

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：32617

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870836

研究課題名(和文) 温度応答性を付与した癌細胞造影剤の新規構造モジュールの構築

研究課題名(英文) Novel Structural Motif for Imaging and Therapeutic Agent of Cancer Cells

研究代表者

岡田 朋子 (Okada, Tomoko)

駒澤大学・医療健康科学部・講師

研究者番号：60409795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がん細胞に対する造影剤の新しい構造モジュールを創製することを目的として実施した。まず、集積特性をもつコラーゲンペプチドと近赤外(NIR)領域の光に応答する色素を組み込んだ分子をデザインし、合成した。続いて、得られた分子の集積特性とNIR領域における蛍光特性を明らかにした。最後に、この分子をグリオーマ(ヒト神経膠芽腫由来細胞)に反応させた後にNIRを照射すると、コラーゲンを被覆した細胞が選択的に破壊されることを確認できた。この細胞毒性は、細胞周囲に集積していた分子がNIRを受けて引き起こしたものであったことから、新しい構造モジュールの可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a novel structural motif of imaging and therapeutic agent for cancer cells. A novel agent was designed and synthesized by conjugation of collagen peptide and a near-infrared (NIR) responsive dye. The collagen peptide was incorporated for targeting collagen fibrils around cancer cells and the NIR dye was for triggering cytotoxicity in human glioma cells. The effective cytotoxicity was achieved by association of the collagen peptide with the collagen surrounding the cells. The results obtained in this study suggest a novel approach for delivering therapeutic imaging agent to targeting cells.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：コラーゲンペプチド 近赤外 集積 光熱治療 がん細胞

1. 研究開始当初の背景

癌に対する活発な研究開発により、新しい診断方法や治療方法が報告され、癌の治癒確率は確実に上昇している。しかし、副作用の克服も含めて、癌に対する対処方法は不十分である。近年では、放射線よりも正常細胞へのダメージが少ない核磁気共鳴画像法(MRI)や、近赤外線(NIR)を使用した診断・治療法の研究開発が活発である。例えば、抗体に金属微粒子を結合させたものを造影剤として利用し、がん細胞を可視化した状態で光照射して細胞を破壊する(光熱治療)方法が報告された。特に、NIRを使った光熱治療は、診断と治療を同時に行うことができ、かつ副作用が少ない事から、魅力的な方法である。しかし、この方法を可能にする薬剤(造影剤)の開発は未だ発展途上であり、副作用や実用性の点から改善が求められている。NIRを利用した副作用の少ない新しい診断・治療方法を開発していくことで、人類の癌に対する恐怖を軽減していくことが期待できる。

2. 研究の目的

近赤外線(NIR)を使った癌に対する光熱治療を可能にする、新しい薬剤(造影剤)の構造モジュールを創製することを目的とする。特に、がん細胞へのターゲティング能を向上させるために有効な薬剤の構造モジュールを構築することを目指す。薬剤を選択的にがん細胞に結合させてNIR照射により細胞毒性を引き起こすことが可能になれば、より治療の副作用を低減することにつながる。

3. 研究の方法

NIRを利用した光熱治療を可能にするための新しい薬剤の創製を目指し、研究項目(1)~(4)について実施した。

(1) 薬剤分子のデザインと合成

コラーゲンペプチドを組み込んだ薬剤の構造モジュールを設計した。コラーゲンペプチドの部分には、分子が集積すると三重らせん構造を形成する H-(Pro-Hyp-Gly)₁₀-OH (PHG10)を導入した。また、光熱治療が可能な NIR 領域の色素(dye)には、800CW および 700DX を導入した。これらをコラーゲンペプチドの N 末端に結合させて、PHG-dye を合成した(Fig. 1)。目的物は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製し、分取した。

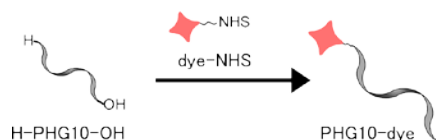


Fig. 1 分子のデザインと合成スキーム

(2) 分光特性と構造特性評価

合成した PHG10-dye の吸光特性と蛍光特性を、マイクロプレートリーダーと分光光度計で評価した。また、構造特性は、円偏光二色性スペクトルで評価した。

(3) がん細胞ターゲティング能の評価

がん細胞には、グリオーマ(ヒト神経膠芽腫由来細胞:HGC)を用いた。HGCをコラーゲンタンパクでコーティングした細胞と、未処理のHGCに対して、PHG10-dyeのターゲティング能を評価した(Fig. 2)。HGCへのコラーゲンコーティングは、コラーゲン抗体で染色し、存在を確認した。培地上の細胞にそれぞれPHG10-dyeの溶液を反応させ培養した後、蛍光顕微鏡でPHG10-dyeの細胞への結合能を評価した。

