

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07627

研究課題名（和文）カーボンナノチューブを利用した自己集合型・腫瘍特異的超音波造影剤の開発

研究課題名（英文）Development of self-assembling and tumor-specific ultrasound contrast agents using carbon nanotubes

研究代表者

対馬 義人 (Tsushima, Yoshito)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20375546

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新たながん特異的超音波造影剤として、がんが集積した後にがんにおいて高発現している酵素により代謝されることで自己重合し、超音波造影能が大きく向上するような「多層カーボンナノチューブ（MWCT）」を設計・合成した。まずは低分子のモデル化合物を用いて検討したところ、酵素により認識を受け結合反応が起こることを確認した。さらにカーボンナノチューブに結合した状態においても、この結合反応が起こり自己重合することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がんを特異的に診断可能な超音波造影剤を開発することを目的として行った研究である。最終的な造影剤開発には至らなかったが、今後の薬剤開発の基盤となるような基礎的な知見を得ることができたことから、学術的に意義のあるものである。また本研究で開発を目指している超音波造影剤は安価かつ簡便にがん診断を行う事を可能とするものであり、我が国のがん診療を大きく変革すると期待され、研究開発の社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we designed and synthesized a novel cancer-specific ultrasound contrast agent using carbon nanotubes (MWCTs), which can accumulate in cancer and then self-polymerize when metabolized by enzymes that are highly expressed in cancer, and consequently improve the ultrasound contrast ability. We prepared a molecule that binds after enzymatic cleavage, and confirmed that the molecules were reacted after the enzyme recognition and cleavage. In addition, it was found that the binding reaction occurred even when the molecules were bound to the carbon nanotubes.

研究分野：放射線科学

キーワード：超音波造影剤 自己集合型 カーボンナノチューブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超音波イメージングは小型の装置で安全かつ低コストに行えることから汎用性が高く、日常臨床において最も高頻度で使用される断層撮像画像診断法のひとつである。従って、がん特異的な造影剤が開発されれば、簡便ながん診断が実現できると考えられる。現在臨床で使用されている超音波造影剤はサイズが大きいため、血管外への漏出が必須条件となるがん特異的な超音波造影剤の母体骨格としては適していない。そこで我々は、血管壁を透過可能な小さなサイズの造影剤として、超音波造影効果を有する液体を含有させた EGFR 抗体標識「PFOB ナノカプセル」を開発してきたが、十分な腫瘍集積性と、超音波シグナル増強効果を同時に達成するには至らなかった。これは、高い腫瘍集積性を達成するためには小さな分子サイズが適している一方で、一般的な分子の超音波造影効果は、サイズの減少に伴って大きく減少してしまうというジレンマに陥るためだと考えられる。

近年、多層カーボンナノチューブ (MWCT) の超音波造影剤としての可能性が報告され、新たな腫瘍特異的な超音波造影剤の基本骨格として注目されている。MWCT は高いアスペクト比を持つ (円柱状の形状で、底面の直径と高さの差が大きい) ことから、同程度の分子サイズを持つ球形の物質と比較して、よりがんを集積しやすいという特徴を持つ。一方、MWCT が超音波造影効果を発揮するためには、大量の MWCT 誘導体を投与する必要があり、毒性が懸念される。これらのことから、MWCT の投与量を低減し、かつ腫瘍特異的な超音波造影能を保持可能とする分子設計が必要である。一方、合成高分子である MWCT は特定の分子を導入することで自己集合性を持たせられると考えられ、MWCT が自己集合した場合、MWCT の局所濃度が上昇し、高い超音波造影効果を発揮できると予想される。

2. 研究の目的

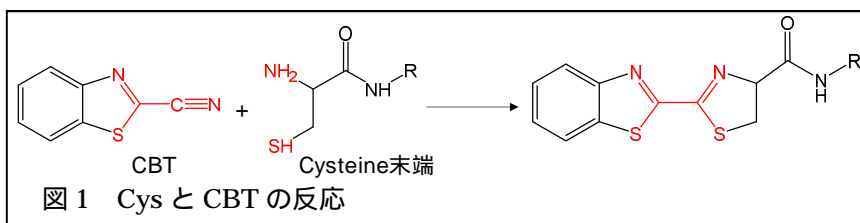
本研究の目的は、がんを高発現している酵素により開裂するペプチド配列を有することで、腫瘍内で特異的に代謝を受けて自己重合し、腫瘍特異的に造影効果を発揮できるような、新たな超音波造影剤を開発することである。これを達成するために、酵素認識配列と、アミノ酸認識タグとしてシステインと結合する部位を有する MWCT 誘導体を設計・合成し、その腫瘍特異的な超音波造影剤としての有用性評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 低分子モデル化合物の作製と評価

