

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07099

研究課題名(和文)放射性ハロゲン標識Bombesin誘導体を用いた前立腺癌の診断・治療への検討

研究課題名(英文) Investigation for diagnosis and treatment of prostate cancer using radiohalogen labeled Bombesin derivative

研究代表者

粟生木 美穂 (Aoki, Miho)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・助手

研究者番号：10783227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：[18F]FDGはがん診断に有用だが、前立腺がんにおいては集積が低く正確な診断が困難であるため代替薬の開発が望まれている。ヒトガストリン放出ペプチド受容体(GRPR)は前立腺がんにも過剰発現していることが報告されており、本研究ではGRPRに親和性を有するペプチド、bombesinの誘導体に放射性ハロゲン(診断用：放射性ヨウ素、治療用：アスタチン-211)を結合させることにより、前立腺がんの新規癌診断・治療薬剤の構築を目指した薬剤設計・合成・評価を行った。

研究成果の概要(英文)：[18F]FDG is useful for cancer diagnosis, but it is difficult to accurately diagnose for prostate cancer due to its low accumulation. Therefore, development of alternative diagnostic agents is desired. Human gastrin releasing peptide receptor (GRPR) has been reported to be overexpressed in various cancers including prostate cancer. I aimed to develop agents for the diagnosis and treatment of prostate cancer by labeling derivatives of Bombesin (BNN), which is a ligand for GRPR, with radioactive halogens including iodine-125 and astatine-211.

研究分野：放射線科学

キーワード：ペプチド GRP受容体 癌 内用放射線治療

1. 研究開始当初の背景

本研究で標的とするヒトガストリン放出ペプチド受容体 (GRPR) は、前立腺がんをはじめ種々のがんに過剰発現していることが報告されている。ヒトサンプルにおいて GRPR は初期の前立腺がんには高密度に分布する一方で、通常の前立腺や前立腺肥大症の組織においてはほとんど発現していない。従って、GRPR に親和性を有する化合物は、前立腺がんへの輸送担体と成り得る。

2016年に塩化ラジウム-223が薬事承認されたことによりα線を用いたRI内用療法に注目が集まっており、α線放出核種アスタチン-211 (At-211)も治療用の核種としての利用が期待されている。RI内用療法を行う前に、PETやSPECTといった画像診断技術で薬剤の集積を確認(診断)できることは有用である。しかしながら、画像診断目的に適したアスタチンの放射性同位体は存在しない。また、アスタチンには安定同位体が存在せず、最も半減期が長いAt-210でも半減期が約8.1時間と短く基礎研究が困難という弱点がある。一方、アスタチンと同族であるハロゲンは、臭素(Br-76/77)、ヨウ素(I-123/124/125/131)と有用な放射性核種が多く存在し、これらは化学的性質が類似しているため同様の方法で標識が可能である。また、ハロゲン標識化合物の体内分布も類似することも報告されている。

2. 研究の目的

上述の通り、アスタチンは画像診断目的に適していないため、アスタチン以外の放射性ハロゲンで診断用の放射性薬剤を作製し、治療時の投与量や治療効果を予測(診断)した上で、At-211によるRI内用療法の実施を行う、セラノスティクス (Theranostics = Therapy + Diagnostics) システムを構築することを目的とする。

本研究では前立腺がんを対象とし、癌への輸送担体としては GRPR のアゴニストであるペプチド Bombesin の誘導体 (以下 BBN 誘導体) を選択した。また、放射性ヨウ素で基礎的な標識検討、体内分布実験を行い、最終的には RI 内用療法にむけて ²¹¹At で BBN 誘導体標識することを目指す。

一方、作製した標識化合物が理想的な体内動態を示すとは限らない。化合物の安定性や体内動態など得られた情報を薬剤設計にフィードバックし、標識化合物の設計・合成・評価を繰り返すことにより理想的な体内動態 (高いがん / 非標的組織放射能集積比) を示す標識化合物の開発を目指す。具体的には、Bombesin 配列と標識部位の間に適切なリンカーを加える (化合物の脂溶性、電荷、輸送担体から標識部位への距離を変更する) などを行う。

3. 研究の方法

(1) BBN 誘導体の合成

Fmoc 固相合成法によるペプチドの合成反応後、トリフルオロ酢酸により保護基の脱保護と樹脂からの切り出しを同時に行い、計7種類の BBN 誘導体を合成した。HPLCによる精製後、凍結乾燥し標識前駆体 (BBN-X-NH₂) を得た。また、*N*-succinimidyl 3-iodobenzoate (SIB) と塩基性条件下反応させ、非放射性ヨウ素標識体 (IB-X-BBN) を作製し、これを標識反応の標品及び受容体競合実験に用いた。

(2) BBN 誘導体の I-125 標識

ATE を標識前駆体として用い、スズ-ヨウ素交換反応により *N*-succinimidyl 3-[¹²⁵I]iodobenzoate ([¹²⁵I]SIB) を作製後、標識前駆体 (BBN-X-NH₂) と塩基性条件下反応させ、HPLC で精製後 [¹²⁵I]IB-X-BBN を得た (図1)。

