

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17212

研究課題名（和文）架橋安定化を基盤とするペプチドプローブの動態最適化と高感度イメージング手法の構築

研究課題名（英文）Development of highly sensitive peptide probes with optimized kinetics based on cross-linking method

研究代表者

近藤 直哉（Kondo, Naoya）

大阪医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80756172

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、不安定ペプチドを架橋により分解制御し、生体内半減期の延長する手法に着目した新たなプローブ開発法を提案した。本手法は、ペプチドが直面する動態制御の困難さ、放射標識後の分離精製の問題点を一挙に解決し得ると考えられる。本研究は、不安定ペプチドGLP-1及び二環性RGDペプチドをモデルとして選択し、合成したイメージングプローブ（ $[^{125}\text{I}]\text{GLP-1CL}$ 及び $[^{125}\text{I}]\text{bcRGD}$ ）に関して、インビトロ、インビボ実験を遂行、本手法の有効性検証を実施し、架橋ペプチドのイメージングプローブとしての優れた性質を見出した。本研究結果より、ペプチド化学や診断・治療研究の発展に幅広い貢献が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチドは高い標的認識性を有し、核医学領域でも診断用・治療用のプローブとして有効性が認められている。一方で、生体内での不安定性が動態に影響し、放射標識後の精製が困難であるなど中分子であるペプチド特有の性質が診断薬・治療薬の開発難度を高めており、有効な動態制御法、精製法の確立がペプチド性プローブ開発の発展に不可欠である。ペプチドへの架橋構造に放射標識部位を組み入れる本手法の有効性を明らかにした本課題の成果は、治療・診断を一体化するセラノスティクス用薬剤開発や、長期滞留型の治療薬開発の可能性に直結し、ペプチド化学や診断・治療研究、個別化医療の発展に幅広く貢献すると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we proposed a new method for developing peptide probes, focusing on a method to control degradation of unstable peptides by cross-linking to extend their in vivo half-life. This method can solve the difficulty of controlling the kinetics of peptide probes and the problem of separation and purification after radiolabeling. In this study, we selected the unstable peptide GLP-1 and the bicyclic RGD peptide as models, performed in vitro and in vivo experiments on the synthesized imaging probes ($[^{125}\text{I}]\text{GLP-1CL}$ and $[^{125}\text{I}]\text{bcRGD}$), and validated the effectiveness of this method. We found that the cross-linked peptides have excellent properties as imaging probes. The results of this study are expected to contribute to the development of peptide chemistry and diagnostic and therapeutic research.

研究分野：分子イメージング

キーワード：ペプチド 安定化 イメージングプローブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペプチドは高い標的特異性を有する点、化学合成が可能な点など様々な利点を有する。現状、多数のペプチド医薬品が開発され、核医学の領域でもペプチドを用いた ^{68}Ga -dotatate による腫瘍の PET 診断 / ^{177}Lu -dotatate による治療等が臨床で実施され、有効性が認められている。一方で、ペプチドは 1. 生体内酵素による分解を受けやすく、その分解がペプチドの動態や薬効に影響するため、体内動態の予測や制御が困難であること、2. 中分子である性質上、標識後の前駆体ペプチドの分離精製が困難であり、投与液に放射標識プローブと比較して、大過剰量の前駆体ペプチドが混入する、といった問題点を有する。したがって、ペプチドの分解及び動態を制御しつつ、標識・精製の問題点を解決し得る薬剤設計手法の確立は、ペプチドを基盤とした治療・診断研究の発展に不可欠である。

近年のペプチドに関する研究の成果として不安定ペプチドの α ヘリックス構造を多様な架橋構造により安定化し、生体内分解を制御することで、親和性を維持しつつ、生体内半減期を安定化度に応じて延長できることが Zhang らにより示された (Bioconjug Chem. 2015)。

このペプチドの安定化に関する基礎的な実証の成果と、本研究で提案する新たな放射標識法との融合により有効なペプチドプローブ開発法が提案できると考えた。すなわち、放射標識した架橋構造により、ペプチドを安定化することで、放射標識体のみを安定化でき、安定化度に応じて生体内半減期を制御できる、動態制御と精製の問題点を一挙に解決する革新的なペプチドプローブ開発手法を着想した。

