

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289369

研究課題名(和文)ペプチド創薬を目指した放射性同位体の新しい活用法

研究課題名(英文)A new approach using radioisotopes for peptide drug discovery

研究代表者

石岡 典子 (ISHIOKA, NORIKO)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射性生物応用研究部・上席研究員(定常)

研究者番号：30354963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：病気の原因となる物質に対して選択的に効果を発揮する「分子標的治療薬」は、副作用が少ない次世代の薬剤として期待されている。その候補の一つとしてペプチドは大きな可能性を秘めているが、今のところ効率的なペプチド薬剤の開発法は無い。わずかな量でも検出可能な放射性同位元素(RI)を活用することで、効率的にペプチド薬剤を開発できる、新しい創薬システムの構築を目標とする。本研究では、D-アミノ酸からなるRI標識ランダムペプチドライブラリーから、標的分子(HER2)に対する親和性を有するペプチドの選抜に関する基礎的研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Molecularly targeted drugs, which selectively exert effects on disease-causing substances, are expected to populate a new generation of drugs with few side effects. Peptides have great potential as candidates for molecularly targeted drugs, but currently the methods for developing peptide drugs are limited. We aim to establish an innovative drug discovery system to effectively develop peptide drugs by utilizing radioisotopes (RIs) that can be detected even at low concentrations. In this study, we performed basic research on selection of peptides having affinity for target molecule (HER2) from RI-labeled random peptide libraries consisting of D-amino acids.

研究分野：放射化学

キーワード：放射性同位体 ペプチド 医薬品開発 スクリーニング 癌

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がんの分子標的治療薬としてリツキサンやハーセプチン等の抗体医薬品が開発され、多くの患者に使用されるようになった。抗体医薬品は治療効果が高く副作用が少ないことから、今後その重要性はさらに高まると考えられる。一方で、抗体医薬品は、他の医薬品と比べて莫大な生産コストがかかるという大きな問題を抱えており、重要性和同時に医療費の益々の増加が懸念されている。このような状況を回避するために、次世代の分子標的治療薬として注目されているのが、ペプチドである。ペプチドの魅力は、有効なペプチドさえ見つけ出せば容易に合成が可能であり、化学的な合成が困難な抗体に比べて生産コストが低く抑えられる点にある。また、ペプチドには、標的分子へ特異的に結合する性質と高い薬理効果を示す性質が、抗体と同様に備わっていることから、分子標的治療薬としての期待が大きい。現在、生理活性を示すことがわかっているペプチドや標的分子に対して特異的に結合するペプチドを探索する手法(ファージディスプレイ法など)により得られたペプチドを出発物質として、医薬品候補となるペプチドの開発研究が進められているが、ペプチド開発の課題である生体内で分解されにくいペプチドを効率的に見出す技術は未だ確立されておらず、根本的な解決策がない状況である。このような理由から、ペプチド薬剤の開発は思うように進んでいないのが現実である。

## 2. 研究の目的

わずかな量でも検出可能な放射性同位元素(RI)を活用することで、効率的にペプチド薬剤を開発できる、新しい創薬システムの構築を目標とする。本研究では、D-アミノ酸

からなる RI 標識ペプチドライブラリーから、標的分子 (HER2) に対する親和性を有するペプチドの選抜に関する基礎的検討を行う。

## 3. 研究の方法

先行研究において研究代表者らが開発した放射性ヨウ素 (I-131) 標識ランダムペプチドライブラリーの作製技術を応用し、本研究では、(1)RI 標識 D 体ランダムペプチドライブラリーの合成手法の開発、(2)HER2 特異的ペプチドの選抜手法の検討、を実施した。併せて、ライブラリーを多様化するために、(3)配列中の任意の位置に RI 標識可能な前駆体の合成に関する技術を開発した。

## 4. 研究成果

(1)RI 標識 D 体ランダムペプチドライブラリーの合成手法の開発

【D 体ランダムペプチドライブラリーの作製】

I-131 が標識可能なチロシンを N 末端に有する 2400 万種類のペプチドで構成されるライブラリー ( $y-X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6$ , X: グリシン、チロシン、システインを除く 17 種類の D 体アミノ酸) を設計し、4 残基をランダム化した 3 シリーズ 867 種のランダムペプチドライブラリーの作製に取り組み、完成させた。

【ペプチドライブラリーへの I-131 標識条件の最適化】

約 8 万種類のペプチドを含むライブラリーに I-131 を標識するための反応に関わる重要な因子(反応温度、時間等)を最適化し、標識効率の良い I-131 標識ランダムペプチドライブラリーの安定的な作製法を見出した。

