

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591827

研究課題名(和文) インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ をターゲットにしたペプチドを用いた PET プローブの開発研究課題名(英文) Development of peptide-based PET probe targeting integrin $\alpha 5 \beta 1$

研究代表者

金 朝暉 (Jin, Zhao-Hui)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：70324150

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)：本研究は、がんの診断や治療に関わる $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンをターゲットとした PR_b ペプチドを用い、新たな $\alpha 5 \beta 1$ PET イメージング剤の開発を目的として行った。NOTAを用いる新規な方法で PR_b を ^{18}F 標識し、 ^{18}F -PR_b というプローブの製造に成功した。インビトロ及びインビボの評価では、 ^{18}F -PR_b は $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンに特異的に結合することが示された。さらに、 ^{18}F -PR_b の PET 撮像によるマウスの $\alpha 5 \beta 1$ 陽性腫瘍の明瞭な描出に成功した。 ^{18}F 標識 PR_b は $\alpha 5 \beta 1$ PET イメージング剤として有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to develop a novel PET imaging probe targeting the transmembrane glycoprotein receptor, $\alpha 5 \beta 1$ integrin, by use of the fibronectin-mimetic peptide sequence KSSPHSRNSGSGSGSGRGRGDSP (called PR_b). PR_b was modified and conjugated with the chelating agent p-SCN-Bn-NOTA, and radiolabeled with ^{18}F based on the chelation of ^{18}F -aluminum fluoride. ^{18}F -PR_b was produced with a radiochemical purity of >95%; it exhibited $\alpha 5 \beta 1$ -binding activity and specificity in cultured cells and in tumor-bearing mice, and had a rapid blood clearance and a predominant renal excretion pathway. In vivo $\alpha 5 \beta 1$ -positive tumors could be clearly visualized by ^{18}F -PR_b PET imaging. ^{18}F -PR_b was developed as a promising PET imaging agent targeting the $\alpha 5 \beta 1$ integrin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：alpha5beta1 integrin Fluorine-18 PET imaging Fibronectin Radioprobe

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞接着分子の一つである 5 1 インテグリンは膜貫通性糖タンパク質で、がんの血管新生や浸潤または転移に関与している。新生血管の内皮細胞及び一部の腫瘍細胞では 5 1 が高発現し、がんの分子標的治療や腫瘍イメージングの重要なターゲット分子の一つであると認められている。

PR_b ペプチド (アミノ酸配列 KSSPHSRN(SG)₅RGDSP) はアメリカのミネソタ大学の Kokkoi 教授らによって開発されたフィブロネクチンミメティックである。PR_b は RGD 配列と PHSRN 配列を導入することによって、5 1 インテグリンに特異的に結合すると報告された。PR_b では RGD が main domain として、PHSRN が synergy domain として働く。

最近、フッ化アルミニウム錯体形成により PET イメージングに用いるペプチドやタンパク質のポジトロン放出核種 F18 による標識が簡単に行えることが報告された。

上記の先行研究の成果を踏まえ、新たな 5 1PET イメージング剤の開発には十分な可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、フィブロネクチンミメティックペプチドを用い、新たな 5 1PET イメージング剤の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) PET分子プローブの製造

まず、PR_b をポジトロン放出核種 F18 (¹⁸F、半減期 110 分) で標識するため、PR_b-NOTA 分子を構築した。PR_b-NOTA の構築には、PR_b ペプチドの配列 ((C16)(2-Glu-C2-KSSPHSRNSGSGSGSGSGRGRGDSP) の修飾とその部位へのキレート剤 NOTA (p-SCN-Bn-NOTA) の導入を行った。純度 95% 以上の分子が委託合成により提供された。一方、PR_b の 5 1 結合モチーフである RGD 配列を RAD 配列に変えて、PR_b のネガティブコントロールペプチド (PR_b control) も合成した。次に、PR_b-NOTA を Aluminium-¹⁸F 複合体の形成により放射能標識した。¹⁸F 標識 PR_b のマウス血清中安定性も検討した。

(2) ¹⁸F 標識 PR_b のインビトロ (in vitro) での 5 1 インテグリンへの結合および特異性の評価:

5 1 インテグリン発現の高いマウスメラノーマ B16-F10 細胞と発現の見られなかったヒト結腸癌 SW48 細胞を用いて、¹⁸F 標識 PR_b の細胞への取り込み実験を行った。結合率は β -カウンターを用いて放射活性を測定し求めた。また、¹⁸F 標識 PR_b の 5 1 インテグリンへの特異性を証明するため、5 1 インテグリン高発現の B16-F10 細胞を用

