

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20890206

研究課題名（和文）腎集積低減型がん治療用ラジオアイソトープ標識ペプチドの開発

研究課題名（英文）Development of radioisotope-labeled peptides of decreased renal accumulation for 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

研究成果の概要（和文）：

近年、がんの放射線治療の 1 つとして、ラジオアイソトープ (RI) 標識ペプチドの利用が注目されている。しかし RI 標識ペプチドは、腎臓に高い放射能が集積することから、臨床応用への障害となっている。そのような中、RI 標識ペプチドに負電荷を導入すると腎臓への集積を低減できることが明らかにされた。そこで、ペプチドに負電荷を導入することで、がん親和性を損なうことなく、腎集積を低減した RI 標識ペプチドの開発を試みた。その結果、がん細胞に対して既存の薬剤と同程度の親和性を有する、新しい RI 標識ペプチドを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Recently, cancer treatment using radioisotope(RI)-labeled peptides have received attention as one of radiation therapies. But, their clinical application is difficult because of their high accumulation of radioactivity in kidney. On the other hand, it was revealed that the renal accumulation can be reduced by introducing anion charge to peptide moiety. In this study, therefore, I aimed to develop RI-labeled peptides of reduced renal radioactivity with maintaining the affinity for cancer cells by introduction of anion charge. As a result, I found a new RI-labeled peptide having equivalent affinity for cancer cells compared with non-modified RI-labeled peptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,170,000	351,000	1,521,000
2009 年度	1,020,000	306,000	1,326,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,190,000	657,000	2,847,000

研究分野：放射性医薬品化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：がん、アイソトープ内用療法、薬物動態制御、放射性医薬品、オクトレオチド、腎臓、負電荷導入

1. 研究開始当初の背景

低分子量ペプチドは合成が容易で、血液か

ら速やかな消失を示すことから、様々なラジオアイソトープ (RI) 標識ペプチドについて、

その標的受容体を発現するがんに対する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で非特異的な放射能の滞留を示し、臨床応用への大きな障害となっている。

この腎集積の低減は、母体化合物としてペプチドを用いるアイソトープ治療の成否の鍵を握ることから、再吸収阻害剤や塩基性アミノ酸の前投与や同時投与などによる低減の試みがなされてきたが、十分な結果が得られてこなかった。そのような中、筆者らは、欧米で臨床使用されている RI 標識オクトレオチドを対象に、母体化合物へ化学修飾を施すことによって、腎集積を低減させる方法について検討を行ってきた。その結果、母体化合物の構造中に負電荷を導入することで、滞留する腎臓の放射能を半分以上に低減することに成功した。

しかし、母体化合物への負電荷の導入が、がん細胞上の標的分子（ソマトスタチン受容体）への親和性に及ぼす影響については検討されていない。そこで、標的となる受容体への親和性を維持し、腎集積を低減する最適な負電荷導入法を見出すことができれば、RI 標識ペプチドを用いたがんの治療を実施するにあたり、理想的ながんアイソトープ治療を実現する RI 標識ペプチドを開発できると考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

多くの実験結果が蓄積され、イメージング薬剤として海外で臨床使用されている RI 標識ペプチドである、 ^{111}In -DTPA-オクトレオチドをモデル化合物として選定し、本研究を実施することにした。

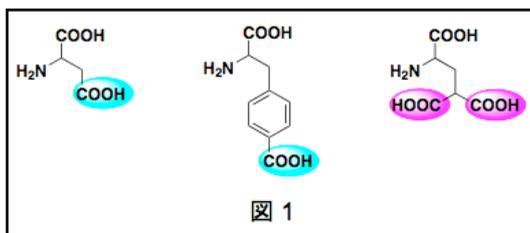
先に述べたように、RI 標識ペプチドは、投与後早期から腎臓で高い放射能の滞留を示し、このことが臨床応用への大きな障害となっている。また、非特異的腎集積の低減には、RI 標識オクトレオチドを用いた検討により、母体化合物の構造中に負電荷を導入することが有用であることが示されている。

そこで、 ^{111}In -DTPA-オクトレオチドに、腎集積を低減するために、負電荷を種々の化学修飾により導入した ^{111}In -DTPA-オクトレオチド誘導体を合成し、次に合成した誘導体の標的分子（ソマトスタチン受容体）への親和性、即ち、がんへの集積性を評価することにより、医薬品として供することができる「がん治療用 RI 標識オクトレオチド誘導体」を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ^{111}In -DTPA-オクトレオチドに酸性アミノ酸を導入し、負電荷を付与することで腎臓への非特異的な RI の集積が低減されること

が示されている。そこで、1 個または複数個の酸性アミノ酸、もしくはその類似体 (図 1) を導入した ^{111}In -DTPA-オクトレオチド誘導体の合成を固相合成法により行う。また、合成した化合物に負電荷が導入されたかどうかを確認するため電気泳動法により分析し、その移動度を未修飾の ^{111}In -DTPA-オクトレオチドと比較する。