2. 研究の目的

本研究はペプチドの架橋化によるイメージングプローブ開発手法の有効性の検証を目的とする。母体とするペプチドとして、架橋前は不安定であるペプチド、架橋前は標的への親和性が低値であるペプチドを設定した。の検討として、元来超早期に分解される不安定ペプチド GLP-1 (Glucagon like peptide-1) を選択し、低分子架橋構造により安定化したプローブ開発を計画した。この場合、架橋構造に放射標識部位を組み入れることで、従来法とは異なり、標識と同時に不安定ペプチドを安定化でき、前駆体は不安定ペプチドとなるため、投与液に前駆体が混在しても、体内で前駆体は分解され、安定な標識体が優先的に標的へ到達すると予想される。したがって、前駆体混在時でも、高感度イメージングや副作用低減が期待できる。の検討として、インテグリン結合性を示す RGD 配列を含むペプチドを架橋することで二環性ペプチド (bcRGD) とするプローブ開発を計画した。二環性ペプチドは近年注目される新たなプローブ母体であるが、架橋構造への放射標識により、架橋前は親和性が低く、架橋後に性能向上する性質を有するため、同様の効果が期待される。本研究では、上記架橋ペプチドに関してインビトロ・インビボ評価を行い、本課題で提案する架橋安定化の手法に関する有効性を検証する。

3. 研究の方法

(1) GLP-1 受容体を標的とした架橋型プローブ開発 (図 1)

ペプチド合成

Fmoc 固相合成法により、N 末端側から 14、21 番目 (X) に、4-Azido-L-homoalanine を導入した GLP-1_{N3} (HAEGTFTSDVSSYXEGQAAXFIAWLKGR) を合成した。95% trifluoroacetic acid により脱樹脂後、逆相 HPLC により精製した。

放射標識

GLP-1_{N3} (0.78 μmol , 1 eq)、別途合成した [^{125}I]IB_{alkyne} (図 1, 3.7 MBq) を溶解した DMSO (110 μL) と、CuSO₄ · 5H₂O (7 μmol , 9 eq)、L(+)-Ascorbic Acid Sodium Salt (28 μmol , 36 eq)、bathophenanthroline disulfonic acid (6 μmol , 7.6 eq) を溶解した蒸留水 (60 μL) を混合し、65% DMSO 溶液として室温で 2 時間攪拌した。

安定同位体を用いて同様に合成した IB_{alkyne} を用いて GLP-1_{CL} を上記の方法で合成し、ESI-MS による質量分析及び逆相 HPLC による保持時間を確認した。

SPR 法による GLP-1R への親和性評価

GLP-1_{CL}、GLP-1_{N3}、及び陽性対照として GLP-1R アゴニスト Exendin-4 を HBSS 緩衝液にそれぞれ溶解して、1000、250、62.5、15.6、3.9、0.97 nM に調製した。Biacore T200 system を用いて、GLP-1R protein (0.5 μM , 13944-H02H; Sino Biological) を固相化した Sensor Chip CM5 に各調製液を流し、GLP-1R に対する K_d 値を測定した。

体内分布評価

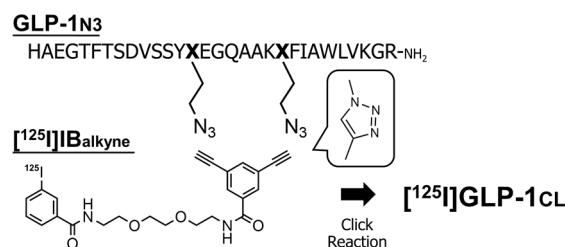


図1 GLP-1受容体標的架橋型プローブ開発の概念図

[¹²⁵I]GLP-1_{CL} (18.5 kBq/mouse) を ddY マウス (雄性、6 週齢) に尾静脈より投与後、5、15、30、60、120 分後において屠殺した。血液及び臓器を摘出し、重量及び放射能を測定して放射能集積量 (%ID/g) を算出した。

(2) 二環性 RGD ペプチドプローブの開発

ペプチド合成

直鎖ペプチド Ac-KPPPSG-Abz-SGCHPQcRGDc-NH₂ (Ac, Acetyl; Abz, 4-amino-benzoic acid; c, D-Cys) を Fmoc 固相合成法により合成後、1,3,5-tris(bromomethyl) benzene (1.1 eq.) との反応により、二環性 RGD ペプチド (bcRGD) を合成した。

