

令和元年6月12日現在

機関番号：32624

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07110

研究課題名(和文) 錯形成により多価効果を示す^{99m}Tc標識メラノーマイメージング薬剤の開発研究課題名(英文) The development of ^{99m}Tc-labeled melanoma targeting imaging agents based on chelation mediated multivalency

研究代表者

水野 雄貴 (MIZUNO, Yuki)

昭和薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：90805194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、転移性メラノーマにおいて発現するMC1Rに対して高い結合親和性を有する、MSH誘導体を母体とした核医学分子イメージングプローブの開発を行った。研究開始当初は、1価イソニトリル配位子から^{99m}Tc標識6価体を作製する分子設計を用いることを計画していたが、目的とする^{99m}Tc標識6価体の生成が確認できなかったため、新たな候補化合物としてDOTA結合2価MSH誘導体を合成し、その評価を行った。MSH誘導体として直鎖MSHと環状MSHを比較したところ、¹¹¹In標識2価環状MSHが直鎖体よりも優れたメラノーマ集積性を示し、新たなメラノーマイメージング薬剤としての可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果は、イソニトリル1価配位子から^{99m}Tc標識6価体を作製する薬剤設計が適応可能な標的指向性分子について、化学構造の観点から新たな知見を与えた。更に、環状MSHを分子内に2つ有する¹¹¹In標識2価環状MSHを世界で初めて合成し、環状MSH間をつなぐスペーサ構造とメラノーマ細胞集積性との関係について評価した。これらの成果は、多価効果を基盤とした新たなMC1Rイメージング薬剤の開発において、有用な指針を与えるものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed -MSH peptide based molecular imaging agents which target MC1R, overexpressed on metastatic melanoma. At the beginning of this project, we had planned to synthesize ^{99m}Tc-labeled hexavalent -MSH peptides from monovalent isonitrile ligands. However, because we could not obtain the objective ^{99m}Tc-labeled hexavalent -MSH probes due to unexpected side reactions, we instead synthesized DOTA conjugated bivalent MSH analogues and evaluated them in vitro. We compared linear MSH peptides and cyclic MSH peptides as an -MSH analogue, and the results showed that ¹¹¹In-labeled bivalent cyclic MSH peptides possessed superior targeting capability to melanoma compared with the linear MSH counterparts. These results show the potential of ¹¹¹In-labeled bivalent cyclic MSH peptides as a novel melanoma imaging agent.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：SPECT メラノーマ 多価効果 テクネチウム-^{99m} インジウム-111 イソニトリル

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Melanocortin-1 receptor (MC1R) は転移性メラノーマにおいてその発現が亢進しており、MC1R を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発は、メラノーマ患者における転移の有無の診断に非常に有用である。His-DPhe-Arg-Trp (HfRW) は、MC1R への中程度の親和性を有するペプチドフラグメントであるが、本配列を分子内に複数有する多価 HfRW は、1 つのみ有する 1 価 HfRW に比べ 10 倍以上高い結合親和性を示すことが報告されており、MC1R を標的とした多価 HfRW の開発が、近年盛んにおこなわれている。

(2) 一方我々はこれまでに、イソニトリル (CN-R) と $[^{99m}\text{Tc}]^+$ が 6 対 1 のモル比で反応することで、安定な $[^{99m}\text{Tc}(\text{CN-R})_6]^+$ を形成する点に着目した薬剤設計を考案し、環状 RGD ペプチドを用いてその有用性を報告してきた。本薬剤設計の特長は、 ^{99m}Tc 標識体 (6 分子の環状 RGD ペプチド) が非標識配位子 (1 分子の環状 RGD ペプチド) に比べ、標的分子である integrin $\alpha_v\beta_3$ に対し、多価効果に基づいた高い結合親和性を示す点にある。通常、 ^{99m}Tc 標識反応後の溶液中には大過剰の非標識配位子が混在し、 ^{99m}Tc 標識体の標的への集積を競合的に阻害する。一方我々の考案した設計を用いた場合、精製を行わず反応液をそのまま生体内へ投与した場合においても、より優れた結合親和性を有する ^{99m}Tc 標識体が優先的に標的分子に結合し、標的への高い集積を示すことが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らがこれまでに開発した親和性の低い 1 価イソニトリル配位子から、より高い結合親和性を有する ^{99m}Tc 標識多価化合物を作製する薬剤設計を、MC1R イメージングへと展開することを目的とした。即ち、親和性の低い 1 価 HfRW を有するイソニトリル配位子から、より高い結合親和性を有する ^{99m}Tc 標識多価 HfRW を作製することで、 ^{99m}Tc 標識反応後に煩雑な精製操作を行わない投与でも、MC1R の明瞭な画像化を可能とする SPECT 用分子イメージングプローブの開発を行うことを計画した。

