

温熱療法による癌治療を目指した磁性ナノ粒子と酵素阻害剤複合体の合成研究

岸根 葵葉^{1, #}, 本西 和花^{2, #}, 大久保 仁美³, 大石 宏文³, 小林 祐輔³, 竹本 佳司^{3*}

¹ 京都市立堀川高等学校, ² 洛南高等学校, ³ 京都大学大学院薬学研究科

要旨

我々は、手術や薬物療法に比べ QOL に優れた癌治療として知られる温熱療法に着目した。磁気照射により患部を加温する温熱療法は手軽で副作用の軽減が期待できるが、腫瘍組織選択的に加温する技術が開発されていないため普及が滞っている。そこで、腫瘍細胞特異的に集積し、かつ磁気照射により発熱する分子標的型磁性体分子として、磁気により発熱する磁性体ナノ粒子と癌細胞に多く存在する酵素（例えばスベルミジン/スベルミン N¹ アセチル転移酵素：SSAT）と親和性の高い化合物（例えばノルスベルミン誘導体）を共有結合させた複合体を設計した。本研究では、ノルスベルミン誘導体と鉄ナノ粒子を繋ぐ連結部 [ポリエチレングリコール (PEG) 構造: (OCH₂CH₂)_n] が SSAT 酵素との親和性に与える影響を調べるため、n = 4, 6 の PEG 連結部を持つ複合体モデルを 2 種合成し、Biacore を用いて SSAT との親和性を評価した。その結果、両化合物共に数 μM の親和性で SSAT と結合し、連結部の長さがより短い複合体 (n = 4) の方が若干ながら強く酵素と結合することが示唆された。また、今回合成した複合体と BSA (牛血清アルブミン) との間では殆ど相互作用が見られなかったことから、この複合体はある程度の分子識別能を有しており、SSAT 特異的に結合する可能性があることを確認した。

重要語句：癌治療、温熱療法、スベルミジン/スベルミン N¹ アセチル転移酵素、SSAT 阻害剤 - ビオチン結合体、ピアコア

序論

プトレスシン (PUT)・スベルミジン (SPD)・スベルミン (SPM) は、生物界に広く存在する生体ポリアミンであり⁽¹⁾、核酸との相互作用により核酸・タンパク質合成を促進し、細胞増殖因子として機能する⁽²⁾。正常細胞では各ポリアミン濃度比は相互代謝酵素により厳密に制御されており、一定量以上蓄積するとアポトーシスを起こす⁽³⁾。腫瘍細胞ではポリアミンの合成は特に亢進しているが⁽⁴⁾、SSAT をはじめとするポリアミン代謝酵素⁽⁵⁾ も過剰産生しているため、アポトーシスが起こりにくいと考えられている⁽⁶⁾。また、癌温熱療法⁽⁷⁾ は、腫瘍組織が正常組織に比べて熱に極めて弱い⁽⁸⁾ という性質に基づき古くから行われてきた治療法であるが、腫瘍組織だけを加温する技術が未だ確立されていないため、現在は手術・薬物療法等の併用療法が主に使用されている。今回、磁性体ナノ粒子・酵素阻害剤複合体 A として、入手容易な鉄ナノ粒子に既知の SSAT 阻害剤^(9,10) であるダンシルノルスベルミン (SSAT に対するミカエリス定数 K_m (μM) は以下の通りである。スベルミジン：K_m = 26, ダンシルノルスベルミン：K_m = 10) を PEG 鎖で連結させた化合物の合成を計画した (図 1)。SSAT 酵素阻害剤の分子構造を複合

体に組み込む分子設計により、鉄ナノ粒子を腫瘍細胞特異的に送達し、外部より交流磁場を当てることでナノ粒子を活性化し癌組織だけを特異的に加温⁽¹¹⁾ することを目指して研究に着手した。SSAT は細胞内に存在するため⁽¹²⁾ 磁性体ナノ粒子・酵素阻害剤複合体の (i) 生体内での安定性と (ii) 癌細胞内への取込効率が問題となる。正常細胞に比べて細胞膜が粗いが癌細胞は、分子サイズが 20 ~ 100 nm の分子を効率よく取り込むことが知られている (EPR 効果⁽¹³⁾)。よって金属磁性体ナノ粒子の分子サイズを調整することで確実に癌細胞内へ送達できると考えている。また、この複合体は温熱療法という面だけでなく、SSAT 酵素と強く結合することで腫瘍細胞のアポトーシスを促す⁽¹⁴⁾ 化学療法の面を持つこと、さらに熱ショックタンパク質 (HSP) が生成される点で免疫治療⁽¹⁵⁾ の面もあり、これら 3 つの相乗効果が期待される。