腫瘍特異的に代謝させるための酵素として、一部のがんにおいて高発現することが知られている グルタミルトランスぺプチターゼ (GGT) を選定した。GGT により開裂することで末端にシステイン残基を露出することが知られているグルタミン酸 (Glu) -システイン (Cys) 配列を有し、カーボンナノチューブとの結合部位としてリシン (Lys) を導入した 3 残基のペプチド「Glu-Cys-Lys」をモデル化合物として選択し、合成を行った。またペプチドが酵素により切断されたのちに露出したシステインと反応する部位として 6-アミノ-2-シアノベンゾチアゾール (CBT) を選択した。

システインと CBT は右図 1 のような反応により結合することが知られている。トリペプチド Glu-Cys-Lys が



GGT により開裂後に CBT と結合するかどうかを検討する目的で、GGT を含有することが知られているマウス腎ホモジネートと、トリペプチドおよび CBT を混合し 40 °C でインキュベーションを行った。結合体が生成したかどうかの評価は、別途合成した Cys-Lys と CBT の結合後の化合物 (上図

1の右側の化合物)とHPLCの保持時間を比較することで行った。

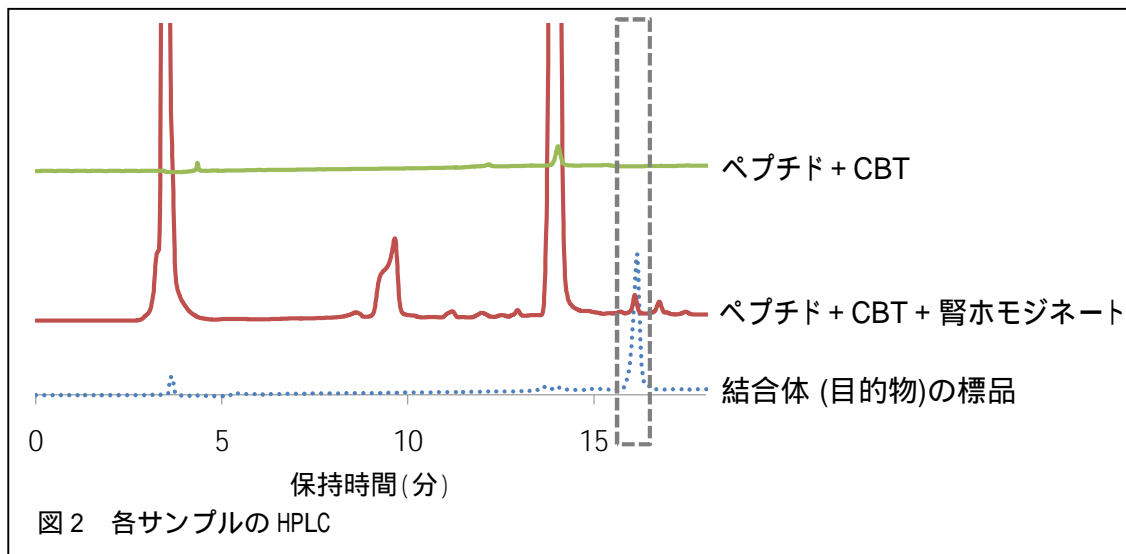
(2) カーボンナノチューブ結合分子の作製と評価

GGTにより切断された後の配列である Cys-Lys を、Lys 側鎖を介してカルボン酸が導入されたカーボンナノチューブに対して結合した。また CBT も別途カルボン酸が導入されたカーボンナノチューブに対して結合した。両カーボンナノチューブを混合し、分散させた後に室温で一晩インキュベートした。インキュベート前後での吸光度を測定し、その波形を比較することで重合反応が起こっているかを検証した。また Glu-Cys-Lys の結合したカーボンナノチューブについても合成を試みた。

4. 研究成果

(1) 低分子モデル化合物の作製と評価

下図2にHPLCの結果を示す。トリペプチドとCBTのみを混合してインキュベートしたところ、結合体の標品と一致する保持時間にピークは認められなかった。一方で、トリペプチドとCBTにさらに腎ホモジネートを混合してインキュベートを行ったサンプルにおいては、標品と一致する保持時間にピークが観察された。このことから、トリペプチドが腎ホモジネート中で開裂し、CBTと反応することでCys-LysとCBTの結合物が生成されたことが示唆された。従って、トリペプチドおよびCBTをカーボンナノチューブに導入した場合、GGT存在下で、両カーボンナノチューブが結合し、重合が起こることが期待される。

