

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07630

研究課題名（和文）放射性ハロゲンを用いた包括的癌診断・治療法（ラジオセラノスティクス）の確立

研究課題名（英文）Establishment of comprehensive cancer diagnosis and therapy using radio halogen

研究代表者

小川 数馬（OGAWA, KAZUMA）

金沢大学・新学術創成研究機構・教授

研究者番号：30347471

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）：診断と治療の一体化を目指すラジオセラノスティクスにおいて、プローブ開発を効率よく推進することは重要である。一方、アルファ線を用いた治療は、極めて治療効果が高く、世界的に注目されている治療法である。本研究では、アルファ線放出核種として²¹¹Atを用いたラジオセラノスティクス確立のための基礎的研究を行った。

RGDペプチドの新規²¹¹At標識法を開発し、²¹¹At標識RGDペプチドと¹²⁵I標識RGDペプチドが、担がんマウスにおいて同等の体内動態を示したことより、ラジオセラノスティクス用プローブとしての有用性が示された。また、²¹¹At標識BBN誘導体を作製し、GRPR発現腫瘍への集積を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

診断と治療の一体化を目指すラジオセラノスティクスは、事前の画像診断により、治療時の治療効果予測、副作用予測により患者の層別化、治療の最適化が可能となり、また、治療後の画像診断により早期効果予測を可能とする正に、個別化医療を体現している手法である。本研究では、治療効果が高いことから注目度が高いアルファ線を用いた新規ラジオセラノスティクス用プローブの開発に成功し、ラジオセラノスティクスの推進に大きく貢献した。

研究成果の概要（英文）：Efficient promotion of probe development is important for radiotheranostics, which aims to integrate diagnosis and treatment. On the other hand, the cancer therapy using alpha particles has extremely high therapeutic effects and gathers much attention all over the world. In this study, I conducted a preliminary study to establish radiotheranostics using ²¹¹At as an alpha particles emitting radionuclide.

A novel ²¹¹At labeling method for an RGD peptide was developed, and the ²¹¹At-labeled RGD peptide and ¹²⁵I-labeled RGD peptide showed equivalent biodistribution in tumor-bearing mice, demonstrating their usefulness as probes for radiotheranostics. In addition, an ²¹¹At-labeled BBN derivative was prepared. It was accumulated in GRPR-expressing tumors.

研究分野：放射性医薬品科学

キーワード：核医学 がん セラノスティクス プローブ

1. 研究開始当初の背景

生体内で生じている分子レベルでの変化を非侵襲的に捉え、臨床診断や基礎研究などの分野へ貢献しようとする「分子イメージング」研究は、近年、注目度が高く、そして、その応用として、診断と治療を一体化して効率的に展開するセラノスティクスへの展開が期待されている。

放射性同位元素 (RI) を用いたセラノスティクスをラジオセラノスティクスと言う。RIには異なる物理学的性質の放射線を放出する核種が多数存在するため、同じ分子構造の前駆体に対して、化学的性質が類似した診断用 RI (透過性の高いガンマ線を放出) と治療用 RI (細胞殺傷性の高いベータ線やアルファ線を放出) で標識した化合物を各々創製することができ、診断と治療の一体化を目指すラジオセラノスティクスにおいて診断用と治療用のプローブ開発を効率よく推進することができる。また、その結果、診断と治療のプローブが極めて類似した体内動態を示すことから、診断用プローブによるイメージングにより治療用プローブの標的部位および他の各組織への集積性とそれに基づく各組織の放射線吸収線量 (治療効果や副作用) の予測が可能となる。即ち、患者の層別化、投与量の最適化を可能とし、真に個別化医療、精密医療の実現が期待される。

一方、アルファ線は、ベータ線と比べて飛程が短く、その間に失うエネルギーが圧倒的に大きい。従って、アルファ線の殺細胞効果は非常に高く、アルファ線治療は世界的に注目されている新しい治療法である。本研究では、アルファ線放出核種としてハロゲン元素である ^{211}At を用いて、包括的がん診断・治療法の確立のための基礎的研究を行う。

2. 研究の目的

本研究では、革新的ながん診断治療法と成り得る「放射性ハロゲンを用いた包括的がん診断・治療法 (ラジオセラノスティクス) の確立」を目指した前臨床の基礎的研究を行い、患者の QOL とがん治療成績の向上のための礎を作ることを目的とする。