3. 研究の方法

(1) ペプチド合成

ペプチド合成は Fmoc 固相合成法に基づいて行った。Fmoc-NH-SAL-Resin の Fmoc 基を 20% ピペリジン/DMF で除去し、その後 Fmoc アミノ酸の縮合反応、20% ピペリジンによる脱 Fmoc 反応を繰り返すことでペプチド鎖を伸長した。脱レジン反応は、trifluoroacetic acid (TFA)/1,4-dimethoxy benzene (DMB)/triisopropyl silane (TIPS) = 9.25/0.5/0.25mL を加えることで行った。脱レジン後の粗ペプチドは HPLC にて精製し、目的とするペプチドの生成確認は質量分析により行った。

(2) ^{99m}Tc 標識反応

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ は ^{99}Mo - ^{99m}Tc ジェネレーターから得た。還元剤として塩化スズ (II) を、スズの安定化剤としてシステインを用い、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 、イソニトリル配位子、塩化スズ (II)、システインを含む水溶液を 120°C のヒーティングブロック中において 5 分間加熱することで標識反応を行った。反応溶液の分析は、TLC 及び HPLC を用いて行った。

(3) ^{111}In 標識反応

DOTA 結合配位子を $^{111}\text{InCl}_3$ と混合し、pH7.0 において 75°C で 15 ~ 30 分間加熱した。反応溶液の分析は、TLC 及び HPLC を用いて行った。

(4) 細胞結合実験

MC1R 陽性細胞として B16F1 を用いた。ポリ L リシンコート 24 ウェルプレートに 2×10^5 個/well で B16F1 を播種し、終夜培養した後に実験に用いた。 ^{111}In 標識体と 37°C で一定時間インキュベートした後に細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄し、Acid buffer (50 mM glycine, HCl/100 mM NaCl, pH 2.8) を用いて膜結合画分を回収した。その後 0.1N NaOH を加えることで、内在化画分を回収した。各画分の放射活性はウェル型ガンマカウンターを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 申請書作成時の計画に従い、まず始めに HfRW をイソニトリルに導入した 1 価イソニトリル配位子 (図 1, L1) を合成し、本配位子を用いて ^{99m}Tc 標識反応を行った。しかし、環状 RGD ペプチドを有するイソニトリル配位子を用いた場合は異なり、HfRW を有する本イソニトリル配位子を用いた場合の反応においては、目的とする ^{99m}Tc 標識 6 価体の生成を確認することができなかった。 ^{99m}Tc 標識反応溶液の TLC 分析の結果、原点への非常に高い放射活性の残留を認め、また HPLC 分析においては、ほとんどの放射活性がカラム内に留まり溶出されなかった。これらの結果は、コロイドのような非常に大きな分子量を有する副生成物の生成を示唆しているが、環状 RGD ペプチドを有するイソニトリル配位子ではそのような現象は見られなかったため、本副生成物の生成には HfRW 配列の存在が関与していると考えられた。そのため、今後更なる分子構造の検討は必要ではあるものの、HfRW を有する 1 価イソニトリル配位子からの ^{99m}Tc 標識 6 価 HfRW 体の作製は、非常に困難である可能性が示された。

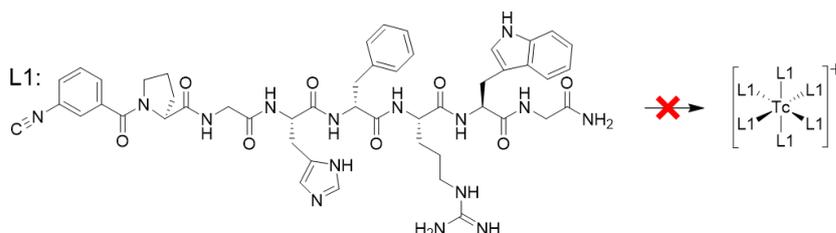


図 1. HfRW を有するイソニトリル配位子 (L1) の構造及びその ^{99m}Tc 標識反応。当初の予想に反し、目的とする ^{99m}Tc 標識 6 価体の生成が確認できなかった。

