

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07281

研究課題名(和文) 膵がん細胞を特異的に認識する放射性ナノ金属薬剤の合成および評価

研究課題名(英文) Synthesis and evaluation of radioactive nanometallic agents that specifically recognize pancreatic cancer cells

研究代表者

破入 正行 (HANYU, Masayuki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 先進核医学基盤研究部・主任研究員

研究者番号：80435552

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)：本研究はナノ粒子系中に効率よく放射性核種で標識した後、生体中低分子または生体高分子を導入する方法を見いだすことで、今後の放射性ナノ薬剤の分子設計に役立つことを目的とする。Cu-64は塩化銅、アスコルビン酸とシクロデキストリンを加えて加熱した後、遠心分離で精製し10%程度の収率でナノ粒子化が進行していることを確認した。そのナノ粒子にPEG鎖を超音波で分散することによって導入可能であった。またisoDGRをCu-64で標識したところ、癌細胞に集積するものの速やかに腎に排出することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ粒子化を利用した治療薬剤の開発は2000年代から研究報告が増大しており、その製剤は約30品目以上が市場にでている。すなわち今後さらに発展する可能性を秘めている。一般的に、ナノ粒子は大きな分子構造の変更なく複数の機能を組み込むことが可能であり治療と診断を融合させるには良好な素材である。そこでナノ粒子系中に効率よく放射性核種で位置特異的な標識を行い、放射性ナノ薬剤の分子設計の指標に大いに役立つことができると考えた。本研究ではCu-64とAt-211の放射性核種のナノ粒子が調製可能であることを見出したが、さらなる検討が必要であることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to find a method to efficiently label nanoparticle systems with radionuclides and then introduce biological small molecules or biological macromolecules, which will be useful for the molecular design of future radiopharmaceuticals. The nanoparticulation was confirmed to be in progress with a yield of about 10%. PEG chains could be introduced into the nanoparticles by dispersing them with ultrasound. When isoDGR was labeled with Cu-64, it was found to accumulate in cancer cells but was quickly excreted into the kidney.

研究分野：放射線科学

キーワード：Cu-64 At-211 標識方法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射性同位元素を用いた治療薬およびイメージング剤はペプチド性薬剤、核酸医薬、蛋白質製剤、抗体医薬などの生体中高分子量物質を利用したバイオ医薬品の開発が進み、前臨床および臨床試験において非侵襲的、継時的な治療効果およびそれを評価するためなどに役立つと期待されている。例えばペプチド性薬剤・蛋白質製剤の特性はその他の低分子放射性薬剤 (PET 薬剤) と異なっており、さらにそれぞれの間でもその特性が大きく異なっている。

放射性薬剤を製造する観点から高い放射エネルギーを用いて製造する場合、被ばくすることを考慮して遠隔装置を用いた合成方法の検討が必要となるが、多段階反応を行うには設備などを大幅に変更する必要があり、また操作も非常に複雑となる。申請者は遠隔装置を用いたオリゴペプチドの位置特異的標識方法の開発および 2-炭素 11 メトキシピリジル基を有するヒスタミン H3 リガンドの位置選択的標識方法の開発に成功した。例えば標識部位である Trp のアミノ基が塩酸塩であれば、酸触媒の添加が必要でなく、かつ無保護のペプチドで位置特異的に炭素 11 標識ができる。炭素 11 標識環状 RGD は、膵がん細胞の一つである BxPC3 細胞を用いた胆癌マウスでの PET 撮像を行ったところ癌細胞に集積することを確認した。しかしながら、環状 RGD のモノマーのため集積量が少ない。そのため集積能の向上、すなわちリガンドの多価化を検討しなければならないが、申請者は様々な方法で薬剤集積能の向上が検討されている中、ナノ薬剤のアプローチに注目した。ナノ粒子化を利用した治療薬剤の開発は 2000 年代から研究報告が増大しており、その製剤は約 30 品目以上が市場にでている。すなわち今後さらに発展する可能性を秘めている。一般的に、ナノ粒子は大きな分子構造の変更なく複数の機能を組み込むことが可能であり治療と診断を融合させるには良好な素材であると考えられている。

そこでナノ粒子系中に効率よく放射性核種で位置特異的な標識を行い、生体中低分子および生体高分子を導入する位置選択的な方法を見出すことで今後の放射性ナノ薬剤の分子設計の指標に大いに役立つことができると考えた。

