

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08139

研究課題名（和文）フルオラス鎖による構造安定化を利用した卵巣癌標的19F-MRIナノプローブの開発

研究課題名（英文）Development of ovarian cancer targeting probe based on the structural stabilization using fluorinated alkyl chain

研究代表者

萩森 政頼（HAGIMORI, Masayori）

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：40446125

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）：本研究では、卵巣癌の早期診断薬剤開発を目的に、フッ素基が示す高いMRIシグナルとフッ素基同士のフルオラス相互作用を基軸とするフッ素化脂質分子鎖を構築し、高標的性かつ高安全性を示す卵巣癌標的ナノキャリア型19F-MRIプローブの開発を目指した。フッ素数の異なる脂質分子を合成し、フッ素を17個有する化合物において安定な単分子膜を形成すること、内部に超音波造影ガスを封入した粒子においても安定性が向上することがわかった。卵巣癌特異的なリガンド分子を組み込んだフッ素化脂質分子鎖の開発にも成功したことから、今後、粒子を製剤化し細胞および動物実験により卵巣癌の19F-MRIプローブとしての有用性を評価する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は化学療法剤への感受性が高い癌であるが、初期の自覚症状が乏しく、有効な早期診断法は確立されていない。そこで、本研究では、卵巣癌の早期診断薬剤の開発を目指して、フッ素基による高いMRIシグナルとフッ素基同士のフルオラス相互作用による高い安定性を実現する卵巣癌標的ナノキャリア型19F-MRIプローブの開発研究を行った。研究期間内において、卵巣癌の腫瘍マーカーであるCA125を標的とする高度フッ素化脂質分子の合成に成功し、フルオラス相互作用により安定な単分子膜を形成できることが明らかとなった。今後、19F-MRIプローブとしての製剤化を行い、動物実験等により有用性を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed fluorinated lipid molecular chains with high MRI signals exhibited by fluorine groups and high stability due to fluorinated interactions between fluorine groups, and developed highly targeted and safe ovarian cancer-targeted nanocarrier-type 19F-MRI probes. We have synthesized lipid molecules with different numbers of fluorines and found that compounds including 17 fluorine atoms form stable monolayers, and that the stability is improved even in particles filled with ultrasound contrast gas inside. We have also developed fluorinated lipid molecular chains incorporating ovarian cancer-specific ligand molecules. We will formulate the particles and evaluate their efficacy as 19F-MRI probes for ovarian cancer in cell and animal studies.

研究分野：放射線科学、薬学

キーワード：MRIプローブ 19-F 卵巣癌 フルオラス相互作用 ナノキャリア

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は化学療法感受性の高い癌であるが、骨盤内に生じる癌であることから、初期の自覚症状が乏しく、約半数の患者はステージIIIまたはIVの卵巣癌が進行した状態で発見される場合も少なくない。また、現在、臨床で行われているCTやMRIによる画像診断では良性腫瘍と卵巣癌との質的診断が困難であるため、卵巣癌の確定診断は病理診断によって行われている。そのため、卵巣癌の発見が遅れ、外科的手術や抗癌剤による治療の最適な時期を逸し、転移や再発のリスクが高くなる場合がある。卵巣癌は妊娠や出産に大きな影響を及ぼすことから、卵巣癌を早期に発見し治療に繋げる新しい早期診断薬剤の開発は急務である。

特定の分子や細胞の標的化を目的に設計された機能性MRI造影剤は、癌細胞を特異的に捉えることが可能であるため、卵巣癌においても新たな早期診断薬剤として期待がされる。しかしながら、それを実現するには生体安定性の高いMRI造影剤を癌の近傍や内部に集積させ、生体内動態・分布特異性を厳密に制御することが必要である。また、MRI装置自体の技術的性能は進歩しているが、明瞭な画像を得るためには、PETやSPECT等の画像診断法に比べてはるかに高い量の造影剤が必要であり、そのため、MRI造影剤の過量投与による毒性を厳密に制御することも重要である。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、応募者は、標的指向性ナノキャリアを基盤とした機能性MRI造影剤を開発できれば、高濃度のMRI造影剤を標的である卵巣癌へ集積させることが可能になり、低毒性の卵巣癌の早期検出・質的診断に真に有効な薬剤を実現できるのではないかと考えた。目的を達成するにはナノキャリアに高い標的性が求められるが、応募者らはこれまでに癌標的性に重要なリガンド分子を有効に提示する方法として、リガンドと脂質分子を繋ぐスペーサー分子としてセリン(S)とグリシン(G)からなる非ヘリックス構造(SG)_nを用いることで達成している。しかしながら、卵巣癌を標的とした機能性MRI造影剤へと発展させるには、ナノキャリアに封入したMRI造影剤の漏出を抑えた非常に高い安定性が求められる。

