

特集：バイオマテリアル研究を担う若手研究者たち3

高分子バイオマテリアルを基盤としたガス状シグナル伝達物質である硫化水素デリバリーシステムの開発

硫化水素(H_2S)はヒトの体内で産生されるガス状シグナル伝達物質であり、心血管・免疫・神経伝達系や悪性腫瘍において興味深い生理活性を示す。本稿では、 H_2S の疾患治療応用を目指した高分子バイオマテリアルを基盤とした H_2S デリバリーシステムの開発について概説する。

キーワード：硫化水素，ガス状シグナル伝達物質，高分子ミセル



長谷川 麗 Urara Hasegawa

ペンシルベニア州立大学
The Pennsylvania State University

1. はじめに

近年、生体内で産生される硫化水素(H_2S)が細胞内レドックス恒常性の維持に関与しており、心血管・免疫・神経伝達系をはじめとする様々な生体機能の発現に重要な役割を持つことが分かってきた。 H_2S は常温常圧において腐卵臭をもつ気体であり、一般的には大気汚染物質として認識されている。これまでに、 H_2S が細菌のエネルギー代謝に使われていることは知られていたが、このガス分子がヒトをはじめとする哺乳類の体内でも恒常的に産生され、これが生体機能維持に不可欠であることが明らかになったのはごく最近のことである。 H_2S はcystathionine β -synthase (CBS), cystathionine γ -lyase (CSE), 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)などの代謝酵素の働きにより、システインやホモシステインから産生される。これらの酵素は、腎臓や肝臓、心血管組織、脳などで発現している。1996年に木村らにより脳内で H_2S がシグナル伝達物質として機能することが発見されて以来、血管新生・拡張、虚血性障害からの細胞保護、免疫調節など興味深い作用が報告されてきた(図1)¹⁾。また最近では、 H_2S により悪性腫瘍の増殖・転移や神経変性疾患の進行を制御できる可能性が示唆されている。 H_2S は、すでにその重要な活性が知られている一酸化窒素(NO)や一酸化炭素(CO)に続く、第3のガス状シグナル伝達物質として、その活性機能の解明が進められており、その生理作用を応用した創薬の開発が期待されている。

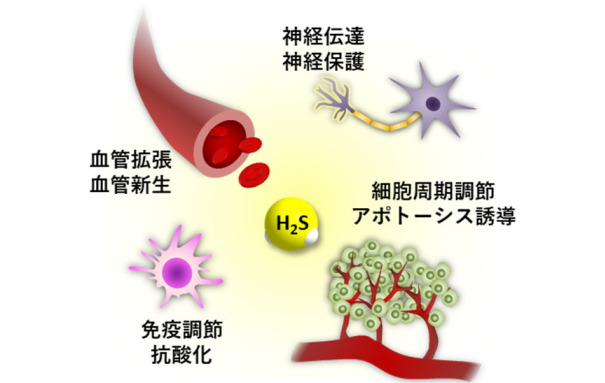


図1 生体内における硫化水素の生理活性。

2. 低分子 H_2S ドナーとその問題点

H_2S の生理活性作用の解明と共に、その疾患治療への応用が期待されている。しかしながら、気体であるために取り扱いが煩雑であり、医療応用には投与方法の開発が不可欠である。そこで、生体内で分解して H_2S を生成する低分子化合物(H_2S ドナー)の開発が進められてきた。このうちAnethole dithiolethione(ADT)やその誘導体は H_2S ドナーとして最も盛んに用いられている化合物の一つである(図2)。ADTはもともと唾液分泌促進剤や利胆薬として用いられてきた医薬品である。肝臓のホモジネート内でADTが H_2S を生成す

ることが見いだされて以来、 H_2S ドナーとしても応用されてきた。最近の報告により、ADTはマイクロソームに存在するチトクロームP450などのモノオキシゲナーゼによる酸化を経て、 H_2S を放出することが明らかになった²⁾。この報告に続いて、筆者らは細胞内に存在する活性酸素種による酸化によっても、ADTからの H_2S の放出を惹起できることを見出した³⁾。ADT以外にも、加水分解により H_2S を除放するLawesson試薬誘導体、システインやグルタチオンなどチオール化合物と反応して H_2S を放出するS-aryoylthioxime, arylthioamideなど様々な H_2S ドナーが報告されている。

