

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：34316

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05713

研究課題名（和文）多剤耐性ガン細胞に対する光熱療法を指向した金ナノロッド-ペプチド複合体の開発

研究課題名（英文）Synthesis and photothermal conversion of gold nanorods surface-modified with mitochondrial localization peptides

研究代表者

富崎 欣也 (Tomizaki, Kin-ya)

龍谷大学・先端理工学部・教授

研究者番号：90397026

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）：ミトコンドリア局在性ペプチドとPEGで被覆した金ナノロッドを合成し、808 nm近赤外光照射下における光熱変換特性を評価し、HeLa細胞への細胞毒性を評価し、ペプチドで被覆された金ナノロッド（AuNR-peptide）と近赤外光照射の組み合わせがガン細胞に効率よくダメージを与えることを見出した。本研究成果は、ガンのフォトサーマル療法技術の発展に寄与すると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内のミトコンドリアは固有のアポトーシス（プログラム細胞死）経路を有し、生体内のエネルギー通貨であるATPを産生するオルガネラである。すなわち、ミトコンドリアのATP産生能を低減することができれば、ABCトランスporter活性の阻害を通じて抗ガン剤の細胞内滞留性の向上が達成できるのではないかと考える。本研究は、皮膚透過性の高い近赤外光を用いることでガン細胞を死滅させるフォトサーマル療法への応用を目指しており、社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要（英文）：We synthesized gold nanorods coated with mitochondria-localization peptides and PEG (AuNR-peptide), evaluated their photothermal conversion properties under 808 nm near-infrared light irradiation, evaluated their cytotoxicity to HeLa cells, and found the combination of the peptide-coated gold nanorods (AuNR-peptide) and near-infrared light irradiation efficiently damaged cancer cells. We believe that the results of this research will contribute to the development of photothermal therapy technology for cancer.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：ペプチド 金ナノロッド フォトサーマル療法 近赤外光

1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因の1位は男女ともに「ガン」であり、現在では、種々のガン診断法およびガン治療法が開発され、多くのガン患者に対して適用されるに至った(厚生労働省、平成29年(2017)人口動態統計(確定数))。しかし、ガンに対する化学療法において、治療の長期化にともない抗ガン剤の効果が弱まる獲得耐性に対する課題への対応が急務となっている。これら多剤耐性(MDR)ガン細胞では、アデノシン三リン酸(ATP)結合カセット(ABC)トランスポーターとよばれる細胞膜タンパク質ファミリーが、ATP 依存的に疎水性抗ガン剤を細胞外へ排出することが原因のひとつと考えられている(Chen et al, ACS Nano 2015, 5223)。これまで、MDR ガン細胞に対するドラッグデリバリーシステム(DDS)研究は、薬剤の細胞内滞留性の向上を図ったものや細胞核を標的とするものが多かった(Guo et al, Adv. Mater. 2015, 6450)。

一方、細胞内のミトコンドリアは固有のアポトーシス(プログラム細胞死)経路を有し、生体内のエネルギー通貨であるATPを産生するオルガネラである。すなわち、ミトコンドリアのATP産生能を低減することができれば、ABCトランスポーター活性の阻害を通じて抗ガン剤の細胞内滞留性の向上が達成できるのではないかと考える。近年、ミトコンドリアを標的とするDDSが注目を集めているが、それらはミトコンドリアにおける薬物放出が主たる目的となっており、ミトコンドリア破壊を主目的としたDDS研究は極めて限定的である(Kumar et al, JACS 2014, 17836)。最近、Hanらは、有機色素とミトコンドリア移行性ペプチドを複合化させ、有機色素をミトコンドリアに集積させるとともに、可視光レーザー照射によって生じる活性酸素種によりミトコンドリアを破壊することで、抗ガン剤の効果を増強する方法を報告した(Han et al, ACS Appl. Mater. Interfaces 2016, 25060)。しかし、一般に可視光の皮膚透過性は低く、本法のin vivoでの効果は限定的と考えられる。現時点において、MDRガン細胞を対象とするDDSシステムとして、①細胞膜の透過、②エンドソームからの脱出、③ミトコンドリアへの局在、④ミトコンドリアの破壊、⑤抗ガン剤の細胞内放出、といった一連の機能を併せもつことが要求される。

