

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07589

研究課題名（和文）自己重合化能を有する高分子化合物を用いた腫瘍特異的な超音波造影剤の開発

研究課題名（英文）Development of Tumor-Specific Ultrasound Contrast Agents Based on Polymeric Compounds Chemically Modified to Impart Self-Polymerization Ability

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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では腫瘍特異的に自己集合能を得ることで造影能を増大させる新規超音波造影剤の開発を目的に、多層カーボンナノチューブ（MWCT）、シアノベンゾチアゾール、グルタチオン構造に着目し、これを基にした新規薬剤の設計・合成およびその有用性の評価を行った。フィルター残存率測定を行ったところ、グルタチオンおよびシアノベンゾチアゾール結合MWCTは酵素による開裂を受け、末端システインとシアノベンゾチアゾールのチアゾリン形成による分子サイズ増大が観察された。以上から、グルタチオン構造とシアノベンゾチアゾールによるカーボンナノチューブ超音波造影試薬への腫瘍特異的な自己集合能の付与についての可能性が示唆された。

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の開発を目的に行われたものである。薬剤の開発には至らなかったものの、グルタチオン構造およびシアノベンゾチアゾールが多層カーボンナノチューブに腫瘍特異的な自己集合能を付与するという示唆が得られており、薬剤設計のコンセプトに大きな知見を与えるものであった。これらの化学的修飾は他の化合物においても適用が可能であり、超音波診断のみならず広範な腫瘍特異的イメージング分野に寄与するものであった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on multi-walled carbon nanotubes (MWCT), cyanobenzothiazoles, and glutathione structures to design and synthesize novel agents and evaluate their usefulness for the development of novel ultrasound contrast agents that increase contrast enhancement by acquiring tumor-specific self-assembly ability. Filter residency measurements revealed that the glutathione-bound MWCT was cleaved by the enzyme, and increased molecular size due to thiazoline formation of terminal cysteine and cyanobenzothiazole-bound MWCT. These results suggest the possibility that the glutathione structure and cyanobenzothiazole may confer tumor-specific self-assembly ability to the carbon nanotube ultrasound contrast reagent.

研究分野：放射線科学

キーワード：超音波造影剤 カーボンナノチューブ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超音波イメージングは小型で安全かつ低コストであるため導入が容易な手法であり、多くの施設で日常臨床に汎用されている画像診断法の1つである。そのため、超音波イメージング分野のさらなる発展は広範な効果を発揮すると期待され、特に超音波造影に適用可能な腫瘍造影剤の開発は、超音波による簡便なガン診断を可能とするために注目されている。

超音波診断の腫瘍造影剤では、化合物のサイズ、造影能、血管透過性、がん特異性が重要な要素である。これまでにマイクロバブル型の薬剤が造影能において高いシグナル増強を示すことが明らかにされているが、一方で化合物のサイズが大きいことから血管外への滲出が難しく、腫瘍を特異的に描出することは困難であった。そこで血管透過可能なサイズのナノカプセル型の造影剤が開発されてきたが、こちらは十分な超音波造影能を示さずがん特異的な描出には至らなかった。これはマイクロバブル型やナノカプセル型では分子サイズの増大に伴いシグナルの増強が確認されるが、同時に分子サイズの増大はがんへの移行を妨げるというジレンマに陥ってしまうためと考えられる。

そこで我々は、マイクロバブルやナノカプセルとは異なる新たな造影剤の薬剤設計が必要であると考え、超音波造影剤の候補化合物として近年報告されている多層カーボンナノチューブ (MWCT) に着目し、これを基本骨格としたがん特異的な造影剤の設計を行った。

MWCT はアスペクト比の高い円筒状の化合物であり、分子の向きによって大きさが異なることから、同程度の大きさの球状分子よりも血管からの漏出が容易である。また、MWCT は分子表面に化学的修飾を施すことが可能であるため、特異的な反応により共有結合を形成する化合物の組み合わせや、腫瘍特異的に酵素反応するペプチドなどを MWCT 表面に結合させることで、がんが集まった MWCT のみが自己集合を起こし、分子サイズが増大することで高い超音波造影能を発揮する、という設計が可能である。

