

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10366

研究課題名(和文) 難治性乳がんの治療に資するナノキャリア型内用放射線治療薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of nanocarrier-based internal radiation therapeutic reagent for breast cancer

研究代表者

萩森 政頼 (HAGIMORI, Masayori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：40446125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トリプルネガティブ乳がん(TNBC)の内用放射線治療を目的に、放射性薬剤をリポソームに封入することによって高い治療効果が期待できるナノキャリアの開発を行った。リポソームに封入する放射性薬剤としては、NQO1およびテロメラーゼに対する選択的阻害剤をベースに放射性ヨウ素標識体を設計・合成した。また、ナノキャリアとしては、TNBC上のMucin-16(MUC16)に対して高親和性を有するEVQペプチドで修飾したリポソームの製剤化に成功した。今後、開発した放射性薬剤をEVQペプチド修飾ペプチド修飾リポソームに封入し、体内動態および治療効果を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、乳癌のなかで悪性度が高いトリプルネガティブ乳がん(TNBC)に対する効果的な治療薬剤の開発を目的に、放射性薬剤をリポソームに内包した内用放射線治療薬剤の開発を計画した。放射性薬剤としては、TNBCで発現しているNQO1およびテロメラーゼを標的とした放射性ヨウ素標識体を設計・合成した。また、リポソームとしては、TNBC上に発現しているMucin-16(MUC16)に高い親和性を示すEVQペプチドで修飾したリポソームを設計し、その製剤化に成功した。それぞれ良好な性質を示したところから、今後、体内動態および治療効果を検討し内用放射性薬剤としての有用性を示す予定である。

研究成果の概要(英文)：To develop internal radiation therapy agents for triple negative breast cancer (TNBC), we planned to prepare highly effective liposome based anti-cancer drug including a radioiodinated compound. Radioiodinated compounds were designed and synthesized based on the selective antagonist of NQO1 or telomerase. In addition, we prepared liposomes grafted by EVQ peptide for Mucin-16 (MUC16) on cell surface of TNBC. We are going to evaluate the biodistribution and therapeutic effect of these liposomes.

研究分野：放射線科学、薬学

キーワード：内用放射線治療薬剤 トリプルネガティブ乳癌 リポソーム 標的指向化 ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんのなかでトリプルネガティブ乳がん (Triple Negative Breast Cancer: TNBC) は、乳がんにおける代表的な3つの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)、ヒト上皮細胞成長因子受容体2 (HER2) が関与しない悪性腫瘍である。そのため、乳がんの標準的治療の一つであるホルモン療法やがん遺伝子である HER2 を標的とした抗体による分子標的治療を行えないことから、予後が非常に悪い。TNBC 患者においても、術後は従来の細胞毒性抗がん剤による治療が行われているが、上記の3つの受容体をターゲットにできないため十分な治療効果が得られない。したがって、TNBC の新しい治療薬の開発は急務となっている。

がんの放射線治療は、がん細胞が正常細胞に比べて放射線感受性が高いことを利用し、低侵襲的にがんの殺傷が可能である。そのため、TNBC の治療法においても有効な選択肢の一つであり、放射線の外部照射による局所療法が行われているが、すでに全身に転移した場合では治療効果を期待できない。一方、放射性物質を体内に投与する内用放射線治療では、がんの内部や近傍に細胞殺傷性の高いオージェ電子や高エネルギーの線を放出する放射性物質を集積させ、選択的にがん細胞に放射線照射が可能であるため、全身に広がったがんに対しても高い治療効果が得られる。また、正常細胞への影響を最小限に単回の投与により長期間効果を持続させることが可能であり、患者の QOL の向上が期待される。しかしながら内用放射線治療薬剤には、核医学イメージングプローブよりも遥かに厳密な生体内動態・分布特異性が求められる。以上のような背景の下、申請者らは、放射線の外部照射により誘導される酵素である NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) に着目し、この酵素を特異的に認識する内用放射線治療薬剤の開発を行ってきた。NQO1 は、多くの固形がん中存在し、TNBC においても高い発現が認められている。これまでに、NQO1 の mechanism-based inhibitor である ES936 (*Biochemistry* 40, 15135 (2001), *Mol Pharmacol* 64, 714 (2003)) をベースに放射性ヨウ素を導入した誘導体を開発し、さらに電子供与基の導入により代謝安定性の高い誘導体の合成に成功した (Sasaki, Hagimori et al, *Bioorg Med Chem* 2014, 若手 B (H25-26))。しかしながら、本化合物は NQO1 に対する高い特異性を示したものの、腫瘍モデルマウスにおいてがんへの集積性が低いことが明らかとなった。したがって、TNBC への高い治療効果を得るには、放射性薬剤の体内動態を改善する何らかの方法が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、TNBC の治療に資する新たな内用放射線治療薬剤を開発することを目的に、精密な分子設計に基づいて標的性を高めたリポソーム型ナノキャリアに放射性薬剤を封入することにより、TNBC への細胞選択的なターゲティングと内用放射線によるがん治療を実現することを着想した。本目的を達成するにはリポソームに高い標的性が求められるが、リポソームに血中滞留性を付与するために用いる PEG がヘリックス構造をとるために PEG 層を形成し、その結果、PEG の末端に修飾した機能性リガンドが PEG 層に埋もれてしまい十分に機能しない問題がある。そこで研究代表者らは、先行研究において、セリン (S) とグリシン (G) からなるジペプチドを 3~7 回繰り返した非ヘリックス構造 (SG)_n を機能性リガンドと脂質の間のスペーサーとして用いることにより、(SG)₅ および (SG)₇ において PEG 層に埋もれず、高い機能性を提示できることを見出している。本研究では、TNBC で発現が報告されている NQO1 と、がんで特異的に発現しがんの不死化に密接に関わっているテロメラーゼを新たな標的として選択し、精密分子設計に基づいて開発した放射性薬剤を、高い TNBC 指向性を持つ EVQ ペプチド修飾リポソームに搭載することにより、TNBC の治療に資する新たなリポソーム型の内用放射線治療薬剤を確立することを計画した。