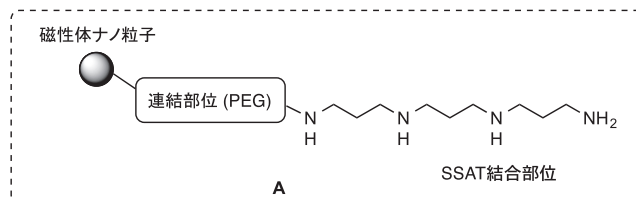


図 1. 鉄ナノ粒子・SSAT 酵素阻害剤複合体 A

目的

本研究では、最終目標である鉄ナノ粒子 - SSAT 阻害剤複合体の合成・評価を行う前段階の重要な検討事項として、以下の 2 点を設定した。

(1) 鉄ナノ粒子と酵素阻害剤を連結する PEG 部位の長さが SSAT との親和性に与える影響および最適な連結部位の長さについて

(2) 設計した複合体と SSAT との特異的結合性について

また、これらの評価を行うことによって、設計した複合体へのフィードバックが可能であると考えた。

方法

(1) SSAT との相互作用解析には Biacore⁽¹⁶⁾ を用いて行うこととした。Biacore は、表面プラズモン共鳴 (SPR)⁽¹⁷⁾ の光学現象を利用して、分子間の相互作用を解明するシステムであり、センサーチップにリガンド (または酵素) を固定し、アナライトとして酵素 (またはリガンド) を流した際のレスポンス (RU 値) や得られる K_D 値 (解離定数) から相互作用を評価することができる。K_D 値は、解離速度定数 (k_d) を結合速度定数 (k_a) で割った値であり、値が小さいほど SSAT と強い相互作用があると判断できる。K_D 値が得られる別の分析手法として、ITC

岸根葵葉と本西和花は貢献度の等しい筆頭著者である。

* 内容に関する連絡先: takemoto@pharm.kyoto-u.ac.jp

(Isothermal Titration Calorimetry)⁽¹⁸⁾ が知られているが、酵素やリガンドをより少ない使用量で測定が可能である Biacore を採用した。また SSAT の方が分子量が大きいことと構造上の特徴から、合成した複合体をセンサーチップに結合させ、アナライトとして SSAT を流すことにした。センサーチップへの複合体の固定化はストレプトアビジン (SA) を利用することにした。そこで、複合体 A の鉄ナノ粒子部位をビオチンに置き換えたモデル化合物 (図 2) の合成を計画した。また、モデル化合物の PEG の長さについては、 $n=4$ (化合物 1) と $n=6$ (化合物 2) の 2 種類を選択した。

(2) 設計した複合体はポリアミン部位を有しており、生体内に存在する多様な酵素と非特異的に相互作用することが懸念される。そのため、比較実験として SSAT の代わりに牛血清アルブミン (BSA) をアナライトとして流し、酵素特異性の評価を行うこととした。