(2) 次に (1) で合成した ^{111}In -DTPA-オクトレオチド誘導体のソマトスタチン受容体に対する親和性を評価する。そのため、それぞれ一定量の化合物を、ソマトスタチン受容体を発現する培養細胞と一定時間インキュベートし、細胞内への取り込み量を測定する。

(3) (1) および (2) の実験を通じて、がん集積性を損なうことなく、腎集積を低減した ^{111}In -DTPA-オクトレオチド誘導体を見出す。

4. 研究成果

(1) ^{111}In -DTPA-オクトレオチドおよび、 ^{111}In -DTPA-Asp¹-オクトレオチドの合成

① イメージング薬剤として海外で臨床使用されている ^{111}In -DTPA-オクトレオチド、ならびに過去に腎集積の低減が認められた負電荷導入誘導体の 1 つである ^{111}In -DTPA-Asp¹-オクトレオチド (図 2, 3) を合成するため、それらの標識前駆体ペプチドである DTPA-オクトレオチドならびに DTPA-Asp¹-オクトレオチドを、それぞれのアミノ酸配列に対応した Fmoc 保護アミノ酸誘導体を用いて固相合成法により合成した。DTPA-オクトレオチドは 26%、DTPA-Asp¹-オクトレオチドは 38% の収率で得られた。

次に得られたペプチドを $^{111}\text{InCl}_3$ を用いて標識した。標識後、得られた ^{111}In -DTPA-オクトレオチドおよび ^{111}In -DTPA-Asp¹-オクトレオチドを分析した結果、放射化学的純度はそれぞれ 93%以上、95% 以上であった。

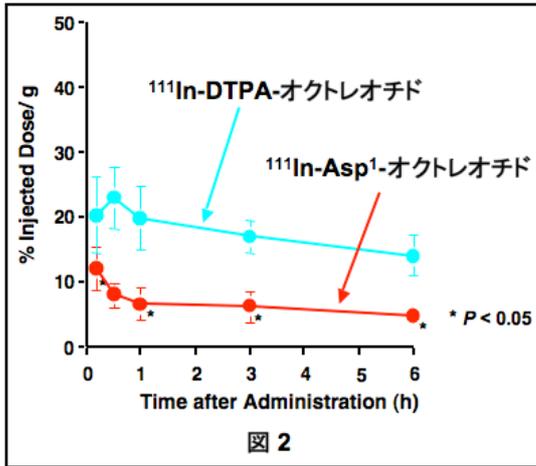


図 2



図 3

② ① で得られた ¹¹¹In-DTPA-Asp¹-オクトレオチドに負電荷が導入されたかを確認するため、セルロースアセテート膜を用いた電気泳動 (CAE) を行った。その結果、¹¹¹In-DTPA-オクトレオチドに比べ、¹¹¹In-DTPA-Asp¹-オクトレオチドの陽極側への移動度が大きかったことから、負電荷が導入されたと判断した (図 4)。

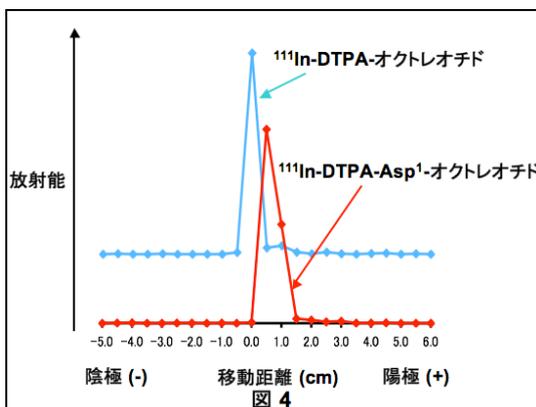


図 4

(2) ¹¹¹In-DTPA-オクトレオチドおよび、¹¹¹In-DTPA-Asp¹-オクトレオチドの培養細胞内への取り込み量の評価

負電荷が導入された ¹¹¹In-DTPA-Asp¹-オクトレオチドと、未修飾の ¹¹¹In-DTPA-オクトレオチドを、ソマトスタチン受容体を発現する培養細胞と一定時間インキュベートし、細胞内への取り込み量を測定した。既に腎集積を低減すると報告されていた ¹¹¹In-DTPA-Asp¹-オクトレオチドでは、細胞内への取り込みは観察されなかった (図 5)。

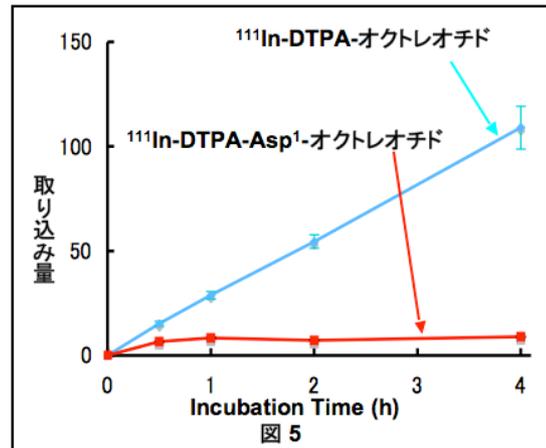
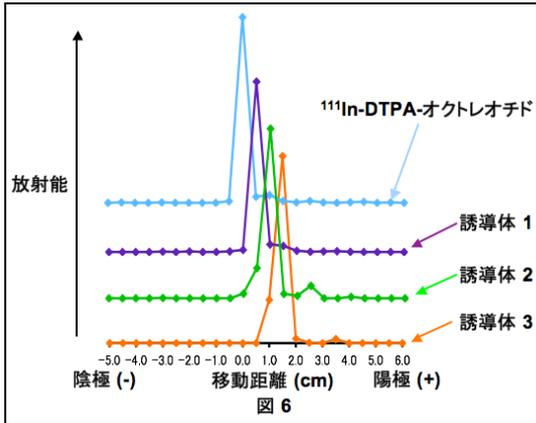