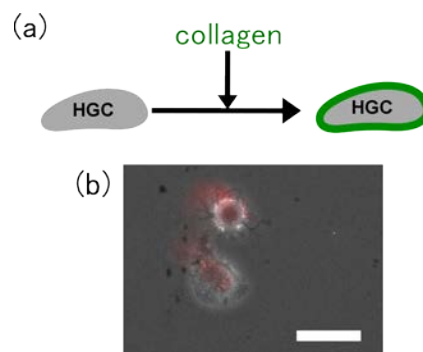


Fig. 2 (a)コラーゲンコートした HGC の作製と (b)コラーゲン抗体染色後の顕微鏡像 (red: fluorescence of anti-collagen, gray: DIC, white bar: 50 μm)

(4) がん細胞の造影・破壊条件の最適化

PHG10-dye を結合させた HGC に NIR(635 - 675 nm, 9.6 mW)を照射し、細胞形態の経時変化を倒立型蛍光顕微鏡(×200)で評価した。顕微鏡のステージには温度制御装置を設置し、35°C の条件下に dish を保持して観察した。また、細胞毒性は、顕微鏡画像による形態評価とともに、Propidium Iodide (PI) 染色法を使って確認した。

4. 研究成果

(1)

まず、コラーゲンペプチドに、NIR に応答する色素を結合させた分子を設計し、合成し

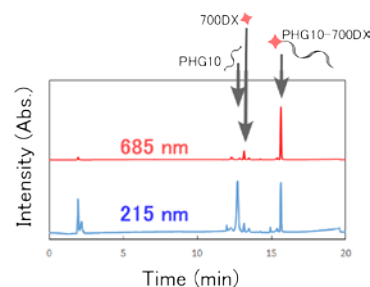


Fig. 3 PHG10-700DX の HPLC 分析

た。HPLC (Fig. 3)と質量分析の結果から、目的物を同定できた。

(2)

得られた分子 (PHG10-700DX, PHG10-800CW) の集積特性と蛍光特性を評価した。PHG10-800CW の CD スペクトルでは、温度に依存した三重らせん構造の形成を確認できた。融解温度は $T_m = 65^\circ\text{C}$ であり、三重らせん構造の指標である Rpn は 0.48 であった。色素を結合させていない PHG10 ($T_m = 64^\circ\text{C}$, Rpn = 0.39) と比較すると、 T_m はほぼ同じであり、かつ Rpn 値も減少しなかったことから、色素 800CW を PHG10 に導入しても、コラーゲンの集積特性は維持されていることが示唆された。以上のことから、得られた分子は自己集積して安定な三重らせん構造を形成する特性を確認できた。

蛍光特性は、PHG10-700DX では蛍光スペクトルのピーク波長が $\lambda_{em} = 695\text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 670\text{ nm}$) であり、PHG10-800CW では $\lambda_{em} = 781\text{ nm}$ ($\lambda_{ex} = 710\text{ nm}$) であった。dye 単独の時 (700DX: 703 nm; 800CW: 781 nm) と比較すると、ピーク位置はわずかしかわらなかつた。PBS ではいずれも dye も安定であったが、塩基性条件下では、800CW は 700DX よりも不安定であった。この点から、細胞毒性の評価実験には PHG10-700DX を使用することにした。

(3)

新しく合成した分子 PHG10-700DX を使い、がん細胞 (HGC) へのターゲティング能を評価した。申請時には、ターゲティングに糖鎖を利用することを計画していた。しかし、コラーゲントタンパクが、がん細胞の周囲に過剰発現することに注目し、糖鎖を要せずにごん細胞に分子を集積させることにした。コラーゲンをコートした HGC に PHG10-700DX を共存させて培養し、wash した後の蛍光像を記録した (Fig. 4)。この結果から、PHG10-700DX が集積して HGC が染色されたことを確認でき

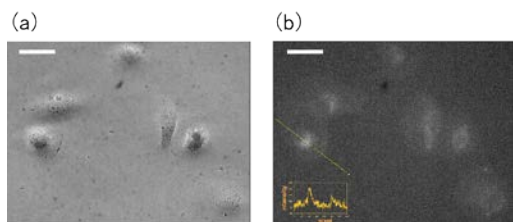


Fig. 4 HGC (コラーゲンコート有り) を PHG10-700DX とともに培養した後の (a) 明視野 (DIC) および (b) 蛍光顕微鏡像 (yellow: intensity profile; white bar: 50 μm)

た。コラーゲンコートしていない HGC に対して、同様に PHG10-700DX を反応させて、wash 後の蛍光顕微鏡像を観察したところ、蛍光シグナルは検出されなかつた。これは、PHG10-700DX が、コラーゲンコートした HGC に選択的に集積したことを示している。上記

(3)の結果で述べたように、PHG10-700DX は三重らせん構造を形成して自己集積する性質を示すことが分かっている。そのため、Fig. 4(b)で HGC が染色されたのは、PHG10-700DX が HGC 周囲に存在するコラーゲンに結合したためだと考えられる。以上の結果から、コラーゲンが自己集積する特性を利用すれば、コラーゲントタンパクが周囲に過剰発現している細胞に対して薬剤を効果的にターゲティングできることが明らかになった。

(4)