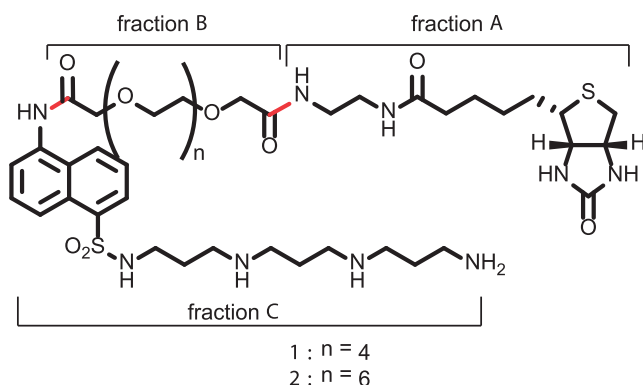


図 2. Biacore 測定用のモデル化合物 1, 2

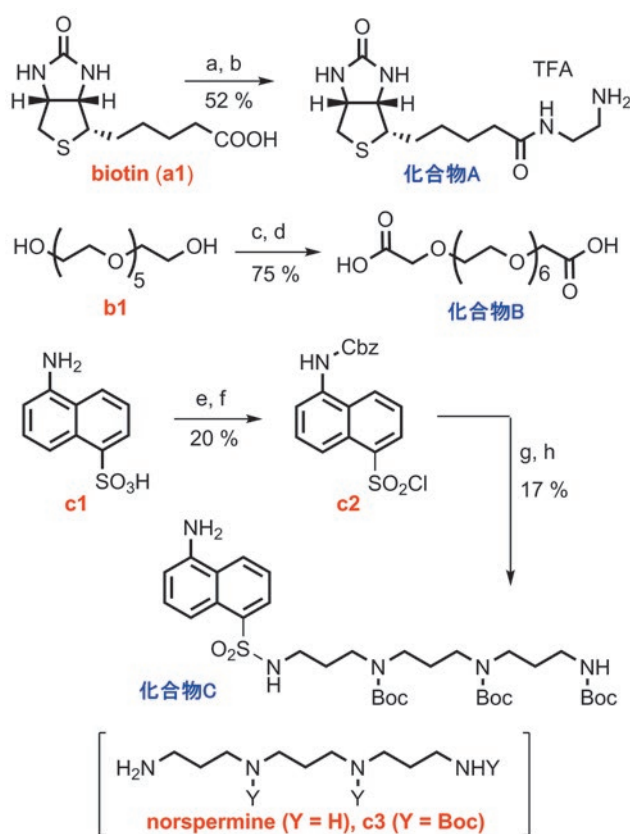
結果

モデル化合物の合成について

化合物 1, 2 について、図 2 に示す通り 2 箇所て切断し、fraction A, fraction B, fraction C とした。それぞれの部位について、化合物 A, B, C を合成し、各々を結合することで化合物 1, 2 を合成した (図 3)。すなわち、化合物 A は市販のビオチン (a1) を出発原料として用い、DMF 中で *N*-Boc-ethylenediamine と縮合条件で処理してアミド結合を作った後、Boc 基を脱保護して合成した。化合物 B は、化合物 b1 を塩基性条件下、プロモ酢酸 *t*-ブチルと DMF 中で処理してアルキル化し、*t*-Bu エステルを酸性条件下脱保護して合成した。化合物 C は、化合物 c1 のアミノ基を Cbz 化した後、スルホン酸部位をスルホン酸クロリドに置換した化合物 c2 へと誘導した⁽¹⁹⁾。その後、市販のノルスペルミンから別途合成した化合物 c3⁽²⁰⁾ と縮合させ、最後に Cbz 基を脱保護して化合物 C を合成した。これら化合物 A, B, C を順次連結し、最後に c3 由来の 3 つの Boc 基を脱保護して化合物 2 ($n=6$) とした。同様の手法で、化合物 1 ($n=4$) も合成することができた。

Biacore の測定結果について

化合物 1 ($n=4$) および化合物 2 ($n=6$) の Biacore を用いた測定結果をそれぞれ図 4, 図 5 に示す。化合物 1 ($n=4$)、化合物 2 ($n=6$) とともによいレスポンスを示すことがわかる。



Reagents: a) EDCI, HOBT, Et₃N, H₂NCH₂CH₂NHBoc, DMF, rt; b) TFA, DCM, rt; c) NaH, BrCH₂CO₂*t*-Bu, DMF, rt; d) TFA, DCM, rt; e) CbzCl, NaOH_{aq}, 0 °C; f) SOCl₂, DMF, rt; g) c3, Et₃N, CH₂Cl₂, rt; h) Pd(OAc)₂, Et₃SiH, Et₃N, CH₂Cl₂, rt

図 3. モデル化合物の合成

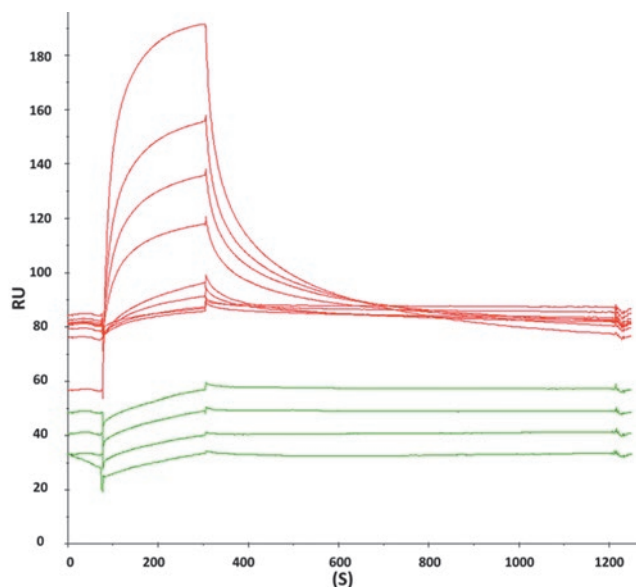


図 4. 化合物 1 ($n=4$) のセンサーグラム、縦軸：Response (RU)、横軸：時間 (秒)、濃度上から 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 (nM)。