放射標識

既報に従い合成した [¹²⁵I]SIB (3.7 MBq) をアセトニトリル中で bcRGD と混合し 40°C、1 時間の反応により、 [¹²⁵I]bcRGD を合成した (図 2)。放射化学的純度・収率は逆相 HPLC 分析により求めた。

インテグリンに対する選択性評価

[¹²⁵I]bcRGD (10 kBq/sample) と His タグ化された各種インテグリンタンパク質 (10 pmol) をバッファー中で 37°C、2 時間インキュベート後、磁気ビーズ上にタンパク質を固相化した。磁気ビーズを洗浄後、γ カウンターを用いて、磁気ビーズに結合した放射能を測定した。

体内動態評価

インテグリン α_vβ₃ 高発現細胞である U-87MG 細胞と低発現細胞 A549 を両下肢に皮下移植したモデルマウスに [¹²⁵I]bcRGD (18.5 kBq/100 μL TPBS) を尾静脈より投与後、10、30、60、120 分後において屠殺した。血液及び臓器を摘出し、重量及び放射能を測定して放射能集積量 (%ID/g) を算出した。

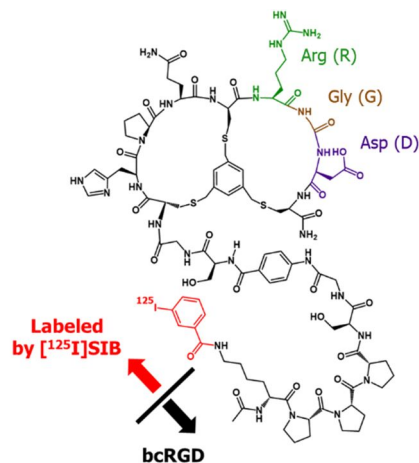


図 2 [¹²⁵I]bcRGD の構造

4. 研究成果

(1) GLP-1 受容体を標的とした架橋型プローブ開発

GLP-1_{N3} について、純度 98% 以上で合成した。 [¹²⁵I]IB_{alkyne} との反応により、 [¹²⁵I]GLP-1_{CL} を放射化学的収率 7.6%、放射化学的純度 95% 以上で合成した。

GLP-1 受容体への親和性は、GLP-1_{CL} が 299 nM、GLP-1_{N3} が 104 nM、Exendin-4 が 33.6 nM となり、GLP-1_{N3} への架橋により若干の親和性低下が認められた。

[¹²⁵I]GLP-1_{CL} の投与後、GLP-1 受容体高発現である膵臓への集積放射能は、5 分後 (4.6% ID/g) をピークに経時的に減少した (図 3)。また、集積放射能の膵臓/血液比および膵臓/筋肉比は 60 分後まで漸増し、60 分後にそれぞれ 2.9、15.9 となった。以上より、架橋型イメージングプローブ [¹²⁵I]GLP-1_{CL} の GLP-1 受容体標的プローブとしての基礎的な有効性が示された。

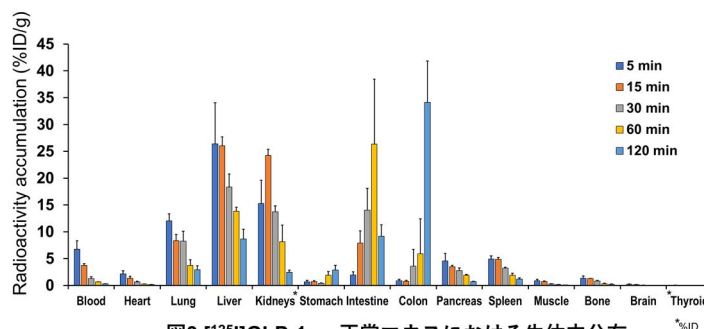


図 3 [¹²⁵I]GLP-1_{CL} の正常マウスにおける生体内分布

(2) 二環性 RGD ペプチドプローブの開発

bcRGD を純度 99% 以上で合成し、 [¹²⁵I]SIB との反応により、 [¹²⁵I]bcRGD を放射化学的収率 36%、放射化学的純度 99% 以上で合成した。 [¹²⁵I]bcRGD と α_vβ₃ タンパク質とのインキュベーションの結合放射能は 133% dose/nmol となった一方で、α_vβ₅ および α₅β₁ では結合は見られなかった (図 4)。よって、 [¹²⁵I]bcRGD の高い α_vβ₃ への特異性が示された。

