

令和元年6月4日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15585

研究課題名(和文) Survivinを分子標的としたマルチモーダルイメージングプローブの開発

研究課題名(英文) Development of multimodal imaging probes targeting survivin.

研究代表者

中山 守雄 (NAKAYAMA, Morio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：60164373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多角的なイメージング法による高精度ながん診断への応用を目指し、最もがん選択的な蛋白の一つであるsurvivinをin vivoで選択的に検出できる放射性核種や蛍光分子にて標識した分子プローブの開発を目的とした。放射性プローブとして、放射性ヨウ素にて標識した低分子プローブの合成と評価を行い、細胞レベルでsurvivinの発現に相関した結合性を示す化合物を見出した。また、蛍光プローブへの応用を目指し、survivinに高親和性を示すペプチド分子の開発に成功した。さらに開発したペプチド分子を用いて、survivinに結合することにより蛍光を放出する蛍光プローブの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Survivinは多くのがん組織に高発現している一方、ほとんどの分化後の正常細胞ではその発現は極めて低レベルである。従って、理想的ながんの画像診断の標的部位となりうるが、これまでにsurvivinを特異的に捉えた診断薬は未開発である。本研究では、がん画像診断への応用を目指し、survivinを標的とした低分子型放射性プローブと、ペプチドを母体化合物とした蛍光プローブの開発を行い、今後のsurvivinを標的としたがん診断さらにはがん治療に向けた新たな知見を提供することができた。

研究成果の概要(英文)：In this research, We aimed to develop molecular probes labeled with radionuclides or fluoresce dyes that can selectively detect the most cancer-specific survivin for high precision cancer diagnosis by multimodal imaging method. As radioactive probes, we synthesized and evaluated small molecule probes labeled with radioiodine. We found prospective molecules that showed consistent binding with the expression of survivin in cell cultures. We also succeeded in developing peptides that exhibited high affinity to survivin. Using the peptides as survivin binding molecules, we succeeded in developing fluorescent probes that emit fluorescence by binding to survivin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：放射線 蛍光 イメージング 癌 survivin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Survivin は多くのがん細胞に高発現している一方、正常細胞ではほとんど発現が見られない。Survivin は細胞質では抗アポトーシスを有する二量体として存在する一方、セントロメアや紡錘体では単量体として存在し、INCENP や Borealin 蛋白と蛋白質複合体を形成して(図1)、細胞分裂の主要な役割も担う(Jeyaprakash, *Cell*, 2007)。Survivin は、がんの生存や増殖に関わる様々な生体分子と複雑な相互作用を示し、未だその機能の全容は明らかではないが、その発現が高いがん患者は化学療法や放射線治療に抵抗性を示し、予後不良に繋がると報告されている。そこで、survivin の分子標的薬剤が、選択的な抗がん剤として期待され、臨床試験が展開されている (Coumar, *Cancer Treat Rev*, 2013)

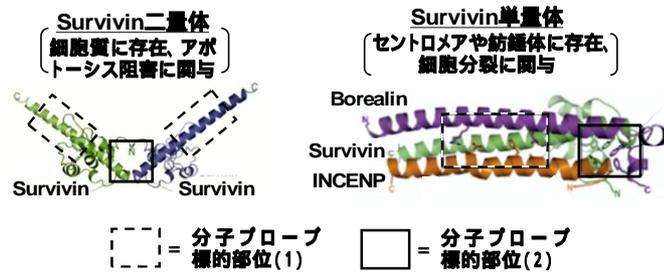


図1 Survivin 結合分子の標的部位.

一方、survivin を標的とした分子プローブを用いた positron emission tomography (PET) や single photon emission computed tomography (SPECT) 等の核医学画像診断は、がん選択的な診断や survivin を標的とした抗がん剤の投与計画の支援や治療効果判定のツールとして大変有用と考えられる。そこで我々は近年、survivin を標的とした SPECT 用診断薬剤への応用を目指し、放射性 4,6-diaryl-3-cyano-2-pyridinone (DCP) 誘導体の開発を行った。DCP 誘導体は、がん細胞において survivin の発現に相関した結合性を示したが、体内動態などの改善が必要であることが示され、新たな分子プローブ開発が必要であることが示された(Fuchigami T, et al, *Bioorg Med Chem Lett*, 2015.)。一方、核医学診断より解像度と簡便性の点において勝る近赤外蛍光分子を survivin 標的分子に、結合させた分子プローブを開発することで、survivin が関与するがんの発生や進行のメカニズムを細胞レベルや生体レベルで詳細に解析できると期待される。しかしながら、そのような蛍光プローブはこれまでに報告例が全くない。

