

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K16803
研究課題名（和文）効果的な核医学治療・診断を可能とする腫瘍滞留性に優れた多価RGDペプチドの開発

研究課題名（英文）Development of radiolabeled multivalent RGD peptides which display high and persistent uptake in cancerous tissues

研究代表者
水野 雄貴（Mizuno, Yuki）
北海道大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：90805194
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、integrin α_3 を標的とした放射性同位元素（RI）標識多価RGDペプチドの合成と評価を行い、多価ペプチドの分子構造の違いが、integrin α_3 との相互作用に与える影響を評価した。その結果、RGDペプチド間をつなぐ分子構造、とりわけ足場分子の構造の違いが、integrin α_3 からの解離速度に大きな影響を与えることを見出した。具体的には、オクタヘドラル型レニウム錯体を足場分子とし、トランス位に2つのRGDペプチドを持つ構造が、複数のintegrin α_3 との同時結合に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究を通して、多価RGDペプチドが複数のintegrin α_3 と同時結合するために必要な化学構造について、新たな知見が得られた。これにより、integrin α_3 を標的とした多価RGDペプチドの開発を、より合理的な薬剤設計に基づき実施することが可能となる。Integrin α_3 は多くのがん種において発現が亢進することが知られているため、integrin α_3 への高い集積性と滞留性を示すRI標識多価RGDの開発は、新たながん診断・治療法へとつながることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we synthesized several radiolabeled multivalent RGD peptides targeting integrin α_3 and evaluated how the difference in their molecular structures affects their interactions with integrin α_3 . As a result, we found that the difference in their scaffold structures connecting each RGD peptide substantially affected their dissociation kinetics from integrin α_3 positive cells. Furthermore, our results also suggested that multivalent RGD peptides whose scaffold structure is an octahedral metal complex could simultaneously bind with more than one integrin α_3 receptors.

研究分野：放射性薬品科学

キーワード：多価効果 がん インテグリン ペプチド 核医学治療 核医学診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん集積性を有するペプチドなどを、 α 線や β 線を放出する放射性同位元素 (RI) で標識した化合物を用いた核医学治療が、近年大きな注目を集めている。効果的な核医学治療を実現するためには、被験者に投与した RI 標識体ががん組織に高く集積するのみでなく、長時間にわたってがん組織に滞留することが重要である。この高い標的滞留性を達成する戦略として、多価効果の利用が非常に有効である。多価効果とは、分子内に複数の標的結合部位を有する多価化合物が、1つのみ有する1価化合物に比べ標的への高い結合力を示す現象を指す。特に、多価化合物が複数の標的と同時結合した場合、標的からの解離速度が著しく遅延する現象が「キレート効果」として知られており、この現象をうまく利用することで、優れた標的滞留性を有する RI 標識多価化合物の開発が可能となる。

多価効果が盛んに利用されている例として、integrin $\alpha\beta3$ 陽性がん細胞を標的とした RI 標識多価 RGD ペプチドが挙げられる。しかし、これまで数多くの RI 標識多価 RGD ペプチドが開発されてきた一方、integrin $\alpha\beta3$ からの解離速度を詳細に評価した報告は存在せず、複数の integrin $\alpha\beta3$ と同時結合するために必要な化学構造的特徴については、未だ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