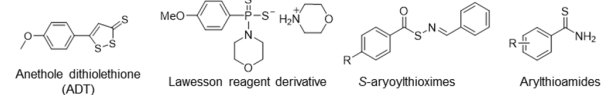


図2 低分子 H_2S ドナー。

これまでに、分子設計により H_2S 放出挙動のコントロールが試みられてきたが、報告されている多くの H_2S ドナーは、生体内における安定性が不十分であり、医療応用の検討は進んでいないのが現状である。 H_2S の生体内の半減期は数秒から数分程度と非常に短い上に、その活性の発現には有効濃度を一定時間維持することが求められる。このため、治療部位において数時間～数日にわたり一定速度で H_2S を放出するような H_2S デリバリーシステムの開発が必要である。また、多くの H_2S ドナーは、有機硫黄化合物由来の副作用や毒性を示すことが報告されている。これらの副作用はドナー分子が細胞内タンパク質に直接相互作用することに引き起こされることが示唆されている。以上のような H_2S ドナー特有の問題に加え、一般の低分子薬物同様、投与後の素早いクリアランスや標的部位への低い集積性も H_2S ドナーの医療応用における課題となっている。

3. 親水性ポリマー修飾 H_2S ドナー分子の開発

H_2S ドナーとして広く使用されているADTは、水溶性が低い上に、ジチオールチオン基に由来する毒性を示すことが知られている。そこで筆者らは、これらの欠点を改善するために親水性のポリエチレングリコール(PEG)の片末端にADTを結合したPEG修飾ADTを合成した(図3)⁴⁾。PEGとADTのリンカーとして、化学的に安定なエーテル結合に加えて(PEG-ether-ADT)、異なる加水分解性をもつエステル結合(PEG-Gly-ADT, PEG-Ile-ADT)を用いた。PEG修飾により、ADTの水溶性の著しい改善とともに、マウスマクロファージにおいて、毒性が低減できることを見出した。興味深いことに、ADTの毒性の発現はリンカーの安定性に依存することが分かった。非分解性のPEG-ether-ADTにおいて、細胞の代謝活性に大きな変化が見られなかったのに対し、素早く加水分解されるPEG-Gly-ADTはADTと同程度の強い毒性を示した。一方で、徐々に加水分解されるPEG-Ile-ADT

はPEG-Gly-ADTよりも弱い毒性を示した。これらの結果より、加水分解によってPEGより放出された低分子ADTが細胞毒性に関与していることが示唆された。さらに、蛍光標識したADTおよびPEG-ether-ADTを用いて細胞内分布を観察したところ、ADTは細胞膜を透過し、細胞質内に均一に拡散するのにに対し、PEG-ether-ADTはエンドソーム・リソソーム内に局在していることが分かった。以上の結果より、細胞膜透過性のない高分子にADTを結合することにより、その細胞質への侵入を阻害し副作用の発現を抑制できることが分かった。さらにマウスマクロファージにおいて、PEG-ether-ADTが細胞へ取り込まれた後、 H_2S を放出することを確認した。

