

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03539

研究課題名（和文）セラノスティクスを指向した抗腫瘍活性SN-38誘導体の開発

研究課題名（英文）Development of SN-38 derivatives with antitumor activity toward theranostics

研究代表者

土居 久志 (Doi, Hisashi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00421818

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 6,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低分子抗癌剤のセラノスティクスを目的として、独自の抗癌剤 RLC140050の放射性PET標識体（ $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}$ ）を合成し、続いて、これを低分子輸送タンパク質（L-PGDS）に内包させて、 $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}/\text{L-PGDS}$ 複合体の作成を行なった。結果として、 $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}$ とL-PGDSの溶液が、それぞれ0.5 - 0.7 μM と160 - 300 μM という超希薄濃度のために本内包化は困難を極めた。しかし、内包物交換平衡に着目した結果、目的の $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}/\text{L-PGDS}$ 複合体を一部作成することができ、小動物PETイメージングを実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者（土居）は抗癌剤SN-38の化学構造を一部改変して、より有望なRLC140050を創製した（SN-38よりも溶解性は19倍改善し、抗癌活性は2倍高い）。そこで、研究分担者（乾）のL-PGDSを用いた薬物送達技術を取り入れて、RLC140050/L-PGDS複合体によるセラノスティクスを考案した。低分子抗癌剤に着目した本研究は、学術的意義に留まらず、癌治療分野における生物製剤・バイオ医薬品の免疫原生やコスト削減等の社会的問題点にも深く関わる研究である。本研究内容は、線放出核種で標識した抗体医薬型セラノスティクスよりも低コストであり、PET研究の新たな方向性を提唱するものでもある。

研究成果の概要（英文）：With the objective of low molecular-based theranostics for cancer PET imaging and cancer treatment, we tried to develop a complex of ^{18}F -radiolabeled RLC140050 (an original compound with higher anticancer activity compared to SN-38) encapsulated in lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) as a transporter protein capable of carrying small lipophilic compound. However, it was extremely difficult to realize the encapsulation because of mixing both highly diluted solutions of a 0.5-0.7 μM solution of radioactive $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}$ and a 160-300 μM solution of L-PGDS. After extensive experiments, a mixing methodology focused on capsule-inclusion exchange equilibrium gave the desired $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}/\text{L-PGDS}$ complex to a small extent, and then PET imaging studies of mice using the complex were performed.

研究分野：有機化学、PET標識化学、創薬化学

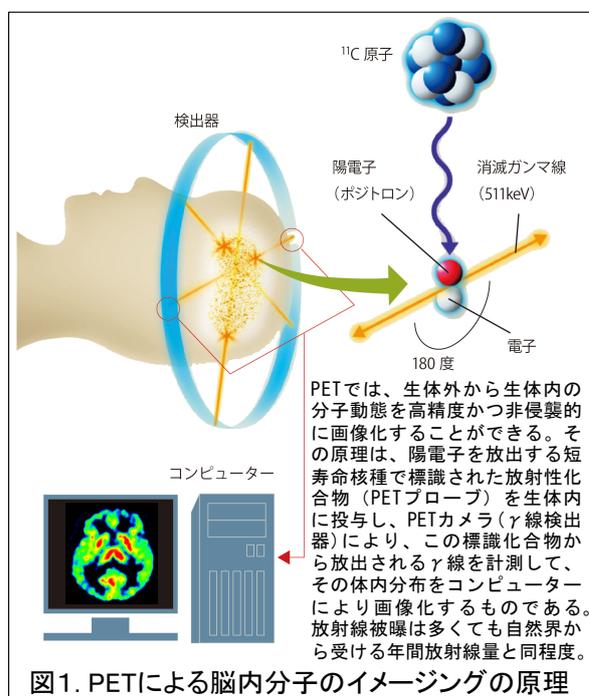
キーワード：18F-標識 抗癌剤 分子設計と化学合成 プロスタグランジンD合成酵素 低分子輸送タンパク質 薬物 輸送 セラノスティクス 超希薄濃度