2. 研究の目的

本研究では、多角的なイメージング法による高精度ながん診断への応用を目指し、最もがん選択的な蛋白の一つである survivin を *in vivo* で選択的に検出できる放射性核種や近赤外蛍光分子にて標識したマルチモーダルイメージングプローブの開発を目的とした。そこで、survivin を標的とした以下のような① 放射性プローブ、② 蛍光プローブの開発を目的とした。

(1) 放射性プローブの開発

Berezov らによって報告されている survivin 二量体形成部位に高親和性を示す 3-phenethyl-2-indolinone (PI) 誘導体である S12(Berezov A, et al., *Oncogene*, 2012) の Br 原子を I 原子に置換し、さらに異なる置換基を導入した IPI-1, IPI-2, IPI-3 を新たに設計した。本研究ではそれらの化合物の合成、放射性ヨウ素標識、および survivin を標的とした放射性プローブとしての有用性の検討を目的とした。

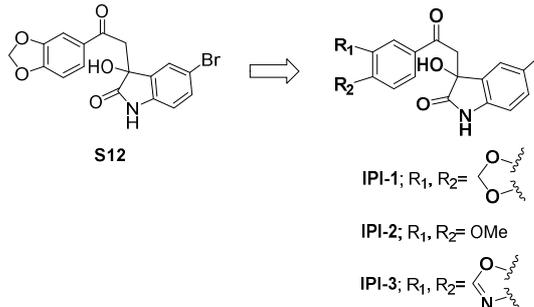


図2 放射性ヨウ素標識 PI 誘導体の設計..

(2) 蛍光プローブの開発

ペプチド分子などの中分子薬剤は、低分子化合物より survivin への結合性や特異性が優れていることが期待される。そこで、survivin が細胞分裂の時に INCENP や Borealin と特異的なタンパク質複合体を形成することに注目して、INCENP や Borealin より誘導体新たなペプチド分子の設計、合成および survivin 標的分子としての基礎的な評価を目的とした。

続いて、survivin に結合した時のみ蛍光を発する survivin 結合応答型蛍光プローブの開発を目的とした。すなわち、開発したペプチド分子に、その認識部位に相当する survivin 由来部分ペプチドをリンカーにて結合させ、C 末端に蛍光色素として fluorescein (FAM) などの蛍光分子を、N 末

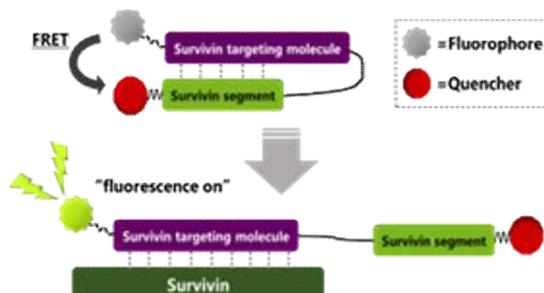


図3 Survivin 結合応答型蛍光プローブの設計.

端に DABCYL などの消光分子を導入した分子を設計した(図3)。このような分子は、survivin 標的分子と Survivin 由来部分ペプチドが分子内で水素結合または疎水性相互作用にて結合し、折りたたみ構造をとった状態では、FRET の原理に基づき消光しているが、survivin に結合した時には、分子内結合が解除され FAM と DABCYL 間に距離が生じて FRET 消光が減少して蛍光を発するようになると期待される。

3. 研究の方法

(1) 分子プローブの合成

放射性ヨウ素標識 PI 誘導体は、スズ前駆体の合成を行ったのち、過酸化水素存在下、酸性条件にて Na¹²⁵I を反応させることにより合成を行った。

ペプチド分子は、一般的な固相合成法を行い、その後蛍光および消光分子の導入を行った。

(2) Survivin への親和性評価

リコンビナントヒト survivin タンパク質の作製を既報の手法に従って行った(Berezov A, et al., *Oncogene*, 2012)。合成化合物の survivin への親和性は、水晶振動子マイクロバランス(QCM)法にて評価した。

