

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07037

研究課題名(和文) MRI造影機能を有し酸化ストレス誘導を作用機序とした新規ナノ粒子化抗がん剤の開発

研究課題名(英文) Development of a novel anticancer agent with MRI contrast effect and induction of oxidative stress

研究代表者

岡崎 祥子 (Okazaki, Shoko)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：40435152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ビタミンK類は生体に必要な栄養素の一つである一方で、細胞内でスーパーオキシドラジカルを産生し、酸化ストレスを引き起こすことで様々な腫瘍細胞に毒性を示す。このため、その毒性を増強させる化合物と組み合わせることで、ビタミンK類が新たな抗がん剤として機能する可能性がある。本研究では、MRI造影効果とSOD様活性を有する低分子ニトロキシラジカルがビタミンK3の細胞毒性を増強させることを明らかにし、これらの化合物を組合わせた新規抗がん剤開発の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ビタミンKの腫瘍細胞に対する毒性は古くから知られており、これまでに様々なビタミンK類縁体が合成されている。しかしながら、癌治療の補助剤として使われる場合があるのみで、主要な抗がん剤として利用されていない。本研究はビタミンKの腫瘍細胞に対する毒性を増強させる化合物を見いだしたものであり、ナノ粒子化によるビタミンKの新たな抗がん剤としての可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：While vitamin K is one of the nutrients necessary for living organisms, it is toxic to various tumor cells by producing superoxide radicals and causing oxidative stress in cells. Therefore, vitamin K may function as a new anti-cancer agent when combined with compounds that enhance its toxicity. In this study, we demonstrated that low molecular weight nitroxyl radicals with MRI contrast and SOD-like activity potentiate the cytotoxicity of vitamin K3, indicating the possibility of developing new anticancer agents by combining these compounds.

研究分野：生物物理

キーワード：ビタミンK ニトロキシラジカル 抗がん剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K (VK) 類は生体に必要な栄養素の一つである一方で、*in vitro* において肝がんや肺がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がんなど細胞種を問わず、幅広い細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが知られている。VK 類はナフトキノン骨格を有しており、NADPH レダクターゼなどから電子を受けとることでセミキノラジカルとなる。生じたセミキノラジカルは酸素に電子を受け渡し $O_2^{\cdot-}$ を生成する。この酸化還元 (レドックス) サイクルにより生じた酸化ストレスや細胞内チオールとの結合などが VK 類の抗腫瘍メカニズムの一つであると考えられている。VK は生体に必要なビタミンであるため、正常細胞への影響が少ない抗がん剤としての利用を期待できるが、自然界由来の VK₁ や VK₂ は正常細胞に対して影響が少ない一方で抗腫瘍効果が弱い。このため、十分な効果を期待できるほど投与するには、難水溶性を克服するための溶剤を大量に使用する必要があり、その毒性が問題になる。そこで、VK の抗腫瘍効果を増強し、且つ水溶性を高めるとともにがん組織へ集積させることができれば、正常組織への障害が少なく、効果的な抗がん剤となる可能性がある。

がん細胞において、 $O_2^{\cdot-}$ を過酸化水素へと不均化する酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の過剰発現による過酸化水素の過剰生成がアポトーシスを誘導することが知られており、VK が産生する $O_2^{\cdot-}$ を速やかに過酸化水素に変換することで VK の抗腫瘍効果の増強を図れる可能性がある。しかし、SOD は細胞膜を透過させるのは難しく、細胞内で過剰発現させるには遺伝子操作が必要となる。一方で、電子スピン共鳴法のレドックスプローブとして用いられる環状の低分子ニトロキシラジカルは SOD 様活性を有している。低分子ニトロキシラジカルは脂質膜を透過しやすく、担体と結合させるなどの加工も酵素より行いやすい。また、低分子ニトロキシラジカルは MRI の造影剤としての機能も有しているため、投与後の体内動態について解析できる。

抗がん剤の腫瘍組織への送達には薬剤のナノ粒子化による EPR 効果の利用が広く検討されている。したがって、VK とニトロキシラジカルをデキストランのような水溶性の高分子化合物に結合させたナノ粒子は、VK の抗腫瘍効果を増強し、且つ水溶性を高めるとともにがん組織へ集積させることができ、さらに MRI 造影により体内動態をトレースできる理想的な抗がん剤となる可能性がある。

2. 研究の目的

VK の抗がん剤としての利用を目指し、VK の抗腫瘍効果を増強し、且つ水溶性を高めるとともにがん組織へ集積させることができる新規化合物の開発を行う。その基礎検討として、ビタミン K₃ (VK₃) の腫瘍効果を増強させる低分子ニトロキシラジカルの探索をおこない、そのメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

