

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07613

研究課題名(和文)トリプルネガティブ乳がんの標的 線治療に資する放射性薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of radio-labeled compounds for targeted alpha-therapy of triple-negative breast cancer

研究代表者

山田 圭一 (Yamada, Keiichi)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：70323334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：1)ポリプロリンヘリックス型膜透過性ペプチドGPro-CPPを合成し、蛍光法により細胞膜透過性と核への局在を確認した。2)TNBC特異的に発現しているA2B受容体に対する抗体と 線放出核種At-211で標識したCPPの連結に用いる抗体Fc領域特異的標識用環状ペプチドを合成した。3)At-211標識抗腫瘍ペプチドを内封するための高分子ミセルを合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標的 線治療(TAT)は、飛程の短い 線によりDNAに直接ダメージを与えることから副作用の少ない核医学治療法として期待されている。本研究では予後不良のトリプルネガティブ乳がん(TNBC)に特異的に作用するTAT薬剤の開発を目指し、At-211標識抗体とAt-211標識抗腫瘍ペプチドを主剤とする水溶性高分子ミセルの創製に向けた基礎検討を実施した。今回の研究で標識抗体を細胞内に導入するための構成要素となる膜透過性ペプチドを合成し、所定の機能を示すことが分かった。本研究を通じてTNBCの放射線治療に資するTAT薬剤の開発に向けた有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：1)Cell penetrating peptides containing (4S)-guanidino-Pro (GPro), namely GPro-SPP, were synthesized. Fluorescopic analysis suggested that fluorescent-labeled GPro-CPP internalize into cell and localize around nuclei. 2) Cojugated peptide based on GPro-CPP and cyclic peptide for site-specific chemical modification of antibody was synthesized. 3) Amphiphilic polymer including poly(sarcosine) block and poly-(lactic acid) block was synthesized for encapsulation of At-211 labeled antitumor cyclic peptide.

研究分野：生物有機化学

キーワード：標的 線治療 アスタチン-211 トリプルネガティブ乳がん 抗腫瘍ペプチド 膜透過性ペプチド 水溶性高分子ミセル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

トリプルネガティブ乳癌(TNBC)は、乳癌における代表的な3つの増殖因子受容体(エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、ヒト上皮細胞成長因子受容体2(HER2))が関係しない予後不良の悪性腫瘍であり、乳癌患者全体の約20%を占める。乳癌の治療戦略(手術・放射線・ホルモン療法・化学療法)のうち、TNBCの治療には化学療法が推奨されている。乳癌の化学療法薬のうち、抗HER2抗体(ハーセプチン)はHER2陰性のTNBCにおいては治療効果が期待できない。そのため、TNBC特異的な治療標的の同定や有効な薬剤の開発が急務とされているが、有効な薬剤は限られている。治療標的に対する抗体が見つければ腫瘍標的化に利用できるため、適切な抗癌剤と組み合わせることで患部に送達することができる。(能動的ターゲティング)一方、薬剤の種類によっては体内動態の制御が難しく副作用を招く恐れもある。この場合、高分子ミセルなどのナノサイズの薬物キャリアに封入することで腫瘍血管の脆弱性を利用した腫瘍組織への選択的送達(受動的ターゲティング)が可能になり、副作用のリスク軽減につながる。

研究代表者は、海洋天然物由来ペプチドを改変した疎水性環状ペプチド SA-I (cyclo[Phe(4-I)-Leu-MeLeu-Val-Leu], MeLeu = *N*-methyl-Leu)の合成と培養TNBC細胞に対する生物活性に関する研究を行ってきた。その一環として、次世代シーケンサーによる培養乳癌細胞の網羅的遺伝子解析と公共データベースを活用したTNBC特異的遺伝子の探索、さらには臨床サンプルの遺伝子プロファイリングに基づく候補遺伝子の選別に関する共同研究を通じて、*Adora2b* 遺伝子の翻訳産物である Adenosine A2B 受容体(以下、A2B 受容体)が正常臓器ではほとんど発現しておらずTNBC患者特異的に高発現していることを報告した。この結果から、A2B 受容体に結合するモノクローナル抗体をTNBCの標的化に応用できないかと考えた。

腫瘍標的化抗体は、抗癌剤だけでなく治療用RIとの複合化により有効な治療薬候補になりうる。近年、治療用RIとして α 線放出核種が注目されている。 α 線放出核種を用いる標的 α 線治療(TAT)では飛程の短い α 線の特徴を生かして正常組織に対する影響を抑えつつ細胞内DNAを破壊するため高い治療効果が期待できる。しかし、抗体そのものは膜透過性が低く、標識抗体を細胞内に輸送する工夫が必要になる。そこで、 α 線放出核種と抗体をつなぐリンカーとして膜透過性ペプチド(CPP)を用いることで標的化と細胞内輸送を達成しようと考えた。