(3) がん細胞の survivin への結合性評価

Survivin 高発現株の MDA-MB-231 細胞と survivin 低発現株の MCF-10A をそれぞれ用いて、survivin への分子プローブの結合性を検討した。

(4) 担癌マウスにおける分子プローブの体内分布実験

MDA-MB-231 細胞をヌードマウス(日本 SLC, BALB/cSlc-nu/nu) に移植し、¹²⁵I 標識 PI 誘導体を尾静脈投与し、各時間後に安楽死させた後、臓器を摘出して単位重量当たりの放射能集積を測定した。

4. 研究成果

(1) 放射性プローブの開発

合成した PI 誘導体の survivin への親和性を QCM で評価したところ、S12 では K_d 値が 77 nM、IPI-1 では K_d 値が 68 nM と算出され、ヨウ素置換した IPI-1 は S12 と同程度の rSurvivin への親和性を有することが示唆された(表1)。さらに、置換基を変換した IPI-2、IPI-3 についても、survivin へ結合性は示したものの、IPI-1 に比べて親和性は低下していた。以上の結果から、IPI-1 について、さらなる検討を行う事とした。

続いて、細胞株を用いた放射性プローブの結合性に関する検討をしたところ、¹²⁵I]IPI-1 は、MCF-10A 細胞に比べて、MDA-MB-231 細胞において有意に高い集積率を示した(図4)。また、S12 を用いた阻害実験にて、MDA-MB-231 細胞においてのみ、阻害剤の濃度依存的に有意な集積率の減少が観察された。以上の結果から、¹²⁵I]IPI-1 は survivin の発現量に応じた結合性を有することが示された。

表1 PI 誘導体の survivin への親和性.

Compounds	K_d (nM)
S12	77.0 ± 23.2
IPI-1	68.3 ± 2.6
IPI-2	168.6 ± 46.2
IPI-3	140.0 ± 22.6

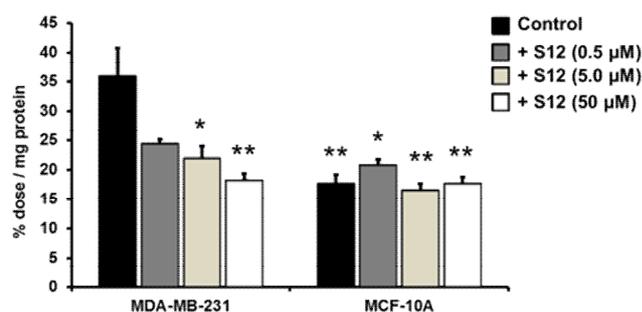


図4 ¹²⁵I]IPI-1 の培養細胞への結合性評価.

¹²⁵I]IPI-1 の担癌マウスにおける体内放射能分布を検討したところ、腫瘍/筋肉比は時間経過とともに増加し、30分後から180分後にかけて1.2から2.4まで上昇し、筋肉組織よりも腫瘍組織への滞留性が高いことが示された。しかし、腫瘍/血液比は投与30分後から180分後まで0.6~0.9の値を推移しており、いずれの時点においても1を上回ることなく、腫瘍への放射能の集積は低いことが明らかになった。また、S12の同時投与により、¹²⁵I]IPI-1の survivin 選択性を評価したところ、投与30分後において腫瘍/筋肉比は0.8となり、¹²⁵I]IPI-1のみを投与したときの腫瘍/筋肉比(1.2)と比べて若干の減少が見られたが、腫瘍/血液比についてはほとんど変化が見られなかった。以上の結果から、¹²⁵I]IPI-1の腫瘍への集積性は核医学診断薬剤としては不十分であることが示され、S12による腫瘍組織への集積の減少は見られたものの、有意な survivin への特異的結合は示されなかった。今後は、survivin への結合性を損なうことなく、腫瘍への集積性を向上させる分子設計が必要であるものと考えられる。

