

金属配位結合を利用した薬の高分子修飾

田畑 泰彦、高藤 義正、吉田 雅貴、城 潤一郎

Yasuhiko Tabata, Yoshimasa Takafuji, Masataka Yoshida, Jun-ichiro Jo

京都大学再生医科学研究所 生体材料学分野

1. 緒言

ドラッグデリバリーシステム (DDS) は、材料と組み合わせることで、薬の作用を最大限に発揮させる技術および方法論である。DDS 技術は、薬の持続的放出 (徐放化)、薬の体内での安定化および長寿命化、薬の吸収促進、および薬のターゲティングの 4 つに分類される¹。その中で、薬の体内での安定化および長寿命化技術では、水溶性高分子を用いて薬を修飾する。水溶性高分子により修飾された薬は、その見かけの分子量が高くなるため、体内投与後の尿中への排泄が抑制できる²。また、修飾した高分子鎖による立体障害により、体内での薬の酵素分解を回避できる。さらに、修飾した高分子鎖に結合した水分子により、薬はその姿を隠すことができ (ステルス性)、細網内皮系による除去を回避することができる³。がん組織の周辺血管は、ナノメートルレベルの血管内皮細胞間隙が生じており、かつリンパ系の欠如により排泄されないため、高分子量の物質が血中よりがん組織へ透過、滞留することが知られている (Enhanced permeability and retention: EPR 効果)^{4,5}。このように、水溶性高分子による薬の修飾は、薬を安定化、解剖学的特徴を利用してがん組織へ運ぶことが可能である。ポリエチレングリコール (PEG) は、デキストランやヒアルロン酸などと並び、薬の修飾に用いられる代表的な水溶性高分子であり、これまでに薬の PEG 修飾に関する多くの研究が報告されている^{6,7}。PEG はその末端にのみ反応性基を有するため、化学反応の制御が簡便であるという長所をもつ。

これまでの薬物の PEG 修飾は、そのほとんどが化学結合によって行われている⁸。しかしながらこの化学結合法には、いくつかの問題点がある。例えば、反応過程が煩雑で時間がかかるため、活性の半減期が短い放射性診断薬には不向きである。多くの化学反応は、部位非特異的であるため再現性に乏しく、また化学結合により、薬の活性が低下する可能性がある。一般に、化学結合により修飾した高分子は、薬から解離できないため、がん組織に薬を運ぶことができても修飾高分子によりその活性を発揮できない可能性がある。そこで、化学結合法に代わる、簡便な PEG 修飾技術の開発が望まれている。これまでにわれわれは、金属配位結合によりタンパク質^{9,10}や核酸物質¹¹を水溶性高分子で修飾できることを報告している。この金属配位結合は、タンパク質の精製過程に用いられていることから、金属配位結合を用いた薬の修飾は、簡便で、薬の失活の可能性は低いと考えられる。本研究では、キレート残基を導入した PEG を合成し、このキレート残基導入 PEG による金属配位結合を介した薬の修飾を試みた。

加えて、金属配位結合により PEG 修飾した薬のがん組織へのターゲティングについても評価した。

2. 実験

2-1. キレート残基導入 PEG の合成

Methoxy 基と carboxymethyl succinimidyl ester 基とを両末端にもつ PEG (MeO-PEG-NHS, 重量平均分子量: 5,000, 日油株式会社製) と N,N-bis-(carboxymethyl)-L-lysine (NTA, シグマ製) を脱水ジメチルスルホキシド中で反応させた。反応溶液を蒸留水に対して透析後、凍結乾燥することでキレート残基導入 PEG (MeO-PEG-NTA) を得た。

