

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：34413

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19412

研究課題名(和文) チェレンコフ光エネルギーによる分子マシン駆動と革新的がんセラノスティクスへの挑戦

研究課題名(英文) Theranostics on molecular machine action driven by the Cherenkov light

研究代表者

天満 敬 (Temma, Takashi)

大阪薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90378787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、18F-FDGチェレンコフ光によりがん細胞傷害性を示す分子マシンを用いたセラノスティクス実現の可能性に着目した。すなわち、がん選択的送達可能な分子マシンの開発と、それを用いたがん細胞傷害性評価実験を行った。分子マシンのがん送達のため、種々の候補ペプチドの中からインテグリンを標的とした二環性ペプチドの有効性を見出し、当該二環性ペプチド修飾分子マシンの合成に成功した。さらに本分子マシンを用いたインビトロ実験により細胞傷害性を示す基礎的な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、本邦で月間3万人以上が対象となる18F-FDG PET検査によるがん診断の後、速やかに分子マシン駆動がん治療を直結させる方法論の開発にかかる挑戦的原理構築研究である。チェレンコフ光を生じる18Fと細胞傷害性を有する分子マシンが共局在するがん部位においてのみ治療効果を発現することから、従来法よりも高い有効性と安全性が期待される。本研究成果は、今後のがんセラノスティクスの推進に重要な知見を与えうる。

研究成果の概要(英文)： In this study, we focused on the possibility that the Cherenkov light produced by 18F-FDG could act as a driving force for molecular machine to damage tumor cells. We thus designed and synthesized a new cancer-targeting molecular machine and evaluated a cytotoxicity in cancer cells. We demonstrated high potential of a bicyclic peptide for targeting integrin expressed in tumors among several peptide candidates tested. We also synthesized the bicyclic peptide modified molecular machine successfully. Furthermore, we demonstrated a cytotoxicity of the modified molecular machine in vitro.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：分子マシン 18F-FDG セラノスティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の個別化医療ニーズの高まりとともに、疾患の診断・治療の一体化を実現するセラノスティクス (Theranostics) の概念が提唱され、治療に直結する診断法の必要性から、PET をはじめとする核医学診断法の重要性が高まっている。現状、セラノスティクス実現のために、診断用  $^{111}\text{In}$ -Zevalin / 治療用  $^{90}\text{Y}$ -Zevalin のように診断の時点で明確な治療指向性を求めた手法が用いられ、成果を挙げているが、現状の手法においては適用が極めて狭い範囲に限定されるため、セラノスティクス拡大の観点においては、セラノスティクスに適合する新たな診断・治療法の構築が必要である。一方で、外部エネルギーの付与により分子構造中央の二重結合を軸として上部モーター部分が高速回転する微小分子マシンの基本構造が 2009 年に Feringa らにより報告され、2017 年には、紫外線照射により培養がん細胞膜上に集積した分子マシンが高速回転することで細胞膜を傷害し細胞死を惹起する可能性が Nature 誌に報告されるなど、分子マシンの疾患治療への応用を示唆する知見が蓄積されてきている。

本研究では、PET 診断に用いる  $^{18}\text{F}$  等のポジトロン放出核種より生じるチェレンコフ光が、紫外可視光領域にエネルギースペクトルを有することに着目した。すなわち、がんの PET 診断に汎用される  $^{18}\text{F}$ -FDG が有する  $^{18}\text{F}$  より生じるチェレンコフ光を分子マシンの回転駆動力に利用できれば、 $^{18}\text{F}$ -FDG PET によるがん診断と分子マシン駆動によるがん治療を同時に実現できる発想である。本研究課題では、 $^{18}\text{F}$ -FDG と分子マシンを用いた診断・治療一体型がん治療法という、独創性の高い新たなセラノスティクスの構築を目指す。

### 2. 研究の目的

分子マシンの生体内応用には、分子マシンへのがん送達性の付与が肝要であると考えられる。外部エネルギー付与により回転する分子マシン自身の構造は、がん組織への集積性能を有さないため、分子マシンへのがん標的化構造の導入が必要である。分子マシンのインビトロでのがん傷害性を明らかにした Nature 誌での検討においては、分子マシン構造へのペプチドの導入によるがん標的化能の付与が試みられたが、がん認識性ペプチドの分子マシン両側への修飾では立体障害により細胞傷害性を損ない、片側への修飾では細胞傷害性を維持するもののがん標的化能が乏しいことが報告され、修飾に用いるペプチドには厳密な選別が必要であることが示唆された。この結果から、分子マシン修飾に用いるペプチドの条件として、1. がん特異的かつ細胞膜上に発現する分子に高い親和性を示すこと、2. 分子マシンへの導入後も標的化能と細胞傷害性が維持され得るサイズ・構造を有すること、を満たす必要があると考えられる。

