

令和元年6月11日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09946

研究課題名(和文) PET薬剤を指向した放射性臭素標識ペプチドの実用的合成法の開発

研究課題名(英文) Development of practical synthetic method of radiobromine-labeled peptides for PET imaging

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アミノ酸・ペプチドを基盤とした核医学的診断用薬剤開発の一環として放射性臭素標識ペプチドの実用的合成法の開発を行った。その結果、ケイ素-放射性ハロゲン交換反応を利用した標識合成法を確立し、その有用性の一端を示すことができた。具体的にはシリル化フェニルアラニン残基を含むペプチドを標識前駆体として酸化剤の存在下で基礎検討用核種Br-77を作用させ、対応するBr-77標識腫瘍標的化ペプチド(環状RGDペプチド)の標識合成に成功した。本方法は従来までの標識合成法(Tyr残基への直接標識)と比較してより高い標識率と生体内安定性を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した標識合成法は核医学的診断に資する新規放射性ペプチド薬剤の合成に適用できるため、腫瘍をはじめとする様々な疾病の非侵襲的診断やRI内用療法に基づく放射線治療への応用が期待される。また、放射性臭素は現在実用化されている放射性フッ素よりも半減期が長いので、遠隔地への標識化合物の輸送が実現できれば、RI製造設備を持たない医療機関でのPET検査などに利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We developed facile synthetic method of radiobromine-labeled bioactive peptides via electrophilic desilylation. In this study, we synthesized bromine-77 labeled cyclic RGD peptide in good radiochemical yield.

研究分野：ペプチド科学

キーワード：PET薬剤 生物活性ペプチド 放射性臭素 標識合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射性臭素 ^{76}Br は、半減期 16.2 時間の PET 核種であり、サイクロトロンで製造される。 ^{76}Br は、 ^{11}C や ^{18}F と比較して標識合成時の放射能減衰が少なく、検査時においても時間的制約を受けずに動態解析を行えるというメリットを有する。また、標識後に輸送すればサイクロトロンを持たない遠隔地の医療施設における核医学検査が可能になる。さらに、治療と診断を両立するセラノスティクスプローブの開発も期待できる。

生体関連分子の ^{76}Br 標識化法には核酸塩基やタンパク質中の Tyr 残基への直接標識や Prosthetic tag を用いた抗体への間接標識がある (Curr. Radiopharm. 2011, 4, 76)。一方、連携研究者らは、 ^{76}Br を用いた低分子化合物の標識合成と PET イメージングによる腫瘍検出に成功しており、研究の対象をペプチドなどの生体関連分子へと広げつつある。ペプチドは、抗体に匹敵する受容体親和性を持ちつつ比較的安価に製造できるため、腫瘍検出用 PET プローブの母骨格として有用であるが、意外にも ^{76}Br 標識ペプチドは、過去に数例報告されているのみである (例: Theranostics, 2011, 1, 341)。

放射性ヨウ素標識ペプチドの合成では Tyr への直接標識が頻用されてきた。Tyr 標識体は *in vitro* では比較的安定なのに対し、*in vivo* では脱ヨウ素化が顕著に起こることが知られている。一方、予め放射性ヨウ素標識した Prosthetic tag による間接標識は、脱ハロゲン化抑制の有効な手段ではあるが、これをペプチドに適用する場合、tag の導入が構造や活性に影響する可能性がある。これに対し、申請者らは、 ^{76}Br で直接標識した Phe 誘導体が *in vivo* でも安定であることを見出している。この性質を活かしてスズ-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合成研究を行ってきた。その過程で、一般的な手法により標識前駆体を合成する際、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た。そこで、申請者は、配列中の任意の位置で ^{76}Br 標識できる標識前駆体ペプチドの合成研究を開始した。まず、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 誘導体の合成について予備実験を行った。その結果、ケイ素置換 Phe 誘導体 1 から Br 体 2 への変換に成功し、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も確認した (図 1 左)。以上の結果をもとに、申請者はケイ素置換 Phe 含有ペプチドを標識前駆体とする ^{76}Br 標識ペプチドの合成研究を計画した (図 1 右)。

