

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02794

研究課題名(和文)がん幹細胞結合ペプチドと高エネルギー線核種を融合した核医学治療の開発

研究課題名(英文)Development of radionuclide therapy with a fusion of CSC binding peptides and high energy alpha nuclides

研究代表者

吉本 光喜(Mitsuyoshi, Yoshimoto)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・主任研究員

研究者番号：00345638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：CD44結合ペプチドとして報告されている化合物を基に、¹¹¹In等の金属核種を標識するためのキレート剤(DOTA)を結合した3種のペプチド(DOTA-A5G27、DOTA-RP-1、DOTA-P7)を合成した。すべてのペプチドに対し、¹¹¹Inを高収率で標識することができた。さらに、²²⁵Ac標識も検討したが、標識効率が悪いことを確認した。今回検討した3化合物について薬物動態試験を行ったが、腫瘍への集積は著しく低かった。ヒアルロン酸ナトリウムを使ったインビトロ競合阻害実験では、¹¹¹In-DOTA-RP-1に対して阻害効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD44結合ペプチドとして報告されている化合物を参考に、核医学治療薬剤の開発を試みた。キレート剤を結合させることにより、放射性金属核種(¹¹¹Inや²²⁵Ac)を標識することは可能であった。しかしながら、治療可能な照射線量を付与できる腫瘍集積を確認することはできなかった。投与後早期から肝臓への高集や速やかな体外排泄が、腫瘍集積を妨げる要因であると考えられた。これらの知見は、核医学治療用ペプチドの開発を進めるうえで、非常に意義あるものとする。

研究成果の概要(英文)：Based on compounds that have been reported as CD44-binding peptides, three types of peptides (DOTA-A5G27, DOTA-RP-1, DOTA-P7) conjugated with a chelating agent (DOTA) for labeling metal radionuclides such as ¹¹¹In were synthesized. All peptides could be labeled with ¹¹¹In in high yield. Furthermore, ²²⁵Ac labeling was also investigated, but it was confirmed that the labeling efficiency was poor. We investigated the pharmacokinetics of ¹¹¹In-labeled peptides in BxPC-3 and U-87 MG bearing nude mice. Unfortunately, the tumor uptake of these peptides was extremely low. In in vitro competitive inhibition experiments, the tumor uptake of ¹¹¹In-DOTA-RP-1 was inhibited by hyaluronic acid.

研究分野：核医学治療

キーワード：アルファ線核種 ペプチド CD44 がん幹細胞 CD44

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織は、がん細胞に加え、がん間質細胞、悪質液、またそれに伴う微小環境など多くの多様性を含んでいる。また、がん細胞自身、遺伝的及び表現型の特徴が変化することは知られている。そのため、がん細胞の多様性に基づいて治療戦略を設計することが、効果的な治療を行う上で重要となる。特に、がん幹細胞はがん組織中に 0.1%～数%以下しか存在していないが、高い自己修復能や増殖能、腫瘍形成能を持つことが知られており、治療抵抗性や再発の要因となっている。従って、がんの根治を目指すためには、がん幹細胞を標的にしたがん治療戦略の開発が必要である。

ヒアルロン酸レセプターとして知られている CD44 (Cluster of differentiation-44) は、代表的ながん幹細胞マーカーの一つとして知られている。CD44 は 1 回膜貫通型糖タンパク質で、選択的スプライシングによりいくつかのバリエーションアイソフォーム (CD44v) が存在する。CD44v はシスチントランスポーター (xCT) の安定化に寄与しており、シスチンの取り込みが亢進することにより抗酸化物質グルタチオン合成が促進され、酸化ストレス耐性を獲得していることが報告されている。CD44 は、がん幹細胞に加え、膵臓がんや結腸癌、乳がんなどで発現亢進しており、転移に関連していることが報告されている。