2. 研究の目的

応募者は、アミノ酸9残基からなるβシート性ペプチドが数ナノメートル径のディスク状自己集合体を形成し(Tomizaki et al, Langmuir 2014, 846, Bioorg. Med. Chem. 2015, 7282)、それらに核移行シグナル(NLS)を結合したドラッグキャリアの内部に抗ガン剤ドキシソルピシンを内包することで、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞に対する細胞死活性が強化されることを見いだした(Tomizaki et al, Molecules 2017, 1916)。また、直近では、キャリアペプチドとタンパク質をコードしたプラスミドDNAとの複合体による、標的細胞内での外来タンパク質発現にも着手している。さらに、科研費(基盤C, 2016-2018)の支援により、皮膚透過性の高い近赤外光を熱に変換する光熱変換特性を有する金ナノ結晶(AuNC)のバイオミネラリゼーション合成に関する知見を得ている(Tomizaki et al, Protein Peptide Lett, 2018, 48)。このように、応募者の有するDDS技術と金ナノ結晶合成技術を組み合わせることで、AuNCをミトコンドリアに集積させ、皮膚透過性の高い近赤外光照射下、発熱によるミトコンドリアの破壊とドラッグキャリアからの抗ガン剤の放出促進により、MDRガン細胞を効果的にアポトーシス誘導できるのではないかと考える。

そこで、本研究課題では、近赤外光を吸収し熱に変換する特性を有する金ナノロッド(AuNR)の表面をミトコンドリア局在性ペプチドにより被覆したコア-シェル型AuNR-ペプチド複合体の合成を行い、AuNRの細胞内への取り込みならびに近赤外光照射下にHeLa細胞に対する細胞

死活性を評価することを目的とする。

AuNR を被覆するミトコンドリア局在性ペプチドには、シクロヘキシルアラニン (Cha) と D-アルギニン (D-Arg) の交互配列 (Jean et al. Mol. Pharmaceutics 2014, 2675) をもとに、 (ChaDArg)₃-SH を設計・合成し、AuNR の表面修飾に利用した。

3 . 研究の方法

コア-シェル型 AuNR-ペプチド複合体の合成

短軸 10 nm 程度、長軸 50 nm 程度で近赤外領域 (800-1000 nm) に吸収帯をもつ AuNR を CTAB (セチルトリメチルアンモニウムブロミド) 鑄型法 (Nikoobakht et al, Chem. Mater. 2003, 1957) により合成し、得られた GNR 表面を mPEG-SH で修飾した。次いで、細胞毒性を示す CTAB を除去後、Fmoc 固相合成法により調製したミトコンドリア局在性ペプチド (ChaDArg)₃-SH で被覆し、AuNR-ペプチド複合体を得た。得られた AuNR-ペプチド複合体の構造を UV-Vis-NIR 吸収スペクトル測定、IR 吸収スペクトル測定、ゼータ電位測定、TEM 測定などにより評価した。

コア-シェル型 AuNR-ペプチド複合体の光熱変換特性評価

上記で得られたコア-シェル型 AuNR-ペプチド複合体を水に分散させ、近赤外光照射による発熱挙動をサーモカメラを通じて評価した。

コア-シェル型 AuNR-ペプチド複合体の HeLa 細胞に対する細胞毒性評価

コア-シェル型 AuNR-ペプチド複合体を HeLa 細胞に添加し、近赤外光照射下にて細胞生存率を評価した。また、対照実験として、近赤外光照射を伴わない場合の細胞毒性についても評価した。

4 . 研究成果

コア-シェル型 AuNR-ペプチド複合体の合成

まず、Fmoc 固相合成法により (ChaDArg)₃-SH を合成した。得られたペプチドは、HPLC により十分に純粋であり、MALDI-TOF-MS によって目的分子量 (計算値: 1521.96, 測定値: 1523.51) を示すことがわかった。

次いで、CTAB 法を用いて GNR の合成を行ったところ、480 nm 付近と 800 nm 付近にそれぞれ AuNR の短軸及び長軸由来のプラズモン共鳴吸収ピークが見られた。TEM 観察を行ったところ、アスペクト比 3-4 程度のロッド状の金ナノ結晶が見られた。

このようにして得られた CTAB 被覆 AuNR (AuNR-CTAB) を mPEG-SH で修飾し (AuNR-PEG)、CTAB を除去後、 (ChaDArg)₃-SH で修飾した (AuNR-peptide)、これら金ナノロッドの吸収スペクトルを測定したところ、金表面の PEG 修飾、ペプチド修飾のように段階が進むにつれて 800 nm 付近の吸収極大ピークがレッドシフトした。また、 (ChaDArg)₃-SH で修飾する際のペプチド濃度を変化させたところ、ペプチド濃度 100 μM を使用したときにゼータ電位がプラトーに達したため、これ以降のペプチド-AuNR 複合体合成には (ChaDArg)₃-SH 濃度 100 μM を使用した。