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

SN-38 (トポイソメラーゼ I 阻害剤) は強力な抗癌活性を持つが、難水溶性のため臨床使用には至らなかった。実際の臨床では溶解性を改善したイリノテカン (SN-38 プロドラッグ) が医薬品として使用されているが、その抗癌活性は体内代謝過程の影響から SN-38 の 1/100~1/1000 も低下している。そのため、薬効量 (投与量) は必然的に多くなり、結果として患者の負担が大きい。本件に関して、申請者らは、SN-38 の溶解性を改善すべく、創薬化学的考察から SN-38 の化学構造の改変を行ってきた。とくに、土居 (代表者) が開発した 10-O-フルオロプロピル置換 SN-38 誘導體 (RLC140050) の溶解性は SN-38 より 19 倍高く、かつ、抗癌活性は SN-38 より 2 倍高い。一方、乾 (分担者) は、プロスタグランジン D 合成酵素が持つ低分子化合物の溶解能と輸送能に着目したタンパク質 DDS 製剤を開発し、実際に難水溶性薬剤の可溶化と薬剤活性の向上に成功している。特筆すべきは、RLC140050 溶液に L-PGDS を添加した場合、その溶解性は SN-38 水溶液と比べて 238 倍に向上した。これはイリノテカンの溶解度を上回る。なお、タンパク質 DDS 製剤の医薬品の実例としては、難水溶性のパクリタキセルをヒト血清アルブミンに懸濁させたアブラキサンがある (我が国では 2010 年に乳がんに対して使用が承認されている)。

このようは研究背景の下、本研究では、新しいセラノスティクス (癌の診断と治療) を提案すべく、抗癌活性化合物 RLC140050 の放射性 PET プローブ化 (^{18}F -標識化) に向けた標識化学研究と、低分子輸送タンパク質に着目した DDS 研究とを組み合わせた“低分子抗癌剤/癌認識タンパク質の DDS 製剤”を開発することとした。



本件の標識化学研究を実施するにあたり、PET 標識体の化学合成には、通常とは異なった化学が必要である。例えば、PET で用いる陽電子放出核種としては、代表的なものに、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{76}Br (半減期は、それぞれ、20.4 分、9.96 分、2.04 分、109.8 分、16.2 時間) などがある。これらの核種を薬剤や生体機能の探索分子に標識する事ができれば、PET 法により生体の *in vivo* 分子情報の抽出が可能となる (図 1)。しかしながら、有機化学的に最も重要な核種である ^{11}C の場合、その半減期はわずか 20 分である。そのため、 ^{11}C の導入は合成の最終段階で、反応、精製、生体投与までを半減期の 2 倍の 40 分以内で行う必要がある。その結果、 ^{11}C の導入に許される反応時間はわずか 5 分程度である。なお、 ^{18}F の場合は、30 分程度の反応時間まで許容され、合成・調剤を経て生体投与までは 90 分以内を目安とされる。加えて、サイクロトロンで製造できる陽電子放出核種の量は、超微量 (数 μg 程度) である。このような短時間かつ超微量という極限の有機化学においては、短寿命放射性核種に適応した

新たな化学反応の開発が必要である。さらに、合成作業中の放射線被曝の防止や、動物やヒト投与に向けた PET 標識体の品質を担保しないといけない。本研究では従来の有機化学には無いこれらの問題解決にも取り組みつつ、RLC140050 の ^{18}F -標識化研究を実施した。

2. 研究の目的

低分子抗癌剤は低コストであり魅力的な生物活性を持っている。しかしながら、それらの多くは難水溶性で調剤が難しいこと、脂溶性ゆえに肝臓で代謝を受けやすいことから、必然的に投与量が多くなり、加えて、選択的な癌組織への移行性 (薬物動態) に課題が残ってきた。本研究では、独自の創薬化学的アプローチ (設計と合成) とタンパク質 DDS 研究を融合して、溶解性・癌組織移行性・薬剤コストの問題に真正面から取り組むこととした。

