〔原 著 論 文〕

がん細胞指向性リガンドを導入したポリグリセロールデンドリマーの
アルギニンデリバリー評価

板倉 幸枝*¹・大谷 亨*¹

(受付 2017 年 3 月 1 日・審査終了 2017 年 3 月 29 日)

(早期公開 2017 年 5 月 22 日・DOI:10.1295/koron.2017-0011)

要 旨 ポリグリセロールデンドリマー (PGD) は L-アルギニン (Arg) と 10^6 (M^{-1}) オーダーの極めて高い結合定数を示す。この現象に着目し、がん細胞への Arg デリバリーの可能性を検証するため、葉酸 (FA) もしくは Biotin をがん細胞標的リガンドとして修飾し、がん細胞表面上に存在するこれら受容体との相互作用を介してがん細胞へ選択的に Arg を送達するキャリアとしての評価を行った。第三世代の PGD (PGD-G3) と FA もしくは Biotin をエステル化反応させたところ、PGD-G3 一分子あたり一分子のリガンドが導入された。FA 受容体過剰細胞、biotin 受容体過剰細胞、どちらの受容体もない細胞を用い、Arg 取り込み能を評価したところ、一部の細胞では Arg 取り込みに伴う蛍光強度の増大がみられたことから、特異的なリガンド-受容体相互作用を介した取り込みの可能性が示唆された。

1 結 言

1985 年に Tomalia らによって、規則的な多重分岐構造からなる高分子としてデンドリマーが発表された^{1),2)}。化学構造や分子量、形状、サイズが制御できる精密高分子であるため、既存の線状高分子とは異なる特性が期待される。ナノマテリアルの分野では、デンドリマーは数〜数十 nm の精密なナノ構造を構築できる構造体として注目されており、高世代デンドリマーは一分子でナノ微粒子として、低世代デンドリマーは集合してナノ組織体として超分子ナノマテリアルとしての機能が期待される。これらデンドリマーの化学的・物理的性質から、バイオメディカル分野への応用が期待される。デンドリマー末端にある多数の官能基を利用して薬物やリガンドを結合でき、さらに内部空間には薬物保持に利用されることが可能である。デンドリマーをキャリアとして利用する研究が行われており³⁾、たとえば、2002 年に Baker らは、葉酸をリガンドにもつポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマーに抗がん剤メトキレスートをエステル結合すると、葉酸受容体が過剰発現する細胞では約 100 倍高く細胞毒性を示したと報告している⁴⁾。

筆者らは、デンドリマーの中でもポリグリセロールデンドリマー (PGD) に着目している。PGD はグリセロー

ルを枝分かれ状に高分子量化した分子であり、親水性の特徴を示すのみならず、水中では弱い疎水性の特徴を示す^{5),6)}。最近になって筆者らは、第三世代の PGD (PGD-G3) が L-アルギニン (Arg), L-リシン (Lys), L-ヒスチジン (His) と相互作用し、とくに Arg と 10^6 (M^{-1}) オーダーの極めて高い結合定数を示すことを見いだした (Figure 1)⁷⁾。この現象は PGD の枝分かれ構造に特有の現象であり、Arg のキャリアとしての可能性を示唆するものであった。近年、長崎らによって Arg デリバリーによるがん免疫療法への有用性が示されている⁸⁾。この研究戦略に誘発され、筆者らも PGD の Arg 保持能を利用したがん細胞へのデリバリーの可能性を検証することとした。本研究では、PGD に多数存在する官能基に葉酸もしくはビオチンを修飾し、がん細胞表面上に存在するこれら受容体と相互作用し選択性を付与することを考えた。細胞外のがんマーカータンパク質に着目したターゲティングとして、細胞外受容体を標的とし、リガンドと PGD を化学修飾し、がん細胞へ選択的にアルギニンを送達するキャリアとしての評価を行った。

2 実 験

2.1 試薬

メタノール、酢酸エチル、Dimethyl sulfoxide (DMSO)、葉酸、(+)-Biotin、*N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA)、ジエチルエーテルは和光純薬工業 (株) より購入した。(Benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)-

*¹ 神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻 (☎ 657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1)

Polyglycerol Dendrimer

Figure 1. Schematic illustration of interaction between PGD-G3 and basic amino acids (see ref. 7)).