いて、¹⁸F 標識 PR_b と非標識 PR_b を用いる培養細胞への結合阻害実験も行って、競合的に阻害されるかどうかを検討した。

(3) ¹⁸F 標識 PR_b の体内動態及び分布の検討:

1. 体内安定性の評価: 健常マウスに経尾静脈的に ¹⁸F 標識 PR_b を投与し、経時的に血液を採取した。血漿を高速液体クロマトグラフィーにおいて各成分を分析し、¹⁸F 標識 PR_b の体内安定性を評価した。2. インビボ (in vivo) 移植腫瘍による検討: ヌードマウスに B16-F10 細胞或いは SW48 細胞を皮下移植し、腫瘍モデルを作製した。¹⁸F 標識 PR_b を担がんマウスに投与し、小動物用 PET 装置による PET イメージングを行った。また、撮像終了後、直ちに血液と主な臓器、腫瘍を採取し、 β -カウンターにより放射活性を測定して、取り込み量を求めた。

(4) 移植腫瘍による in vitro での検討:

¹⁸F 標識 PR_b の腫瘍への集積の特異性を評価するため、腫瘍組織の凍結切片において、¹⁸F 標識 PR_b の組織結合実験及び結合阻害実験を行った。この際、オートラジオグラフィ (autoradiography) により組織への特異的な放射能集積を評価した。

4. 研究成果

(1) PR_b プローブの合成及び ¹⁸F 標識: PR_b を ¹⁸F 標識するためにキレート剤 NOTA を導入し、PR_b-NOTA という分子を設計、合成した (図 1)。標識率 20% 以上、精製後放射化学的純度 95% 以上で ¹⁸F 標識 PR_b を得ることに成功した (図 2)。一方、血清中で 30 分間 37°C インキュベート後も 85% 以上が未変化体として存在しており、¹⁸F 標識 PR_b の血漿中での安定性が確認された (図 3)。

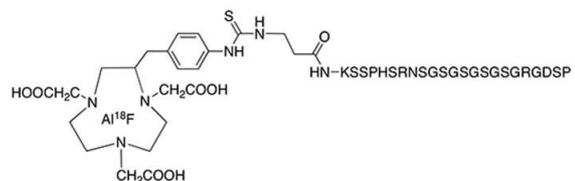


図 1: ¹⁸F 標識 PR_b の構造式

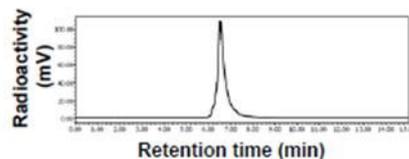


図 2: RP-HPLC による標識純度の分析

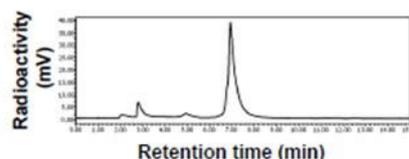


図 3: ¹⁸F-PR_b のマウス血漿中での安定性

(2) 培養細胞を用いた ^{18}F -PR_b の 5 1 イソトプリンへの結合および特異性の評価:

1. 細胞結合実験 (図 4)

5 1 発現の高い B16-F10 細胞において、 ^{18}F 標識 PR_b は細胞濃度の増加とともに、細胞への結合率が明らかに増加した。それは、5 1 発現の見られなかった SW48 細胞において、見られなかった。また、ネガティブコントロールプロープの B16-F10 細胞への集積は認められなかった。

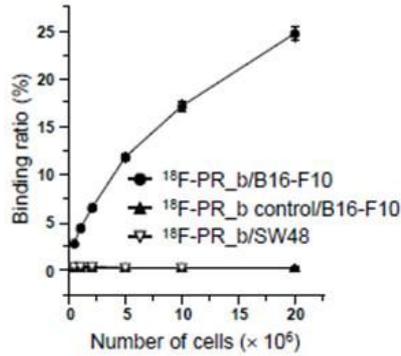


図 4: ^{18}F -PR_b の in vitro cell binding

2. 競合阻害実験 (図 5)

B16-F10 細胞においては、 ^{18}F 標識 PR_b の細胞への集積はあらかじめ未標識の NOTA-PR_b または PR_b のいずれかを添加をすることで濃度依存的に抑制された。