図 5

(3) 新たな ¹¹¹In-DTPA-オクトレオチド誘導体の設計と合成

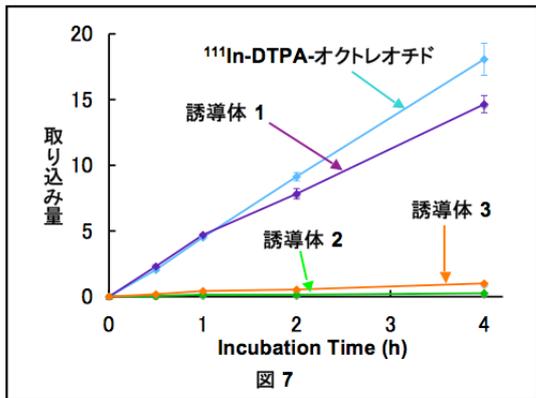
① ¹¹¹In-DTPA-Asp¹-オクトレオチドの細胞内への取り込み実験の結果を考慮し、培養細胞に取り込まれる化合物の創出を目指し、負電荷の導入位置および、導入方法を検討することとした。そのために、酸性アミノ酸およびその類似体を用いた新たな 3 種類の標識前駆体 (DTPA-オクトレオチド誘導体) を設計・合成した。それぞれの DTPA-オクトレオチド誘導体の合成収率は、20-40%程度であった。また、¹¹¹In で標識した際、得られた放射性化合物の放射化学的純度は誘導体 1 では 91% 以上、誘導体 2 では 93% 以上、誘導体 3 では 99% 以上であった。

② 次に新たに設計・合成・標識した ¹¹¹In-DTPA-オクトレオチド誘導体が、¹¹¹In-DTPA-オクトレオチドと比べて、負に帯電しているか確認するため、(1)-②と同様に CAE を行った。その結果、3 種の誘導体 1, 2, 3 は、¹¹¹In-DTPA-オクトレオチドに比べ、陽極側への移動度が大きく、母体ペプチドに対して負電荷が導入されたと判断した (図 6)。



(4) 新たに合成した 3 種の ^{111}In -DTPA-オクトレオチド誘導体の培養細胞内への取り込み量の評価

負電荷の導入が確認された新たな 3 つの ^{111}In -DTPA-オクトレオチド誘導体について、(2) で述べた方法と同様に、ソマトスタチン受容体を発現する培養細胞内への取り込み量を評価した。その結果、誘導体 2 および 3 では細胞内への取り込みは観察されなかったが、誘導体 1 は ^{111}In -DTPA-オクトレオチドに匹敵する細胞内への取り込み量を示した。(図 7)。



(5) 取り込みを示した、即ち標的とするソマトスタチン受容体に対して親和性を維持した誘導体 1 の正常マウスにおける体内動態および、担がんマウスを用いた腫瘍集積性の評価には至らなかった。

(6) ペプチドを母体とするがん治療用 RI 標識薬剤の開発を目的として、様々な研究がなされている。しかし、どの化合物の場合も非特異的な腎集積が認められ、高い治療効果があるにも関わらず、その腎毒性のため治療を継続できない例が多く見られる。したがって、安全で有効ながん治療用 RI 標識ペプチド

薬剤の開発には、不必要な腎集積の回避および、がん組織への十分な集積が必須であると考えられる。母体化合物に対し、負電荷導入という化学修飾を施すことで、腎集積を低減させるという手法は、世界に先駆けて筆者らが開発した方法である。しかしながら、母体化合物への直接的な化学修飾は、標的に対する親和性に影響を与える可能性が考えられる。本研究では、過去に腎集積の低減が認められた化合物も含め 4 種の RI 標識オクトレオチド誘導体を合成し、それらががん細胞に対する親和性の評価を行った。その結果、海外でイメージング薬剤として臨床使用されている ^{111}In -DTPA-オクトレオチドと同程度の親和性を有する、新たな負電荷導入ペプチドを見出すことができた。この成果は、オクトレオチドだけではなく、他のペプチドを母体とする、安全かつ有用なアイソトープ治療薬剤の開発において、新たな設計指針を提供するものであり、非常に価値のあるものである。したがって、本研究成果は、難治性のがんの治療に新たな可能性を与えるものと考えられる。

5. 主な発表論文等
なし

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