

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07625

研究課題名(和文) 環状ペプチドライブラリーを用いた放射性薬剤探索研究の新機軸

研究課題名(英文) New methods for screening radiopharmaceuticals using cyclic peptide libraries

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍の核医学的診断や治療に資する新しい放射性標識環状ペプチド薬剤の探索に資する標識前駆体ペプチドライブラリーの合成法について検討した。ケイ素-放射性臭素交換反応による標識合成を念頭に置き、ケイ素置換基を有する環状ペプチドの合成法を検討した。N末端をBpoc(2-(4-biphenyl)-2-propyloxycarbonyl)基で保護したアミノ酸をビルディングブロックとしたペプチド鎖伸長と固相環化脱離により標識前駆体ペプチドを純度良く得ることができた。応用研究としてRGD配列を持つ環状ペプチドのスクリーニングに資するパーシャルライブラリーの構築も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍特異的に集積するペプチドを様々な放射性同位元素(RI)で標識した薬剤(放射性標識ペプチド)は、核医学的診断や治療への応用が期待されている化合物群である。すでにいくつかの薬剤が実用化されているが、より幅広い疾病に対応するためには各疾患に特異的な分子標的に結合するペプチドの開発が重要になる。本研究では薬剤候補となる環状ペプチドを効率よく選別するための化学合成可能なRI標識ライブラリーの構築に向けた基礎研究を行い、標識前駆体ペプチドを純度良く短時間で合成できる方法を開発することができた。本研究で開発された標識前駆体の迅速合成法により今後の薬剤開発に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study we developed new methods for creating cyclic peptide libraries for screening radiopharmaceuticals. The main concept for preparing RI-labeled cyclic peptides is based on silicon-radiobromine exchange reaction. Therefore, we tried to synthesize silylated cyclic pentapeptide libraries containing RGD sequence. Stepwise elongation of peptides using Bpoc-chemistry (Bpoc=2-(4-biphenyl)-2-propyloxycarbonyl) followed by on-resin macrocyclization and cleavage from the resin afforded desired cyclic peptides in good yield and high purity. In addition, we utilized this method for preparation of partial cyclic pentapeptide libraries by split and mix method.

研究分野：創薬化学

キーワード：環状ペプチドライブラリー 放射性標識ペプチド 標識合成

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

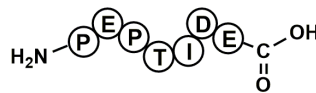
1. 研究開始当初の背景

腫瘍特異的に集積するペプチドを様々な放射性同位元素(RI)で標識した薬剤(放射性標識ペプチド)は、核医学的診断はもとより治療(Peptide receptor radionuclide therapy: PRRT)への応用が期待されている化合物群であり、これまでにソマトスタチン受容体を標的とした ^{111}In 標識ペントレオチド(商品名: オクトレオスキャン)が実用化されている。今後、幅広い疾病に対応するためには各疾患に特異的な分子標的に結合するペプチドの探索が不可欠である。

結合モチーフの探索は、コンビナトリアルペプチドライブラリーのような多品目化合物の中から選別する方法が主流である。例えば、ファージディスプレイやたんぱく質プライシングなどの生物学的手法を駆使して多くの結合モチーフが発見されてきた。その大半はタンパク質性アミノ酸からなる鎖状ペプチドであるが、これらは生体内安定性に乏しいというデメリットがある(図1)。一方、環状ペプチド、特にD-アミノ酸や非天然アミノ酸を含む特殊環状ペプチドは酵素分解耐性の面で優れ、立体配座の自由度低下による標的親和性の向上が期待されるが、このような化合物ライブラリーの構築は特殊な翻訳合成系を使用できる研究グループに限定されてきた。上記のような生物学ライブラリーに対し、化学合成が可能な環状ランダムペプチドライブラリーに放射性標識化を

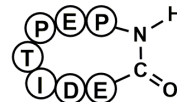
施し、スクリーニングに供する試みは有効な手段の一つと考えられるが、先行研究例はほとんどなかった。これは、標識前駆体ライブラリーの構築および標識後の評価系について十分に検討されていないことが背景にあると考えられる。

鎖状



- 合成or生物学的手法にて調製が可能。
- ×酵素により容易に分解を受けるため生体内安定性が低いものが多い

環状



- 鎖状よりも酵素分解を受けにくい。
- 立体配座の固定化により標的への親和性が鎖状より高い。
- ×鎖状ペプチドの環化が必須。

図1. 鎖状および環状ペプチドの特徴

2. 研究の目的

本研究課題では、放射性薬剤候補化合物スクリーニングへの応用を指向した放射性標識環状ランダムペプチドライブラリーの化学合成法の開発を目的とし、ライブラリー構築における問題点や課題を明らかにする。まず、コンセプトの有効性を確認するために環状ペプチドライブラリーから既知の結合モチーフ(RGD)を有する環状ペプチドを選別できるか検証する。

