

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03619

研究課題名(和文)腎放射活性を低減するradiotheranostic薬剤の新規設計

研究課題名(英文)New design of radiotheranostic agents that reduce renal radioactivity

研究代表者

上原 知也(Uehara, Tomoya)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：10323403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：放射性核種標識低分子化合物を生体に投与すると、腎臓への非特異的集積が観察される。本検討では、初めに腫瘍へ集積する化合物を投与し、次いでその化合物に結合する放射性核種標識薬剤を投与するというプレターゲティング法を用いて、腎臓に集積する放射能を低減する薬剤設計を新規提案し、その有用性を評価した。その結果、本方法により、腎臓の放射能は低減したが、腫瘍の放射能の低減も観察された。これは、血液中に初めに投与した化合物が残存しているためと考えられた。以上の結果は、初めの化合物が腫瘍へ集積後速やかに血液から取り除くことができれば、本方法により腫瘍への高い集積と腎臓への集積低減を可能とすることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射性核種標識低分子化合物を生体に投与すると、腎臓への非特異的集積が観察され、診断時における腎臓付近の診断能の低下や、治療時における腎毒性が危惧されている。この問題に対し、リジンなどの同時投与による競合的阻害、薬剤内に代謝性スペーサを導入した薬剤設計により、腎臓への集積の低減が行われている。本研究では、それらに加え、新たにプレターゲティング法により腎臓への非特異的集積を低減できる可能性を新たに示した。これらの結果は、今後の薬剤開発の参考になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When radionuclide-labeled low-molecular-weight compounds are administered to the body, nonspecific accumulation in the kidney is observed. In this study, we proposed a new drug design to reduce the accumulation of radioactivity in the kidney by using a pretargeting method in which a compound that accumulates in the tumor is administered first, followed by administration of a radionuclide-labeled drug that binds to the initial compound, and evaluated the usefulness of this method. The results showed that this method reduced kidney radioactivity, but also reduced tumor radioactivity. This would be due to the fact that the initially administered compound remained in the blood. These results suggest that if the initial compound can be removed from the blood quickly after accumulation in the tumor, this method can achieve high accumulation in the tumor and low accumulation in the kidney.

研究分野：放射線化学

キーワード：核医学診断 核医学治療 プレターゲティング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

前立腺がんは米国人男性のがん部位別死因第2位であり、日本人男性においてもがん部位別死因第6位となっており、年間12000人以上の患者が亡くなっている。今後さらに増加すると予想されており、特にホルモン療法や化学療法では治療効果が得られない去勢抵抗性前立腺がん(CRPC)へ進行した場合に予後が非常に悪く、CRPCに対する新たな診断・治療薬の開発が進められている。CRPCの多くにprostate specific membrane antigen (PSMA, 前立腺特異的膜抗原)が高発現していることが知られており、これを標的とした放射性核種 (RI) 標識 PSMA 誘導体による核医学診断・治療が、近年欧米で行われている。しかしながら、これらの PSMA 誘導体は腎臓に高い集積を示すことが知られており、診断精度の低下や治療時の副作用の懸念から、腎臓への集積が少ない薬剤の開発が望まれている。PSMA 誘導体の腎臓への非特異的集積は、腎臓の糸球体濾過された PSMA 誘導体が近位尿細管で再吸収されることが原因と考えられている。この再吸収過程は、尿中に排出された栄養素を回収する生理的な機構であり、数多くの栄養素を回収するため非常に速い速度で再吸収される。一方、プレターゲティング法とは、抗体などの腫瘍集積性を示す高分子化合物を初めに投与し、次いで、本高分子化合物に結合する放射性核種標識低分子化合物を2番目に投与することで、放射性核種標識抗体投与時に観察される、血液クリアランス遅延に由来する血液毒性を回避する技術である。

