X線照射下で駆動する生体関連材料を設計する

青山学院大学理工学部化学・生命科学科*

田邊一仁*

Molecular Design of Caged Biomaterials Activated by X-Irradiation

High-energy ionizing radiation is among the potential external triggers for precise control of the function and drug efficacy in living organisms, because the radiation reaction for activation of biomaterials can be regulated spatially and temporally without any additives. Herein, we demonstrated a radiation-activated prodrugs, the activities of which can be blocked by chemical modification, while their intrinsic activities are recovered by X-irradiation. Our studies illustrated that azidomethyl, indolequinone and disulfide groups have favorable functionalities for caging molecules and materials. We applied the prodrug strategy to antitumor agents, nucleic acid medicine and drug-encapsulating nanocarriers.

筆者らは、薬剤の副作用の軽減を目標に、X線活性化型のプロドラッグの開発を進めてきた。このプロドラッグとは、化合物そのものは毒性を示さないが、X線照射によって構造が活性な薬剤へと変わり、効果を発現するスマートな薬剤である。薬剤をプロドラッグ化することによってX線照射した病変部でのみ抗がん活性を発現できることから、薬剤が抱える副作用の問題を解決できると考えた。筆者らはアジドメチル基、インドールキノン基、ジスルフィド結合等のX線還元反応を受けて結合開裂を生じる官能基を見出し、各種プロドラッグを設計してきた。本稿では、筆者らが進めてきた低分子抗がん剤、核酸医薬品、および薬剤運搬システムのX線照射による活性制御について、分子設計の視点から解説する。

Kazuhito Tanabe*

Keywords: Prodrug, Ionizing radiation, Hydrated electrons, Antitumor agents

1. はじめに

「放射線を生体材料に応用してみたい」そんな好奇心から、研究を始めた。

光化学と核酸化学の研究室で学生時代を過ごした筆者は、「照射実験」というキーワードから放射線に親近感を持っており、光照射でできることを放射線照射でも実現できれば、機能性材料の用途をさらに広げ得ると考えていた。以来13年、失敗を重ねながら、新たな挑戦を続けてきた。いまだ発展途上ではあるものの、本稿ではその成果の一部を紹介する。

2. X線との出会い

筆者がX線と出会ったのは、京都大学大学院工学研究科 西本清一教授(現京都大学名誉教授)の研究室の助手に採用された2002年である。西本先生は、放射線生物学、放射線物理化学がご専門で、特に放射線によるDNA損傷に関する研究を進めておられた。その研究過程でチミジンの二量体にX線を照射すると、還元反応が起こって単量体に開裂することを見出し、さらにこの反応を発展させて「X線照射によって活性化されるプロドラッグ」の開発を試みておられた¹⁾。助手に採用された筆者は、このプロドラッグ化をさらに発展させるべく、研究をスタートした。

* Department of Chemistry and Biological Science,
College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University

プロドラッグとは、化合物そのものは毒性を示さないが、X線照射によって構造が活性な薬剤へと変わり、効果を発現するスマートな薬剤である(図1)。薬剤を化学修飾し、プロドラッグ化することでいったん不活性化し、副作用を軽減する一方、X線を照射した病変部に特化した薬効発現を実現し得る。

一方、プロドラッグのX線による構造変化には、溶媒である水が深く関与する。水にX線を照射すると水分子が分解し、種々の反応活性種が発生する²⁾。このうちの水和電子は多様な化合物を還元する。すなわち、プロドラッグの水溶液へのX線照射によって、プロドラッグ上で還元反応を起こし、活性な薬剤に構造を戻す。

なお、水和電子による還元反応は水溶液中の酸素の影響を受ける。水和電子は酸素によって捕捉され、不活性化されるため、酸素濃度が低い条件でのみこの還元反応は進行する。一般的に、腫瘍は酸素濃度が低いことが知られるため、このプロドラッグは腫瘍を標的とした薬剤となり得る。以下、筆者が開発した3種類のプロドラッグについて順に解説する。

3. X線活性化型プロドラッグ抗がん剤

薬剤はその有効成分が体内の疾患部に到達した後、その機能を発現することで、薬効発現にいたる。

しかしながら、一般的には、疾患部に到達できる薬剤成分はごく一部で、体内には、膜透過性、代謝、組織移行性など、薬剤にとって多くの関門が待ち受ける。また、標的とする部位以外の受容体や酵素などに薬剤が作用することによって副作用が生じる。したがって、特定の標的に特異的に作用し、かつ生体内の多くの関門を突破できる薬剤の開発が、創薬研究には常々求められる。

