

# 研究報告書

## 「生体内合成化学治療:動物内での生理活性分子合成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年10月～平成30年3月

研究者: 田中 克典

### 1. 研究のねらい

本研究課題では、生理活性分子の革新的な機能創出技術として、動物内での直接的な合成戦略を提起する。生理活性を示さない「原料」や「試薬」を生きている動物に導入し、生体内の特定の臓器や細胞周辺で有機合成を実施する。または特定の器官で発現する特徴的な分子をそのまま生体機能性分子へと変換する。このように、生体内での特定の場所において、特定の時間枠で目的とする生理活性分子を効率的に構築すると共に、特定の生理活性機能を発揮させ治療に貢献する。抗がん剤の副作用やペプチド安定性の問題を根本から回避し、または生体内での毒性物質を生理活性物質に変換する生体内合成研究である。本研究は、合成化学分野における10年先の研究課題を世界に先駆けて開拓するチャレンジであり、合成化学者のインビボ科学への挑戦である。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究課題では、(A)糖鎖クラスターを生体内での触媒キャリアとした、(B)生体内の特定臓器上での金属触媒反応、ならびに(C)疾患で過剰に発生する毒性分子の生体内変換反応を基盤として「生体内合成化学治療」の実現を目指した。

報告者はまず、独自に開発した「理研クリック反応」を用いて、アルブミン表面のアミノ基へアスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖(N-型糖鎖)を導入し、均一、または不均一な糖鎖クラスターを調製した。これらの糖鎖構造を厳密に選択することで、特定の臓器やがんへの集積、あるいは排出経路を制御できることを見出し、「糖鎖のパターン認識」による新しいドラッグデリバリーシステムを開発した。

次いで、この糖鎖クラスターを生体内での触媒キャリアとして、目的の臓器へ触媒を運搬し、その現地で金属触媒反応を実現するとともに、抗がん活性分子などの生理活性分子を合成することに成功した。

さらに、がん組織で過剰に発生するアクロレイン分子に対して、特定のアミンやアジド基と反応させることでがんの検出分子や抗がん活性分子へと変換することに成功した。このように、2種類の生体内戦略により、創薬研究における革新的な「生体内分子技術」の概念を確立した。

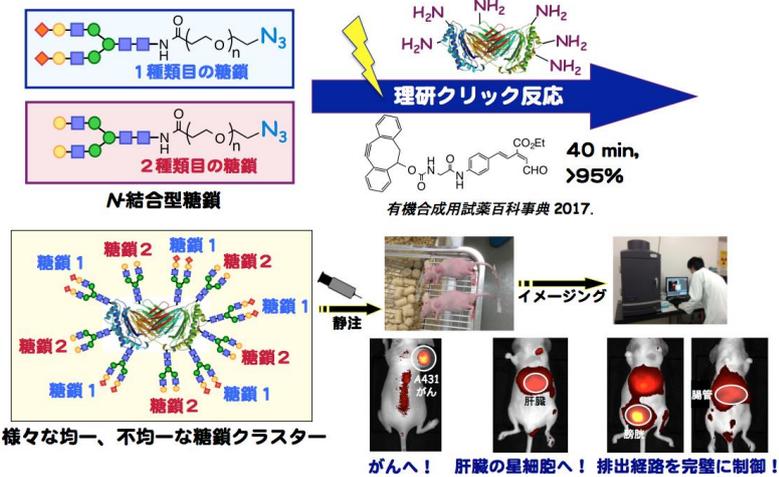
#### (2) 詳細

##### 研究テーマ A 「糖鎖導入によるタンパク質動態と集積の制御」

報告者は、独自の理研クリック反応(共役イミンの 6 $\pi$ -アザ電子環状反応)を用いて、タンパク質アミノ基への高効率な複合化分子技術を開発した(5.主な研究成果リストにおける文献1)。本反応は超高速に反応が進行するため、試薬量を厳密に調節することにより、アミノ