2-2. キレート残基導入 PEG への金属配位の評価

MeO-PEG-NTA (10 mg/ml) と種々の濃度の CuCl_2 とを水溶液中で 6 時間、混合することで、PEG 末端のキレート残基へ金属を配位させた。混合溶液を Sephadex G-25 (GE ヘルスケア バイオサイエンス株式会社製) によりゲルろ過した後、各分画中に含まれる PEG および銅イオンの量を、それぞれ高速液体クロマトグラフィー (HPLC、東ソー株式会社製) および紫外可視吸収光度計 (ベックマン・コールター株式会社製) を用いて測定した。MeO-PEG-NTA と銅イオンの両方を含むゲルろ過分画を金属配位 PEG とした。単位モル数の金属配位 PEG に含まれる銅イオンのモル数を配位金属数と定義した。種々の pH をもつ 2-Morpholinoethanesulfonic acid (MES) 緩衝液中で、MeO-PEG-NTA と CuCl_2 とを混合し、所定時間後にゲルろ過にて得られた金属配位 PEG 中の銅イオン濃度を原子吸光法にて測定した。混合直後の金属配位 PEG 中の金属イオン濃度に対する所定時間後の金属イオン濃度の割合を安定性と定義した。

2-3. 金属配位結合による PEG-タンパク質複合体の形成と評価

種々の濃度の金属配位 PEG と apo-transferrin (Tf, 分子量: 80,000, 30 mg/ml, シグマ製) とをリン酸緩衝水溶液 (0.02M, pH7.4, NaCl 0.15M 含有) 中で混合、室温で 15 分間、静置することで、金属配位結合による PEG と Tf との複合体を形成させた。この混合溶液を Sephadex G-100 を用いたゲルろ過を行い、Tf と PEG との両方が含まれるゲルろ過分画を金属配位 PEG-Tf 複合体として回収した。金属配位 PEG-Tf 複合体中に含まれる Tf のモル数に対する PEG のモル数を結合 PEG 数と定義し、結合 PEG 数に与える PEG 仕込み量の影響を評価した。

2-4. 金属配位 PEG-Tf 複合体のがん組織ターゲティング能の評価

BALB/c マウス (メス, 6 週令) の背部皮下に 2×10^6 個の Meth-A 線維肉腫細胞を播種した。1 週間後、皮下にがん細胞塊 (1 cm 直径) をもつ担がんマウス

を得た。放射性同位元素 (^{125}I) あるいは蛍光色素 (Cy5.5) でラベル化した Tf (50 μg) を用いて金属配位 PEG-Tf 複合体を作製、担がんマウスの静脈内に投与した。所定時間後、血液およびがん細胞塊の放射活性の測定 (アロカ株式会社製)、あるいは蛍光イメージング (Night OWL LB-981 装置, ベルトールド株式会社製) を行い、金属配位 PEG-Tf 複合体のがんへの集積能および血中安定性を評価した。蛍光イメージングでは、がん組織面積あたりの蛍光強度をがん集積量とした。

3. 結果と考察

3-1. MeO-PEG-NTA の合成評価

図 1 は、NTA、MeO-PEG-NHS、および MeO-PEG-NTA の ^1H NMR スペクトルである。合成により得られた PEG は、NTA および PEG 末端の Methoxy 基由来のピーク ($\delta = 1.14\text{--}2.14$ (a) および 3.38 (b)) が存在しており、MeO-PEG-NTA であると同定できた。また、それらのピーク面積より、反応収率が 82.5% であることがわかった。