この研究戦略は、現在、国際的な新潮流となっている「α線放出核種で標識した抗体医薬を用いたセラノスティクス研究」とは対照的なものである。例えば、α線を利用したセラノスティクスでは、α線を放出する原子番号の大きなアスタチン-211 (At-211) やアクチニウム-225 (Ac-225) の放射性核種を用いるが、これらの核種はサイクロトロン製造コストが高いことに加えて、被標識体となる抗体医薬の製造コストも高い。この製造コストの問題は今後も抜本的な解決策はないかもしれない。このような背景の下、我々は、持続可能な保険医療の観点から低分子抗癌剤を再認識すべき意義があると考えて本研究を立案した。とくに本研究では、 ^{18}F 核種 (γ線) の使用を前提に、低分子化合物と小サイズタンパク質を用いた研究であるので、その作成 (合成)

費用は従来の抗体医薬型のセラノスティクスと比べて低コストとなる。今後の PET イメージング研究・セラノスティクス研究が取り組むべき新たな課題でもあると考えた。

3. 研究の方法

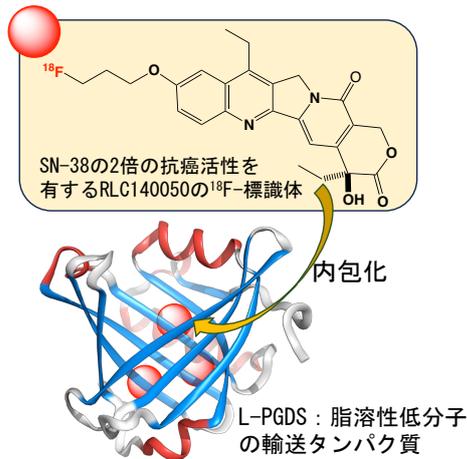


図2. ^{18}F -標識RLC140050を内包させた薬物輸送体タンパク質のイメージ図

識 RLC140050 と L-PGDS との複合体 (タンパク質 DDS 製剤) の作成に取り掛かった。なお、L-PGDS を用いた乾の熱力学的研究によると、この内包化におけるギブスの自由エネルギーは負であり、一つの L-PGDS に対して数個の脂溶性低分子が自然に内包されることがわかっている。すなわち、原理的には (物理化学的には)、脂溶性低分子と輸送体タンパク質を混合するだけで、脂溶性低分子はタンパク質内に内包化されるものと考えた。このようにして、目的のタンパク質 DDS 製剤を作成することとした。

4. 研究成果

^{18}F -標識 RLC140050 の合成

^{18}F は放射性的陽電子放出核種であり半減期は約 110 分である。そのため、本研究では放射線被曝を防ぐためにホットセル内に設置した専用の合成装置を遠隔操作して、また合成時間は 90 分以内を目標として、目的の ^{18}F -標識 RLC140050 ($[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}$) の化学合成を行なった (図 3)。具体的には、まず、 $[^{18}\text{F}]\text{KF}$ をトリシロピル-3-ブロマイドと反応させて標識ユニットとなる 1- $[^{18}\text{F}]$ フルオロプロピル-3-ブロマイドを合成した。続いて、この溶液に He ガス (40 mL/min) を吹き込みつつ、溶液を 120 °C の温風で加熱して 1- $[^{18}\text{F}]$ フルオロプロピル-3-ブロマイド (沸点 99-101 °C) を蒸発させ、連結チューブ内を通じて SN-38 溶液に添加した (蒸留移送法)。次に、アルカリ性条件下、SN-38 と反応させて、SN-38 の 10 位フェノール性水酸基に対する 10- $[^{18}\text{F}]$ フルオロプロピル化を施した。最後に HPLC 分離精製と調剤を行ない、約 1.6 GBq の放射能を持つ $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}$ 溶液を得た。本合成は 70 分以内で完結し、溶液の pH 値は約 7、比放射能は約 450 GBq/ μmol 、放射化学純度は 99% 以上、化学純度は 93% 以上であった。これらの結果は生体投与のための品質基準を満たしていた。本合成は実験を繰り返して再現性を確認した。

