

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790005

研究課題名（和文）トリプルネガティブ乳癌の分子標的薬開発に貢献する分子プローブの創製

研究課題名（英文） Design and synthesis of molecular probes useful for the development of molecular-targeted chemotherapeutics for triple-negative breast cancer

研究代表者

山田 圭一（YAMADA KEIICHI）

群馬大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：70323334

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳癌（TNBC）細胞に対して抗腫瘍活性を示すハロゲン化環状ペプチドSA-Xの標的分子探索とin vivo治療効果判定に用いる分子プローブの合成を行い、以下の成果を得た。(1) ビオチンあるいは蛍光色素で標識したポリプロリンロッドとSA-Xを結合させた2種類の標的分子探索用プローブを合成した。(2) 放射性標識化SA-I (SA-[¹²⁵I])を合成に成功した。ノーマルマウス及び培養TNBC細胞を移植したマウス体内での臓器滞留性を調べた結果、SA-[¹²⁵I]は投与後早期に肝臓へ集積し、その後胆汁酸経路で排泄されて腫瘍に殆ど移行しないことが分かった。

研究成果の概要（英文）：

SA-X is a *N*-methylated cyclic peptide containing Phe(4-X) (X=Br, I) residue exhibiting potent antitumor activity against triple-negative breast cancer (TNBC). In this study, we designed and synthesized molecular probes useful for the development of molecular targeted chemotherapeutics for TNBC. (1) SA-I was successfully conjugated with biotin- or fluorophore-tagged polyproline rod. (2) Radioiodine-labeled SA-I (SA-[¹²⁵I]) was synthesized *via* tin-radioiodine exchange reaction. SA-[¹²⁵I] showed high accumulation in liver and intestine after administration to in normal and tumor-bearing mice. In addition, SA-[¹²⁵I] hardly accumulated in tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：トリプルネガティブ乳癌、環状ペプチド、分子プローブ、標識合成、薬物動態

1. 研究開始当初の背景

(1) 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、乳癌全体の約15%を占める。ホルモン受容体陽性乳癌に対するホルモン療法や抗体医薬を

用いた分子標的治療とは異なり、TNBCの治療は薬物による化学療法に限定される。そのため、新たな腫瘍の増殖因子の同定とそれに基づく分子標的薬（療法）の開発による有効な診断・治療法の確立が急務である。（総説：*Cancer J.* **2008**, *14*, 343-351.）これまでに、poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)やcyclooxygenase-2等が抗TNBC薬の分子標的候補として挙げられているが、特異性はそれほど高くない。

(2) 研究代表者らは、海洋微生物由来ペプチドを改変したハロゲン含有環状ペプチド *cyclo*[Phe(*p*-I)-Leu-MeLeu-Val-Leu]（以後、SA-Iと略す）がTNBCの1種であるMDA-MB-231細胞の増殖を阻害し、48時間後に9割以上の細胞を死滅させることを見いだした。Iの代わりにCl, Brを含むSA-Cl, SA-BrもSA-Iと同等の活性を示したが、他の置換基(H, F, NO₂)では活性が無かったことから、ハロゲン原子の重要性が示唆された。さらに、文科省がん特定領域研究・化学療法基盤情報支援班によるSA-Iの化合物評価の結果、MDA-MB-231細胞に対するSA-Iの殺細胞活性(LD₅₀)は、TNBC以外の乳癌細胞と比べ約9倍高いことが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究ではSA-Xをベースとした抗TNBC分子標的治療薬のリード化合物創出に向けた研究の第1段階としてTNBC細胞内におけるSA-X (X = Br, I)の標的分子同定と*in vivo*薬物動態解析に資する2種類のプローブ分子を開発する。

①標的分子探索用プローブの開発

「蛍光イメージング」や「標的タンパク質単離同定」に用いるプローブを合成する。蛍光プローブは薬剤の細胞内動態をイメージングし、ビオチンプローブはアフィニティークロマトグラフィーによるSA-Xの標的分子候補の単離同定に用いる。