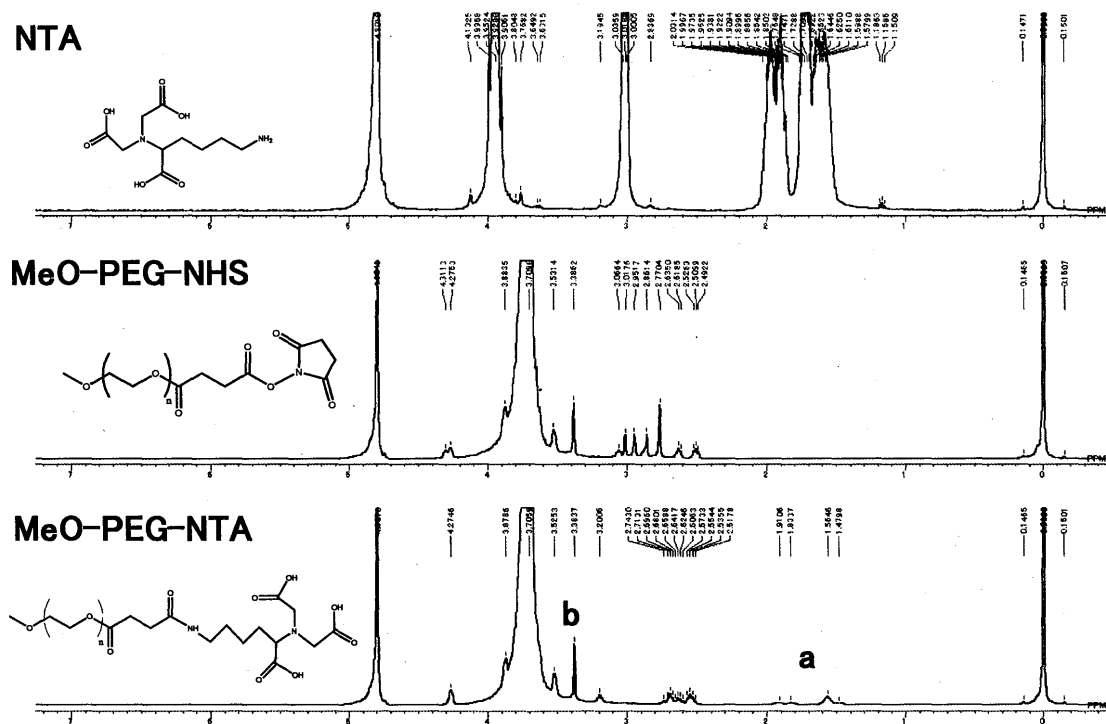


図 1. NTA, MeO-PEG-NHS, および MeO-PEG-NTA の ^1H NMR スペクトル。

3-2. MeO-PEG-NTA への金属配位の評価

図 2A は、MeO-PEG-NTA と CuCl_2 との混合溶液に対するゲルろ過プロファイルである。高分子量分画に MeO-PEG-NTA と銅イオンとが存在していたことから、銅イオンが MeO-PEG-NTA に配位していることがわかった。図 2B に、銅イオンの仕込み量に対する金属配位 PEG の配位金属数を示す。配位金属数は、仕込み

量が高くなるにつれて増加し、その後一定となった。この結果により、1分子の MeO-PEG-NTA に対して 1 分子の銅イオンが配位していることがわかった。以後の実験では、MeO-PEG-NTA に対して 10 倍モル量の CuCl_2 を混合、ゲルろ過精製した金属配位 PEG を用いた。