2. 研究の目的

本研究では、腎臓への非特異的集積の少ない放射性核種標識 PSMA 誘導体の開発を目的とする。先ほども記したように、PSMA 誘導体の腎臓への非特異的集積は、近位尿細管における非常に早い再吸収過程によるものである。一方、腫瘍への集積は、腫瘍細胞表面に発現した PSMA 抗原に結合によるもので、その後徐々に内在化されていく。そこで我々は、この内在化の速度の差を利用することで、腫瘍/腎臓比を向上させるのではないかと考えた。すなわち、非放射性 PSMA 誘導体(薬剤①)を初めに投与し、腫瘍細胞表面に結合させる一方、腎臓では再吸収により細胞内に内在化させる。その後、薬剤①に結合する RI 標識化合物(薬剤②)を投与することで、腫瘍細胞表面でのみ薬剤①と薬剤②が結合し、腫瘍/腎臓比を向上させるという設計である(図1)。このような方法は2種類の薬剤を用いる点や生体内で2つの薬剤が結合する点でプレターゲティング法と類似しているが、プレターゲティング法は血液毒性を回避するために開発された手法であり、本方法とは全く意図、設計が異なる。本検討では、薬剤①と薬剤②の結合反応にクリック反応を用い、PSMA 認識部位である非対称ウレア構造 Lys-CO-Glu に trans-cyclooctene (TCO) 構造を、RI 標識部位として水溶性の高い 1,4,7-triazanonane-triacetic acid (NOTA) を用いた tetrazine (Tz) 構造を含む薬剤を新たに作成し、本薬剤設計の有用性を評価した。

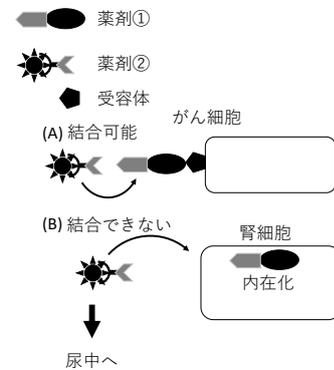


図1. 本薬剤設計の概念図

3. 研究の方法

(1) 候補薬剤の合成

今回作製した化合物を図2に示す。PSMA の非対称ウレア構造を合成後、ナフチルアラニンの付加を行い、さらに、D-グルタミン酸を導入した薬剤を合成した。そして、本化合物に、クリック反応で使用する trans-cyclooctene (TCO) を導入した TCO-PSMA (図2A) を作製した。本化合物の体内動態を推定するために、TCO をヨウ素安息香酸に変更した I-Bn-PSMA (図2B)、および放射性ヨウ素標識を行うための前駆体であるトリブチルスズ体も合成した。放射性ヨウ素としては、半減期が長く、取り扱いの容易なヨウ素-125 (^{125}I) を用い、N-chlorosuccinimide (NCS) を酸化剤として用いて、 ^{125}I -I-Bn-PSMA を作製した。一方、RI 標識低分子化合物としては、尿排泄性を考えることを考え、RI 標識部位として放射性金属キレートを用いることにし、今回は、ガリウム-67 (^{67}Ga) の標識に最適な 1,4,7-triazacyclononane-triacetic acid (NOTA) を選択し、NOTA

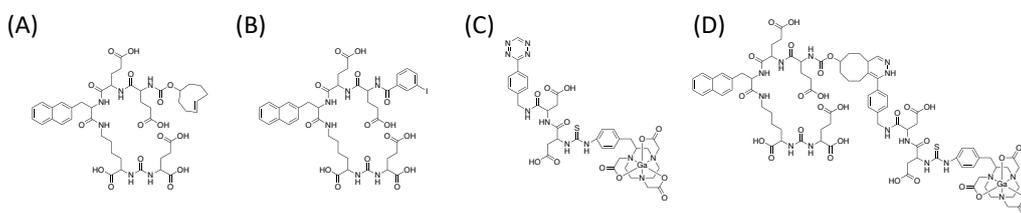


図2. (A) TCO-PSMA, (B) I-BN-PSMA, (C) Ga-NOTA-Tz, (D) Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA の構造。