②治療効果判定用プローブの開発

陽電子断層撮像法(PET)により*in vivo*薬物動態の評価と治療効果判定を行うことを念頭に置き、殺細胞活性に必須なSA-X中のハロゲン原子を対応する陽電子放出核種(⁷⁶Br, ¹²⁴Iなど)に置換した環状ペプチドの合成法を確立する。

3. 研究の方法

1) 標的分子探索用SA-Xプローブ

スペーサーを介して蛍光色素・ビオチンと

SA-Iを連結して目的とするプローブを得る。これらの成分の連結にはCu(I)触媒存在下でアルキンとアジドを付加環化させてトリアゾールを得るHuisgen反応を用いた。

2) 放射性標識化SA-Xプローブ

放射性臭素は、(独)日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所のイオンビーム照射施設(TIARA)を利用して製造した。

報告されている放射性臭素標識化合物の大半は低分子化合物・抗体・核酸であり、ペプチドの標識化は殆ど検討されていない。予備実験として酸化剤存在下でのスズ-ハロゲン交換反応保護アミノ酸の標識合成を行ったところ、前駆体であるBoc-Phe(4-Bu₃Sn)-OMeからBoc-Phe(4-⁷⁷Br)-OMe (⁷⁷Br: *t*_{1/2} = 57 h)を収率よく合成することに成功した。その際、酸化剤(Chloramine T (CAT)) 100 μgの存在下で前駆体 100 μgと⁷⁷Br (20 kBq)を作用させたところ、反応時間 30分で収率は82%に達した。この結果をもとに、Phe(4-Bu₃Sn)残基を含む保護ペプチドを前駆体として標識合成を行った。放射性臭素化に先立ち、市販されている基礎実験用核種である¹²⁵I (*t*_{1/2} = 59.4 d)を用いて合成条件の検討を行った。

4. 研究成果

1) 蛍光・ビオチンプローブの合成

まず、4*R*-azido-L-Pro (Azp)をN末端に有するポリプロリンロッドBoc-Azp-(Pro)₈-OHを液相法により合成し、別途合成したSA-IのVal残基をLysで置換した改変体 *cyclo*[Phe(4-I)-Leu-MeLeu-Lys-Leu]と縮合した。これをHuisgen反応によりアルキン修飾TAMRA及びアルキン修飾ビオチン誘導体と結合させ、目的とする2種類のプローブを合成した。現在、これらのプローブを用いた標的分子探索実験を実施中である。

2) SA-[¹²⁵I]の標識合成

合成スキームを図1に示す。まず、固相合成法により鎖状の非放射性標品1を収率61%で合成し、これをPd(PPh₃)₄触媒存在下3当量のbis(tributyltin)と加熱還流して対応する標識前駆体2を得た。これをCATの存在下Na[¹²⁵I]と作用させ¹²⁵I標識体3を収率よく得ることができた。(標識率90%)最後に両末端保護基の除去により得られた鎖状ペプチド4を高希釈条件下で環化することにより目的とする放射性標識化環状ペプチドSA-[¹²⁵I]が得られた。鎖状ペプチド4までは収率よく進行したが、環化反応の収率は著しく低く、わ

ずか 11%であった。そこでSA-[¹²⁵I]の収率向上を図るために、鎖状前駆体 **2** の合成法と同様の手法にてSA-Iから環状標識前駆体 **5** を合成することに成功した。(図1右側) 今後、**5** の¹²⁵I 及び⁷⁷Br標識化を行い、収率や放射化学的純度を前述の方法と比較する。