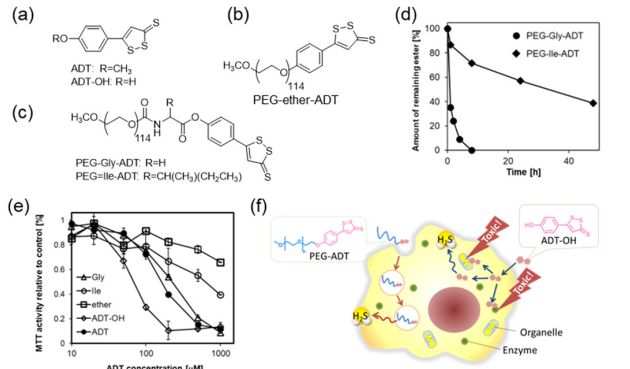


図3 PEG修飾ADTによる毒性の低減。(a) 低分子 H_2S ドナーADTおよびADT-OH。(b) PEG-ether-ADT。(c) 加水分解性エステル結合をもつPEG-Gly-ADTおよびPEG-Ile-ADT。(d) PEG-Gly-ADTおよびPEG-Ile-ADTの加水分解速度。(e) マウスマクロファージにおける毒性。(f) 提唱されたPEG修飾による毒性低減メカニズム。Ref [4]より改変。

4. H_2S ドナーミセルの開発

高分子ナノ粒子を基盤としたドラッグデリバリーシステム(ナノメディシン)は薬物を標的部位に効率よく輸送するキャリアとして機能することが知られている。筆者らは、このアプローチを H_2S デリバリーに応用することで、 H_2S の医療応用を可能とする投与技術を開発できると考えた。前述のPEG修飾ADTの研究で得られた知見に基づき、ADTをコアにもつ高分子ミセルを調製した⁵⁾。親水性PEGブロックおよび疎水性のADT含有ブロックよりなるPEG-PADTジブロックコポリマーは、疎水性の高いADT含有ブロックの自己組織化により水中で高分子ミセルを形成することを確認した。ミセルの構造およびその安定性は疎水性ブロックのADT含有量によりコントロールできることが分かった。また、 H_2S の放出速度はミセル構造の安定性に依存し、安定性の高いミセルほど H_2S の放出が遅くなることを見出した³⁾。この結果より、ミセルの疎水性コアがADTの酸化と分解を抑制することが示唆された。以上のように、高分子ミセルの安定性を制御することにより H_2S 放出速度を調節できることが明らかになった。

最近、異なるガン細胞において H_2S が細胞増殖抑制作用を示すことが報告された。一方で、正常細胞の増殖にはほとんど影響を与えないことが分かっている。この細胞選択的

な H_2S の作用メカニズムはいまだ解明されていないが、細胞内における H_2S をはじめとする活性硫黄種の代謝機能の違いが関与していると考えられている。このような H_2S の生理活性を利用することで、より安全なガン治療の実現が期待されている。そこで、ヒト大腸がん細胞(HT29細胞)およびヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において、ADT含有高分子ミセルの細胞増殖への影響を評価した³⁾。高分子ミセルは、HT29細胞において有意な細胞増殖抑制能を示したのに対し、HUVECにおいてその影響は確認されなかった。興味深いことに、高分子ミセルのガン細胞における増殖抑制能は、その H_2S 放出速度に依存することが分かった。一方で、低分子ADTはHT29細胞と比較してHUVECにおいてより強い毒性を示した。これはジチオールチオン構造に由来する副作用であると考えられる。さらに、鶏卵漿尿膜(CAM)上に構築したHT29の腫瘍様組織においてその効果を評価したところ、高分子ミセルが腫瘍の成長を抑制することが確認された。以上の結果より、ADT含有高分子ミセルは、ガン細胞選択的に増殖抑制作用を持つことが明らかとなった。また、 H_2S 放出速度を制御することで、治療効果を高めることが可能であることを見出した。このほかにも、ADT含有高分子ミセルが、血管新生促進作用⁶⁾、虚血下における細胞保護作用⁷⁾、免疫賦活剤であるGardiquimodによる免疫活性化の促進作用⁵⁾など様々な H_2S 由来の生理活性を示すことが確認されており、副作用を示さずに H_2S を効率よく輸送するシステムとして医療への応用が期待されている。

