

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 13 日現在

機関番号：23701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670059

研究課題名(和文) 化学的分子送達システムの創製 腫瘍を標的とする核集積性ホウ素キャリアの開発

研究課題名(英文) Development of chemical drug delivery system using pepducin for boron carriers of BNCT

研究代表者

永澤 秀子 (Nagasawa, Hideko)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90207994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ホウ素中性子捕捉療法における新規ホウ素キャリアの開発を目指して、pepducinのユニークな細胞膜透過機能に着目した膜透過性ホウ素クラスターの設計と合成を行った。臨床で用いられている低毒性のホウ素キャリアであるBSH(sodium borocaptate)は、陰イオン性ホウ素クラスターで細胞膜を透過しないが、pepducin由来のリポペプチドとのハイブリッド分子に変換したところ、細胞膜透過性を示した。さらに、細胞内取り込みを指標として、pepducinのペプチド配列と脂質構造及びリンカー構造などの構造展開を行ったところ、それらの構造と細胞内取り込みに相関があることを見出した。

研究成果の概要(英文)： Selective delivery of sufficient quantity of  $^{10}\text{B}$  to tumor cells is essential for the success of boron neutron capture therapy (BNCT). Although sodium borocaptate (BSH) has been used clinically as a boron carrier for BNCT, it is impermeable to plasma membrane due to its anionic charges. Recently, we found that pepducins, which are artificial lipopeptides derived from an inner loop domain of G protein-coupled receptors (GPCRs), enabled anionic molecule such as fluorescein to penetrate membrane directly.

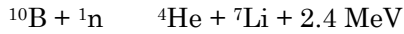
In this study, we designed and synthesized novel pepducin-boron cluster hybrid compounds as membrane permeable boron carriers for BNCT and evaluated their intracellular penetration ability. The pepducin comprising 13pep and palmitoyl tail showed the highest uptake quantity of boron atom into cells. We are further trying to modify the structure of boron carriers for tumor targeting delivery.

研究分野：創薬化学

キーワード：ホウ素中性子捕捉療法 ホウ素キャリア 化学的分子送達システム がん

### 1. 研究開始当初の背景

ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) は、がん細胞に取りこませた  $^{10}\text{B}$  原子に比較的低エネルギーの熱中性子 ( $> 0.5 \text{ eV}$ ) を照射することで核崩壊を誘導し、生じたりチウムとヘリウム ( $\alpha$  線) によって細胞を殺傷する。



熱中性子は人体に対して無害であるが、この核反応で生じる  $\alpha$  粒子の飛程は約細胞 1 個分 ( $5\text{-}9 \mu\text{m}$ ) に相当するため、 $^{10}\text{B}$  をがん細胞のみに取りこませることができれば、がん細胞選択的に障害をもたらすことができる。

現在、ホウ素キャリアとして Sodium mercapto undecahydrododecaborate (BSH) と p-bronophenylalanine (BPA) が臨床に供されているが、がん細胞への選択性や集積性において満足のいくものではない。

また、BSH は 12 個の  $^{10}\text{B}$  原子を含むホウ素クラスターでホウ素含量の高さと毒性の低さから臨床に用いられているが、陰イオン性を有するために細胞膜透過性を持たないため腫瘍送達効率の向上が求められている。

一方、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 細胞内ループ領域に由来のペプチドと脂質分子からなるリポペプチドの pepducin は、細胞膜を直接透過する性質を有する。そこで、我々は、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) クエンチングシステムを利用した pepducin 蛍光プローブを開発し、pepducin の細胞内移行機序について解析を行った結果、脂質部分が細胞膜にアンカリングした後にフリップ運動によりペプチド部分が細胞内に転移することにより直接膜透過することを証明した。<sup>1</sup>

### 2. 研究の目的

本研究では、化学修飾によって分子を特定の標的に送達する化学的分子送達システムの構築を目指す。そこで、pepducin を利用した化学的分子送達システムによる BNCT のためのホウ素キャリアの開発を行う。まず、細胞膜を透過しにくい、親水性「積荷」分子である陰イオン性ホウ素クラスターの BSH を選び、これに膜透過能を付与するために pepducin 型リポペプチドキャリアに結合させ、細胞内取り込み効率の向上をはかる。細胞内取り込み量を指標として、リポペプチド及びリンカー構造の構造最適化を行う。

