

令和 5 年 6 月 1 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：20K18106

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中性子捕捉療法の開発

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

研究代表者

久保田 優花（Kubota, Yuka）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30866926

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、低被ばくかつ治療効果が高い前立腺癌特異的な画像診断 + 治療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中性子捕捉療法の確立を目指し、研究を実施し結果、PSMA結合ペプチド（L7あるいは、R7）を見出した。L7ペプチドは、ガドリニウム（Gd）と結合させたL7-Gd-錯体の合成に成功した。さらに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。中性子照射施設の問題により、中性子捕捉実験に遅れが生じたため、令和5年以降も本L7-Gd錯体を用いて、今後、中性子捕捉療法の抗腫瘍効果の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、さらに検出した病変に対して、中性子捕捉療法の抗腫瘍効果が明らかとなれば、将来的には、前立腺癌特異的な高精度放射線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 have investigated the use of a novel PSMA-binding peptide (L7 or R7) and a gadolinium contrast agent for neutron capture therapy as a low exposure and highly effective diagnostic imaging and treatment modality for prostate cancer. The L7 peptide was successfully combined with gadolinium (Gd) to form the L7-Gd-complex. Furthermore, we confirmed that the L7-Gd-complex accumulates specifically in prostate cancer tissue. Since the neutron capture experiment was delayed due to the problem of the neutron irradiation facility, we will continue to investigate the anti-tumor effect of neutron capture therapy using this 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 中性子捕捉療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

欧米諸国を中心に前立腺癌病変の高精度検出が可能な PSMA-PET が普及し、さらに ¹⁷⁷Lu-PSMA リガンドによる前立腺癌標的の内照射療法も開発され、前立腺癌の画像診断および治療を同時に行えるモダリティによる前立腺癌治療のパラダイムシフトが起きている。しかしながら、本邦では放射性同位元素に起因する被曝の問題から PSMA-PET および ¹⁷⁷Lu-PSMA は本邦未承認であり、より低被ばくで治療効果が高い前立腺癌特異的画像診断 + 治療モダリティが必要である。MRI の造影剤として使用される金属のひとつであるガドリニウム(Gd)は、熱中性子捕捉面積が大きく、中性子捕捉療法(Neutron Capture Therapy, NCT)の薬剤候補として注目されている。GdNCT は、Gd 錯体を取り込んだ癌細胞に熱中性子線を照射することで、Gd 錯体の核反応により γ 線やオージェ電子が発生し、腫瘍に特異的な細胞傷害作用を示す放射線治療法であり、MRI で腫瘍を確認しながらピンポイントで熱中性子線照射が可能のため、低被ばくで取りこぼしの無いがん治療法の開発への応用が期待される。中性子源の確保が問題であったが、近年、院内に設置可能な小型加速器が実用化され、残す課題は Gd 錯体の腫瘍細胞へのドラッグデリバリーである。

2. 研究の目的

最近、弘前大学泌尿器科では、PSMA に特異的に結合するペプチド配列 (*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 陽性細胞に結合し、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、PSMA-GdNCT 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