そこで、応募者は、高いMRIシグナルとフルオラス相互作用により高安定性が期待できるフッ素(19F)に着目し、部分あるいは完全フッ素化した脂質分子鎖によるナノキャリアを構築し、卵巣癌の早期検出・質的診断に真に有効な標的指向性19F-MRIプローブの開発をする、という着想に至った。本研究では、卵巣癌の腫瘍マーカーであるCA125(carbohydrate antigen 125)に対する特異的リガンドを基盤とし、さらに内部をパーフルオロヘキサ(PFH) で置換したキャリア分子に基づく19F-MRIプローブを開発するにした。

3. 研究の方法

(1) フッ素化炭素鎖の最適化

フッ素化率の上昇により高いフルオラス相互作用が期待できるが、一方で、界面活性の高いフッ化炭素鎖はナノキャリアの自己組織化構造に影響を与える。そこで、分子シミュレーションを用いた精密分子設計により部分フッ素化した脂質分子の最適化を行った。

(2) フッ素化ペプチド脂質の合成

ペプチド固相合成法により、フッ素数の異なる3つの分子とフッ素を含まない分子を合成した。HPLCによる精製後、質量分析および赤外吸収スペクトルにより構造を確認した。

(3) フッ素化ペプチド脂質の物理化学的性質の検討

フッ素基による膜安定性の効果は、空気/水界面での自発的吸着についてLangmuir-Blodgett法を用いて表面圧を測定することにより確認した。また、ナノキャリア製剤化の際にDPPC(Dipalmitoylphosphatidylcholine)を用いることから、DPPC存在下における表面圧の測定も行った。

(4) ナノキャリアの製剤化

フッ素化ペプチド脂質を用いて、PFH飽和窒素気流下における粒子作製を行った。粒子サイズの継時的な変化を指標に安定性の評価を行った。

(5) CA125標的指向性フッ素化ペプチド脂質の開発

卵巣癌マーカーのCA125に親和性を有するリガンドとしてEVQSSKFPAHVS(EVQ)ペプチドを選択し、その標的指向性について、EVQ修飾リポソームを用いて評価した。その後、EVQ修飾フッ素化ペプチド脂質をペプチド固相合成法により合成した後、フッ素基による膜安定性の効果について、懸滴法(ペンダント・ドロップ法)を用いて評価した。また、PFH気流下における安定性についても評価した。

4. 研究成果

卵巣癌の腫瘍マーカーであるCA125に特異性を示す新規CA125標的フッ素化ペプチド脂質の開発を行うにあたり、まず、高度にフッ素化されたフッ化炭素鎖によって生じるフルオラス

相互作用によって実際にナノキャリアの脂質膜の安定性が向上するか検討を行った。フッ素基の数としては 13 個、15 個、17 個のフッ素化炭素を選択し、CA125 標的リガンドのスペーサー分子としては、(SG)₅ を用いたフッ素化ペプチド脂質 1-3 を設計した (図 1)。合成は、反応の安全性が高い Fmoc 固相合成法を用い、図 2 に示すスキームにより行った。樹脂からフッ素化ペプチド脂質を切り出し後、粗結晶を透析および HPLC による精製を行い、高純度の 1-3 の合成に成功した。また、フッ素を含まないペプチド脂質 4 についても同様に Fmoc 固相合成法により合成した。合成した 1-3 および 4 の構造については、質量分析および FTIR により確認した。FTIR においては、導入したフッ素の数が増えるにしたがって、1200 cm⁻¹ 付近に C-F 伸縮に由来する強い吸収が見られた。

