

低分子ゲルによるガン細胞特異的細胞死の誘導

神戸大学大学院 工学研究科 応用化学専攻 化学工学講座
丸山 達生

1. 緒言

ゲルとは、分散質によって液体が流動性を失った状態を指す。ゲルは、分散系の種類によって溶媒が水ならばハイドロゲル、有機溶媒・油の場合ではオルガノゲルに分類される。ハイドロゲルは少量で多量の水分を内包しながら、固体として扱うことが可能である。この特徴を利用した様々な応用が古くから展開され、生活・日用品から分析化学など分野を問わず、現代社会において必要不可欠な存在となっている。

ゲルは分散質の種類によって、高分子ゲルと超分子ゲル（低分子ゲル）に大別される。従来、高分子ゲルが広く用いられてきたが、近年低分子でもゲル化する分子（超分子ゲル化剤）が次々と発見され、注目を集めている。この超分子ゲル（低分子ゲル）は、分子量1000以下のゲル化剤分子が自己組織化してナノファイバーを形成することによりゲルを形成する（図1）。超分子ハイドロゲルは、従来使用されてきた高分子ゲルと強度の点で劣るものの、分子構造と機能の制御が容易なため、ソフトでウェットな新たなマテリアルとして近年注目を浴びている。^{1,2} その機能の一つである酵素応答性を利用して、本研究ではガン細胞が分泌する酵素matrix metalloproteinases (MMPs)に応答し、ゲル化が誘導される超分子ゲル化剤前駆体を設計・合成し、その特性を評価した。

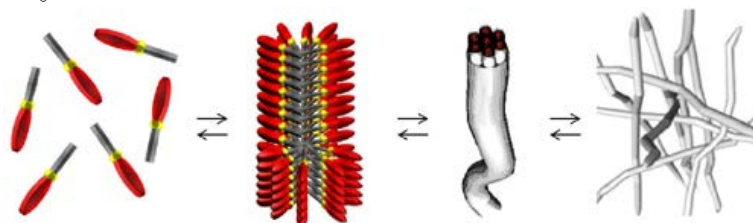


図1 超分子ゲル化剤分子の自己組織化とそれによって引き起こされるゲル形成

2. 方法

①超分子ゲル化剤(Palmitoyl-GGGHGPLG)の合成と物性評価

Fmoc固相ペプチド合成法により、Palmitoyl-GGGHGPLGというアミノ酸配列と脂肪酸鎖を持つ超分子ゲル化剤の合成を行った（図2）。化合物の精製は高速液体クロマトグラフィー、同定はMALDI-TOF/MSを用いて行った。ゲル化の判断は試験管倒置法を採用した。電子顕微鏡（FE-SEMおよびTEM）、および示差走査熱量測定（DSC）によるハイドロゲルの観察・物性評価を行った。

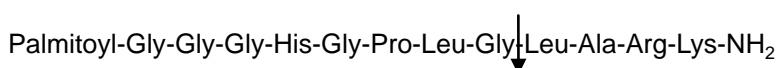


図2 超分子ゲル化剤分子（上）とゲル化剤前駆体（下）の分子構造。矢印は、酵素（MMP-7）による切断部位

②酵素応答性を有する低分子ゲル化剤前駆体の合成

Fmoc固相ペプチド合成法により、図2のアミノ酸配列を持つ超分子ゲル化剤前駆体の合成を行った。化合物の精製は高速液体クロマトグラフィー、同定はMALDI-TOF/MSを用いて行った。この前駆体を用いて、ガン細胞が分泌する酵素matrix metalloproteinase-7 (MMP-7)存在下でゲル化試験を行った。

さらに、この前駆体をマウス由来癌細胞であるL929細胞、ヒト由来ガン細胞であるHeLa細胞、正常ヒト皮膚毛細血管内皮細胞(MvE細胞)を用いてLive-Dead testを、24穴マイクロプレート上で行った(細胞濃度は 1.0×10^6 cell/ml)。なお、インビトロジェン製のLIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kitにより細胞毒性は評価し、共焦点蛍光顕微鏡により観察した。