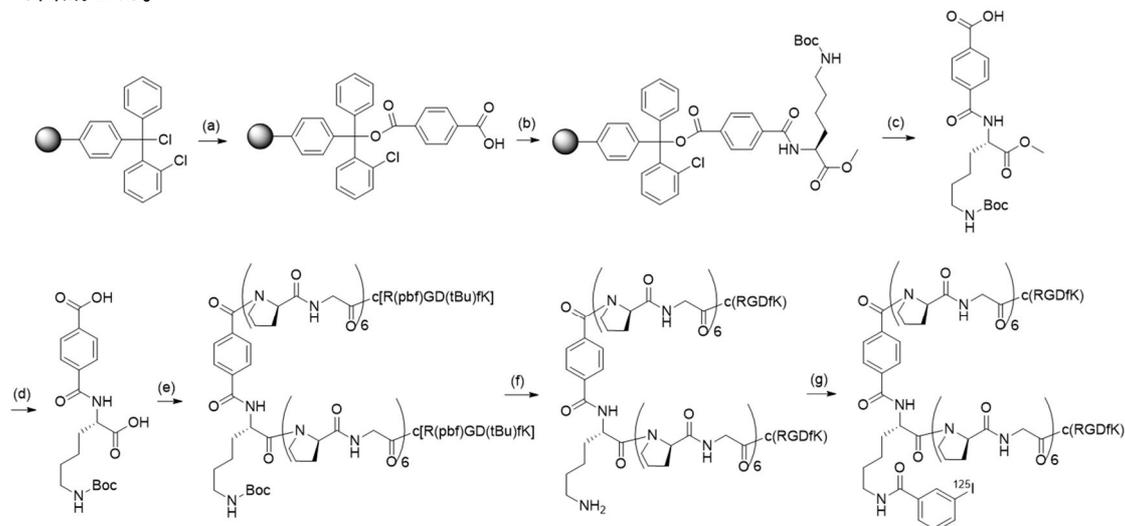
本研究では、多価 RGD ペプチドのスペーサ構造や足場分子の違いが、integrin $\alpha\beta3$ からの解離速度に与える影響を評価し、多価 RGD ペプチドが複数の integrin $\alpha\beta3$ と同時結合するために必要な化学構造的特徴について、明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 候補化合物の合成

$[^{125}\text{I}]\text{IB-TPA}[(\text{pG})_6\text{-c(RGDfK)}]_2$ の合成

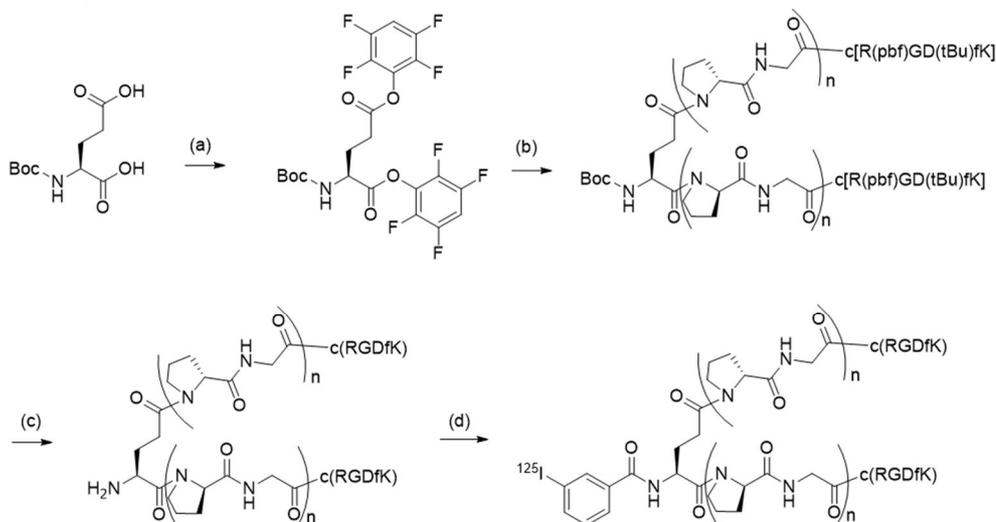
足場分子としてテレフタル酸 (TPA) を有する 2 価 RGD (図 1B) を、以下に示すスキームに従って合成した。



(a) terephthalic acid, DIPEA, DMF (b) H-Lys(Boc)-OMe·HCl, DIC, HOBT, DMF (c) AcOH, trifluoroethanol, dichloromethane (d) 1N NaOH, MeOH (e) H-(pG)₆-c[R(pbf)GD(tBu)fK]·HCl, WSCD·HCl, DIPEA, DMF (f) TFA, triisopropylsilane, water (g) [¹²⁵I]-SIB, 0.1 M B.B. (pH 9.0).