そこで、本研究では第一の目的として、生体内において分子マシンをがん選択的に送達しうるペプチドの選別を掲げ、がん細胞膜上に発現する PD-L1、EMMPRIN、GLP-1R、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  を標的とするペプチドについて、それぞれ放射性同位元素を標識したプローブを合成し、標的認識性やインビボでの腫瘍移行性について詳細な検討を行った。本報告では、検討した各種ペプチドの中で、特に有望な結果が得られた、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  を標的とした二環性ペプチド bcRGD について詳述する。

さらに、本研究では、分子マシン駆動に関する基盤原理の構築を目的に、分子マシンに bcRGD を導入した複合体について、その合成法や UV 照射後の細胞傷害性を基礎的に調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 二環性ペプチドプローブ ( $^{125}\text{I}$ ]bcRGD) の開発

Fmoc 固相合成により直鎖ペプチド Ac-KPPPSG-Abz-SGCHPQcRGDc-NH<sub>2</sub> (Ac, Acetyl; Abz, 4-amino-benzoic acid; c, D-Cys) を合成後、1,3,5-tris(bromomethyl) benzene との反応を介した環化により、bcRGD を合成した。得られた bcRGD と [ $^{125}\text{I}$ ]N-succinimidyl 3-iodobenzoate ([ $^{125}\text{I}$ ]SIB) との結合により放射性ヨウ素標識プローブ [ $^{125}\text{I}$ ]bcRGD を合成した。 [ $^{125}\text{I}$ ]bcRGD をインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  高発現 U-87MG 細胞および低発現 A549 細胞と 4°C、1 時間インキュベートした後に細胞に結合した放射能を測定し、細胞タンパク質あたりの集積量 (%dose/mg) を評価した。U-87MG 細胞および A549 細胞を両下肢に皮下移植した担がんモデルマウスに [ $^{125}\text{I}$ ]bcRGD を尾静脈より投与し、経時的に屠殺した後、摘出した臓器の重量と集積放射能を測定し、集積量 (%ID/g) を算出した。

#### (2) bcRGD 導入分子マシン ( $M_{\text{RGD}}$ ) の合成

末端にアジドを導入した分子マシン構造 M2N は既報に基づいて合成した。分子マシン末端アジドとの結合のため、bcRGD の N 末端にアルキン残基を導入した bcRGD<sub>3</sub> を (1) と同様に合成した。bcRGD<sub>3</sub> (1 eq.)、M2N (2 eq.) を無水 DMF に溶解し、アスコルビン酸ナトリウム (1 eq.)、Cu-TBTA 溶液 (0.5 eq. in 55% DMSO) と混合後、室温攪拌下で 4 時間反応させた。反応後、逆相 HPLC により M2N の片側のアジドに bcRGD<sub>3</sub> が結合した誘導体  $M_{\text{RGD}}$  を分取し、ESI-MS により分子量を測定した。  $M_{\text{RGD}}$ : calculated  $m/z$  2657.1, detected 1330.0 [ $M+2H$ ]<sup>2+</sup>, 887.2 [ $M+3H$ ]<sup>3+</sup>

#### (3) $M_{\text{RGD}}$ の細胞傷害性評価

$M_{\text{RGD}}$  (500 nM)、Propidium Iodide (PI, 100 nM) を DMEM (phenol red 不含) 中の U-87 細胞に添加後、Keyence 社 BZ-X810 システムのバンドフィルター ( $\lambda_{\text{ex}}$ ; 360/40 nm) を介して紫外光を照射した。照射後、経時的に PI 由来 ( $\lambda_{\text{ex}}$ ; 545 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ ; 605 nm) の蛍光像を取得した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 二環性ペプチドプローブ ( $[^{125}\text{I}]\text{bcRGD}$ ) の開発