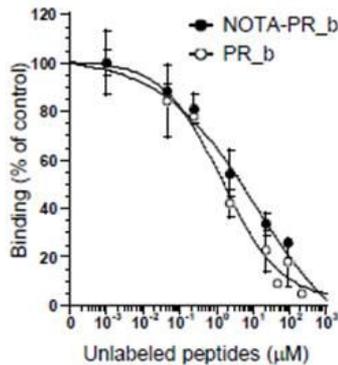


図 5: ^{18}F -PR_b の in vitro blocking assay

(3) PET イメージングと体内動態: ^{18}F 標識 PR_b (~8 MBq) を 5 1 発現の高い B16-F10 腫瘍モデルマウスに静注し、投与直後から 30 分後まで 1 分/フレームの間隔でダイナミックスキャンを行った。得られた画像から、 ^{18}F -PR_b の血液からの速やかな消失、腎臓以外の非標的臓器への非常に低い放射能集積が示された。一方、投与後 20 分から腫瘍が明瞭に描出された (図 6)。また、生体内において、 ^{18}F -PR_b は比較的安定であることが示された。

また、PET イメージング直後に、マウスを sacrifice し、腫瘍および主な臓器の放射能集積を確認した。その結果を表 1 に示した。

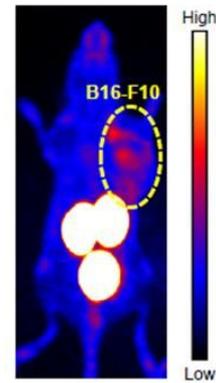


図 6: B16-F10 腫瘍マウスの ^{18}F -PR_b を投与後 25 分後から 30 分後までの 5 分間の PET 画像。

表 1. ^{18}F -PR_b の体内分布

Organ	Uptake (%ID/g)	Organ	Uptake (%ID/g)
Blood	1.82 ± 0.26	Pancreas	0.40 ± 0.05
Tumor	1.07 ± 0.14	Spleen	0.41 ± 0.02
Muscle	0.36 ± 0.03	Stomach	0.82 ± 0.34
Bone	0.72 ± 0.12	Small intestine	0.63 ± 0.04
Brain	0.05 ± 0.003	Large intestine	0.50 ± 0.06
Heart	0.61 ± 0.02	Kidney	73.4 ± 0.62
Lung	1.18 ± 0.08	Skin	1.43 ± 0.30
Liver	0.48 ± 0.04	n=10 for blood and tumor; n= 4 for other organs	

4) 腫瘍組織の in vitro の autoradiography による検討

5 1 発現陽性 B16-F10 腫瘍組織において、 ^{18}F 標識 PR_b はネガティブコントロールプロープより高集積を示した (図 7)。この集積は、未標識 PR_b の添加によって抑制された。一方、5 1 発現陰性 SW48 腫瘍組織においては、 ^{18}F 標識 PR_b の腫瘍組織への集積を認めなかった。

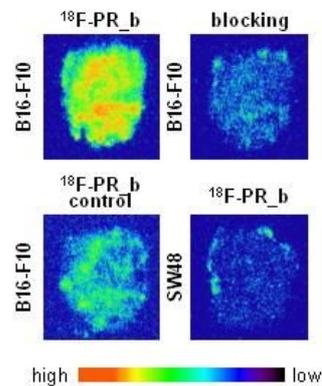


図 7: ^{18}F -PR_b の in vitro tissue binding

以上の検討結果より、本研究において、我々はフィブロネクチンミメティックペプチド

PR_b のポジトロン放出核種である ^{18}F 標識方法を確立し、 5×1 PET イメージング剤の製造に成功した。 ^{18}F 標識 PR_b の *in vitro* 及び *in vivo* での集積は 5×1 インテグリンに特異的に結合することによって考えられた。本研究で得られた成果は今後の 5×1 インテグリンをターゲットにするプローブの開発の重要な基礎データになりうると考えられた。

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)

[学会発表](計 1 件)

Zhao-Hui Jin, Takako Furukawa, Katsushi Kumata, Lin Xie, Joji Yui, Hidekatsu Wakizaka, Yasuhisa Fujibayashi, Ming-Rong Zhang, Tsuneo Saga: Development of ^{18}F -labeled fibronectin-mimetic peptide for positron emission tomography imaging of 5×1 integrin expression, 2014 World Molecular Imaging Congress, Seoul, Korea, 2014 年 9 月 17 日 ~ 20 日, 口演発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 朝暉 (Jin Zhao-Hui)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：70324150

(2) 研究分担者

張 明栄 (Zhang Ming-Rong)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・プログラムリーダー

研究者番号：80443076

(3) 連携研究者

古川 高子 (Furukawa Takako)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究者番号：00221557