討論会の話題から

第 64 回放射線化学討論会 創薬応用を目指した放射線架橋ペプチド粒子の開発: 放射線化学反応の解析

群馬大学 東京大学

量子科学技術研究開発機構

上野 美穂, 新井 唯史 Hao Yu, 山下 真一 木村 敦*, 田口 光正

1 はじめに

最新の医療ではさまざまな腫瘍の診断・治療法が存在する。がん診断にはMRI、CTおよびPET造影剤などが、治療には抗がん剤、分子標的薬、ホルモン剤などが用いられてきたが、その副作用が問題となる場合が多い。そのため、薬剤を腫瘍に選択的に送達するナノ薬物送達システムの必要性が認識されており、診断と治療を一体化した高度な医療技術を目指すナノセラノスティクスなどの研究開発が進められている。

低い薬剤投与量でがんに対する治療効果を向上させるには、薬剤をがん組織により多く集積させることが重要となる。そのために、ナノメートルオーダーの粒子ががん組織に集積しやすい性質を利用した診断薬や治療薬の開発が進められている。He ら¹)の研究では、100 nm 程度の粒子が腫瘍細胞に効果的に集積することが報告されている。また、Asati ら²) は正および中性の粒子に比べ、負電荷をもつ粒子は腫瘍組織への集積性が高いことを報告している。

薬物輸送に用いられる材料には、リポソームや合成 高分子(ヒドロキシプロピルセルロース、ポリ乳酸)、 天然高分子(タンパク質、多糖、核酸、ペプチド)など

Development of Radiation Crosslinked Peptide Nanoparticles for Drug Delivery Application: Analysis of Radiation Chemical Reactions

Miho Ueno and Tadashi Arai (*Gunma University*), Hao Yu and Shinichi Yamashita (*The University of Tokyo*), Atsushi Kimura* and Mitsumasa Taguchi (*National Institutes for Quantum Science and Technology*),

〒370-1292 群馬県高崎市綿貫町 1233

TEL: 027-346-9208, E-mail: kimura.atsushi@qst.go.jp

がある。その中でも、ペプチドは生体適合性が高く、アミノ酸残基の組成により粒径および表面電位の制御が可能であるため、ナノ粒子の母材として注目されている

本研究では、放射線架橋に寄与するアミノ酸を主成分としたペプチドを分子設計して有機合成し、パルスラジオリシス法による反応性解析を行った。また、放射線照射によりナノ粒子を作製し、照射条件により粒径を制御した。さらに、ナノ粒子に蛍光色素を担持したのち細胞集積試験を行うことで、放射線架橋ペプチドナノ粒子を用いた新たな薬物送達システムの開発を目指した。

2 ペプチドの分子設計

タンパク質の一種であるゼラチンを用いた報告では、放射線架橋で作製したハイドロゲルを酸加水分解した後に生成物分析を行っており、架橋に関与するアミノ酸はフェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、ヒスチジン(H)の三種であることがわかっている³⁾。そこで、F、Y、Hおよびゼラチンの主成分であるグリシン(G)を含む5種のペプチドFGGGG、FGGGF、FGFGF、YGYGY、HGHGHを固相合成法により合成した。ペプチドの残基数は、ペプチドの機能を発現するといわれている最小単位である5残基⁴⁾に決定した。

これらのペプチドのうち F と G からなる 3 種 (FGGGG, FGGGF, FGFGF) については 0.1 wt% 水溶液を準備し、室温にて 2.5 kGy (5 kGy/h) の線量で γ 線照射し (量研高崎 60 Co)、その後、溶質の質量分析を行った。 FGGGG はモノマーのピーク (m/z=394) のみが検出され、多量体化反応は観測されなかった。

FGGGFではモノマー(m/z=484)と二量体のピーク(m/z=967)が観測された。さらに、FGFGFではモノマー(m/z=573)と、二量体(m/z=1147)および三量体のピーク(m/z=1721)が観測された。すなわち、ペプチドにおける Fの増加にともない、多量体化反応が促進されることを明らかにした。

