日本医療研究開発機構 先端バイオ創薬等基盤技術開発事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 糖鎖付加工人工金属酵素による生体内合成化学治療
(英語) Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry
by Glycosylated Artificial Metalloenzyme

研究開発実施期間：令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 田中 克典
(英語) Katsunori Tanaka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立研究開発法人 理化学研究所・開拓研究本部 田中生体機能合成化学研究室・主任研究員
(英語) RIKEN

II 研究開発の概要

和文：

本課題では、がんを標的とした生体内合成化学治療に関する基盤技術とその治療システムを開発することを目的とした。すなわち、標的のがんに選択的な糖鎖アルブミンを見出すシステムを構築するとともに、糖鎖アルブミンに遷移金属触媒を複合化して、生体内で効率的な化学反応を実現する人工金属酵素を創製する。さらに標的のがんで選択的に金属触媒反応を実施して、「ドラッグ合成」、「ドラッグ放出」ならびに「ドラッグ複合化」を実現することにより、がんを効果的に治療することを目指した。下記の4つの研究開発項目に従って研究を実施した。

【研究開発項目①】糖鎖アルブミンの効率的なライブラリー合成による DDS 探索システムの構築

アルブミンに糖鎖構造の異なる理研クリックプローブを使用し、順番を変えて複数回作用させることによって、アルブミンに複数種類の糖鎖を持つ合成技術を確立した。この合成技術を用いて、多種類のライブラリーを調製することに成功した。これらの技術により、全体で約 10 分子の糖鎖を付加したアルブミンを再現性良く得ることができた。

このように多くの不均一糖鎖構造を含む糖鎖アルブミンライブラリーを作成するためには、N-型糖鎖の量的供給と品質管理が必要となる。報告者は、基礎骨格を持つ天然のジシアロ N-型糖鎖の大量供給法を精査するとともに、このジシアロ N-型糖鎖に対して糖を順番に切り出していく（トリミング）酵素反応の条件を精査した。その

結果、非還元末端の異なる数種類の糖鎖をそれぞれグラムスケールで調製することに成功し、上記の糖鎖アルブミンライブラリーを確立することが可能となった。

さらに、このように調製した糖鎖アルブミンライブラリーを用いて、特定のがんをターゲティングする最適構造が効率的に見つけられるかどうか検討した。肺がん、結腸がん、あるいは子宮頸がんについて選択的に結合する糖鎖アルブミン分子を得ることに成功し、糖鎖アルブミンライブラリーによる DDS 探索システムの構築を完了した。

【研究開発項目②】糖鎖アルブミンの構造均一化、および単一細胞への作用と薬物動態・安全性評価

研究開発項目①で確立したライブラリーを構成する糖鎖アルブミン構造は、最初の迅速なスクリーニングには適しているが、取得した「糖鎖パターン」をもとに今後検討を進める上において、構造をより均一化することが必要である。そこで、あらかじめ数種類の糖鎖を繋いだ糖鎖ユニットをアルブミン上に修飾することで、構造が均一な糖鎖アルブミンの合成を検討した。具体的には、3,5-ヒドロキシ置換ベンゼン部分に対して「糖鎖パターン」を構成する2種類の糖鎖を導入し、これを理研クリック反応により一挙にアルブミンに導入することを試みた。その結果、構造を均一化した糖鎖アルブミンを再現性良く得ることができた。

さらに、この方法を用いて数種類の糖鎖アルブミンを調製するとともに、結腸がんに対する相互作用を検討したところ、研究開発項目①で確立したライブラリーを構成する糖鎖アルブミンと同様に、「糖鎖パターン」が発揮されることが分かった。さらに、細胞実験で強く相互作用を示した2種類の糖鎖パターンを使用し、さらにこれらを理研クリック反応で順にアルブミンに導入して、4種類の異なる糖鎖構造を持つアルブミンを調製した。その結果、糖鎖パターンを相乗的に働かせることにより、標的がんとの相互作用をさらに強めることに成功した。マウスから取り出した生のがん組織でも選択的に認識することが可能となった。このように、糖鎖の構造を均一化するだけでなく、特定のがん細胞と相互作用する4種類の糖鎖の組み合わせを迅速に最適化するスクリーニング方法を実現した。本法はより多種の糖鎖の組み合わせを持つ「糖鎖パターン」の合成にも広く適応できるため、様々なターゲットに選択的な「糖鎖パターン」をテーラーメイドで調製することが可能となった。