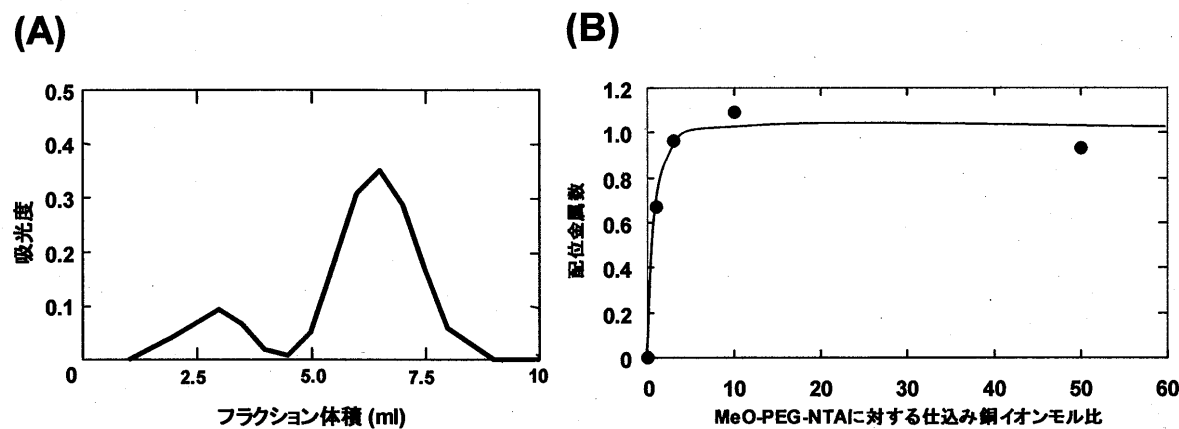


図 2. (A) MeO-PEG-NTA と CuCl_2 との混合溶液のゲルろ過プロファイル。各分画中の銅イオン濃度を紫外可視光吸光度計にて測定した。(B) 銅イオンの仕込み量に対する金属配位 PEG の配位金属数。

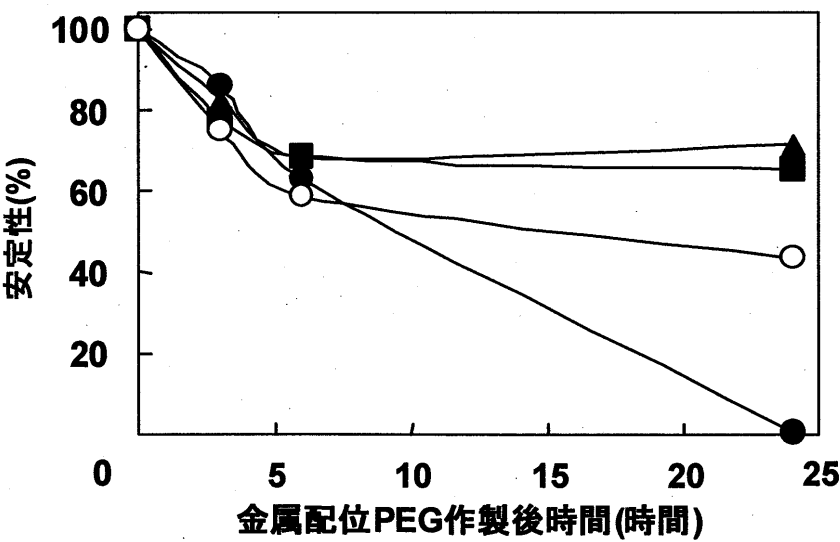


図 3. MeO-PEG-NTA への銅配位の pH 安定性。MeO-PEG-NTA と銅イオンとを異なる MES 緩衝液(pH 3.5 (●), 5.0 (▲), 6.8(■), 8.8(○))中で混合した。

図 3 は、MeO-PEG-NTA への銅配位の pH 安定性の結果である。酸性およびアルカリ性の条件では時間経過とともに安定性が減少、配位結合が解離しているものと考えられた。一方、中性付近では銅イオンは長時間安定に

MeO-PEG-NTA へ配位することがわかった。一般に、がんあるいは炎症組織の pH は、一般組織の pH よりも低いことが知られている¹²。したがって、金属配位 PEG はがん組織周辺で解離、その場で薬の効果を発揮することができると考えられる。

3-2. 金属配位 PEG とタンパク質との結合

図 4 は、金属配位 PEG、Tf、およびそれらの複合体のゲルろ過プロファイルである。Tf と金属配位 PEG との混合溶液に対するゲルろ過の高分子量分画に、Tf と金属配位 PEG とが同時に含まれていたことから、金属配位 PEG と Tf とが配位結合により複合体化していると考えられた。また、Tf に対する仕込み PEG モル比の増加とともに、結合 PEG 本数が増加することがわかった(図 4D)。