3. 研究の方法

(1) コールド体および標識前駆体の合成

研究代表者らは、ES936 のフェニル基上に電子供与性であるメトキシ基を導入することにより p-ヨードフェノキシ基の脱離を抑えた安定性の高い誘導体の合成が可能であることを見出している。そこで、コールド体として各種フェノール誘導体とのカップリング反応により電子状態の異なる種々の ES936 誘導体(6-8)の合成を行った。標識前駆体としては、放射性ヨウ素の導入が容易であるトリブチルスズ体(9-11)の合成を行った。テロメラーゼ標的放射性薬剤としては、既報に従い、BIBR1532 (IC₅₀ = 93 nM) (*EMBO J*, 6958, 2001)をベースにしたコールド体およびトリブチルスズ体の合成を行った。

(2) 放射性ヨウ素標識

標識前駆体としてトリブチルスズ体を合成し、スズ-ヨウ素交換反応により放射性ヨウ素標識を行った。

(3) 代謝安定性評価

溶液中での代謝安定性については、コールド体、ホット体、NQO1 および補酵素として NADH を加えて、37 度で 30 分間インキュベート後、逆相 TLC を用いて基質代謝速度を求めた。

(4) TNBC 指向性を持つリポソームの開発

TNBC 上で高発現している Mucin16 (MUC16) に親和性を示すペプチドとして EVQ ペプチドおよび種々のがん細胞表面で発現している v 3 インテグリン受容体に高い結合性する環状 RGDfK (cRGD) をリガンドペプチドとして選択した。これらのペプチドと脂質を非ヘリックス Spacer (SG)_n (n=3~7) で繋いだ機能性脂質を Fmoc 固相合成法により合成した。作製したリポソームの粒子径、表面電荷等の物理化学的性質や安定性を評価した。

(5) TNBC 指向性リポソームのインビトロ評価

EVQ ペプチド修飾リポソームについては、MUC16 高発現 TNBC 細胞株である 4T1、MDA-MB-231 と MUC16 低発現細胞株である A549、NIH3T3 を用いて細胞結合性、細胞内動態、スクランブルペプチドによるリガンドの機能性を評価した。