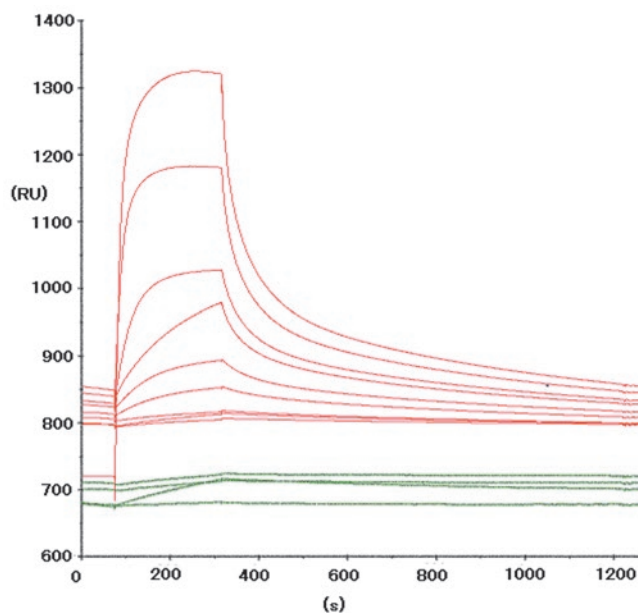


図 5. 化合物 2 ($n = 6$) のセンサーグラム, 縦軸: Response (RU), 横軸: 時間 (秒), 濃度上から 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 (nM).

合成した化合物と BSA との相互作用について

BSA (牛血清アルブミン) は, 多数の結合部位を有するため非特異的に低分子化合物と相互作用することが知られており, 比較実験として一般的に用いられるタンパク質である.

化合物 2 ($n = 6$) を固定化したセンサーチップに BSA をアナライトとして流した際の測定結果を図 6 に示す.

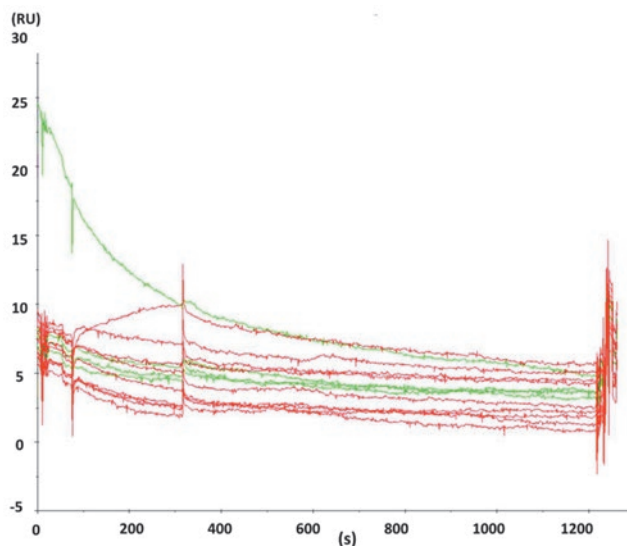


図 6. BSA を使用した際のセンサーグラム, 縦軸: Response (RU), 横軸: 時間 (秒), 濃度上から 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 (nM).

特異的な結合が存在する場合は, 図 4, 5 のように特徴的な台形型のセンサーグラムが得られるのに対し, BSA を用いた場合は異なるセンサーグラムが得られた (図 6). これらの結果より, BSA と化合物 2 ($n = 6$) は特異的な相互作用をしていない可能性が高いと考えられる. 一部, RU 値が上昇している部分が観測されるが, これはセンサーチップ表面に BSA が乗った影響だと考えられる.

考察と結論

上記の実験で得られた結果を用いて, (1) 合成した化合物 1, 2 の連結部 (PEG) の長さが酵素親和性に与える影響と, (2) SSAT 酵素以外の異なる酵素との親和性を比較することでその特異的結合性についても評価した.