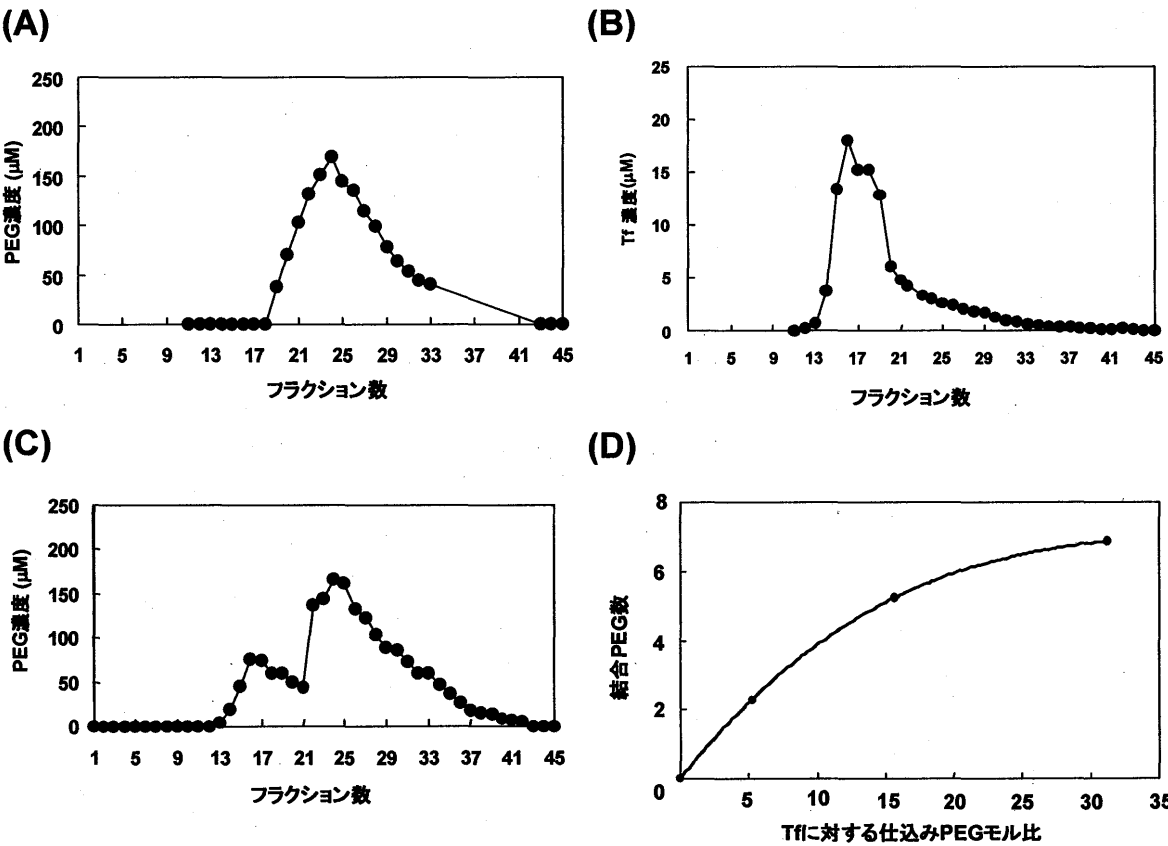


図 4. 金属配位 PEG (A)、Tf (B)、およびそれらの複合体(C)のゲルろ過プロファイル。(D) 結合 PEG 数に与える Tf に対する仕込み PEG モル比の影響。