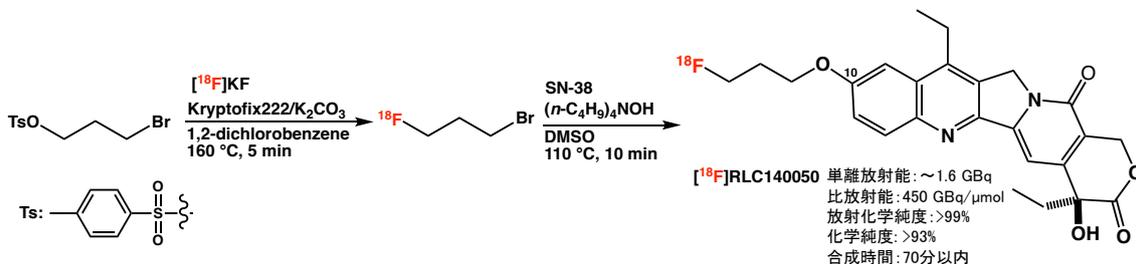


図3. RLC140050の ^{18}F -標識体の合成:遠隔操作合成と生体投与溶液の作成

$[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}/\text{L-PGDS}$ 複合体 (DDS 製剤) の作成

$[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}$ の化学合成法が確立できたので、続いて、 $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}$ を L-PGDS に内包させた $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}/\text{L-PGDS}$ 型 DDS 製剤の作成に取り組んだ。本 DDS 製剤の確認は、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を用いて、L-PGDS 由来の UV 吸収 (280 nm と 373 nm) と $[^{18}\text{F}]\text{RLC140050}$ 由来の放射線 (RI 強度) を測定することで判断した。なお、乾の先行研究によると、この製剤化におけるギブス自由エネルギーは負であり、過剰量の RLC140050 を用いた場合、L-PGDS に対し

独自に開発した RLC140050 の溶解性は SN-38 より 19 倍高いが、投与薬剤としてはまだ脂溶性であり、さらなる可溶化が求められている。そこで、我々は、低分子化合物の可溶化と生体内輸送能を有する L-PGDS のタンパク質輸送体に着目し、RLC140050 を内包させたタンパク質 DDS 製剤の開発に取り組んできた。本研究では低分子抗癌剤によるセラノスティクスを目的として、 ^{18}F -標識 RLC140050 の DDS 製剤を用いた場合は“PET イメージングによる癌診断”を、非標識体 RLC140050 の DDS 製剤を用いた場合は“低分子抗癌剤による癌治療”を行うことを目的としたセラノスティクスを実現したいと考え、合成化学とタンパク質薬物送達学が融合した創薬研究を行うこととした (図 2)。

最初の課題として、RLC140050 の ^{18}F -標識体の合成を実現し、次に、生体投与可能な高品質・高純度投与溶液 (純度 99% 以上) を調製すべく、HPLC 分離精製法と調剤法の確立を行なった。続いて、 ^{18}F -標

て数個のRLC140050が自然に内包されることがわかっている。そこで、合成した ^{18}F RLC140050溶液(約 $0.5\ \mu\text{M}$)をL-PGDS溶液(約 $160\ \mu\text{M}$)に混合してDDS製剤化の検討を行なった。製剤化に向けた混合時間に関しては、 ^{18}F 核種の半減期が109.8分のため、混合時間はなるべく1時間以内とし、最大でも4時間以内とした。しかし、残念ながら、1時間を超えて6時間に渡り混合しても ^{18}F RLC140050の内包化は起こらなかった。内包化が進まなかった主な原因は、希薄な溶液濃度にあると考えられた。例えば、本研究で合成できる放射性 ^{18}F RLC140050はせいぜい $1.0\ \text{nmol}$ であり、また放射線被曝を避けるために遠隔操作で調製できる溶液量は約 $2.0\ \text{mL}$ であるので、その濃度は約 $0.5\ \mu\text{M}$ という超希薄濃度になっている。そこで、関連する研究報告(学術論文・学会発表等)の調査を行なったが、このような超希薄溶液を用いたDDS製剤化については、従来の有機化学・薬化学分野では行われておらず、有意な知見もほとんど得られなかった。また、 ^{18}F RLC140050は放射性化合物であり、放射線被曝を避けるために専用の機器を遠隔で操作して化学合成しているため、本件の溶液濃度を向上させることは簡単ではない。しかしながら、濃縮プロセスの改良を続けて、 ^{18}F RLC140050溶液の濃度を1.5倍に高め(目標濃度は $0.75\ \mu\text{M}$)、加えて、包接体であるL-PGDS溶液の方も、その濃度を2倍に上げる努力をした(目標濃度は $300\ \mu\text{M}$)。すなわち、 ^{18}F RLC140050とL-PGDSの双方において、できる限りの高濃度溶液を作成して、 ^{18}F RLC140050/L-PGDS型DDS製剤化を検討することとした。一方で、別途、包接物交換反応(非放射性RLC140050を内包したL-PGDSに対して放射性 ^{18}F RLC140050を添加)にも着目した。実のところ、別途行なった非放射性条件下における包接物交換反応では、DDS製剤化のきっかけを掴んでいたからである。そこで、PET放射性条件下における包接物交換反応においても、 ^{18}F RLC140050とL-PGDSの高濃度溶液を用いて検討することとした。