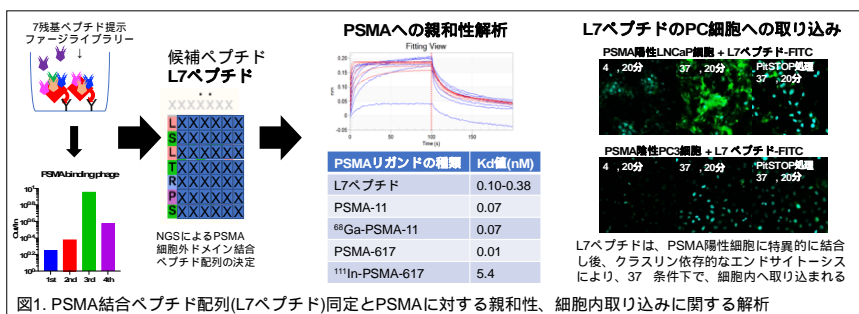


図1. PSMA結合ペプチド配列(L7ペプチド)同定とPSMAに対する親和性、細胞内取り込みに関する解析

MRI でモニタリングし、中性子捕捉療法による抗腫瘍効果を検討する (図 2)。

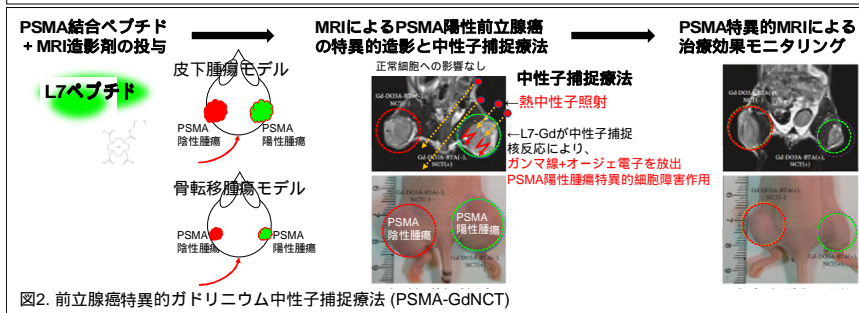


図2. 前立腺癌特異的ガドリニウム中性子捕捉療法 (PSMA-GdNCT)

3. 研究の方法

前立腺癌特異的 GdNCT 確立のため、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-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 (1×10⁶個/マウス)を、右背部に PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 LNCaP (2×10⁶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。

II. 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 (4×10⁶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、L7 ペプチド-Gd 錯体投与後、各腫瘍部位に十分に L7 ペプチド-Gd 錯体が集積したタイミングで、中性子捕捉療法を実施する。皮下腫瘍、骨転移モデルにおける L7 ペプチド-Gd 錯体投与後のマウスに対する中性子捕捉療法の抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

I. 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(図3)。

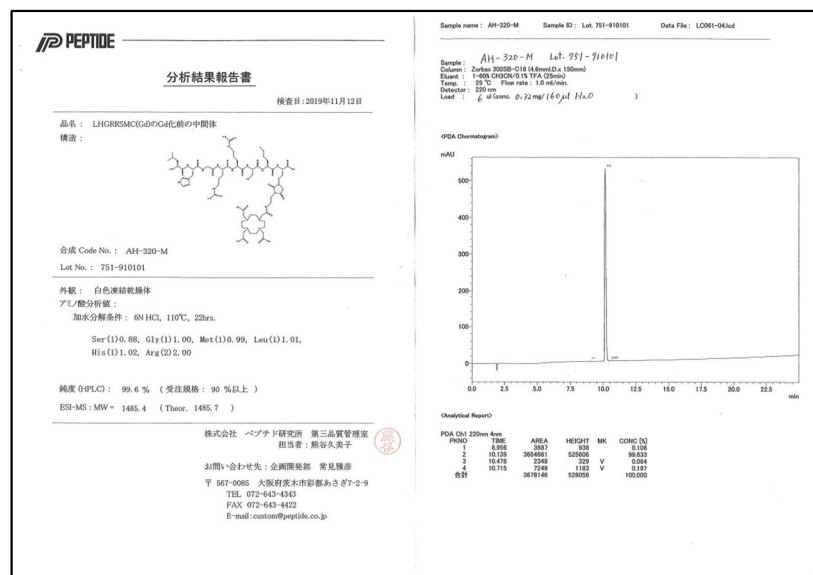


図3. L7 ペプチド(LHGRSSMC)の Cys 残基側鎖と DOTA-monoamide MI のマレイミドリンカーで結合させた LHGRSSMC-DOTA monoamide 中間体の合成結果