### 3. 研究の方法

Pepducin は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) モジュレーターとして開発されたリポペプチドであり、標的 GPCR の細胞内ループドメイン構造に由来するペプチド断片を含み、細胞内に直接ペプチド部位が挿入されて生理活性を発揮すると考えられている。そこで、我々は pepducin の細胞内移行機構を解明すべく、FRET 型 pepducin 蛍光プローブを開発した。この分子は pepducin 及び、

FRET モジュール (蛍光色素フルオレセインと細胞内グルタチオンによって開裂するジスルフィドリンカーを介して結合させたダブルシルクエンチャー) から成る。この分子を用いて生細胞イメージングを行った結果、pepducin は脂質分子のフリップ運動によって直接膜透過するユニークな機能を持つと考えられた。<sup>1</sup> そこで、今回 GPCR の一つである protease-activated receptor-1 (PAR-1) を標的とする pepducin の構造を参照して、Fig. 1 に示すような BSH とのハイブリッド分子を設計した。

BSH を適当なリンカーと S-S 結合を介して、pepdusin リポペプチドに結合させる。これにより細胞質に移行すると、豊富に存在するグルタチオンによって切断され、BSH を含む断片が放出され、細胞内に蓄積されるものと期待した。

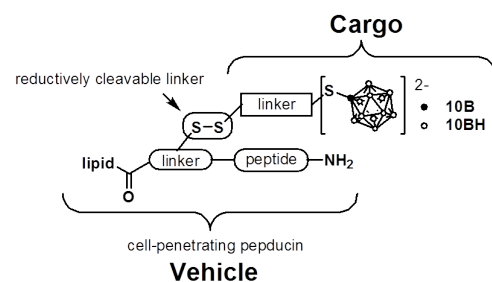


Fig. 1 Design of membrane penetrating boron carriers

まず、pepducin の構造最適化のために、種々のペプチド配列や脂質の種類について検討した。得られた誘導体の細胞内取り込みの評価は、神経膠芽腫 T98G 細胞にホウ素化合物を一定時間処理し、濃硝酸で抽出して、ICP-AES でホウ素濃度を測定することによって行った。

### 4. 研究成果

当初、核移行性ホウ素キャリアを目指して Fig. 2 に示す化合物を設計した。すなわち、細胞内に放出された BSH を含む断片を核移行させ、さらに蛍光イメージングでとらえることができるように、蛍光色素 Hoechst

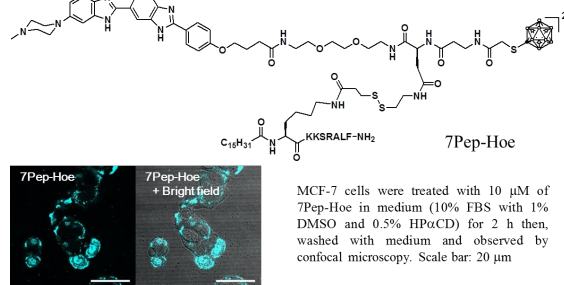
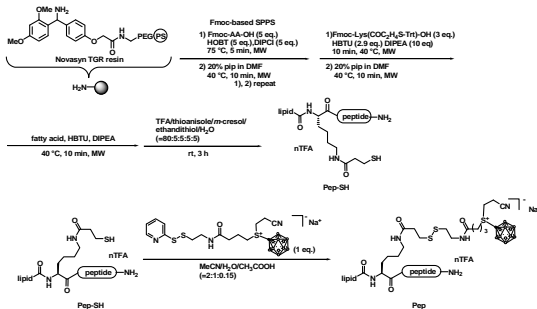


Fig. 2 structure of nuclear targeting boron carrier and its imaging picture

33342 を導入したホウ素キャリアを設計し、その合成を達成した。そこで、細胞内取り込みを評価すべく、生細胞イメージングによって細胞内局在を調べた結果、核への局在が確認された。しかしこの分子は物性が悪く(水への溶解度が低い)、ペプチド配列や脂質構造の

変換をおこなったが改善されず、色素の導入によって不溶性になると考えられた。今後、*in vivo* への展開が困難となることが予想されたため、蛍光色素を導入した核移行性ホウ素キャリアの開発については断念した。