【HER2 結合性既知ペプチドの I-131 標識体の合成】

I-131 標識ランダムペプチドライブラリーから HER2 親和性ペプチドをスクリーニング

する際の指標として、HER2 結合性ペプチドの I-131 標識体の合成について、スズ化フェニルアラニンの合成、ペプチドへのスズ化フェニルアラニンの伸長およびスズ - ヨウ素交換反応等の最適条件を見出し、I-131 標識ペプチドを得ることに成功した。得られた I-131 標識ペプチドに対して、HER2 発現 / 未発現細胞を使用して結合実験を実施し、発現 / 未発現細胞間における結合差を確認した。

#### 【I-131 標識ランダムペプチドライブラリーのスクリーニング】

I-131 標識ランダムペプチドライブラリーのスクリーニングを HER2 発現 / 未発現細胞を使用して結合実験を実施し、1 シリーズ 289 種類のランダムペプチドライブラリー ( $X^1$ ,  $X^2$  が既知配列) のスクリーニングが完了した。ライブラリーの多くは、発現細胞、未発現細胞間で同等の結合値であったが、 $X^1 = \text{D-Thr (t)}$ ,  $X^2 = \text{D-Glu (e)}$  のライブラリーは、発現細胞に特異的な結合性を示し、未発現細胞に対する結合値の 5 倍ほどの高い値が得られた。

現在、 $X^3$ ,  $X^4$  が既知配列のライブラリーのうち、70 種類のスクリーニングが完了しており、引き続き、進めて行く。

#### (2) HER2 特異的ペプチドの選抜手法の検討

化学合成によって得たランダムペプチドライブラリーから特定の標的結合活性を有するペプチドを選抜する手法はこれまでにない。検出感度の高い RI を利用した新しいペプチドスクリーニング手法について検討しており、これまでに細胞膜上に発現する標的分子である HER2 発現細胞 SKOV3 及び未発現細胞 Ramos に対して、 $^{131}\text{I}$  標識ペプチドライブラリーを緩衝液中で結合させ、選抜する手法について検討してきた。その結果、SKOV3 と Ramos 間で結合量の差が認められるペプチドライブラリーをいくつか検出することができている。しかし、細胞表面には数多くの

細胞膜タンパク質が発現しているため、検出したペプチドライブラリーが HER2 特異的結合であるかを示すには至っていない。そこで、HER2 特異的ペプチドライブラリーの選抜手法について検討した。

#### 【表面活性磁気ビーズを用いたスクリーニング手法の検討】

本手法では、表面活性磁気ビーズに recombinant HER2 (rHER2) のみを化学的に結合させた rHER2 結合ビーズを用意し、 $^{131}\text{I}$  標識ペプチドライブラリーの結合を評価する手法を検討した。比較対照として、ウシ血清アルブミン (BSA) 結合ビーズを用意した。rHER2 結合ビーズと BSA 結合ビーズに対し、ポジティブコントロールとして  $^{131}\text{I}$  標識ハーセプチンの結合を評価した結果、rHER2 結合ビーズにおいて特異的かつ高い結合活性 (60 ~ 70% applied dose) を得た。しかし、 $^{131}\text{I}$  標識ペプチドライブラリーでは、rHER2 結合ビーズと BSA 結合ビーズ間の差が認められなかった。 $^{131}\text{I}$  標識ペプチドライブラリーの標識率は 30~50% であり、ペプチド溶液中に  $^{131}\text{I}$  free が存在することから、 $^{131}\text{I}$  free の BSA 標識ビーズへの結合を検討したところ、非特異的な結合 (2 ~ 3% dose) が認められた。そのため、 $^{131}\text{I}$  free の非特異的結合によって  $^{131}\text{I}$  標識ペプチドライブラリーの結合がマスキングされてしまったことが、rHER2 結合ビーズと BSA 結合ビーズ間での差が得られない原因と考えられる。これらの結果より、表面活性磁気ビーズを用いたスクリーニング手法は HER2 特異的ペプチドの選抜手法としては適切ではないことが示唆された。