3. 研究の方法

(1) 標識前駆体ペプチドライブラリー調製方法の検討

本研究では5残基の環状ペプチドを対象を絞り、放射性標識環状ペプチドライブラリーからの選別を検討する。前駆体環状ペプチドライブラリーの構築では固相上で環化と脱樹脂を同時に行うことができるオキシム樹脂を選択し、合成の効率化を図る。この方法に適したN末端保護基として非常に弱い酸にて切断可能なBpoc(=2-(4-biphenyl)-2-propyloxycarbonyl)基を、側鎖保護基にBoc^tBu基を用いた固相合成法(Bpoc-SPPS)を実践する。

(2) 使用する放射性核種と標識方法の検討

選別した化合物を核医学的診断(PET, SPECT)やRI内用療法に用いることを念頭に置き、その両面に対応できる放射性臭素を標識核種として用いる。一般に、放射性ハロゲン標識化ではprosthetic tagを用いることが多いが、標的への結合や薬物動態に与える影響を最小限にとどめる

ため芳香族アミノ酸側鎖への直接標識を利用する．本研究では従来法のスズーハロゲン交換と比べ前駆体の安定性と保存性に優れ，標識率も高いケイ素 - ハロゲン交換を用いる．

4．研究成果

(1) ビルディングブロックとなる Bpoc アミノ酸 (Bpoc-AA) の合成

研究コンセプトの妥当性を検証するために， $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに特異的に結合する環状 RGD ペプチド *cyclo*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys] をモデルペプチドとし，その合成法を検討した．まず，ビルディングブロックとなる Bpoc-AA の合成方法を検討した．文献法に従い Triton B を塩基としてアミノ酸の Bpoc 化を試みたところ総じて収率は低く，Phe に至っては反応が全く進行しなかった．そこで，塩基を 1,1,3,3-テトラメチルグアニジン(TMG)に変更したところ Phe の Bpoc 化反応は進行し，その他のアミノ酸も含め中程度の収率で目的とする Bpoc-AA を合成することができた．

(2) Bpoc-SPPS によるモデルペプチドの合成

(1) の方針に従い Bpoc-SPPS により目的とする環状 RGD ペプチドが合成できるか検討した．縮合剤として HBTU を用いて Bpoc-AA を伸長し，Bpoc 基の脱保護は 1% $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ in CH_2Cl_2 (v/v)で行った．伸長により得られた鎖状ペプチド樹脂に塩基を作用させて環化と同時に樹脂からの切り出しを行い，目的とする側鎖保護環状 RGD ペプチド *cyclo*[Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe-Lys(Boc)]を効率よく得ることができた．

(3) 合成方法の改良

最終脱保護プロセスの検討

通常の環状ペプチド合成では保護鎖状ペプチドを溶液中で環化した後に側鎖保護基の除去を行う．当初は本実験でも同様の手法で行う計画だったが，文献調査の結果から Safety-catch 樹脂を用いた環状ペプチド合成では樹脂に結合したまま最終脱保護を行い，環化脱離を経て側鎖遊離の環状ペプチドを得ている点に着目した．そこで，Bpoc-SPPS 法で鎖状ペプチド樹脂を調製後，酸処理による側鎖脱保護の除去を行った後に環化脱離を行う方法で側鎖遊離の環状ペプチド *cyclo*[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys]が得られることが分かった．

一次配列の検討

次に，ケイ素置換基を有する標識前駆体環状 RGD ペプチド *cyclo*[Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe(TESS)-Lys(Boc)] (TESS=triethylsilyl)の合成を検討した．当初計画では樹脂への導入の容易さから Gly を C 末端アミノ酸として用いることを検討していた．そのためケイ素置換 D-Phe (D-Phe(TESS))の Bpoc 保護体である Bpoc-D-Phe(TESS)がビルディングブロックとして必要になった．まず，(1)の結果に基づき Bpoc 化反応を試みたが，TMG を塩基として用いる方法でも収率が低く，ライブラリー構築に必要な量を確保するために合成プロセスの改良が必要となった．そこで，Bpoc-D-Phe(TESS)の代わりに合成中間体である Boc-D-Phe(TESS)を配列の N 末端に配置してペプチド鎖を構築した．次に得られた知見をもとに固相環化脱離の前に酸処理を施して側鎖保護基を脱保護し，環化脱離を行うことで同様にケイ素置換基を有する保護環状ペプチド前駆体 *cyclo*[Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-D-Phe(TESS)-Lys(Boc)]を合成できることを確認した．

側鎖保護基の検討

で合成したケイ素置換環状 RGD ペプチドの最終脱保護の際に、脱シリル化とそれに起因する精製プロセスの煩雑化の問題が生じた。生成物のプロファイリングを行った結果、Arg の側鎖保護基である Pbf 基が最も除去されにくく、完全脱保護までに長時間の酸処理が必要だったことが脱シリル化の主な要因であることがわかった。そこで、Pbf 基から Boc 基へと変更して合成を行った。まず、ビルディングブロックとして新たに Arg 側鎖グアニジノ基を 2 つの Boc 基で保護した Bpoc-Arg(Boc)₂-OH を合成し、実際に Bpoc-SPPS 法に適用した。その結果、最終脱保護時の脱シリル化が顕著に抑制され、目的とするケイ素置換環状 RGD ペプチドの収率が向上することが分かった。