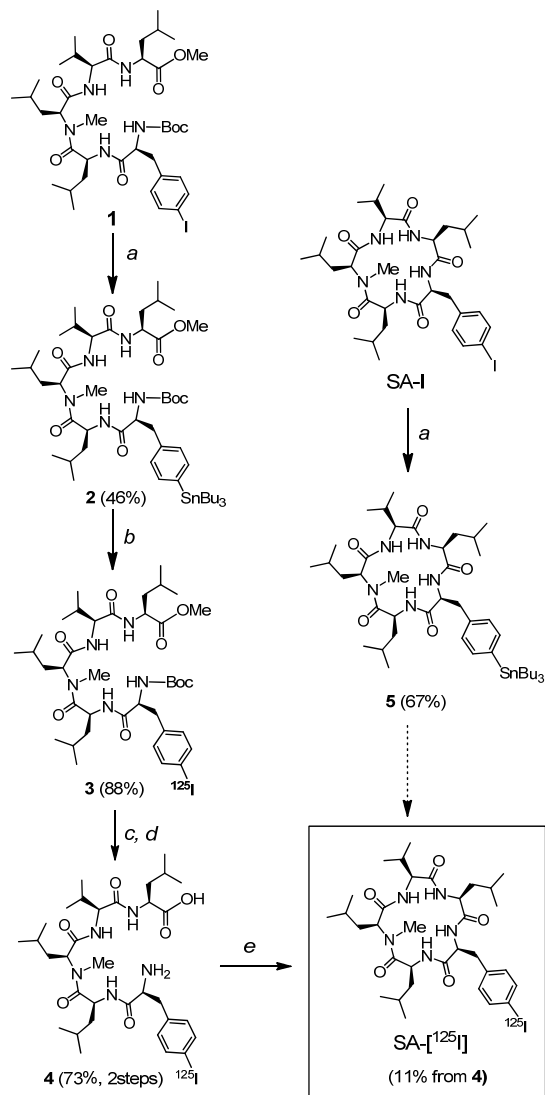


図1. SA-[¹²⁵I]の標識合成: a) (Bu₃Sn)₂, Pd(PPh₃)₄, toluene b) Na[¹²⁵I], chloramine T, 90% MeOHaq., c) 1M NaOHaq., MeOH, d) 25%TFA in CH₂Cl₂, e) PyBOP, DIEA

2) SA-[¹²⁵I]の*in vivo*薬物動態

培養乳癌細胞(MDA-MB-231)を移植したヌードマウスにSA-[¹²⁵I]を尾静脈から投与し、その臓器移行性を調べた。その結果、SA-[¹²⁵I]は投与後早期に肝臓へ集積し、その後胆汁酸経路で排泄されて腫瘍に殆ど移行しないことが分かった。(図2) これはSA-Iの高い脂溶性に起因するものと推測されたため、実際にPET

撮像による治療効果判定を実施するためにはSA-Xの分子改変による薬物動態改善が必要であることが示唆された。

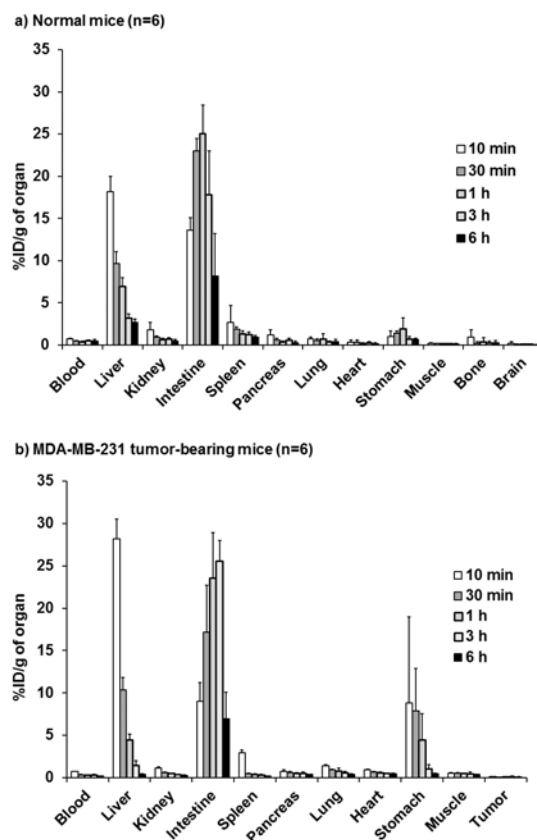


図2. SA-[¹²⁵I]の臓器移行性(a) ノーマルマウス (b)MDA-MB-231細胞を移植したマウス

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1) K. Yamada, I. Nagashima, M. Hachisu, I. Matsuo, H. Shimizu, "Efficient solid-phase synthesis of cyclic RGD peptides under controlled microwave heating.", *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1066-1070. (査読有)

2) K. Yamada, S. Watanabe, Y. Ohshima, H. Hanaoka, N. Tsukui, C. Takano, A. Yamaguchi, H. Oku and N. S. Ishioka "Synthesis and *in vivo* evaluation of radiohalogen-labeled antitumor cyclic peptides.", " *Peptide Science 2011*, K. Sakaguchi (Ed.), The Japanese Peptide Society, 287-290. (査読有)

3) K. Yamada, M. Kodaira, S. Shinoda, K.

