

研究成果報告（概要）

1. 研究課題

和文 合成超分子ゲルによる選択的ガン細胞殺傷システムの開発
英文 Cell killing system selective for cancer cells using a synthetic supramolecular gel

2. 申請者名(代表研究者)

氏名 丸山 達生	ローマ字表記 Tatsuo Maruyama
所属大学・機関名 神戸大学	英訳表記 Kobe University
研究科専攻名・部課名等 大学院工学研究科・応用化学専攻	英訳表記 Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering
役職名 准教授	英訳表記 Associate Professor

3.研究について

【緒言】

何十万という多種類の低分子化合物群（ライブラリー）から薬理活性のある化合物を探し出すスクリーニングがこれまでの創薬手法の中心であった。このようにして探し出した化合物は、ほとんどの場合単分子でその機能を発現し、単分子で薬として働いていた。しかしながら、ライブラリー設定およびスクリーニング手法に限界があり、新しい新薬候補が見つかりにくくなっている。我々は、先に単純なペプチド脂質分子が多数集まることでガン細胞を選択的に死滅できることを発見した¹⁾。これは従来の単分子で機能する薬と異なり、単分子では特段の機能を示さず、多数集合してゲル化することで、細胞を殺傷するというものである。そこで本研究ではこのゲル化という全く新しい原理に基づき、細胞内の pH 環境を認識して細胞選択的殺傷を目的とした。本研究で用いるペプチド脂質は、水素結合や静電相互作用などといった非共有結合によって分子が自己組織化し、ゲルを形成する低分子ゲル化剤である¹⁾。この低分子ゲル化剤は比較的分子量であるため、精密な分子設計が可能であり、分子構造を変えることで様々な機能性を付与させられるといった特徴がある²⁾。そこで今回は、一部のガン細胞や一部のウイルス感染細胞の細胞内 pH が正常細胞に比べて若干低いという報告を元に、ある特定の pH の溶液においてのみゲルを形成する pH 応答性ペプチド脂質を考案した。これにより、正常細胞には影響を及ぼさないが、一部の低 pH 細胞においては細胞内でゲルを形成し死滅させることを狙った。このガン死滅機構は、これまでの抗ガン剤と比較してその作用機序が大きく異なるために、これまでの抗ガン剤に対して耐性を有していたような細胞にも有効であると期待できる。

【実験方法】

ペプチド固相合成法によって種々のペプチド脂質の合成を行い、pH 応答性に優れるペプチド脂質を選択した。ゲル化剤の精製には高速液体クロマトグラフィーを用い、MALDI-TOF/MS、¹H-NMR によって合成物の同定を行った。このペプチド脂質の pH 応答性及び、ゲル化能を確認するため、様々な pH においてゲル化試験、臨界ミセル濃度（CMC）測定及び CD スペクトル測定を行った。またペプチド脂質のナノファイバー構造を透過型電子顕微鏡によって観察し、超分子構造体とゲル化の関係を調べた。次に、細胞毒性を検討するためにヒト由来ガン細胞(HeLa, MCF-7, A431, HepG2, GIST-T1)、正常細胞(MvE)や無限増殖細胞である HEK293 に対して MTT アッセイや LDH アッセイを行った。また、Live dead アッセイの結果から共焦点レーザー顕微鏡の結果から目視にて細胞の生死判定を行った。

【結果と考察】

アミノ酸配列の異なるペプチド脂質を計 20 種類合成した。ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を溶媒として用い、各 pH におけるゲル化試験を行った。その結果、グルタミン酸を含むヘキ

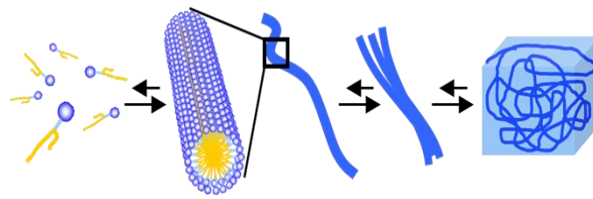


Fig. 1 Mechanism of gelation induced by a supramolecular gelator.

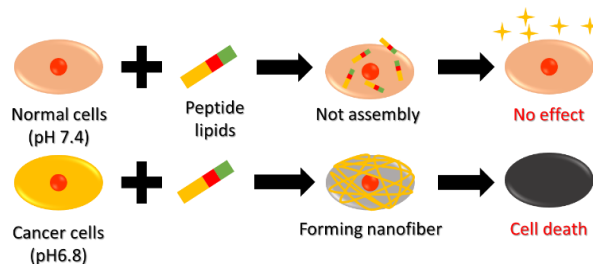


Fig. 2 Illustration of selective cancer cell-killing process.