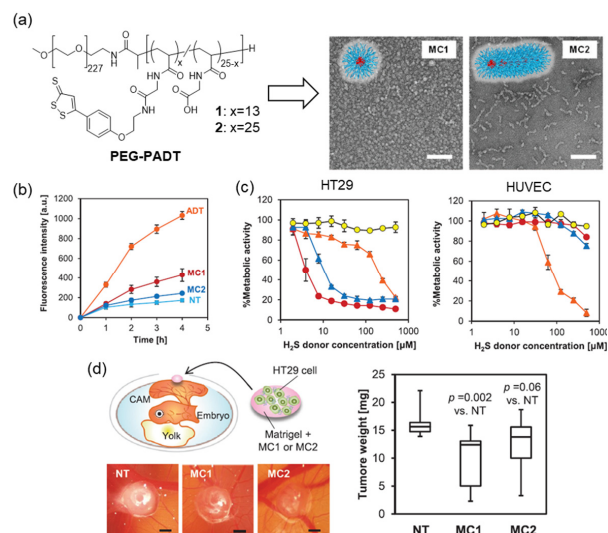


図4 ADT含有 H_2S ドナーミセル。(a)親水性PEGブロックおよび疎水性ADT含有ブロックよりなるジブロックコポリマーから調整された高分子ミセル。Scale bar: 100 nm。(b)ヒト大腸がん細胞(HT29)における H_2S 放出。 H_2S 検出蛍光色素HSip-1DAにより細胞内蛍光強度の変化を測定。(c) HT29およびHUVECにおける細胞増殖能への影響。赤:MC1, 青:MC2, 橙:ADT, 黄: Na_2S 。(d)鶏卵漿尿膜(CAM)上に構築した腫瘍成長の抑制作用。HT29細胞を移植し、6日間培養の後、形成した腫瘍の重量を測定。Scale bar: 1 mm。Ref [3] より改変。

5. おわりに

本稿では、高分子バイオマテリアルを用いた H_2S のデリバリーシステムの開発について、筆者の研究を中心に概要を解説した。近年、 H_2S やその代謝産物の生体における機能の解明が進められており、これらの活性硫黄種は活性酸素種や活性窒素種と並ぶ重要なシグナル伝達物質であることが分かってきた。 H_2S および関連分子に関する研究の発展に伴い、その医療への応用は重要な課題となっている。今後、これらの活性種を効率よく輸送するシステムの開発において、バイオマテリアル分野の研究者による貢献が期待される。

本論文の成果の一部はthe U. S. National Science Foundation (NSF), 2102848, およびNational Institute of General Medical Sciences (NIGMS), P20GM103638の助成を受けて実施された。

参考文献

- Kimura H.: Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids* 2011, 41 (1), 113-121.
- Dali M.-M., Dansette P.M., Mansuy D., Boucher J.-L.: Comparison of Various Aryl-Dithiolethiones and Aryl-Dithiolones As Hydrogen Sulfide Donors in the Presence of Rat Liver Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 2020, 48 (6), 426-431.
- van der Vlies, A.J., Ghasemi M., Adair B.M., Adair J. H., Gomez, E.D., Hasegawa U.: Reactive Oxygen Species-Triggered Hydrogen Sulfide Release and Cancer-Selective Antiproliferative Effect of Anethole Dithiolethione-Containing Polymeric Micelles. *Adv. Healthc. Mater.* 2023, 12 (6), 2201836.
- Hasegawa U., van der Vlies A.J.: Design and Synthesis of Polymeric Hydrogen Sulfide Donors. *Bioconjugate Chem.* 2014, 25 (7), 1290-1300.
- Hasegawa U., van der Vlies A.J.: Polymeric micelles for hydrogen sulfide delivery. *MedChemComm* 2015, 6 (2), 273-276.
- Chen J.J.Y., van der Vlies A.J., Hasegawa U.: Hydrogen sulfide-releasing micelles for promoting angiogenesis. *Polym. Chem.* 2020, 11(27), 4454-4463.
- Takatani-Nakase T., Katayama M., Matsui C., Hanaoka K. van der Vlies A. J., Takahashi K., Nakase I., & Hasegawa U.: Hydrogen sulfide donor micelles protect cardiomyocytes from ischemic cell death. *Molecular BioSystems* 2017, 13 (9), 1705-1708.