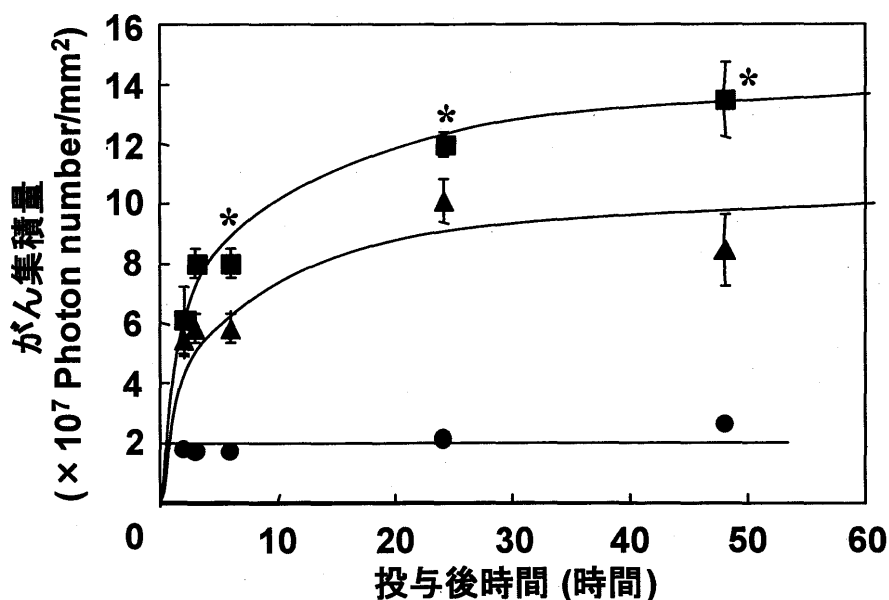


図 5. 蛍光イメージングを用いたがん集積量の計時変化。担がんマウスの尾静脈より生理食塩水(●)、Tf (▲)、および金属配位 PEG-Tf 複合体(■)を投与した。
*, $p < 0.05$; 他の群に対して有意差あり。

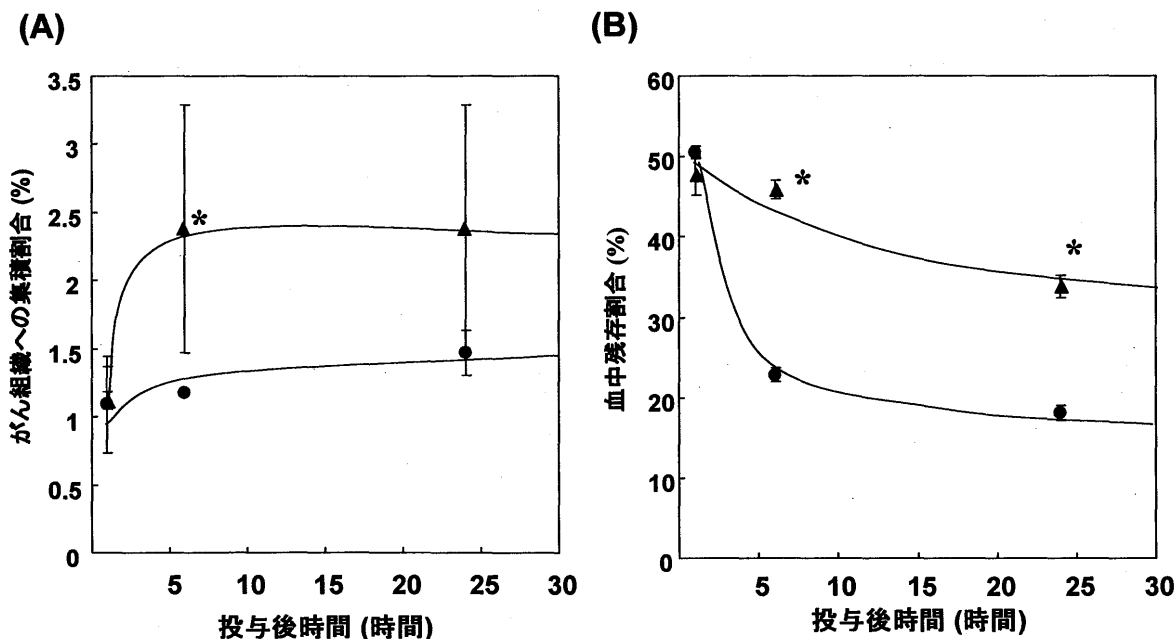


図 6. 放射性同位体を用いたがん組織への集積(A)および血中残存割合(B)の計時変化。担がんマウスの尾静脈より Tf (●)および金属配位 PEG-Tf 複合体 (■)を投与した。
*, $p < 0.05$; Tf 群に対して有意差あり。