次に、ペプチド-AuNR 複合体 (AuNR-peptide) の IR スペクトルを測定したところ、PEG 修飾体 (AuNR-PEG) に比べて AuNR-peptide は、1650 cm⁻¹ 付近にアミド C=O 伸縮ピークを与えたため、金表面へのペプチド鎖の結合を確認した。最後にペプチド-AuNR 複合体 (AuNR-peptide) の TEM 測定を行ったところ、アスペクト比 3-4 程度のロッド状の金ナノ結晶が見られた。以上より、本研究において CTAB 法で合成した金ナノロッドはアスペクト比 3-4 程度であり、金表面に PEG 鎖およびペプチド鎖を有し、その表面電位は +60 mV 程度であった。

コア-シェル型 AuNR-ペプチド複合体の光熱変換特性評価

続いて、ペプチド-AuNR 複合体 ([AuNR-peptide] = 5 μg/mL) をリン酸緩衝液 PBS に分散させ、

近赤外光照射による光熱変換特性の評価を行った。808 nm レーザーを 5 W/cm^2 の密度で照射したところ、溶液の温度は 15 分間で 25 から 50 へ、約 30 の温度上昇を認めた。また、PBS のみの温度上昇分を差し引くことで金ナノロッドによる温度上昇分を算出したところ約 15 であった。

コア-シェル型 AuNR-ペプチド複合体の HeLa 細胞に対する細胞毒性評価

最後に、ペプチド-AuNR 複合体 ($[\text{AuNR-peptide}] = 5 \mu\text{g/mL}$) の HeLa 細胞に対する細胞毒性を評価したところ、近赤外光非照射下において、AuNR-peptide のみでは細胞生存率が約 80%であったが、AuNR-peptide 非存在下では、レーザー照射 (5 min) のみでは細胞生存率が約 65%であった。一方、AuNR-peptide 存在下に近赤外光を照射 (5 min) すると、細胞生存率は約 40%となり、ミトコンドリア局在性ペプチドで被覆した金ナノロッドと近赤外光照射の組み合わせによる温度上昇によって HeLa 細胞に効率よくダメージを与えたと考えられる。

