

ウレアベンゼン誘導体の自己集合化挙動とアミロイド凝集体形成阻害効果

瀧 靖史、小林 茂樹、唐澤 悟

薬品分析化学研究室

Self-Assembly Behavior and Inhibition of Amyloid Aggregate Formation using Urea Benzene Derivatives

Yasufumi FUCHI, Shigeki KOBAYASHI, Satoru KARASAWA

要旨

本研究では両親媒性側鎖の長さが異なるウレアベンゼン (UBD) 誘導体 3 種類を合成し、それらの水中における自己集合化挙動とナノ微粒子形成について評価した。さらに水溶液を加温することによって、自己集合体がナノ粒子からマイクロ粒子へと肥大化することが見出された。本論文ではこれら UBD 誘導体の自己集合化挙動について詳細に調べた成果を述べる。またアルツハイマー病の病理学的要因とされるアミロイド (A β) 凝集体に対する、UBD 誘導体の凝集阻害作用についても検討したので報告する。

キーワード：ウレアベンゼン、自己集合化、ナノ微粒子、LCST、アミロイド凝集体

I. はじめに

薬学部に所属する研究者にとってゲルやナノ微粒子といった分子集合体及びポリマーはあまり馴染みが無いように感じられるが、実際は理学・工学の分野だけでなく医薬の分野でもいわゆるソフトマテリアルとして幅広く応用されている。例えばハイドロゲルは、人工関節や人工角膜、ステントなどに応用されている^{1,2}。また機能性ナノ微粒子は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) において重要な役割を担っている³。細胞間隙の大きい腫瘍組織 (10-500 nm) においてナノ微粒子が集積しやすい性質 (EPR 効果) を利用して^{4,5}、抗がん剤をナノ微粒子で内包し標的選択的に薬物放出できるシステムが汎用されている。

一方で生体内においては、自己集合化した分子凝集体がパーキンソン病やプリオン病、アルツハイマー病のような「アミロイド病」の原因となることが知られている⁶。特にアルツハイマー病患者の脳内においては、39-43 残基のアミノ酸から構成されるアミロイ

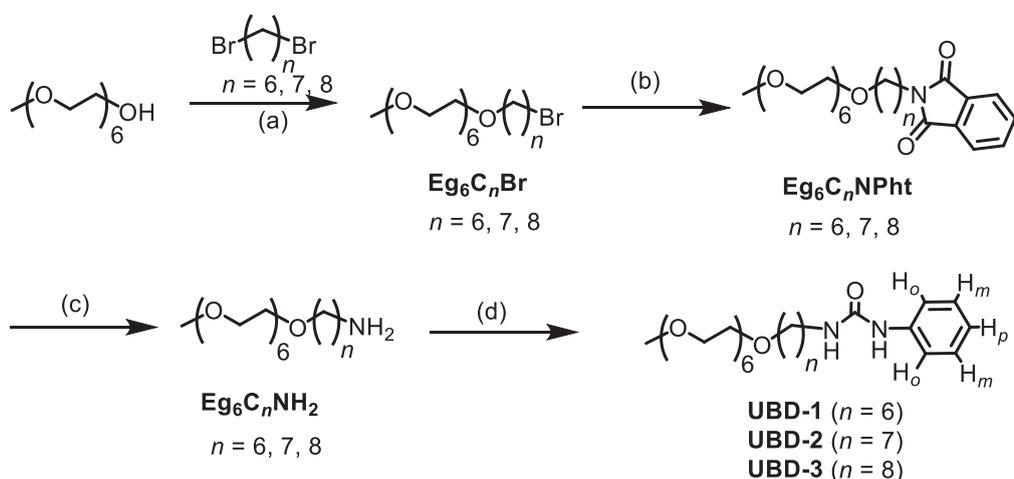
ドβ (Aβ) ペプチドが自己集合化して線維化したアミロイド凝集体が蓄積して病因になるとされている⁷。この Aβ凝集体形成を阻害できる薬剤はアルツハイマー病治療薬として期待されるため、低分子化合物からナノ微粒子まで様々な物質が研究されている⁸。