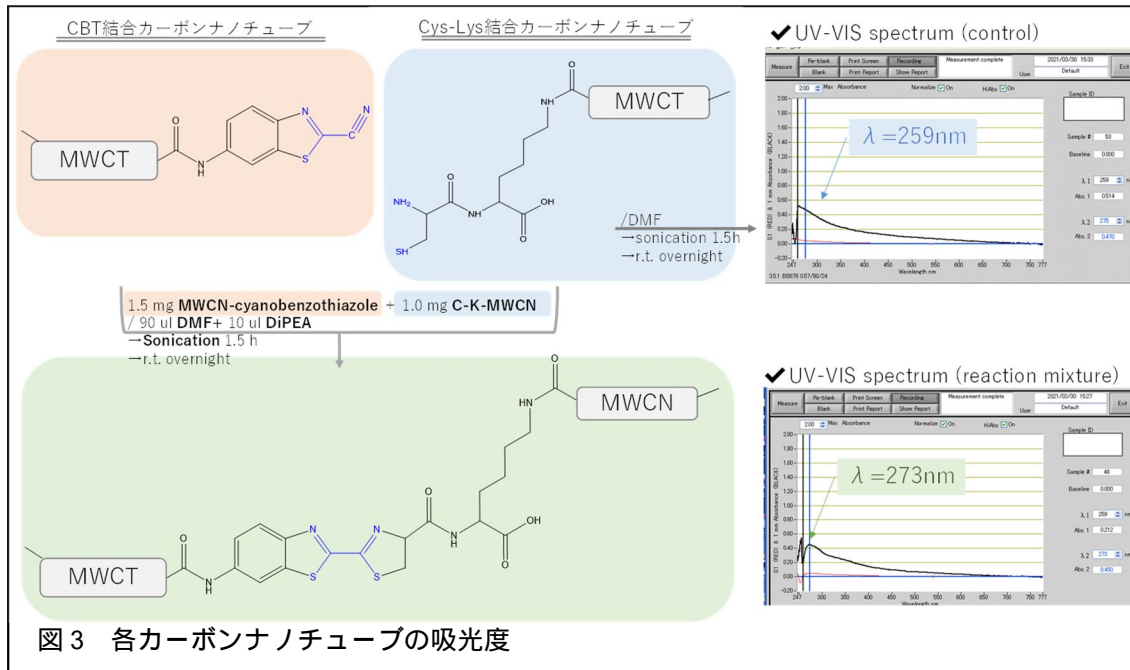


(2) カーボンナノチューブ結合分子の作製と評価

カーボンナノチューブから出ているカルボン酸に対して0.5等量のCBTを反応させたが、それでも半分程度のCBTが未反応であった。その原因として、カーボンナノチューブに導入されているカルボキシル基の数が想定よりも少ない、あるいは、実際にアクセスできる位置のものが少ない可能性が考えられた。当初の予定では、一つのカーボンナノチューブに対してCBTおよびトリペプチドを導入したものを作製する予定であったが、結合できるカルボン酸が想定よりも多くないこと、また分子間ではなく分子内で開裂して露出したCysとCBTが反応してしまい、重合が起こらないことが懸念されることから、トリペプチドが結合したカーボンナノチューブとCBTが結合したカーボンナノチューブをそれぞれ作製することとした。開裂したCys-Lysを導入したカーボンナノチューブ、CBTを導入したカーボンナノチューブおよびトリペプチドを導入したカーボンナノチューブをそれぞれ合成することに成功した。

Cys-LysカーボンナノチューブまたはCBTカーボンナノチューブを、それぞれ単独で分散溶液中における吸光度を測定したところ、259nm付近に極大値が観測された(次頁図3)。一方、両カーボンナノチューブを混合し塩基性条件下でインキュベートした後に吸光度を測定したところ、

273nm 付近に極大値が観測された。この吸光度波形の遷移は、Cys と CBT が結合することにより重合が起こったことを示唆するものである。



以上のように、本研究においては、がん特異的に開裂する基質配列として Glu-Cys を選択し、開裂後の Cys と結合する CBT の反応により自己重合するカーボンナノチューブの開発を行い、このカーボンナノチューブが新規超音波造影剤として有用である可能性を見出すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	花岡 宏史 (Hanaoka Hirofumi) (50361390)	群馬大学・大学院医学系研究科・特任准教授 (12301)	
研究分担者	山口 藍子 (Yamaguchi Aiko) (80609032)	群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座等教員 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関