とクリック反応に使用するテトラジンの間を2分子のD-グルタミン酸を介して結合したNOTA-Tz (図2C) を作製した。 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ は $[^{67}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ とNOTA-Tz を混和することにより作製した。

(2) インビトロにおける評価

逆相HPLCにより未反応の配位子を除去した $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ とTCO-PSMA (100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) を水溶液中で混和し、37°Cで30分あるいは1時間反応させ、逆相HPLCで分析することで、TzとTCOとの結合性について検討した。結合の確認は、非放射性ガリウムで作製した標品との逆相HPLCの保持時間の比較から行った。

(3) インビボにおける評価

TCO-PSMA誘導体の体内動態を推測するために、 $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ を正常マウスに投与し、投与後、10分、1時間、3時間、6時間後の体内動態を評価した。また、ヒト前立腺がん細胞であるLnCap細胞を移植した担がんマウスを作製し、TCO-PSMA (100 μg) を投与後1時間後に $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を投与し、その1時間後の腫瘍集積および腎集積について検討した。一方、対象として、予め $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ とTCO-PSMAを結合した $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ を投与し、投与1時間後の腫瘍集積および腎集積についても検討した。さらに、投与間隔を3時間に伸ばした場合についても同様に検討した。

4. 研究成果

(1) 化合物の合成

$[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ 、および $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ はそれぞれ放射化学的収率14%、75%でそれぞれ得た。それぞれの化合物の確認は、対象となる非放射性的のヨウ素あるいはガリウムを用いた化合物を作製し、それらの逆相HPLCとの保持時間の比較から決定した。逆相HPLCで精製後、これらの化合物はいずれも放射化学的純度95%以上で得られ、以降これらの放射性化合物を用いて実験を行った。

(2) RI標識化合物の体内動態評価

プレターゲティング法を用いた腎臓への非特異的集積の低減では、①番目に投与する薬剤が、従来のRI標識PSMA誘導体と同様の体内動態を示すこと、そして、②番目に投与する薬剤が、薬剤①との結合能を有し、そして腎臓から速やかに排泄されることが重要である。そこで薬剤①として $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ を、薬剤②として $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を用い、それらの正常マウス体内動態を評価した。その結果、 $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ は投与早期から腎臓への高い集積を示した(図3)。腎臓への高い集積はRI標識PSMA誘導体で観察される大きな特徴であることから、本化合物は従来報告されているRI標識PSMA誘導体と同様に生体内でPSMA誘導体として認識されているものと考えられた。一方、肝臓から腸管へと放射活性の移行が観察された。これは、 $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ の脂溶性が高いため、一部肝臓へと集積し、その後腸管へと排泄されたものと考えられた。しかしながら、腸管へと排泄された場合、2番目に投与する $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ とは結合できないと考えられる。そのため、本薬剤設計を評価する上で、 $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ の体内動態には問題無いと考え、 $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ を最初に投与する薬剤①とした。次いで、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ の正常マウス体内動態を評価した(図4)。その結果、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ は腎臓から速やかに排泄され、②番目に投与する薬剤として理想的な体内動態を示した。以上の結果より、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を②番目に投与する薬剤として用いた。

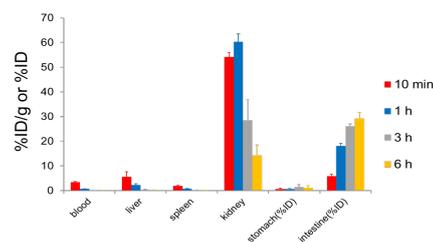


図3. 正常マウスにおける $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ の体内動態

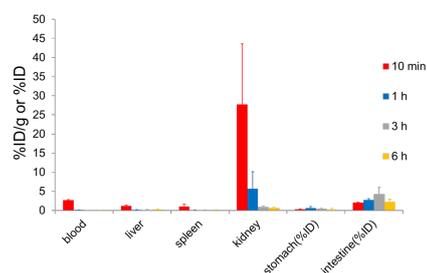


図4. 正常マウスにおける $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ の体内動態

(3) クリック反応評価

先の検討より、 $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ と $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ はそれぞれ①番目に投与する薬剤、②番目に投与する薬剤として適切であると考えられたことから、インビトロにおいてこれらの結合能を評価した。クリック反応には、化合物の濃度が重要であるが、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ は放射性化