抗体による能動的ターゲティングに加え、高分子ミセルなどのナノサイズの薬物キャリアに At-211 標識化合物を封入した TAT 薬剤を腫瘍組織への選択的送達(受動的ターゲティング)することも併せて検討することとした。At-211 がヨウ素と同じハロゲンであることに着目し、代表者らの研究成果である抗TNBCペプチド SA-I のヨード基を At-211 に変えた標識ペプチドを設計した。これにより構造や生物活性に影響を与えることなく標識化でき、かつペプチド本来の抗腫瘍効果と α 線放出による抗腫瘍効果を併せ持つ薬剤ができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

- 1) α 線放出核種である At-211 ($t_{1/2} = 7.2$ h) で標識した CPP と抗 A2B 抗体のコンジュゲートによる TNBC 特異的 TAT 薬剤の開発に向けた基礎的検討
- 2) TNBC に対して細胞毒性を持つ疎水性環状ペプチドを α 線放出核種で標識した新規

3. 研究の方法

1) ペプチド固相合成

CPP の構成要素である(4S)-グアニジノ-L-プロリン((4S)-GPro)の合成は、文献法 (*J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1038–1042) を一部変更して行った。シリル化フェニルアラニン誘導体(以後, Si-Phe)の合成は、代表者らの研究成果(特開 2016-166151)をもとに行った。全てのペプチドは Fmoc 固相法により合成した。マイクロ波ペプチド固相合成(MW-SPPS)は、全自動マイクロ波固相合成装置(Biotage, Initiator+ Alstra)を用いて行った。第1アミノ酸をプレロードした合成用樹脂は市販品(Novabiochem, Merck)を購入した。Fmoc アミノ酸の縮合は COMU もしくは HATU を用いて行った。Fmoc 基の除去は 2%DBU/DMF 溶液で室温 2分×3回の処理で行った。反応の進行はクロラニル試験により確認した。伸長終了後、1%トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン溶液で樹脂からの切り出しを行い、鎖状の粗ペプチドを得た。PyBOP を用いた液相環化の後、酸処理による側鎖保護基の除去と逆相 HPLC 精製を経て標識前駆体となるシリル化環状 RGD ペプチドを得た。同定は質量分析(ESI-MS)及び¹H NMRにより行った。

2)高分子ミセル用基剤の合成

RI 標識抗 TNBC 環状ペプチドを内封した水溶性高分子ミセルであるラクトソームの合成を検討した。基剤となるポリマーの合成は、文献法 (*ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 873-877.) を一部改変して行った。

4. 研究成果

1) ケイ素置換基を有する標識前駆体ペプチドの合成

L-アルギニンまたは(4S)-グアニジノ-L-プロリン((4S)-GPro)で構成されるCPP (Arg-CPP, GPro-CPP)にSi-Pheを結合させた標識前駆体ペプチドを合成した。2-Chlorotriptyl樹脂を用いた標準的な固相ペプチド合成法でGPro-CPPを合成したところ、欠損ペプチドの副生が問題となった。合成条件を検討した結果、縮合剤にCOMUを用い、固相担体としてChemMatrixを使用することで欠損ペプチドの副生を低減できることが分かった。また、(4S)-GProのジアステレオマーである(4R)-GProを用い、マイクロ波固相合成を行うことでも欠損を大幅に低減できることが分かった。

次に、抗TNBC環状ペプチドSA-Iのヨード基をトリエチルシリル基に置換したAt-211標識前駆体ペプチドcyclo[Phe(4-TES)-Leu-MeLeu-Val-Leu](TES = triethylsilyl)を合成した。合成には代表者らの研究成果であるBpoc (2-(4-Biphenyl)-2-propyloxycarbonyl) 保護アミノ酸をビルディングブロックとする環状ペプチド合成法 (Bpoc-SPPS) を適用し、目的とする標識前駆体を得ることができた。

2) 標識合成に向けた検討

前述のとおり、標識前駆体となるケイ素置換ペプチドの合成には成功したが、社会情勢の急激な変化(感染症対策による研究設備の利用制限や電気代の高騰による装置停止)に伴い、RI製造のマシントイムが全く取れず、標識合成の実施が困難であった。そのため、マシントイムに依存せずに研究を進めるための代替案としてRIの代わりに蛍光団を導入した標識体の合成について検討することとした。オリゴアルギニンなどの膜透過性ペプチドにトリプトファン(Trp)残基を導入することで、膜透過性が大きく向上するとい

