

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34517

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2022

課題番号：18KK0439

研究課題名（和文）超音波応答性フッ素化ナノバブルによる難治性乳がんに対する内用放射線治療薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of a breast cancer targeted agent for internal radiation therapy using ultrasound responsive nanobubbles

研究代表者

萩森 政頼（HAGIMORI, Masayori）

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：40446125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,600,000円

渡航期間：10ヶ月

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳がん(TNBC)は、悪性度が高く予後不良であり、現在、有効な治療法は確立されていない。そのため、本研究では、フルオロカーボンの超音波ガス溶存能と超音波照射後の発熱による放射線感受性の増大に着目し、細胞内動態制御と抗腫瘍効果を両立した内用放射線治療薬剤を開発を目的に研究を行い、フッ素化ペプチド脂質の合成、バブル製剤の調製並びに物理化学的評価を行い有効性を明らかにした。また、代謝安定を向上したNQO1標的放射性ヨウ素標識体の合成に成功した。今後、開発した放射性薬剤を内包した薬剤を作製し、細胞内動態および治療効果を検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、明確な治療方法が確立されていないトリプルネガティブ乳がん(TNBC)に対する内用放射線治療薬剤の開発を目的に、NQO1標的放射性薬剤を細胞内動態制御と抗腫瘍効果が期待できる超音波応答性フッ素化バブルに内包した薬剤の開発を目的に研究を行った。フッ素基の導入により、フッ素化脂質分子同士および超音波造影ガスとの間でフルオラス相互が生じ膜が安定化することが明らかとなった。また、代謝安定を向上したNQO1標的放射性ヨウ素標識体の合成に成功した。今後、NQO1特異的放射性薬剤を内包したEVQ修飾フッ素化ペプチド脂質によるバブル製剤の内用放射線治療薬剤としての有用性を評価していく。

研究成果の概要（英文）：Triple negative breast cancer (TNBC) is a high malignancy cancer with poor prognosis, and currently no effective treatment has been established. In this study, we focused on the enhancement of ultrasound gas solubility by fluorocarbons and radioactivity by heat generation after ultrasound irradiation, and developed an internal radiation therapy drug with both in intracellular kinetic control and antitumor effects. Fluorinated peptide lipids were synthesized and bubble formulations were prepared, and their efficacy was clarified by physicochemical evaluation. In addition, we synthesized a radiolabeled NQO1 target compound with improved metabolic stability. In the future, we will prepare a radiopharmaceutical encapsulating the developed radiopharmaceutical and verify its intracellular kinetics and therapeutic efficacy.

研究分野：放射線科学、薬学

キーワード：内用放射線治療薬剤 ナノキャリア 細胞内動態 トリプルネガティブ乳がん

1. 研究開始当初の背景

トリプルネガティブ乳がん (Triple Negative Breast Cancer: TNBC) は、乳がんの代表的な増殖因子であるエストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、ヒト上皮細胞成長因子受容体 2 (HER2) の 3 つ全てが陰性の難治性乳がんである。現在、乳がんの標準治療であるホルモン療法や HER2 標的抗体による薬物治療では十分な効果は得られていない。そのため、TNBC の治療に有効な薬剤の開発が急務となっている。放射性物質を体内に投与する内用放射線治療は、がん細胞の高い放射線感受性を利用することにより、選択的にがん細胞に放射線照射が可能であるため、TNBC の新たな治療法として期待されている。しかしながら、それを可能にするには、細胞殺傷性の高いオージェ電子や高エネルギーの β 線を放出する放射性物質をがんの内部や近傍に集積させ、生体内動態・分布特異性を厳密に制御する必要がある。