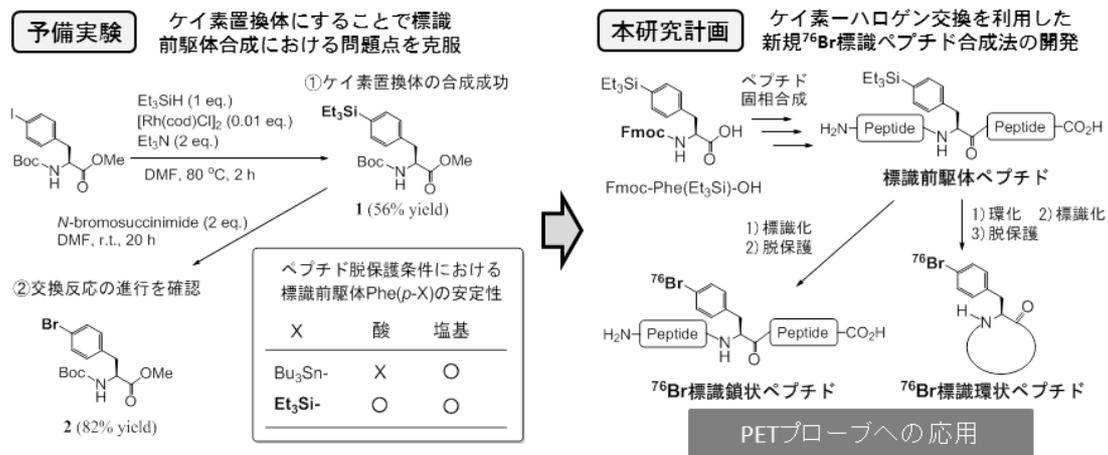


図 1. 放射性臭素標識ペプチド合成のための新しい標識前駆体合成法の概要

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、ケイ素-ハロゲン交換反応を利用した放射性臭素標識化アミノ酸・ペプチドの実用的合成法の開発、腫瘍および脳機能イメージングへの応用を指向した ^{76}Br 標識 PET 薬剤の合成と薬物動態解析、の 2 つである。これを達成するために 3 年間で以下の 3 つの研究課題を実施することとした。

- 1) 新規ケイ素置換アミノ酸 Fmoc-Phe(*p*-Et₃Si)-OH を合成する。これをペプチド固相合成に適用して配列中の任意の位置で ^{76}Br 標識可能な前駆体ペプチド (鎖状・環状) の合成法を確立する。
- 2) 合成した前駆体を用いて放射性臭素標識アミノ酸・ペプチドの標識合成を行い、標識条件 (酸化剤の量、反応時間など) の最適化や標識体の放射化学的性質を明らかにする。前駆体の母骨格には、既に標識合成の研究例がある環状 RGD ペプチドを用いる。得られた標識化合物の標識率・放射化学純度・安定性を評価し、対応する Tyr (or D-Tyr) 前駆体並びにスズ置換 Phe 前駆体の場合と比較する。また、標識化合物を担がんマウスに投与し、代謝安定性評価や PET 撮像による *in vivo* 薬物動態評価を行う。
- 3) 2) で得られた成果をもとに、腫瘍に高発現しているヒト上皮成長因子受容体 (EGFR) に結合するペプチドや血液脳関門 (BBB) 透過性 *N*-メチル化ペプチドを母骨格に持つ新しい

⁷⁶Br 標識 PET 薬剤の合成並びに PET イメージングを行い、本研究の標識合成法の有用性を検証する。

3. 研究の方法

1) ペプチド合成

シリル化フェニルアラニン誘導体の合成は文献既知の方法で行った(特開 2016-166151)。標識前駆体ペプチドの合成は、Fmoc 固相法により行った。第 1 アミノ酸をプレロードした合成用樹脂は市販品を購入した。アミノ酸残基の縮合は HBTU もしくは HATU を用いて行った。Fmoc 基の除去は 2% DBU/DMF 溶液で 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。同定は質量分析及び ¹H NMR により行った。

2) 標識合成

⁷⁷Br (半減期 57 h) は、日本原子力研究開発機構の AVF サイクロトロン(TIARA)で製造した。ターゲットには Cu₂^{nat}Se を用い、プロトンビーム(20 MeV, 5 μA)を 1 時間照射後、乾式蒸留による精製を経て ⁷⁷Br を単離した。標識前駆体(100 μg)を EtOH 100 μL に溶解させ、この溶液に ⁷⁷Br 水溶液 (10-50 kBq) と次亜塩素酸 *tert*-ブチル(1 μL)を加え、室温で 1~15 分間反応させた。ピロ亜硫酸ナトリウムを加えて反応停止後、TLC 及び逆相 HPLC により生成物の分析を行った。標品となる非放射性ペプチドは前述の方法により行った。

3) 安定性試験

HPLC 精製した標識ペプチドを 1.5 mL チューブに移し、生理食塩水を加えて 37 °C で 24 時間インキュベートした。その後、逆相 HPLC により分析し、処理前のクロマトグラムと比較して安定性を評価した。

4. 研究成果

1) 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実験

まず、Rh(I)触媒を用いた芳香族シリル化反応を利用して 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-TES)-OH (TES=triethylsilyl)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。モデルペプチドとして腫瘍に高発現している α_vβ₃ インテグリンの強力なアンタゴニストである環状 RGD ペプチドを選択した。Gly を担持した 2-chlorotriethyl 樹脂を出発原料として通常の Fmoc 固相合成を行い、1% トリフルオロ酢酸/ジクロロメタン溶液を用いて樹脂からの切り出しと液相環化を経て保護環状ペプチド cyclo[Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe(4-TES)-Lys(Boc)]を得た。これを酸処理による脱保護に付し、良好な収率にて前駆体ペプチド cyclo[Arg-Gly-Asp-D-Phe(4-TES)-Lys]を得ることができた。