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 4)。

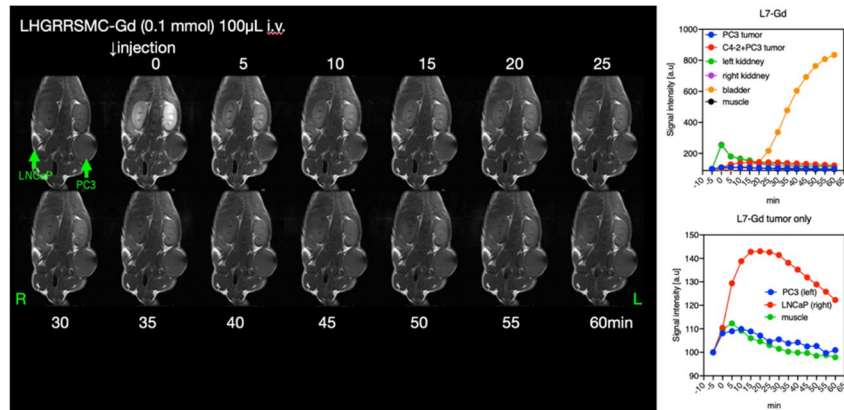


図 4. L7-Gd の LNCaP および PC3 担がんマウスへの集積

II. 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。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-Luc

(4×10^6 個/マウス) を播種して、骨転移マウスモデルの構築を試みたが、尾動脈への注入手技の難易度が高く、細胞を注入しても、図 5 のように尾の付け根で細胞が血圧に負けてとどまってしまう、うまく下肢骨へ播種することができなかった。血圧を弱めるため、イソフルラン麻酔強度を上げた検討も実施したが、同様の結果となり、うまく下肢骨へ腫瘍細胞を播種することができなかった。

本研究においては、実験者の手技が未熟であるため、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。

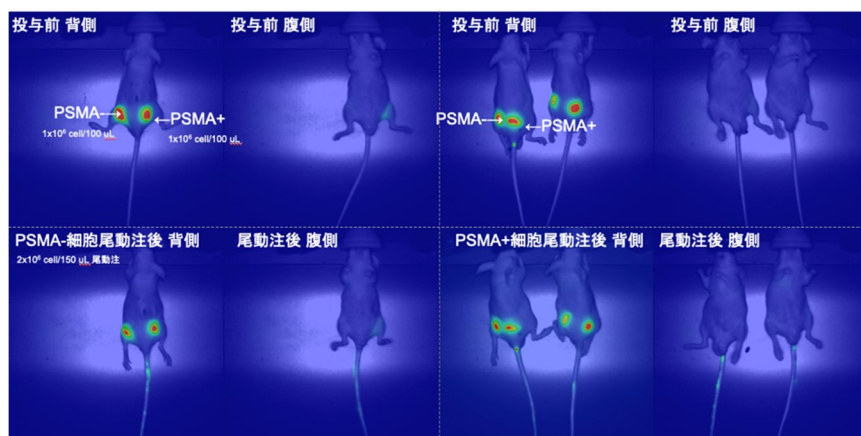


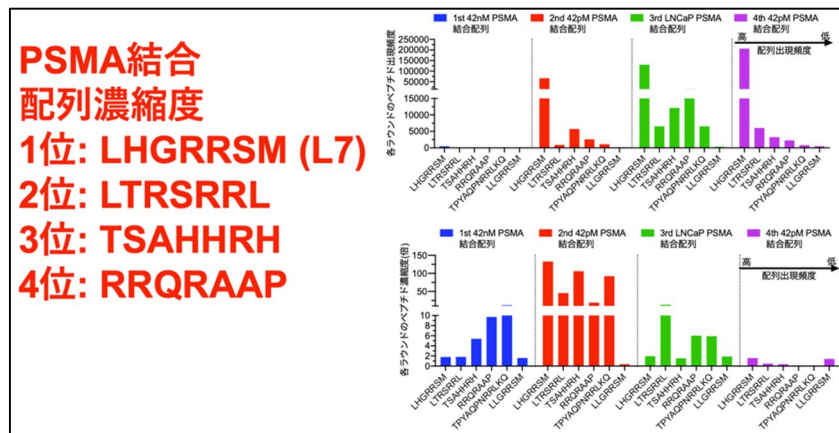
図 5. 尾動脈投与前後の Luciferase 陽性 LNCaP C4-2 の分布