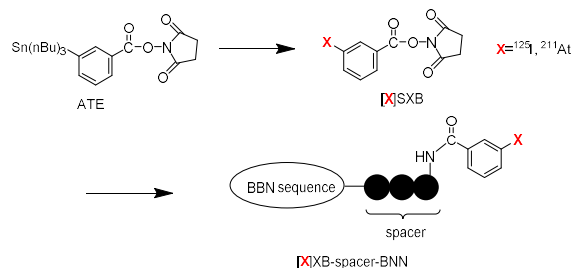


図1: BBN 誘導体の標識反応

(3) 体内放射能分布実験

雄性 balb/c nu/nu マウスに PC-3 細胞を皮下移植することにより作製した担癌マウスに [¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14)を投与し、屠殺後、主要組織の重量と放射能を測定することにより体内放射能分布を評価した。また、腫瘍への [¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14)の集積が GRPR の結合であることを確かめる目的で、非放射性リガンド Bombesin(100μg)を同時投与する阻害実験を行った。

(4) 受容体競合実験

作製した IB-X-BBN の GRPR への結合親和性を評価するため、GRPR を発現するヒト前立腺がん細胞 PC-3 を用い、市販の [¹²⁵I]-[Tyr⁴]BBN をトレーサーとして、既報(参考文献①)に従い受容体結合実験を行った。

(5) At-211 の製造および BBN 誘導体の At-211 標識

²¹¹At は福島県立医科大学の MP-30 サイクロトロンを用い、²⁰⁹Bi (α, 2n) ²¹¹At 反応により製造後、乾式法により精製し、エタノールもしくはメタノール溶液として得た。ATE を前駆体として、スズ-アスタチン交換反応により SIB のアスタチンアナログである *N*-succinimidyl 3-[²¹¹At]astatobenzoate ([²¹¹At]SAB) を合成した。その後、

[¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14)の場合と同様に前駆体と反応させ[¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14)を得た。

4. 研究成果

標識前駆体 BBN-X-NH₂ は 12-75%、非放射性ヨウ素標識体 IB-X-BBN は 21-75%の収率で得た。BBN 誘導体はメチオニン残基を有し、これは標識反応に用いられる酸化剤によってされやすい。そこで、標識反応は [¹²⁵I]SIB を標識後精製し、酸化剤を取り除いた後 BBN-X-NH₂ と反応させる 2 段階反応で行った。[¹²⁵I]SIB を放射化学的収率 80.6% で、[¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14) は放射化学的収率 48.2% で得た。放射化学的純度は 80-90% であった。一方、精製後もメチオニン残基が酸化されやすく、放射標識体の安定性が問題となったが、非放射性の単体としてメチオニン、酸化防止剤としてアスコルビン酸を添加することで一定の改善効果が得られた。

[¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14) を PC-3 前立腺がん細胞担がんマウスに投与し、1 時間後の体内放射能分布を評価したところ、排泄臓器である小腸や肝臓に大部分が分布し、腫瘍への放射能集積はわずかであった。これは化合物の放射化学的純度が低いこと、もしくは、生体内での安定性が低い、クリアランスが早いためであると考えられる。一方、[¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14) と bombesin (過剰量) を同時投与することによる阻害実験を行ったところ、腫瘍への集積は bombesin の同時投与により有意に低下し、[¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14) の腫瘍への集積が GRPR によるものであることが示された(図 2)。

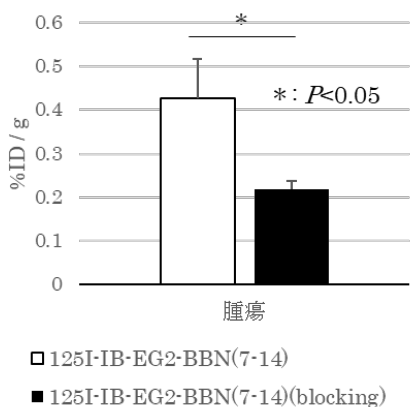


図 2: 担癌マウスにおける受容体阻害実験

[¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14) よりも GRPR に親和性が強く、腫瘍へ長時間滞留する BBN 誘導体を探索するため、GRPR 認識部位である BBN(7-14) と放射性同位元素標識部位 (IB) の間に入れるスペーサー部分を変更した BBN 誘導体を作製し GRPR に対する受容体競合阻害実験を行った(表 1)。その結果、比較対照となる Bombesin と比較して、同等もしくはそれ以上の親和性を有する化合物