アルファ線は、「高い線エネルギー付与 (LET ; 50-230keV/ μm)」と「超短飛程 (100 μm 以下)」が最大の特徴である。中でも、申請者が着目した ^{225}Ac は、多段階壊変 (α 壊変 4 回、 β 壊変 2 回) により 27.5MeV の高エネルギーと 9.9 日の半減期を有しており、がん治療を行う上で非常に魅力的な物理的性質を有している。一般的な治療用核種である ^{90}Y は、低 LET ベータ線 (0.2keV/ μm) のみを放出し、酸素や水分子を電離・励起することにより活性酸素種を産生し、DNA に障害を与える。しかし、CD44v が発現している腫瘍では、酸化ストレス耐性機構を有しているため、既存の放射線治療に対して抵抗性を有している。一方、アルファ線は DNA を直接電離・励起できるため、不可逆的な DNA 障害を与える。従って、がん幹細胞を含んだ酸化ストレス耐性ががん細胞を克服するためには、アルファ線核種の利用が最適であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、多くのがん細胞やがん幹細胞での発現が確認されている CD44 に着目し、新規 ^{225}Ac 標識 CD44 結合ペプチドによるがんの根治を目指した核医学治療を開発する。現在臨床で利用されているベータ線核種は飛程が長いため、標識薬剤が結合した細胞以外にも広範囲に照射し、細胞障害を与えることが可能である。しかし、ベータ線は低 LET 放射線であるため、酸素の電離励起により活性酸素を産生し、DNA 障害を与える (間接作用)。そのため、酸化ストレス耐性を有するがん幹細胞への効果は限定的であり、がんの根治には至らないと考えられている。一方、アルファ線は DNA を直接電離励起し、不可逆的な DNA 障害を与えるため、がん幹細胞に対しても殺細胞効果を示すと期待されている。しかし、アルファ線の飛程は 100 μm 以下と細胞数個分の飛程しかないため、がん幹細胞へのターゲティングが重要である。一方、がん組織中に数%以下しか存在していないがん幹細胞のみを攻撃するのは、非効率的である。

我々が注目している CD44 は、がん幹細胞マーカーの一つであり、膵臓がんや乳がんなどでも発現亢進している。従って、がん幹細胞を含んだがん統合治療を行うには最適な標的分子であり、アルファ線核種で腫瘍組織内を過不足なく照射することが可能である。我々は、新規 CD44 結合ペプチドを開発し、アルファ線核種 ^{225}Ac と組み合わせた核医学治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) CD44 発現解析

ヒト膵臓がん細胞株 (AsPC-1、BxPC-3、PANC-1、PSN-1) 及びヒトグリオーマ細胞株 (U-87 MG) における CD44 発現を、フローサイトメーターを用いて計測した。

(2) ペプチド合成

新規 CD44 結合ペプチドの合成 (DOTA-RP-1, DOTA-P7, DOTA-A5G27) は Fmoc-固相合成法で行った。本年度は、結合親和性を損なわないために、CD44 結合ペプチドの N-末端に Gly を介してキレート剤 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA) を結合させた。固相合成の樹脂として CLEAR-Amide Resin を使い、アミノ酸 (Fmoc-AA-OH) のカップリングには 1-hydroxybenzotriazole (HOBT), N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIPCI) を用いた。また DOTA のカップリングに関しては、tri-t-butyl 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate/HOBT/DIPCI で行った。N-末端まで縮合後、樹脂からの切り出し及びアミノ酸側鎖の脱保護をトリフルオロ酢酸を主成分とする試薬で行い、HPLC で精製後、MALDI-TOF-MS で分子量を確認することにより目的のペプチドが合成されていることを確認した。

(3) 体内動態

ペプチドへの ^{111}In の標識は、3M 酢酸アンモニウム (pH 6.0) 中、 95°C で 15 分間反応させることにより行った。標識率は TLC により確認した。標識したペプチドを、ヒト膀胱がん (BxPC-3) 移植マウスに尾静脈より投与した。投与 1 (又は 10 分)、4、24 時間後に屠殺し、腫瘍を含む各組織を採取した。組織重量を測定後、ガンマカウンターにて放射能を測定し、組織重量集積率及び腫瘍正常組織比を算出した。

(4) インビトロ阻害実験

本実験では CD44 阻害剤としてヒアルロン酸ナトリウムを用いた。BxPC-3 細胞にヒアルロン酸ナトリウム (10 ~ 100 μg) を加え、10 分間 37°C でプレインキュベーションを行った。次に、 ^{111}In -DOTA-P7 または ^{111}In -DOTA-RP-1 を加え、さらに 30 分間インキュベーションを行った。遠心分離にて細胞を回収し、PBS で細胞を洗浄した後、ガンマカウンターで放射能を測定した。