上記の考察と計画に基づいて鋭意実験を行なった結果、 ^{18}F RLC140050とL-PGDSの溶液濃度をそれぞれ $0.7\ \mu\text{M}$ と $300\ \mu\text{M}$ にまで高めることができた[†]。そこで、これらの溶液を用いて ^{18}F RLC140050/L-PGDS複合体の作成を行なった。具体的には、標識合成後の ^{18}F RLC140050溶液を減圧条件下で溶媒を除去して、これにL-PGDSのリン酸緩衝液($300\ \mu\text{M}$, $1.4\ \text{mL}$, $420\ \text{nmol}$)を加えて、室温で5分間混合した。これを調剤開始時溶液とし、その後も引き続き室温で攪拌を続け、2.5時間、4.0時間、7.0時間目の溶液をHPLCにて分析した(図4: UV吸収と放射線検出器によるRI強度)[§]。

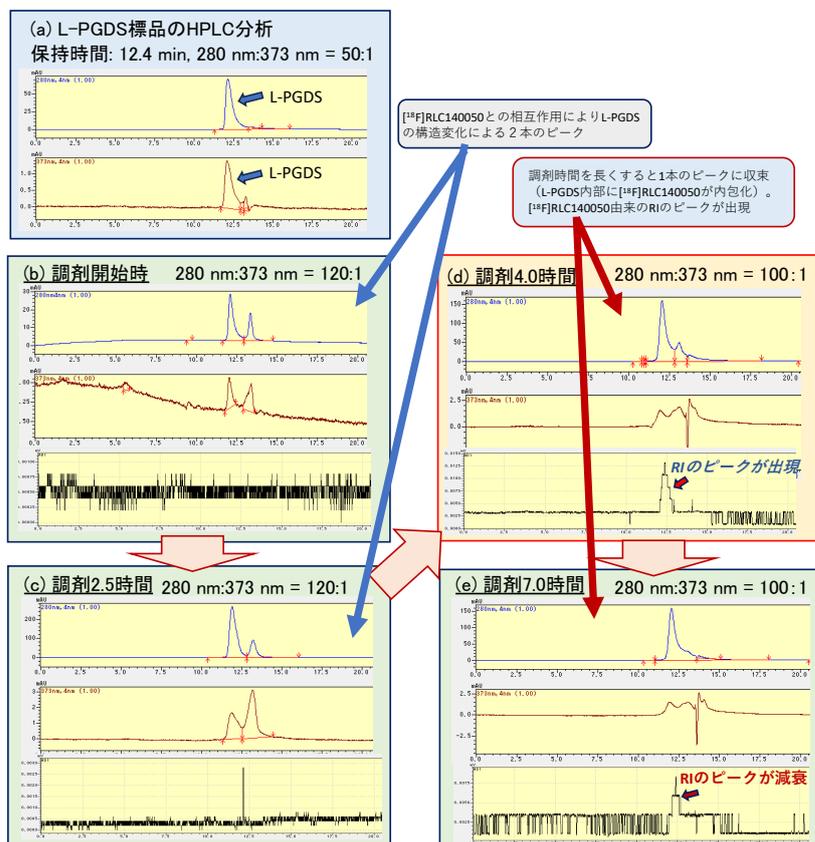
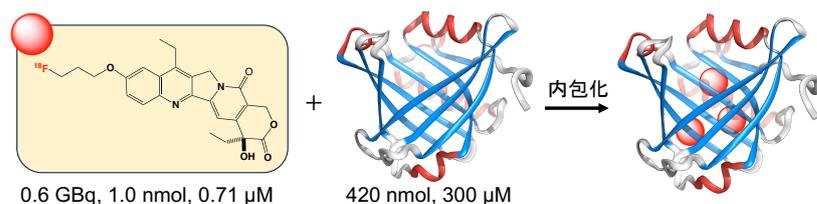