PHG10-700DX が集積している HGC (コラーゲンコート有り) に NIR を照射し、細胞毒性を評価した。Fig. 5(a)に得られた顕微鏡像の経時変化を示す。NIR 照射時間の経過とともに、細胞がシュリンクしていく様子がみら

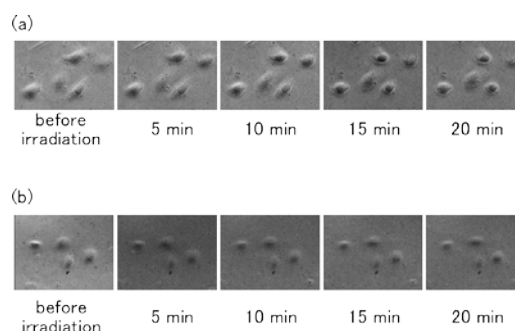


Fig. 5 (a) PHG10-700DX が結合している、または (b) PHG10-700DX を反応させていない HGC (コラーゲンコート有り) に NIR を照射して得られた顕微鏡像 (DIC) の経時変化

れた。この形態変化は、NIR 照射 1 min 後の画像にも現れており、10~15 min 後には収束した。このような形態変化は、同じ dish 内で NIR 未照射領域の細胞にはみられなかつた。また、PHG10-700DX を加えずに、コラーゲンコートされている HGC に NIR を照射しても、形態変化は起こらなかつた (Fig. 5(b))。Fig. 5(a) でシュリンクした細胞が細胞死に至っているかを、PI 染色法で確認した。Fig. 6 は、PHG10-700DX を反応させた後に NIR 照射した HGC (コラーゲンコート有り) が、PI で染色された様子を示している。染色された細胞数の割合は 85%以上であった ($n = 3$)。PI で染色されたことは、細胞死が起きていることを示している。このことから、

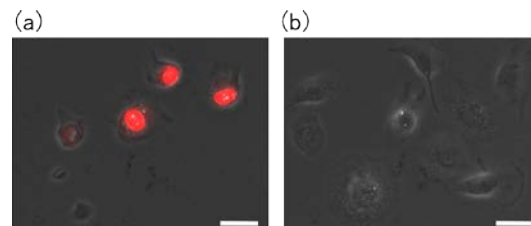


Fig. 6 HGC (コラーゲンコート有り) の PI 染色像 ((a) NIR 照射および (b) 未照射の顕微鏡像 (明視野と蛍光像の重ね合わせ) (red: fluorescence of PI; gray: DIC, white bar: 50 μm))

PHG10-700DX が結合した HGC に NIR を照射すると、85%以上の細胞が細胞死に至ることがわかった。一方、Fig. 5(b)で形態変化が観られなかった NIR の未照射領域の HGC は、PI で染色されなかった。また、PHG10-700DX を反応させずに NIR を照射した HGC も、PI で染色されず、細胞死は起こらなかった。細胞死が起こった直接の原因はまだ解明できていないが、NIR を受けた dye が局所的に熱を発生するか、または活性酸素を発生させることで、細胞膜が破壊されているのではないかと推察している。以上のことから、本実験で観察された細胞毒性は、細胞周囲に集積していた PHG10-700DX が NIR を受けて引き起こしたものであることを明らかにした。

本研究により、細胞選択的に集積し、NIR によって細胞毒性を引き起こす新しい薬剤の構造モジュールを示すことができた。コラーゲンペプチドの集積特性を利用した細胞へのターゲティング法は、これまででない新しいアプローチである。既存の抗原抗体反応を利用した分子標的薬に加えて、新しい薬剤のデザインモチーフになりうると期待できる。今後は、組織および *in vivo* での評価を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Masayuki Honda, Aoi Odawara, Ikuro Suzuki, Morio Shimada, Kohki Yoshikawa, Tomoko Okada. “Near-Infrared-Responsive Peptide that Targets Collagen Fibrils to Induce Cytotoxicity” *Photochemistry and Photobiology*, 査読有, (2016), URL: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1751-1097](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1751-1097).

② Tomoko Okada, Chika Isobe, Takeaki Wada, Sumiyo Ezaki, Norihiko Minoura. “Switchable Binding Affinity of Mannose Tethered to Collagen Peptide by Temperature-Dependent Triple-Helix Formation” *Bioconjugate Chemistry*, 査読有, 24 (2013), 841 - 845. DOI: 10.1021/bc3006013

[学会発表] (計 1 件)

① 岡田 朋子、小林 司 “近赤外蛍光色素でラベルしたコラーゲンペプチドの構造特性および分光特性評価”、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 27 日、「名古屋大学 (愛知県・名古屋市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 朋子 (OKADA, Tomoko)
駒澤大学・医療健康科学部・講師
研究者番号：60409795

(2) 連携研究者

鈴木 郁朗 (SUZUKI, Ikuro)
東北工業大学・工学部・講師
研究者番号：90516311

(3) 研究協力者

本多 正幸 (HONDA, Masayuki)

小田原 あおい (ODAWARA, Aoi)