3. 結果 研究成果

①超分子ゲル化剤(Palmitoyl-GGGHGPLG)の物性評価

合成した超分子ゲル化剤をリン酸緩衝液および各種培養液に、90°Cで溶解させ、室温に冷却したところ、それぞれの水溶液でゲル化が観測された(図3)。このことは、今回合成した超分子ゲル化剤が比較的幅広い水溶液をゲル化可能であることを示している。

FE-SEMおよびTEMにより、太さ数十nmのナノファイバーを観察できた(図4)。このナノファイバーは超分子ゲル化剤分子が自己組織化したものであり、これがゲル化に大きく関与していることが示された。またDSC測定の結果、得られたゲルは74°C付近にブルゲル転移温度を持つことが分かり、将来的なアプリケーションとして考えている生体温度37°Cではゲルの状態を維持できることが示された。



図3 合成した超分子ゲル化剤分子によるゲル化試験(ゲル化剤 2 wt%)

左: PBS buffer (50 mM pH 7.5)
中央: D-MEM (HeLa 細胞培養液)
右: E-MEM (L929 細胞培養液)

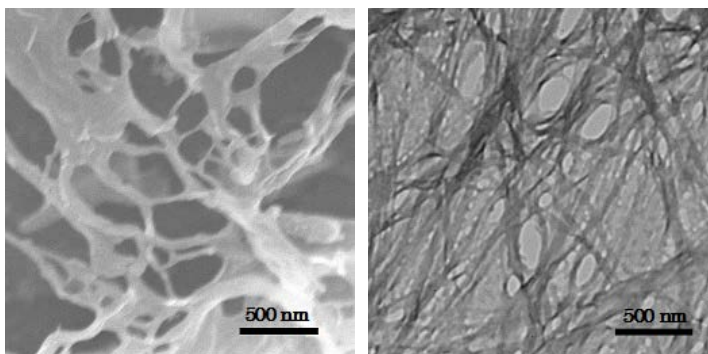


図4 得られたゲルの FE-SEM および TEM 観察像 (PBS buffer (50 mM pH 7.5), ゲル化剤 2 wt%)

②酵素応答性を有する超分子ゲル化剤前駆体

合成したゲル化剤前駆体水溶液(0.2 wt%)に、酵素MMP-7(終濃度 2 μ g/ml)を添加するとゲル化することを確認した(図5)。このゲル化剤前駆体は、強力な超分子ゲル化剤である Palmitoyl-GGGH¹とゲル化を阻害するペプチド部位により構成されている。プロリン(Pro)による「分子構造の屈曲効果」とカチオン性アミノ酸配

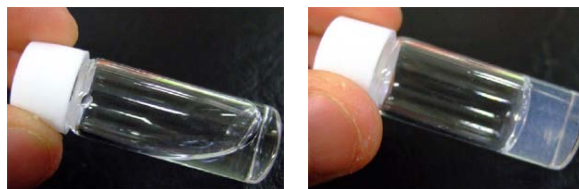


図5 MMP-7 によるゲル化剤前駆体水溶液のゲル化 (Tris-HCl buffer solution (pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂), ゲル化剤 0.2 wt%)

列(Arg-Lys)による静電反発をゲル化の阻害要因として利用しており、MMP-7の作用でGly-Leu間で結合が切断されるとPalmitoyl-GGGHGPLGを主体にゲル化が誘導されたと考えられる。

③細胞死滅特性

合成したこのゲル化剤前駆体を、マウス由来癌細胞であるL929細胞、ヒト由来ガン細胞であるHeLa細胞、正常ヒト皮膚毛細血管内皮細胞(MvE細胞)に投与したところ、投与18時間後にL929細胞とHeLa細胞のほぼ全てが死滅した(図6)。一方、正常ヒト皮膚毛細血管内皮細胞ではほとんど死滅効果が見られなかった。ゲル化剤前駆体の濃度を検討したところ、終濃度およそ0.1 wt%でHeLa細胞を全て死滅させられることが明らかになった。前駆体ではなく超分子ゲル化剤そのものを正常ヒト皮膚毛細血管内皮細胞に投与したところ、明確な死滅効果が見られたことから、ガン化細胞が大量に分泌する酵素MMP群がこのガン細胞選択的細胞死に関与していることが明らかになった。