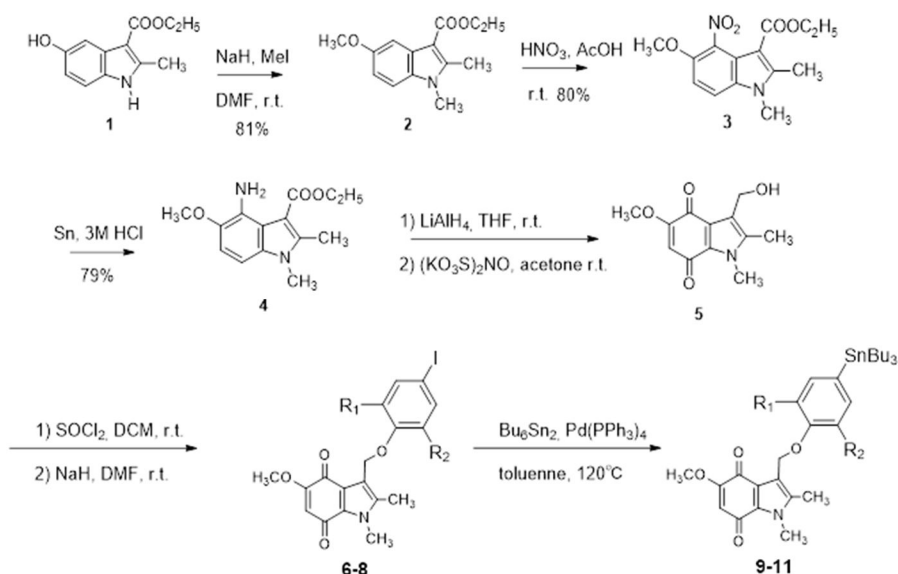
(6) RI 封入 TNBC 指向性リポソームの基礎的検討

TNBC への標的性が確認された EVQ ペプチド修飾リポソームについて、放射性薬剤の封入率や粒子径などへの影響について基礎的なデータを得るために、配位子交換法による ¹¹¹In 標識を行った。

4. 研究成果

(1) コールド体および標識前駆体の合成

NQ01 の mechanism-based inhibitor である ES936 をベースにしたコールド体(6-8)および標識前駆体(9-11)の合成は、図 1 に示すように行なった。化合物 1 から 4 ステップで 3-(hydroxymethyl)-5-methoxy-1,2-dimethylindole-4,7-dione (5) を合成した後、R₁ と R₂ に異なる置換基を持つ 4-iodo-methoxyphenol 誘導体を反応させてコールド体(6-8)を良好な収率で得ることができた。標識前駆体(9-11)は、パラジウム触媒存在下、ヘキサブチルチンを用いてそれぞれ対応するトリブチルスズ体(9-11)を収率 25-38% で得ることができた。テロメラーゼの選択的阻害剤である BIBR1532 をベースにした放射性ヨウ素標識体は既報に従い、5-iodo-BIBR1532 を得ることができた。



R ₁	R ₂	コールド体	収率	標識前駆体	収率
H	H	6	62%	11	38%
OCH ₃	H	7	69%	12	25%
CH ₃	H	8	78%	13	25%
CH ₃	CH ₃	9	56%	14	27%

図 1

(2) 放射性ヨウ素標識

放射性ヨウ素標識は、スズ ヨウ素交換反応で行い、放射性ヨウ素標識体 [¹²⁵I]6-9 をそれぞれ、85%、50%、69%、58% の放射化学的収率で得ることができた(図 2)。また、いずれも放射化学的純度は 99% 以上であった。5-iodo-BIBR1532 の放射性ヨウ素標識体は、放射化学的収率 91%、放射化学的純度 99% で得ることができた。

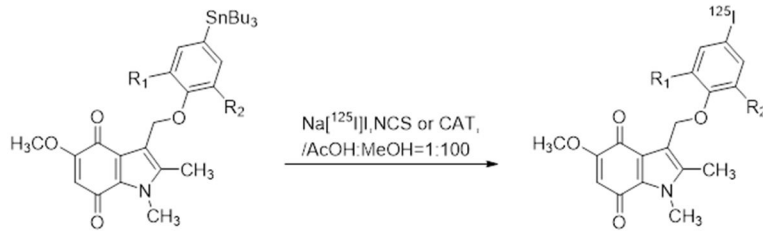


図 2

(3) 代謝安定性評価

ES936 誘導体(6-8)について、それらの放射性ヨウ素標識体を用いて安定性評価を行った。Hanes-Woolf plot を用いて、 K_m 、 k_{cat} を求めたところ、 K_m (μM)はそれぞれ、23.6 ($[^{125}I]$ 6)、8.9 ($[^{125}I]$ 7)、33.9 ($[^{125}I]$ 8)、117.5 ($[^{125}I]$ 9)、 k_{cat} (s^{-1})はそれぞれ、1.16 ($[^{125}I]$ 6)、0.57 ($[^{125}I]$ 7)、0.26 ($[^{125}I]$ 8)、0.21 ($[^{125}I]$ 9)であった。電子供与基を持たない $[^{125}I]$ 6と比べて、 $[^{125}I]$ 7と $[^{125}I]$ 8では、NQO1 との親和性を維持し分解が抑制された。一方、メチル基を2つ持つ $[^{125}I]$ 9でも分解は抑制されたが、NQO1 への親和性が低下した。以上のことより、適切な位置に電子供与基を導入することにより代謝安定性の高いES936 誘導体を構築することが可能であることがわかった。