本研究では、モデルペプチドとしてがん組織に集積することが知られている RGD ペプチドをがん指向性輸送担体として用い、同じ標識前駆体から類似の手法によりシステムティックに放射性ハロゲン標識体を作製 (Br、I、At は類似した化学的性質を示すことが知られている) する手法とそれら標識体を用いた包括的な診断治療を行うラジオセラノスティクスの確立を目的として研究を行う。アスタチンを生理活性ペプチドの構成アミノ酸に直接導入する方法はこれまでに報告がなく、本研究が世界初の試みであり、アルファ線治療研究の大きなブレークスルーと成り得る。

一方、ガストリン放出ペプチド受容体 (以下、GRPR) は、さまざまな腫瘍で過剰発現している。GRPR は前立腺がん細胞の膜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。したがって、GRPR リガンドは前立腺がん細胞へのキャリア分子として期待されている。Bombesin (以下、BBN) は 14 残基のペプチドで、哺乳類の GRPR に対して高い親和性を有する。現在までに、 ^{211}At を含むアルファ線放出核種で標識された GRPR 誘導体はまだ報告されていない。本研究では、前立腺がん治療を目的とした ^{211}At 標識 BBN 誘導体を作製し、基礎的検討を行った。

3. 研究の方法

3. 1. ^{211}At 標識 RGD ペプチド

3. 1. 1. ^{211}At 標識 RGD ペプチドの合成

フェニルアラニンにヨウ素を導入した 4-ヨードフェニルアラニンのアミノ基を Fmoc 保護した化合物[Fmoc-D-Phe(4-I)-OH]を合成し、この化合物を用いて Fmoc 固相合成、環化を行い、ヨウ素を導入したペプチド c[R(Pbf)GD(OtBu)f(4-I)K(Boc)] (Fig. 1 左) を合成した。アミノ酸の保護基を脱保護後、ヨウ素をトリブチルスズ化することにより c[RGDf(4-nBu₃Sn)K] (Fig. 1 中央) を合成し標識前駆体とした。次いで、トリブチルスズと

^{211}At との交換

反応により

^{211}At 標識 RGD

ペプチド

[^{211}At]c[RGDf(4-

At)K] (Fig. 1 右)

を得た。

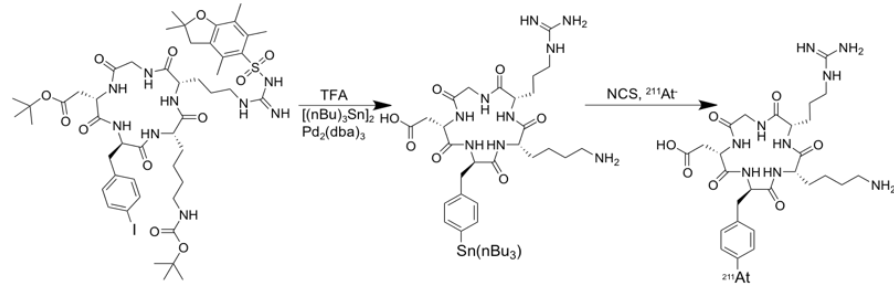


Fig. 1. ^{211}At 標識 RGD ペプチドの合成

3. 1. 2. $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する Binding Assay

ヒト精製 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対して、放射性リガンドとして [^{211}At]c[RGDf(4-At)K]、非放射性リガンドとして c(RGDfK)を用い、 [^{211}At]c[RGDf(4-At)K]の $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの結合親和性の評価を行った。

3. 1. 3. 担がんモデルマウスにおける体内放射能分布

U87MG ヒトグリオーマ細胞 5×10^6 cells/100 μL をヌードマウスの背面皮下へ移植した。28 日後、 [^{125}I]c[RGDf(4-I)K]及び [^{211}At]c[RGDf(4-At)K]の混合液を担がんモデルマウスに尾静脈投与した。投与 1、4 時間後にマウスを屠殺し、各臓器を摘出、臓器の重量と放射能を測定した。

3. 2. ^{211}At 標識 BBN 誘導体

3. 2. 1. 非放射性 IB-BBN の合成

Fmoc 固相合成によりアミノ酸を伸長させ、HPLC で精製することにより Table 1 の 6 種類の BBN 誘導体 (BBN-1~BBN-6) を合成した。次いで、*N*-succinimidyl 3-iodobenzoate (SIB) を結合させ、HPLC で精製し、IB-BBN (IB-1~IB-6) を得た。