phosphonium hexafluorophosphate (BOP) はシグマ・アルドリッチ社より購入した。D-PBS(-), DMEM (4.5 g/L Glucose), Roswell Park Memorial Institute (ロズウェルパーク記念研究所培地) (RPMI) 1640, Fetal Bovine Serum, 2.5 g/L-Trypsin/1 mmol/l-EDTA Solution はナカライテスク (株) より購入した。Cell Counting Kit-8 は (株) 同仁化学研究所より購入した。Diaminorhodamine-4M acetoxymethyl ester (DAR-4M AM) は五稜化学 (株) より購入した。

2.2 装置

^1H NMR スペクトル測定には、JEOL JNM-ECZS400FT NMR SYSTEM を用いた。データ解析には、JEOL NMR Data Processing Software ALICE 2 を用いた。UV-vis 測定には JASCO の UV-vis Spectrophotometer V-730 を、解析ソフトは Spectra Manager を用いた。インキュベータには Forma Scientific Inc. の Thermo Scientific Series II 3110 water-jacketed CO_2 incubator を、オートクレーブはトミー精工の High-Pressure Steam Sterilizer KS-243 を用いた。プレートリーダーには Tecan Spectrafluor Plus を用いた。蛍光測定は、Perkin ElmerTM の LS55, 解析には FL WINLAB SOFTWARE と用いた。蛍光顕微鏡は Thermo Fisher SCIENTIFIC の EVOS FL Ver.3.1 を用いた。

2.3 葉酸-PGD-G3 結合体 (G3-FA) の合成 (Scheme 1 (a))

サンプル瓶に、葉酸 (FA) 0.0158 g (35.7 μmol) を dimethyl sulfoxide (DMSO) 5.0 mL, 30°C で 10 分間加熱して溶解させた。BOP 0.0162 g (36.5 μmol), *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) 32 μL (186 μmol), DMSO 1.0 mL に溶解させた第三世代 polyglycerol dendrimer (PGD-G3) 0.00245 g (1.44 μmol , 34.5 μmol alcohol equivalent) を加え、室温で 6 日間かくはんした。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒; methanol: ethyl acetate = 1:1) で目的のスポットを回収後、約 200 mL の diethyl

ether を入れたビーカーに回収物を少しずつ加え、一晚ドラフト内にかくはんした。かくはん後、黄色の沈殿を回収し、 100°C で真空乾燥後、濃い黄色の湿った固体を得た。UV スペクトル測定から 364.2 nm の FA 由来の吸光度を利用し、FA 導入量を算出した。構造の確認は、 ^1H NMR スペクトルから行った。

収率: 21.2%

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ =0.770 (t, 3H, CH_3CH_2), 1.20 (m, 2H, CH_3CH_2), 2.04 (s, 25H, OH, CHNH_2), 3.18–3.46 (m, 117H, CH_3CH_2), 6.6–6.8, 7.6–7.7 (m, 4H, aromatics), 8.61 (s, 1H, $\text{N}=\text{CHC}=\text{N}$), 11.4 (s, 1H, COOH)

2.4 ビオチン-PGD-G3 結合体 (G3-Biotin) の合成 (Scheme 1 (b))

サンプル瓶に、(+)-Biotin 0.0239 g (98.0 μmol) を DMSO 1.6 mL に溶解させた。ここに、BOP 0.0456 g (103 μmol), DIEA 100 μL (560 μmol), DMSO 0.4 mL に溶解させた PGD-G3 0.00826 g (4.85 μmol , 116 μmol alcohol equivalent) を加え、室温で 5 日間かくはんした。シリカカラムクロマトグラフィー (展開溶媒; ethyl acetate 100%~methanol 100%) で目的のスポットを回収後、 35°C で真空乾燥し、焦げ茶色の粘性固体を得た。Biotin 導入量と構造の確認は、 ^1H NMR スペクトルから行った。

収率: 60.9%

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ =0.972 (t, 3H, CH_3CH_2), 1.07 (m, 2H, CH_3CH_2), 1.29 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.45 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.56 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.04 (s, 23H, OH), 3.18–3.46 (m, 117H, CH_3CH_2), 2.32 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.96 (s, 2H, SCH_2CH), 3.07–3.54 (m, 117H, CH_3CH_2), 4.09 (d, 1H, OCH_2CHOH), 4.26 (d, 2H, COOCH_2CH), 6.33 (s, 2H, NH)

(a)

(b)

Scheme 1. (a) Synthesis of G3-FA and (b) Synthesis of G3-Biotin.

