

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：34517

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20870

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳がんの早期発見を可能とする新規分子標的型ペプチド薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of a novel molecular-targeted peptide drug to diagnose triple-negative breast cancer

研究代表者

原 史子（HARA, Fumiko）

武庫川女子大学・薬学部・嘱託助手

研究者番号：40966595

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳がん(Triple Negative Breast Cancer：TNBC)は悪性度の高い難治性のがんであるが、明確な治療標的が存在しないため、早期診断を可能とする薬剤や有効な分子標的薬剤が開発されていない。そこで、本研究では、TNBCの早期診断・治療を実現する分子イメージングプローブの開発を目指し、TNBCに高発現しているMUC16を標的とする放射性薬剤を開発した。MUC16に親和性を有するEVQペプチドをヨウ素で標識した薬剤は、MUC16に対し標的指向性を示し、TNBC細胞に集積したことから、TNBCの分子イメージングプローブとして有用である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TNBCは悪性度の高い難治性のがんであるが、有効な治療標的分子が確立されていないことから、早期発見を可能とする診断薬や治療効果の高い分子標的薬剤の開発が滞っている。本研究では、EVQペプチドを基盤とした薬剤がTNBC細胞表面に高発現するMUC16に標的指向性を示すことを明らかにし、MUC16がTNBCの標的分子として有用である可能性が示された。本研究の成果は、TNBCの分子標的薬剤開発に貢献するものと期待できる。

研究成果の概要（英文）：Triple-negative breast cancer (TNBC) is highly malignant and is likely to occur in metastasis and relapses. However, molecular-targeted drugs that effectively treat or detect TNBC at an early stage have not been developed due to the lack of a suitable target molecule for TNBC. In this study, we aimed to develop molecular imaging probes that target Mucin 16 (MUC16) in high expression on TNBC. We designed a novel radiolabeled peptide compound based on the EVQ peptide reported to have an affinity for MUC16 on TNBC cells. The novel compound was associated significantly with MUC16-positive cells compared to MUC16-negative cells. The results of this study indicate that the novel compound is potentially useful as the imaging probe of TNBC.

研究分野：放射線科学

キーワード：トリプルネガティブ乳がん ペプチド イメージング 核医学

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、乳がんにおいて代表的な増殖因子受容体であるエストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、ヒト上皮成長因子受容体 (HER2) が全て陰性の悪性腫瘍である。TNBC は浸潤性のがんであり、転移や再発が起こりやすい。そのため、TNBC は他のサブタイプの乳がんと比べて生物学的悪性度、再発率、5 年生存率、全てにおいて高いことから、TNBC の早期発見を可能とする診断薬剤の開発が求められているが、有効な標的分子は確立されていない。

Mucin(MUC)16 は、細胞の保護に関与する高分子量糖タンパク質であり、癌抗原 125 (CA125 : 後に MUC16 上に存在するエピトープとして同定された) としてがん増殖に大きく関与していることが明らかになっている。MUC16 は TNBC に高発現していることから、有効な治療標的の乏しい TNBC の新たな標的となる可能性がある。これまでに、MUC16 を標的とする分子がいくつか報告されており、近年 Vera らはファージディスプレイによって同定した 12 個のアミノ酸配列、EVQSSKFP AHVS (EVQ ペプチド) が *in vitro* において MUC16 を発現している TNBC と高い親和性を示すことを報告している (Vera L. S., PLOS ONE, 2016.)。

2. 研究の目的

こうした背景を踏まえ、TNBC の早期診断・治療を実現する分子イメージングプローブの開発を目指し、MUC16 を標的とした放射性 EVQ ペプチドプローブの開発する、という考えに至った。本研究では EVQ ペプチドを放射性ヨウ素で標識し、TNBC 診断用薬剤としての有用性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プローブの設計・合成

放射性ヨウ素標識には高い安定性と高い標識効率が期待できる N-succinimidyl-4-iodobenzoate(SIB)を使用した。EVQ ペプチドには末端と側鎖に 2 つアミノ基が存在しており、2 か所でヨウ素標識が可能であるため、末端を標識したプローブ **1** とペプチド鎖中の側鎖を標識したプローブ **2** を設計した(図 1)。

