

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19824

研究課題名(和文)新規64Cu標識ソマトスタチン誘導体を基盤とした次世代NET診断/治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of NET theranostic agents based on novel 64Cu-labeled somatostatin derivatives

研究代表者

藤澤 豊 (Fujisawa, Yutaka)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号：30511993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経内分泌腫瘍(NET)の診断や治療において、放射性核種標識somatostatin (SST)誘導体の利用が有益とされている。本研究では、診断～治療を同一化合物で行うことが出来る薬剤開発を目標とし、新規Cu-64標識SST誘導体を設計・合成した。これをAR42J細胞移植マウスに投与し経時的にPET撮像をした結果、腫瘍を明瞭に描写することができた。また、投与長時間後においても、対照化合物と比較して腫瘍に対し高い集積を示した。これらの結果は、新規化合物がNET診断薬剤として有益であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Radiolabeled somatostatin (SST) analogues are useful for diagnosis and therapy of neuroendocrine tumor (NET). The aim of this study is to develop a novel theranostic agent which enables to perform both diagnosis and therapy of NET, we designed and synthesized novel Cu-64-labeled SST analogues. Administration of them in the model mice implanted AR42J cells before acquiring time-dependent PET images contributed to obtain clear tumor images. In addition, higher accumulation of Cu-64 over a prolonged period to AR42J tumor were observed in mice administrated a novel radiolabeled SST than in mice administrated a reference SST analogue. These results suggest the usability of Cu-64-labeled SST analogue as a novel agent for NET diagnosis.

研究分野：創薬錯体化学

キーワード：神経内分泌腫瘍 ソマトスタチン誘導体 64Cuキレーター ATSM誘導体 診断/治療薬開発

1. 研究開始当初の背景

神経内分泌腫瘍(NET)は、日本国内で全悪性腫瘍の数%程度と極めて稀な腫瘍ではあるものの、その罹患率は年々増加傾向にある。NETは、2010年WHOの分類においてKi 67指数によってNET G1, NET G2, NECの3種に大別され、このうち細胞分化能の高いNET G1では¹⁸F-FDGが低集積な場合が多く、¹⁸F-FDGを用いた診断は有益でないといわれている。一方で、NETはsomatostatin receptor (SSTR) 2を高発現していることが多く、¹⁸F-FDGが低集積なNET G1においてもsomatostatin (SST)誘導体を利用した診断の有益性が認知されてきている。近年、欧州ではNETのこの性質を利用して、SSTR2に対し強力な結合活性を有するSST誘導体(octreotideやoctreotateなどのペプチド)の放射性核種標識体を用いた診断およびペプチド受容体放射性核種療法(PRRT)が標準的に行われている。しかしながら、日本では現在PRRTが未承認のため、海外での治療を余儀なくされるケースも多く、欧州に比べ大きく遅れをとっている。

また、欧州では診断とPRRTで異なる放射性核種を含む薬剤が使用されているが、治療効果を正確に予測するためには、診断~治療までを同一化合物で行うことが望ましく、これを可能にする次世代薬剤の開発が期待される。

2. 研究の目的

⁶⁴Cuは、β⁺線およびβ線を出す核種で、診断および治療に利用可能な核種として知られており、これはNETの診断/治療に用いる次世代薬剤にも十分に应用可能である。本研究では、SSTR2に対して高い選択的親和性を示し、かつ細胞内への導入効率の高いSST誘導体を母核構造とし、そのN末端に⁶⁴Cuを結合できる機能性chelatorを導入した化合物を新規に設計・合成した。また、新規化合物の*in vitro*における物理学的・生物学的性質の評価、およびNETモデルマウスにおける*in vivo*評価を行い、新規化合物のNET診断薬としての有用性を評価した。