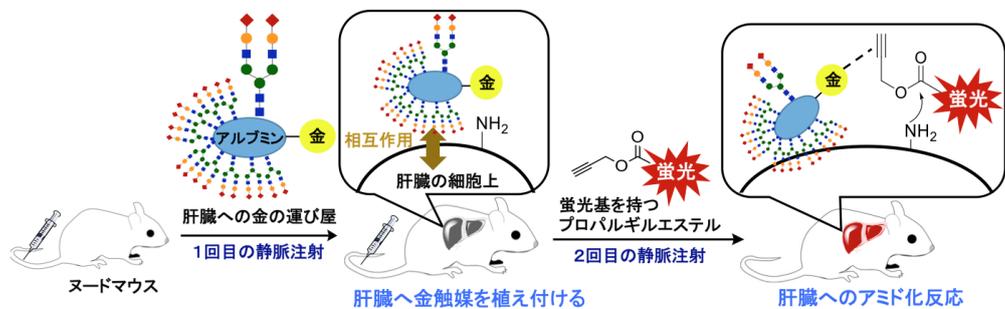
基への糖鎖導入量を制御することが可能となった。この技術により、アルブミンの表面に2種類以上のアスパラギン結合型糖鎖(N-型糖鎖)を持つ不均一な糖鎖クラスターでも自在に合成することが可能となった。これらの糖鎖クラスターを蛍光標識し、マウス内での動態を検討したところ、不均一な糖鎖構造によって特定の臓器やがん、あるいは排出を厳密に制御することを可能とした(文献2)。また、様々ながん細胞から特定のがん細胞を選択的に見分けることにも成功した。

このように、自然界で存在すると言われていた「糖鎖のパターン認識」を実験的に証明するとともに、この生体内での厳密な糖鎖認識機構を抗体やペプチドを凌駕する新しいドラッグデリバリーシステムとして開拓した。



### 研究テーマ B 「生体内合成化学治療-1:がん組織上での金属触媒カップリング合成、および動物内での生理活性ペプチド合成」

上記の研究テーマAで開発した糖鎖クラスターを「生体内での金属触媒キャリア」として活用し、マウス内の特定臓器上での金属触媒反応を検討した。



(例)肝臓での選択的な金触媒アミド化反応による蛍光標識化  
すなわち、まず N-型糖鎖構造の末端にシアル酸またはガラクトースを持つ二種類の糖鎖クラスターに対して、アルブミンの低分子リガンドを介して金触媒を結合させ、“金のキャリア(運び屋)”を調製した。これらをヌードマウスに静脈注射したところ、金触媒を30分以内に、それぞれ望む肝臓、腸管表面に植え付けることができた。次いで、蛍光基を持つプロパルギルエステルを静脈注射したところ、プロパルギルエステルは血液中を巡るが、肝臓、腸管に到達した時に、先に植え付けていた金触媒と反応して、臓器表面にあるアミノ基との間で金触媒アミド化反応を起こすことに成功した(文献3)。このように、初めてマウスの特定臓器上で金属触媒反応を実現した。

さらに報告者は、本結果を基に、生理活性分子の合成や他の金属触媒反応にも成功し、生体内での金属触媒反応による生体内合成化学治療を実現した。

研究テーマ C 「生体内合成化学治療-2: 疾患細胞で過剰生産する毒性アクロレインの生体機能性分子変換」

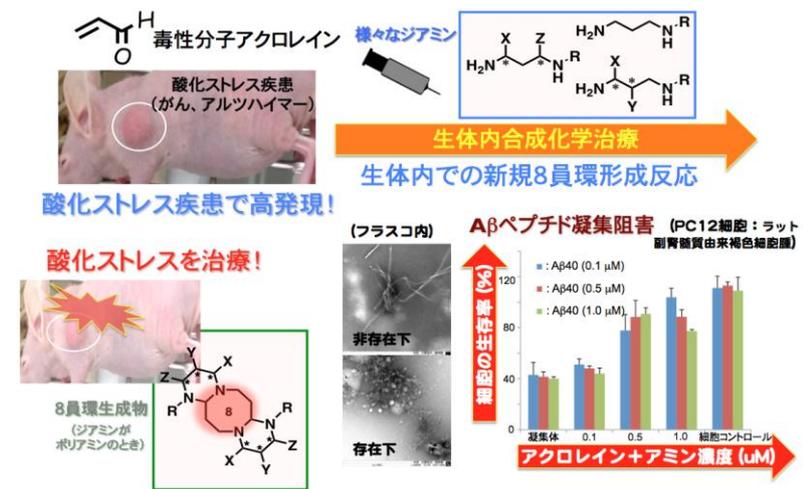
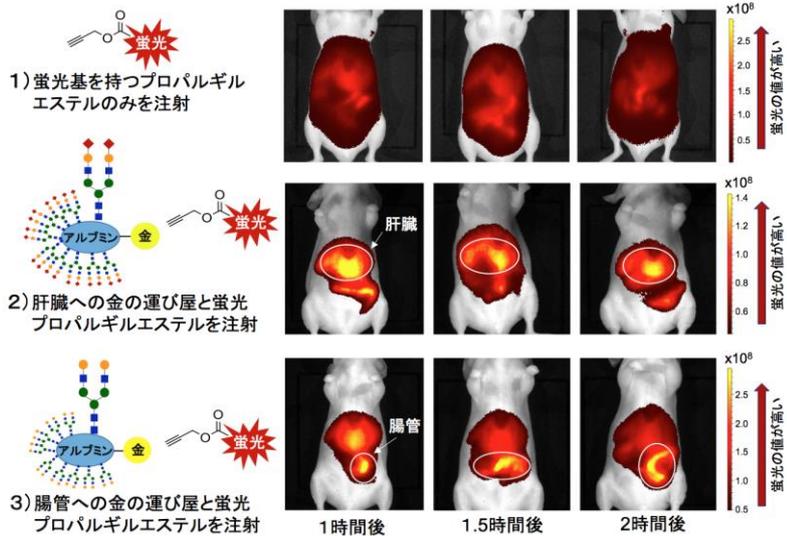
アクロレインとポリアミンとの生体内反応による生体内合成化学治療

