

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18082

研究課題名（和文）PSMA標的ペプチド-MRI造影剤による前立腺癌特異的MRI画像診断法の開発

研究課題名（英文）PSMA-targeted peptide-MRI contrast agent for prostate cancer-specific MRI imaging

研究代表者

小島 由太 (Kojima, Yuta)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00792334

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）：本研究では、低被ばくかつ汎用性が高い前立腺癌特異的画像診断モダリティとして新規PSMA結合ペプチドとガドリニウム造影剤による治療効果モニタリング法の確立を目指し、研究を実施した結果、PSMA結合ペプチド（L7）を見出した。L7ペプチドとガドリニウム（Gd）と結合させたL7-Gd-錯体合成に成功した。L7-Gd-錯体が前立腺癌組織に特異的に集積することを確認した。MRI設置施設の問題から、治療効果のMRIによるモニタリング試験に遅れが生じたため、令和5年以降もL7-Gd錯体を用いて、今後、抗腫瘍効果のMRIモニタリング法検討を継続して検討する予定である。得られた研究成果は、論文発表予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本薬剤が前立腺癌に特異的に集積することから、学術的に前立腺癌の進展過程を検出できるツールとして意義があると考えられる。また前立腺癌の診断、ターゲット生検、転移巣の高精度検出など幅広い診療シーンで使用可能なモダリティとして期待され、さらに抗癌剤等を結合させることができれば、将来的には、前立腺癌特異的な治療が実現するため、より低侵襲な前立腺癌治療につながる社会的意義が非常に高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish a treatment efficacy monitoring method using a novel PSMA-binding peptide and gadolinium contrast agent as a low-exposure and versatile prostate cancer-specific imaging modality, and as a result, we discovered a PSMA-binding peptide (L7). Since there was a delay in the MRI monitoring of the therapeutic effect due to the problem of MRI facilities, we plan to continue the MRI monitoring of the anti-tumor effect using the L7-Gd complex after 2023. We plan to continue the study of MRI monitoring of the anti-tumor effect using the L7-Gd complex after 2023. The obtained research results will be published in a paper.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：MRI PSMA

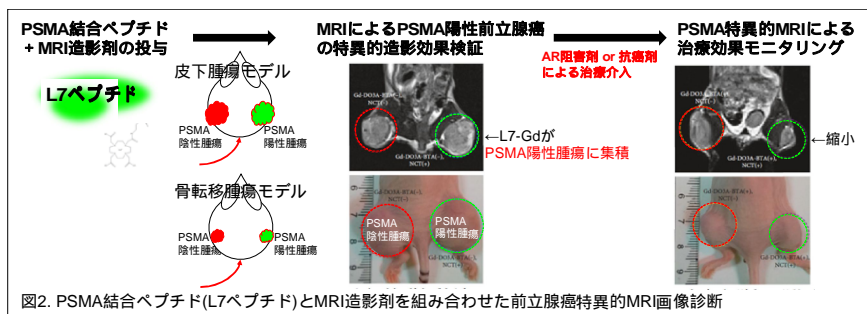
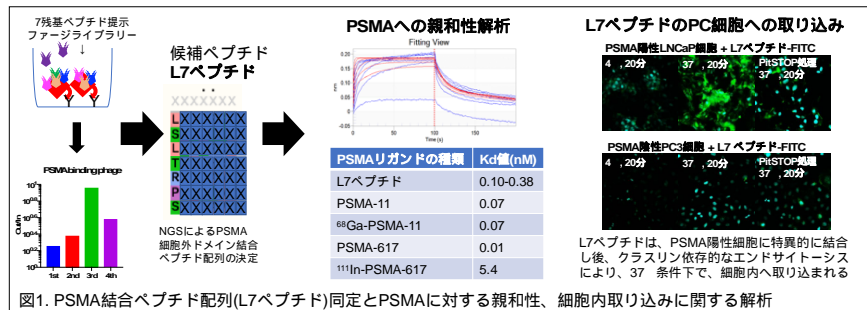
1. 研究開始当初の背景

前立腺癌診断シーンにおいて不要生検の低減は重要な課題であり、本邦では2017年からMRIで見える癌病巣をピンポイントで狙い撃ちできるMRIターゲット生検が先進医療として開始され、より低侵襲な前立腺癌の確定診断が可能になってきた。さらに前立腺癌治療のモニタリングに関しては、欧米諸国を中心にPSMA-PETによる画像診断法が普及し、既存のMRI、PET/CTおよび骨シンチグラフィなどの画像診断よりも鋭敏かつ高精度に前立腺癌の病変検出が可能となり、前立腺癌診断および治療モニタリングにおける画像診断のパラダイムシフトが起きている。しかしながら、本邦では、欧米諸国と比較し、MRIターゲット生検の普及率は低く、PSMA-PETにいたっては、放射性同位元素に起因する被曝の問題から本邦未承認であり、前立腺癌特異的画像診断モダリティが必要である。