(2) 蛍光プローブの開発

まず、survivin 蛋白に直接結合できる 7-22 残基のペプチド分子を開発したところ、リコンビナントヒト survivin タンパク質への結合性を有することを見出した。続いて、survivin 結合応答型蛍光プローブへの応用を目指し、親和性の最も高かったペプチド分子を母体化合物として、Fluorescein と DABCYL が立体的に近接し、survivin が結合した時に Fluorescein と DABCYL が離れるような配列を有するペプチド分子 (SFP) を設計、合成した。QCM 法を用いた結合飽和実験により、SFPs は survivin に対していずれも結合性を示し、 K_d 値=0.20-1.74 μ M と算出された。蛍光スペクトル測定の結果、これら SFPs は survivin 非存在下ではほとんど蛍光を発しないのに対し、survivin を存在させることによって、蛍光強度が 1.79-2.66 倍に上昇した。最も蛍光強度が上昇した分子プローブは、ループ構造中に剛性ヘリカルリンカーのポリプロリンを導入した SFP5 であった。また、SFP5 は HSA 存在下での蛍光強度の変化が 1.16 倍と、ほぼ変化しなかった (図 5)。従って、所期の通り SFP5 は survivin に結合した後、Fluorescein と DABCYL FRET の距離が離れ、特異的に蛍光を発することが示唆された。

続いて、SFP5 を用いて、survivin を高発現している MDA-MB-231 細胞における蛍光イメージングを行ったところ、SFP5 集積による強い蛍光染色部位が確認され、さらに抗 survivin 抗体による蛍光染色部位との一致が観察された。一方、survivin がほとんど発現していない MCF-10A 細胞においては、SFP5 の蛍光強度は極めて低レベルであった (図 6)。従って、SFP5 が培養細胞においても、survivin の発現量に相関して蛍光を放出する事が示唆された。

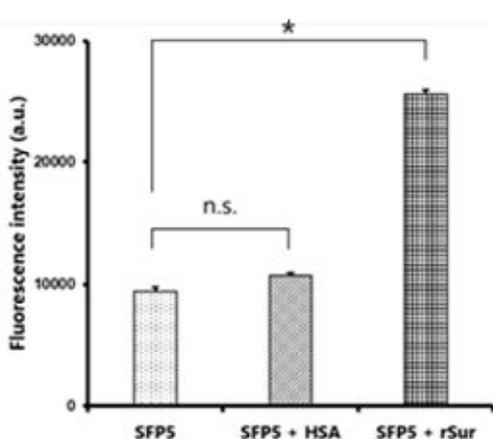


図 5 SFP5(0.5 μ M) の survivin あるいは HSA 存在下 (2.0 μ M) における蛍光強度 (λ ex= 483 nm, λ em = 525 nm)変化 (n= 3).
*P < 0.01 (paired t test).

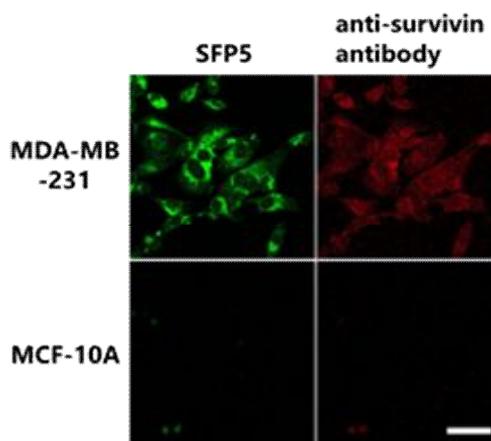


図 6 共焦点レーザー顕微鏡による MDA-MB-231 細胞および MCF-10A 細胞における 5 μ M SFP5 の集積 (緑) と survivin タンパク質発現部位(赤).

以上の結果より、今回開発した SFP5 が、survivin を特異的にイメージングできる survivin 結合応答型蛍光プローブとして機能しうることが示された。今後は膜透過ペプチドの導入などによるさらなる構造の改変により、*in vivo* にて survivin を特異的にイメージングできる蛍光プローブの開発を行っていく。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Fuchigami Takeshi, Kawasaki Masao, Koyama Ryusuke, Nakaie Mari, Nakagaki Takehiro, Sano Kazunori, Atarashi Ryuichiro, Yoshida Sakura, Haratake Mamoru, Ono Masahiro, Nishida Noriyuki, Nakayama Morio, Development of radioiodinated benzofuran derivatives for *in vivo* imaging of prion deposits in the brain, ACS Infectious Diseases, 2019, 査読有
DOI : 10.1021/acscinfecdis.8b00184