う報告 (*Biochim. Biophys. Acta (Biomembrane)* **2015**, 1848, 593-602.) を参考にGPro-CPPを基盤とした蛍光性膜透過ペプチドを設計することとした。Trpは蛍光性アミノ酸であるが、発光極大波長が紫外領域であるため、ペプチドの細胞内挙動を調べるうえでは発光極大波長の長波長化が不可欠である。そこで、Trpのサロゲート(代替基)となる光耐性に優れたベンゾチアジアゾール型蛍光団DBThDを有する新規蛍光性アミノ酸を新たに設計し、その合成に成功した。実際に本アミノ酸誘導体をペプチド合成に適用して目的とするDBThD標識CPPを得ることに成功した。得られた標識化CPPを培養がん細胞に添加したところ、2時間後の蛍光顕微画像から標識CPPの細胞内移行と核への局在が観察された。

2) At-211標識抗A2B抗体の合成に向けた基礎検討

Fc領域特異的に標識可能なCCAP法により抗体のFc領域特異的にRIまたは蛍光標識CPPを導入するためのツールとして、ジスルフィド架橋17残基環状ペプチド(CCAPペプチド, HGPDCAYHKGELVWCTFH-amide, 4位と14位のシステイン間でジスルフィド架橋)と膜透過性ペプチド(GPro-CPP)のコンジュゲートの合成を試みた。CCAPペプチドはFmoc固相合成により調製した。クリック反応による二成分の連結を念頭に置き、CCAPペプチドのN末端にはアジド基を含むジペプチドリinker($N_3-(CH_2)_4-CO-NH-(CH_2O)_2-CO-$)を導入した。次に、N末端、C末端にそれぞれDBThD蛍光団とアルキン部位を導入した蛍光標識化GPro-CPPを合成し、クリック反応に付して目的とするコンジュゲートを得た。今後、当初の研究計画に基づいて抗A2B抗体の標識を行う予定である。

3) At-211標識ペプチドを封入した高分子ミセルの調製に向けた基礎的検討

RI標識抗腫瘍環状ペプチドを内封した水溶性高分子ミセルの基剤として、ラクトソームを合成し、非放射性のヨウ素含有環状ペプチドを封入したミセルの調製を検討した。ラクトソームのビルディングブロックとなるエチレンジアミン修飾ポリ乳酸は、文献法(*ACS Med.Chem.Lett.* 2014, 5, 873-877) に従い、L-ラクチドの開環重合を経て合成した。

次に、*N*-Phenoxycarbonyl-Sar (Poc-Sar)を前駆体として系中で発生させた*N*-カルボキシ無水物(Sar-NCA)とエチレンジアミン修飾ポリ乳酸を反応させることで目的とするラクトソーム調製用ポリマーを得た。今後、当初の研究計画に基づいて抗TNBC環状ペプチドSA-Iの内封と物性評価を行う予定である。

研究期間全体を通じて得られた結果

- 1)ポリプロリンヘリックス型膜透過性ペプチドGPro-CPPを合成し、蛍光法により細胞膜透過性と核への局在を確認した。
- 2)腫瘍標的化抗体とAt-211標識CPPの連結に用いるFc領域特異的環状ペプチドを合成した。
- 3)At-211標識抗腫瘍ペプチドを内封するための高分子ミセルを合成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Ichiro Sasaki, Yuta Araki, Keiichi Yamada	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis of Head-to-Tail Cyclic Peptides Using Bpoc-chemistry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Peptide Science 2022	6. 最初と最後の頁 97-98
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chikako Takano, Hiromasa Ueno, Kanta Matsumoto, Hiroyuki Oku, Seiji Torii, Keiichi Yamada	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis and Biological Evaluation of N-Methylated Cyclic Peptides Against Triple-Negative Breast Cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Peptide Science 2023	6. 最初と最後の頁 in press
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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木一郎, 荒木悠汰, 山田圭一
2. 発表標題 Bpoc-chemistryを用いたHead-to-Tail型環状ペプチドの合成
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田圭一
2. 発表標題 難治性乳がんを標的としたペプチド薬剤の開発
3. 学会等名 新潟大学UGCEセンター第13回研究シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田圭一
2. 発表標題 ベンゾチアジアゾール型蛍光団を有する膜透過性ペプチドの合成と応用
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高野智香子, 上野浩正, 松本貴太, 奥裕之, 鳥居征司, 山田圭一
2. 発表標題 N-メチル化環状ペプチドの合成とトリプルネガティブ乳がんに対する生物活性評価
3. 学会等名 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023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
研究 分 担 者	渡辺 茂樹 (Watanabe Shigeki) (10450305)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用 研究所 放射線生物応用研究部・主幹研究員 (82502)	

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
---------	---------