2. 研究の目的

金属キレーターをナノ表面上に露出させて標識体を調製する方法が一般的であるが、この方法では *in vivo* 中の薬物安定性に大きく影響する。今回の申請テーマは全く違うアプローチを試みている。また、金属ナノ粒子に放射性核種をドーブする論文が少なからず報告されているものの、数多くは Cu-64 を用いたものである。この理由は Cu-64 の製造が安定にでき、また供給する体制が整っているからである。リガンドの多価化をナノ粒子を用いて集積能を向上することで治療効果が望まれるオリゴペプチド、オリゴ核酸などのバイオ医薬品に対しても、この方法で薬剤を調製できれば、より簡便により汎用的に治療効果の判定および追跡が可能であると推察した。

3. 研究の方法

(A) ナノ粒子と金属 PET 核種の直接ドーブ法の検討

金属 PET 核種として Zr-89 また比較として Cu-64 を使う。手法としては、アルコールなどの極性溶媒と水の混合溶液を用いた分散法を用いる。またはマイクロウェーブを用いた加熱法を行う。反応物を遠心分離で分離した後、超純水を加え超音波で分散する。その分散水溶液をラジオ TLC によって放射化学純度を算出する。ドーズキャリブレーターによる放射エネルギーも確認し、放射性ナノ粒子の構造安定性を水溶液と血清中で測定する。

(B) ナノ粒子への放射性核種の導入検討

一般的なナノ粒子への表面上に修飾する放射性核種の導入検討も行った。ナノ粒子としては金ナノ粒子、放射性核種として Cu-64 と At-211 を用いた。

(C) 放射性ナノ粒子のペプチド鎖導入方法の検討

上述で調製した放射性ナノ粒子にペプチド鎖の導入を試みる。放射性ナノ粒子に、アミノ基またはチオール基を有する PEG 鎖で表面を修飾する。アミノ基であれば EDC 法、チオール基であればマレイミド法による導入を行う。使用するペプチドとしては $\alpha\beta 3$ や $\alpha 2 \beta 5$ を認識する環状 RGD ペプチドと環状 isoDGR を用いる。導入した後の分子量の差異をゲル濾過 HPLC にて追跡する。

4. 研究成果

1. Zr-89 を用いたナノ粒子作成

Zr-89 は当研究所で製造した。ジルコニウム-89 はシュウ酸溶液に溶解したものを使用した。Zr-89 溶液を超純水で希釈した放射エネルギー 370KBq とよう化ジルコニウム (1mM) をネオデカン酸ナトリウム水溶液 (10mM) に加えた。反応の追跡は未反応の Zr-89 をデスフェリオキサミンで錯形成した後、TLC (展開溶媒: 酢酸エチル) を用いて行った。反応温度および反応濃度を変化させて検討を行ったが Zr-89 の導入量は 1%未満であった。次に Zr-89 のシュウ酸水溶液、炭酸水素ナトリウムで中和した Zr-89 水溶液を調製した。またシュウ酸を除去するために QMA カートリッジに吸着後、リン酸カリウム緩衝液 (pH7.2) で抽出した Zr-89 も調製した。コールド体として三種類のジルコニウム塩 (酢酸塩、塩化物とリン酸水素塩) とを用いて Zr-89 含有ナノ粒子の作成を試みた。分散液として、ネオデカン酸ナトリウム水溶液 (5mM) コールド試薬濃度 (1mM-10mM)、溶媒 (イソプロパノール、n-ブタノール、DMF) と温度 (120 -150) で行ったが導入量は 1%未

満であった。以上から Zr-89 を用いたナノ粒子の調製法は困難であった。

2. Cu-64 を用いたナノ粒子作成

Cu-64 は当研究所で製造した。銅-64 水溶液を超純水で希釈した放射エネルギー 370KBq に塩化銅水溶液(1mM)を加えた。次に還元剤として、水素化ホウ素カリウム (2mM)、ヒドラジン(2mM)またはアスコルビン酸 (5mg/mL)を添加し反応を行った。反応の追跡はエチレンジアミン 4 酢酸水溶液を用いて未反応の銅-64 を TLC にて確認した。その結果、還元剤としてアスコルビン酸、反応温度 60 度、反応時間 2 時間で 20%前後の Cu-64 導入量であった。遠心分離を行って沈殿物を超純水で洗浄する工程を 2 回繰り返し、化合物を得ることに成功した。次いで末端にアミノ基またはチオール基をもつ平均分子量 5000 の PEG で修飾を試みた。水溶液中にそれぞれ混合した後、超音波で分散した。分散液を室温で静置または 100 °C で 1 時間反応を試みた。混合時は透明だったが、沈殿が生じていた。超音波で再分散、またエタノールを添加して超音波で再分散したものの、透明な溶液にはならなかった。また反応混合物をゲル濾過 HPLC で確認したところ、未反応物が 30%程度残留していることも確認した。