2. 研究の目的

最近、弘前大学泌尿器科では、ランダムペプチド配列を提示するファージライブラリーを用いたファージディスプレイ法により、PSMAに特異的に結合する7残基のペプチド配列(*L7ペプチド,*特許申請中)を同定した。*In vitro*の検討からPSMA分子にKd 0.1~0.38 nMで結合し、PSMA陽性細胞に特異的に結合した後、クラスリンを介したエンドサイトーシスにより、37°C条件下で、30分以内に

細胞内へ取り込まれることを明らかにした(図1)。L7ペプチドは、既存の低分子PSMAリガンドと同等の性質を示し、前立腺癌特異的画像診断のデリバリーペプチドとして、有用であると期待される。本研究では、同定したPSMA標的L7ペプチドにガドリニウム(Gd)錯体を結合させた造影剤



を合成し、PSMA陽性腫瘍への集積をMRIでモニタリングし、前立腺癌特異的MRI画像診断に使用可能な新規薬剤の開発を試みる(図2)。

3. 研究の方法

前立腺癌特異的MRI画像診断法を確立するため以下の計画で検討を進める。

令和2年度の計画

I. L7ペプチドの毒性試験

L7 ペプチドの投与による毒性試験のため、ヌードマウスに L7 ペプチド (1, 10, 100, 250, 500 mg/kg) を投与し、投与後 3 時間まで、連続して観察し、投与翌日から、1 日 1 回体重測定、14 日間観察を行い、体重減少など異常所見が見られないかを観察する。エンドポイントに達した個体は、速やかに剖検し、イソフルランガスの吸入麻酔下で全採血により、安楽死させ、血液生化学検査を実施する。また各器官および組織を肉眼的に観察し、肉眼的異常が認められる場合には、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作成し、病理学的検査を行う。

II. L7 ペプチドの組織集積性の検討

ヌードマウスの左背部に PSMA 陰性ヒト前立腺癌細胞 PC3 (1×10^6 個/マウス)を、右背部に PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 LNCaP (2×10^6 個/マウス)を播種した Dual tumor モデルに蛍光標識ペプチド (L7-FITC) を尾静脈投与 (1 mM/マウス) し、*in vivo* imaging system (IVIS) で蛍光標識 L7 ペプチドの PSMA 陽性腫瘍への集積の観察、撮影 (投与後 5, 10, 20, 30, 60 および 120 分後) を行う。投与後 120 分の撮影後、腫瘍部を切除し、凍結切片を作製し、蛍光集積を観察する。

III. L7 ペプチド-Gd 錯体(L7-Gd)の合成および皮下腫瘍マウスモデルにおける L7-Gd 投与後の MRI によるモニタリング

MRI によるモニタリングのために L7 ペプチドの C 末端の側鎖に DOTA-monoamide-MI をつけて、Gd 錯体としたものを合成する。ヌードマウスの左背部に PSMA 陰性ヒト前立腺癌細胞 PC3 (1×10^6 個/マウス)を、右背部に PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 LNCaP (2×10^6 個/マウス)を播種した Dual tumor モデルに L7-Gd を尾静脈投与 (0.01 mM/マウス) し、小動物用 PET/MRI で L7-Gd の PSMA 陽性腫瘍への集積のモニタリング (投与後 5, 10, 20, 30, 60 および 120 分後) を行う。

IV.骨転移腫瘍マウスモデルにおける L7-Gd 投与後の MRI によるモニタリング

イソフルラン麻酔下でヌードマウスの尾動脈より PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 LNCaP C4-2 (4×10^6 個/マウス)を播種して、作製した骨転移 tumor モデルに L7-Gd を尾静脈投与 (0.01 mM/マウス) し、小動物用 PET/MRI で L7-Gd の PSMA 陽性骨転移腫瘍への集積のモニタリング (投与後 5, 10, 20, 30, 60 および 120 分後) を行う。同様に PSMA 陰性ヒト前立腺癌細胞 PC3 細胞を用いた検討も行う。

令和 3 年度以降の計画

前年度に確立した MRI における L7 ペプチド-Gd 錯体の組織集積性の検討結果を踏まえ、皮下腫瘍、骨転移モデルにおける AR 阻害剤あるいは、抗がん剤による治療効果を L7 ペプチド-Gd 錯体投与による MRI 画像解析にて、モニタリング可能かどうか検討する。