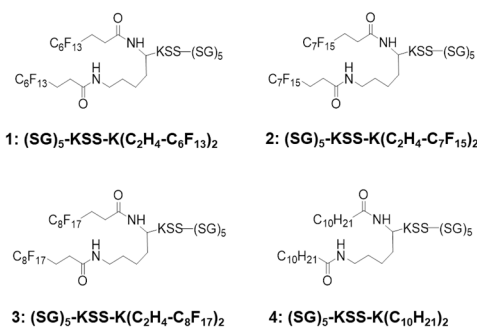


図1. Chemical structures of fluorinated amphiphilic lipids (1-3) and non-fluorinated amphiphilic lipid (4)

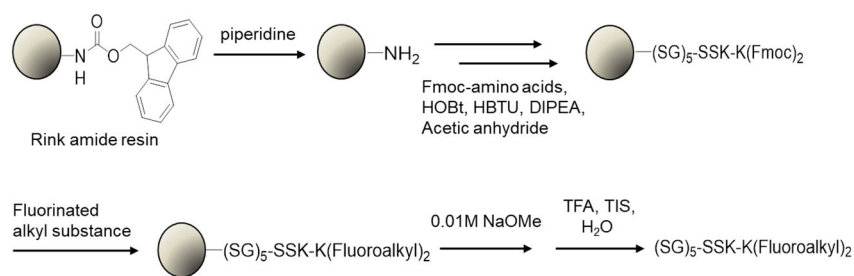


図2. Solid-phase synthesis of fluorinated amphiphilic lipids (1-3) and non-fluorinated amphiphilic lipid (4)

フッ素基の導入による膜安定性の効果は、Langmuir-Blodgett 法を用いて表面圧 を測定することにより空気 / 水界面における吸着速度論的解析を行ったところ、ペプチド脂質のフッ素含量が多くなるにつれて表面圧 が増大し、フッ素基を 17 個含有するフッ素化ペプチド脂質 3 において、より安定な単分子膜を形成できることがわかった (図 3)。そこで、次に、リポソームやマイクロバブルの構成成分として使用されている DPPC 存在下における、表面圧 の変化を評価することにした。方法は、pH7.4 の HEPES 緩衝液において DPPC 単分子膜の液体膨張膜 (LE 膜) と液体凝集膜 (LC 膜) のそれぞれの膜を形成後、下層水にフッ素化ペプチド脂質 1-3 を加えて、継時的に表面圧 を測定した (図 4)。その結果、DPPC の LE 膜 (5 mN m⁻¹) では、フッ素を含む 1-3 により大きな表面圧 の上昇が見られ、DPPC 単分子膜にフッ素化ペプチド脂質が挿入されることにより、安定な膜が形成されていることがわかった。フッ素を持たないペプチド脂質 4 では、表面圧 の上昇はみられず、DPPC 膜に吸着されないことが示された。一方、LC 膜 (19 mN m⁻¹) においても、フッ素を含む 1-3 により表面圧 の上昇が見られたことから、ここでも DPPC 膜にフッ素化ペプチド脂質が挿入されていることが明らかとなった。表面圧 の上昇度については、LE 膜および LC 膜の両相において、フッ素の数に依存し、最も多くのフッ素をもつフッ素化ペプチド脂質 3 において大きな上昇がみられた。以上のようにフッ素基の導入により膜の安定化が期待できることから、粒子の作製を行った。HEPES 緩衝液中で DPPC と DPPE-PEG2000 が 9:1 (モル比) となるように調製後、フッ素化ペプチド脂質を添加し、PFH で飽和した窒素気流下において攪拌したところ、フッ素を含まない 4 を用いた粒子のサイズが約 4 μm だったのに対し、フッ素化ペプチド脂質 1-3 を用いた粒子のサイズは約 2 μm となり大きなサイズダウンが見られた。また、粒子の安定性を評価したところ、4 からなる粒子の半減期が約 15 分であるのに対し、フッ素化ペプチド脂質 3 では半減期が 1 時間以上を示し高い安定性を有することが明らかとなった。