これまでの報告から、グルタチオン構造が酵素反応によって末端システインを生じることや、6-アミノ-2-シアノベンゾチアゾール構造が末端システインと反応しチアゾリン構造を形成し共有結合することが明らかにされており、我々はこれらの反応が、造影剤の腫瘍特異的な分子増大に応用可能であると考えた。

2. 研究の目的

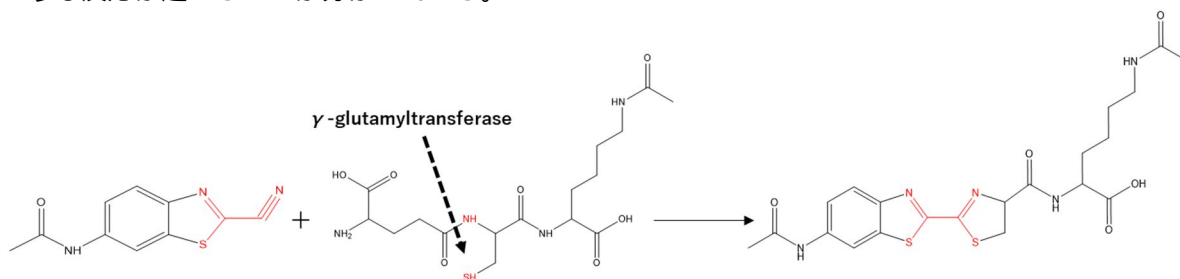
本研究では汎用性の高い画像診断法である超音波イメージングをがん診断領域へと展開することを目標に、腫瘍特異的な超音波造影剤の開発を目的としている。

本検討では多層カーボンナノチューブを基本骨格とし、腫瘍内あるいは腫瘍近傍で高発現している酵素による代謝を受けることで自己集合能を獲得する化学的修飾を付与した造影剤を設計・合成し、新規薬剤の腫瘍特異的な超音波造影剤としての有用性の評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 多層カーボンナノチューブを基本骨格とした新規薬剤の設計および合成

我々はこれまでに低分子モデル化合物を用いた検討から、2-シアノベンゾチアゾールがシステインと反応し、チアゾリン構造を生じて共有結合を形成することを確認している。また、グルタチオンは グルタミルトランスペプチターゼによって開裂し、末端にシステイン残基が露出する構造として知られており、これらを組み合わせた低分子モデル化合物の検討から、下図のような反応が起こることが分かっている。



そこで本研究ではこの化合物の組み合わせを MWCT に導入した、シアノベンゾチアゾール結合 MWCT およびグルタチオン結合 MWCT を候補化合物として設計した。修飾部位との間には、MWCT の難溶性を解消するための水溶性リンカーとして、分子表面に多数のアミノ基を有する PAMAM dendrimer を導入することとした。

基本骨格となる MWCT には、Carbon nanotube, multi-walled, carboxylic acid functionalized (sigma-Aldrich) を用い、全ての検討に先立って本試薬が反応可能なカルボン酸基をどのくらい有しているか、 ^{125}I 標識アミノ酸との縮合反応から推定を行った。本検討ではまず MWCT 試薬に、一部が ^{125}I 標識された tBu 保護チロシンを大過剰に縮合し、限外ろ過膜 (100k WACO) にて十分な精製を行ったのち、得られた ^{125}I チロシン結合 MWCT とろ液の放射活性を測定し、加えたチロシンのうち結合した割合を算出することで反応に関与したカ

ルポン酸基の数を算出した。

以降は得られたカルボン酸基数をもとに修飾部位の結合を行い、WSCl (Water Soluble Carbodiimide) を縮合剤に用いたアミド結合の形成と、限外ろ過膜 (100k WMC0) を用いた精製を繰り返し、第四世代 PAMAM dendrimer、シアノベンゾチアゾールあるいはグルタチオン誘導体を段階的に伸長させた。サンプルの一部には測定を容易にするために ^{125}I 標識 3-(3-iodo-4-hydroxyphenyl) propanoyl 基 (ポルトン-ハンター試薬) を結合させた。