標識前駆体および安定同位体ヨウ素標識体 (コールド体) は Fmoc アミノ酸を用いて固相合成法により合成した。本合成経路において、EVQ ペプチドにはアミノ基が 2 つ存在するため、それぞれの反応点を制御することが可能な異なる保護基を有する Fmoc-Lysine を用いた。反応後、自動精製装置および HPLC で精製し、質量分析により同定した。

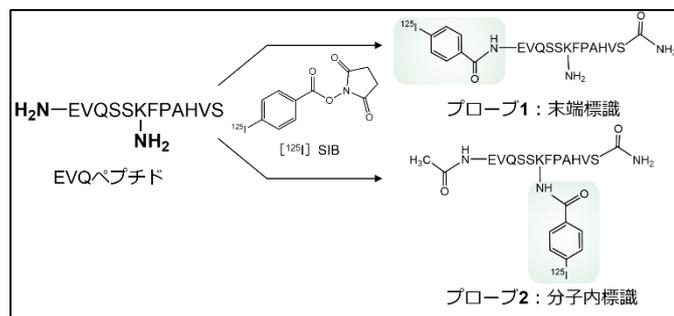


図 1. プローブ **1,2** の設計

(2) プローブの機能性評価

MUC16 高発現細胞 (ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231、マウス乳がん細胞 4T1) と MUC16 低発現細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549、マウス胎児繊維芽細胞 NIH3T3) を用いて、コールド体 **1,2** の細胞集積性を比較した。細胞集積性は液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)を用いて、細胞に取り込まれたプローブを定量した。