3. 研究の方法

(1) 機能性 Cu chelator の設計および合成

低酸素下(還元的環境下)においてCuを分子から放出することが知られているCu

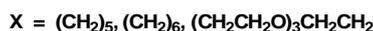
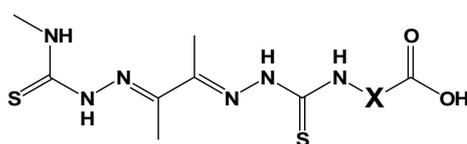
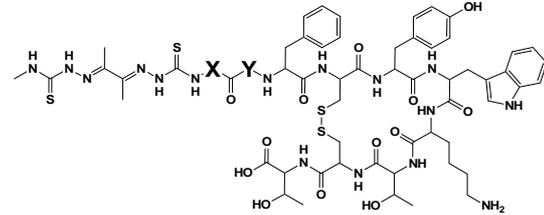


図 1: Cu chelator の構造

chelator: ATSM (diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone)に、ペプチドとの縮合部位を導入した3種のCu chelator (図1)を合成した。

(2) Cu chelator 導入ペプチドの合成

SSTR2 高親和性 / 高選択性分子として、Tyr³-octreotate (TATE: H₂N-DPhe-c[Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys]-Thr-OH)]を選択し、本研究における新規化合物の母核ペプチドとし、そのN末端にCu chelatorを導入することとした。また、物性の異なる化合物を設計・合成することを目的としてCu chelatorと母核ペプチドの間に、水溶性アミノ酸の導入を行った。まず、2-Cl-Trt resin上に保護ペプチドを構築した後、ペプチドN末端に合成した3種のCu chelatorを導入した。直鎖保護ペプチドは、樹脂からの切り出し、保護基除去を順次行った。脱保護したペプチドは、DMF中でジスルフィド結合を形成させた。得られた化合物はRP-HPLCにて精製後、凍結乾燥して、以下4種類の新規SST誘導体(図2)を得た。



	1	2	3	4
X	(CH ₂) ₅	(CH ₂) ₆	(CH ₂) ₆	(CH ₂ CH ₂ O) ₃ -CH ₂ CH ₂
Y	-	-	(DAsp) ₃	-

図 2: 新規 SST 誘導体の構造

(3) 非放射性銅(^{nat}Cu)複合体の*in vitro*物性評価

50% MeCN中で新規SST誘導体に非放射性銅^{nat}Cuを1:1のモル比で加え、microwave reactorを用いて反応し^{nat}Cu複合体へと誘導した。得られた^{nat}Cu複合体は、タンデム質量分析計を用いてキレーター部位に^{nat}Cuが導入されていることを確認した。合成した各種^{nat}Cu複合体を1-octanolおよびPBS (pH 7.4)で分配し、各相に含まれる^{nat}Cu複合体濃度を定量することでlogD_{7.4}値を求め脂溶性を評価した。次に、^{nat}Cu複合体を曝露したマウス血清を超速心しタンパク非結合型画分を単離した後、曝露全濃度および非結合型画分に含まれる^{nat}Cu複合体をそれぞれ定量することで、マウス血清に対するタンパク結合率(PB%)を算出した。

さらに、^{nat}Cu複合体をマウス血清中、あるいはCu chelatorであるpenicillamine (Pen)共存マウス血清中に曝露後、37℃でインキュベートし、経時的に血清中残存量を定量することで、複合体の血清中安定性および配位子交換反応に対する安定性を評価した。また、

^{nat}Cu 複合体を glutathione (GSH) 溶液中に曝露後、同様に残存量を定量し還元環境下における複合体の安定性を評価した。なお、これらの物性評価における比較対象として、欧州で PRRT に利用されている SST 誘導体 DOTATATE を用い、また、これら ^{nat}Cu 複合体の定量分析には LC-MS/MS を用いた。

(4) ^{nat}Cu 複合体の各種 SSTR に対する結合親和性評価

本研究にて母核ペプチドとして用いた TATE は SSTR2 に対して高親和性かつ高選択性を有する分子として知られているが、N 末端側への様々な分子導入により、それらの特性に変化を及ぼす可能性がある。そこで、SSTR2 を含む SSTR 関連サブタイプ SSTR3 および SSTR5 に対する結合親和性を評価した。各種 SSTR に対して、¹²⁵I]-Tyr¹¹-somatostatin をトレーサーに用いた競合実験法によって、トレーサーの SSTR に対する結合を 50% 阻害する ^{nat}Cu 複合体濃度を IC₅₀ 値として算出することで、結合親和性を評価した。