我々の研究室では医薬分野への応用を目指して、ウレアベンゼンを基本骨格にもつ誘導体 (UBD) を用いた分子集合体の研究を行ってきた。UBD は水中で自己集合化してナノ微粒子を形成するだけでなく、温度上昇に伴って透明だった水溶液が濁り、より大きなマイクロ微粒子を形成する現象を見出した⁹。このような分子の温度依存的な自己集合化現象は、下限臨界溶液温度 (LCST) 以上の温度で誘導され、水中における分子の脱水和が鍵とされている。我々はさらに UBD を応用して様々な機能性マテリアルを開発してきた。その 1 種であるラジカル修飾した UBD 型ナノ粒子は、Gd (ガドリニウム) を用いない新たなメタルフリー造影剤としての有用性を示した¹⁰。また UBD 骨格に対して我々の研究室で開発された蛍光性キノリン分子¹¹ TFMAQ[®] を付与したナノ微粒子を用いて、EPR 効果による腫瘍組織の *in vivo* 蛍光イメージングにも成功した¹²。以上の知見を基に本研究では、構造を単純化して異なる長さの炭素鎖 (hexyl C6, heptyl C7, octyl C8) を有する UBD 誘導体 (UBD-1-3) を用いて、自己集合化挙動を調べた¹³。また、それらを用いて水中における Aβ凝集阻害作用についても調べたので報告する。

II. 方法、結果、考察

2-1. UBD-1-3 の合成

両親媒性側鎖 (ヘキサエチレングリコール) を有する UBD-1-3 の合成は、Scheme 1 に示す経路に従って行った。ヘキサエチレングリコールを出発原料として、Williamson エーテル合成法により炭素鎖の異なるブロモアルキルを導入し、Gabriel アミン合成法によりアミノ基へと変換した。最後にフェニルイソシアネートと反応させることで、ウレア基を構築した目的の UBD-1-3 を得た。



(a) dibromoalkane, NaH, THF; (b) potassium phthalimide, DMF; (c) hydrazine monohydrate, EtOH; (d) phenyl isocyanate

Scheme 1. UBD-1-3 の合成経路

2-2. UBD-1-3 の水中における自己集合化挙動の評価

2-2-1. D₂O 中における ¹H-NMR スペクトルと凍結乾燥後の IR スペクトル

合成した **UBD-1-3** を用いて水中 (D₂O) における自己集合化挙動を、¹H-NMR スペクトルによって観測した。また濃度依存的なスペクトル変化測定により、臨界凝集濃度 (CACs) を算出した。**UBD-1** (Figure 1a) のスペクトル変化に着目すると、0.25 mM から 20 mM までの間では NMR 化学シフト値の変化がほとんどなく、この濃度の間では **UBD-1** が水溶液中でモノマーの状態で溶解していることが示唆された。しかし 20 mM 以上の濃度では 1.1-1.6 ppm 付近のアルキル鎖、3.0-3.7 ppm 付近のエチレングリコール鎖及び 6.9-7.5 ppm 付近いくつかのフェニル基由来のピークが高磁場シフト (遮へい化) することが観測された。またウレアベンゼン環中のオルト位プロトン (H_o) については低磁場シフト (反遮へい化) することが観測された。一般的に ¹H-NMR における遮へい化は凝集体形成に由来し¹⁴、反遮へい化についてはウレア基同士の分子間水素結合相互作用によるものと考えられる¹⁵。次にウレアベンゼン環中のメタ位プロトン (H_m) の化学シフト値と濃度をプロットして CACs を求めた結果、**UBD-1** では 16 mM と算出された。また **UBD-2, 3** についても同様に CACs を求めた結果、それぞれ 9.0、2.0 mM と算出され、両親媒性側鎖の脂溶性が大きくなるにつれて CACs が低くなること明らかとなった (Figure 1b)。