報告者は、アルツハイマーやがん为代表される酸化ストレス疾患で過剰に生産されるアクロレインが、ポリアミン

などの水酸基やアミノ基を分子内に持つアミンと効率的に反応し、その8員環生成物が酸化ストレス条件を制御する機能を持っていることを明らかにした。特に、アクロレインとポリアミンとの反応では、8員環生成物がアルツハイマー疾患の病原となる Aβペプチドの凝集を阻害することを発見した。そこで、細胞内で直接8員環化合物を形成させ、ペプチド凝集を阻害し、細胞生存率を回復させることを検討した。ラット福腎髄質由来褐色細胞腫 (PC12 細胞) は、Aβペプチドの凝集によりその生存率が低下するが、アクロレインとポリアミンの濃度依存的に生存率を回復させることに成功した(文献4)。このように、まず細胞レベルの検討で、立案したアクロレインとポリアミンとの反応による生体内合成化学治療の可能性を示した。

アクロレインとアジドとの反応による生体内合成化学治療

さらに本研究課題において、アクロレインがアジドと生体内の夾雑物存在下で選択的に反応し、さらにトリアゾリン生成物が細胞内に効率的に取り込まれることを発見した。またこの現象を有効に活用することで、生細胞内でアクロレインを検出する方法へと展開するとともに、がん細胞でアクロレインが過剰に発生することを初めて実験的に証明した(文献5)。トリアゾリン生成物は細胞内に取り込まれた後、細胞内の酸性により不安定なジアゾ化合物へと速やかに変換され、細胞内や表面の様々な分子と共有結合を形成した結果であることが示唆された。



提唱した機構でアクロレイン・アジド付加生成物が細胞内に取り込まれて細胞の生体分子と反応するならば、がん細胞に単にアジド分子を導入することで選択的にがんを殺傷できるのではないかと考えた。そこでがん細胞に対してアジド、ならびにアクロレインとの付加体(トリアゾリン)を作用させて、細胞毒性を検討したところ、トリアゾリンを導入した細胞で、濃度依存的に細胞毒性を示した。さらに、アジド化合物の構造を最適化することにより、動物実験でもがんを壊死させることに成功した。このように、報告者が開発した生体内でのアクロレインクリック反応を活用して、疾患で過剰に発生する毒性分子の生体内変換反応を基盤とした「生体内合成化学治療」を実現した。

(アクロレインクリック反応の発見)

10 μM, 室温, 30分  
~50%

(1) 生成物が安定に存在  
(2) 生成物が細胞内に入ってくる

コントロール      タバコの煙存在下      H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下

アクロレインを数pMレベルで検出できる初めての分子技術

↑ アクロレイン生成量

蛍光アジド分子の量 (μM)	蛍光強度
0	0
3	~10
6	~20
12	~40
24	~80

蛍光アジド分子の量 (μM)	蛍光強度
0	0
3	~10
6	~20
12	~40
24	~80

蛍光アジド分子の量 (μM)	蛍光強度
0	0
3	~0
6	~0
12	~0
24	~0

毒性分子アクロレイン + アジド → クリック生成物

生体内合成化学治療

がんを高発見      アクロレインクリック反応

がんを治療する

### 3. 今後の展開

**研究テーマ A 「糖鎖導入によるタンパク質動態と集積の制御」**のテーマで実現した「糖鎖パターン認識」による選択的な細胞や生体組織へのターゲティング技術は、次世代のドラッグデリバリーシステムとして製薬会社や医療診断現場から大きな注目を集めている。既に(株)糖鎖工学研究所と共同で理研敷地内(埼玉県和光市)に企業との融合連携研究室を設置して共同開発を始めており、他社を巻き込んだプロジェクトが始まっている(2017年4月1日)。糖鎖クラスターを抗体に代わる薬剤や RI のドラッグデリバリーシステム担体(ミサイル療法)として5~10年を目処に市場化する。