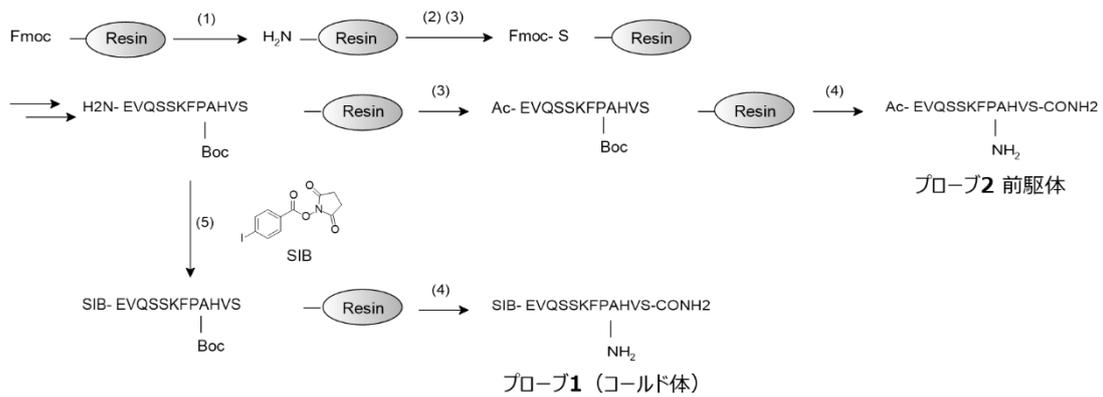
(3) プローブの生体安定性評価

マウスの血漿を用いてプローブの安定性を評価した。LC/MS を用いて、血漿中のプローブを定量した。

4. 研究成果

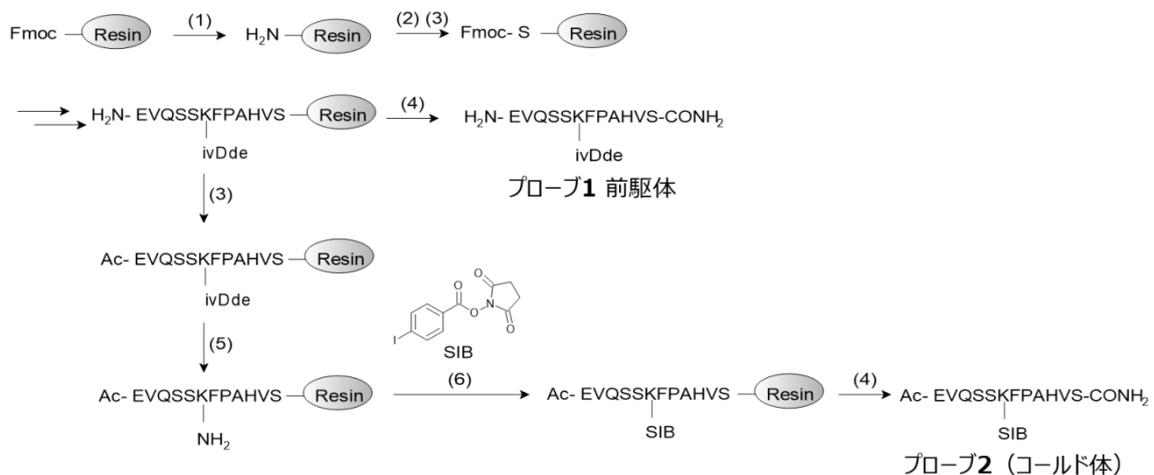
(1) プローブの合成

EVQ ペプチドには 2 つのアミノ基が存在するため、反応点を制御するために、2 つの合成経路を考案した (図 2, 3)。プローブ **2** の標識前駆体およびプローブ **1** は Fmoc-Lysine(Boc)-OH を用いて図 2 の経路で合成した。プローブ **1** の標識前駆体およびプローブ **2** (コールド体) は Fmoc-Lysine(ivDde)-OH を用いて図 3 の経路で合成した。また、効率的な合成を行うために、プローブ **1,2** のコールド体は樹脂上で SIB による標識を実施した。質量分析にて目的物であることを確認した。



(1) 20% piperidine (2) Fmoc-amino acid, HoBt, HBTU, DIPEA (3) Ac₂O (4) TFA, TIS, H₂O (5) TEA

図 2. プローブ 2(前駆体)、プローブ 1 (コールド体) の合成経路



(1) 20% piperidine (2) Fmoc-amino acid, HoBt, HBTU, DIPEA (3) Ac₂O (4) TFA, TIS, H₂O
(5) 2% Hydrazine monohydrate (6) TEA

図 3. プローブ 1(前駆体)、プローブ 2 (コールド体) の合成経路

(2) プローブの機能性評価

・細胞集積性の評価

MUC16 高発現細胞 (MDA-MB-231, 4T1) および MUC16 低発現細胞 (A549, NIH3T3) におけるプローブ 1, 2 の細胞取り込み量を LC/MS で定量し、集積性を評価した (図 4)。プローブ 1 は MUC16 高発現細胞に有意に集積した (図 4AB)。一方、プローブ 2 はマウスの MUC16 高発現細胞/低発現細胞間で集積性に有意な差が見られなかったことから、プローブ 2 は MUC16 の発現量に関係なく集積することが示唆された (図 4 CD)。EVQ ペプチドへの SIB の標識部位の違いが、MUC16 に対する親和性に影響を与えたことが考えられる。

・MUC16 結合性の評価

EVQ ペプチドの MUC16 への特異的結合性を評価するために、EVQ ペプチドの配列をランダムにした 12 残基のペプチド (EVPFKSSQAHVS : Scr ペプチド) の細胞集積性を確認した。その結果、Scr ペプチドは MUC16 高発現細胞にはほとんど集積せず、プローブ 1, 2 と比較して集積性が有意に低いことが明らかになった (図 5)。このことから、EVQ ペプチドの配列は MUC16 への結合に重要であることが確認できた。