$[^{125}\text{I}]\text{IB-E}[(\text{pG})_6\text{-c(RGDfK)}]_2$ の合成

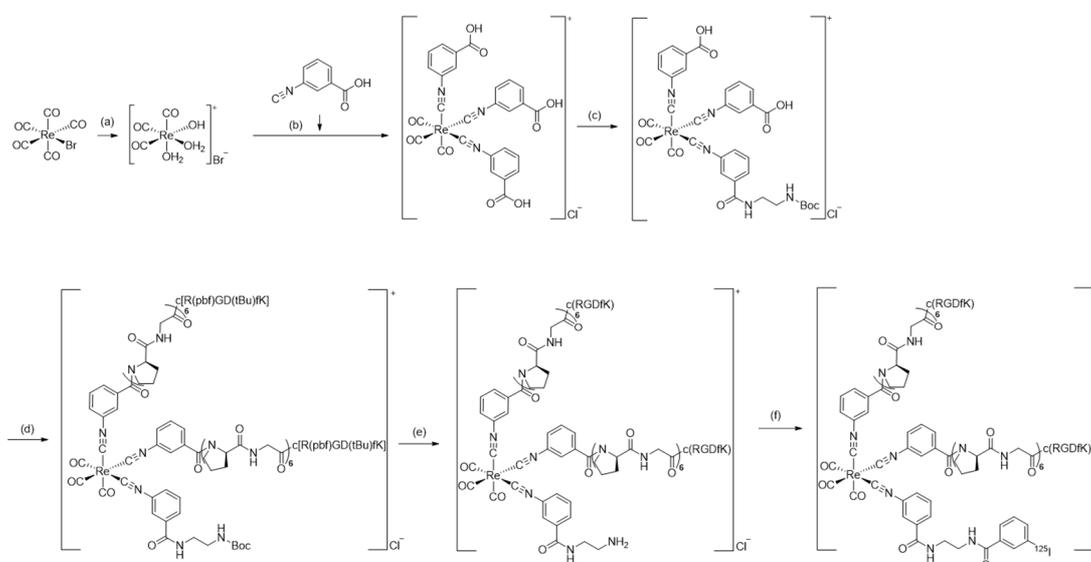
足場分子としてグルタミン酸 (E) を有する 2 価 RGD (図 1C) を、以下に示すスキームに従って合成した。



(a) 2,3,5,6-tetrafluorophenol, WSCD·HCl, DMF (b) H-(pG)₆-c[R(pbf)GD(tBu)fK]·HCl (c) TFA, triisopropylsilane, water (d) [¹²⁵I]-SIB, 0.1 M B.B. (pH 9.0).

$[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{CN-Et-}^{125}\text{I})\text{IB}(\text{CN-(pG)}_6\text{-c(RGDfK)})_2]^+$ の合成

足場分子としてオクタヘドラル型レニウム錯体を有する 2 価 RGD (図 1D) を、以下に示すスキームに従って合成した。



(a) Water (b) 0.1M A.B. (pH 5.0) (c) *N*-Boc-1,2-diaminoethane, WSCD·HCl, HOBT, DMF (d) H-(pG)₆-c[R(pbf)GD(tBu)fK]·HCl, WSCD·HCl, HOBT, DMF (e) TFA, triisopropylsilane, water (f) [¹²⁵I]-SIB, 0.1 M B.B. (pH 9.0).