¹H-NMR の濃度依存性によって、分子間相互作用を伴った会合体形成が明らかとなった。一般的に、ウレア基を有する化合物は水素結合が支配的になり会合体を形成する。水素結合能を評価する目的で、凍結乾燥試料を用いて、IR スペクトルのウレア基のアミド I と II 伸縮の波数から、水素結合の有無と強さを見積もった。その結果、**UBD-1-3** のア

ミド I と II の波数の差はそれぞれ、145, 143, 139 cm^{-1} であり、分子間の水素結合は生じているものの、それほど強い力で働いてはいなかった^{16,17}。しかしながらこの大きさは、微粒子形成には十分な大きさであった。

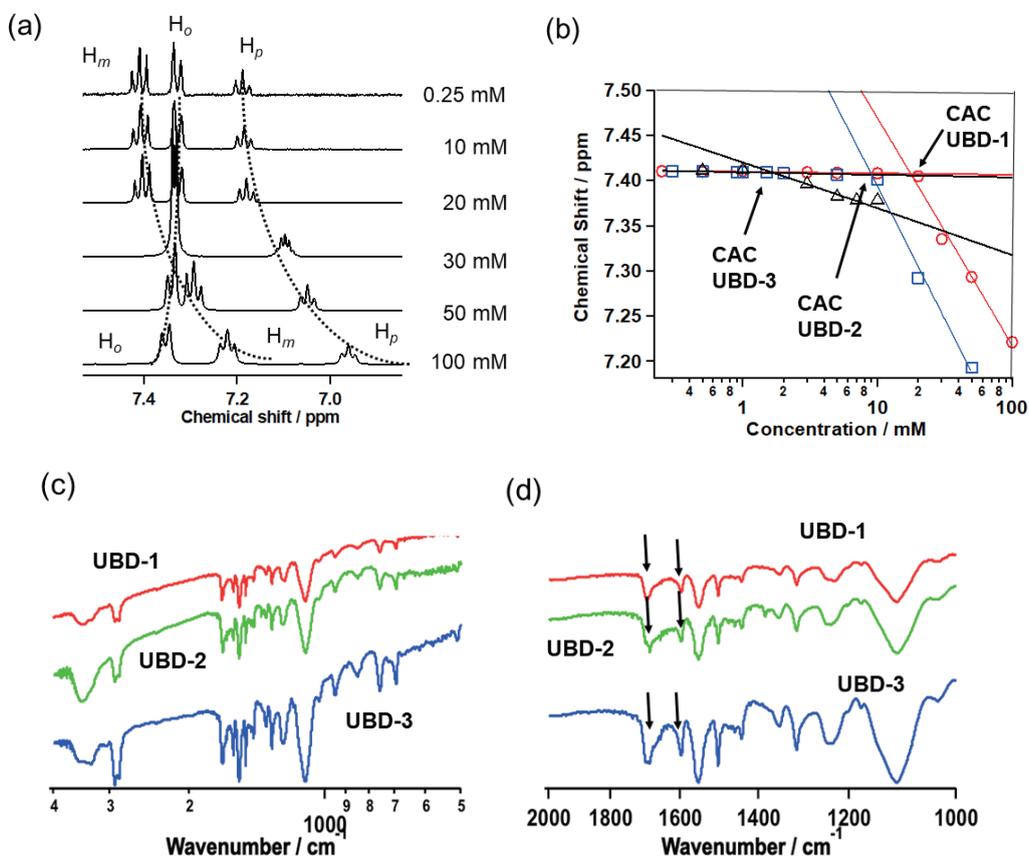


Figure 1. UBD-1 の D_2O 中における ^1H -NMR 変化. (a) 6.5-7.8 ppm 間の拡大図 (b) UBD-1-3 の H_m 化学シフト値変化プロット。

凍結乾燥サンプルを用いた IR 測定. (c) 4000 – 400 cm^{-1} , (d) 2000 – 1000 cm^{-1} 。矢印はアミド I と II 伸縮を表している。