3 合成ペプチドの反応速度論的解析

ペプチド FGFGF, YGYGY, HGHGH と水由来の水 酸化(OH)ラジカルとの反応速度定数を競争反応法に より評価した. パルスラジオリシス実験は東大, 原子 力専攻の電子線形加速器施設 LINAC で実施した.電 子線パルス (加速エネルギー35 MeV, パルス幅10 ns, 線量4Gy/パルス)を各種ペプチドとチオシアン酸カ リウム KSCN の混合水溶液に照射し、(SCN)っつの生成 量の変化を観測した。電子線パルス照射直後の各種ペ プチドおよび KSCN 混合水溶液の 500 nm における吸 光度は、添加したペプチド濃度の増加にともない、減 少した (Fig. 1). このタイムプロファイルより, 各種 ペプチドと OH ラジカルとの反応速度定数を kegege = $8.8 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{YGYGY} = 1.5 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{HGHGH}} = 4.2 \times 10^9 \,\text{L mol}^{-1} \,\text{s}^{-1} \,$ と求めた。これは、既報 の各アミノ酸の反応速度定数 $(F:7.2\times10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$ $Y: 1.0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}, H: 4.3 \times 10^{9} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})^{-5}$ と同程度か、より大きい値となった。この理由として、 ペプチドはアミノ酸単体と比べて OH ラジカルとの反 応部位が多く、側鎖の芳香環が立体障害の影響を受け

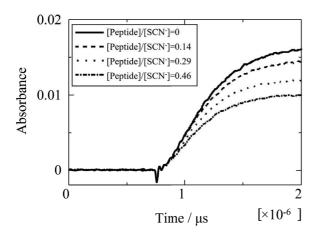


Figure 1. Time profile of absorbance at 500 nm of mixed aqueous solution of YGYGY and KSCN by pulsed electron irradiation.

ていないため反応性が上がったと考えられる.

Galano ら⁶ は、密度汎関数法による遷移状態の構造分析により、遊離アミノ酸は OH 付加体の生成が主であるのに対し、ペプチドでは OH ラジカルによる水素引抜反応が主であることを示し、水溶液中における OH ラジカルとの反応性は、遊離アミノ酸に比べてペプチドがより高くなると報告している。

4 放射線架橋によるペプチドナノ粒子の作製

ペプチド FGFGF、YGYGY、HGHGH の 0.1 wt% 水溶液に 5 kGy-10 kGy(5 kGy/h)の線量で γ 線照射(量研高崎 60 Co)することで、ナノ粒子の作製に成功した.粒径範囲は、それぞれ 134 nm-160 nm,149 nm-270 nm,58 nm-64 nm であり、平均粒径は HGHGH <FGFGF < YGYGY の順に大きくなった(Fig. 2).各種アミノ酸と OH ラジカルの反応速度定数も HGHGH < FGFGF < YGYGY の順に大きくなることから、ペプチドに含まれる芳香族アミノ酸残基の反応性が、粒子の粒径に影響を及ぼすことが示唆された.

5 粒子の蛍光染色と細胞培養試験

さらに、ナノ粒子に蛍光極大波長 555 nm を有する 蛍光色素(NH_2 -Reactive HyLite Fluor 555)を用いて標 識を行った。蛍光染色前後の表面電位を電気泳動動的 光散乱法で測定したところ、ペプチドナノ粒子の Zeta 電位は正に偏っていたが、蛍光標識後は-10 mV 程度 の電荷を持っていることが確認された(Fig. 3).

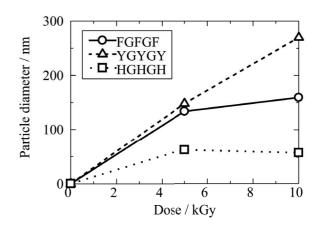


Figure 2. Dose dependence of particle diameters of FGFGF, YGYGY, HGHGH aqueous solutions irradiated with 60 Co γ -rays.