(2) In vitro 細胞実験

Integrin $\alpha_v\beta_3$ 陽性細胞として、ヒトグリオーマ細胞である U87MG を用いた。U87MG を 24 ウェルプレートに播種し、一晩インキュベートした後に細胞取り込み実験を行った。各 RI 標識体を U87MG と 37 °C で 2 時間インキュベートした後に、未結合の RI 標識体を除去するため細胞を 2 回洗浄した。その後、細胞を 0.25 M NaOH で溶解し、溶解液の放射能をガンマカウンターで、タンパク量を BCA アッセイで求めた。これらの実験から、インキュベート 2 時間後における各 RI 標識体の U87MG への集積量を %Dose/mg protein の値で評価した。

各 RI 標識体の U87MG からの解離の経時変化は、各 RI 標識体を U87MG と 2 時間インキュベートした後、細胞を 2 回洗浄し、次いで標識体を含まないバッファー中で U87MG を 1, 5, 10, 60 分インキュベートすることで評価した。解離開始後の各タイムポイントにおける RI 標識体の細胞への残存量は、インキュベート 2 時間後における集積量の評価と同様に、%Dose/mg protein の値で評価した。また、キレート効果の関与をより詳細に検討するため、50 μM の c(RGDyV) 存在下における解離速度を併せて評価した。

4. 研究成果

今回新たに設計・合成した ^{125}I 標識 2 価 RGD ペプチドと、我々がこれまでにキレート効果を発揮することを見出した 6 価 RGD ペプチド ($^{99\text{m}}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_6]^+$) の構造を図 1 に示す。多価 RGD ペプチドの化学構造は大きく 3 つに分けることができ、1 つ目は RGD ペプチド、2 つ目はスペーサ構造、3 つ目は足場分子である (図 2)。我々の先行研究において、スペーサ構造として 6 ユニットの (DPro-Gly) が適していることを示す結果が得られたため、本研究ではスペーサ構造として (DPro-Gly)₆ を選択した。足場分子については、剛直性の高いテレフタル酸とオクタヘドラル型レニウム錯体、柔軟性の高いグルタミン酸を有する 2 価 RGD ペプチドを合成した。なお、オクタヘドラル型レニウム錯体に関しては、シス位に 2 つの RGD ペプチドを有する錯体を評価に用いた。