3-3. 金属配位 PEG-Tf 複合体のがん組織ターゲティング能

図 5 に、蛍光イメージングを用いた場合の生理食塩水、Tf、および金属配位 PEG-Tf 複合体のがん集積量の経時変化を示す。金属配位 PEG-Tf 複合体は、生理食塩水および Tf 単独投与に比較して、有意に高くがんを集積、滞留することがわかった。図 6 は、放射性同位体を用いた場合の Tf および金属配位 PEG-Tf 複合体のがん組織への集積および血中残存割合の経時変化である。金属配位 PEG-Tf 複合体は、Tf 単独投与に比較して、がん組織へ集積および血中に残存していることがわかった。これらの結果は、銅イオンによる金属配位 PEG 修飾が十分に強力であり、金属配位 PEG が中性の血液中でも解離することなく(図 3)、Tf の血中寿命が延長され、そのがん組織へのターゲティング能が増大したためであると考えられる。

4. おわりに

本研究では、キレート残基を導入した PEG を合成した。PEG 末端に導入されたキレート残基は、期待通り、金属を配位する能力をもっていた。それらの金属配位 PEG は、水中での単純な混合によりタンパク質に結合し、タンパク質の PEG 修飾が可能となった。金属配位 PEG 修飾はタンパク質の体内動態を変化させ、がんへの集積性を増強させることもわかった。本稿では、モデルタンパク質として Apo-transferrin を用いたが、薬として、タンパク質だけでなく、small interfering RNA や DNA アプタマーなどの核酸物質に対しても同様の PEG 修飾を行い、RNA 分解酵素からの回避および体内動態の変化が可能であることがわかってきている。さらに、この技術は PEG だけではなく、他の水溶性高分子にも適用可能である。金属配位結合を利用した薬の PEG 修飾法は、DDS の有効な技術となると考えられる。

参考文献

- 1 田畑泰彦編. ドラッグデリバリーシステムDDS技術の新たな展開とその活用法. メディカル ドゥ, 2003.
- 2 稲田祐二編. タンパク質ハイブリッド～ここまできた化学修飾. 共立出版: 東京, 1987.
- 3 稲田祐二、前田浩編. 続タンパク質ハイブリッド～これからの化学修飾. 共立出版: 東京, 1988.
- 4 Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986; 46: 6387-6392.
- 5 Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 1987; 47: 3039-3051.
- 6 Torchilin VP, Omelyanenko VG, Papisov MI, Bogdanov AA, Jr., Trubetskoy VS, Herron JN et al. Poly(ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1195: 11-20.
- 7 Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 347-360.
- 8 Elvira C, Gallardo A, Roman JS, Cifuentes A. Covalent polymer-drug conjugates. *Molecules* 2005; 10: 114-125.
- 9 Yasukawa T, Kimura H, Tabata Y, Kamizuru H, Miyamoto H, Honda Y et al. Targeting of interferon to choroidal neovascularization by use of dextran and metal coordination. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 842-848.
- 10 Suginoshita Y, Tabata Y, Matsumura T, Toda Y, Nabeshima M, Moriyasu F et al. Liver targeting of human interferon-beta with pullulan based on metal coordination. *J Control Release* 2002; 83: 75-88.
- 11 Hosseinkhani H, Aoyama T, Ogawa O, Tabata Y. Tumor targeting of gene expression through metal-coordinated conjugation with dextran. *J Control Release* 2003; 88: 297-312.
- 12 Becelli R, Renzi G, Morello R, Altieri F. Intracellular and extracellular tumor pH measurement in a series of patients with oral cancer. *J Craniofac Surg* 2007; 18: 1051-1054.