$[^{125}\text{I}]\text{bcRGD}$  (図1) は放射化学的純度 99% 以上、比放射能 81 GBq/ $\mu\text{mol}$  で合成した。 $[^{125}\text{I}]\text{bcRGD}$  は U-87MG 細胞に 1.6 %dose/mg と A549 細胞 (0.3% dose/mg) と比較して有意に高く集積した。担がんマウスに  $[^{125}\text{I}]\text{bcRGD}$  を投与したところ、30 分後における U-87MG 腫瘍への放射能集積量は 3.8%ID/g と高い値を示した。この集積は A549 腫瘍 (2.1%ID/g) と比較して有意に高く、また集積放射能の腫瘍/血液、腫瘍/筋肉比はそれぞれ 4.0、6.0 と良好な値であった (図2)。この結果より、 $[^{125}\text{I}]\text{bcRGD}$  のがん細胞膜上に発現するインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  を標的としたイメージングプローブとしての有効性が示された。同時に、二環性ペプチド bcRGD は、1. 二環性ペプチドの構造にリンカーを介して修飾した場合にもインテグリンへの結合性が維持される、2. インピトロ・インピボにおいてインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  への結合性を有する、3. 生体への投与後にインテグリン発現腫瘍に高集積性を示し、また血液や筋肉といった正常組織への集積が低い、といった優れた性質を有することが示された。

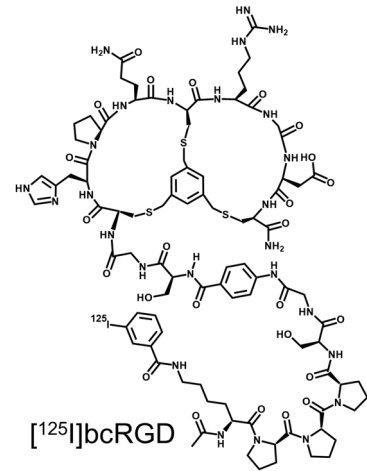


図1.  $[^{125}\text{I}]\text{bcRGD}$  の構造

以上の性質は、分子マシンをがん細胞膜特異的に集積させる必要のある本研究の治療機序に必須の条件であり、bcRGD は分子マシンの腫瘍特異的送達を担うモデルペプチドとして適切であると判断できる結果が得られた。

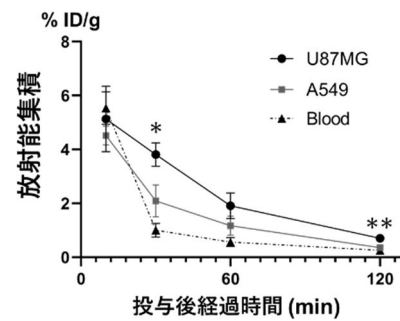


図2.  $[^{125}\text{I}]\text{bcRGD}$  の体内動態

##### (2) bcRGD 導入分子マシン ( $M_{\text{RGD}}$ ) の合成

分子マシンの末端にアジドを導入した M2N は既報に従い合成し、末端にアジド結合部位の形成のためアルキンを導入した bcRGD<sub>3</sub> についても常法により合成した。両者をクリック反応により結合させる場合、極性の低い M2N と極性の高いペプチド bcRGD<sub>3</sub> 両者が溶解する DMF/DMSO 混合液中のクリック反応により、 $M_{\text{RGD}}$  は合成可能であり、また逆相 HPLC において  $M_{\text{RGD}}$  単一ピークとして分取可能であった (図3)。

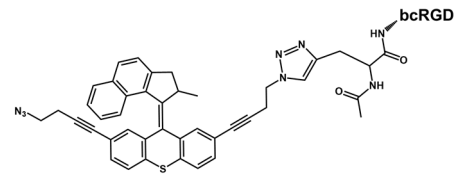


図3.  $M_{\text{RGD}}$  の構造

##### (3) $M_{\text{RGD}}$ の細胞傷害性評価

$M_{\text{RGD}}$  を細胞に添加後、紫外光照射の時間経過につれて PI 由来の蛍光の増加が認められた (図4)。また、明視野像の観察でも細胞死の特徴である Blebbing を確認できた。以上より、 $M_{\text{RGD}}$  はインピトロにおいてインテグリン  $\alpha_v\beta_3$  発現がん細胞に対する細胞傷害性を有することが示唆された。 $M_{\text{RGD}}$  のインピボにおける腫瘍への移行性については、 $M_{\text{RGD}}$  の放射標識プローブの開発などの手法を用いた検証が今後必要である。また本研究課題の最終目標である分子マシンを用いた診断・治療の一体化の実現には、ポジトロン核種由来のチェレンコフ光による分子マシン駆動に関する検証が別途必要である。

以上の結果より、本研究では、分子マシンの生体内応用を実現するべく、インピボでのがん選択的送達が期待される bcRGD の選別、および、分子マシンへの二環性ペプチド修飾の手法確立に成功した。また合成したがん標的分子マシン  $M_{\text{RGD}}$  について、インテグリン発現細胞への傷害性を示す基礎的な知見が得られた。