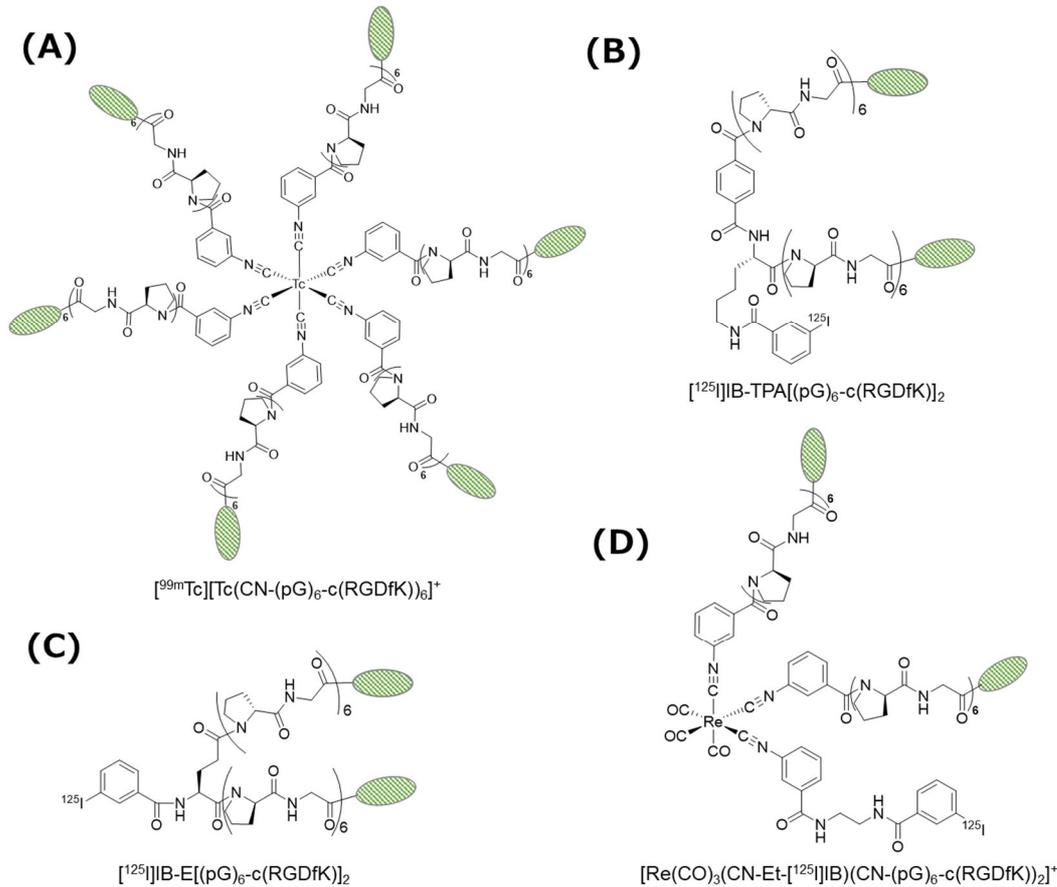


図1. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識6価RGDと ^{125}I 標識2価RGDの化学構造



図2. 多価RGDの化学構造の模式図

3 つの ^{125}I 標識 2 価 RGD ペプチドを用いて細胞取り込み実験を実施したところ、どの化合物においても解離速度は非常に速やかであった (図 3B~D)。また、 $\text{c}(\text{RGDyV})$ 存在下における解離速度を併せて評価したところ、その解離速度は $\text{c}(\text{RGDyV})$ 非存在下における結果と同程度であった。以上の結果よりこれらの化合物は、少なくとも *in vitro* 実験条件下においては、複数の integrin $\alpha\beta 3$ と同時結合できていないことが示唆された。一方、我々が既に報告しているオクタヘドラル型テクネチウム錯体は、1 分子の錯体内に 6 分子の RGD ペプチドを有しているが、integrin $\alpha\beta 3$ 陽性細胞からの解離速度が非常に遅く、またその解離速度は $\text{c}(\text{RGDyV})$ 存在下において著しく上昇した (図 3A)。以上の結果は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_6]^+$ が複数の integrin $\alpha\beta 3$ と同時結合可能であることを示している。