2-2-2. UBD 誘導体の粒子径分布

UBD-1-3 の水溶液中における粒子径分布を動的光散乱法 (DLS) により測定した。20 mM の UBD-1 水溶液では 20 $^{\circ}\text{C}$ において流体力学直径 (D_H) が約 30 nm を示した。さらに溶液の温度を 90 $^{\circ}\text{C}$ まで上昇させると、 D_H がおよそ 200 nm まで増大し、温度依存的に粒子径が肥大化することが示唆された。また 10 mM 水溶液中における UBD-2, 3 の粒子径分布についても DLS 測定により観測した。20 $^{\circ}\text{C}$ においては UBD-2, 3 の粒子径はそれぞれおよそ 20, 70 nm と算出され、30 $^{\circ}\text{C}$ 以上の溶液ではおよそ 1500, 4000 nm

となり、**UBD-1** よりも粒子径がさらにサイズアップしていることが明らかとなった。

2-2-3. UBD 誘導体の粒子形態観察

UBD-1-3 の粒子形態を、酢酸ウランをネガティブ染色剤として用いて透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察した。試料の前処理については、銅グリッド上に 23 °C で試料の水溶液を滴加し、乾燥後直ちに観測を行った。**Figure 2** に示すように、**UBD-1-3** の直径は、約 10-80 nm の球状構造を形成していることが明示された。得られた直径は、DLS で得られた値とよく一致していた。

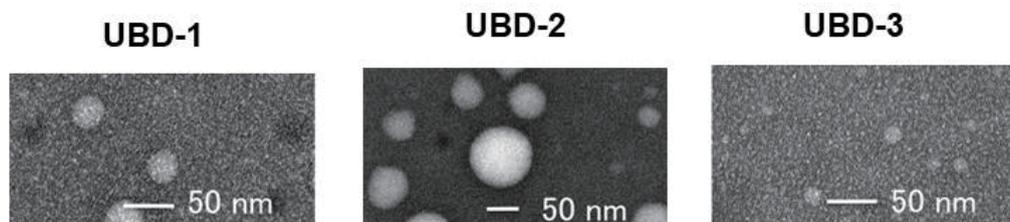


Figure 2. UBD 誘導体のネガティブ染色で得られた TEM 画像。スケールバーは 50 nm を表す。

2-2-4. LCST 現象の観測

我々が以前開発したウレアベンゼン誘導体の水溶液は、加熱に伴って溶液が白濁する現象 (LCST 現象) を見出されていた。本研究で合成された UBD 誘導体についても同様の現象が観測されたため、加熱により誘起されるナノ微粒子の自己集合化挙動について、温度可変の光透過率測定により調べた。その結果、10、15、20 mM の **UBD-1** 水溶液において加熱により急激な光透過率減少が観測され、LCST がそれぞれ 71、51、38 °C と示された (**Figure 3a**)。すなわち UBD 溶液濃度上昇に伴って LCST も上昇することが明らかとなった。**UBD-2** と **3** の同様な測定結果を **Figure 3b** と **c** に表す。**UBD-1-3** の挙動を比較するため、10 mM 水溶液中における温度依存的透過率変化を **Figure 3d** に表す。10 mM 水溶液中の LCST が **UBD-1** で 51 °C、**UBD-2** で 29 °C、**UBD-3** で 23 °C において観測された。各誘導体の ¹H-NMR より測定された CAC と、様々な濃度における LCST を **Table 1** に集約した。この表の結果より CAC は **UBD-1 > -2 > -3** となっており、任意の濃度における LCST は **UBD-1 > -2 > -3** であることが示された (10 mM においてそれぞれ 71、29、23 °C)。つまりアルキル側鎖が長いほど低濃度で凝集 (自己集合化) し、より低温で LCST 現象を引き起こすことが明らかであった。以上の結果から UBD 誘導体は、水溶液中での疎水性相互作用を増強させることによって、自己集合化が誘発しやすくなることが示唆された。