Table 1. List of Cancer Cells for Arg uptake Experiments

Name	Tissue	Medium	Receptor
HeLa	Cervix	DMEM/10% FBS/1% PS	Folate
Colon-26	Rectum Carcinoma	RPMI 1640/10% FBS	Biotin
B16	Skin, melanoma	RPMI 1640/10% FBS	—

2.5 培養がん細胞を利用したアルギニン取り込み試験

2.5.1 細胞

Table 1 示した3種のがん細胞を準備した。

2.5.2 サンプル調製

G3-FA, G3-Biotin, Arg を純水に溶解させ、2000, 1000, 200, 20 μ M に調製した。G3-FA と Arg を等量ずつ混合し、1000, 500, 100, 10 μ M の混合溶液 A を調製した。G3-Biotin と L-arginine を等量ずつ混合し、1000, 500, 100, 10 μ M の混合溶液 B を調製した。Arg と純水を等量ずつ混合し、1000, 500, 100, 10 μ M の混合溶液 C を調製した。

Diaminorhodamine-4M acetoxymethyl ester (DAR-4M AM) を、無血清の DMEM または RPMI に溶解させ、

DMEM (10 μ M DAR-4M AM) と RPMI (10 μ M DAR-4M AM) を調製した。

2.5.3 アルギニン取り込み試験

対数増殖期になった HeLa 細胞, Colon-26 細胞, B16 細胞を、96 well プレート (black) 3 枚に 3500 cells/well (10937 cells/cm²) になるよう 100 μ L/well ずつ播種し、n=8 で用意した。ブランクは培地のみを、陰性対照には培地と細胞のみとした。CO₂ インキュベータ内で 24 時間静置した。各種の細胞に、ブランク用と陰性対照用には純水を、その他には各濃度の混合溶液 A, B, C を、10 μ L/well ずつ添加した (最終濃度は、100, 50, 10, 1 μ M)。CO₂ インキュベータ内で 24 時間静置した。その後、培地を DMEM (10 μ M DAR-4M AM) または RPMI (10 μ M DAR-4M AM) に交換し、CO₂ インキュベータ内で 30 分静置した。培地を、無血清 DMEM または RPMI に交換し、CO₂ インキュベータ内で 1 時間静置した。培地を D-PBS(−) に交換し、プレートリーダーで蛍光強度を測定した (励起波長 560 nm, 蛍光波長 575 nm)。測定後、最終濃度が 100 μ M の細胞を回収し、蛍光顕微鏡で観察した (励起波長 531/40 nm, 蛍光波長 593/40 nm)。

Figure 2. (Color online) Fluorescence as functions of G3-FA-L-arginine, G3-Biotin-L-arginine and L-arginine concentration in HeLa cells ($n = 8$, Mean $\pm$ S.E.) (* $p < 0.05$).

3 結果と考察

G3-FA の合成後, ^1H NMR スペクトル測定を行ったところ, FA 由来のピークを確認し, その積分値から PGD-G3 一分子につき FA が一分子結合したものと推定された. UV364 nm の FA 由来の吸光度から, G3-FA に含まれる FA 量を算出したところ, 合成で得られた G3-FA 15.56 mg のうち, FA は 5.93 μmol , PGD-G3 は 7.59 μmol 含まれると計算された. これは, ^1H NMR の結果より, G3-FA のコアのメチル基のプロトン数3に対して, FA のベンゼン環由来のプロトン数との比較からも一致した. G3-Biotin の合成後, ^1H NMR スペクトル測定を同様に行ったところ, biotin 由来の積分値から, PGD-G3 一分子につき biotin が一分子結合したものとなった. これらリガンド導入数は受容体との多価相互作用に大きく影響することが考えられるため, 合成法の再検討が必要と考えている. PGD の合成では, アリル化反応を経てオスミウム酸酸化する過程がある. このアリル基に着目し, 現在は, チオール-エン反応⁹⁾によりリガンド導入量の制御を行っている.

得られた G3-FA, G3-Biotin と Arg を混合し, FA 受容体過剰細胞 (Hela 細胞), biotin 受容体過剰細胞 Colon-26 細胞), どちらの受容体もない細胞 (B16 細胞) を用い, Arg 取り込み能を評価した. Arg の取り込みは, DAR-4M AM の radical nitric oxide ($\cdot\text{NO}$) との反応に伴う蛍光増大を利用した. Arg は, 細胞内での酸化反応により $\cdot\text{NO}$ と N^ω -hydroxyl-L-arginine 中間体を生成する¹⁰⁾. 細胞中の $\cdot\text{NO}$ をリアルタイムで観察するための蛍光試薬が, DAR-4M AM である. 細胞内に取り込まれると,

acetoxymethyl ester (AM) 部分が esterase により分解して DAR-4M となる. すぐに $\cdot\text{NO}$ と反応して, 安定な DAR-4MT を生じる¹¹⁾. DAR-4MT は, 波長 560 nm で励起すると, 波長 575 nm の橙色の蛍光を発する.