Komagoe, H. Oku, R. Katakai, T. Katsu, I. Matsuo, "Structure-activity relationships of gramicidin S analogs containing (β-3-pyridyl)-α,β-dehydroalanine residues on membrane permeability..", *Med. Chem. Commun.* **2011**, 2 644-649. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1) 山田景子, 山田圭一, 渡邊茂樹, 奥浩之, 石岡典子, 「生物活性ペプチドの標識合成に関する基礎的検討」, 日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会 (2011年12月10日, 群馬)

2) 渡邊茂樹, 山田圭一, 大島康宏, 花岡宏史, 津久井匠隆, 高野智香子, 山口藍子, 奥浩之, 飯田靖彦, 遠藤啓吾, 石岡典子 「¹²⁵I 標識環状ペプチド Sansalvamide A 誘導体の合成と評価」, 第 11 回放射線医薬品・画像診断薬研究会 2011 年 12 月 3 日, 京都)

3) K. Yamada, "The revival of cationic peptide antibiotics: Design and synthesis of membrane-active cyclic peptides based on gramicidin S and polymyxin B", 5th China Medical Biotech Forum (November 7-9, 2011, Beijing, China)

4) 山田圭一, 渡邊茂樹, 大島康宏, 花岡宏史, 津久井匠隆, 高野智香子, 山口藍子, 奥浩之, 石岡典子, 「放射性ハロゲンで標識化した抗腫瘍活性ペプチドの合成と *in vivo* 動態評価」, 第 48 回ペプチド討論会 (2011 年 9 月 27-29 日, 札幌)

5) 中島徹也, 山田圭一, 長島生, 奥浩之, 松尾一郎, 清水弘樹, 「N-メチル化ペプチドの合成におけるマイクロ波効果」, 日本化学会第 91 春季年会 (2011 年 3 月 26-29 日, 神奈川)

6) N. Tsukui, K. Yamada, S. Watanabe, H.

Hanaoka, H. Oku, K. Endo, N. S. Ishioka, I. Matsuo, "Solid-phase synthesis of cyclic peptides containing *p*-[tri-(*n*-butyl)-stannyl]phenylalanine residue.", *PacificChem* 2010 (December 15-20, 2010, Hawaii, USA)

7) K. Yamada, I. Nagashima, M. Hachisu, H. Oku, H. Shimizu, I. Matsuo, "Microwave-assisted Solid-phase Synthesis of hindered N-methyl peptides.", *PacificChem* 2010 (December 15-20, 2010, Hawaii, USA)

8) T. Murase, T. Yoshihara, K. Yamada, S. Tobita, "Syntheses of fluorescent peptides labeled with 7-diethylaminocoumarin and their photophysical properties in liposome membranes.", 5th International Peptide Symposium (December 4-9, 2010, Kyoto)

9) 津久井匠隆, 渡邊茂樹, 花岡宏史, 山田圭一, 奥浩之, 松尾一郎, 遠藤啓吾, 石岡典子, 生理活性ペプチドのイメージングを目指した芳香族アミノ酸の標識合成」, 第 47 回アイソトープ・放射線研究会 (2010 年 7 月 7 日, 東京)

10) 花岡宏史, 渡邊茂樹, 富永英之, 大島康宏, 津久井匠隆, 渡邊智, 山田圭一, 飯田靖彦, 織内昇, 樋口徹也, 石岡典子, 遠藤啓吾, 「がんの PET イメージング薬剤としての ⁷⁶Br 標識アミノ酸の有用性」, 第 5 回日本分子イメージング学会学術総会 (2010 年 5 月 21-22 日, 滋賀)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 圭一 (YAMADA KEIICHI)
群馬大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：70323334