」を生かし、特定部位との選択的結合などの研究推進が期待できる。

## 8. 研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

◎O. Hayashida, D. Sato, Surface Plasmon Resonance Study on Binding Interactions of Multivalent Cyclophane Hosts with Immobilized Guests, *Polym. Adv. Technol.* **21**, 96–99 (2010). DOI: DOI: 10.1002/pat.1398

・N. Kumari, R. Prajapati, O. Hayashida, L. Mishra, Synthesis and Characterization of Coordination Polymers of A Carboxylato Cyclophane with Metal [Zn(II) and Cd(II)]–2,20–Bipyridines, *Polyhedron* **29**, 2755–2761 (2010). DOI: 10.1016/j.poly.2010.06.027

◎O. Hayashida, C. Eguchi, K. Kimura, Y. Oyama, T. Nakashima, K. Shioji, Guest-binding, Cellular Uptake, and Molecular Delivery of Water-soluble Cyclophanes Having a Pyrene Moiety, *Chem. Lett.*, **39**, 1321–1322 (2010). DOI: 10.1246/cl.2010.1321

◎O. Hayashida, T. Nakashima, Synthesis of Cyclophane Dimer Using Cyclophane-tethered Fmoc-amino Acid Derivatives as a Multivalent Host, *Chem. Lett.*, **40**, 134–135 (2011). DOI:10.1246/cl.2011.134

## (2)特許出願

なし

## (3)口頭発表

### ①学会

国内 5 件, 海外 5 件

- ・ 中島智美、佐藤大輔、林田 修、「シクロファン多量体の合成とクラスター効果に基づくゲスト認識」、第 20 回万有福岡シンポジウム (H22.5.22、福岡市)
- ・ 中島 智美、林田 修、「シクロファン多量体の合成とクラスター効果に基づくゲスト捕捉」、第 47 回化学関連支部合同九州大会 (H22.7.10、北九州市)
- ・ 林田 修、江口 千佳、小山 優、塩路 幸生、中島 智美、「蛍光性シクロファンの合成と薬物モデルの細胞内送達」、第 47 回化学関連支部合同九州大会 (H22.7.10、北九州市)
- ・ Tomomi Nakashima, Osamu Hayashida, Preparation and multivalently enhanced guest-binding affinity of peptide-based cyclophane oligomers, *Fukuoka Univ. - Ulsan Univ. Joint Seminar* (August 25-27, 2010, Ulsan, South Korea)
- ・ Keiichiro Kimura, Chika Eguchi, Kosei Shioji, Osamu Hayashida, Guest-binding, cellular Uptake, and molecular delivery of water-soluble cyclophanes having a pyrene moiety, *Fukuoka Univ. - Ulsan Univ. Joint Seminar* (August 25-27, 2010, Ulsan, South Korea)
- ・ 中島 智美、中村 勇気、林田 修、「ペプチドを基盤とするシクロファン多量体の合成とゲスト取り込みにおけるクラスター効果」、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム (H22.9.24-26、大阪市)
- ・ 林田 修、江口 千佳、小山 優、塩路 幸生、木村 圭一朗、中島 智美、「蛍光性シクロファンによる薬物モデルの細胞内送達」、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム (H22.9.24-26、大阪市)
- ・ Osamu Hayashida, Chika Eguchi, Tomomi Nakashima, Yu Oyama, Kosei Shioji, Guest-binding and molecular delivery of water-soluble cyclophanes having a pyrene moiety, *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies* (December 15-20, 2010, Honolulu, HI, USA)
- ・ Osamu Hayashida, Daisuke Sato, Noriko Yahiro, Keiichiro Kimura, Synthesis and host-guest properties of multivalent cyclophane hosts, *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies* (December 15-20, 2010, Honolulu, HI, USA)
- ・ Tomomi Nakashima, Yu-ki Nakamura, Kazuaki Ichimura, Osamu Hayashida, Syntheses and guest-binding behaviors of peptide-based cyclophane oligomers, *2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies* (December 15-20, 2010, Honolulu, HI, USA)

### ②その他

国内 0 件, 海外 0 件

## (4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)

下記の原書論文が日本化学会 *Chemistry Letters* の Editor's Choice に選ばれた。

O. Hayashida, C. Eguchi, K. Kimura, Y. Oyama, T. Nakashima, K. Shioji, *Chem. Lett.*, **39**, 1321-1322 (2010). DOI: 10.1246/cl.2010.1321

[http://www.chemistry.or.jp/gakujutu/chem-lett/cl\\_ec/cl\\_ec2010.html](http://www.chemistry.or.jp/gakujutu/chem-lett/cl_ec/cl_ec2010.html)