1) VK₃ の腫瘍効果を増強させる低分子ニトロキシラジカルの探索

マウス線維肉腫 (RIF-1) 細胞を 96 穴プレートで 24 時間培養 (RPMI1640 培地、5%FBS) 後、VK₃ と各種低分子ニトロキシラジカル (2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPO)、4-hydroxy-TEMPO、4-amino-TEMPO、4-oxo-TEMPO、3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy radical (3-carboxy-PROXYL)、3-carbamoyl-PROXYL) を培地に添加し、さらに 24 時間後に細胞の生存率を Cell counting kit-8 (Dojindo) で測定した。

2) RIF-1 細胞において VK₃ が産生する活性酸素種の同定

RIF-1 細胞の細胞懸濁液に VK₃ とスピントラップ剤である DMPO を添加し、DMPO のラジカル付加体を X-band ESR で検出した。

得られたスペクトルについてシミュレーションを行い、VK₃ が産生したラジカル種の同定を行った。

3) VK₃ と 4-hydroxy-TEMPO による細胞死メカニズムの検討

RIF-1 細胞を 96 穴プレートで 24 時間培養 (RPMI1640 培地、5%FBS) 後、活性酸素応答性蛍光プローブである DCFH-DA で処理し、VK₃ と 4-hydroxy-TEMPO 処理後の蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定した。また、同様に H₂DCFDA、VK₃ と 4-hydroxy-TEMPO で処理した細胞についてフローサイトメトリーで測定した。

一方で、RIF-1 細胞を 96 穴プレートで 24 時間培養 (RPMI1640 培地、5%FBS) 後、抗酸化剤とともに VK₃ と 4-hydroxy-TEMPO で処理し、24 時間後の細胞の生存率を Cell counting kit-8 で測定した。

4. 研究成果

1) VK₃の腫瘍効果を増強させる低分子ニトロキシラジカルの探索

RIF-1にVK₃と電子スピン共鳴法でレドックスプローブとして汎用される環状低分子ニトロキシラジカルの1つである4-hydroxy-TEMPOを同時に処理し、24時間後の細胞生存率を比較した。その結果、VK₃単独処理に比べて、4-hydroxy-TEMPOとの同時処理では顕著に細胞生存率が低下することが分かった(図1)。低分子ニトロキシラジカルには基本骨格が6員環構造のもの(TEMPO系)と5員環構造のもの(PROXYL系)さらに各基本骨格で官能基の異なるものなど多様な分子種が存在する。そこで、4-hydroxy-TEMPOが示したVK₃に対する毒性増強効果を他の分子種も有するのかわかるため、代表的な5種類のニトロキシラジカル(TEMPO、4-hydroxy-TEMPO、4-amino-TEMPO、4-oxo-TEMPO、3-carboxy-PROXYL、3-carbamoyl-PROXYL)の毒性増強効果を検討した。その結果、TEMPO系よりもSOD様活性が低いPROXYL系の3-carboxy-PROXYLと3-carbamoyl-PROXYLは4-hydroxy-TEMPOと同条件ではVK₃に対する毒性増強効果を示さなかった。一方で、TEMPO系ではO₂^{•-}との反応性が低い4-oxo-TEMPOは有意な毒性増強効果を示さなかったが、TEMPOや4-amino-TEMPOは4-hydroxy-TEMPOと同程度の毒性増強効果を示した。これらの結果から、TEMPO系であれば毒性増強効果を示す可能性は高く、ナノ粒子化にはTEMPO系が適していると考えられる。

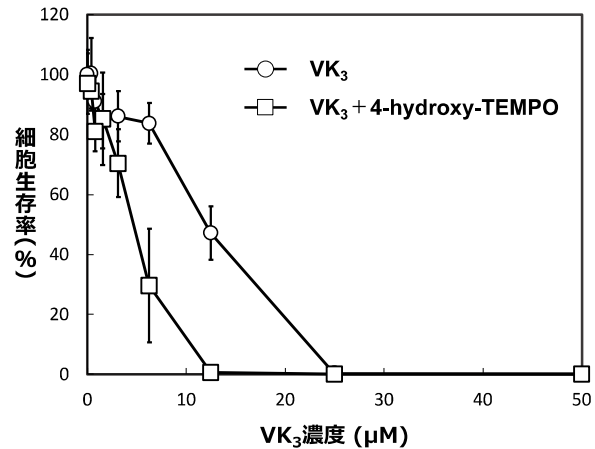


図1 VK₃の細胞毒性における4-hydroxy-TEMPOの効果

2) RIF-1細胞においてVK₃が産生する活性酸素種の同定

次に、RIF-1細胞内で産生されるラジカル種について検討した。電子スピン共鳴のスピントラップ法は反応性の高いラジカル種をスピントラップ剤で捕捉し、安定なラジカルとして検出できる。そこで、細胞懸濁液にVK₃とスピントラップ剤であるDMPOを添加し、X-band ESRで測定したところ、複数のラジカル付加体のシグナルが重なっていると考えられる14本のシグナルが検出された。このシグナルはVK₃あるいは細胞非存在下では検出されなかった。