得られた標識前駆体に酸化剤(次亜塩素酸 *tert*-ブチル)の存在下で基礎検討用の核種である ⁷⁷Br (半減期 57 h) を作用させ、高い標識率で対応する放射性臭素標識ペプチド [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。また、標識反応の再現性も確認できた。以上の結果、当初の研究目的に相当する課題を達成した。

上記の標識合成実験と並行して保護アミノ酸誘導体(Boc-Phe(4-SiEt₃)-OMe)をモデル化合物とした放射性臭素標識化の最適化を行った。その結果、酸化剤として用いる次亜塩素酸 *t*-ブチルを遮光下で取り扱うことで副反応(ウレタン水素の *N*-クロロ化)を顕著に抑制できることを見出した。また、反応溶媒を水から EtOH に変更することで上記副反応を抑制できることも明らかとなった。

2) ⁷⁷Br 標識ペプチドの安定性評価

Br-RGD1 の生理食塩水中ならびに血清中における安定性を評価した。比較化合物として ⁷⁷Br 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 については研究協力者の所属機関に設置されている RI 製造設備の都合により標識合成と血清中での安定性試験を行えなかった。一方、生理食塩水中での安定性試験の結果、どちらのペプチドも一部分解していることが分かった。分解の主な原因として標識化反応溶液が強酸性(pH 1)だったためにペプチドの加水分解が進行した可能性が考えられた。未変化体の割合を比較すると Br-RGD1 の方が 77% と高かったが、再現性も含め検討する必要がある。上記の結果から環状 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。しかし、H29 年度からの放射性臭素製造設備の不調の影響や RI 製造を担当する研究協力者らの実験スケジュールの都合で、

ノーマルマウスにおける臓器移行性試験の実施に必要な放射性臭素を製造するためのマシンタイムを確保できなかった。そのため、予定していた ^{77}Br 標識環状 RGD ペプチドの標識合成を実施することができなかった。今後、放射性臭素の製造問題が解消され次第、Br-RGD1 および Br-RGD2 の標識合成と動物試験を行う。

3) ケイ素 - ハロゲン交換による標識合成の汎用性と問題点の検証

本研究で開発したケイ素-ハロゲン交換を利用した放射性臭素標識合成法の汎用性を検証するために 2 種類の生物活性ペプチド (EGFR 結合ペプチドおよび血液脳関門透過性ペプチド) を選択し、その標識合成に使用するケイ素置換前駆体ペプチドとして H-Phe-Pro-Met-Phe(4-SiEt₃)-Asn-His-Trp-Glu-Gln-Trp-Pro-Pro-OH (EGFR 結合ペプチド)、Ac-MePhe(4-SiEt₃)-(MePhe)₃-NH₂ (血液脳関門透過ペプチド) を合成した。合成にはマイクロ波照射固相合成法(MW-SPPS)を用い、良好な収率で目的物を得た。今後、放射性臭素の製造問題が解消され次第、上記前駆体を用いた標識合成を進めていく。

4) ^{211}At 標識合成への適用

前項で述べたように RI 製造設備の不調という想定外の問題が発生したため、他機関で製造された放射性ハロゲンの譲渡を受けて標識合成研究を継続することとした。具体的には線放射核種である放射性ハロゲン ^{211}At を用いてケイ素 - ハロゲン交換による ^{211}At 標識 L-フェニルアラニンの標識合成を行った。CHCl₃ および N-chlorosuccinimide (NCS)-MeOH 溶液として単離された ^{211}At をケイ素前駆体 H-Phe(4-TES)-OH に作用させ、対応する標識化合物 4-[^{211}At]astato-L-phenylalanine を放射化学収率 75% (CHCl₃), 64% (NCS-MeOH) で得ることができた。in vitro 実験により得られた ^{211}At -標識化合物は大腸がんなどの腫瘍に高発現しているアミノ酸トランスポーターLAT1 に認識されて腫瘍内に有意に取り込まれることを確認した。これによりケイ素 - ハロゲン交換反応を利用した標識合成の有用性の一端を示すことができた。