(5) ⁶⁴Cu 標識実験および NET モデルマウスを用いた *in vivo* 評価

上記の *in vitro* 評価結果を総合的に考慮し、新規化合物の代表として化合物 4 を選定した。また、その対象に DOTATATE を使用して、以下の実験を行った。

まず、DOTATATE あるいは化合物 4 の MeCN 溶液に ⁶⁴Cu を溶解した酢酸緩衝液(pH 5.5)を添加後、microwave reactor を用いて反応し ⁶⁴Cu 標識 SST 誘導体(⁶⁴Cu-DOTATATE あるいは ⁶⁴Cu-化合物 4)へと誘導した。標識反応後、radio-HPLC にて標識率を確認した。反応溶媒を濃縮除去後、極少量の MeOH に再溶解した後、十分量の生理食塩水を加えて投与溶液とした。ラット膵臓外分泌腺癌(AR42J)細胞を 6 週齢の雄ヌードマウス(BALB-c/nu-nu)の右側腹部に移植後、3 週間腫瘍の成長を待ち NET モデルマウスを作成した。2 種の ⁶⁴Cu 標識 SST 誘導体を NET モデルマウスの尾静脈より投与し、投与後 1, 20, 40 時間後に屠殺して、臓器摘出法により経時的な ⁶⁴Cu 体内分布を評価した。また、同時系列で PET 撮像実験を行った。これらにより、⁶⁴Cu-化合物 4 (新規 SST 誘導体)の新規 NET 診断薬剤としての有用性を評価した。

4. 研究成果

(1) ペプチドとの縮合部位を有する 3 種の Cu chelator (図 1)は、Paterson らの方法[Inorg. Chem. 2010]をもとに合成し、各種 NMR 測定 (¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, ¹H-COSY, HSQC, HMBC)、および精密質量分析により設計分子が合成出来ていることを確認した。

(2) Cu chelator を導入した新規 SST 誘導体は、高分解能タンデム質量分析計を用いて質量分析を行い表 1 の結果を得、目的化合物であ

ることを確認した。

表 1: 新規 SST 誘導体の質量分析結果

	理論値 (m/z)*	実測値 (m/z)*	誤差 (ppm)
1	696.2794	696.2825	3.2
2	703.2873	703.2890	2.5
3	875.8277	875.8287	1.1
4	741.2953	741.2979	3.6

*観測された m/z のうち、対応する[M + 2H]²⁺を示す。

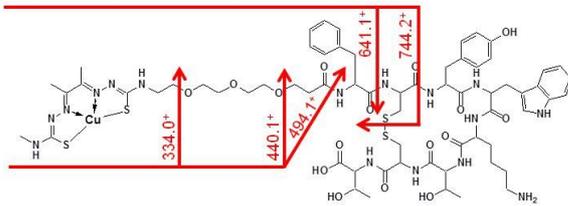
(3) 合成した非放射性銅(^{nat}Cu)複合体は、高分解能タンデム質量分析計を用いて質量分析を行い、得られた表 2 の結果より新規 SST 誘導体が容易に ^{nat}Cu と 1:1 錯体を形成することを確認した。また、これらの ^{nat}Cu 複合体は、タンデム質量分析計の衝突誘起解離により、図 3 に示す Cu を含む product ion (化合物 4 を代表例として示し、赤線は衝突誘起解離による開裂部位を示す)が検出されたことから、キレーター部位に ^{nat}Cu が導入された構造であることを確認した。次に、合成した ^{nat}Cu 複合体の logD_{7.4} 値および PB% は表 3 に示す結果が得られ、^{nat}Cu-DOTATATE と比べると高脂溶性であり、また高いタンパク結合率を有する化合物であることを確認した。また、表 4 に示すように、これら ^{nat}Cu 複合体は、50 μM の penicillamine (Pen) 共存下マウス血清中において曝露後 4 時間においても残存率 90%以上を示し、配位子交換反応の起こりやすい環境下においても安定な化合物であることを確認した。一方、5 mM GSH 溶液中(細胞内濃度と同等)においては、曝露後 4 時間でその残存率が 85%以下にまで有意に低下した。さらに、経時的に ^{nat}Cu 解離体が増加することを LC-MS/MS 分析にて確認できたことから、還元環境下において徐々に ^{nat}Cu を放出する性質を持つことが示された。すなわち、これらの結果は新規 SST 誘導体の Cu 錯体が血中においては比較的安定であり、且つ DOTA をキレーターとする場合と比べ、細胞内において効率良く Cu を放出できることを示している。