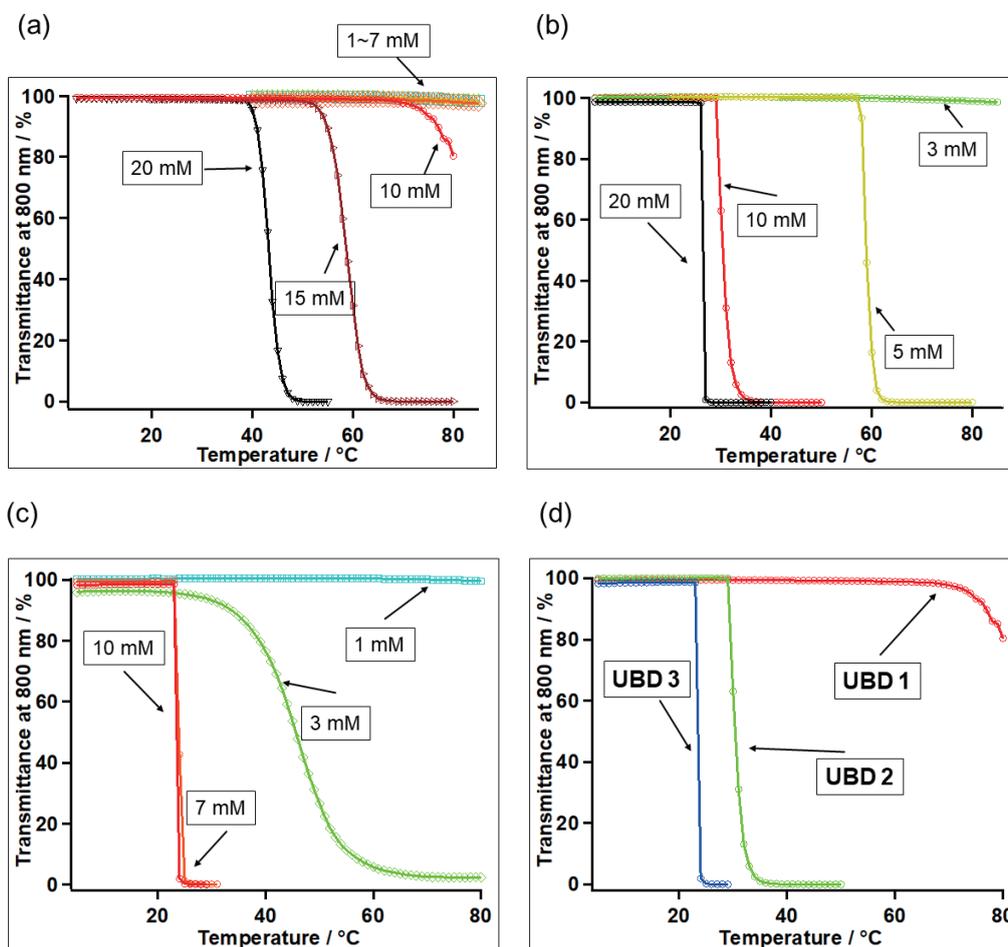


Figure 3. 溶液の温度可変光透過率測定による LCST 評価. 様々な濃度における (a) UBD-1、(b) -2、(c) -3 の温度可変光透過率測定 (d) 10 mM 濃度における UBD-1-3 比較

Table 1. UBD 誘導体の CAC 及び LCST 測定結果

	UBD-1	UBD-2	UBD-3
		CAC	
	16 mM	9 mM	2 mM
Concentration / mM		LCST	
20	38 °C	26 °C	-
15	51 °C	-	23 °C
10	71 °C	29 °C	-
7	>80 °C	-	23 °C
5	>80 °C	57 °C	-
3	-	>80 °C	27 °C
1	>80 °C	-	-