得られたスペクトルが複雑だったことからシミュレーションを行ったところ、超微細分裂定数がA_N=1.41、A_H=1.16、A_H=0.13のO₂^{•-}付加体とA_N=1.49、A_H=1.49の・OH付加体のシグナルが重なっていることが判明した。過酸化水素は細胞内で鉄を触媒としたフェントン反応により・OHを生成することが知られている。したがって、VK₃によってできたO₂^{•-}の一部は過酸化水素を経て・OHとなっていることが示された。4-hydroxy-TEMPO存在下で産生される活性酸素種についても検討したが、4-hydroxy-TEMPO自身のシグナルが重なってしまうため、検討を断念した。

3) VK₃と4-hydroxy-TEMPOによる細胞死メカニズムの検討

スピントラップ法ではVK₃と4-hydroxy-TEMPOによる活性酸素の産生を確認出来なかったため、活性酸素応答性蛍光物質を用いて検討を行った。その結果、VK₃単独処理に比べて、4-hydroxy-TEMPOとの同時処理では細胞当たりの蛍光強度が約2倍に増加した。また、フローサイトメトリーを用いた検討では、VK₃と4-hydroxy-TEMPOの同時処理における平均蛍光強度がVK₃単独処理の約3倍の値を示した。また、VK₃と4-hydroxy-TEMPOとを同時処理した細胞では他の細胞より約10倍蛍光強度が高い細胞群が全体の20%ほど存在していることが分かった。

VK₃と4-hydroxy-TEMPOを同時処理すると細胞内レドックスが酸化に傾いていたことから、細胞毒性との関連を調べるため、抗酸化剤の効果についても検討した。その結果、PEG結合カタラーゼやグルタチオン前駆体のN-アセチルシステイン存在下では、細胞生存率は90%以上と未処理細胞と同程度となり、VK₃と4-hydroxy-TEMPOによる細胞毒性には過酸化水素などの活性酸素種が重要な役割を果たしていることが示された。

以上の結果から、6員環構造の低分子ニトロキシラジカルがVK₃の細胞毒性を増強する効果を有していることが明らかとなった。コロナ感染症対策の影響などにより、当初の目標であった新規化合物の合成着手までには至らなかったが、本研究結果は、VK₃と低分子ニトロキシラジカルを組み合わせることで新たな抗がん剤となる可能性を強く示唆しており、本研究を進展させていく重要な根拠となるものである。

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 Okazaki Shoko, Hirata Ayako, Shogomori Yusuke, Takemoto Megumi, Nagata Takuro, Hayashida Eriko, Takeshita Keizo	4. 巻 214
2. 論文標題 Radical reactions induced by ketoprofen in phospholipid membranes under ultraviolet light irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotobiol.2020.112090	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 Keizo Takeshita, Hana Okazaki, Megumi Tsukamoto, Shoko Okazaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Differences in pharmacokinetic behaviors of two lipophilic 3-substituted 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl radicals, in vivo probes to assess the redox status in the brain using magnetic resonance techniques	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance in Medicine	6. 最初と最後の頁 560-569
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrm.28499	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡崎 祥子、岡崎 華、塚本 愛美、竹下 啓蔵
2. 発表標題 磁気共鳴法による非侵襲的レドックス測定のための五員環ニトロキシルプローブ（MCP, HMP）のマウス脳内動態解析
3. 学会等名 第72回酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎 祥子、宮瀬のぞみ、有田 瑠名、山田 瑠依、竹下 啓蔵
2. 発表標題 紫外線照射によりケトプロフェンが惹起するリボソーム膜傷害の検出
3. 学会等名 第58回電子スピンスサイエンス学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎 祥子、宮瀬のぞみ、平尾 誠、有田 瑠名、山田 瑠依、竹下 啓蔵
2. 発表標題 紫外線照射下のケトプロフェンが惹起したラジカル反応によるリポソーム膜の傷害
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎祥子、海江田真愛、野下麻衣子、柴原由帆、寺山元規、太田悠平、竹下啓蔵
2. 発表標題 TEMPOLによるビタミンK3の細胞毒性増強効果の検討
3. 学会等名 第61回電子スピンサイエンス学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡崎祥子、海江田真愛、野下麻衣子、柴原由帆、寺山元規、太田悠平、竹下啓蔵
2. 発表標題 スピンプローブTEMPOLによるビタミンK3の細胞毒性増強効果
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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

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