72 放射線化学

γ線を 5 kGy 照射して作製した FGFGF (134 nm), YGYGY (149 nm), HGHGH (58 nm) 粒子をヒト子宮 頸がん由来の HeLa 細胞へ取り込み, その様子を蛍光

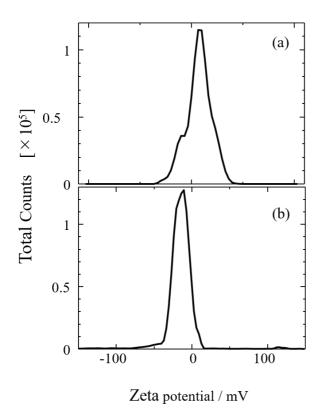


Figure 3. Zeta potential of YGYGY nanoparticles produced by ⁶⁰Co γ-rays before and after fluorescent staining. (a) YGYGY nanoparticles (b) Fluorescent labeling YGYGY nanoparticles.

顕微鏡観察した (Fig. 4). 細胞断面 (YZ面)の観察により、赤で示したナノ粒子が細胞表面ではなく細胞内部まで取り込まれていることが確認できた。各ペプチド粒子の蛍光染色後の電位に大きな差は見られなかった。したがって、粒子の細胞集積性は粒径に依存していると考えられる。粒子は負電荷を有しているため、Heら¹⁾の示しているように、まず細胞表面に接着した後、小胞体経由で細胞内に取り込まれたものと考えられる。

今後は、アミノ酸の組成を変えたペプチドを合成することで、粒径、電荷、疎水性を制御したペプチド粒子を作製することも可能である。さらに、キレーターをアミノ基に結合することができるため、ガドリニウムを担持した MRI 造影剤⁷⁾ やホウ素を担持した BNCT薬剤、放射性同位体を担持した PET 薬剤等への応用が期待される。

6 まとめ

放射線架橋技術により、創薬応用可能なペプチドナノ粒子の開発を目指した。タンパク質の放射線架橋反応メカニズムに基づき、架橋構造を形成するアミノ酸を組み込んだペプチドを設計・合成し、放射線架橋法により、粒径範囲 58 nm-405 nm、負電荷をもち、細胞集積性をもつペプチドナノ粒子を開発した。ペプチドナノ粒子は新たな薬物送達システムへの応用の可能性を示し、がんの診断や治療など将来の医療分野での応用が可能な新規ペプチドナノ粒子プラットフォームの可能性と放射線架橋の有効性を示すことができた。

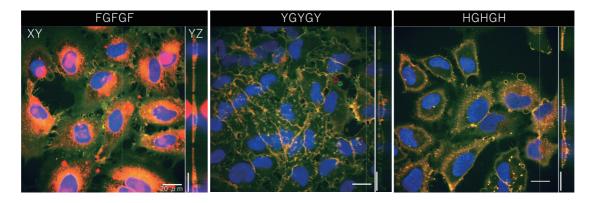


Figure 4. Confocal image of red fluorescent FGFGF, YGYGY, HGHGH nanoparticles in HeLa cells. Blue: nuclei, yellow: cell membranes, and red: nanoparticles solutions irradiated with 60 Co γ -rays.

第 113 号 (2022) 73

〈謝 辞〉

本研究は東京大学原子力専攻の共同利用の一環として実施した。本研究は JSPS 科研費 20K20915,公益財団 中谷医工計測技術振興財団の支援を受けて行った。

〈参考文献〉

- 1) C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Biomaterials 31 (2010) 3657.
- 2) A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, J.M. Perez, Nanoparticles, 4 (2010) 5321.

- 3) A. Kimura, F. Yoshida, M. Ueno, M. Taguchi, Radiat. Phys. Chem., 180 (2021) 109287.
- 4) C. Kaga, M. Okochi, Y. Tomita, R. Kato, H. Honda, BioTechniques, 44 (2018) 3.
- T. Masuda, S. Nakano, M. Kondo, Radiat. Res., 14 (1973) 339.
- 6) A. Galano, A. C. Torresb, Org. Biomol. Chem., 6 (2008) 732.
- 7) A. Kimura, J. Jo, F. Yoshida, Z. Hong, Y. Tabata, A. Sumiyoshi, M. Taguchi, I. Aoki, Acta Biomater., 125 (2021) 290.

74 放射線化学