1) PEG 鎖長 (n) の SSAT 親和性への影響

ビオチン - 酵素阻害剤複合体 1, 2 を用いて得られたセンサーグラム (図 4, 5) はアナライトの添加に伴い急激なレスポンス変化を示したため, カイネティクス解析による反応速度定数の導出はできなかった. そこで, 添加したアナライト濃度を横軸に, レスポンス (RU) を縦軸に取って用量反応曲線による解析を行った. その結果, レスポンスはアナライト濃度依存的に増加し, さらに高い濃度では傾きが減少する様子が認められ, 典型的な双曲線型結合曲線となると考えられた (図 7, 図 9).

化合物 1 ($n = 4$) について

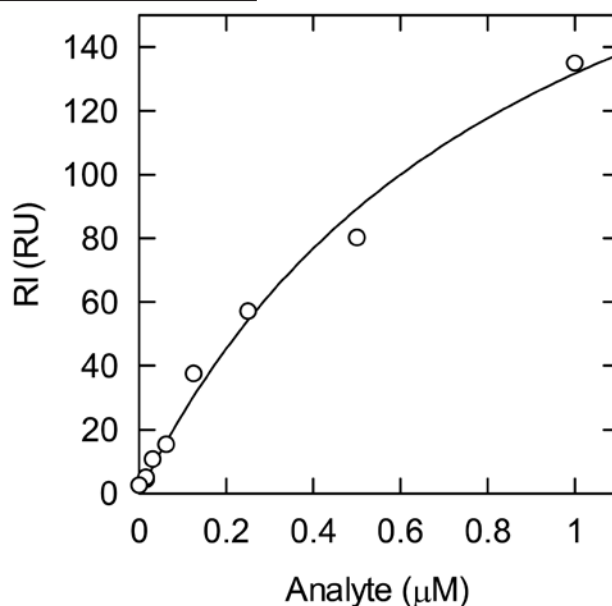


図 7. 化合物 1 の用量反応曲線

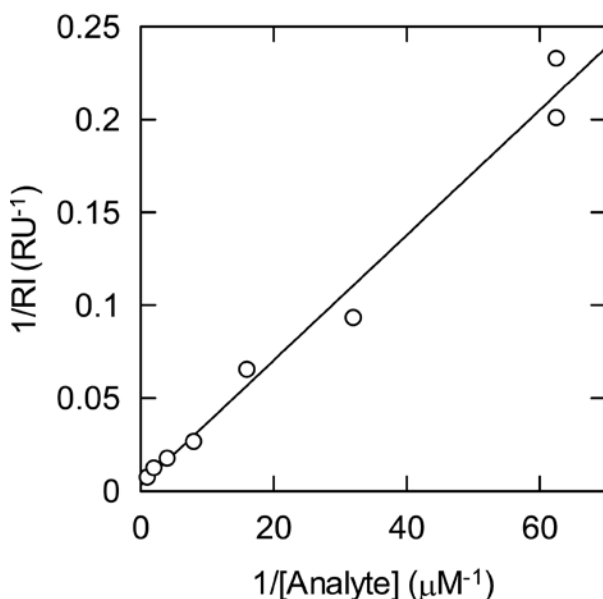


図 8. 化合物 1 とレスポンス値の両逆数プロット

最も単純な 2 分子結合モデルを表す式 1 を用いて解離定数を求めた。

$$R = R_{\max} \times A / (K_D + A) \quad (\text{式 1})$$

ここで、A はアナライト濃度、R はレスポンス値、 K_D は解離定数、 $R_{\max}$ は最大レスポンス値を示す。この式を用いて、反復非線形回帰により計算した結果、 $K_D = 0.90$ (μM)、 $R_{\max} = 251$ (RU) と求めることができた。また、化合物 1 については、Biacore 測定で有効なサンプル数が 1 であったため、異なる近似方法による解離定数の導出も検討した。すなわち、式 2 の逆数を取ると、

$$1/R = (K_D/R_{\max}) \times 1/A + 1/R_{\max} \quad (\text{式 2})$$

となり、アナライト濃度の逆数とレスポンスの逆数は直線関係が成り立つ。図 8 に示すように、横軸をアナライト濃度の逆数、縦軸をレスポンスの逆数としてプロットし、式 2 を用いて線形近似を行ったところ、グラフの傾き $K_D/R_{\max} = 0.00337$ 、切片 $1/R_{\max} = 0.00295$ より、 $K_D = 1.14$ (μM)、 $R_{\max} = 339$ (RU) と求められ、式 1 で求めた値と近い値が得られた。