(2) In vitro におけるモデル化合物の分子サイズ増大の検討

有機化学的手法により得られた 5 種類の修飾 MWCT を用い、シアノベンゾチアゾールとシステインの反応による分子サイズの増大について、種々の孔径を持つフィルターに対する残存率から評価を行った。

シアノベンゾチアゾール結合体 (^{125}I 標識) とシステインリジン (CK) 結合体、シアノベンゾチアゾール結合体 (^{125}I 標識) と修飾なし MWCT、CK 結合体 (^{125}I 標識) とシアノベンゾチアゾール結合体、CK 結合体 (^{125}I 標識) と修飾なし MWCT の 4 種の組み合わせを作り、それぞれを D-PBS 溶液中、37 °C で一晩攪拌した。その後、サンプル溶液の一部を孔径の異なる 6 種類のフィルターに通し、得られたろ液とフィルター膜の放射活性を測定した。

(3) In vitro における酵素反応による開裂と分子サイズ増大の評価

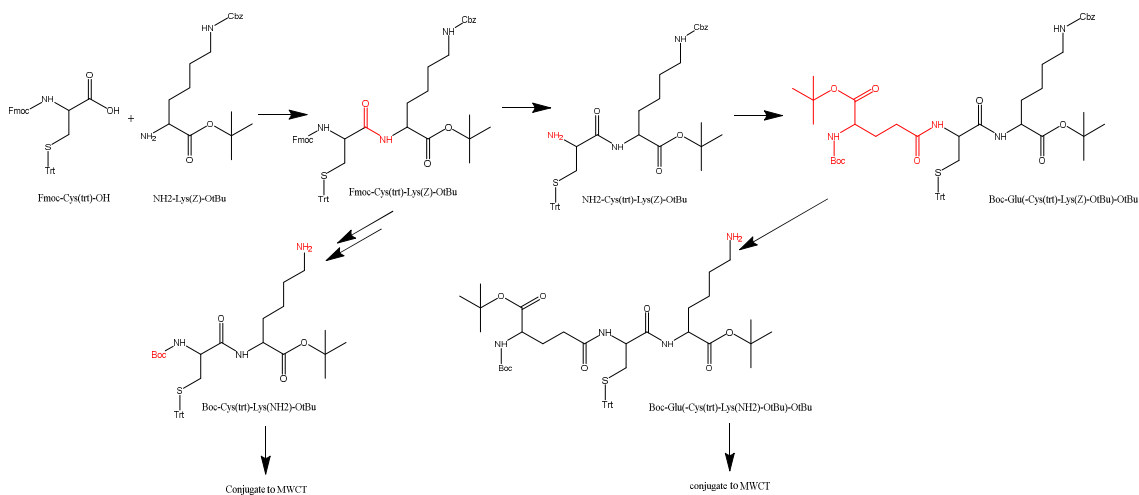
有機化学的手法により得られた 2 種の修飾 MWCT を用い、グルタチオン構造の酵素的な開裂反応と、それに伴うシアノベンゾチアゾールとシステインの反応による分子サイズの増大について、(2) と同様にフィルター残存率から評価を行った。

シアノベンゾチアゾール結合体 (^{125}I 標識) とグルタチオン (ECK) 結合体を混合し、さらに腎ホモジネートを加えて 37 °C で一晩インキュベートしたのち、サンプル溶液の一部を孔径の異なる 3 種類のフィルターに通し、得られたろ液とフィルター膜の放射活性を測定した。腎ホモジネートの代わりに D-PBS を加えたサンプルも別途用意し、同様の操作を行ったのちにそれぞれのフィルター残存率を比較した。