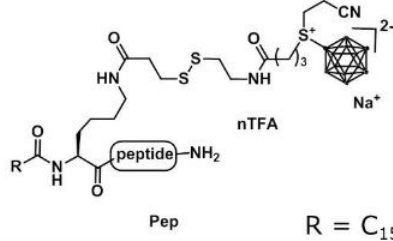
そこでまず、Fig. 1 の分子設計に切り替え、合成をおこなった。各種リポペプチドは Scheme 1 に示すマイクロウェーブを用いた Fmoc 固相合成法にて、良好な収率で合成できた。これらリポペプチドに液相反応で合成したリンカーを含むボロンクラスターを導入し、Pep シリーズホウ素キャリアを中程度の収率で得ることに成功した。



Scheme 1 Synthesis of boron carriers based on peptidic

以上の方法で、Table 1, 2 に示す各種 Pep 誘導体を合成した。

Table 1 Structures of boron carriers



Pep	Sequence of peptide
7Pep	KKSRLF
13Pep	AVANRSKKSRLF
10Pep	AVANRSKKSRLF
13Pep <sub>mix-1</sub>	SKKSRAVANRALF
13Pep <sub>mix-2</sub>	ALFAVANRSKKSRLF
13Pep <sub>mix-3</sub>	ARVSAKNKASLRF
13Pep <sub>rev</sub>	FLARSKKSRLF

Table 2 Structures of boron carriers

Pep	R
13Pep	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>
myr-13Pep	C <sub>13</sub> H <sub>27</sub>
Ac13pep	CH <sub>3</sub>
DHA-13Pep	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub>
LCA-13Pep	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> OH

\*Sequence of peptide = AVANRSKKSRLF

次に 7Pep と 13Pep の細胞内取り込みについ

て調べるため、それぞれ 10 μM を T98G 細胞に 12 時間処理し、細胞内ホウ素濃度の経時変化を調べた。PAR-1 由来の pepducin と同じ 13 残基のアミノ酸配列とパルミトイル基を有する 13Pep で処理した場合、経時的に細胞内取り込み量が増加し、12 時間後に最大となり約 200 ng B/10<sup>6</sup> cells となった。また 20 μM で 12 時間処理すると、約 450 ng B/10<sup>6</sup> cells となり、用量依存的な取り込み量の増大が認められた。これに対して、7Pep で処理した場合はほとんど細胞内に取りこまなかったことから、pepducin 部分の構造によって細胞内への送達効率が大きく異なることが明らかになった(Fig. 3)。

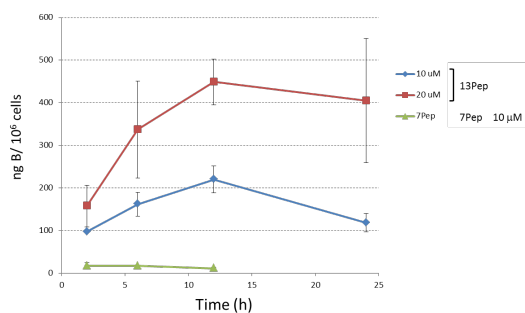


Fig. 3 time course of the intracellular uptake of 10B by the use of boron carrier 13Pep and 7Pep

さらに 13Pep の安定性を調べるため、10 μM の 13Pep を 10% の血清を含む培地中で 37 °C でインキュベートし、HPLC で残存 13Pep を定量したところ、24 時間経過しても約 70% の 13Pep が残存し、高い安定性を持つことが明らかとなった。

その他のペプチド配列に関しては、N 末端側や C 末端側の数残基を排除した短い配列を有する Pep 誘導体では 13Pep と比較して細胞内取り込みの低下が見られた。また PAR-1 由来のアミノ酸配列をランダムにした場合や逆向きにした場合も同様に取り込みは低下した。脂質部位に関してはパルミトイル基の他に炭素数の少ない飽和脂肪酸であるミリスチル基(myr)、不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)、ステロール骨格を有する脂肪酸(LCA)について検討したが、C<sub>15</sub> 飽和脂肪酸のパルミトイル基が最も良好な取り込みを示した(Fig. 4)。