化合物 2 ($n = 6$) について

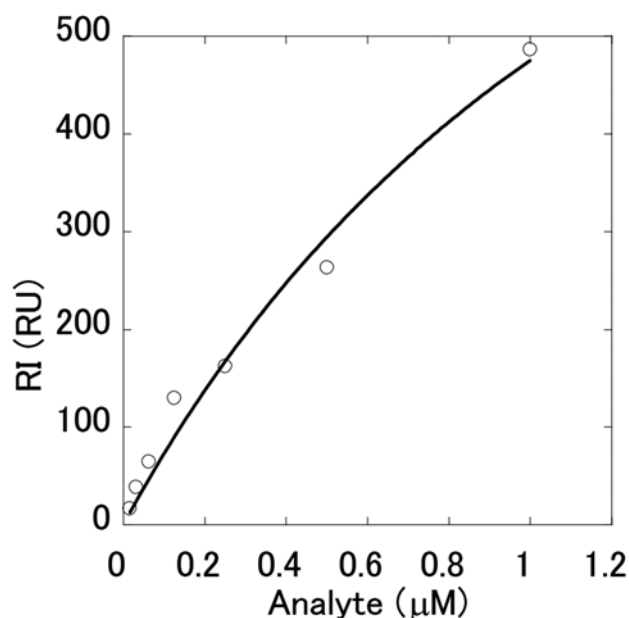


図 9. 化合物 2 の用量反応曲線

化合物 1 と同様に式 1 を用いて反復非線形回帰により計算した結果、 $K_D = 1.99$ (μM)、 $R_{\max} = 1770$ (RU) と求めることができた。化合物 2 については、Biacore 測定において複数のサンプルで同様の結果が得られた。

以上の解析によって導き出された K_D 値の比較から、僅かではあるが化合物 1 ($n = 4$) の方が SSAT との酵素親和性が高いことが判明した。しかしながら、今回測定した $n = 4, 6$ 以外の $n = 2, 8, 10$ や更に長い $n = 20$ については測定を行っていないことから、 $n = 4$ との優劣が不明なため今後の課題である。また、ノルスペルミン構造を分子内に装着しているため、毒性の有無の検証も必要と思われる。

2) ビオチン-酵素阻害剤複合体の SSAT との特異的結合形成

今回合成した分子と酵素 SSAT が特異的に結合しているか否かについては、牛の血中に存在する代表的な酵素である BSA と複合体との間にほとんど相互作用が見られなかったことから (図 6)、設計分子は SSAT と特異的に結合する可能性がある

結論づけた。

謝辞

本研究を進めるにあたって、多くのご支援をいただきました。特に、京都大学大学院薬学研究科薬品分子化学分野の研究室の皆様、未熟な私たちに丁寧かつ親切なご指導をありがとうございました。また、ELCAS という貴重な機会を用意してくださった ELCAS 事務局の皆様、ありがとうございました。

Biacore の測定においてご助言・ご指導いただいたケモゲノミクス分野の大石先生に感謝致します。また、Biacore の解析においてご指導いただいた構造生物薬学分野の山口先生に深謝致します。