4. 研究成果

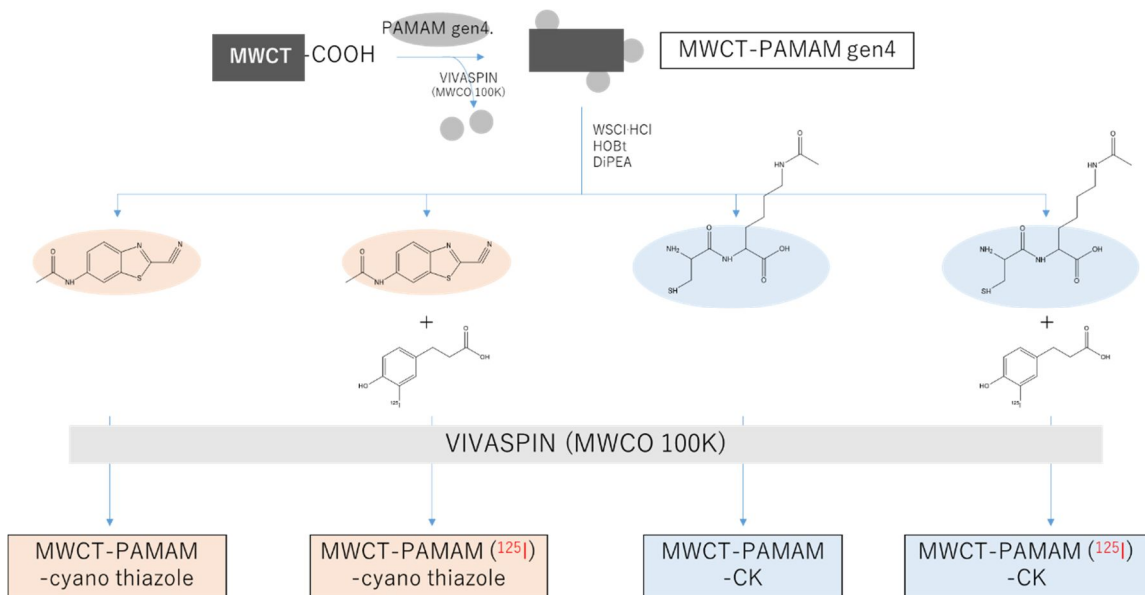
(1) 多層カーボンナノチューブを基本骨格とした新規薬剤の設計および合成

下記に示すように保護システインと保護リシンを出発物質として、段階的な縮合反応によってジペプチド化合物およびトリペプチド化合物を合成した。

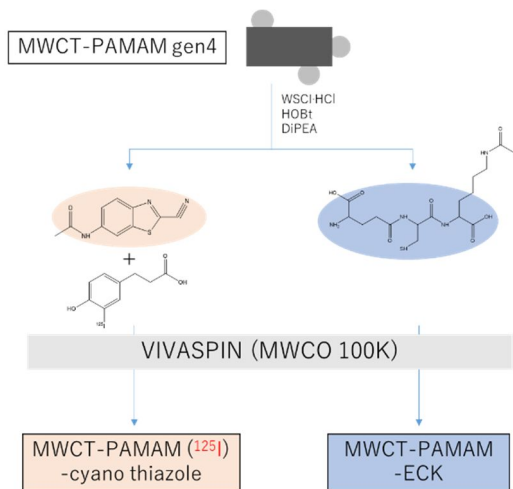


MWCT への化学的修飾の結合に先立って行ったカルボン酸基数の算出では、3 mg の MWCT に対して一部に ^{125}I 標識体を含む NH₂-Tyr-OtBu 6 mg を反応させたところ、MWCT に結合した活性は 5.18% であった。以上から MWCT 3 mg に 1.3×10^{-6} mol のチロシンが結合可能であり、MWCT 1 mg は 0.44 μmol の反応可能なカルボン酸基を有していると推定された。

本カーボンナノチューブ試薬に対し、PAMAM dendrimer を縮合させた後、下図に示す通りさらに 4 種類の化合物の縮合を行った。



また、酵素との反応による自己集合能の獲得について評価するため、グルタチオン構造を縮合させた化合物を右図のように合成した。



(2) In vitro におけるモデル化合物の分子サイズ増大の評価

各サンプル溶液のフィルター残存率について表に示す。

シアノベンゾチアゾール結合体 (¹²⁵I 標識) とシステインリジン(CK) 結合体、シアノベンゾチアゾール結合体 (¹²⁵I 標識) と修飾なし MWCT の結果を比べると (赤枠) 孔径の小さなフィルター においては大きな差はないが、孔径の大きなフィルター ではコントロール CK 結合体混合サンプルで 1.1% 4.8%、20.1% 71.9%、7.5% 40.0% とフィルター膜残