こうした創薬における課題に対し、従来は薬の投与方法を工夫する、剤形を変えるといった手法により解決策を探索してきた。近年は、機能性材料を用いたり、薬そのものを高機能化することによって、標的となる部位のみに薬剤を運搬し、薬効を発現する技術、いわゆるドラッグデリバリーシステム(以下DDS)が重要視されている。このDDSの形態の1つであるプロドラッグ化を用いて、筆者らは抗がん剤の機能化を試みた^{3,4)}。X線還元反応により除去され得る官能基(放射線分解型置換基)を抗がん剤に導入した、X線分解型プロドラッグの開発を目指した。

プロドラッグを設計するにあたり、まず筆者らは放射線分解型置換基の探索に取り組んだ。文献を種々検索した結果、インドールキノン基、およびアジドメチル基の2つの官能基が想定する機能を持つと予測した。これらの官能基はいずれも還元反応を受けやすく、また結合開裂を起こしやすい。アジド

図1 X線活性化型プロドラッグの概念

図2 放射線分解型置換基を活用した抗がん剤5-FdUrdのプロドラッグ化

(A) アジドメチル基をもつプロドラッグ N3-FdUrd (文献5) より転載)
 (B) インドールキノン基をもつプロドラッグ IQ-FdUrd
 (C) IQ-FdUrd の還元反応を過渡吸収スペクトルで追跡 (文献6) より転載)

メチル基は、還元反応により窒素分子が除去された後、生成したアミナルが加水分解を経て除去されたと考えた。他方、インドールキノン基は還元酵素との反応によって除去されることが知られた官能基であることから、X線照射を用いてもインドールへと還元され、除去されるものと予想した。

抗がん剤として広く用いられている5-フルオロデオキシウリジン (以下5-FdUrd) を選択し、アジドメチル基を導入したプロドラッグを合成した。5-FdUrd は高い抗がん活性を示す一方、副作用も強いことが問題となっていた。5-FdUrd のN3位にアジドメチル基を導入したプロドラッグ (以下N3-FdUrd) を4段階の工程を経て合成し、X線照射下での反応挙動を調べた (図2(A))。その結果、低酸素条件での照射線量の増加とともに、原料は速やかに消失し、対応する5-FdUrd が生成した。一方、同じ反応を有酸素条件で行っても、反応の進行は大きく抑えられた。すなわち、本プロドラッグ活性化には、水和電子による還元反応が関与していることが確認できた。続いて、ヒト肺がん細胞A549を用

いてN3-FdUrd の薬効を評価した。低酸素環境にした細胞にN3-FdUrd を投与した後、X線を照射したところ、6Gy の照射で抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。これらの結果から、N3-FdUrd は放射線活性化型プロドラッグとして機能することがわかった⁵⁾。

次に、インドールキノン基を用いた5-FdUrd のプロドラッグ化を検討した (図2(B))。N3位にインドールキノン部を備えた5-FdUrd (IQ-FdUrd) にX線を照射すると、N3-FdUrd と同じく低酸素環境で選択的な5-FdUrd の放出が確認できた。過渡吸収スペクトルを測定すると、インドールキノンのアニオンラジカルが観測できたことから、確かに一電子還元反応を経由してインドールキノン部の除去反応が進行していることが示された (図2(C))。また、A549細胞を用いて薬効を調べたところ、4Gy程度のX線照射によって低酸素細胞に選択的な薬効発現が確認された⁶⁾。以上のように、放射線分解型置換基を用いることによって、X線照射で抗がん剤の薬効をコントロールすることに成功した。

4. X線によって活性化される核酸型プロドラッグ

「核酸の機能をX線で制御してみよう」と、筆者は、学生時代に核酸を取り扱った経験から、プロドラッグ化手法をDNAやRNAに応用することを試みた。外部トリガーの効果により二重鎖形成や相補鎖認識能を制御する人工核酸は、遺伝子治療やバイオセンサーなどの分野への応用が期待されている。このような観点から、核酸の機能化に向けた糖リン酸部や塩基部の化学修飾に関する研究が進められ、金属イオンの結合あるいは光照射などのトリガーによる機能制御システムが開発されてきた。しかし、X線をトリガーとして活用した報告は皆無であり、新たな放射線の活用法を提案できるのではないかと考えた。