表 2: ^{nat}Cu 複合体の質量分析結果

	理論値 (m/z)*	実測値 (m/z)*	誤差 (ppm)
1	726.7364	726.7375	1.5
2	733.7442	733.7432	1.4
3	906.2846	906.2825	2.4
4	771.7523	771.7551	3.7

*観測された m/z のうち、対応する[M + 2H]²⁺を示す。

(4) 合成した ^{nat}Cu 複合体の SSTR2, SSTR3 および SSTR5 に対する結合親和性について、表 5 に示す結果を得た。化合物 3 を除いて SSTR2 に対する結合親和性は対象に用いた ^{nat}Cu-DOTATATE とほぼ同程度の値を示した。化合物 3 における SSTR2 への結合親和性の低



Precursor ion: $m/z = 771.8 [M+H]^{2+}$
 Product ions: $m/z = 334.0^+$, 440.1^+ , 494.1^+ , 641.1^+ , 744.2^+ .
 Isolation width: 5 Da
 Collision energy: 37 V

図 3: 化合物 4 の ^{nat}Cu 複合体構造

表 3: ^{nat}Cu 複合体の $\log D_{7.4}$ 値および PB (%)

	$\log D_{7.4}$	PB (%)
^{nat}Cu -DOTA-TATE	< -3.0	27.72 ± 4.61
1	0.92 ± 0.10	98.90 ± 0.09
2	1.40 ± 0.11	99.29 ± 0.04
3	-2.56 ± 0.18	97.34 ± 0.17
4	0.41 ± 0.05	97.49 ± 0.11

表中の数値は、Mean ± S.D.を示す。

表 4: ^{nat}Cu 複合体曝露 4 時間後の残存率 (%)

	Mouse serum + pen 溶液	GSH 溶液
^{nat}Cu -DOTA-TATE	98	97
1	94	78
2	90	82
3	97	74
4	96	70

表 5: somatostatin receptor に対する結合親和性

	SSTR2	SSTR3	SSTR5
^{nat}Cu -DOTA-TATE	0.452	1060	269
1	0.467	559	40.6
2	0.931	2090	101
3	10.9	9060	863
4	1.79	372	31.5

表中の数値は、 IC_{50} 値(nM)を示す。

下は、化合物の水溶性向上の目的で導入した 3 残基の D_{Asp} が受容体との反発を生んだことに起因すると推察される。また、いずれの化合物も SSTR2 に対する結合親和性に比べ、SSTR3 または SSTR5 に対する結合親和性は有意に小さく、SSTR2 結合選択性の高い化合物群であることが確認できた。

(5) 化合物 4 (42.2 nmol)を MeCN に溶解し、そこに 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5)に溶解した ^{64}Cu 46.5 MBq を加え microwave reactor を用いて反応した。反応後、radio-HPLC にて標識率 90%以上の ^{64}Cu 標識体が得られたことを確認した。 ^{64}Cu 標識体投与時の NET モデルマウスにおける経時的な ^{64}Cu 体内分布を

