

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19810

研究課題名(和文) 効率の放射能送達を実現するがん治療用RI標識ペプチドの創製

研究課題名(英文) Development of new radioisotope-labeled peptides for effective delivery in cancer therapy

研究代表者

大島 伸宏 (Oshima, Nobuhiro)

北海道医療大学・薬学部・助教

研究者番号：80508648

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)：ラジオアイソトープ (RI) 標識ペプチドを用いる「がんの内用アイソトープ治療」では、非特異的で高い腎放射能集積が投与後早期から長時間に渡り認められる。そのため、腎被曝によって発現する腎毒性の解消が臨床において重要な課題となっている。これまでに申請者は、ペプチドへの酸性アミノ酸による負電荷付与が薬剤の腎集積低減に有用であることを示してきた。また、ペプチド鎖アミノ酸配列の伸長により腎放射能集積の低減に加えて、腫瘍放射能集積を増大する新たな化合物を見出した。本研究では、アミノ酸配列の改良により腎放射能集積を低減し、腫瘍放射能集積をさらに増大する新たな RI 標識ペプチドを見出した。

研究成果の概要(英文)：Recently, Radioisotope (RI)-labeled peptides have been studied as therapeutic agents for cancer treatment. However, their clinical applications are difficult because of non-specific long-lasting accumulation of radioactivity in the kidney. To resolve this problem, we demonstrated the renal accumulation could be reduced by introducing a negative charge to peptide moiety with acidic amino acid. In addition, we also found that the elongation of amino acids to original peptide sequences dramatically increased tumor accumulation of radioactivity. In this study, we successfully developed a new RI-labeled peptide derivative which showed both lower renal radioactivity and higher tumor radioactivity by chemical modifications of the peptide sequence.

研究分野：放射性医薬品

キーワード：放射性医薬品 octreotide 腎臓 がん 体内動態 インジウム-111 アイソトープ内用療法

1. 研究開始当初の背景

ラジオアイソトープ (RI) 標識抗体医薬品「ゼヴァリン」が、悪性リンパ腫の治療薬として我が国でも認可され、臨床使用されている。近年、がんの特異的に集積する抗体や低分子ペプチドを RI で標識し、それらを体内に投与する「がんのアイソトープ内用療法」が注目されており、盛んに研究が行われている。抗体と比べて低分子ペプチドは、合成や RI 標識が容易で、薬剤投与後の血中クリアランスも良好であることから、ペプチドを母体とした様々な RI 標識薬剤についてアイソトープ治療薬剤としての可能性が検討されている。

しかし、いずれの RI 標識ペプチドも、投与早期から腎臓において非特異的で高い放射能の滞留が認められる。そのため腎被曝によって、高頻度で発現する腎毒性が臨床応用への大きな障害となっている。

この腎集積を低減できれば、ペプチドを母体化合物とするアイソトープ内用療法の安全性を高められることから、様々な腎集積低減法が検討されてきたが、十分な成果が得られているとは言い難い。

そのような中、我々は欧米で開発され、近年の日本でも臨床使用が開始された  $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide (1) をモデル化合物として選択し、RI 標識ペプチドの腎集積低減法を検討してきた。その結果、母体化合物のペプチド鎖中に Asp や Glu などの酸性アミノ酸を導入し、分子全体に負電荷を付与することで腎集積を半減できることを報告してきた (図 1)。

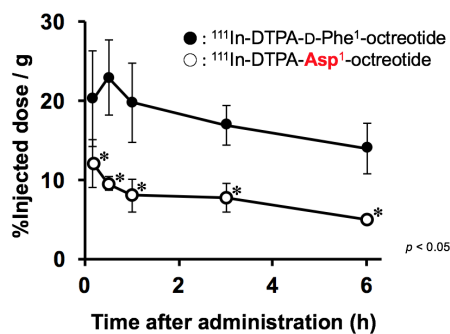


図1. 負電荷付与による腎集積の低減

さらに、 $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide の母体ペプチド鎖 N 末端へ Asp に続けて D-Phe の 2 残基のアミノ酸を伸長した  $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>-1</sup>-Asp<sup>0</sup>-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide (2) は、担がんマウスにおいて腎集積を半減するだけでなく、腫瘍集積を 4 倍に増大することを明らかにした (図 2)。