BBN(7-14)-IB および BBN(7-14)-(β-Ala)₃-IB が見いだされた。これは報告されている他の BBN 誘導体の IC₅₀ 値が数十~数 nM の値を示すことが多いことを考えても良好な結果であったと考えられる。一方、酸性アミノ酸残基の導入や水酸基の導入は親和性向上に寄与せず、むしろ親和性を低下させた。今後は候補化合物として BBN(7-14)-IB および BBN(7-14)-(β-Ala)₃-IB の放射標識体を用いて担がんマウスにおける体内動態を確認する。

表 1: GRPR 受容体への親和性評価

No.	Compound	IC ₅₀ (nM)
	Bombesin	0.525
1	BBN[Lys ³]-IB	0.850
2	BBN(7-14)-IB	0.322
3	BBN(7-14)-EG ₂ -IB	0.529
4	BBN(7-14)-(β-Ala) ₃ -IB	0.341
5	BBN(7-14)-(β-Ala) ₂ -Ser-IB	3.167
6	BBN(7-14)-(β-Ala) ₂ -Glu-IB	1.666
7	BBN(7-14)-(β-Ala)-Glu ₂ -IB	2.717

精製した At-211 の放射性核種純度をゲルマニウム半導体検出器によって確認したところ、At-211 とその娘核種である Po-211 のみが認められた。核反応の副生成物となりうる At-210 の娘核種である Po-210 は強い毒性を持つため、At-211 を医療応用する際には At-210 が検出されないことが望ましい。今回の製造結果は At-211 を医療応用する上で最良の結果であったと言える。

HPLC での分析で、[²¹¹At]SAB 及び [²¹¹At]AtB-EG₂-BBN(7-14) は非放射性ヨウ素標識体 SIB 及び [¹²⁵I]IB-EG₂-BBN(7-14) と非常に似た保持時間に放射能ピークが検出された(図 3)。アスタチンには安定同位体がないため、化合物そのものの同定はできないが、この放射能ピークが [²¹¹At]SAB および [²¹¹At]AtB-EG₂-BBN(7-14) であると推定している。また、[²¹¹At]SAB 標識の収率は良好 (74~96.4%) であり、[²¹¹At]AtB-EG₂-BBN(7-14) は放射化学的収率 45.6% であった。放射化学的純度は 90% 以上であった。

同一の構造を有する放射性ヨウ素標識 BBN 誘導体 (診断用) と At-211 標識 BBN 標識体 (治療用) の合成に成功した。放射性同位元素標識化合物を用いたセラノスティクスシステムの構築に前進したと考えている。なお、腫瘍への集積は現段階では少ないが、受容体結合実験からより GRPR に親和性の高い化合物を見出しており、この構造を有する放射性標識体の評価を今後行う予定である。

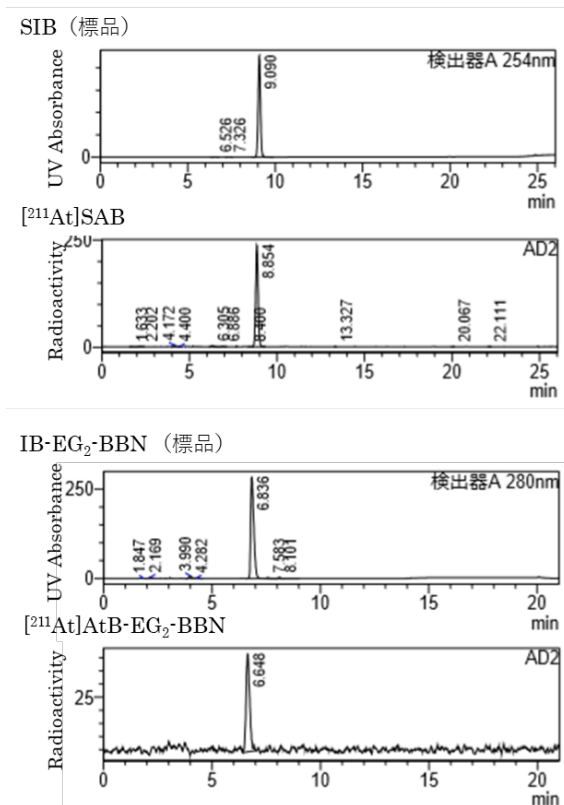


図 3: At-211 標識化合物の HPLC チャート

<引用文献>

① Xiaoyuan Chen. et al. J Nucl Med. 45 (2004)

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)
 該当なし

[学会発表] (計 1 件)

① Aoki Miho, Tominaga Hideyuki, Kato Jun, Oda Takashi, Zhao Songji, Hiasa Toshikazu, Oriuchi Noboru, Seiichi Takenoshita: " The Production of ²¹¹At at Fukushima Medical University." 10th International Symposium on Targeted Alpha Therapy. (2017)

6. 研究組織

(1)研究代表者

粟生木 美穂 (AOKI, Miho)
 福島県立医科大学・ふくしま国際医療科学センター 先端臨床研究センター・助手
 研究者番号：10783227

(2)研究協力者

小川 数馬 (OGAWA, Kazuma)
 金沢大学, 新学術創成研究機構・准教授
 研究者番号：30347471