また添加剤としてシクロデキストリンも使用した。Cu-64 水溶液を超純水で希釈した放射エネルギー 185MBq に塩化銅水溶液(10mM)とシクロデキストリン(1mM)を加えた。次に還元剤として、アスコルビン酸 (10mg/mL)を添加し反応を行った。遠心分離による洗浄を行った後末端にアミノ基またはチオール基をもつ平均分子量 10000 の PEG で修飾を試みた。水溶液中にそれぞれ混合した後、超音波で分散した。遠心分離を行って沈殿物を超純水で洗浄する工程を 2 回繰り返した。また、アミノ-PEG-チオール基を用いて上述と同様の操作も行った。調製時間は三時間で Cu-64 導入量は 10%前後であった。三種類の Cu-64 ナノ薬剤の溶液中の安定性を検討したところ、24 時間後で未変化体が 90%残存していた。

3. At-211 を用いたナノ粒子作成

At-211 は当研究所で製造した。銅ナノ粒子(1mg/ml)にジアミノ基をもつ平均分子量 10000 の PEG をを加えた。遠心分離後 沈殿物を超純水で洗浄する工程を 2 回繰り返した。一部に 3-トリメチルスズ安息香酸の活性エステル体を加えて反応を行なった。それぞれスズ体がある化合物とならない化合物に At/NCS の MeOH 溶液と At/Na₂SO₃ の MeOH 溶液を加えて標識反応を試みた。スズ体は At/NCS の MeOH 溶液で反応が進んだのに対して他は全く反応が進まなかった。

4. isoDGR の標識反応と PET 撮像

放射性ナノ薬剤に導入する環状ペプチドとして isoDGR の生体内挙動を調べるために、c(-phg-isoDGRK)のリジン側鎖に DOTA を導入した後、銅-64 で標識を行った。放射化学的収率および放射化学純度は 99%以上であった。B16B10 癌細胞を播種したマウスに投与し、PET 撮像を行った。その結果、癌細胞に集積するものの速やかに腎に排出することがわかった。

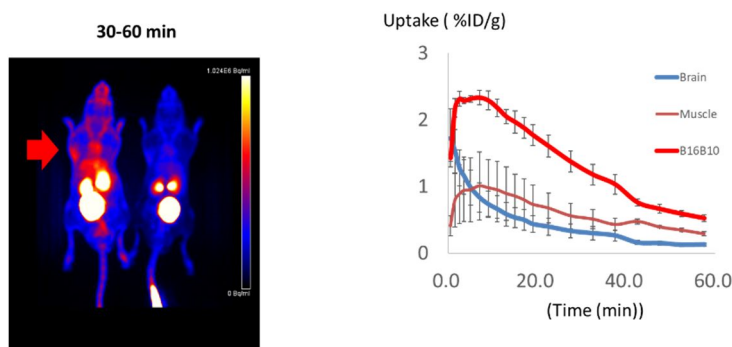


図 1 isoDGR の PET イメージングと臓器の放射能減衰曲線

Cu-64 水溶液を超純水で希釈した放射エネルギー 37MBq に塩化銅水溶液(100 mM)とシクロデキストリン (5 mM)を加えた。次に還元剤として、アスコルビン酸(10mg/mL)またはアスコルビン酸ナトリウム(10mg/mL)を添加し反応を行った。遠心分離による洗浄を行った後末端にアミノ-PEG-チオール(平均分子量 10000)の PEG で修飾を試みた。水溶液中にそれぞれ混合した後、超音波で分散した。遠心分離を行って沈殿物を超純水で洗浄する工程を 2 回繰り返した。調製時間は三時間で 64Cu 導入量は 10%前後であった。次に環状ペプチドである isoDGR にマレイミド基を導入した化合物と混合した。導入量は 40%であった。