このような背景のもと、応募者は TNBC で発現が認められる酵素である NAD(P)H:quinone oxidoreductas 1 (NQO1) に着目し、NQO1 に対する選択的阻害剤を基盤とする分子標的型の放射性ヨウ素標識体を新規に設計・合成を行い、¹ この薬剤を TNBC に対して高い指向性を有する新規標的指向型リポソームに搭載することで治療効果の高い TNBC の内用放射線治療薬の開発を行った。² しかしながら、TNBC に対して高い指向性を有する標的指向型リポソームは、リソソームでの局在を示すため、核や細胞質を標的とする放射性薬剤の治療効果は期待できない。そのため、開発するナノキャリアには、高度な細胞内動態制御が不可欠であるとの考えに至った。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、TNBC の治療に資する真に内用放射線治療に有効なナノキャリア型薬剤へと発展させるには、ナノキャリアのエンドソームから細胞質への細胞内動態を制御できること、ナノキャリアから放出された放射性薬剤が標的的特異性・抗腫瘍効果を示すこと、が必要不可欠であると考えた。温度、pH、超音波などの外部刺激はナノキャリアの細胞内動態に効果的に機能し、我々はこれまでに臨床で使用されている超音波造影ガス (C_3F_8 ガス) を封入した超音波応答性ナノバブルリポソーム製剤 (バブル製剤) を創製し、遺伝子・核酸のエンドソームからの脱出および選択的送達を達成している。しかしながら、実用化を考慮するとバブルへの超音波ガス溶存量および安定性の向上は不可欠である。そこで本研究では、超音波ガスとのフルオラス相互作用が期待できるフルオロカーボンに着目した。フッ素同士の特徴的な作用により超音波ガス溶存量は増大し製剤の安定化が期待できる。また、超音波照射後のキャビテーションにより熱が発生するが、部位特異的な温度上昇は低酸素状態にある TNBC の放射線感受性を高め、内用放射線治療薬の抗腫瘍効果を向上させると期待できる。そこで、本研究では、海外共同研究者とともに計算科学的手法を駆使した精密分子設計法によりフッ素化ペプチド脂質を構築することにより、TNBC の治療に資するフッ素化バブル型内用放射線治療薬の確立 (図 1) を目指した。

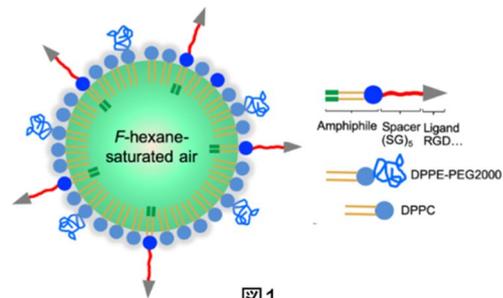


図1

3. 研究の方法

(1) フッ素化ペプチド脂質の開発

フッ素化率の上昇により超音波ガスの溶存量の増大が期待できるため、完全あるいは部分フッ素化した脂質分子の自己集合体構造を分子シミュレーションにより最適化した。導入するフッ素基の数により分子の性質はもとより、その自己組織体の機能および形態は大きく変化する。そのため、フッ素化界面活性剤の合成とそれによるナノ構造体を専門としている海外協力研究者 Krafft 博士 (フランス共和国ストラスブール大学シャルル・サドロン研究所) からの助言を受け、まずは、モデルフッ素化ペプチド脂質として、リガンド分子を組み込む前のフルオロカーボンをセリンとグリシンからなるスペーサー (SG)₅ で繋いだフッ素化ペプチド脂質を合成した。フッ素化率上昇による効果は、空気/水界面での自発的吸着について Langmuir-Blodgett 法を用いて表面圧 π を測定することにより検証した。

(2) フッ素化バブルの製剤化

モデルフッ素化ペプチド脂質からなるバブルを作製し、粒子サイズの変化および光学顕微鏡を用いた形態変化を指標にフッ素基の影響および安定性を評価した。また、粒子サイズについては、継時的に検証し、安定性を評価した。

(3) TNBC 特異的フッ素化ペプチド脂質の開発

TNBC に対するリガンドとして糖タンパク質 MUC16 (Mucin-16) への結合性が報告されている EVQ ペプチドを選択し、³ EVQ ペプチドの有効性について EVQ ペプチド修飾リポソームを作製して検証した。