**研究テーマ B 「生体内合成化学治療-1:がん組織上での金属触媒カップリング合成、および動物内での生理活性ペプチド合成」**のテーマで実現した、生体内での金触媒反応によるアミド化反応は、さらに疾患組織での「分子充填治療」へと発展させる。すなわち、疾患組織上に糖鎖やペプチドなどの生理活性分子を複合化することによって、「疾患で不足する生理活性分子を補って治療する」新しいコンセプトとその分子技術を打ち出す。さらに糖鎖クラスターによる触媒キャリアに対して、他の様々な金属触媒、あるいは酵素についても導入することを検討し、生体内で汎用的かつ自在に金属触媒反応を実現して創薬研究を行ったり、抗体に変わる次世代のプロドラッグを開拓する。

一方、**研究テーマ C 「生体内合成化学治療-2:疾患細胞で過剰生産する毒性アクロレイン**

の生体機能性分子変換」のテーマで見出したアクロレイン環化反応やアクロレイン・アジドクリック反応については、アミンやアジドの構造をさらに展開して次世代の生体内創薬研究へと繋ぐ。細胞内へ選択的に導入されるシグナル分子や抗がん活性分子と複合化させることにより、より選択的に特定の疾患を殺傷する戦略へと発展させる。特に、生体内での夾雑物存在化で高選択的に進行するアクロレイン・アジドクリック反応は、「治療」戦略にとどまらない。アクロレインはがんを始めとする様々な酸化ストレス疾患で高発現しているため、体内診断や対外診断も視野に入れた幅広い検討を行い、「生体内での有機合成化学による医療診断」の概念を一般化する。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

報告者のさきがけ研究の成果は以下の3つに集約される。

- (1) 特定の疾患やがん、あるいは排出経路を高度に制御する糖鎖クラスタードラッグデリバリーシステムを開発した。
- (2) 生きている哺乳類の中で選択的に金属触媒を起こすことに成功し、臓器選択的に分子を合成できることを世界に先駆けて実証した。
- (3) 酸化ストレス疾患で過剰発現する毒性物質アクロレインをがん組織で選択的に抗がん剤に変換することに成功した。

今後さらに発展するビッグデータやインシリコ、あるいは AI の開発により、従来からの創薬研究がますます加速されると考えられる。一方で、報告者がさきがけ研究で確立した「生体内合成化学治療」により、毒性や安定性のために動物実験でドロップアウトしてきた分子に再度注目し、その特性を再び取り戻し、活性を引き出すという新たな可能性が生まれる。今後10年後には、過去20年間で見出されてきた分子構造を生体内で見直す、という報告者の分子技術の重要性が増してくると予想される。創薬化学やドラッグデリバリーシステムにおける「分子開発のルネッサンス」である。実際に最近では、これまでフラスコ内で実施されてきた有機合成反応を、細胞表面や細胞内で積極的に実施しようとする挑戦的な研究が進められている。これまでのドラッグデリバリーシステムを、細胞での有機反応によって置き換えようという研究であり、米国ではベンチャーが開始されつつある状況にある。しかし、現状では細胞レベルやゼブラフィッシュでしか達成されていない。報告者が実現した哺乳類での研究は、他の追従を許さない。

さきがけ研究の過程で、オールインワン顕微鏡を購入し、さらに国内外の他研究施設に研究補助員を常駐させることで効率的に細胞や動物実験を進めることができた。一方、国際強化支援策を利用させていただき、マックスプランク研究所やロシアカザン大学と連携を組むことで、研究を一層促進させるとともに国内外に「生体内合成化学」の概念を広めることができた。さらにさきがけの成果をもとに、企業との連携研究室を開設して、社会実装に向けた検討も始めている。実際にさきがけ研究で達成した分子技術の1つは、近い将来に様々な医療診断機関で使用される可能性が大きい。このような成果から、さきがけ研究の目的を十分達成したと自己評価する。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本さきがけ研究者は、独自の糖鎖クラスターを効率的なドラッグデリバリーシステムとして活用して、マウス内での合成研究を進め、当初計画した生体内合成化学治療を実現した。領域会議では、特に企業のアドバイザーの指摘を受けながら、治療に関わらず診断への展開にも踏み込んだ研究を展開し、実際に企業との連携研究室を開設するなど、ライフサイエンスにおける新しい分子技術を提供した。