2 の腫瘍集積が増大した要因を明らかに出来れば、酸性アミノ酸での負電荷付与による腎集積の半減に加え、標的とする腫瘍へ放射能を特異的に送達できる新たな放射性 octreotide 誘導体を開発できるのではないかと考え研究を開始した。

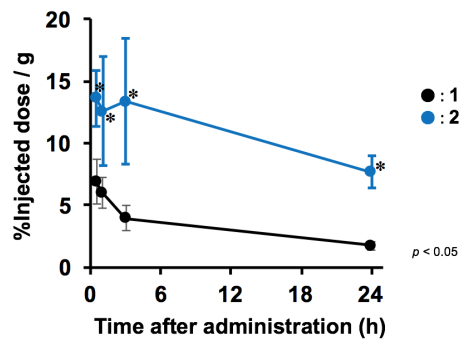


図2.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>-1</sup>-Asp<sup>0</sup>-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide の *in vivo* 腫瘍集積性

2. 研究の目的

これまでに我々は、RI 標識 octreotide の腎集積を半減し、腫瘍集積を大幅に増大する新たなペプチド配列を見出している。そこで、このペプチド配列を最適化し、細胞殺傷性が高い放射性核種で標識することで「腎毒性の軽減に加えて、腫瘍選択的な放射能送達を増大により高い抗がん作用を有する新たな放射性ペプチド薬剤を開発できる」と考えた。

本研究では、がんのアイソトープ内用療法への応用を念頭に、安全性が高く効果的ながん治療を実現する新たな RI 標識 octreotide 誘導体の開発を目指した。

3. 研究の方法

標識前駆体ペプチドは、常法に従い Fmoc 固相合成法により合成した。母体ペプチドの受容体親和性の測定に用いた、各種の非放射性 octreotide 誘導体も同様の方法で合成した。

標識前駆体ペプチドの  $^{111}\text{In}$  標識は、常法に従いクエン酸緩衝液中で実施し、放射化学的純度は TLC、セルロースアセテート膜電気泳動法 (CAE) および HPLC により測定した。

$^{111}\text{In}$  標識 octreotide 誘導体の電気化学的性質は CAE において、各標識ペプチドの原点からの移動度を比較することで評価した。

放射性 octreotide 誘導体の *in vitro* 評価には、ソマトスタチン受容体を高密度に発現するラット膵臓がん由来 AR42J 細胞を用いた。また受容体親和性の評価 (ラジオレセプターアッセイ) には、培養 AR42J 細胞から調製した細胞膜ホモジネートを用いた。

$^{111}\text{In}$  標識 octreotide 誘導体の *in vivo* 評価には、がん移植モデルマウス (担がんマウス) を用いた。担がんマウスは雄性 Balb/c-nu/nu ノードマウスの皮下に培養 AR42J 細胞を移植することで作製した。

4. 研究成果

固相法により標識前駆体ペプチドを合成し、 $^{111}\text{In}$  で標識した。得られた放射性ペプチド 1, 2, 3, 4 の放射化学的純度はそれぞれ 97%、95%、96% および 97% であり in

in vitro および in vivo 実験に用いるのに十分な純度であった (図 3)。得られたこれら放射性ペプチドの電気的性質を比較したところ、ペプチド配列中に酸性アミノ酸を導入した **2, 3, 4** の 3 種は **1** よりも陽極側への移動度が大きく、分子全体が **1** よりも負に帯電していることが確認された (図 4)。



図3.  $^{111}\text{In}$  標識 octreotide 誘導体の構造式

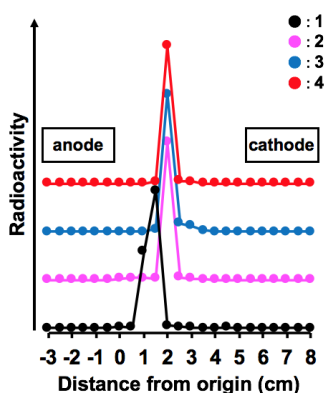


図4. 放射性ペプチドの電気的性質の評価

放射性ペプチド **1, 2, 3, 4** を培養 AR42J 細胞とインキュベートし、in vitro 腫瘍集積性を評価した。誘導体 **2, 3, 4** はそれぞれコントロールとして用いた **1** の 2 倍、4 倍、10 倍高い細胞取込みを示した (図 5)。