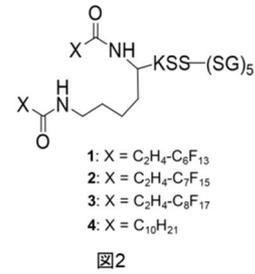
(4) フッ素化バブル型内用放射線治療薬剤の開発

フッ素化バブルに内包する法制薬剤としてNQO1 特異的放射性薬剤の開発を行った。

4. 研究成果

(1) フッ素化ペプチド脂質の開発

TNBC ペプチド分子とフッ素化脂質をつなぐスペーサー分子として、汎用されているポリエチレングリコール (PEG) ではなく非ヘリックス性のペプチド鎖であるセリン-グリシン (SG)₅ を選択した。セリン-グリシン(SG)の長さについては、これまでに標的指向性リポソームの研究において検討をしており、(SG)₅ をスペーサーとすることにより効率的に粒子表面にリガンドを提示できることを明らかにしている。フッ素基の数としては、十分なフルオラス相互が得られると考えられるフッ素基の数として13、15、17を選択し、フッ素化ペ



チド脂質 1-3 を設計した (図 2)。また、フッ素を含まないペプチド脂質 4 も設計した。合成は、精製が簡便で、反応の安全性が高い Fmoc 固相合成法を用いて行った。得られた粗結晶は、透析後、HPLC による精製を行い、質量分析および FTIR により構造を確認した。また、得られた化合物の純度は HPLC により高純度 (99%以上) であることを確認した。合成したフッ素化ペプチド脂質は Langmuir-Blodgett 法を用いて、フッ素化ペプチド脂質 1-3 およびフッ素を含まない 4 を下層水に添加して、表面圧 π の変化を継時的に測定した (図 3)。その結果、いずれの脂質においても、継時的な表面圧の上昇がみられ、プラトーに達したが、フッ素を含まない 4 においては 0.7 mN/m と非常に低い値であったのに対し、フッ素を含む 1-3 では、大きな表面圧の上昇を示したことから、フッ素化ペプチド脂質が界面において安定な単分子膜を形成することが明らかとなった。また、プラトーにおける値は、フッ素基の数が増えるにしたがって上昇し、ペプチド脂質の疎水性の増加を反映する結果となった。

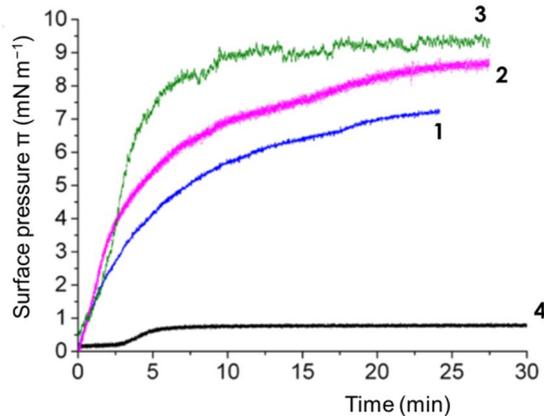


図3 Adsorption kinetics of 1-4 at the air/water interface

(2) フッ素化バブルの製剤化

Langmuir-Blodgett 法を用いた表面圧 π の測定において最も高い値を示したフッ素化ペプチド脂質 1-3 およびフッ素を含まないペプチド脂質 4 を用いて、それぞれフッ素化バブルを作製した。HEPES 緩衝液中で DPPC と DPPE-PEG2000 が 9:1 (モル比) となるように調製後、3 または 4 を加え、パーフルオロヘキサン (PFH) で飽和した窒素気流下、室温において攪拌した。作製した粒子のサイズと顕微鏡画像を図 4 に示す。フッ素化ペプチド脂質 3 の粒子サイズは $1.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$ であった。フッ素化ペプチド脂質 1 および 2 については、

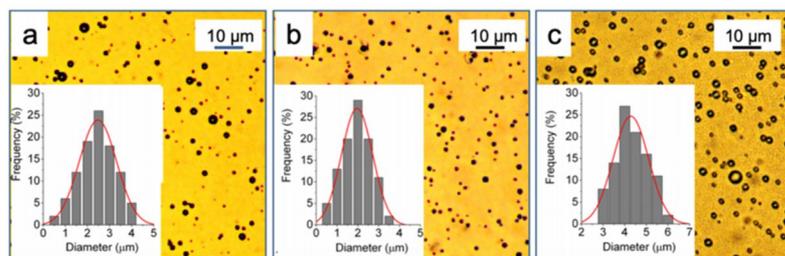


図4 Optical micrographs and corresponding size distribution of the perfluorohexane-stabilized microbubbles with a shell of a) DPPC, b) DPPC/F-lipo-peptide 3, and c) DPPC/hydrocarbon analog 4.