評価したところ、表 5 および表 6 に示した結果を得た。

表 5: ^{64}Cu -化合物 4 の経時的体内分布

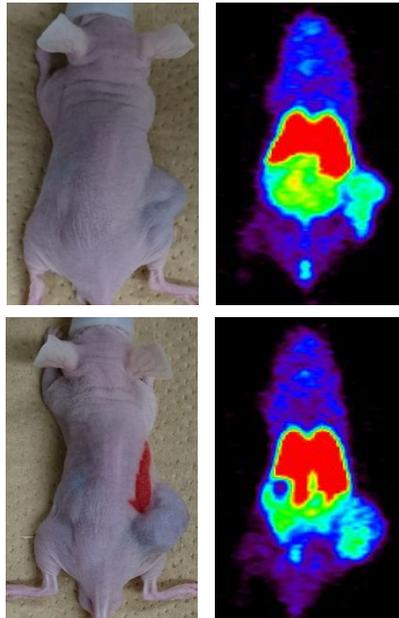
	20 時間	40 時間
Tumor	3.10 ± 0.51	3.66 ± 0.30
Blood	2.16 ± 0.18	1.91 ± 0.64
Liver	18.92 ± 0.81	19.05 ± 2.17
Kidney	7.20 ± 0.67	6.95 ± 0.43
Intestine	6.51 ± 1.73	4.06 ± 0.38
Pancreas	2.72 ± 0.18	2.35 ± 0.11
Muscle	1.29 ± 0.67	1.03 ± 0.18
Tumor/Blood	1.43	1.92

表中の数値は、%dose/g を示し Mean ± S.D.として記す。

表 6: ^{64}Cu -DOTATATE の経時的体内分布

	20 時間	40 時間
Tumor	1.63 ± 0.25	2.47 ± 0.51
Blood	1.25 ± 0.35	1.74 ± 0.14
Liver	10.89 ± 0.72	15.29 ± 5.11
Kidney	4.47 ± 0.48	5.72 ± 1.10
Intestine	2.93 ± 0.49	4.16 ± 1.77
Pancreas	1.20 ± 0.12	1.47 ± 0.31
Muscle	0.41 ± 0.07	0.59 ± 0.09
Tumor/Blood	1.31	1.42

表中の数値は、%dose/g を示し Mean ± S.D.として記す。



上段: ^{64}Cu -化合物 4、下段: ^{64}Cu -DOTATATE

図 4: ^{64}Cu 標識体投与 40 時間後における PET 画像

^{64}Cu -化合物 4 は、 ^{64}Cu -DOTATATE に比べ、若干腫瘍組織以外へも残留しやすい傾向がみられるものの、腫瘍組織に対して有意に高い集積を示すことが明らかとなった。腫瘍血液比は、 ^{64}Cu -DOTATATE では投与短時間か

らほぼ一定の値を示したが、 ^{64}Cu -化合物 4 では時間経過とともに上昇し、40 時間後では ^{64}Cu -DOTATATE より高値を示した。また、PET 撮像実験において、図 4 上段に示すように ^{64}Cu -化合物 4 は投与後 40 時間においても明瞭に腫瘍を描写できることを確認した。

これらの結果は、 ^{64}Cu キレーターとして DOTA を用いた場合に比べ、ATSM を含有する SST 誘導体が、NET 組織に対して投与後長時間においてもより効率的な ^{64}Cu 集積を可能にしていることを示唆している。標的組織以外への ^{64}Cu の残留を考慮すると、今後はさらに化合物の物性最適化を図り、体内動態の優れた薬剤開発を目指す必要があるが、本研究において、 ^{64}Cu 標識新規 NET 診断/治療用薬剤の開発に関する基盤的な成果を得られたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

藤澤豊、沖活也、有松冴、石川敬祐、赤塚栄作、飯田靖彦

次世代 NET 診断/治療薬剤の開発を目的とした ATSM-SST 誘導体の物性評価

日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日、横浜

藤澤豊、山口藍子、沖活也、丸橋和史、飯田靖彦

ATSM-SST 誘導体の次世代 NET 診断薬としての有用性評価

日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 26 日、仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤澤 豊 (FUJISAWA YUTAKA)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号：30511993