(4) TNBC 指向性を持つリポソームの開発

EVQ ペプチド修飾脂質 ((Dipalmitoyl) $_2$ K-KSS(SG) $_5$ EVQ)) は、Fmoc 固相合成法により合成することができた。HPLC と MALDI-TOF-MS によって純度と分子量を分析し、目的物質の合成を確認した(図3)。EVQ ペプチド修飾リポソームは、ポストインサージョン法を用いて調製した後、ゼータサイザーによる物性の評価を行ったところ、粒子径は約 100 nm、ゼータ電位はほぼゼロであった。cRGD 修飾脂質は、(SG) $_5$ 脂質とクリック反応を用いて合成を行った(図4)。水への高い分散性を有するcRGD 修飾脂質を用いてcRGD 修飾リポソームの調製を行い、粒子径は約 100 nm、ゼータ電位はほぼゼロのリポソームの調製に成功した。

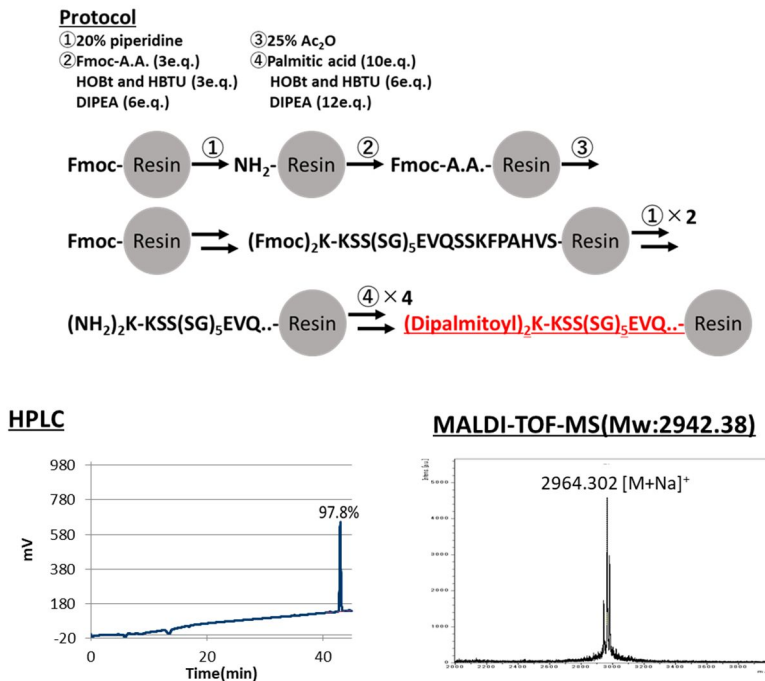


図 3

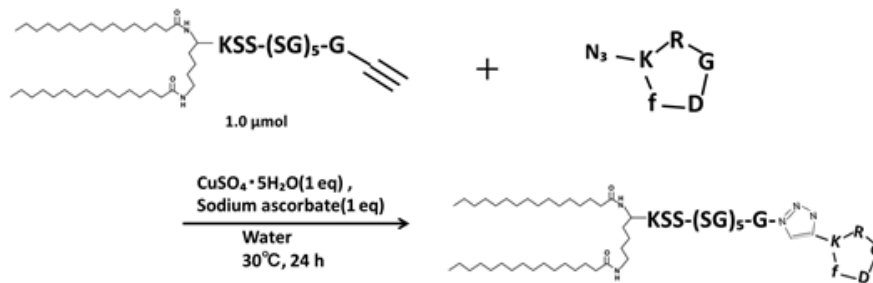


図 4

(5) TNBC 指向性を持つリポソームのインビトロ評価

MUC16 を発現している TNBC 細胞であるマウス乳癌細胞 4T1 と MUC16 を発現していないマウス胎児繊維芽細胞 3T3 を用いて EVQ ペプチド修飾リポソームの細胞結合性を評価したところ (図 5) 4T1 では EVQ ペプチド修飾リポソームの添加量依存的な蛍光の上昇がみられ、一方、3T3 細胞では蛍光の上昇が確認されなかったことから、EVQ ペプチド修飾リポソームは TNBC 細胞株に結合性を示し、その結合性には MUC16 の発現の有無が関与している可能性が示唆された。また、細胞内での動態を評価するために共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内分布を評価した結果、4T1 細胞において EVQ ペプチド修飾リポソームが多く取り込まれており、その一部はリポソームに局在していることがわかった。