図4. L-PGDSと ^{18}F RLC140050との混合による複合体(DDS剤)の作成: 調剤溶液のHPLC分析

図4(a)は、標品となるL-PGDSのみをHPLC分析したものである。L-PGDSの保持時間は12.4分であり、 $280\ \text{nm}$ と $373\ \text{nm}$ のピーク面積比は50:1であった。

次に、L-PGDSと ^{18}F RLC140050の混合溶液の時間変化、すなわち複合体の生成に伴うL-PGDSのピーク面積比の変化と、 ^{18}F RLC140050由来のRIピークの出現を追跡した。その結果、調剤開始時溶液では、L-PGDSのピークは2本となり、 $280\ \text{nm}$ と $373\ \text{nm}$ のピーク面積比は120:1であった。なお、RIピークは全く現れなかった。しかし、混合4時間後には、L-PGDSのピークは1本に収束しつつあった。 $280\ \text{nm}$ と $373\ \text{nm}$ のピーク面積比は100:1に変化し、 ^{18}F RLC140050由来のRIピークがL-PGDSと同じ保持時間に現れた。すなわち、混合4時間で、 ^{18}F RLC140050の一部がL-PGDSに内包されたことが確認できた(図4(d))。

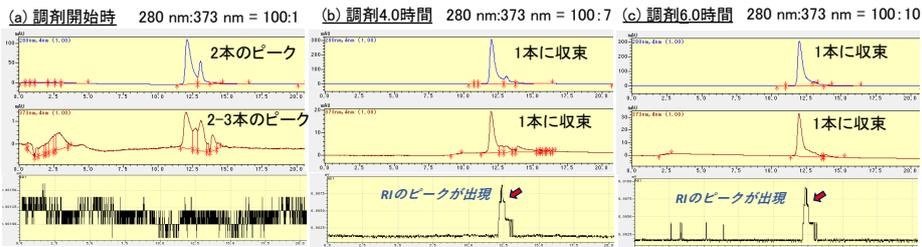
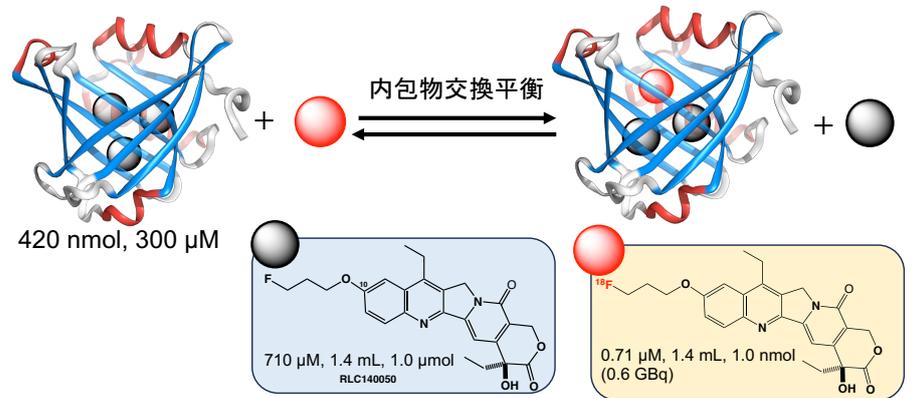