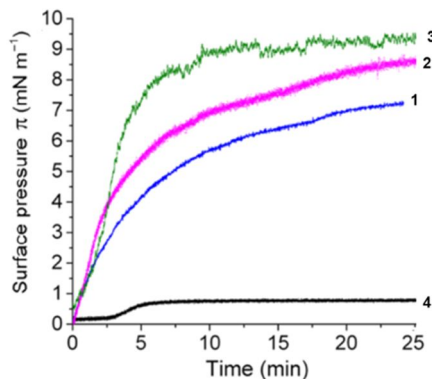


図3. Adsorption kinetics of 1-4 at the air/water interface

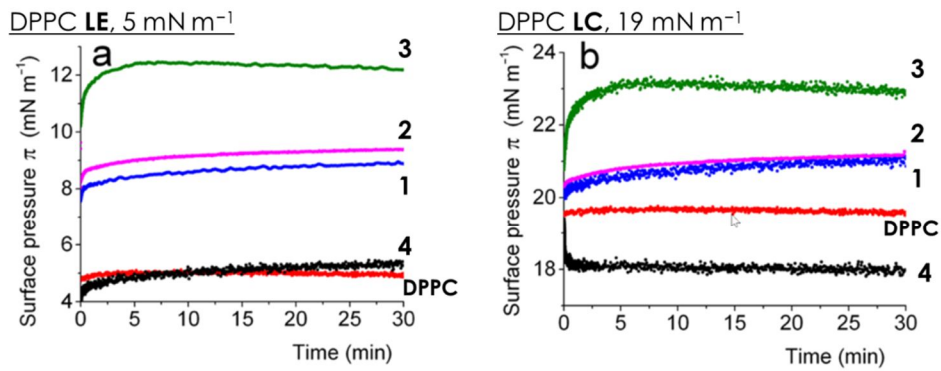


図3. Adsorption of 1-4 on DPPC monolayers spread at the air/water interface

以上の結果を基に CA125 標的指向性フッ素化ペプチド脂質の開発を行うこととした。CA125 は膜結合性の糖タンパク質であり、腫瘍の形成や転移に関与することが報告されている。卵巣癌においても高発現していることが期待されるため、CA125 標的性が期待される EVQ ペプチドを選択した。Fmoc 固相合成により EVQ を含むペプチド脂質の合成を行い、蛍光物質としてローダミンを含む EVQ 修飾 PEG リポソームを作製した。EVQ の CA125 結合性を評価するために、CA125 を発現している 4T1 細胞を用いて、EVQ 修飾 PEG リポソームの細胞結合性を検証した。その結果、CA125 の発現がない NIH-3T3 細胞に比べて顕著な蛍光の上昇が見られた。また、EVQ の CA125 への結合に関わる QSSKFP 配列をスクランブル配列とした scr- EVQ 修飾 PEG リポソームにおいても同様に検討を行ったところ、EVQ 修飾 PEG リポソームと比較して有意な細胞結合性の低下が確認された (図 4)。そこで、フッ素を 13 または 17 個持つ EVQ 修飾 フッ素化ペプチドを Fmoc 固相合成により合成し、ペンダント・ドロップ法による膜安定性の検証を行った。その結果、CA125 に対するリガンドを持ったフッ素化ペプチドにおいては、顕著な表面張力の低下が見られたことから、フッ素基同士のフルオラス相互作用により膜安定性の効果が見られた。PFH 気流下では、さらに大きな膜安定性が見られたことから、EVQ 修飾 フッ素化ペプチドのフッ素基と PFH のフッ素が相互作用し膜の膜が安定化することが明らかとなった (図 5)。