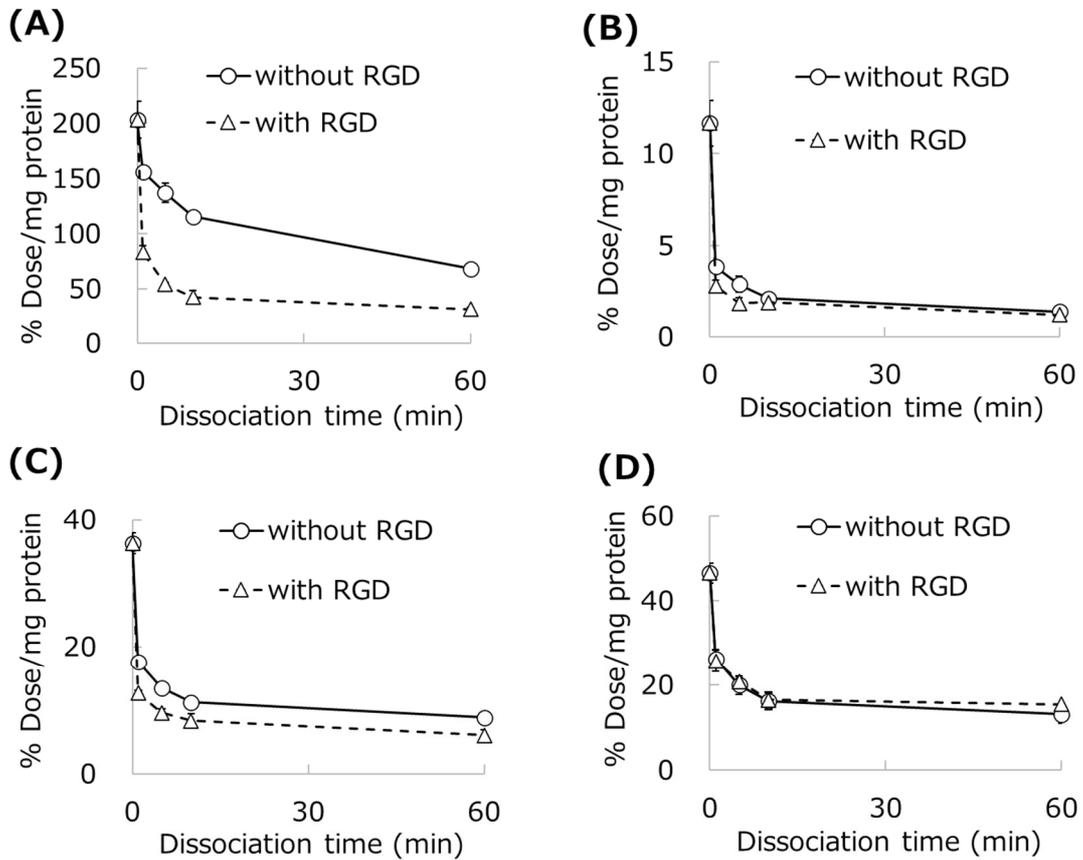


図3. RI標識多価RGDペプチドのU87MGからの解離の経時変化 (A) $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_6]^+$ (B) $^{125}\text{I}[\text{IB-TPA}[(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_2]$ (C) $^{125}\text{I}[\text{IB-E}[(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_2]$ (D) $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{CN-Et-}^{125}\text{I}[\text{IB}](\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_2)]^+$

$^{99m}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_6]^+$ と $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{CN-Et-}^{125}\text{I}[\text{IB}](\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_2)]^+$ の化学構造を比較すると、両化合物共に足場分子としてオクタヘドラル型金属錯体を有しているが、 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{CN-Et-}^{125}\text{I}[\text{IB}](\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_2)]^+$ はシス位のみ RGD ペプチドのペアを有している一方、 $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_6]^+$ はシス位とトランス位両方の組み合わせで RGD ペプチドのペアを有している。そのため、トランス位に存在する RGD ペプチドの組み合わせで複数の integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ と同時結合可能であると仮定すると、 $^{99m}\text{Tc}[\text{Tc}(\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_6]^+$ は同時結合できた一方、 $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{CN-Et-}^{125}\text{I}[\text{IB}](\text{CN}-(\text{pG})_6\text{-c}(\text{RGDfK}))_2)]^+$ は同時結合できなかったという結果を矛盾なく説明することができる。以上の考察を踏まえると、オクタヘドラル型金属錯体のトランス位に RGD ペプチドのペアを有する化合物であれば、複数の integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ と同時結合可能となることが期待できる。

これらの結果は、標的での高い滞留性を示す多価 RGD ペプチドの開発には、リンカー分子と足場分子の両方の化学構造を考慮に入れることの重要性を示しており、integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ 陽性がん細胞を標的とした核医学治療薬の開発に、有用な知見を与えるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Mizuno Yuki, Kimura Kohta, Onoe Satoru, Shukuri Miho, Kuge Yuji, Akizawa Hiromichi | 4. 巻 64 |
| 2. 論文標題 Influence of Linker Molecules in Hexavalent RGD Peptides on Their Multivalent Interactions with Integrin v 3 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry | 6. 最初と最後の頁 16008 ~ 16019 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jmedchem.1c01396 | 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 水野雄貴、木村倅大、尾江悟、宿里充穂、久下裕司、秋澤宏行 |
| 2. 発表標題 多価RGDのリンカー構造がintegrin v 3陽性細胞との相互作用に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第141年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 水野雄貴、宮本莉里、尾江悟、宿里充穂、久下裕司、秋澤宏行 |
| 2. 発表標題 2価環状RGDペプチドのスペーサ構造がintegrin v 3陽性細胞との相互作用に与える影響 |
| 3. 学会等名 第4回日本核医学会分科会 放射性薬品科学研究会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
|---------|---------|