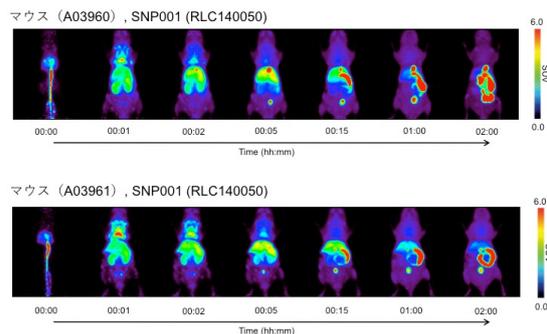
図5. 内包物交換平衡によるL-PGDS/[¹⁸F]RLC140050複合体 (DDS剤) の作成：調剤溶液のHPLC分析

PGDS に内包させ、これに放射性的 [¹⁸F]RLC140050 を添加したところ、内包物交換平衡により [¹⁸F]RLC140050 が徐々に L-PGDS に内包されることを見出した (図 5)。しかし、この交換平衡による調剤法は、上記の単純混合よりもより効果的であったが、それでもその調剤時間は少なくとも 4 時間は必要であった (図 5 (b))。

このように [¹⁸F]RLC140050 と L-PGDS の各溶液濃度を 0.7 μM と 300 μM にまで高めたが、それでも一般的な化学条件からすると 100 倍以上の超希薄濃度であり、本件の内包化は困難を極める結果となった。さらに、¹⁸F 核種の半減期 (109.8 分) を踏まえると、短時間で内包化しないといけない (目標は 1 時間以内)。しかしながら、内包物交換平衡に着目した結果、4 時間もかかったが、一部とは言え、確実に [¹⁸F]RLC140050/L-PGDS 複合体を作成できたことも事実である。

そこで、この [¹⁸F]RLC140050/L-PGDS 複合体を健常マウスに投与して、薬物動態 PET イメージングを実施することとした。その結果、 [¹⁸F]RLC140050 の単独投与時と、 [¹⁸F]RLC140050/L-PGDS 複合体の投与とでは、投与後初期 (0 分~15 分) において代謝経路 (肝代謝と腎代謝) に違いがあった (図 6 : (a) と (b) の比較)。薬物動態の見地からは、L-PGDS の薬物送達の結果が視覚化された興味深い結果であった。今後は、内包化条件を最適化して、是非とも担癌マウスを用いた PET イメージングに展開したい。また、それらの研究成果を、学会ならびに学術論文として発表していく所存である。

(a) [¹⁸F]RLC140050 の単独投与



(b) [¹⁸F]RLC140050/L-PGDS複合体の投与

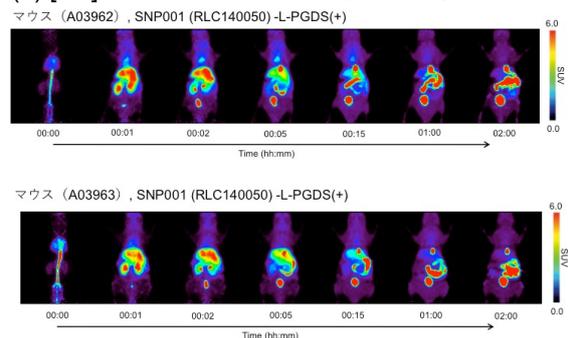


図6. 健常マウスを用いた全身PETイメージング：(a)の [¹⁸F]RLC140050 の単独投与では腎代謝よりも肝代謝が支配的であった。(b) の [¹⁸F]RLC140050/L-PGDS複合体の投与では、投与後初期(2分程度)に腎代謝が亢進したが、時間経過とともに肝代謝が支配的であった。

脚注：† [¹⁸F]RLC140050 (合成後の放射能は 0.6 GBq、その比放射能は 600 GBq/μmol だったので、モル数は 1.0 nmol。これを 1.4 mL 溶液に溶解させたので [¹⁸F]RLC140050 溶液の濃度は 0.71 μM)。L-PGDS (300 μM 濃度の溶液を調整し、この溶液を 1.4 mL 使用したので、L-PGDS のモル数は 420 nmol)。§ HPLC 分析条件 (カラム：TSKgel SuperSW3000, 4.6 x 300 mm、移動相：25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、流速：0.35 ml/min)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	乾 隆 (Inui Takashi) (80352912)	大阪公立大学・大学院農学研究科 ・教授 (24405)	
研究分担者	喜田 達也 (Kida Tatsuya) (70641968)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員 (82401)	

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