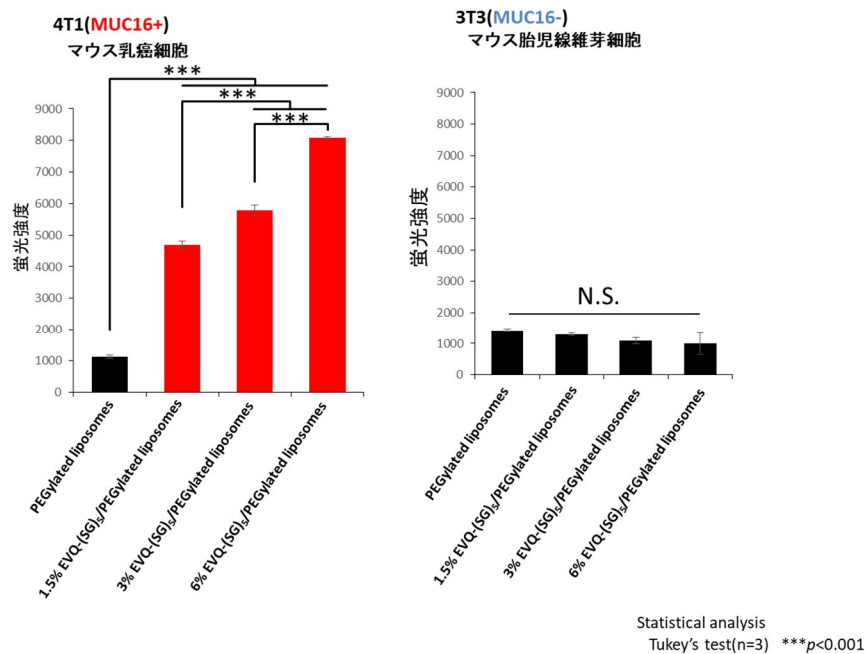


図 5

(6) RI 封入 TNBC 指向性リポソームの基礎的検討

EVQ ペプチド修飾リポソームへ合成した放射性ヨウ素標識体を封入する前に、配位子交換法による ¹¹¹In 標識体を用いて、放射性薬剤の封入率や粒子径等への影響を検討した。その結果、90%以上の高い標識率で ¹¹¹In 標識体を EVQ ペプチド修飾リポソームへ封入が可能であり、封入の前後において粒子径やゼータ電位に影響はなかった。以上の結果より、今後、EVQ ペプチド修飾リポソームと cRGD 修飾リポソームへ放射性ヨウ素標識体の封入を行い、マウスにおける体内動態や治療効果の評価を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masayori Hagimori, Yuki Fuchigami, Shigeru Kawakami	4. 巻 40
2. 論文標題 Peptide-based cancer targeted DDS and molecular imaging	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chemical & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 297-302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c17-00098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masayori Hagimoria, Yorinao Chinda, Tadaharu Suga, Kazuto Yamanami, Naoya Kato, Tatsuo Inamine, Yuki Fuchigami, Shigeru Kawakami	4. 巻 123
2. 論文標題 Synthesis of high functionality and quality mannose-grafted lipids to produce macrophage-targeted liposomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 153-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejps.2018.07.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤直也、萩森政頼、淵上由貴、川上茂
2. 発表標題 インテグリン v 3を標的とした新規機能性脂質修飾リボソームの開発
3. 学会等名 第34回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萩森政頼
2. 発表標題 創薬を推進するイメージングおよびDDS研究
3. 学会等名 長崎大学生命医科学域交流・共同研究促進セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤直也、萩森政頼、淵上由貴、川上茂
2. 発表標題 非ヘリックスペプチド Spacer によるがんへの標的性を高めた近赤外蛍光標識PEGリポソームの開発
3. 学会等名 第12回日本分子イメージング学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoya Kato, Masayori Hagimori, Tadaharu Suga, Yuki Fuchigami and Shigeru Kawakami
2. 発表標題 Development of integrin α 3 targeted peptide-lipids modified PEGylated liposome for cancer imaging
3. 学会等名 第7回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川崎 翔哉、杉本 理紗、佐野 紘平、萩森 政頼、向 高弘
2. 発表標題 NAD(P)H: quinone oxidoreductase1 (NQO1)標的放射性薬剤の開発：電子供与基の導入が親和性および安定性に及ぼす影響の評価
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masayori Hagimori, Tadaharu Suga, Yorinao Chinda, Kazuto Yamanami, Naoya Kato, Tatsuo Inamine, Yuki Fuchigami, Shigeru Kawakami
2. 発表標題 Synthesis of high functionality and quality mannose-grafted lipids and its application for macrophage-targeted liposomes
3. 学会等名 18th Symposium for Gene, Design and Delivery (国際学会)
4. 発表年 2018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 分担 者	川上 茂 (KAWAKAMI Shigeru) (20322307)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授 (17301)	