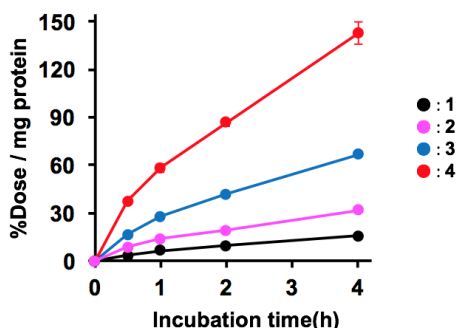


図5. 培養 AR42J 細胞への取込み

化合物 **2** にはペプチド鎖 0 位に酸性アミノ酸として Glu を導入している。**2** と **3**

の細胞取込みの比較から、0 位に導入する酸性アミノ酸として Asp を用いる方が腫瘍集積の増大には好ましいことが示された。また、-1 位に導入する Phe の立体化学が L 配置の場合、腫瘍集積性が飛躍的に向上することが明らかとなった。

放射性ペプチドの培養細胞への取込みが増大した原因として、母体ペプチド部の受容体親和性の増大が考えられた。そこで母体ペプチドの受容体親和性を評価するために  $^{111}\text{In-DTPA}$  が結合しておらず、-1 位を様々なアミノ酸に置換した非放射性 octreotide 誘導体を合成し、それらの受容体親和性をラジオレセプターアッセイで評価した。図 6 に示すようにどのペプチドの親和性も octreotide の 0.4–1.7 倍程度であり、極端な受容体親和性の増加は認められなかった。そのため、母体ペプチド鎖の受容体親和性の増大が腫瘍集積の増大に寄与しているとは考えにくく、本研究期間内では高い細胞取込みの原因説明には至らなかった。

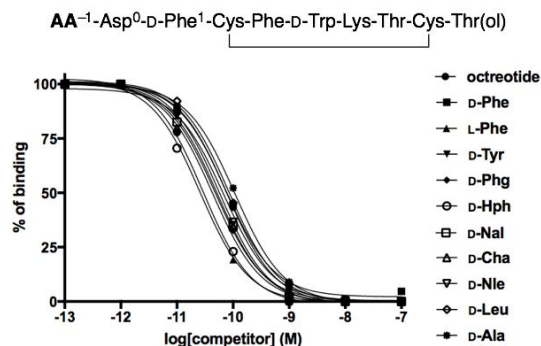


図6. -1 位置換 octreotide 誘導体の受容体親和性評価

培養細胞で最も高い取込みが認められた **4** の in vivo 腫瘍集積性を担がんマウスを用いて評価した。また、体内分布を **1** および **3** と比較した。**4** および **3** の腫瘍集積は **1** よりも有意に高く、細胞取込み実験で得られた結果と同様、腫瘍放射能集積の顕著な増大が in vivo においても認められた (図 7)。

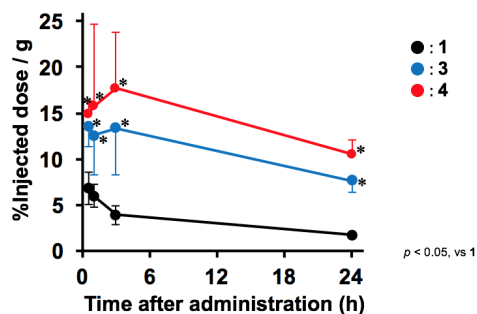


図7. 新規  $^{111}\text{In}$  標識 octreotide の in vivo 腫瘍集積性の評価

また、**3** および **4** の腎集積は投与 1 時間後から **1** よりも有意に低く、これまでと同様、**4** においても負電荷付与による腎集積の低減効果が認められた (図 8)。