参考文献

1. Bachrach, U. Function of Naturally Occurring Polyamines. Academic Press, New York. (1973).
2. Baron, K. & C. Stasolla. The role of polyamines during in vivo and in vitro development. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 44: 384–395. (2008).
3. Melino, G. & D. Vaux. Cell Death. Wiley-Blackwell, West Sussex. (2010).
4. Huang, Y., A. Pledgie, R. A. Casero Jr. & N. E. L. Davidson. Molecular mechanisms of polyamine analogs in cancer cells. Anti-Cancer Drugs. 16: 229–241. (2005).
5. Chen, Y., S. Vujcic, P. Liang, P. Diegelman, D. L. Kramer & C. W. Porter. Genomic identification and biochemical characterization of a second spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase. Biochemical J. 373: 661–667. (2003).
6. Pegg, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. IUBMB Life. 61: 880–894. (2009).
7. 井藤 彰, 小林 猛, 本多 裕之. 磁性ナノ粒子を用いた温熱療法の開発, 細胞. 38: 557–562. (2006).
8. Epperla, C. P., O. Y. Chen & H.-C. Chang. Gold/diamond nanohybrids may reveal how hyperlocalized hyperthermia kills cancer cells. Nanomedicine. 11: 443–445. (2016).
9. Takao, K., S. Miyatake, K. Fukazawa, K. Wada, Y. Sugita & A. Shirahata. Measurement of spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with N^1 -dansyl norspermine as the substrate. Analytical Biochemistry. 376: 277–279. (2008).
10. Ragione, F. D. & A. E. Pegg. Studies of the specificity and kinetics of rat liver spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase. Biochemical J. 213: 701–706. (1983).
11. Nanoparticles. New electrically-conductive polymer nanoparticles can generate heat to kill colorectal cancer cells. Obesity, Fitness & Wellness Week News. 906. (2012).
12. Huang, W., J. C. Eickhoff, F. Mehraein-Ghomi, D. R. Church, G. Wilding & H. S. Basu. Expression of spermidine/spermine N^1 -acetyl transferase (SSAT) in human prostate tissues is related to prostate cancer progression and metastasis. The Prostate. 75: 1150–1159. (2015).
13. Maeda, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. Bioconjugate Chemistry. 21: 797–802. (2010).
14. McCann, P. P., A. A. Pegg & A. Sjoerdsma. Inhibition of

- Polyamine Metabolism: Biological Significance and Basis for New Therapies. Academic Press, Orlando. (1987).
15. Ito, A., H. Honda & T. Kobayashi. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 55: 320–328. (2006).
 16. GE Healthcare Biacore™ T200
 17. Mizutani, Y. & T. Iwata. Thin film thickness measurement by surface Plasmon resonance using a modified Otto's configuration combined with ellipsometry. *International J. Automation Technology*. 5: 236–240. (2011).
 18. Lewis, E. A. & K. P. Murphy. Isothermal Titration Calorimetry. *Methods in Molecular Biology*. 305: 1–15. (2005).
 19. Nedospasov, A. A. & I. G. Sharina. The synthesis of *N*(*S*)-alkoxyethyl-substituted aminonaphthalenesulfonamides by opening of an aziridine ring. *Synlett*. 661–662. (1992).
 20. Dinesh, N. V. S., K. Bhupathiraju, M. Graça & H. Vicente. Synthesis and cellular studies of polyamine conjugates of a mercaptomethyl-carboranylporphyrin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 21: 485–495. (2013).

using Biacore. We found that the designed model norspermine derivatives ($n = 4$ and 6) showed similar affinity to SSAT. By contrast, the synthesized model compounds showed almost no interaction with bovine serum albumin. These results suggest that the magnetic nanoparticle conjugates we have designed will form specific interactions with SSAT.

Key words: Cancer therapy, Hyperthermia, Spermidine/spermine acetyltransferase, SSAT inhibitor-biotin conjugate, Biacore

Synthetic Studies of Spermidine/Spermine Acetyltransferase (SSAT) Inhibitors Conjugated with Magnetic Nanoparticles in Hyperthermia-assisted Cancer Chemotherapy

AOI KISHINE^{1, #}, NODOKA MOTONISHI^{2, #}, HITOMI OHKUBO³, HIROFUMI OHISHI³, YUSUKE KOBAYASHI³ & YOSHII TAKEMOTO^{3*}

¹ Kyoto Municipal Horikawa Senior High School, ² Rakunan High School, ³ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

Abstract

We focused on thermotherapy, which is considered a superior cancer treatment with good QOL rather than surgical operation and chemotherapy using anticancer drugs. Thermotherapy is inexpensive and expected to reduce adverse side effects, since the treatment involves warming up the tumor tissue by utilizing heat generated from magnetite subject to magnetic irradiation. However, thermotherapy is not popular because tumor-selective heating is difficult using the present methodology. Therefore, we designed tumor-targeted magnetic molecules comprising magnetic iron nanoparticles and norspermine derivatives, because such polyamine derivatives exhibit high affinity for the enzyme SSAT, which is particularly highly expressed in tumor tissues. In this work, we synthesized two model norspermine derivatives bearing tethers with different lengths (polyethylene glycol (PEG), $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$, $n = 4$ and 6), and estimated their affinities for SSAT

#A. Kishine and N. Motonishi have contributed equally as first authors.

*Correspondence Researcher: takemoto@pharm.kyoto-u.ac.jp