酵素と類似した機能を持つ比較的短鎖の核酸が報告され、それらは遺伝子を標的として塩基配列特異的に生理活性を示すことから、核酸医薬品として注目されていた。筆者らは、この核酸医薬品の相補鎖認識様式をX線という外部トリガーを用いて制御することを試みた。研究初期段階の分子設計を図3に示す。筆者らはRNAを切断する核酸医薬品DNAzymeを化学修飾することによって活性を制御することを試みた。DNAzymeとは、DNAから成るオリゴマーであり、相補的なRNAとハイブリダイズすることで特異的に結合し、RNAを金属イオンの存在下で切断する(図3(A))。したがって、DNAzyme-RNA間の二重鎖形成を制御すれば、切断活性の制御に結びつくものと考えた。筆者らは、まず前述の放射線分解型置換基インドールキノン基およびアジドメチル基をDNAzyme上に導入し、標的となるmRNAと結合しにくいように改変する一方、X線照射によって放射線分解型置換基を除去し、mRNAの切断活性を回復させる分子システムを設計した(図3(B))。しかし、これら放射線分解型置換基は酸性条件、酸化反応を用いる核酸自動合成上で分解し、目的とする修飾DNAzymeは合成できなかった。そこで、アジドメチル基、インドールキノン基に代わる放射線分解型置換基を探索することにした。

筆者らが次に着目した官能基はジスルフィド結合

である。ジスルフィド結合は、還元反応に極めて敏感であるうえ、DNAに自動合成機を用いて導入しやすい。しかし、X線照射下でどのような反応性を持つかわからなかったため、まず単純なジスルフィド基含有DNAを合成し、その反応を追跡することにした。まず、ジスルフィド結合を持つDNA二量体(SS-ODN 1)を合成し、X線を照射した。図3(C)に示したように、反応をHPLCで追跡したところ、2種類の生成物(SS-ODN 1a、SS-ODN 1b)が得られた。筆者がこのデータを初めて見た際、おそらくジスルフィド結合が開裂して、対応するチオール(SH 1、SH 2)が生成したのだらうと予想した。しかし、SS-ODN 1aと1bの構造を詳細に調べたところ、その予想は完全に外れたことがわかった。それら生成物はジスルフィド結合が切断されたのではなく、切断されたチオール同士が再結合したジスルフィド化合物であった。すなわち、SS-ODN 1にX線を照射した結果、ジスルフィド上の置換基が入れ替わる交換反応が起きることを見出した⁷⁾。

筆者はこのユニークな反応をDNAzymeの機能制御システムおよび遺伝子発現のX線制御へと展開した⁸⁾。具体的な分子システムを図3(D)に示す。筆者らはDNAzymeとジスルフィド結合を持つinhibitor鎖をループ部で結んだヘアピン構造を持つSS-DNAzymeをX線活性化型DNAzymeとして設計した。SS-DNAzymeは鎖内のinhibitor部によりDNAzyme活性が抑えられているが、X線照射を受けるとジスルフィド部で交換反応が進行し、inhibitor部が除去される結果DNAzyme活性が回復する。他方、細胞を用いた評価系は次のように設計した。蛍光タンパク質発現をモニターすることでDNAzyme活性の有無を評価することを計画し、GFPをコードする遺伝子を持つプラスミド(以下P1)を調製した。P1は、GFP遺伝子の上流にDNAzymeの標的となるmRNAが発現するように設計した。すなわち、DNAzymeが本来の活性を発現するとmRNAは切断されてGFPは生成しない。しかし、DNAzyme活性が抑制されていると転写・翻訳過程を経てGFPが生成する。

P1とSS-DNAzymeをヒト胎児腎細胞HEK293にトランスフェクトし、GFP発現を蛍光顕微鏡で

観察したところ、SS-DNAzyme を添加しても X 線を照射しなければ細胞内で GFP は発現した。他方、SS-DNAzyme を添加し、X 線を照射すると GFP

の発現はほとんど抑制された。これらの結果は、HEK293細胞に取り込まれた SS-DNAzyme が X 線照射下で DNAzyme 活性を回復し、GFP 発現を