(4) Bpoc-SPPS を用いた標識前駆体パーシャルライブラリーの合成検討

ケイ素置換環状 RGD ペプチド *cyclo*[Arg-Gly-Asp-D-Phe(TEs)-Lys] を基本化合物として結合モチーフとなる Arg-Gly-Asp 部分を構造の類似したアミノ酸残基に置換した *cyclo*[Aaa-Gly-Asp-D-Phe(TEs)-Lys] (Aaa=Arg, Orn, 4-guanidino-Pro), *cyclo*[Arg-Bbb-Asp-D-Phe(TEs)-Lys] (Bbb=Gly, Ala, Ccc=Asp, Glu, Asn), *cyclo*[Arg-Gly-Ccc-D-Phe(TEs)-Lys] (Ccc=Asp, Glu, Asn) の標品 8 種類を split and mix 法により合成した。

(5) 環状 RGD ペプチド以外のスクリーニング評価用標準物質の選定

ペプチドスクリーニング法の評価における環状 RGD ペプチド以外の 5 残基環状ペプチドについて候補化合物の選定を行った。代表者らが研究してきたハロゲン含有疎水性環状ペプチド SA-I (*cyclo*[Phe(4-I)-Leu-MeLeu-Val-Leu], MeLeu = *N*-methyl-L-leucine) が培養乳がん細胞 MDA-MB-231 に対して細胞毒性を示すことに着目し、細胞内外における SA-I の標的探索を行った。その結果、SA-I は、アデノシン受容体 (A2B 受容体) の発現を効果的に阻害していることを見出した。この知見に基づき SA-I をベースとした環状ペプチドライブラリーの構築を指向して標識前駆体ペプチドの合成研究を行った。具体的にはペプチド中の 1 位にある 4-iodo-L-Phe 残基を 4-TEs-L-Phe (Phe(TEs)) に置換した標識前駆体ペプチドを Bpoc-SPPS 法で合成できるか検討した。これまでの研究により通常の Boc 法で SA-I を合成すると培養 TNBC 細胞に対して細胞毒性を示すペプチド以外に同じ分子量で細胞毒性を示さないペプチドが副生することが分かっている。現在までのところ非活性ペプチドの副生の原因は明らかになっていない。そこで、本研究で開発した Bpoc-SPPS 法で SA-I の合成を行った結果、非活性ペプチドの副生を抑制することはできなかった。しかし、逆相 HPLC の条件検討した結果、2 つのペプチドの良好な分離を示す分析条件を決定でき、今後 SA-I の標識前駆体ライブラリーの合成を効率化するための知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 S. Watanabe, M. A.-U. Azim, I. Nishinaka, I. Sasaki, Y. Ohshima, K. Yamada and N. S. Ishioka	4. 巻 17
2. 論文標題 A convenient and reproducible method for the synthesis of astatinated 4-[²¹¹ At]astato-L-phenylalanine via electrophilic desilylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Org. Biomol. Chem.	6. 最初と最後の頁 165-171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C80B02394H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 E. Horigome, M. Fujieda, T. Handa, A. Katayama, M. Ito, A. Ichihara, D. Tanaka, N. Gombodorj, S. Yoshiyama, A. Yamane, K. Yamada, J. Horiguchi, K. Shinozuka, T. Oyama, M. Nishiyama and S. Rokudai	4. 巻 9
2. 論文標題 Mutant TP53 modulates metastasis of triple negative breast cancer through adenosine A2b receptor signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 34554-34566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.26177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山田圭一	4. 巻 36
2. 論文標題 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	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Industry	6. 最初と最後の頁 75-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 I. Sasaki, Y. Araki, K. Yamada	4. 巻 -
2. 論文標題 Synthesis of Head-to-Tail Cyclic Peptides Using Bpoc-Chemistry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Peptide Science 2022	6. 最初と最後の頁 97-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺茂樹, 山田圭一, 佐々木一郎, 石岡典子
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第62回放射化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木一郎, 荒木悠汰, 山田圭一
2. 発表標題 Bpoc-chemistryを用いたHead-to-Tail型環状ペプチドの合成
3. 学会等名 第59回ペプチド討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田圭一
2. 発表標題 難治性乳がんを標的としたペプチド薬剤の開発
3. 学会等名 新潟大学UGCEセンター第13回研究シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田圭一
2. 発表標題 ベンゾチアジアゾール型蛍光団を有する膜透過性ペプチドの合成と応用
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 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	権利者 国立大学法人群馬大学、国立研究開発法人量子
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6707783号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡辺 茂樹 (WATANABE Shigeki) (10450305)	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 (82502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------