以上の結果、放射性同位元素を直接ナノ粒子に導入する方法は困難であるが今後は導入方法の改良を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hu Kuan, Xie Lin, Hanyu Masayuki, Zhang Yiding, Li Lingyun, Ma Xiaohui, Nagatsu Kotaro, Suzuki Hisashi, Wang Weizhi, Zhang Ming-Rong	4. 巻 1
2. 論文標題 Harnessing the PD-L1 interface peptide for positron emission tomography imaging of the PD-1 immune checkpoint	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 214 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cb00070a	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 該当する
1. 著者名 Hu Kuan, Xie Lin, Zhang Yiding, Hanyu Masayuki, Yang Zhimin, Nagatsu Kotaro, Suzuki Hisashi, Ouyang Jiang, Ji Xiaoyuan, Wei Junjie, Xu Hao, Farokhzad Omid C., Liang Steven H., Wang Lu, Tao Wei, Zhang Ming-Rong	4. 巻 11
2. 論文標題 Marriage of black phosphorus and Cu ²⁺ as effective photothermal agents for PET-guided combination cancer therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2778-1 - 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16513-0	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 該当する
1. 著者名 Hu Kuan, Shang Jingjie, Xie Lin, Hanyu Masayuki, Zhang Yiding, Yang Zhimin, Xu Hao, Wang Lu, Zhang Ming-Rong	4. 巻 5
2. 論文標題 PET Imaging of VEGFR with a Novel ⁶⁴ Cu-Labeled Peptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 8508 ~ 8514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b03953	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 該当する
1. 著者名 Xie Lin, Hanyu Masayuki, Fujinaga Masayuki, Zhang Yiding, Hu Kuan, Minegishi Katsuyuki, Jiang Cuiping, Kurosawa Fuki, Morokoshi Yukie, Li Huizi Keiko, Hasegawa Sumitaka, Nagatsu Kotaro, Zhang Ming-Rong	4. 巻 61
2. 論文標題 131I-IITM and 211At-AITM: Two Novel Small-Molecule Radiopharmaceuticals Targeting Oncoprotein Metabotropic Glutamate Receptor 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 242 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2967/jnumed.119.230946	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 -

1. 著者名 Kuan Hu, Masayuki Hanyu, Lin Xie, Yiding Zhang, Kotaro Nagatsu, Hisashi Suzuki, Ming-Rong Zhang	4. 巻 55
2. 論文標題 Developing native peptide-based radiotracers for PD-L1 PET imaging and improving imaging contrast by pegylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 4162 ~ 4165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9cc00445a	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16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Masayuki Hanyu, Lin Xie, Hu Kuan, Yiding Zhang, Ming-Rong Zhang
2. 発表標題 RADIOLABELLING AND PET IMAGING OF COPPER-64 LABELED ISODGR DERIVATIVE
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会, 日本ペプチド学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 謝 琳, 張 露露, 破入 正行, 藤永 雅之, 張 一鼎, 峯岸 克行, Hu Kuan, 李 惠子, 長谷川 純崇, 永津 弘太郎, 張 明榮
2. 発表標題 癌蛋白質mGluR1に基づくがん種横断的な ²¹¹ At-AITM標的アイソトープ治療法の開発
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会, 日本核医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hu Kuan, Lin Xie, Yiding Zhang, Masayuki Hanyu, Ming-Rong Zhang
2. 発表標題 Harnessing PD-L1 interface peptide for PET imaging of PD-1 immune checkpoint
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会, 日本核医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hu Kuan, Lin Xie, Yiding Zhang, Masayuki Hanyu, Ming-Rong Zhang
2. 発表標題 ET Imaging of VEGFR with a Novel ⁶⁴ Cu Labeled Peptide
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会, 日本核医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hu Kuan, Jingjie Shang, Lin Xie, Masayuki Hanyu, Yiding Zhang, Zhimin Yang, Hao Xu, Wang Lu, Ming-Rong Zhang
2. 発表標題 Positron Emission Tomography Imaging of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression with a new ⁶⁴ Cu labeled peptide
3. 学会等名 SNMMI 2020 Annual Meeting, Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 破入正行, 石井英樹, 念垣信樹, 小川政直, 嵐大輔, 古塚賢士, 橋本裕輝, 河村和紀, 張明栄
2. 発表標題 HPLCポストカラム法を用いたPET薬剤中の金属不純物の定量
3. 学会等名 第59回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 謝琳, 破入正行, 藤永雅之, 張一鼎, 峯岸克行, 李恵子, 諸越幸恵, 長谷川純崇, 永津弘太郎, 張明栄
2. 発表標題 転移性メラノーマに対する ²¹¹ At-AITMによる標的アイソトープ治療薬としての実証
3. 学会等名 第59回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Hanyu, Lin Xie, Hu Kuan, Zhimin Yang, Yiding Zhang, Hisashi Suzuki, Ming-Rong Zhang
2. 発表標題 Radiolabeling and evaluation of isoDGR derivative using radioactive cooper
3. 学会等名 14th International Conference on Radiopharmaceutical Therapy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Hanyu, Hideki Ishii, Nobuki Nengaki, Masanao Ogawa, Daisuke Arashi, Kenji Furutsuka, Hiroki Hashimoto, Kazunori Kawamura, Ming-Rong Zhang
2. 発表標題 Measurement of the metal impurity in PET probe using the HPLC post-column method
3. 学会等名 23rd International symposium on radiopharmaceutical science (国際学会)
4. 発表年 2019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