(2) 上述したように、当初問題なく進行すると考えていた ^{99m}Tc 標識反応が進行しなかったため、大幅な分子設計の変更が必要となった。そこで新たな分子設計として、 ^{111}In と安定な錯体を形成する DOTA を母体とした薬剤の合成に着手した。 ^{111}In は SPECT に適したエネルギーのガンマ線を放出し、かつ DOTA との反応から ^{111}In -DOTA 錯体を迅速かつ定量的に与えることができる。また、低濃度 ($\approx 10 \mu\text{M}$) の DOTA を用いた ^{111}In 標識反応においても、目的とする ^{111}In -DOTA が収率よく得られることが知られている。そのため、多価 HfRW に DOTA を導入した配位子を用いることで、標識反応溶液中に混在する非標識配位子量を最低限に抑えつつ、目的とする ^{111}In 標識多価 HfRW が収率よく得られると考えた。

新たに設計した配位子の構造を図 2 に示す。グルタミン酸の 2 つのカルボン酸に (DPro-Gly) $_n$ ($n = 1, 3, \text{ or } 6$) リンカーを介して Nle-Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Gly (Nle-DHfRWG) を導入し、グルタミン酸のアミノ基に DOTA を結合することで、L2a, L2b, L2c を合成した。当初使用を計画していた HfRW 配列は親和性が比較的低く、2 価体ではその親和性が十分とならないことが懸念されたため、HfRW に比べ MC1R へのより高い親和性を有することが知られている Nle-DHfRWG を母体ペプチド配列として選択した。

L2a, L2b, L2c の ^{111}In 標識反応の結果、 $20 \mu\text{M}$ の配位子濃度において、目的とする ^{111}In 標識体が 90% 程度の放射化学的収率で得られた。しかし、 ^{111}In 標識反応後の HPLC 分析 ($\lambda = 220 \text{ nm}$) において、 ^{111}In 標識体と保持時間が非常に近いピークの生成が観察された。これは、今回作製した配位子の化学的安定性が低いために、標識反応時の加熱によって生じた副生成物であると考えられた。そのため、非標識配位子を除去する目的で ^{111}In 標識反応溶液の HPLC 精製を行った際も、非標識配位子と ^{111}In 標識体の分離が可能であった一方で、 ^{111}In 標識体と副生成物の分離は達成することができなかった。以上の結果から、 ^{111}In 標識体の B16F1 細胞への集積性の評価は、副生成物が混在した状態で行った。 ^{111}In 標識体と B16F1 を 37°C で 3 時間インキュベートした後に、細胞への集積を膜画分と内在化画分に分けて評価したところ、いずれの ^{111}In 標識体を用いた場合においても、内在化画分の放射活性が膜画分の放射活性に比べ約 2 倍高いという結果が得られた。しかし、その内在化画分への集積量は $0.3\% \text{ injected dose (\%ID)}/2 \times 10^5 \text{ cells}$ 程度と非常に低く、インビボイメージング薬剤としての集積性が不十分であると考えられた。この低い集積性が、 ^{111}In 標識体自体の低い親和性に起因するのか、混在する副生成物による競合阻害に起因するのかは今のところ明らかにできていないが、今回作製した ^{111}In 標識体は、MC1R イメージング薬剤として適切でない可能性が示された。