3 とほぼ同じ粒子サイズであった。一方、フッ素を含まない 4 の粒子サイズは $4.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ であることから、フッ素化ペプチド脂質のフッ素基と PFH のフッ素基が相互作用することにより粒子サイズが小さくなったことが考えられる。光学顕微鏡における観察においても、フッ素化ペプチド脂質からなるバブルは明らかに小さな形態を示した。また、25 におけるフッ素化バブルの安定性を継時的に評価したところ、フッ素化ペプチド脂質からなるバブルは安定性の向上を示し、フッ素基を 17 個含む 3 において最も安定性が向上した。

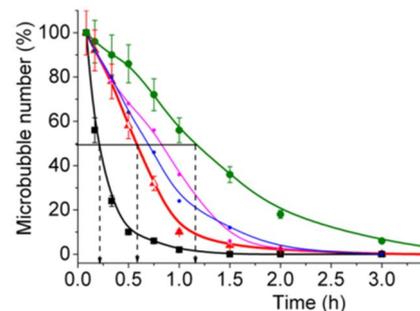


図5 Stability of bubbles (25 °C) containing F-lipo-peptides 1-3 and hydrocarbon analog 4

(3) TNBC 特異的フッ素化ペプチド脂質の開発

フッ素基により生じるフルオラス相互作用により粒子の安定の向上が得られたことから、TNBC 特異的リガンドの評価を行った。EVQSSKFP AHVS (EVQ) は、様々ながんが発現している糖タンパク MUC16 (Mucin-16) に親和性のある分子として、最近、ファージディスプレイにより見出されたペプチドである。MUC16 は TNBC でも発現していることから、この EVQ が作製した粒子のリガンドとなるか検討を行った。EVQ を含むペプチド脂質は全て固相合成により行い、ポストインサージョン法によってローダミン (蛍光物質) を含む EVQ 修飾 PEG リポソームを作製した。作製したリポソームの TNBC 細胞への親和性の評価としては、4T1 細胞および MDA-MB-231 細胞を選択し、コントロールとしてヒト肺がん細胞 A549 を用いた。その結果、4T1 細胞および MDA-MB-231 細胞において、EVQ ペプチドの修飾率依存的な蛍光上昇を示したことから、EVQ が TNBC の新たな標的となる可能性を示した (図 6)。

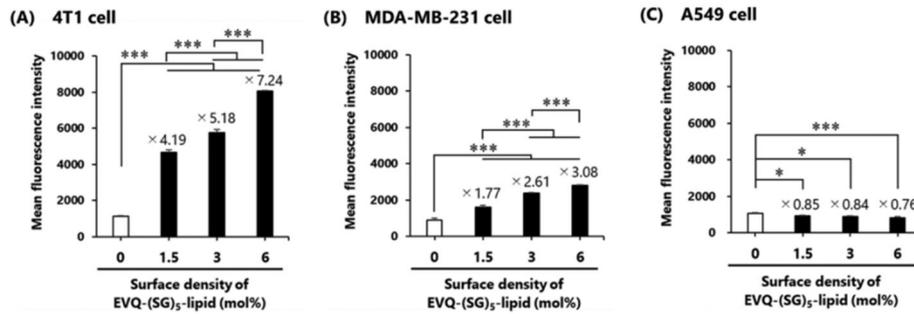


図6 Cellular association experiments in TNBC cells (4T1 and MDA-MB-231) or the other cell (A549). The values are displayed as the fold change compared with PEGylated liposomes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