HeLa 細胞における DAR-4M AM 蛍光強度の結果を Figure 2 に示した. この結果から蛍光強度の差がほとんど見られなかったことから G3-FA により, Arg 取り込みが増加したとはいえなかった. しかしながら, 100 μM G3-FA-Arg 処理の細胞を回収して, 顕微鏡で観察したところ, 一部の細胞では, DAR-4MT による蛍光の増強が見られた (Figure 3). G3-FA は, FA の影響で 2000 μM の濃度では純水に溶解しにくかったことから, 細胞に添加する前の 1000 μM 混合溶液 A では, G3-FA が会合体を形成し, それと Arg が相互作用している可能性がある. 会合体を形成した状態で FA 受容体を介して細胞内に取り込まれたため, 一部の細胞だけが蛍光増強したとも考えられる.

Colon-26 細胞 (biotin 受容体過剰) における, 蛍光強度の結果を Figure 4 に示した. とくに, 10 μM G3-Biotin において, 蛍光強度が有意に大きくなった. これは, biotin 受容体と相互作用する biotin を結合した G3-Biotin による, 受容体を介した Arg の取り込みの可能性を示した. 100 μM G3-Biotin-Arg 処理の細胞を回収して, 顕微鏡で観察したところ, DAR-4MT の顕著な蛍光の増強は見られなかった (Figure 5). このことは, 一様に G3-Biotin-Arg が細胞内に取り込まれたことを示唆していたが Figure 3 の結果と比較すると Arg の取り込みに伴う蛍光増強が顕著であるとは言い難い.

続いて, B16 細胞 (受容体なしの細胞) における, 蛍

Figure 3. (Color online) Fluorescent images of HeLa cells after adding 100 μ M G3-FA-L-arginine, followed by standing for 24 h and then adding 10 μ M DAR-4M AM. The images were measured in DMEM without serum: (a) transmitted, (b) RFP filtered (Ex: 531/40 nm; Em: 593/40 nm), (c) overlaid (a) and (b).

Figure 5. (Color online) Fluorescent images of Colon-26 cell after adding 100 μ M G3-Biotin-L-arginine, followed by standing for 24 h and then adding 10 μ M DAR-4M AM. The images were measured in RPMI 1640 without serum: (a) transmitted, (b) RFP filtered (Ex: 531/40 nm; Em: 593/40 nm), (c) overlaid (a) and (b).

Figure 4. (Color online) Fluorescence as functions of G3-FA-L-arginine, G3-Biotin-L-arginine and L-arginine concentration in Colon-26 cells ($n = 8$, Mean $\pm$ S.E.) (* $p < 0.05$).

光強度の結果を Figure 6 に示した。B16 細胞では FA 受容体, biotin 受容体がないにもかかわらず, G3-FA, G3-biotin を添加した細胞では, 蛍光強度が増大した。Arg のみでも有意に蛍光強度が増大していたことから B16 細胞は Arg 感受性が強く, G3-FA, G3-biotin の共存に関係なく NO 生産する傾向にあると言える。100 μ M G3-FA-Arg および G3-Biotin-Arg 処理細胞を回収して顕微鏡で観察したところ, どちらの場合も DAR-4AMT の顕著な蛍光の増強は見られず, 細胞内に一様に Arg が取り込まれたことを示唆した (Figure 7, 8)。

4 結 論

G3-FA, G3-Biotin それぞれの受容体を有する FA 受容体過剰細胞 (HeLa), biotin 受容体過剰細胞 (Colon-26) に対して, G3-FA, G3-Biotin 共存下にて Arg の細胞内取り込みを NO 産生を指標とした蛍光強度測定から判断すると, これらキャリアと受容体との特異的な相互作用を介した Arg 取り込みとの相関性を結論づけるには至らなかった。しかし, G3-FA と HeLa 細胞との系において見られたように, 一部の細胞においては Arg 取り込みに伴う蛍光強度の増大が観測されたことから, 特異的なリガ

Figure 6. (Color online) Fluorescence as functions of G3-FA-L-arginine, G3-Biotin-L-arginine and L-arginine concentration in B16 cells ($n = 8$, Mean $\pm$ S.E.) (* $p < 0.05$).