(5) ^{225}Ac 標識

ペプチドやキレート剤 (DOTA、PCTA、DFO、TCMC、HEHA) への ^{225}Ac 標識は、2M Tris HCl (pH 9) 中、 95°C で 30 分間反応させることにより行った。標識率は TLC により確認した。

4. 研究成果

(1) CD44 発現解析

すべての細胞で CD44 の発現を確認したが、BxPC-3 は低発現、U-87 MG は高発現であった。

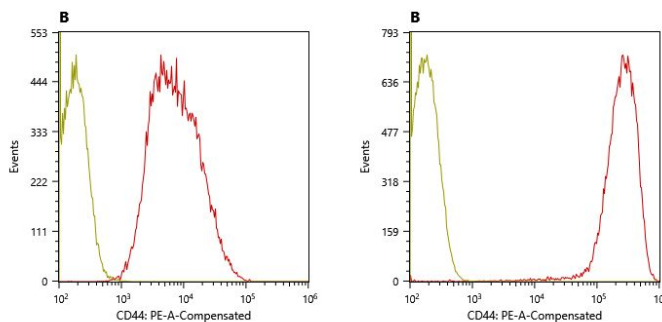


図 1 . BxPC-3 (左) 及び U-87 MG (右) における CD44 発現

(2) 体内動態解析

本研究課題で合成したペプチドを ^{111}In で標識し、BxPC-3 又は U-87 MG 皮下移植モデルにおける体内動態解析を行った。 ^{111}In -DOTA-A5G27 は投与 10 分後から肝臓及び脾臓への集積が顕著に高く、本ペプチドが異物として認識されていることが示唆された。投与 4 時間後における肝臓への集積は 39.8 %ID/g、脾臓への集積は 56.9 %ID/g であった。 ^{111}In -DOTA-P7 及び ^{111}In -DOTA-RP-1 は腎臓への集積が最も高く、投与 4 時間後においてそれぞれ 2.0 及び 10.1 %ID/g であった。しかしながら、すべてのペプチドにおいて腫瘍 (BxPC-3 及び U-87 MG) への集積は低かった。

(3) インビトロ阻害実験

ヒアルロン酸ナトリウムを阻害剤として検討した結果、 ^{111}In -DOTA-RP-1 の U-87 MG 細胞への集積は、ヒアルロン酸ナトリウムにより阻害された。しかしながら、明確な用量依存性は確認されなかった。一方、 ^{111}In -DOTA-R7 に対して明らかな阻害効果は認められなかった。本ペプチドは脂溶性が比較的高いことが想定されるため、細胞膜への非特異的な吸着が阻害効果に影響している可能性が考えられた。

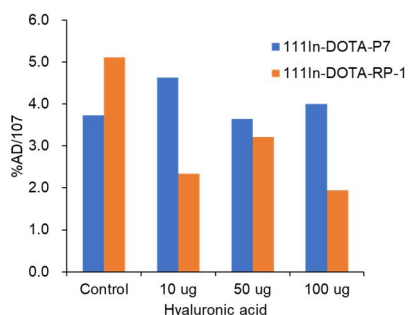


図 2 . ヒアルロン酸ナトリウムによる阻害実験

(4) ^{225}Ac 標識

DOTA-P7 及び DOTA-RP-1 に対して ^{225}Ac 標識を試みた結果、標識率は 37~38 % と非常に低いことが明らかとなった。今回のペプチドは腫瘍集積率が低かったため、治療実験には至らなかったが、今後標識率も考慮した薬剤開発が必要であることが示唆された。今後の開発を見据えて、DOTA 以外のキレート剤への標識について検討を行った。その結果、DOTA 以外にも DFO や TCMC に対して標識可能であることが示唆された。今後さらなる検討を行い、その妥当性について明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 吉本光喜	4. 巻 55
2. 論文標題 ペプチドと高エネルギーアルファ線核種を融合した核医学治療の可能性	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 33-36
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 無
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
研究 分 担 者	和田 俊一 (Wada Shun-ichi) (30278593)	大阪医科薬科大学・薬学部・准教授 (34401)	

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