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、腫瘍部位に L7 ペプチド-Gd 錯体が集積したタイミングで中性子捕捉療法を実施する計画を立てたが、中性子照射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中性子捕捉療法実験実施が不可能となった。このた

め、PSMA を標的とした中性子捕捉療法実施が困難と判断し、令和 3 年度後半から、L7-ペプチドよりも PSMA に親和性が高い新たなペプチドをファージスクリーニングプールから、再検討した。その結果、配列濃縮率の高い 3 種類のペプチド候補 (LTRSRRL, TSAHHRH,RRQRAAP) を得た (図 6)。

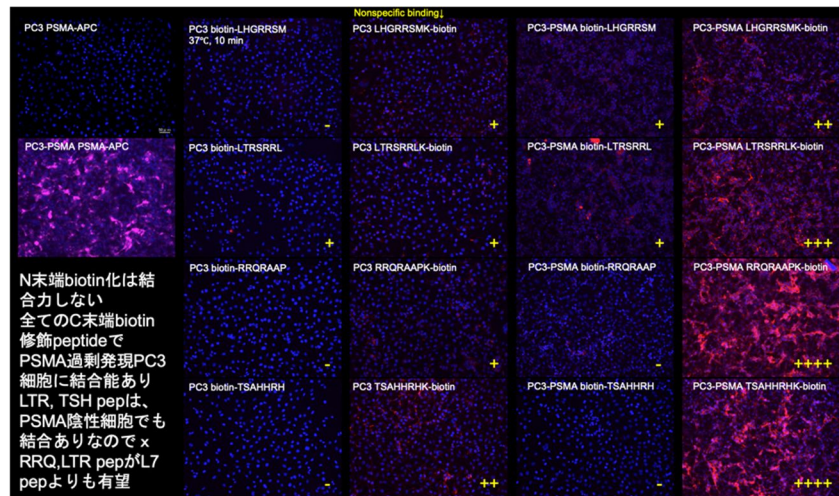
図 6 ファージディスプレイスクリーニングにおける PSMA 結合配列の配列濃縮率



配列濃縮度が高い 3 種のペプチドと L7 ペプチドの細胞内取り込みを PSMA を過剰発現させた PC3-PSMA+細胞に対して実施した。との親和性検討や細胞内取り込みを検討した (図 7)。

図 7. 4 種の PSMA 結合ペプチドの PSMA 陽性、陰性細胞に対する結合量の比較

図 7 の結果、L7 ペプチドの染色強度と比較し、RRQRAAP ペプチドの染色強度が非常に高く PSMA 陰性 PC3 細胞に対する非特異的結合が低いことが明らかとなり、L7 ペプチドと同様 PSMA に結合するペプチドとして、RRQRAAP (R7) ペプチドを PSMA 結合ペプチドとして選択した。



以上の結果から、PSMA に結合する R7 ペプチドを新たに同定したため、今後 R7 ペプチドと L7 ペプチドに Gd あるいは、ホウ素を結合させた薬剤を合成し、青森県量子科学センターの遺伝子組み換え動物実験施設整備が完了した段階で中性子捕捉療法による抗腫瘍効果について検討を実施する予定である。

現在のところ、令和 5 年度後半に中性子照射施設である青森県量子科学センターにおける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るため、本研究期間終了後に皮下腫瘍モデルにおける中性子捕捉療法の抗腫瘍効果検討を継続する。これらの研究成果を泌尿器科学会で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
---------	---------