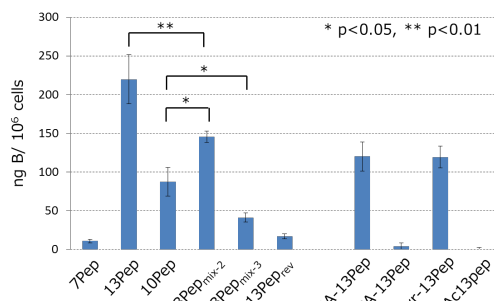
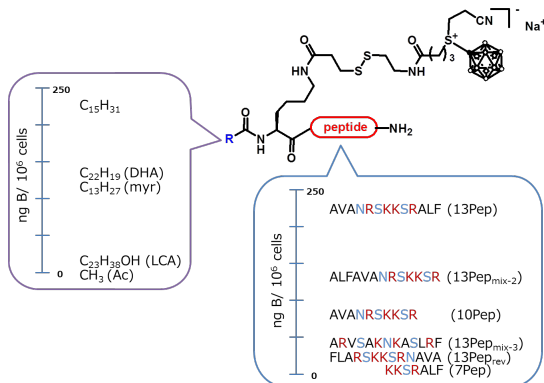


Fig. 4 The intracellular uptake of 10B by the use of 10 μM boron carrier Pep derivatives for 12 h

以上、BNCTのために pepducin を基盤とした膜透過性ホウ素キャリアを設計し、合成を達成した。Pepducin の脂質構造及びペプチド配列によって、細胞内への取り込み量が大きく変化した。脂肪酸構造に関しては、炭素数が最も多い飽和脂肪酸のパルミトイル基が最大の取り込みを示した。一方ヒドロキシ基を持ち親水性が高いリトコール酸やアセチル基を導入した場合には、ほとんど取り込まれなかった。ペプチド配列に関しては、PAR-1 の細胞内ループドメイン由来の配列を有する 13Pep が最大の取り込みを示し、配列の短い 10Pep では取り込みが低下し、さらに短い配列を有する 7Pep ではほとんど取り込まれなかった。(Fig. 5) 現在リンカー構造の最適化を行っている。

Fig. 5 Relationship of cellular uptake and structure of pepducin of new boson carriers



調べたペプチド配列のうち PAR-1 由来 pepducin 配列を有するホウ素キャリアの細胞内取り込みが優れていたことから、細胞内取り込みが PAR-1 の発現に依存する可能性が示唆された。今後、PAR1 遺伝子発現細胞を用いて、細胞内取り込みへの影響を調べ、pepducin を基盤とする化学的送達システムの分子送達機構を解明する。また、ペプチド部分をさらに修飾してがん細胞で切断されるプロドラッグ機能を付与し、*in vivo* 適用へと展開する予定である。

1) M. Tsuji *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, 11 (2013) 3030- 3037.

#### 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)

- Hattori K., Koike K., Okuda K., Hirayama T., Ebihara M., Takenaka M., Nagasawa H., Solution-Phase Synthesis and Biological Evaluation of Triostin A and its Analogues., *Org. Biomol. Chem.*, 14, 2090-2111(2016). 査読有 DOI: 10.1039/c5ob02505b
- Masunaga S., Tatebe H., Nishimura

Y., Tano K., Sanada Y., Moriwaki T., Sakurai Y., Tanaka H., Suzuki M., Kondo N., Maruhashi A., Ono K., Effect of oxygen pressure during incubation with a  $^{10}\text{B}$ -carrier on  $^{10}\text{B}$  uptake capacity of cultured p53 wild-type and mutated tumor cells: dependency on p53 status of tumor cells and types of  $^{10}\text{B}$ -carriers., *Int J Radiat Biol.* 92(4), 87-94(2016). 査読有 doi: 10.3109/09553002.2016.1137104.