(4) フッ素化バブル型内用放射線治療薬剤の開発

フッ素化バブルに内包する NQO1 特異的放射性薬剤として、著者らはインドールキノン骨格に基づく放射性ヨウ素化合物の開発を進めてきた。これまで NQO1 を高発現している固形がんを用いた検討において、NQO1 依存的な細胞取り込みを示す一方で、NQO1 により放射性ヨウ素を含む *p*-ヨードフェノールが速やかに代謝され脱離することが課題となっている。そこで、NQO1 による還元後の脱離を抑制するために、電子供与基としてメトキシ基あるいはメチル基を導入した放射性ヨウ素化合物を結成し合成した。ヨウ素標識前駆体とは放射性標識率および標識特異性の観点からスズ - 放射性ヨウ素交換反応を選択し、放射性ヨウ素標識体の合成に成功した。NQO1 に対する安定性については、NQO1 を含む溶液に放射性ヨウ素標識体および補酵素として NADH を加え、37°C で 30 分インキュベートした後に、逆相 TLC を用いて基礎代謝速度を算出した。その結果、導入した電子供与基によって NQO1 への親和性および NQO1 による分解速度が異なることが明らかとなり、メチル基を 1 つ導入した放射性ヨウ素化合物が NQO1 への高い親和性と NQO1 による分解の抑制を示した。

以上、本研究では、フッ素化界面活性剤に高い専門性を有する海外協力研究者 Krafft 博士とともにフッ素化ペプチド脂質の設計および合成を行い、Langmuir-Blodgett 法においてフッ素基の上昇による膜が安定化することを示した。また、PFH を含むバブル製剤においても、フッ素基を含む製剤では粒子サイズが減少し、継時的な安定性の向上が見られたことから、本研究のコンセプトとしたフルオラス相互作用による超音波ガス溶存量の増大し製剤の安定化が期待できる結果となった。また、これまでに有用な標的が乏しい TNBC に対する新たな標的として、MUC16 に対する EVQ ペプチドを選択し、その TNBC 細胞への標的性を明らかにした。さらに、フッ素化バブル製剤に内包する内用放射線治療薬剤として、代謝安定性の高い NQO1 特異的放射性薬剤の開発に成功した。今後、NQO1 特異的放射性薬剤を内包した EVQ 修飾フッ素化ペプチド脂質によるバブル製剤の内用放射線治療薬剤としての有用性を評価する必要がある。

参考文献

1. Sasaki, J., *et al.*, Synthesis and in vitro evaluation of radioiodinated indol-equinones targeting NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 for internal radiation therapy, *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 6039-6046 (2014).
2. Hagimori, M., *et al.*, Synthesis of high functionality and quality mannose-grafted lipids to produce macrophage-targeted liposomes, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 123, 153-161 (2018).
3. Silva, V.L., *et al.*, Selection of Novel Peptides Homing the 4T1 CELL Line: Exploring Alternative

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masayori Hagimori, Estefana E. Mendoza-Ortega, Marie Pierre Krafft	4. 巻 17
2. 論文標題 Synthesis and physicochemical evaluation of fluorinated lipopeptide precursors of ligands for microbubble targeting	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Beilstein Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 511-518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3762/bjoc.17.45	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hagimori Masayori, Kato Naoya, Orimoto Akira, Suga Tadaharu, Kawakami Shigeru	4. 巻 112
2. 論文標題 Development of Triple-Negative Breast Cancer-Targeted Liposomes with MUC16 Binding Peptide Ligand in Triple-Negative Breast Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 1740-1745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2023.02.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 萩森政頼、原史子、Estefania E. Mendoza-Ortega, Marie Pierre Krafft
2. 発表標題 標的指向性マイクロバブルのためのフッ素化ペプチド脂質の合成と評価
3. 学会等名 日本油化学会第60回年会
4. 発表年 2021年

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	漢字表記なし 漢字表記なし (KRAFFT Marie Pierre)	ストラスブール大学・シャルル・サドロン研究所・Research Director	

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		
フランス	ストラスブール大学 シャルル・サドロン研究所 / フランス国立科学研究センター		