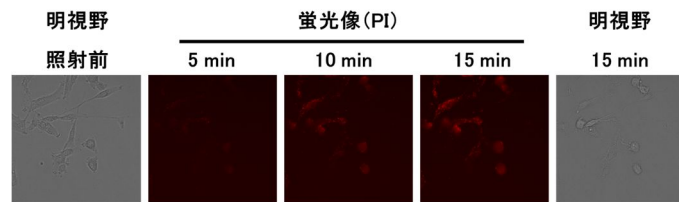


図4. U-87MG細胞の明視野及び蛍光像の変化

本研究成果は、近年高まりを見せる分子マシンの生体応用や、がんセラノスティクスの推進に重要な情報を提供しうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Kondo N, Wakamori K, Hirata M, Temma T  | 4. 巻<br>528           |
| 2. 論文標題<br>Radioiodinated Bicyclic RGD Peptide for Imaging Integrin $\alpha$ 3 in Cancers | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Biochem Biophys Res Commun  | 6. 最初と最後の頁<br>168-173 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>doi: 10.1016/j.bbrc.2020.05.106.                               | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>江島怜那、近藤直哉、中林真理、高田慎也、向井昭裕、源間ゆり、宮部とき、平田雅彦、天満敬 |
| 2. 発表標題<br>ホウ素化合物の効率的開発に資する生体試料中ホウ素濃度の簡易定量法の開発         |
| 3. 学会等名<br>第15回日本中性子捕捉療法学会学術大会                         |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>向井昭裕、平田雅彦、高田慎也、勝野宥、江島怜那、源間ゆり、宮部とき、近藤直哉、天満敬 |
| 2. 発表標題<br>ホウ素中性子捕獲療法のためのホウ酸カルシウム内包ナノ粒子の開発            |
| 3. 学会等名<br>第15回日本中性子捕捉療法学会学術大会                        |
| 4. 発表年<br>2018年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>高田慎也、平田雅彦、向井昭裕、江島怜那、源間ゆり、宮部とき、近藤直哉、天満敬 |
| 2. 発表標題<br>ホウ素中性子捕捉療法のための分散制御に基づくホウ酸カルシウムナノ粒子の作製  |
| 3. 学会等名<br>第15回日本中性子捕捉療法学会学術大会                    |
| 4. 発表年<br>2018年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>天満 敬                                 |
| 2. 発表標題<br>非侵襲的分子イメージングに基づく生体機能分析               |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会近畿支部 2018年度第2回提案公募型セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2018年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古角應弥、近藤直哉、赤尾美乃里、平田雅彦、天満 敬                 |
| 2. 発表標題<br>PD-L1結合ペプチドRK-10を母体とする放射性ヨウ素標識ペプチドプローブの開発 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会                               |
| 4. 発表年<br>2019年                                      |

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>天満 敬               |
| 2. 発表標題<br>病態解析のための生体分子イメージング |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2019年               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>近藤直哉、天満 敬                                   |
| 2. 発表標題<br>PD-L1 結合性ペプチドRK-10を母体としたSPECT用イメージングプローブの開発 |
| 3. 学会等名<br>第78回日本癌学会学術総会                               |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>若森恵太、近藤直哉、大石綾香、平田雅彦、天満 敬               |
| 2. 発表標題<br>放射性ヨウ素標識二環性RGDペプチドのイメージングプローブとしての有効性評価 |
| 3. 学会等名<br>第69回日本薬学会関西支部総会・大会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大石綾香、近藤直哉、左 萌子、平田雅彦、天満 敬                                 |
| 2. 発表標題<br>Exendin-4 の一残基置換体を母体としたイメージングプローブ開発 放射性ヨウ素標識体の合成と膵臓集積性評価 |
| 3. 学会等名<br>第69回日本薬学会関西支部総会・大会                                       |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>近藤直哉、大石綾香、左 萌子、平田雅彦、天満 敬                        |
| 2. 発表標題<br>1残基置換したExendin-4 のGLP-1受容体イメージングプローブ母体としての有効性評価 |
| 3. 学会等名<br>第3回日本核医学会分科会放射性薬品科学研究会、第19回放射性医薬品・画像診断薬研究会      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>天満 敬                      |
| 2. 発表標題<br>分子イメージングに基づく非侵襲的インビボ機能分析  |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会近畿支部第3回支部講演会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年                      |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-----------|--|----------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 近藤 直哉<br><br>(Kondo Naoya)<br><br>(80756172)     | 大阪薬科大学・薬学部・助教<br><br><br>(34413) |    |
| 研究<br>分担者 | 平田 雅彦<br><br>(Hirata Masahiko)<br><br>(00268301) | 大阪薬科大学・薬学部・講師<br><br><br>(34413) |    |