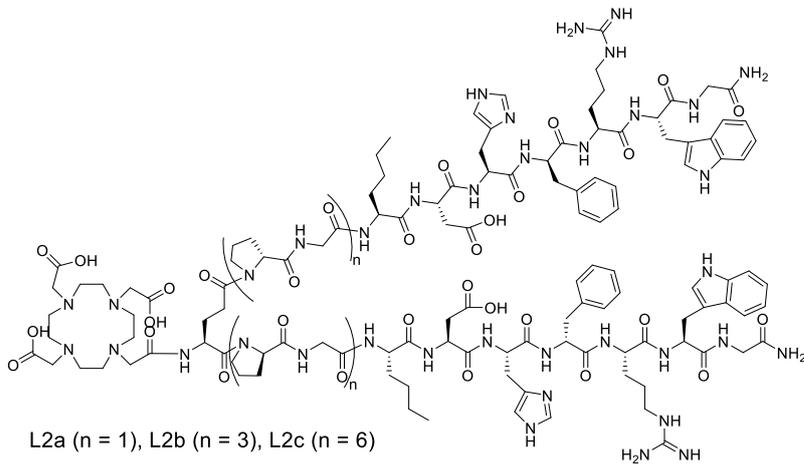


図 2. Nle-DHfRW を有する DOTA 結合配位子 (L2a, L2b, L2c) の構造。

(3) 以上の結果に基づき、直鎖ペプチドである Nle-DHfRW に比べ、更に高い MC1R 結合親和性を有することが知られている環状 MSH を母体として、新たに DOTA 結合 2 価 MSH を作製した。作製した配位子の構造を図 3 に示す。直鎖 MSH の場合と同様に、グルタミン酸の 2 つのカルボン酸に (DPro-Gly) n ($n = 1$ or 6) リンカーを介して 2 分子の環状 MSH を導入し、次いでアミノ基に DOTA を縮合することで、L3a と L3b を合成した。作製した L3a 及び L3b を用いて ^{111}In 標識反応を行ったところ、直鎖 MSH の場合とは異なり、標識反応後においても配位子自体は未変化体のまま残存し、 ^{111}In 標識体と保持時間の近い副生成物の生成は観察されなかった。また、その標識収率は直鎖 MSH の場合と同様に、 $20 \mu\text{M}$ の配位子濃度において 90% 程度であった。そこで、 ^{111}In 標識反応後の溶液を HPLC にて精製し、非標識配位子を除去した ^{111}In 標識体を用いて B16F1 細胞への集積性の評価を行った。その結果、今回新たに作製した ^{111}In 標識環状 MSH は、直鎖 MSH の場合に比べ 10 倍以上高い B16F1 細胞への集積を示した (図 4a, b)。更に、その集積量は 2 つの環状 MSH 間をつなぐスペーサ構造の影響を大きく受け、(pro-Gly) 1 をスペーサとして持つ 2 価環状 MSH (^{111}In -[L3a]) は、(pro-Gly) 6 をスペーサとして持つ 2 価環状 MSH (^{111}In -[L3b]) に比べ、約 2 倍高い集積値を示した (図 4a, b)。また、その集積を膜面分と内在化分に分けて評価した所、(pro-Gly) 6 をスペーサとして持つ ^{111}In -[L3b]の方が速やかに細胞内へ内在化され、かつ結合全体に占める内在化の割合も高いことが明らかとなった (図 4a, b)。一方、両 2 価環状 MSH の B16F1 からの解離速度を比較した所、両者の間に大きな差は見られなかった (図 4c, d)。

^{111}In -[L3a]と ^{111}In -[L3b]を、代表的な MC1R リガンドである NDP-MSH ($1 \mu\text{M}$) 存在下で B16F1 とインキュベートしたところ、予想に反しこれら ^{111}In 標識体の集積はほとんど阻害を受けなかった (図 4a, b)。そこで、 $2 \mu\text{M}$ の L3a 存在下で再度 ^{111}In -[L3a]を B16F1 とインキュベートしたところ、 ^{111}In -[L3a]の B16F1 への集積は 25%程度まで低下し、その集積が MC1R 特異的であることが示唆された。 ^{111}In 標識 2 価環状 MSH の B16F1 への集積が NDP-MSH によって阻害を受けなかった原因は今後明らかにする必要はあるが、今回作製した ^{111}In -[L3a]は B16F1 への高い集積性と滞留性を示したことから、MC1R イメージング薬剤として今後更なる検討を進める価値のある化合物であると考えられる。