一方、糖鎖アルブミンの *in vivo* での安全性試験を行うため、がん相互作用するシアロ糖鎖アルブミン、ならびに生体内合成化学治療のデモ薬効評価システムとして設定した2種類の遷移金属触媒、さらにこれらの複合体（生体内で実際に機能する人工金属酵素）をそれぞれグラムスケールで調製し、ラット静脈投与における一般安全性評価を実施した。その結果、遷移金属触媒のみを単体で投与した場合には毒性が見られたものの、糖鎖アルブミンや人工金属酵素においては、生体内合成化学治療で優位な治療効果が見られる至適投与量の数10倍の投与量においても顕著な毒性は見られず、極めて安全性が高いことが分かった。金属触媒をアルブミンの疎水性ポケットで覆うことにより、触媒の安定性だけでなく、安全性も向上することを示す結果を得た。

【研究開発項目③】アルブミンの構造改変による基質汎用性の拡張と金属触媒反応の調節

下記に示すように、「ドラッグ合成」、「ドラッグ放出」、および「ドラッグ複合化」に関する3つの人工金属酵素システムを開発した。

触媒的環化反応による抗がん剤の合成（ドラッグ合成）

これまでの遷移金属触媒による薬剤活性化技術では、抗がん剤の放出（ドラッグ放出）を目指した研究がほとんどであった。そこで、より汎用性ある技術とするために、遷移金属触媒による抗がん剤の合成（ドラッグ合成）を検討した。これを実現する様々な金属触媒と基質を検討した結果、アセチレンを持つ基質に対する分子内での金触媒ヒドロアミノ化反応を開発した。この反応により、活性のないフェニルアセチレンからフェナントリジウム骨格を持つ抗がん活性物質の合成が可能となった。

さらに、ルテニウム触媒メタセシス反応に続く脱水環化反応を経た、生体内での芳香環化合物の合成にも成功した。この反応により、薬剤構造に普遍的に含まれる芳香環部分を構築して抗がん活性を発揮させることが可能となった。ルテニウム触媒を持つ人工金属酵素の場合には、全血中でも高い触媒活性を持つことが分かり、人工金属酵素が「生体内合成化学治療」に使用しうることを示すことができた。

触媒的脱保護による抗がん剤の放出（ドラッグ放出）

遷移金属触媒をトリガーとしたプロドラッグ法は現在盛んに検討されているが、異なる官能基（保護基）を選択

的に脱保護し分ける遷移金属触媒の例はない。そこで、ルテニウムやパラジウム触媒に独立して、金触媒で脱保護できる保護基として、2-アルキニルベンズアミド基 (Ayba 基) を新たに開発した。抗がん剤であるエンドキシフェンやドキシソルビシンに対して Ayba 基や Alloc 基、あるいは Proc 基を別々に導入し、金属触媒を使い分けることにより、薬剤を選択的に活性化することができた。

Ayba 基を使用するもう 1 つの利点として、Ayba 基に存在するアセチレンの末端を介して様々な置換基や官能基を導入しても、効率的に金触媒で脱保護できる点である。これにより、様々な置換基を導入することでプロドラッグの特性を自在に変化させることが可能となった。例えば、ドキシソルビシンに対してサイズが大きく親水性である Ayba 誘導体を導入することによって、このプロドラッグ自体が細胞膜を通り抜けることができないために、ドキシソルビシンの活性を完全に消失させることができた。一方で、金触媒で脱保護を行うことによって初めて細胞膜を通過することが可能となり、抗がん活性を示してがん細胞を治療することに成功した。このように、金属触媒に高選択的・敏感であり、さらにプロドラッグの物性を自在に制御できる初めての技術を開発した。

抗がん活性物質の触媒的複合化 (ドラッグ複合化)

次項、目標④のインビボでの研究で詳細に示した。

【研究開発項目④】 がん治療効果と従来技術との比較検討

研究開発項目③で開発した人工金属酵素システムを用いて、下記の細胞、ならびに動物モデルでの治療効果を評価した。

触媒的環化反応による抗がん剤の合成 (ドラッグ合成)