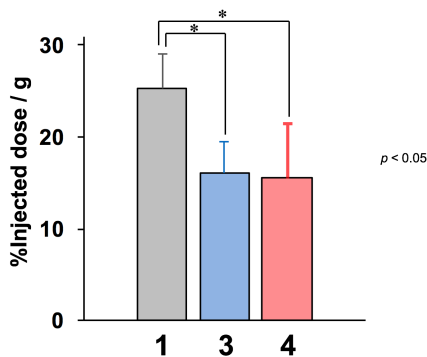


図8. 3 および 4 の担がんマウスにおける腎集積低減効果

以上、本研究を通して既存の放射性ペプチド薬剤において問題となっている腎集積を半減し、加えて腫瘍集積を大幅に増大する新たな RI 標識 octreotide 誘導体  $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^{-1}\text{-Asp}^0\text{-D-Phe}^1\text{-octreotide}$  を見出した。今後、更なる構造最適化によって、「腫瘍選択的放射能送達により、高い安全性と有効性を示すがん治療用 RI 標識ペプチド薬剤」が開発できると考えられ、引き続き研究を進めていく予定である。

#### 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)

**N. Oshima**, H. Akizawa, H. Kitaura, H. Kawashima, S. Zhao, Y Zhao, K. Nishijima, Y. Kitamura, Y. Arano, Y. Kuge, K. Ohkura,  $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^{-1}\text{-Asp}^0\text{-D-Phe}^1\text{-octreotide}$  exhibits higher tumor accumulation and lower renal radioactivity than  $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ , Nucl. Med. Biol. (査読あり), 54, (2017) 18–26.

DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.07.002>

**N. Oshima**, H. Akizawa, H. Kawashima, S. Zhao, Y Zhao, K. Nishijima, Y. Kitamura, Y. Arano, Y. Kuge, K. Ohkura, Redesign of negatively charged  $^{111}\text{In-DTPA-octreotide}$  derivative to reduce renal radioactivity, Nucl. Med. Biol. (査読あり), 48, (2017) 16–25.

DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2017.01.006>

#### 大島伸宏

トピックス “乳がん細胞選択的な白金製剤のデリバリー” ファルマシア (査読なし), 53, (2017) 919.

[学会発表](計 4 件)

**大島伸宏**, 亀山裕司, 鹿内浩樹, 北浦廣剛, 秋澤宏行, 大倉一枝,  $^{111}\text{In-DTPA-L-Phe}^{-1}\text{-Asp}^0\text{-D-Phe}^1\text{-octreotide}$  の正常マウスでの体内動態および *in vitro* 腫瘍集積性の評価、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 27 日 (石川県金沢市)

**Nobuhiro Oshima**, New  $^{111}\text{In}$ -labeled octreotide derivatives with increased specific tumor uptake, CIS workshop 2017 2<sup>nd</sup>, December 18, 2017, Central Institute of Isotope Science, Hokkaido University (Hokkaido, Sapporo)

**大島伸宏**, 近江悠, 近藤史博, 河嶋秀和, 秋澤宏行, 大倉一枝,  $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^{-1}\text{-Asp}^0\text{-D-Phe}^1\text{-octreotide}$  の高い放射能集積の原因解明に向けた N 末端伸長 octreotide の構造活性相関研究、第 16 回 放射性医薬品画像診断薬研究会、2016 年 10 月 1 日、京都市勧業館「みやこめっせ」(京都府京都市)

**大島伸宏**, 河嶋秀和, 秋澤宏行, 久下裕司, 大倉一枝,  $^{111}\text{In-DTPA}$ -オクトレオチドの錯構造に基づく幾何異性体の相互変換と受容体親和性に関する検討、第 55 回 日本核医学会学術総会、2015 年 11 月 5 日、ハイアットリージェンシー東京 (東京都新宿区)

[その他]  
ホームページ等

<http://www3.hoku-iryu-u.ac.jp/courses/1/008/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

大島 伸宏 (OSHIMA, Nobuhiro)  
北海道医療大学・薬学部・助教

研究者番号 : 80508648