[¹²⁵I]bcRGD を担癌マウスへの投与 30 分後の生体内分布を調べた結果、U-87MG 腫瘍に 3.8% ID/g、A549 腫瘍に 2.1% ID/g となり、α_vβ₃ 高発現腫瘍への有意に高い集積が認められた。また、 [¹²⁵I]bcRGD は速やかな体内動態を示し、明瞭な腫瘍イメージングの指標となる集積放射能の腫瘍対血液および腫瘍対筋肉比はそれぞれ、4.0、6.0 と高値を示した (図 5)。

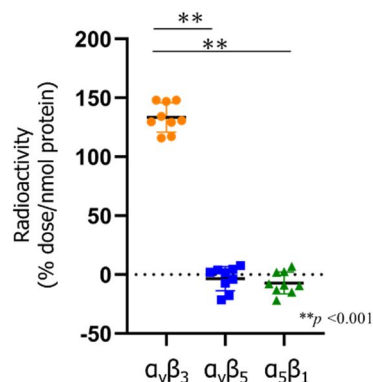


図 4 [¹²⁵I]bcRGD のインテグリン選択性

以上より、 ^{125}I bcRGD のイメージングプローブとしての優れた性質を明らかとした。今後、標識部位への放射標識により、前駆体分離が不要な新たなイメージングプローブ開発が可能であると期待される。投与液中の前駆体混在が許容されれば、固相抽出等、自動合成装置への組み込みが容易な簡便な精製法を適用可能となり、汎用性、臨床応用性の格段に高い方法により投与液を調製できる可能性を有する。本手法は、GLP-1 や RGD ペプチド以外にも様々なペプチドや医薬品開発において不安定性や低親和性を理由に不適合とされたペプチドへの適用が期待できる。また、治療・診断を一体化するセラノスティクス用薬剤開発や、長期滞留型の治療薬開発の可能性も有しており、ペプチド化学や診断・治療研究、個別化医療の発展に幅広く貢献し得る独創的かつ革新的な手法となり得る。

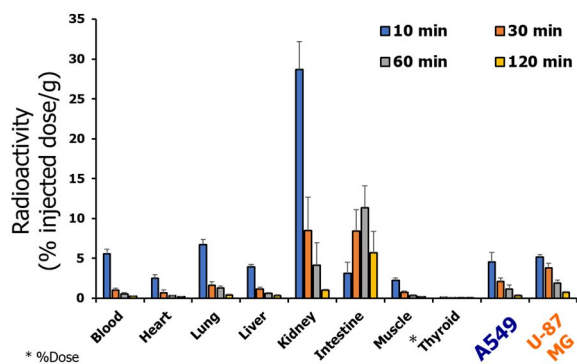


図5 ^{125}I bcRGDの担癌マウスにおける生体内分布

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kondo Naoya, Wakamori Keita, Hirata Masahiko, Temma Takashi	4. 巻 528
2. 論文標題 Radioiodinated bicyclic RGD peptide for imaging integrin α 3 in cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 168 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.106	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 Kondo Naoya, Oishi Ayaka, Hirata Masahiko, Temma Takashi	4. 巻 35
2. 論文標題 Indirectly radioiodinated exendin-4 as an analytical tool for in vivo detection of glucagon-like peptide-1 receptor in a disease setting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 83 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-020-01540-0	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若森恵太、近藤直哉、平田雅彦、天満 敬
2. 発表標題 放射性ヨウ素標識二環性RGDペプチドのインテグリン α 3標的イメージングプローブとしての有効性評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤 直哉、二木 綾香、天満 敬
2. 発表標題 GLP-1受容体を標的とした架橋型イメージングプローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大島 葵、近藤 直哉、天満 敬
2. 発表標題 アルブミンによる効率的腫瘍送達を目指した放射性ヨウ素標識二環性RGDペプチドプローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若森恵太、近藤直哉、大石綾香、平田雅彦、天満 敬
2. 発表標題 放射性ヨウ素標識二環性RGDペプチドのイメージングプローブとしての有効性評価
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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