3. 2. 2. GRPR との親和性評価

GRPR に対する天然 BBN および合成 IB-BBN の結合親和性は、GRPR を発現することが知られている PC-3 細胞を用い、GRPR 特異的に結合する放射性リガンド [^{125}I]Tyr⁴-bombesin との競合結合実験によって求めた。

3. 2. 3. [^{211}At]AB-3 の調製

^{211}At 導入試薬 *N*-succinimidyl 3- [^{211}At]astatobenzoate ([^{211}At]SAB) を調製し、続いて BBN-3 と縮合させ、HPLC で精製することにより目的物 [^{211}At]AB-3 を得た

Table 1. The sequence and analytical data of BBN derivatives.

| | Additional sequence | | | BBN sequence | | | | | | | | | | [M+H] ⁺ | | Yield (%) | | | | |
|------------|----------------------------------------------------|----|----|--------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|--------------------|----|-----------|------------------|--------------------|--------|--------------------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | | 13 | 14 | calc. | found ^a |
| Native BBN | — | — | — | Pyr | Q | R | L | G | N | Q | W | A | V | G | H | L | MNH ₂ | — | — | — |
| BBN-1 | — | — | — | Pyr | Q | K | L | G | N | Q | W | A | V | G | H | L | MNH ₂ | 796.4 ^b | 796.6 | 16.2 |
| BBN-2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | Q | W | A | V | G | H | L | MNH ₂ | 940.5 | 940.5 | 52.7 |
| BBN-3 | (CH ₂ -CH ₂ -O) ₂ | — | — | — | — | — | — | — | — | Q | W | A | V | G | H | L | MNH ₂ | 1085.5 | 1085.6 | 74.5 |
| BBN-4 | βA | βA | βA | — | — | — | — | — | — | Q | W | A | V | G | H | L | MNH ₂ | 1153.6 | 1153.6 | 78.7 |
| BBN-5 | βA | βA | S | — | — | — | — | — | — | Q | W | A | V | G | H | L | MNH ₂ | 1169.6 | 1169.6 | 12.9 |
| BBN-6 | βA | βA | E | — | — | — | — | — | — | Q | W | A | V | G | H | L | MNH ₂ | 1211.6 | 1211.6 | 26.1 |

Pyr: Pyroglutamic acid, βA: β-Alanine, M-NH₂: amidated methionine

^a Mass values were obtained by ESI-MS. ^b This calculated value was based on [M+2H]²⁺.

3. 2. 4. 前立腺がんモデルマウスにおける体内放射能分布実験

PC-3 細胞 5×10⁶ cells/100 μL をヌードマウス (BALB/c nu/nu マウス、雄性、4 週齢) の右肩皮下へ移植した。移植 12 日後に [²¹¹At]AB-3 (85 kBq/100 μL) を尾静脈投与した。BBN 添加群には 100 μg の BBN を添加した。投与後 1 時間後に屠殺し、臓器を摘出し、それぞれの重量と放射能を測定した。

4. 研究成果

4. 1. ²¹¹At 標識 RGD ペプチド

4. 1. 1. ²¹¹At 標識 RGD ペプチドの合成

Fig. 2 に c[RGDf(4-I)K] と [²¹¹At]c[RGDf(4-At)K] のクロマトグラムを示す。c[RGDf(4-I)K] と [²¹¹At]c[RGDf(4-At)K] は、類似の保持時間を示した。 [²¹¹At]c[RGDf(4-At)K] の放射化学的収率は 63% であり、精製後の放射化学的純度は 96% 以上であった。

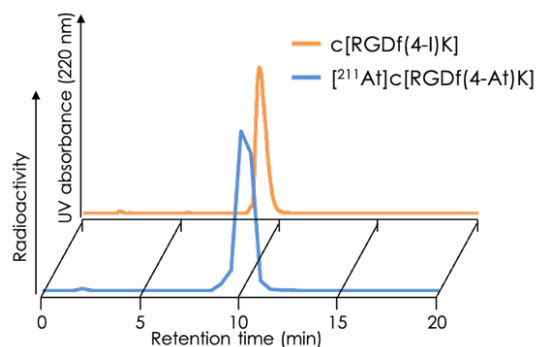


Fig. 2. RP-HPLC chromatograms.