以上より、本研究において、ミトコンドリア局在性ペプチドと PEG で被覆した金ナノロッドを合成し、808 nm 近赤外光照射下における光熱変換特性を評価し、HeLa 細胞への細胞毒性を評価し、ペプチドで被覆された金ナノロッド (AuNR-peptide) と近赤外光照射の組み合わせがガン細胞に効率よくダメージを与えることを見出した。今後は、HeLa 細胞内の AuNR-peptide の局在について詳細に検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ozaki, M.; Imai, T.; Tsuruoka, T.; Sakashita, S.; Tomizaki, K.-Y.; Usui, K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Elemental Composition Control of Gold-Titania Nanocomposites by Site-Specific Mineralization Using Artificial Peptides and DNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun. Chem.	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-020-00440-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomizaki, K.-Y.; Tonoda, T.; Teramura, S.; Okazaki, H.; Imai, T.; Asano, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Miniaturization of Anthracene-Containing Nonapeptides for Selective Precipitation/Recovery of Metallic Gold from Aqueous Solutions Containing Gold and Platinum Ions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Processes	6. 最初と最後の頁 2010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pr9112010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomizaki Kin-ya, Iori Tomomi, Fukushima Hideyasu, Nakabayashi Yasuhiro, Matsumoto Yoshiki, Imai Takahito	4. 巻 8
2. 論文標題 Tandem-Homodimer of a β -Sheet-Forming Short Peptide Inhibits Random-to-Structural Transition of Its Original Monomer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Processes	6. 最初と最後の頁 1421 ~ 1421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pr8111421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tomizaki Kin-ya, Okamoto Takuya, Tonoda Tatsuki, Imai Takahito, Asano Masahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Selective Gold Recovery from Homogenous Aqueous Solutions Containing Gold and Platinum Ions by Aromatic Amino Acid-Containing Peptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5060 ~ 5060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21145060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹村直記・富崎欣也
2. 発表標題 カルボキシ基を有するコラーゲンモデルペプチドの構造安定性とリン酸カルシウムの形成
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中駿・青井芳史・富崎欣也
2. 発表標題 チタン-細胞間接着強化を指向したコラーゲンモデルペプチドの合成とチタン表面修飾
3. 学会等名 日本化学会第102回春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田龍・浅野昌弘・今井崇人・富崎欣也
2. 発表標題 貴金属イオン混合溶液から金イオンを選択的に還元回収するアントラセン誘導体の合成
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村翔也・今井崇人・山崎正幸・富崎欣也
2. 発表標題 ミトコンドリア送達を指向した金ナノロッドの光熱変換能力評価
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田憲稔・今井崇人・山崎正幸・富崎欣也
2. 発表標題 核移行シグナルを修飾したペプチドを鋳型とするナノサイズのリボン型金結晶の合成と細胞内送達
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岸根克弥・今井崇人・山崎正幸・富崎欣也
2. 発表標題 ミトコンドリア局在シグナル含有ペプチドの細胞毒性評価
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤澤梨花・富崎欣也・山崎正幸
2. 発表標題 細胞内遺伝子送達を指向したDNA-ペプチド複合体の合成
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栢下昂大・富崎欣也
2. 発表標題 細胞膜透過能ならびに細胞内還元環境におけるハウ素放出機能向上を指向した核移行シグナルペプチドの合成
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹村直記・富崎欣也
2. 発表標題 カルボニル基含有コラーゲンモデルペプチドの三重鎖構造の安定性
3. 学会等名 第15回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中駿・富崎欣也
2. 発表標題 チタン-細胞間接着強化を指向したコラーゲンモデルペプチドの合成
3. 学会等名 第15回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高山 啓・山崎 正幸・富崎 欣也
2. 発表標題 ALDH由来ミトコンドリア移行シグナルを有するペプチド誘導体の二次構造と細胞内動態評価
3. 学会等名 第15回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀雅竜・富崎欣也
2. 発表標題 リン酸基および細胞認識部位を有するコラーゲンモデルペプチドの合成評価
3. 学会等名 第15回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣田翔吾・今井崇人・山崎正幸・富崎欣也
2. 発表標題 膜融合配列によるエンドソーム脱出促進を指向したペプチド性薬物キャリアの合成
3. 学会等名 第15回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村翔也・今井崇人・富崎欣也
2. 発表標題 ペプチドを表面修飾した金ナノロッドの合成
3. 学会等名 第15回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田憲稔・富崎欣也
2. 発表標題 核移行シグナル含有ペプチドを鑄型とする金ナノリボン結晶の合成
3. 学会等名 第15回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺村 駿吾・今井 崇人・浅野 昌弘・富崎 欣也
2. 発表標題 金選択的回収機能を有するアントラセン誘導体の合成
3. 学会等名 第15回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Takemura, Kin-ya Tomizaki
2. 発表標題 Structural Stability of Collagen Model Peptides Containing Carboxyl Groups
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shun Tanaka, Kin-ya Tomizaki
2. 発表標題 Synthesis of Collagen Model Peptide with Titanium and Cell Recognition Sequences
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kei Takayama, Masayuki Yamasaki, Kin-ya Tomizaki
2. 発表標題 Synthesis of Analogs of a Mitochondria Targeting Signal Peptide from Aldehyde Dehydrogenase and Effects on Cellular Uptakes
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Garyu Hori, Kin-ya Tomizaki
2. 発表標題 Synthesis of Collagen Model Peptides with a Phosphate Group and a Cell Recognition Site, and Characterization
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shogo Hirota, Takahito Imai, Masayuki Yamasaki, Kin-ya Tomizaki
2. 発表標題 Synthesis of a Peptide-Based Drug Carrier with Endosome-Disruptive Activity
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shoya Nakamura, Takahito Imai, Kin-ya Tomizaki
2. 発表標題 Synthesis of a Mitochondrial Targeting Signal Peptide and Gold Nanorods Toward Photothermal Therapy
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazutoshi Ishida, Kin-ya Tomizaki
2. 発表標題 Synthesis of Nano-Sized Ribbon-Shaped Gold Crystals Using a Peptide Containing a Nuclear Localization Signal as a Template
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shungo Teramura, Masahiro Asano, and Kin-ya Tomizaki
2. 発表標題 Selective Gold Ion Reduction with an Anthracene Derivative
3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021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
---------	---------