さらに、JST新技術説明会やSciFoSへの参加がきっかけとなり、企業と共同して国内外の医療診断現場への適応が急ピッチで進められている。このように、基礎技術開発に留まらず、世界中の患者を救う大きな可能性を秘める分子臨床技術を実現した。

本さきがけで確立した生体内での合成分子技術は、現在国内外で注目を集めており、研究成果リストから見られるように、国際誌の表紙や重要な国際講演に多数招待されている。さらに糖鎖科学関連分野で著名な国際賞を日本人として初めて受賞している。本研究者のさきがけ研究の成果が、事業化へと発展する期待も大きい。このように、本さきがけの成果によって、ライフサイエンス分野の若手トップランナーの1人として注目され、研究者として大きな飛躍を果たした。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. K. Fujiki, **K. Tanaka**, RIKEN Click Reagent for Protein Labeling, *e-EROS* (有機合成用試薬百科事典), **2017**, in press. **[Selected Contribution]**
2. L. Latypova, R. Sibgatullina, A. Ogura, K. Fujiki, A. Khabibrakhmanova, T. Tahara, S. Nozaki, S. Urano, K. Tsubokura, H. Onoe, Y. Watanabe, A. Kurbangaliev, **K. Tanaka**, Sequential Double “Clicks” Toward Structurally Well-Defined Heterogeneous N-Glycoclusters: The Importance of Cluster Heterogeneity on Pattern Recognition In Vivo, *Adv. Sci.*, **2017**, 4, 1600394. **[Journal Cover] [Very Important Paper]**
3. K. Tsubokura, K. K. H. Vong, A. R. Pradipta, A. Ogura, S. Urano, T. Tahara, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Nakao, R. Sibgatullina, A. Kurbangaliev, Y. Watanabe, **K. Tanaka**, In Vivo Gold Complex Catalysis Within Live Mice, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 3579-3584. **[Journal Cover] [Hot Paper]**
4. A. Tsutsui, T. Zako, T. Bu, Y. Yamaguchi, M. Maeda, **K. Tanaka**, 1,5-Diazacyclooctanes, as Exclusive Oxidative Polyamine Metabolites, Inhibit Amyloid- $\beta$ (1-40) Fibrillization, *2016, Adv. Sci.*, 3, 1600082. **[Journal Cover]**
5. A. R. Pradipta, M. Taichi, I. Nakase, E. Saigitbatalova, A. Kurbangaliev, S. Kitazume, N. Taniguchi, **K. Tanaka**, Uncatalyzed Click Reaction between Phenyl Azides and Acrolein: 4-Formyl-1,2,3-Triazolines as “Clicked” Markers for Visualizations of Extracellular Acrolein Released from Oxidatively Stressed Cells, **2016**, *ACS Sens.*, 1,

623-632.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 2件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 国際招待講演:**K. Tanaka**, Therapeutic In Vivo Synthesis by Glyco carriers, 249th ACS National Meetings, Division of Carbohydrate Chemistry, Horace S. Isbell Award 受賞講演, 2015.3.22 (Denver, Colorado).
2. 国際招待講演:**K. Tanaka**, Click Chemistry for Theranostic Glycoconjugates: In Vivo Pattern Recognition Using “Strong” and “Weak” Interactions, 251st ACS National Meeting & Exposition, Symposium in honor of Professor Sharpless's 75th Birthday, 2016.3.16 (San Diego).
3. 国際受賞: 米国化学会 Division of Carbohydrate Chemistry, Horace S. Isbell Award 受賞(2015年)  
[http://www.riken.jp/pr/topics/2014/20141023\\_2/](http://www.riken.jp/pr/topics/2014/20141023_2/)  
<http://carb.sites.acs.org/isbellawardees.htm>
4. プレスリリース: 狙った臓器で金属触媒反応を実現 一体内の疾患部分で薬を直接作る研究に大きな一歩  
[http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170215\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170215_1/)  
[http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170215\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170215_1/)  
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1521-3773/homepage/press/201706press.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1521-3773/homepage/press/201706press.html)
5. プレスリリース: 糖鎖は不均一であることが重要 ー糖鎖特有の分子認識機構をマウスで解明ー  
[http://www.riken.jp/pr/press/2016/20161128\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20161128_1/)  
[http://www.riken.jp/en/pr/press/2016/20161128\\_1/](http://www.riken.jp/en/pr/press/2016/20161128_1/)  
<http://www.advancedsciencenews.com/glycocluster-design-lead-targeted-drug-delivery/>