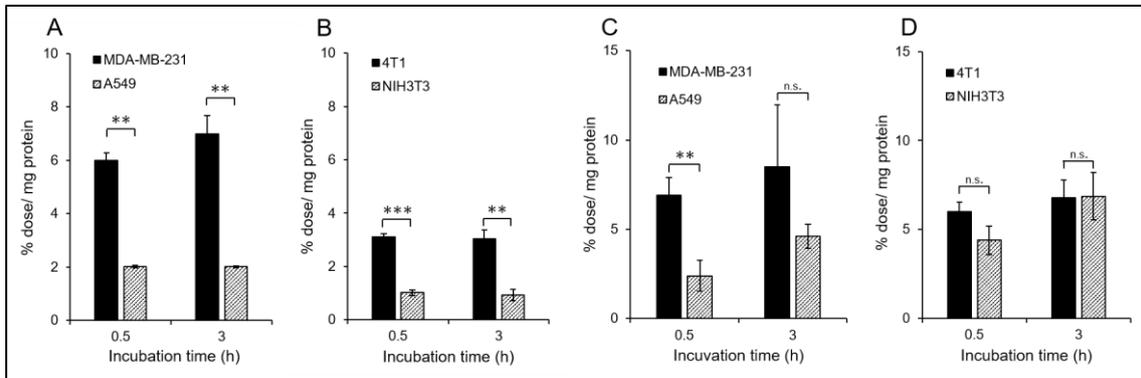


図 4. プローブ 1,2 の細胞集積性評価

A. プローブ 1 の MDA-MB-231, A549 における細胞内取り込み量

B. プローブ 1 の 4T1, NIH3T3 における細胞内取り込み量

C. プローブ 2 の MDA-MB-231, A549 における細胞内取り込み量

D. プローブ 2 の 4T1, NIH3T3 における細胞内取り込み量

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, n.s.: not significant.

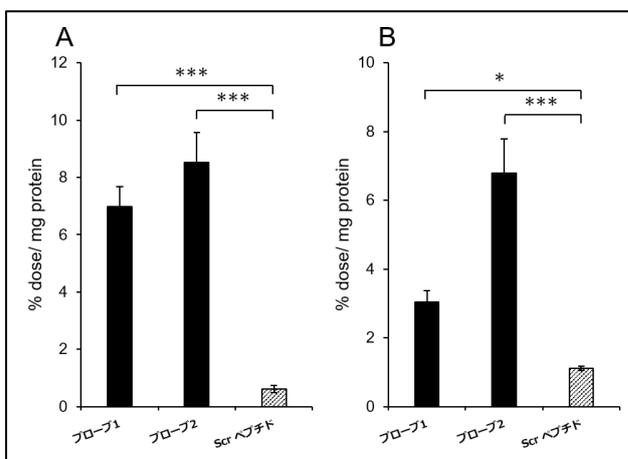


図 5. プローブ 1,2, Scr ペプチドの MUC16 高発現細胞における細胞取り込み量の比較

A. MDA-MB-231 における取り込み量

B. 4T1 における取り込み量

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(3) プローブの生体安定性評価

マウスの血漿にプローブ 1, 2 を添加し、37°C で一定時間インキュベートした後、血漿中のプローブ量を LC/MS で定量し、残存率を算出した。プローブ 1, 2 ともに 15 分インキュベート後には残存率が 30% 程度であり、安定性が低いことが明らかになった。一方、プローブ 2 はプローブ 1 と比較して残存率が高かったことから、ペプチド鎖中への SIB 標識はペプチドの安定性を向上させることが明らかになった。

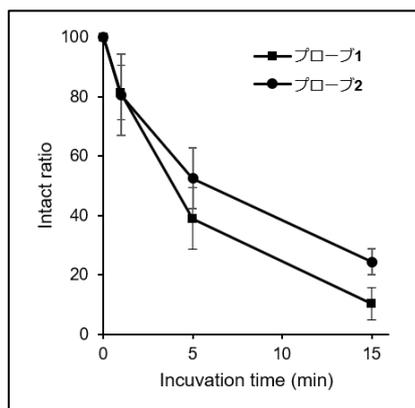


図 6. マウス血漿中におけるプローブ 1,2 の残存率

以上、本研究では、TNBC の早期診断・治療を実現する分子イメージングプローブの開発を目指し、MUC16 を標的とした放射性 EVQ ペプチドプローブを設計・合成し、細胞およびマウス血漿を用いてプローブの基礎的性質を評価した。プローブ 1 は MUC16 高発現細胞において有意な集積を示し、MUC16 標的 TNBC 分子イメージングプローブとなる可能性が示唆された。一方で、生体安定性の向上が課題であることが明らかになったため、今後、プローブ 1 の生体安定性の向上を目指すとともに、細胞および動物を用いて評価していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 原史子、河嶋秀和、堀山志朱代、屋木祐亮、高田慎也、木村寛之、萩森政頼
2. 発表標題 TNBCの早期診断を目的としたMUC16指向性ペプチドプローブの合成
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024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
研究協力者	萩森 政頼 (HAGIMORI Masayori)	武庫川女子大学 (34517)	
研究協力者	河嶋 秀和 (KAWASHIMA Hidekazu)	京都薬科大学 (34306)	
研究協力者	木村 寛之 (KIMURA Hiroyuki)	金沢大学 (13301)	

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
---------	---------