(D-PBS, 37°C, 0/N) → filtration	フィルター残存率					
	① 0.45um	② 1.00um	③ 300K MWCO	④ Cell Strainer	⑤ filter tip	⑥ 10 um
MWCT-PAMAM (¹²⁵ I)-cyano thiazole × MWCT-PAMAM-CK	99.4%	98.3%	98.3%	4.8%	71.9%	40.0%
MWCT-PAMAM (¹²⁵ I)-cyano thiazole × MWCT-PAMAM gen4	99.6%	96.1%	97.8%	1.1%	20.1%	7.5%
MWCT-PAMAM (¹²⁵ I)-CK × MWCT-PAMAM-cyano thiazole	96.6%	93.9%	89.2%	5.1%	44.1%	48.5%
MWCT-PAMAM (¹²⁵ I)-CK × MWCT-PAMAM gen4	96.2%	85.7%	85.5%	1.7%	17.7%	9.1%

存率が增大している。これは、シアノベンゾチアゾール結合 MWCT のシアノ基と CK 結合 MWCT の末端システインがチアゾリン結合を形成し、分子サイズが大きくなったことに由来すると考えられる。

さらに、CK 結合体 (¹²⁵I 標識) とシアノベンゾチアゾール結合体、CK 結合体 (¹²⁵I 標識) と修飾なし MWCT の結果を比べると (青枠) 同様にフィルター においては大きな変化はないが、フィルター ではコントロールサンプルとシアノチアゾール結合体混合サンプルで 1.7% 5.1%、17.7% 44.1%、9.1% 48.5% と膜残存が増大しており、チアゾリン形成による分子サイズの増大が起こったと考えられる。

(3) In vitro における酵素反応による開裂と分子サイズ増大の評価

右表は各サンプルのフィルター膜残存率について示している。

シアノベンゾチアゾール結合体 (^{125}I 標識) とグルタチオン (ECK) 結合体を混合したサンプルを 37 で一晩インキュベートしたところ、マウス腎ホモジネートの有無でフィルター残存率がフィルター 17.2% 36.4%、15.7% 50.9%、55.1% 73.9%と変化した (フィルターの番号は

	MWCT-PAMAM (^{125}I) -cyano thiazole	x	MWCT-PAMAM -ECK	④ Cell Strainer	⑤ filter tip	⑥ 10 um
(D-PBS, kidney homogenate 37°C, O/N)				36.4%	50.9%	73.9%
(D-PBS, 37°C, O/N)				17.2%	15.7%	55.1%

(2) に用いたフィルターに準拠している)。グルタミルトランスぺプチターゼの発現が豊富な腎由来のホモジネートを加えることによる分子サイズの増大が確認されており、トリペプチドの酵素的な開裂と末端システインの露出、およびシアノ基とシステインによるチアゾリン形成が起こったと考えられる。

一方で (2) の結果と比較すると、修飾部位をジペプチド (CK) からトリペプチド (ECK) に変更した際のフィルター残存率の変化も確認されており、修飾部位の構造が全体の性質に影響を与え得るものであると明らかになった。これはペプチド構造を変えたことで脂溶性や電荷が変化したことによるものと考えられる。

本研究によって得られた結果から、シアノベンゾチアゾールとグルタチオンにより修飾された多層カーボンナノチューブは、酵素反応特異的な開裂を受けて自己集合能を獲得する腫瘍特異的超音波造影剤として有用である可能性が示唆された。

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	福島 康宏 (Fukushima Yasuhiro) (60772861)	群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座等教員 (12301)	
研究分担者	金井 彩香 (Kanai Ayaka) (10847495)	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