#### 【ELISA を応用したスクリーニング手法の検討】

表面活性磁気ビーズを用いたスクリーニング手法の問題点である  $^{131}\text{I}$  free の非特異的結合を解決すべく、ELISA の原理を応用し、

rHER2 を 96 ウェルプレートに固相化して、選抜する手法について検討した。その結果、本手法では  $^{131}\text{I}$  free の非特異的な結合はほぼ認められなかったため、 $^{131}\text{I}$  free の影響を受けることなく  $^{131}\text{I}$  標識ペプチドライブラリーを選抜できる手法であることが示唆された。しかし、ポジティブコントロールとして用いた  $^{131}\text{I}$  標識ハーセプチンの結合量は 1% applied dose 前後と低く、 $^{131}\text{I}$  標識ペプチドライブラリーの結合を検出できない可能性が予想された。ウェル底面に固相化できる最大の rHER2 量は表面活性磁気ビーズに比べて少ないため、 $^{131}\text{I}$  標識ハーセプチンの結合量低下は固相化された rHER2 量に依存すると考えられる。今後、24 ウェルプレート等を使用することによって底面積を増加させ、rHER2 量を増やす改善を図る必要があるが、本手法が HER2 特異的ペプチドの選抜手法となりうることを示唆された。本手法で使用する rHER2 が非常に高価であることから、ランニングコストの面での問題が残る。そこで、細胞株を用いた選抜によって 1 次選抜した後、HER2 特異的結合であるかを本手法で検証する方法が有用であると考えられる。

#### 【生体内環境に近い条件における選抜手法の検討】

これまで、緩衝液を用いたペプチド選抜手法を検討してきたが、生物応用性の高いペプチドを選抜するため、生体内環境に近い条件での選抜手法の確立について検討した。具体的には、SKOV3 及び Ramos に対して  $^{131}\text{I}$  標識ペプチドライブラリーを培地中で結合させて選抜する手法を検討した。使用する培地には、ペプチドの非特異的結合を防ぐために、BSA を 1% w/v となるように添加し、さらに培養中の pH 変動を防ぐために、緩衝剤である HEPES を最終濃度が 25 mM となるように添加した。緩衝液と培地間で比較すると、緩衝液を用いた場合では培養後に細胞死が認めら

れたが、培地を用いた場合では培養後の細胞死は認められなかった。細胞死によって緩衝液中に拡散する細胞内タンパク質は、ペプチドの非特異的結合の増加に寄与する。そのため、培地を用いることによって、ペプチドの HER2 特異的結合をより検出しやすくできる可能性が示唆された。

#### (3) 配列中の任意の位置に RI 標識可能な前駆体の合成

先行研究でスズ - ハロゲン交換反応を利用した放射性ハロゲン標識化ペプチドの標識合成を行う際、ペプチド中のスズ置換基が合成時の酸処理に不安定であることからスズ置換アミノ酸 Phe 誘導体を N 末端以外に導入できないことが分かっている。そこで、配列中の任意の位置に標識可能な新規前駆体ペプチドの合成と放射性臭素標識反応について検討した。

#### 【ケイ素置換アミノ酸誘導体の合成と Br 標識】

スズ(Sn)の同族元素であるケイ素(Si)がハロゲンと容易に交換することに着目し、ケイ素置換 Phe 誘導体 Boc-Phe(4-Et3Si)-OMe の合成を行った。その結果、ケイ素置換 Phe 誘導体から対応する Br 体へと良好な収率で変換でき、ペプチド合成中の酸・塩基処理でもケイ素置換基が脱離しないことを確認した。

#### 【シリル化ペプチドの合成と Br 標識】

配列中の任意の位置で放射性臭素標識可能な新規標識前駆体ペプチドの合成法について検討した。ケイ素置換 Phe 誘導体 Boc-L-Phe(4-Et3Si)-OMe を前駆体とする Br-77 標識反応、Fmoc 固相合成に適用可能なケイ素置換 Phe 誘導体(Fmoc-L/D-Phe(4-Et3Si)-OH)を合成し、実際の固相合成に適用して標識前駆体となるシリル化ペプチドを

合成した。ペプチドには腫瘍の浸潤・転移に関わる  $\alpha_3$  インテグリンに対して強力なアンタゴニスト活性を示す環状 RGD ペプチドを選択し、良好な収率にて前駆体ペプチド cyclo[Asp-D-Phe(4-Et3Si)-Lys-Arg-Gly] を得ることができた。さらに次亜塩素酸 tert-ブチルを酸化剤として本ペプチドの Br-77 標識反応を行った結果、良好な標識率で標識ペプチド [77Br]-cyclo[Arg-Gly-Asp-D-Phe(4-Br)-Lys] (以後、Br-RGD1 と表記する) を得ることに成功した。