2-2-5. UBD 誘導体の自己集合化メカニズム

UBD 誘導体の自己集合化挙動について各種測定法により評価した結果、アルキル鎖が長くなる (C6、C7、C8) につれて CAC 及び LCST が低くなることから、水溶液中における疎水性相互作用が自己集合化挙動と関連していることが示唆された。これらの結果より UBD 誘導体の水溶液中における自己集合化挙動について、我々は以下のメカニズムを立てた (Figure 4)。まず UBD は CAC 付近濃度において水溶液中でモノマーとナノ微粒子の平衡状態をとっている。このときのナノ微粒子はウレア基による分子間水素結合と、アルキル基及びベンゼン環部の分子間で疎水性相互作用や π - π スタッキング相互作用により形成されていると考えられる。さらに加熱することで分子運動が増大するため、ナノ微粒子内の水分子 (エチレングリコール鎖に取り込まれていた水分子) が脱水してより集合化したマイクロ微粒子との平衡状態となり、溶液が白濁する LCST 現象が観測されると考察した。

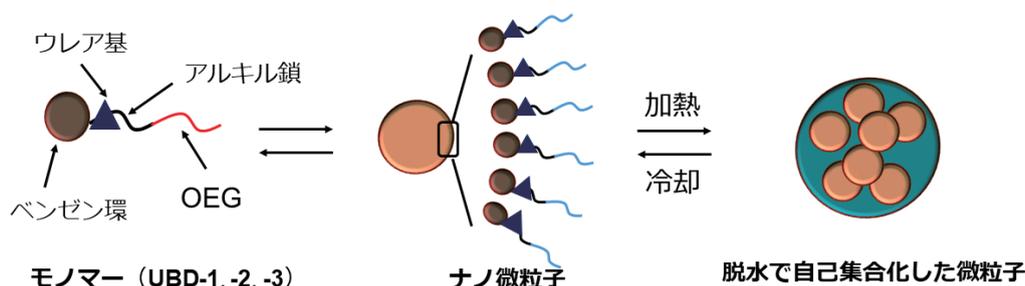


Figure 4. UBD 誘導体の水溶液中における自己集合化メカニズム

2-2-6. UBD 誘導体のアミロイド凝集体形成阻害評価

次に UBD 誘導体を用いて、水溶液中における $A\beta_{1-42}$ ペプチドの凝集体形成に対する阻害効果を評価した。 $A\beta_{1-42}$ ペプチド ($A\beta_{42}$, 25 μM) を pH 7.4 の Tris 緩衝液中 37 $^{\circ}\text{C}$ にて UBD-1-3 共存下 (10 または 100 μM) で 5 日間以上インキュベーションし、任意の時間における溶液に蛍光試薬チオフラビン T (ThT) を添加して蛍光強度 (490 nm) を測定した。コントロールとして調製した $A\beta_{42}$ ペプチドのみの溶液では、インキュベーション時間経過に伴いアミロイド凝集体が形成するため、ThT と結合することで蛍光発光強度増加が観測された (Figure 5 青棒)。UBD-1 共存下では 72 時間後に大きな差は見られなかったが、122 時間後において共存下で僅かに蛍光強度が減少し、若干の凝集体形成阻害効果が示された (Figure 5a)。UBD-2 共存下では 122 時間後において明らかな蛍光強度減少が観測され、コントロールと比較しても大きな差があるため阻害効果が強いことが示唆された (Figure 5b)。一方 UBD-3 共存下では、122 時間以上インキュベーションしてもコントロールとほとんど差がなく、阻害効果が弱いことが示唆された (Figure 5c)。