上記、研究開発項目③で開発したアセチレンへの金触媒ヒドロアミノ化反応に基づいて、肺がん細胞を用いた抗がん活性物質の触媒合成と治療効果を検討した。その結果、肺がん細胞表面、あるいは細胞内で人工金属酵素を駆動させることにより、デザインした前駆体からフェナントリジウム抗がん活性物質を合成し、標的のがん細胞で選択的に強い障害性を与えることに成功した。

一方、同様にルテニウム触媒メタセシス反応を経た芳香環形成反応を利用して (研究開発項目③の進捗を参照)、子宮頸がんに対してチューブリン阻害剤を合成し、強力ながん細胞障害性を与えることに成功した。この例では、薬剤前駆体から薬剤に変換されることにより、活性が 1,000 倍向上させることができた。さらにマウスの担がんマウスを用いた検討も行い、静脈注射によりがんを顕著に縮小させることに成功した。世界で初めてマウスのがんで抗がん剤を触媒的に合成して治療することに成功した。

がん組織への抗がん活性物質の触媒的複合化 (ドラッグ複合化)

さらに報告者は、マウスの腹腔内に播種したがん細胞に対して、糖鎖付加工人金属酵素とプロパルギル基を持つ抗がん剤を投与することにより、がん細胞表面で金触媒アミド化反応を高選択的に実現した。このように生体内のがん表面に抗がん活性物質を結合 (タギング) させることにより、薬剤ががんで濃縮されるとともに、その薬効ががんで選択的に増強され、副作用を起こさずにがん転移の阻害や増殖を抑えることに成功した (「タギング治療」と命名した)。さらに金属触媒やターゲティング分子をより精査することにより、タギング治療の効率性を著しく向上させることに成功した。マウス内のがんに独自に開発したペプチドをタギングすることで、1 回の静脈投与で効果的ながん治療を可能とした。

遺伝子変異を持つがんの標的化と治療

さらに本項では、本研究課題の総まとめとして、①-④全ての研究開発項目の技術を総合し、抗体では成し得ない特定の遺伝子変異を持つがんの高選択的なターゲティングと生体内合成化学治療に成功した。細胞株に加えて、PDO や PDX マウスを用いた検証実験にも成功した。このように、(1) ライブラリーから標的のがんに対して最適な糖鎖アルブミンを取得し、(2) 細胞株、(3) 細胞株のマウスゼノグラフト、(4) PDO、さらには (5) PDX に対する一連の相互作用の検証と治療システムを確立し、本技術の有用性を実証した。

英文：

This research aimed at developing the technology and system for “Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry”. This therapeutic system was achieved by the following 4 technological developments. Initially, (1) we established the library system to rapidly screen the glycosylated albumins to interact with the target cancers. We then (2) prepared the structurally well-defined glycosylated albumins based on the cell affinity data and investigated the affinity and internalization properties at the cell-level, as well as pharmacokinetics and toxicity. We further functionalized the glycosylated albumin to perform the drug synthesis in vivo. Thus, (3) we loaded the transition metal catalysts onto glycosylated albumin to develop the artificial metalloenzymes to perform the desired synthetic transformations at target diseases. Finally, (4) we performed the metal-catalyzed reactions for drug synthesis, drug release, and drug conjugation, at the cancer regions to efficiently treat them.

Conventional prodrug methods mainly use the tumor-associated enzymes or tumor-specific antibodies, hence their application has been limited, namely, to specific cancer types. On the other hand, the proposed system can be used to synthesize or conjugate the therapeutic molecules at a certain cancer target directly in vivo by applying the optimized glycosylated albumins and various transition metal catalysts against the target the cancer. Once the metal catalysts are immobilized at the cancer, various synthetic transformations could be performed from the various substrates, so that their therapeutic effects could be directly evaluated in vivo. Alternatively, once the pharmacologically active, but weak molecules, such as adhesion inhibitors, are conjugated on the cancers, then their activities and drug efficacy could be enhanced and prolonged.

As such, our proposed system would significantly expand the applicability of the therapeutic molecules, which have not been recognized as “promising” drug candidates, due to the side effects, instability and/or weak activity. This research proposes the next generation of drug delivery system and drug development strategy from the field of synthetic organic chemistry.