図3 X線照射によるジスルフィド交換反応と遺伝子発現制御

(A) DNAzyme による RNA 切断

(B) アジドメチル基とインドールキノン基を活用した DNAzyme 切断活性の制御

(C) ジスルフィド結合の X 線還元反応 (文献7) より転載 (D) ジスルフィド交換反応を活用した DNAzyme 機能の制御

抑制したことを強く示唆している。すなわち、X線照射によってDNAzyme活性を制御し、遺伝子発現をコントロールできた。

5. X線によって崩壊するドラッグキャリア

上述のように、筆者らは副作用の低減と効果的な薬効発現を目的にプロドラッグというDDS手法を活用した研究を進めてきた。しかし、その手法には薬剤ごとの化学修飾が求められ、煩雑であることは否めない。そこで、より簡単に各種薬剤の薬効制御ができる分子システムの開発を試みた。

筆者らが着目したシステムは、ナノスケールのサイズを持つ運搬分子(キャリア分子)である。キャリア分子に薬剤を内包し患部まで送達する一方、X線の照射によってキャリアが崩壊し、内包薬剤が放出されるドラッグデリバリーシステムを考案した。こうしたキャリアシステムは、プロドラッグと同じく薬剤を内包したキャリアを投与しただけでは何ら薬効を示さないが、患部に放射線照射を行うと、薬剤活性を示す。したがって、このシステムでも放射線照射部を選択的に攻撃し得る。また、これまでにドラッグ運搬分子が抱えてきた問題点：「例えば、薬剤放出の不完全さに起因する不十分な薬効発現」はX線を用いることによって解決できると期待した。

図4(A)に示したように、筆者らは、放射線分解型置換基ジスルフィド結合のX線構造変換反応を応用したナノキャリア分子を設計した。すなわち、キャリアを形成する両親媒性化合物にジスルフィド結合を導入し、X線照射とともに両親媒性分子が分解するシステムの構築を試みた。両親媒性化合物は水中に溶解すると、疎水部を内側に、そして親水部を外側に向けた会合体を形成する。したがって、両親媒性化合物から成る会合体は疎水性の薬剤を内包する。一方、X線を照射するとジスルフィド交換反応が進行し、両親媒性が維持できなくなる結果、会合体は解離する。すなわち、キャリアは崩壊し、内包された薬剤が放出される。この両親媒性化合物の疎水部として長鎖アルキル基を選択し、親水部としては生体適合性と合成の容易さからDNAオリゴ

マーを選択した。また、近年の報告で、DNAから成る会合体が高い細胞透過性を示し、かつ細胞内でも比較的安定に存在しうることが示されたことも、DNAを親水部として選んだ大きな理由である。親水部となるDNAオリゴマーと疎水部となる長鎖アルキル基をジスルフィド結合で連結した両親媒性化合物DAMを合成し、機能を評価した。

DAMの合成は非常に簡単で、核酸自動合成装置を用いてわずか数時間で合成できる。続いて、得られた両親媒性化合物のミセル形成能・薬剤内包特性を疎水性の蛍光色素を用いて調べた。ある種の疎水性蛍光色素は、その疎水性のため水中では沈殿し、ほとんど溶解しない。一方、両親媒性分子がミセルやベシクルといった会合体をつくり、蛍光色素を内部の疎水性領域に取り込むと、水中でも発光する。すなわち、蛍光発光の有無により、会合体形成能、薬剤内包特性を調べることができる。合成したDAMを水に溶かし、蛍光色素を添加すると、普段水中では発光しない色素の蛍光が観測され(図4(B))、また、興味深いことに親水部として短いDNAオリゴマーを用いたほうが効果的に会合体を形成することがわかった。この傾向は会合体のサイズにも現れ、短いDNAオリゴマーを用いたほうがより大きな会合体を形成し、より多くの疎水性薬剤を内包できることがわかった。

次に、生きた細胞内での薬剤放出と薬効発現を評価した。まず、ヒト肺がん細胞A549に抗がん剤カンプトテシン(以下CPT)を内包させたDAMを投与し、CPTはDAM会合体に内包されると抗がん活性を示さないことを確認した。続いて、A549細胞にCPT内包DAM会合体を投与して細胞内に取り込ませた後、X線を照射した。細胞の生存率をモニターした結果、6Gyの照射でも有意な抗がん活性の発現が見られた(図4(C))。CPTを非内包の会合体を投与してX線を照射しても細胞はほとんど生存したことから、X線照射下での薬効発現は、細胞内でのCPTのリリースに由来することが示された。すなわち、DAMは疎水性の抗がん剤を内包し、X線照射によって崩壊するドラッグキャリアとして機能することが明らかとなった⁹⁾。

図4 X線照射によって崩壊するドラッグキャリア

(A) ドラッグキャリアのコンセプト

(B) 蛍光色素ナイルレッドを用いた会合体形成特性の評価(文献9)より転載)