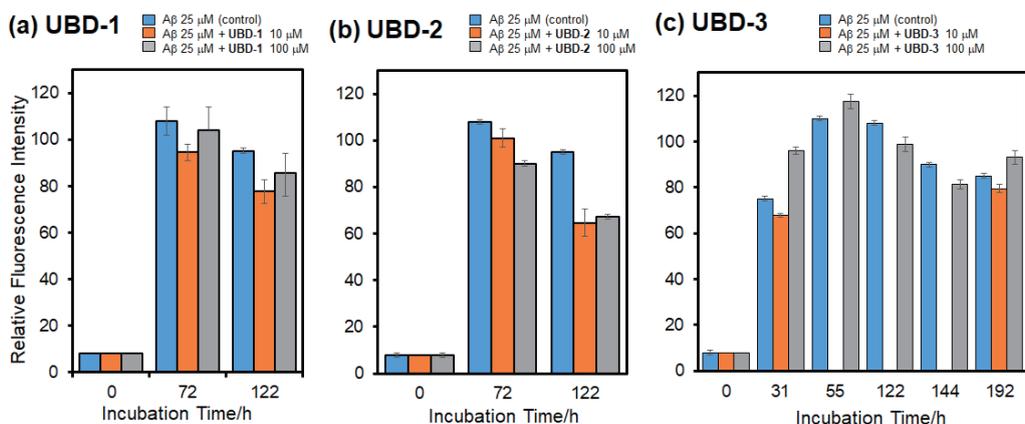


Figure 5. UBD 誘導体による Aβ凝集体形成阻害評価 (a) UBD-1 共存下、(b) UBD-2 共存下、(c) UBD-3 共存下における各時間のチオフラビン T 蛍光強度比較

UBD 誘導体による阻害効果の差について未確定ではあるが、我々は分子の疎水性に着目して以下のように 2 種類の可能性で考察した。まず Aβペプチドが凝集する際に、2つのフェニルアラニン残基における疎水性相互作用が重要であることが知られており¹⁸、この部位への結合が UBD-2 で最適な疎水性を有していた可能性が考えられる。もしくは、UBD-3 が低温・低濃度で自己集合化しやすい (Table 1) ことが示されているため、UBD-3 粒子自体が ThT を取り込み蛍光発光している可能性も考えられた (Figure 6)。本文中には記載していないが、後者に関するコントロール実験 (UBD のみでインキュベーションして ThT 蛍光強度測定) を行っており、全く蛍光発光を示さないことを確認している。このことから前者で記したように、UBD-2 の疎水性が Aβ凝集体形成阻害の際に最適であることが予想された。

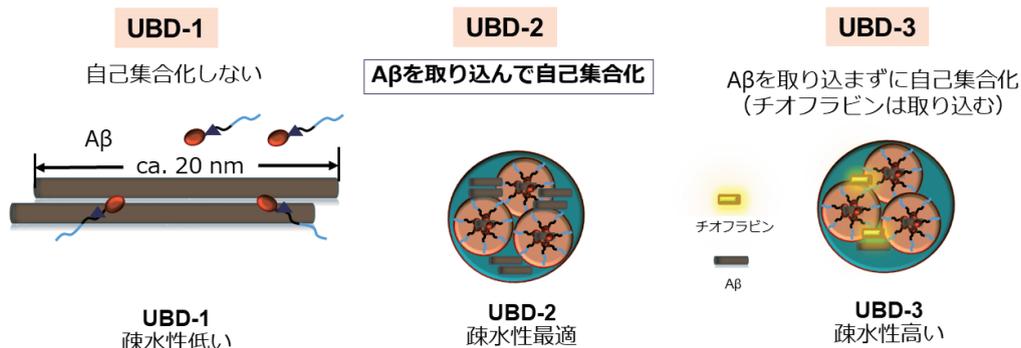


Figure 6. Aβ凝集体形成阻害の違いについての予想メカニズムと生じた蛍光強度の差に対する解釈

III. 結論

本研究で合成及び機能性評価した **UBD-1-3** は、水溶液中 CAC 以上の濃度において球状のナノ微粒子を形成することが示された。またアルキル鎖が長いほど (**UBD-1 < -2 < -3**) 疎水性が増加し、CAC 及び LCST が減少するため自己集合化しやすいことが明らかとなった。さらに **UBD-2** は、UBD 誘導体の中で最も A β 凝集体形成阻害能が高いことも分かった。以上の成果より本研究で開発した UBD 誘導体に対して様々な機能修飾することで、温度及び濃度感受性のソフトマテリアルとして医薬分野への幅広い応用が期待される。