〔学会発表〕(計 14 件)

- 磯野蒼、寺嶋宏朗、平山祐、奥田健介、永澤秀子、ホウ素中性子捕捉療法のためのペプデュシンを基盤とする膜透過性ホウ素キャリアの開発、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26-29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 服部幸三、小池晃太、奥田健介、平山祐、永澤秀子、Triostin A の実用的液相合成法の確立及び新規類縁体合成と生物活性評価、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26-29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 奥田健介、服部幸三、小池晃太、平山祐、永澤秀子、がん微小環境を標的とする抗腫瘍性抗生物質 Triostin A 及び種々の環状デプシペプチド誘導体の設計・合成および生物活性評価、第 18 回癌治療増感研究シンポジウム、2016 年 2 月 5-6 日、奈良県文化会館 (奈良県奈良市)
- Aoi Isono, Hiroaki Terashima, Shin-ichiro Masunaga, Tasuku Hirayama, Kensuke Okuda, Hideko Nagasawa, Design and synthesis of new boron carriers based on pepducin chemistry and evaluation of their subcellular distribution、PACIFICHEM2015、2015 年 12 月 15-20 日、(ハワイ (アメリカ))
- Kozo Hattori, Kota Koike, Kensuke Okuda, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa, Design, synthesis, and biological evaluation of cyclic depsipeptides as chemical probes for study of the tumor microenvironment、PACIFICHEM2015、2015 年 12 月 15-20 日、(ハワイ (アメリカ))
- 服部幸三、小池晃太、奥田健介、平山祐、永澤秀子、抗腫瘍性抗生物質 Triostin A 及び種々の環状デプシペプチド誘導体の液相合成、第 41 回反応と合成の進歩シンポジウム、2015 年 10 月 26-27 日、近畿大学 (大阪府東大阪市)
- Kozo Hattori, Kota Koike, Naohito Abe, Kensuke Okuda, Tasuku Hirayama, Toshiyuki Tanaka Masayoshi Oyama, Hideko Nagasawa, Solution-phase Syntheses and Conformational Studies

of Antitumor Bicyclic Octadepsipeptides, Triostin A and Its New Diastereomers, ISPSA2015、2015年8月30-9月2日、徳島文理大学(徳島県徳島市)

8. 小池晃太、服部幸三、阿部尚仁、奥田健介、平山祐、田中稔幸、大山雅義、永澤秀子、環状デブシペプチド triostin A 及びその立体異性体の合成とコンフォメーション解析、第 61 回日本薬学会東海支部総会・大会、2015年7月4日、名古屋市立大学(愛知県名古屋市)
9. Aoi Isono, Hiroaki Terashima, Kensuke Okuda, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa、Design, synthesis and fluorescence imaging of new membrane permeable boron carrier based on the pepducin chemistry、ICRR2015、2015年5月25-29日、国立京都国際会館(京都府京都市)
10. Aoi Isono, Kensuke Okuda, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa、Development of a cell-penetrating boron cluster for boron neutron capture therapy、第 73 回日本癌学会学術集会、2014年9月25-27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
11. 磯野蒼、寺嶋宏朗、平山祐、奥田健介、永澤秀子、ホウ素中性子捕捉療法のための新規膜透過性ホウ素キャリアの開発、創薬懇話会 2014、2014年7月10-11日、ホテルパーク(岐阜県岐阜市)
12. 服部幸三、小池晃太、竹中芽衣、奥田健介、平山祐、永澤秀子、エキノマイシンを基盤とした環状デブシペプチド HIF-1 阻害剤の分子設計および合成、創薬懇話会 2014、2014年7月10-11日、ホテルパーク(岐阜県岐阜市)
13. 小池晃太、服部幸三、奥田健介、平山祐、永澤秀子、エキノマイシンを基盤とするバイオプローブの開発研究、創薬懇話会 2014、2014年7月10-11日、ホテルパーク(岐阜県岐阜市)
14. 寺嶋宏朗、磯野蒼、平山祐、奥田健介、永澤秀子、新規核標的型ホウ素キャリアの開発、創薬懇話会 2014、2014年7月10-11日、ホテルパーク(岐阜県岐阜市)

[その他]

岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室  
<http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/yakka/>  
<http://www.gifu-pu.ac.jp/info/organization/list/yakka>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

永澤 秀子(NAGASAWA, Hideko)  
岐阜薬科大学 薬学部 教授  
研究者番号: 90207994

### (3)連携研究者

増永 慎一郎(Shin-ichiro Masunaga)  
京都大学 原子炉実験所 教授  
研究者番号: 80238914