<総括> 本研究では、アミノ酸・ペプチドを基盤とした核医学的診断用薬剤開発の一環として放射性臭素標識ペプチドの実用的合成法の開発を行った。その結果、ケイ素-放射性ハロゲン交換反応を利用した標識合成法を確立し、その有用性の一端を示すことができた。具体的にはシリル化フェニルアラニン残基を含むペプチドを標識前駆体として酸化剤の存在下で基礎検討用核種Br-77を作用させ、対応するBr-77標識腫瘍標的化ペプチド(環状RGDペプチド)の標識合成に成功した。本方法は従来までの標識合成法(Tyr残基への直接標識)と比較してより高い標識率と生体内安定性を達成した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1) K. Yamada, S. Watanabe, S. Watanabe, T. Takahashi, T. Moriguchi, H. Oku, N. S. Ishioka, and K. Shinozuka, Synthesis and properties of silylated phenylalanine derivatives, *Peptide Science* 2015, The Japanese Peptide Society, **52**, 93-94. (2016) (査読有)

2) K. Yamada, S. Watanabe, I. Sasaki, H. Hanaoka, and N. S. Ishioka, Synthesis and characterization of radiobromine-labeled bioactive peptides for molecular imaging, *Peptide Science* 2017, The Japanese Peptide Society, *in press*. (査読有)

3) 山田圭一, PET 薬剤を指向した放射性ハロゲン標識化合物の合成:現状と課題, *Bio Clinica*, **32**(6), 66-71. (2017) (査読有)

4) S. Watanabe, M. A. Azim, I. Nishinaka, I. Sasaki, Y. Ohshima, K. Yamada, N. S. Ishioka, A convenient and reproducible method for the synthesis of astatinated 4-[^{211}At]astato-L-phenylalanine via electrophilic desilylation. *Org. Biomol. Chem.*, **17**(1), 165-171. (2019) (査読有)

5) 山田圭一, 放射性ペプチド薬剤の標識合成と診断・治療への展開:現状と課題, *Bio Industry*, **36**(1), 75-81. (2019) (査読無)

[学会発表](計10件)

1) S. Watanabe, K. Yamada, S. Watanabe, H. Oku, T. Moriguchi, K. Shinozuka, N. S. Ishioka, Synthesis of a radiobrominated amino acid derivatives via silicon-bromine exchange reaction, 21st International symposium on Radiopharmaceutical Sciences (2015)

2) K. Yamada, S. Watanabe, S. Watanabe, T. Takahashi, T. Moriguchi, H. Oku, N. S. Ishioka, and K. Shinozuka, Synthesis and properties of silylated phenylalanine derivatives, 52nd Japanese Peptide Symposium (2015)

3) K. Yamada, S. Watanabe, S. Watanabe, S. Torii, N. S. Ishioka, and 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)

4) K. Yamada, S. Rokudai, R. Kawabata, M. Nishiyama and K. Shinozuka, Synthesis and biological evaluation of N-methylated cyclic pentapeptides against malignant breast cancer cell lines, 3rd International Symposium of Gunma University Medical Innovation (2016)

5) 山田圭一, 渡辺茂樹, 佐々木一郎, 花岡宏史, 石岡典子, ケイ素-ハロゲン交換反応を用いた放射性臭素標識ペプチドの合成研究, 第1回日本核医学会分科会放射薬品科学研究会/第17回放射性医薬品・画像診断薬研究会 (2017)

6) 渡辺茂樹, 佐々木一郎, 山田圭一, 石岡典子, 有機ケイ素前駆体を用いた放射性臭素アミノ酸誘導体の合成, 第57回日本核医学会総会 (2017)

7) K. Yamada, S. Watanabe, I. Sasaki, H. Hanaoka, and N. S. Ishioka, Synthesis and characterization of radiobromine-labeled bioactive peptides for molecular imaging, 54th Japanese Peptide Symposium (2017)

8) 渡辺茂樹, 山田圭一, 佐々木一郎, 石岡典子, ケイ素-ハロゲン交換反応を用いた放射性臭素標識化合物合成に関する基礎的検討, 第2回日本核医学会分科会放射薬品科学研究会/第18回放射性医薬品・画像診断薬研究会 (2018)

9) 渡辺茂樹, Mohammad Anwar-Ul Azim, 西中一郎, 佐々木一郎, 大島康宏, 山田圭一, 石岡典子, ケイ素-アスタチン交換反応を用いたアスタチン標識アミノ酸誘導体の合成, 第62回放射化学討論会 (2018)

10) 渡辺茂樹, Mohammad Anwar-Ul Azim, 西中一郎, 佐々木一郎, 大島康宏, 山田圭一, 石岡典子, 有機ケイ素前駆体を用いたアスタチン標識アミノ酸の合成, 第58回日本核医学会学術総会 (2018)

〔図書〕(計0件)

〔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方法

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: 国立大学法人群馬大学・国立研究開発法人日本原子力研究開発機構

種類: 特許公開

番号: 特開2016-166151

出願年: 2015年

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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：渡辺 茂樹
ローマ字氏名：Shigeki Watanabe
研究協力者氏名：花岡 宏史
ローマ字氏名：Hirofumi Hanaoka

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。