4 . 研究成果

I. L7 ペプチドの毒性試験

MRI によるモニタリングのために L7 ペプチドの C 末端の側鎖に DOTA-monoamide-MI をつけて、Gd 錯体としたものを合成した。ペプチド自動固相合成機を使用し、C 末端より 9-fluorenylmethoxycarbonyl 法 (Fmoc 法)によりペプチド鎖を構築し、LHGRSSMC の保護ペプチド樹脂の合成を行った。保護ペプチド樹脂を乾燥し、トリフルオロ酢酸処理により脱保護と樹脂担体からの切り出しを行った。得られた粗ペプチドを液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した後、Cys 残基側鎖と DOTA-MA のマレイミド基との結合を行い、HPLC にて中間体 (LHGRSSMC-DOTA monoamide) を精製した。中間体に Gd 錯体化し、再度 HPLC にて精製した。精製物を分析用 HPLC・質量分析ならびにアミノ酸分析により検定し、目的のペプチド-Gd 錯体である事を確認した。L7 ペプチドの Maus への尾静脈投与による最大投与量を調べるために、10mM, 100mM, 250mM のペプチドを尾静脈投与した。その結果、250mM 濃度(34.25 mg)の L7 ペプチド 100 μ L の尾静脈投与により、Maus が投与直後に死亡した。250mM 濃度(34.25 mg)の L7 ペプチド 100 μ L の腹腔内投与および 100 mM 濃度 (13.7mg) の L7 ペプチド 100 μ L 以下の尾静脈投与では、投与後、1ヶ月に渡って顕著な体重減少などの副作用は、認められなかった (図 3)。

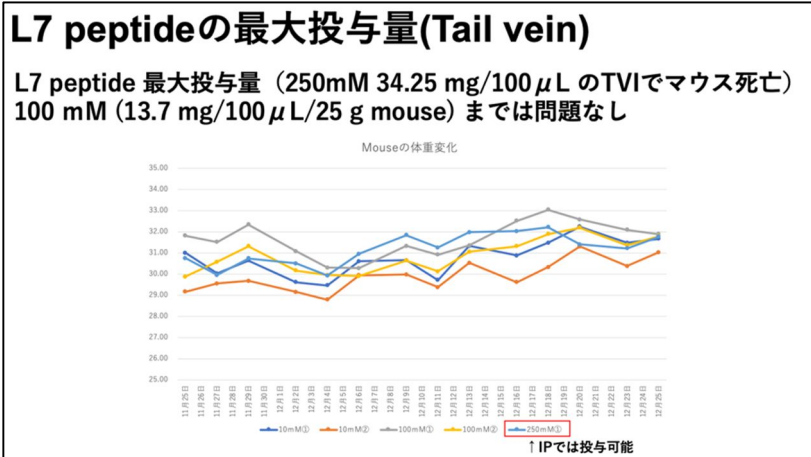


図 3. L7 ペプチドの Maus への最大投与量の検証

II. L7 ペプチドの組織集積性の検討

PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 (LNCaP)、PSMA 陰性ヒト前立腺癌細胞 (PC3) をそれぞれ、ヌード Maus 大腿部に播種した担癌ヌード Maus (腫瘍径各 7mm) における L7-FITC の腫瘍集積性の検討するため、担癌ヌード Maus (左大腿部腫瘍 PC3、右大腿部腫瘍 LNCaP) に生理食塩水で溶解した L7-FITC (0.1 mmol/kg /mouse 100 μ L) を尾静脈投与にて投与後、IVIS にてモニタリングした。その結果、L7-FITC は、投与後、全身に強い蛍光を示し、120 分後には、PSMA 陽性 LNCaP 腫瘍に集積性を示し、PSMA 陰性 PC3 細胞への集積より、蛍光強度が高いことが明らかとなった (図 4)。