ケイ素-臭素交換反応による標識合成法の有用性を示すために Br-RGD1 の *in vitro* における安定性を評価した。比較化合物として Br-77 標識した D-Tyr 含有環状 RGD ペプチド [77Br]-cyclo[Arg-Gly-Asp-D-Tyr(3-Br)-Lys] (以後、Br-RGD2 と表記する) も合成し、標識率、放射化学純度、安定性の違いを評価した。その結果、Br-RGD1 は標識率・放射化学純度共に 90%以上で、Br-RGD2 よりも高かった。また、血清中 37°C で 24 時間処理しても Br-RGD1 は安定だった。(なお、Br-RGD2 については RI 製造設備の都合により血清中での安定性試験を行えなかった。) 一方、生理食塩水中ではいずれのペプチドも一部分解していることが分かった。溶液の pH が強酸性でペプチドの加水分解が進行した可能性が分解の主な原因であると考えられるが、未変化体の割合を比較すると Br-RGD1 の方が高かった(77%)。このことから環状 RGD ペプチド中の D-Phe 残基への標識化の方が D-Tyr 残基への標識化よりも標識率や安定性の面で優れていることが確認できた。

## 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)

[雑誌論文](計 3 件)

I. Sasaki, S. Watanabe, Y. Ohshima, Y.

Sugo, K. Yamada, H. Hanaoka, N. S. Ishioka, Medical application of radiohalogenated peptides: synthesis and *in vitro* evaluation of F( $p$ - $^{131}$ I)KCCYSL for targeting HER2, Peptide Science 2015, The Japanese Peptide Society, Osaka, Japan, 査読有, 2016, pp.243-246

K. Yamada, S. Watanabe, S. Watanabe, T. Takahashi, T. Moriguchi, H. Oku, N. S. Ishioka, K. Shinozuka, Synthesis and properties of silylated phenylalanine derivatives, Peptide Science 2015, The Japanese Peptide Society, Osaka, Japan, 査読有, 2016, pp.93-94

I. Sasaki, H. Hanaoka, K. Yamada, Sh. Watanabe, Y. Sugo, Y. Ohshima, H. Suzuki, N. S. Ishioka, Exploring of peptides with affinity to HER2 from random peptide libraries using radioisotope; Random hexapeptide libraries with fixed amino acid sequence at 1 and 2 positions, Peptide Science 2014, The Japanese Peptide Society, Tokushima, Japan, 査読有, 2015, pp.257-260

[学会発表](計 13 件)

Sh. Watanabe, A. Shimada, Sa. Watanabe, H. Hanaoka, N. S. Ishioka, Improvement and optimization of clinically promising  $^{76}\text{Br}$  isolation using dry distillation approach for its future automation, the International union of materials research society - International conference of advanced materials (IUMRS-ICAM) 2017, 2017 年 8 月 27 日 9 月 1 日, 京都大学吉田キャンパス(京都府堺区)

佐々木 一郎、大島 康宏、渡辺 茂樹、坂

下哲哉、須郷 由美、山田 圭一、石岡 典子、131I 標識ペプチドの医学応用 HER2 標的とした F(p-131I)KCCYSL の合成と in vivo 評価、第 54 回アイソトープ・放射線研究発表会、2017 年 7 月 6 日、東京大学弥生講堂（東京都文京区）  
渡邊 早貴、渡辺 茂樹、山田 圭一、奥 浩之、森口 朋尚、石岡 典子、篠塚 和夫、シリル化フェニルアラニンの合成と放射性臭素による標識化、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 27 日、日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県船橋市)  
K. Yamada, S. Watanabe, S. Watanabe, S. Torii, N. S. Ishioka, K. Shinozuka, Synthesis and properties of silylated phenylalanine derivatives and its application to bioactive cyclic peptides, 2nd International Symposium of Gunma University Medical Innovation, 2015 年 12 月 8 日、前橋商工会議所会館（群馬県前橋市）

〔図書〕(計 1 件)

山田 圭一、化学同人、月刊「化学」4 月号、ルールに囚われない薬剤設計 - 経口吸収される非メチル化環状ペプチドの開発 -、2015、Vol.70 (No.4)、p61-62

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：ペプチド化合物及びペプチド化合物の製造法

発明者：山田 圭一、渡邊 早貴、森口 朋尚、奥 浩之、篠塚 和夫、渡辺 茂樹、石岡 典子

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-047082

出願年月日：2015 年 3 月 10 日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石岡 典子 (ISHIOKA, Noriko)  
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・上席研究員 (定常)  
研究者番号：30354963

### (2) 研究分担者

大島 康宏 (OHSIMA, Yasuhiro)  
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・主任研究員 (定常)  
研究者番号：00588676

渡辺 茂樹 (WATANABE, Shigeki)  
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 (定常)  
研究者番号：10450305

山田 圭一 (YAMADA, Keiichi)  
群馬大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号：70323334

山口 藍子 (YAMADA, Keiichi)  
群馬大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・特任助教  
研究者番号：80609032

### (3) 連携研究者

花岡 宏史 (HANAOKA, Hirofumi)  
群馬大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・特任准教授  
研究者番号：50361390

### (4) 研究協力者

佐々木 一郎 (SASAKI, Ichiro)