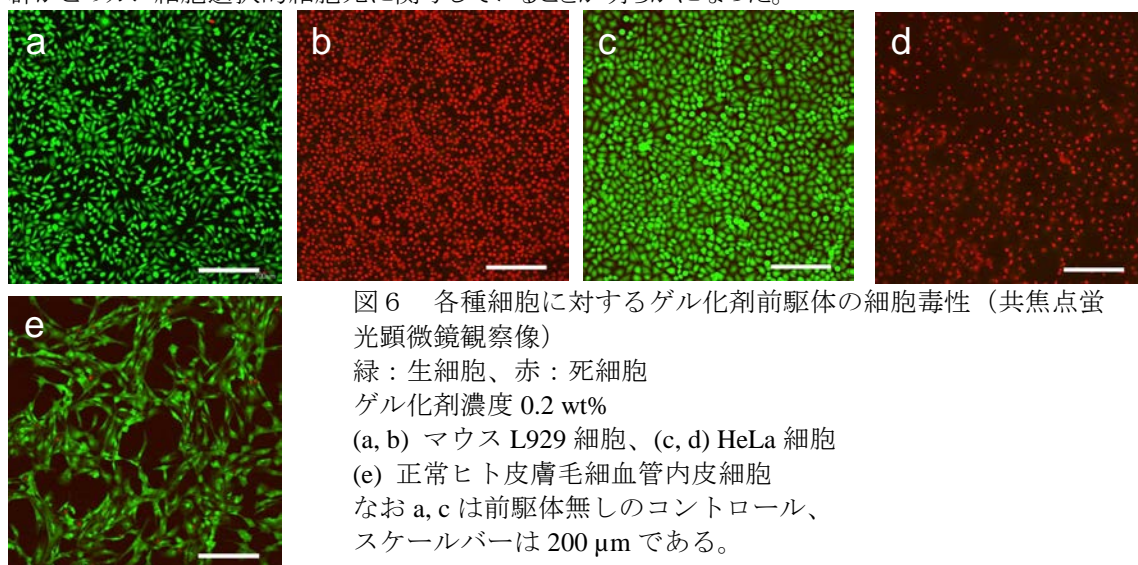


図6 各種細胞に対するゲル化剤前駆体の細胞毒性 (共焦点蛍光顕微鏡観察像)

緑：生細胞、赤：死細胞

ゲル化剤濃度 0.2 wt%

(a, b) マウス L929 細胞、(c, d) HeLa 細胞

(e) 正常ヒト皮膚毛細血管内皮細胞

なお a, c は前駆体無しのコントロール、

スケールバーは 200 μm である。

4. まとめ

本研究では、世界で初めて、病理細胞の選択的死滅を分子標的薬等ではなく、分子の自己組織化により達成した。ここで成功したガン細胞分泌酵素MMPsに応答したゲル化誘導システムは、酵素認識部位を他の酵素のものに変更することで簡易検査などを皮切りとした、様々な病気の治療技術あるいは診療において応用できると考える。また、血清中のMMP-7濃度が大腸ガンや卵巣ガン患者の場合に健常者の約2~3倍になることから、血液検査で採取した血液にこのMMP-7応答性ゲル化剤前駆体を加えてゲル化の有無を検証する事で癌の発見が可能ではないかと期待される。このような試みにおいて、本研究のゲル化剤前駆体を用いれば複雑な機械を使用することなくゲル化するかしないかの目視的な確認だけで癌の発見ができ、非常に簡易である。一方、iPS細胞に代表される万能細胞では、低確率ではあれどガン化が生じる可能性がある。このような一部のガン化細胞を選択的に除去する手段として、本ゲル化剤が活用できると考えている。

5. 発表論文、参考文献

[1] D. Koda, T. Maruyama, N. Minakuchi, K. Nakashima, and M. Goto, *Chem. Commun.* 46, 979–981 (2010).

[2] N. Minakuchi, K. Hoe, D. Yamaki, S. Ten-no, K. Nakashima, M. Goto, M. Mizuhata, T. Maruyama, Versatile supramolecular gelators that can harden water, organic solvents and ionic liquids. *Langmuir* 28, 9259–9266 (2012).