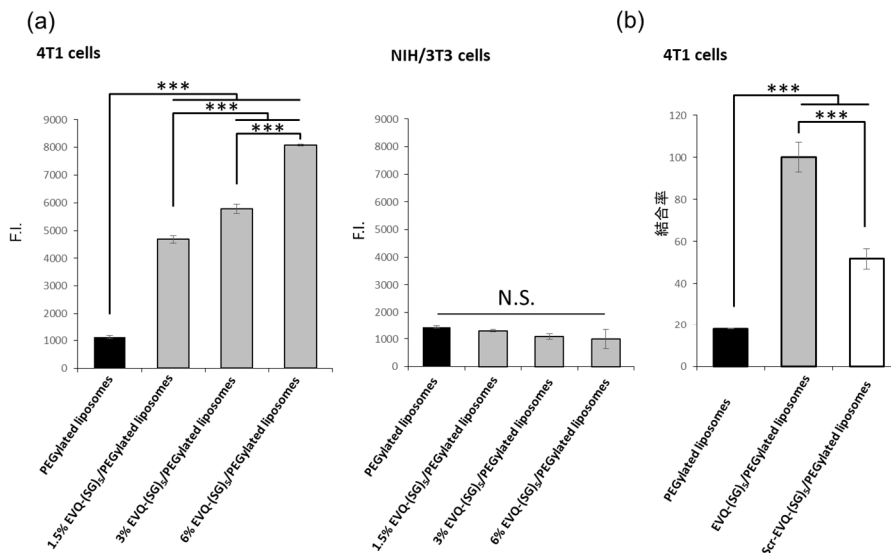


図4. (a) Cellular association experiments in 4T1 (CA125 positive) and NIH/3T3 (CA125 negative). (b) Binding selectivity of peptide sequence. The values are displayed as the fold change compared with PEGylated liposomes. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

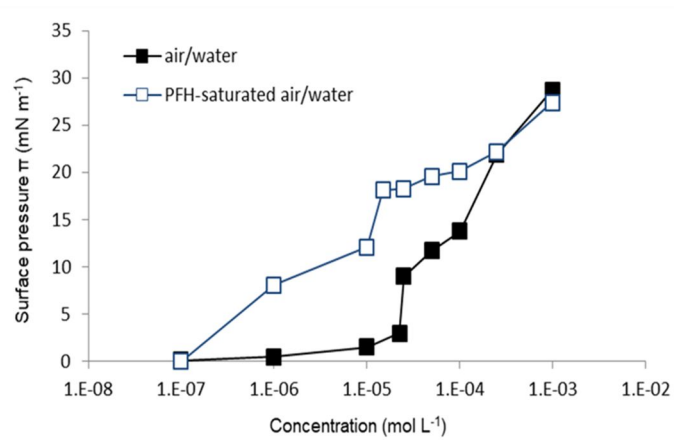


図5. Variation of surface pressure π at 25°C of 3 under air (■) and PFH saturated air (□).

以上、本研究では、卵巣癌の早期検出・質的診断に真に有効な標的指向性 19F-MRI プローブの開発を目的に、高い MRI シグナルとフルオラス相互作用により高安定性が期待できる EVQ 修飾フッ素化ペプチドの開発に成功した。今後、本化合物を用いて粒子を製剤化し、細胞および動物実験により卵巣癌の標的指向性 19F-MRI プローブとしての有用性を評価する予定である。

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 1件）

1. 著者名 Masayori Hagimori, Fumiko Hara, Naoko Mizuyama, Takeshi Fujino, Hideo Saji, Takahiro Mukai	4. 巻 27
2. 論文標題 High-Affinity Ratiometric Fluorescence Probe Based on 6-Amino-2,2'-Bipyridine Scaffold for Endogenous Zn ²⁺ and Its Application to Living Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27041287	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 Hagimori Masayori, Kato Naoya, Orimoto Akira, Suga Tadaharu, Kawakami Shigeru	4. 巻 112
2. 論文標題 Development of Triple-Negative Breast Cancer-Targeted Liposomes with MUC16 Binding Peptide Ligand in Triple-Negative Breast Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 1740-1745
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2023.02.025	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 萩森政頼、原史子、Estefania E. Mendoza-Ortega, Marie Pierre Krafft
2. 発表標題 標的指向性マイクロバブルのためのフッ素化ペプチド脂質の合成と評価
3. 学会等名 日本油化学会第60回年会
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
研究協力者	漢字表記なし 漢字表記なし (KRAFFT Marie Pierre)	ストラスブール大学・シャルル・サドロン研究所・Research Director	

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