Figure 7. (Color online) Fluorescent images of B16 cells after adding 100 μ M G3-FA-L-arginine, followed by standing for 24 h and then adding 10 μ M DAR-4M AM. The images were measured in RPMI 1640 without serum: (a) transmitted, (b) RFP filtered (Ex: 531/40 nm; Em: 593/40 nm), (c) overlaid (a) and (b).

Figure 8. (Color online) Fluorescent images of B16 cells after adding 100 μ M G3-Biotin-L-arginine, followed by standing for 24 h and then adding 10 μ M DAR-4M AM. The images were measured in RPMI 1640 without serum: (a) transmitted, (b) RFP filtered (Ex: 531/40 nm; Em: 593/40 nm), (c) overlaid (a) and (b).

ンド-受容体相互作用を介した取り込みは行われている可能性がある。受容体タンパク質とデンドリマーとの分子間相互作用もその認識機構に関与しているとの報告もあることから^{12),13)}、PGD 表層の官能基変換や世代数の影響なども考慮すると改善する可能性がある。また、Arg と PGD との相互作用が培地中では弱まった可能性もあり、今後は、Arg と PGD との相互作用における培養液の影響についても明らかにすることで、最適な条件を見いだすことが重要になると考えている。

謝 辞 本研究の一部は、JAPS 科研費・新学術領域研究「元素ブロック高分子材料の創出 (No. 2401)」JP15H00748 の助成を受けたものです。

文 献

- 1) M. Calderon, M. A. Quadir, S. K. Sharma, and R. Haag, *Adv. Mater.*, **22**, 190 (2010).
- 2) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith, *Polym. J.*, **17**, 117 (1985).
- 3) A. K. Patri, I. J. Majoros, and J. R. Baker Jr., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 466 (2002).
- 4) A. Quintana, E. Raczka, L. Piehler, I. Lee, A. Myc, I. Majoros, A. K. Patri, T. Thomas, J. Mule, and J. R. Baker Jr., *Pharm Res.*, **19**, 1310 (2002).
- 5) H. Lee and T. Ooya, *Chem. Commun.*, **48**, 546 (2012).
- 6) H. Lee and T. Ooya, *Chem. Eur. J.*, **18**, 10624 (2012).
- 7) T. Ooya and H. Lee, *ChemNanoMat*, **1**, 264 (2015).

- 8) S. Kudo and Y. Nagasaki, *J. Controlled Release.*, **217**, 256 (2015).
- 9) A. B. Lowe, *Polym. Chem.*, **1**, 17 (2010).
- 10) C. Nathan, *FASEB J.*, **6**, 3051 (1992).
- 11) A. Vatsa, D. Mizuno, T. H. Smit, C. F. Schmidt, F. C. MacKintosh, and J. Klein-Nulend, *J. Bone Miner. Res.*, **21**, 1722 (2006).
- 12) M. A. van Dongen, J. E. Silpe, C. A. Dougherty, A. K. Kanduluru, S. K. Choi, B. G. Orr, P. S. Low, and M. M. B. Holl, *Mol. Pharmaceutics*, **11**, 1696 (2014).
- 13) M. A. van Dongen, R. Rattan, J. Silpe, C. Dougherty, N. L. Michmerhuizen, M. Van Winkle, B. H. Huang, S. K. Choi, K. Sinniah, B. G. Orr, and M. M. B. Holl, *Mol. Pharmaceutics*, **11**, 4049 (2014).

[Original Papers]

Evaluation of Ligand-Conjugated Polyglycerol Dendrimers as a L-arginine Carrier

Yukie ITAKURA^{*1} and Tooru OOYA^{*1}

^{*1}*Graduate School of Engineering, Kobe University (1-1 Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan)*

Folic acid (FA) or biotin-conjugated polyglycerol dendrimers (PGD) that are known to tightly bind to L-arginine (Arg) are explored as possible L-arginine carriers. PGD with generation 3 (PGD-G3) was conjugated with FA or biotin by using a condensation reagent, with a 1:1 stoichiometry. Furthermore, cellular uptake studies suggest that FA or biotin-conjugated PGDs can be used as Arg carriers.

KEY WORDS Dendrimer / Polyglycerol / Ligands / Biotin / Folic Acid / Arginine / Cancer Cells /

(Received March 1, 2017: Accepted March 29, 2017: Advance Publication May 22, 2017)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **74**, 304—310 (2017)]

©2017, The Society of Polymer Science, Japan