Fuchigami Takeshi, Fujimoto Noriko, Haradahira Terushi, Nojiri Yumiko, Okauchi Takashi, Maeda Jun, Suhara Tetsuya, Yamamoto Fumihiko, Nakayama Morio, Maeda Minoru, Mukai Takahiro, Synthesis and characterization of 11 C-labeled benzyl amidine derivatives as PET radioligands for GluN2B subunit of the NMDA receptors, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, Vol.61, 2018, pp.1095-1105, 査読有
DOI : 10.1002/jlcr.3691

Ishikawa Natsumi, Fuchigami Takeshi, Mizoguchi Tatsuya, Yoshida Sakura, Haratake Mamoru, Nakayama Morio, Synthesis and characterization of radioiodinated 3-phenethyl-2-indolinone derivatives for SPECT imaging of survivin in tumors, Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol.26,

2018, pp.3111-3116, 査読有

DOI : 10.1016/j.bmc.2018.04.034

Fuchigami Takeshi, Ono Hokuto, Oyadomari Kohta, Iwatake Mayumi, Hayasaka Daisuke, Akbari Masoud, Yui Katsuyuki, Nishi Kodai, Kudo Takashi, Yoshida Sakura, Haratake Mamoru, Nakayama Morio, Development of a $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator system using polysaccharide polymers and its application in PET imaging of tropical infectious diseases, ACS Omega, Vol.2, 2017, pp.1400-1407, 査読有

DOI : 10.1021/acsomega.7b00147

Kawasaki Masao, Fuchigami Takeshi, Kobashi Nobuya, Nakagaki Takehiro, Sano Kazunori, Atarashi Ryuichiro, Yoshida Sakura, Haratake Mamoru, Nishida Noriyuki, Nakayama Morio, Development of radioiodinated acridine derivatives for *in vivo* imaging of prion deposits in the brain, Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol.25, 2017, pp.1085-1093, 査読有

DOI : 10.1016/j.bmc.2016.12.020

Haratake Mamoru, Takiguchi Tohru, Masuda Naho, Yoshida Sakura, Fuchigami Takeshi, Nakayama Morio, Amyloid formation characteristics of GNNQQNY from yeast prionprotein Sup35 and its seeding with heterogeneous polypeptides, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol.149, 2017, pp.72-79, 査読有

DOI : 10.1016/j.colsurfb.2016.10.011

[学会発表](計 38 件)

千賀 健司、淵上 剛志、福嶋 優、井上 広海、吉田 さくら、中山 守雄、がん細胞膜を標的としたカチオン性両親媒性ペプチドの合成と腫瘍イメージング剤としての評価、日本薬学会第 139 年会 (2019)。

野崎 伊織、淵上 剛志、石川 夏海、山下 莉瑠、池田 由美、吉田 さくら、中山 守雄、Survivin を標的とした Borealin 由来ペプチドの合成と抗腫瘍活性評価、日本薬学会第 139 年会 (2019)。

石川 夏海、淵上 剛志、吉田 さくら、原武 衛、中山 守雄、がん選択的な治療や診断への応用を目指した新規 survivin 標的ペプチド分子の開発、第 35 回日本薬学会九州支部大会 (2018)。

中山 智恵、淵上 剛志、石川 夏海、池田 由美、吉田 さくら、中山 守雄、Survivin を標的とした生体イメージングを目的とした結合応答型蛍光プローブの開発、第 35 回日本薬学会九州支部大会 (2018)。

Natsumi Ishikawa, Takeshi Fuchigami, Sakura Yoshida, Mamoru Haratake, Morio Nakayama, Synthesis and biological evaluation of small peptides for survivin targeting cancer treatment、第77回日本癌学会学術総会 (2018)。

Tomoe Nakayama, Takeshi Fuchigami, Natsumi Ishikawa, Yumi Ikeda, Sakura Yoshida, Morio Nakayama, Development of survivin-responsive fluorescent probes for cancer imaging、第77回日本癌学会学術総会 (2018)。

中山 智恵、淵上 剛志、石川 夏海、池田 由美、吉田 さくら、中山 守雄 : Survivin を標的とした結合応答型蛍光プローブの開発、日本薬学会第 138 年会 (2018)