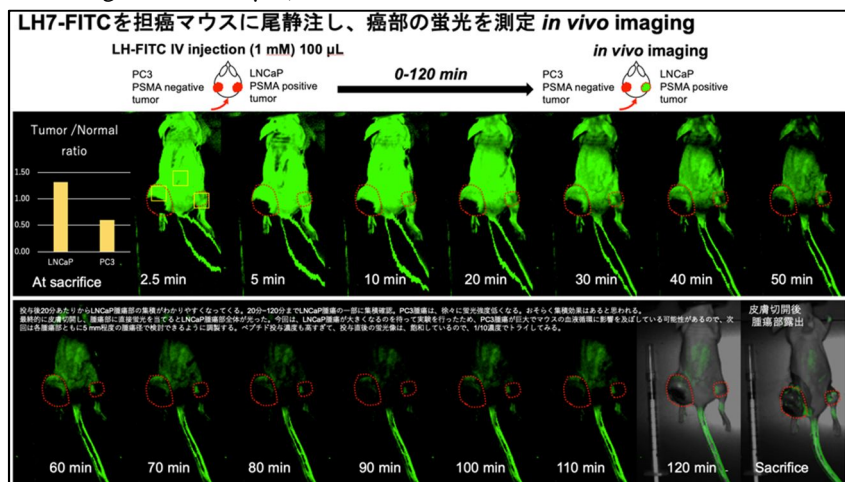


図 4. IVIS による L7-FITC の腫瘍集積性の検討

III. L7 ペプチド-Gd 錯体(L7-Gd)の合成および皮下腫瘍 Maus モデルにおける L7-Gd 投与後の MRI によるモニタリング

PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 (LNCaP)、PSMA 陰性ヒト前立腺癌細胞 (PC3) をそれぞれ、ヌードマウス大腿部に播種した担癌ヌードマウス (腫瘍径各 7mm) における L7-Gd の腫瘍集積性の検討するため、担癌ヌードマウス (左大腿部腫瘍 PC3、右大腿部腫瘍 LNCaP) に生理食塩水で溶解した L7-Gd (0.1 mmol/kg = 4.39 mg/mouse 100 μ L) を尾静脈投与にて投与後、1 時間 7 テスラの MRI にてその集積性を T1 強調画像にてモニタリングした。その結果、L7-Gd は、PSMA 陽性 LNCaP 腫瘍に強い集積性を示し、PSMA 陰性 PC3 細胞への集積はほとんど認めなかった。

L7-Gd は、腎臓への集積が認められ腎排泄であることが示唆された。以上の結果から、L7-Gd は、PSMA 陽性細胞へ投与後、25 分以内に集積する腫瘍集積性の Gd 錯体であることが示された (図

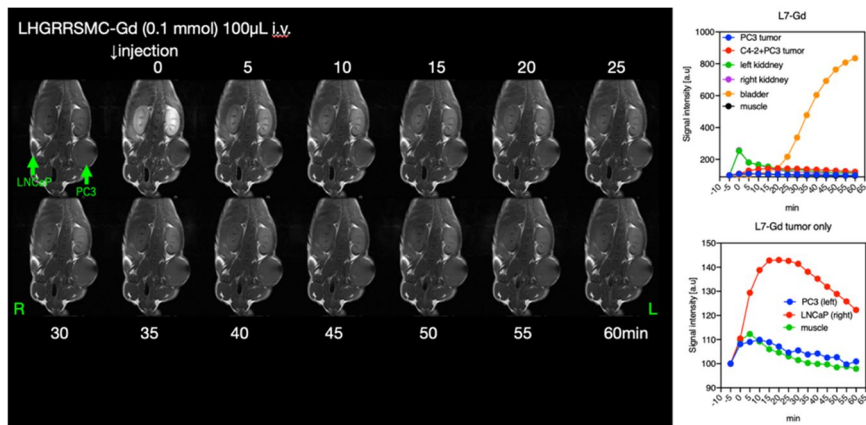


図 5. L7-Gd の LNCaP および PC3 担がんマウスへの集積

5)。

IV. 骨転移腫瘍マウスモデルにおける L7-Gd 投与後の MRI によるモニタリング

研究開始初年度より、最終年度まで [Nature Communications](#) volume 9, Article number: 2981 (2018) に記載されている尾動脈注入法による前立腺癌骨転移モデル構築の検討を実施したが、実験者の手技が未熟であったため、上記論文に記載されているような骨転移モデルの再現ができなかったと考えられる。そのため、骨転移モデル構築は断念せざるをえなかった。

令和 3 年度以降の計画

令和 3 年以降の計画に関して、MRI 集積データを踏まえ、L7 ペプチド-Gd 錯体による治療効果モニタリング実験を実施する計画を立てたが、MRI 設置施設である青森県量子科学センターの新型コロナ禍の影響で遺伝子組み換え動物実験の施設整備が当初の予定通り進まず遺伝子組み換え動物を用いた MRI モニタリング実験実施が不可能となった。このため、PSMA 標的治療効果モニタリング実施が困難と判断し、令和 3 年度後半から、腫瘍血管を標的ペプチドのファージスクリーニングを開始し、前立腺腫瘍に集積する D 型アミノ酸ペプチドを同定した (特許申請準備中のため、データ非公表)。得られたペプチドと抗がん剤 MMAE のペプチド薬物複合体の前立腺癌における抗腫瘍効果を検討した (特許申請準備中のため、データ非公表)。

令和 5 年度後半に MRI 設置施設の遺伝子組み換え動物実験施設整備が完了となる見込みであり、本研究期間終了後に皮下腫瘍モデルでペプチド薬物複合体の抗腫瘍効果の MRI モニタリング検討を継続する。これらの研究成果の発表を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------