IV. 謝辞

本研究は、九州大学大学院薬学研究院、森下晃佑氏と岡本優菜氏の研究成果を基盤に行った。TEM 画像は、大学連携設備ネットワークにより、東京工業大学すずかけ台分析部門で行った。また、本研究の一部は、JST さきがけ (課題 No. 14531409) の支援により行った。深謝いたします。

参考文献

- 1) Aoki, D.; Ajiro, D. *Macromolecules*. **2017**, *50*, 6529–6538.
- 2) Fujiyabu, T.; Li, X.; Shibayama, M.; Chung, U.; Sakai, T. *Macromolecules*. **2017**, *50*, 9411–9416.
- 3) Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res*. **1986**, *46*, 6387–6392.
- 4) Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K. *J. Control. Release*. **2000**, *65*, 271–284.
- 5) Fox, M.E.; Szoka, F.C.; Fréchet, J.M.J. *Acc. Chem. Res*. **2009**, *42*, 1141–1151.
- 6) Chiti, F.; Dobson, C. M. *Annu. Rev. Biochem*. **2006**, *75*, 333–366.
- 7) Selkoe, D. J. *Physiol. Rev*. **2001**, *81*, 741–766.
- 8) Brambilla, D.; Le Droumaguet, B.; Nicolas, J.; Hashemi, S. H.; Wu, L. P.; Moghimi, S. M.; Couvreur, P.; Andrieux, K. *Nanomedicine*. **2011**, *7*, 521–540.
- 9) Hayashi, H.; Ohkubo, K.; Karasawa, S.; Koga, N. *Langmuir*. **2011**, *27*, 12709–12719.
- 10) a) Morishita, K.; Murayama, S.; Araki, T.; Aoki, I.; Karasawa, S. *J. Org. Chem*. **2016**, *81*, 8351–8362. b) Morishita, K.; Okamoto, Y.; Murayama, S.; Usui, K.; Ohashi, E.; Hirai, G.; Aoki, I.; Karasawa, S. *Langmuir*, **2017**, *33*, 7810–7817. c) Morishita, K.; Ueki, S.; Fuchi, Y.; Murayama, S.; Kaneko, T.; Narita, N.; Kobayashi, S.; Hirai, G.; Aoki, I.; Karasawa, S. *ACS Applied Nanomaterials*, **2018**, *1*, 6967–6975 (Cover art)
- 11) Abe, Y.; Karasawa, S.; Koga, N. *Chem. Eur. J*. **2012**, *18*, 15038–15048.
- 12) a) Araki, T.; Murayama, S.; Usui, K.; Shimada, T.; Aoki, I.; Karasawa, S. *Nano Lett*. **2017**, *17*, 2397–2403. b) Araki, K.; Fuchi, Y.; Murayama, S.; Shiraishi, R.; Oyama, T.; Aso, M.; Aoki, I.; Kobayashi, S.; Yamada, K.; Karasawa, S. *Nanomaterials*, **2018**, *8*, 782.
- 13) Okamoto, Y.; Morishita, K.; Fuchi, Y.; Kobayashi, S.; Karasawa, S. *Appl. Sci*. **2018**, *8*, 1080–1089.

- 14) Fielding, L.A.; Lane, J.A.; Derry, M.J.; Mykhaylyk, O.O.; Armes, S.P. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5790–5798.
- 15) Mousseau, J.J.; Xing, L.; Tang, N.; Cuccia, L.A. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10030–10038.
- 16) Mihajlovic, M.; Wyss, H.M.; Sijbesma, R.P. *Macromolecules* **2018**, *51*, 4813–4820.
- 17) Besson, E.; Mehdi, A.; Rey , C.; Gaveau, P.; Corriu, R.J.P. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 7534–7539.
- 18) Lowe, T. L.; Strzelec, A.; Kiessling, L. L.; Murphy, R. M. *Biochemistry.* **2001**, *40*, 7882–7889.