板垣 昂之介、淵上 剛志、石川 夏海、吉田 さくら、中山 守雄 : がん組織における Legumain 酵素活性の *in vivo* イメージングを目的とした放射性ガリウム標識ペプチドの開発、第 17 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、(2017)

石川 夏海、淵上 剛志、吉田 さくら、原武 衛、中山 守雄 : Survivin を標的とした新規ペプチド分子の開発と抗腫瘍活性評価

第 49 回若手ペプチド夏の勉強会(2017)

板垣 昂之介、淵上 剛志、石川 夏海、吉田 さくら、中山 守雄 : がん組織における Legumain の酵素活性を非侵襲的に評価できる ^{67}Ga 標識ペプチドプローブの開発

第 27 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2017) (2017)

板垣 昂之介、淵上 剛志、石川 夏海、吉田 さくら、中山 守雄 : がん組織における Legumain 酵素活性の *in vivo* イメージングを目的とした放射性ヨウ素標識ペプチドの開発
日本薬学会第 137 年会(2017)

板垣 昂之介、淵上 剛志、石川 夏海、吉田 さくら、中山 守雄 : がん組織における Legumain の酵素活性を非侵襲的に評価できる分子プローブの開発

第 56 回日本核医学会学術総会(2016)

石川 夏海、淵上 剛志、溝口 達也、吉田 さくら、原武 衛、中山 守雄 :

Survivin を標的とした腫瘍イメージングを目的とする 3-phenethyl-2-indolinone 誘導体の合成と評価

第 56 回日本核医学会学術総会(2016)

Kohnosuke Itagaki, Takeshi Fuchigami, Natsumi Ishikawa, Sakura Yoshida, and Morio

Nakayama : DEVELOPMENT OF RADIOIODINATED PEPTIDE PROBES FOR

VISUALIZATION OF LEGUMAIN ACTIVITY IN CANCERS , 第 53 回ペプチド討論会(2016)

Yu Fukushima, Takeshi Fuchigami, Hiromi Inoue, Natsumi Ishikawa, Sakura Yoshida, Makoto

Oba, and Morio Nakayama : EVALUATION OF CATIONIC AMPHIPHILIC PEPTIDES AS POTENTIAL PROBES FOR CANCER IMAGING ,

第 53 回ペプチド討論会(2016)

Takeshi Fuchigami, Natsumi Ishikawa, Tatsuya Mizoguchi, Mamoru Haratake, Kounosuke Itagaki, Sakura Yoshida, Morio Nakayama : Development of a 4,6-diaryl-3-cyano-2-pyridinone derivative as a survivin targeting SPECT probe for tumor imaging ,

第 75 回日本癌学会学術総会(2016)

板垣 昂之介, 淵上 剛志, 石川 夏海, 吉田 さくら, 中山 守雄 : がん組織における Legumain 酵素活性の画像化を目的とした放射性ヨウ素標識ペプチドプローブの開発

第 16 回放射性医薬品・画像診断薬研究会(2016)

石川 夏海, 淵上 剛志, 溝口 達也, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄 : Survivin の生体内分子イメージングを目的とした SPECT プローブの開発 ,

日本分子イメージング学会(2016)

(他 20 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称 : クロモン誘導体及びアミロイド関連疾患診断用組成物

発明者 : 淵上 剛志、中山 守雄、吉田 さくら、片山 史博

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特願 2018-037948

出願年 : 2018 年

国内外の別 : 国内

名称 : Survivin 標的ペプチド

発明者 : 淵上 剛志、中山 守雄、吉田 さくら、石川 夏海

権利者 : 同上

種類 : 特許

番号 : 特願 2016-212199

出願年 : 2016 年

国内外の別 : 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/hygiene/index-j.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 淵上 剛志

ローマ字氏名 : FUCHIGAMI, Takeshi

所属研究機関名 : 長崎大学

部局名 : 医歯薬学総合研究科 (薬学系)

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 30432206

研究分担者氏名 : 吉田 さくら

ローマ字氏名 : YOSHIDA, Sakura

所属研究機関名 : 長崎大学

部局名 : 医歯薬学総合研究科 (薬学系)

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 40736419

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。