4. 1. 2. α_vβ₃ インテグリンに対する Binding Assay

放射性リガンドを [²¹¹At]c[RGDf(4-At)K] として、非放射性リガンド c(RGDfK) との α_vβ₃ インテグリンに対する競合阻害実験の結果を Fig. 3 に示す。 [²¹¹At]c[RGDf(4-At)K] のみを添加した群の α_vβ₃ インテグリンと結合した平均放射能を 100% として、c(RGDfK) の濃度依存的に有意な放射能の減少が観察された。

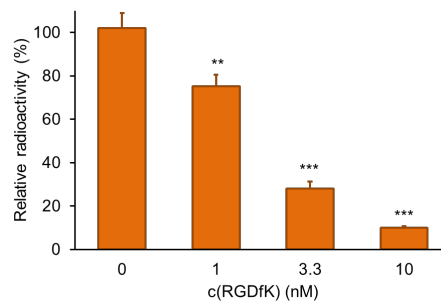


Fig. 3. Competitive binding to α_vβ₃ integrin.

4. 1. 3. 前立腺がん担がんマウスにおける体内放射能分布実験

^{125}I と ^{211}At のダブルトレーサー法により $[^{125}\text{I}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ と $[^{211}\text{At}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ の担がんモデルマウスにおける体内放射能分布を測定した結果を Fig. 4 に示す。 $[^{125}\text{I}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ 及び $[^{211}\text{At}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ は腫瘍組織に高く集積し、非常に類似した体内分布を示した。本結果は、放射性ヨウ素と ^{211}At を組み合わせたラジオセラノスティクスの可能性を示すものである。

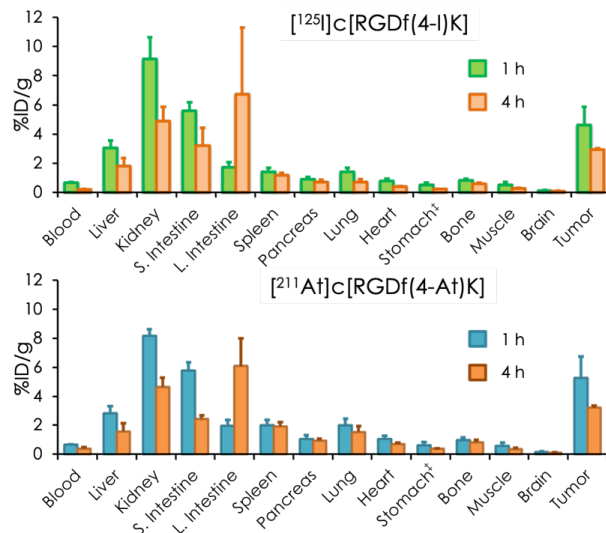


Fig. 4. Biodistribution of $[^{125}\text{I}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ and $[^{211}\text{At}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$.

4. 2. ^{211}At 標識 BBN 誘導体

4. 2. 1. 非放射性 IB-BBN の合成および *in vitro* での GRPR への親和性の評価

BBN-1 ~ BBN-6 に非放射性 SIB を結合させることにより、IB-BBN (IB-1 ~ IB-6) を合成した。さらに、 $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^4\text{-bombesin}$ を使用した競合結合実験により、IB-BBN の GRPR への親和性の評価を行った結果、IB-5 および IB-6 は、天然 BBN よりも低い GRPR 親和性を示した一方で、IB-2、IB-3、および IB-4 は、天然 BBN と同程度の親和性を示した。

IC_{50} (nM): Bombesin 0.53 ± 0.01 , IB-1 0.85 , IB-2 0.34 ± 0.29 , IB-3 0.52 ± 0.29 , IB-4 0.33 ± 0.01 , IB-5 3.91 , IB-6 1.67

4. 2. 2. $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の調製

$[^{211}\text{At}]\text{SAB}$ の HPLC 精製後の放射化学的収率は、 $79.5 \pm 4.4\%$ (減衰補正あり、 $n=3$) であった。 $[^{211}\text{At}]\text{SAB}$ と BBN-3 の縮合率は、 $28.2 \pm 2.4\%$ (減衰補正あり、 $n=3$) であった。放射化学的純度は、95%以上だった。 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の保持時間は 8.1 分で、非放射性 IB-3 の保持時間 7.6 分と類似していた。なお、UV 検出器とガンマ検出器間の遅延時間は約 0.5 分であり、この保持時間の差は妥当である。