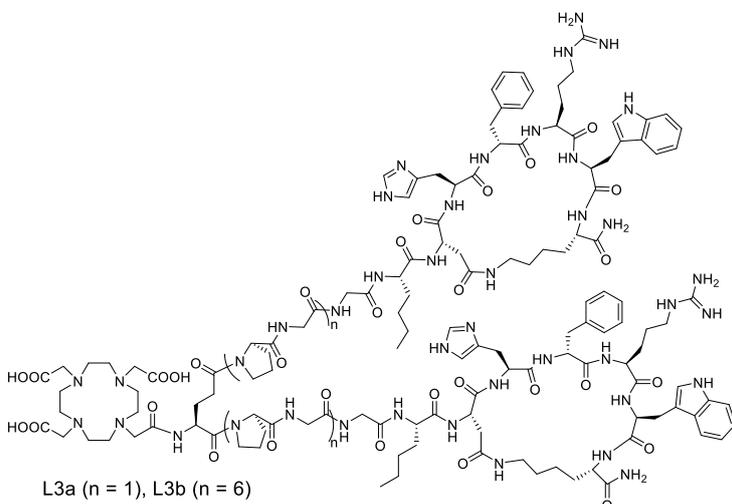


図 3. 環状 MSH を有する DOTA 結合配位子 (L3a, L3b) の構造。

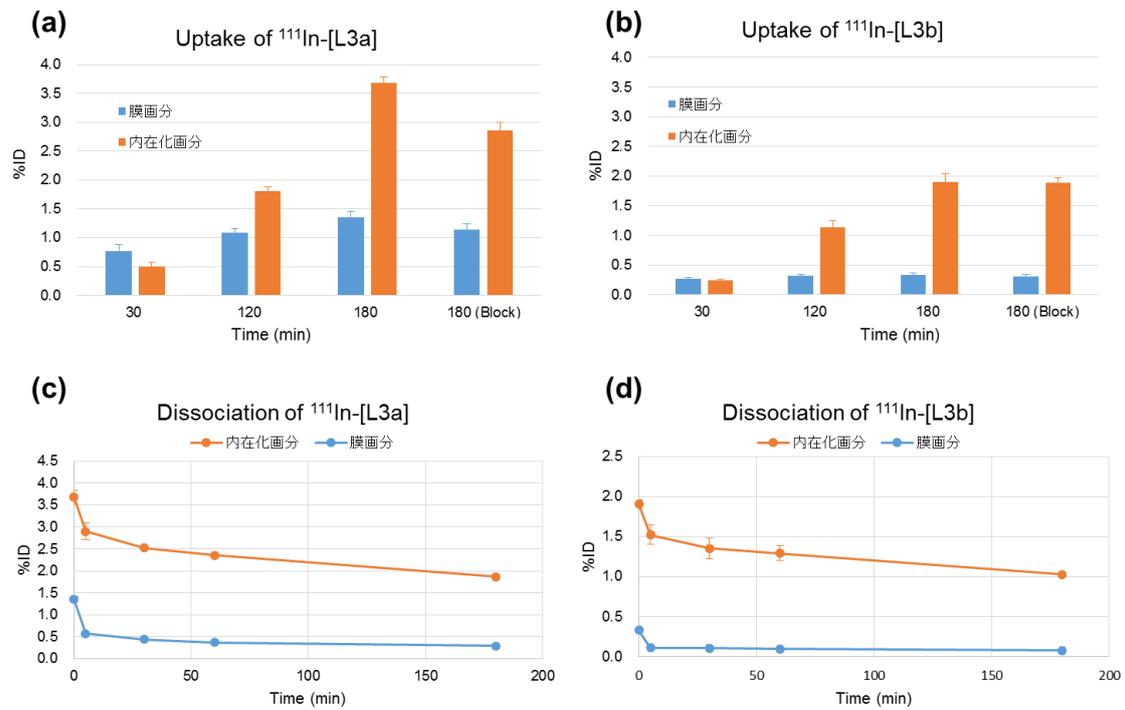


図 4. (a) ^{111}In -[L3a] と (b) ^{111}In -[L3b] の B16F1 (2×10^5 個/well) への集積量の経時的変化。ブロッキング実験は $1 \mu\text{M}$ の NDP-MSH 存在下でインキュベートすることで行った。(c) ^{111}In -[L3a] と (d) ^{111}In -[L3b] の B16F1 からの解離の経時変化。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：秋澤 宏行

ローマ字氏名：(AKIZAWA,hiromichi)

※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、研究者個人に帰属されます。