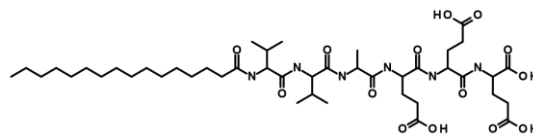


Fig. 2 Molecular structure of C₁₆-VVAEEE.

サペプチドから成るゲル化剤 (C₁₆-VVAE₅)は pH 6.8 付近を境にして CMC 及び溶液の粘性を大きく変化させることが明らかとなった。これは分子の疎水性相互作用や、水素結合によってゲルは形成されるが、グルタミン酸の側鎖及び末端のカルボキシ基が溶媒の pH のわずかな差によって可逆的に解離状態が変化し、pH が高くなるにつれて分子間に働く静電反発が大きくなり、ナノファイバーが形成されなくなるためと考えられる。実際に透過型電子顕微鏡の結果からも、pH の違いでナノファイバーの有無が変化することが明らかとなった。また CD スペクトルの結果から、pH が低くなるにつれピークがランダムコイル由来のものから β-シート由来のものに変化していることが明らかとなった。

次に、細胞毒性試験を行うことで、C₁₆-VVAE₅ が細胞に与える毒性について検討を行った。先ず初めに、イオノフォアを用いて細胞内の pH を任意の値に調整して生存率を測定することで、細胞内 pH と細胞毒性の相関関係について検討を行った。実験結果から細胞内 pH が低い時ほど細胞毒性は高くなると考えられる。更に、各種細胞に投与し細胞種毎の生存率を測定したところ HEK293 の生存率が最も低くなっていることが明らかとなった。

これらの細胞の細胞内 pH を市販の細胞内 pH 測定キットを用いて測定したところ、HEK293 の値が最も低いという結果になった (pH 6.8)。HEK293 は正常細胞でありながら、無限に増殖を繰り返す性質を持っており、増殖速度が速いことから、低酸素環境下になり細胞内 pH が低くなったと考えられる。これらの結果から、細胞内 pH の低い HEK293 に対して高い細胞毒性を示したことが明らかとなり、細胞内 pH と細胞毒性には相関関係があるということが示唆された。

次に、炭素鎖の末端に蛍光物質が結合したペプチド脂質 NBD-C₁₂-VVAE₅ の合成を行った。NBD-C₁₂-VVAE₅ と C₁₆-VVAE₅ を混合させて細胞に添加することで細胞によるペプチド脂質の取り込みが可視化できると考えた。共焦点レーザー顕微鏡の観察結果から、実際に細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。

以上より、細胞内 pH に応答して細胞毒性を示す世界初の自己組織化システムを開発した。現在この成果をもとに投稿論文作成中である。

【参考文献】

- 1) Tanaka *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 770-775.
- 2) Y. Nishida, A. Tanaka, S. Yamamoto *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 9410-9414.

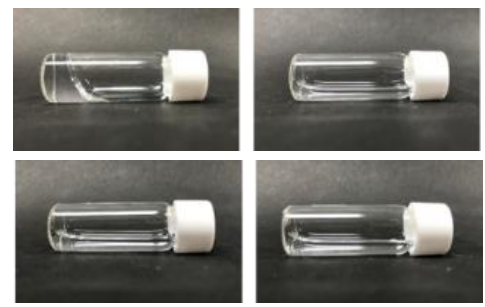


Fig. 3 Gelation tests of 0.15 wt% C₁₆-VVAE₅ (pH 6.8, 7.0, 7.2 & 7.4).

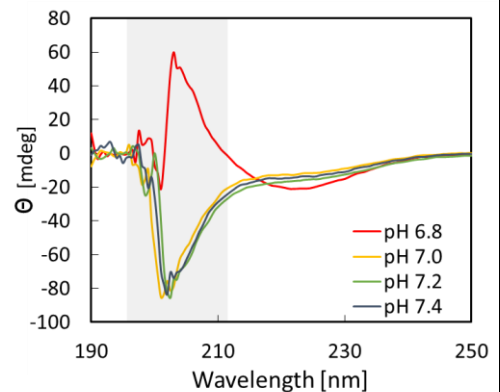


Fig. 4 CD spectra of C₁₆-VVAE₅ (0.15 wt% in PBS).

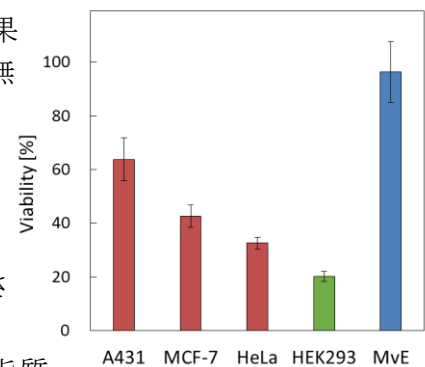


Fig. 5 Results of MTT assay (0.05 wt%, 24 h incubation).