4. 2. 3. 前立腺がん担がんマウスにおける体内放射能分布実験

$[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は投与後 1 時間で腫瘍に集積した ($4.05 \pm 0.73\% \text{ID/g}$)。一方、BBN を同時投与した BBN 添加群では、GRPR 発現が高い腫瘍および脾臓での放射能集積が、対照群と比較して有意に減少した ($2.56 \pm 0.24\% \text{ID/g}$)。 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は腫瘍以外の他の組織にも高い取り込みを示したが、この理由として、標識化合物から脱離した ^{211}At が分布したためと推測された。

以上、初めて α 線放出核種で標識された BBN 誘導体、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ を合成・評価し、これらの研究成果から ^{211}At 標識 BBN 誘導体の基礎的な特性が明らかとなり、今後の研究に有益な情報を提供するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 1. 著者名 Kazuma Ogawa | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Development of Diagnostic and Therapeutic Probes with Controlled Pharmacokinetics for Use in Radiotheranostics | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 897-903 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c19-00274 | 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 小川 数馬 | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 アルファ線放出放射性同位元素アスタチン-211を用いたラジオセラノスティクス用プローブ開発 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 JSMI Report | 6. 最初と最後の頁 14-20 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 Ogawa Kazuma, Takeda Takuya, Mishiro Kenji, Toyoshima Atsushi, Shiba Kazuhiro, Yoshimura Takashi, Shinohara Atsushi, Kinuya Seigo, Odani Akira | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Radiotheranostics Coupled between an At-211-Labeled RGD Peptide and the Corresponding Radioiodine-Labeled RGD Peptide | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 ACS Omega | 6. 最初と最後の頁 4584 ~ 4591 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.8b03679 | 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 Miho Aoki, Songji Zhao, Kazuhiro Takahashi, Kohshin Washiyama, Naoyuki Ukon, Chengbo Tan, Saki Shimoyama, Ken-Ichi Nishijima, Kazuma Ogawa | 4. 巻 68 |
| 2. 論文標題 Preliminary Evaluation of Astatine-211-Labeled Bombesin Derivatives for Targeted Alpha Therapy | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 538-545 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c20-00077 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

| |
|----------------------------------------|
| 1. 発表者名 小川数馬 |
| 2. 発表標題 ラジオセラノスティクスを目指した放射標識化合物開発研究 |
| 3. 学会等名 第59回日本核医学会学術総会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------------|
| 1. 発表者名 小川数馬 |
| 2. 発表標題 アルファ線治療を包括したラジオセラノスティクス用プローブ開発 |
| 3. 学会等名 PETサマーセミナー2019 in 福島（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------|
| 1. 発表者名 越後拓亮, 三代憲司, 柴和弘, 絹谷清剛, 小川数馬 |
| 2. 発表標題 At-211標識RGDペプチドの開発を目指した基礎的検討 |
| 3. 学会等名 第14回日本分子イメージング学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 小川 数馬 |
| 2. 発表標題 セラノスティクスを目的とした放射性プローブの開発 |
| 3. 学会等名 13回日本分子イメージング学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 K. Ogawa, T. Takeda, K. Mishiro, A. Toyoshima, K. Shiba, T. Yoshimura, A. Shinohara, S. Kinuya, A. Odani. |
| 2. 発表標題 Preparation and basic evaluation of an At-211-labeled peptide for targeted alpha therapy. |
| 3. 学会等名 12th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 越後 拓亮、三代 憲司、平田 咲、鷲山 幸信、高橋 和弘、柴 和弘、絹谷 清剛、小川 数馬 |
| 2. 発表標題 腫瘍指向性ペプチドを用いたセラノスティクス用プローブの開発研究 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunseki/ 金沢大学 薬学系 臨床分析科学 研究室 http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunseki/gyoseki.html |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

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 |
|-------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 粟生木 美穂 (Aoki Miho) (10783227) | 福島県立医科大学・公私立大学の部局等・助手 (21601) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 分 担 者 | 三代 憲司 (Mishi ro Kenji) (60776079) | 金沢大学・新学術創成研究機構・准教授 (13301) | |

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 |
|---------|---------|
| | |