(C) 抗がん剤CPTを内包したドラッグキャリアへのX線照射と薬効発現(文献9)より転載)

6. おわりに

化学の視点では、放射線は物質のイオン化、ラジカル形成、高エネルギー励起活性種の形成をもたらす高エネルギーの外部トリガーとして位置付けられる。各種化合物の結合切断、あるいは結合形成を誘起できる有効なトリガーである。しかしながら、生じる反応の多様さから、精密に放射線化学反応が理解されているとはいいい難く、分子レベルでの精密な

反応制御を必要とするケミカルバイオロジー・創薬化学での活用は広がっていない。

筆者らは、本稿で述べたように、X線照射によって進行する化学反応を分子レベルで明らかにし、ドラッグデリバリーシステムへの応用を目指している。現在は、細胞レベルでの機能評価に留まっているが、今後、本研究で見出したプロドラッグ候補化合物群の動物実験が行われる予定であり、その成果が待たれるところである。この研究を通じて、X線

を使った研究がさらに広がることを期待したい。

謝辞

本稿で紹介した研究は京都大学大学院工学研究科物質エネルギー化学専攻で行われたものであり、ご指導いただきました西本清一教授(現京都大学名誉教授)および実験を精

力的に進めていただいた西本研究室のメンバーの皆様に深く感謝いたします。また本研究の一部は、文部科学省 国家基幹研究開発推進事業「原子力基礎基盤戦略研究イニシアティブ」のご支援をいただきました。また、本稿執筆の機会を与えてくださいました熊本大学薬学部の今井輝子教授に感謝申し上げます。

文献

- 1) M. Mori, H. Hatta, S. Nishimoto, Stereoelectronic Effect on One-Electron Reductive Release of 5-Fluorouracil from 5-Fluoro-1-(2'-oxocycloalkyl)uraciles as a New Class of Radiation-Activated Antitumor Prodrugs, *J Org Chem.* 65 (2000) 4641-4647.
- 2) G. V. Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, Critical Review of Rate Constants for Reactions of Hydrated Electrons, Hydrogen Atoms and Hydroxyl Radicals in Aqueous Solution, *J Phys Chem Ref Data*, 17 (1988) 513-886.
- 3) K. Tanabe, Z. Zhang, T. Ito, H. Hatta, S. Nishimoto, Current Molecular Design of Intelligent Drugs and Imaging Probes Targeting Tumor-Specific Microenvironment, *Org Biomol Chem*, 5 (2007) 3745-3757.
- 4) T. Ito, K. Tanabe, H. Yamada, H. Hatta, S. Nishimoto, Radiation- and Photo-Induced Activation of 5-Fluorouracil Prodrugs as a Strategy for the Selective Treatment of Solid Tumors, *Molecules*, 13 (2008) 2370-2384.
- 5) K. Tanabe, J. Ishizaki, Y. Ando, T. Ito, S. Nishimoto, Reductive Activation of 5-Fluorodeoxyuridine Prodrug Possessing Azide Methyl Group by Hypoxic X-irradiation, *Bioorg Med Chem Lett*, 22 (2012) 1682-1685.
- 6) K. Tanabe, Y. Makimura, Y. Tachi, A. Imagawa-Sato, S. Nishimoto, Hypoxia-Selective Activation of 5-Fluorodeoxyuridine Prodrug Possessing Indolequinone Structure: Radiolytic Reduction and Cytotoxicity Characteristics, *Bioorg Med Chem Lett*, 15 (2005) 2321-2324.
- 7) K. Tanabe, E. Kuraseko, Y. Yamamoto, S. Nishimoto, S. One-Electron Reductive Template-Directed Ligation of Oligodeoxynucleotides Possessing Disulfide Bond, *J Am Chem Soc*, 130 (2008) 6302-6303.
- 8) K. Tanabe, T. K. Okada, T. Ito, M. Sugiura, S. Nishimoto, Hypoxic X-irradiation as an external stimulus for conformational change of oligodeoxynucleotides that possess disulfide bond and regulation of DNAzyme function, *Bioorg Med Chem Lett*, 25 (2015) 310-312.
- 9) K. Tanabe, T. Asada, T. Ito, S. Nishimoto, Radiolytic Reduction Characteristics of Drug-Encapsulating DNA Aggregates Possessing Disulfide Bond, *Bioconjugate Chem*, 23 (2012) 1909-1914.