物であり、生体内では無担体状態であると考えられることから、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ は逆相 HPLC により配位子を除去した後、使用した。TCO-PSMA を $100\ \mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$ の濃度に調整し、 $37\ ^\circ\text{C}$ で 30 分インキュベートしたところ、速やかに $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ が消失し、新たに 2 本のピークが観察された (図 5B)。これらの 2 本のピークは、非放射性ガリウムを用いた場合においても観察され (図 5D, E)、それらを質量分析した結果、いずれも薬剤①と薬剤②が結合した $\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ の分子量であった。時間経過と共に、保持時間の短い画分にピークが移動したことから (図 5C)、保持時間の長い画分は反応中間体である可能性が示唆された。以上の結果より、混和 30 分後においてすでに $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ が消失していたことから、Tz と TCO を用いたクリック反応は、RI 標識薬剤を用いた場合においても速やかに進行すると考えられた。

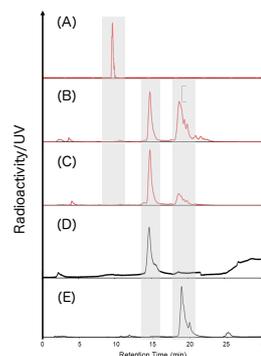


図 5. TCO-PSMA と $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を混和し、クリック反応を行った時の逆相 HPLC クロマトグラム。(A) 反応前の $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ 、(B) 混和 30 分後、(C) 混和 60 分後の逆相 HPLC クロマトグラム、(D) (E) は非放射性 Ga を用いた時の逆相 HPLC のクロマトグラムチャートであり、いずれも Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA の質量を有していた。

(4) 担がんマウスを用いた評価

TCO-PSMA と $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ が速やかに結合することが示されたことから、次いで、前立腺がん細胞を移植した担がんマウスを用いて評価を行った (Table 1)。正常マウスを用いた $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ の検討によると、投与 1 時間後において、血液中の放射能は $0.71\ \text{ID/g}$ と低値を示していたことから (図 3)、①番目の薬剤と②番目の薬剤の投与間隔を 1 時間に設定した。また対象として、TCO-PSMA と $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を予め結合した $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ および $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ 単独も投与し、その体内動態を評価した。その結果、従来法である $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ は腫瘍への高い集積 ($14.7\ \text{ID/g}$) を示す一方で、腎臓に高い放射能集積 ($318\ \text{ID/g}$) を示した。一方、TCO-PSMA を投与後 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を投与するプレターゲティング法では、腎集積を大きく低減し、 $15.3\ \text{ID/g}$ となった。しかしながら、腫瘍集積も大きく低減し、 $0.69\ \text{ID/g}$ となった。その結果、腫瘍腎臓比は変わらず 0.05 であった (図 6)。 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を単独で投与した場合、腎臓における放射能は、 $2.55\ \text{ID/g}$ とプレターゲティング法における $15.3\ \text{ID/g}$ よりも低値を示していた。 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ はそれ自身で、腎臓への集積を示さないことから、これらの結果は、血液中において、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ が TCO-PSMA と結合し、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ となったことで、腎臓へ集積したと考えられる。正常マウス

Table 1. LNCap 細胞を移植した担がんマウスに $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ および $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ を投与し、1 時間後の体内動態、および TCO-PSMA を投与 1 時間後、3 時間後に $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を投与し、その 1 時間後の体内動態の結果

	Tissue radioactivity is expressed as %ID/g for each group (n=3 or 4); results are reported as mean \pm SD			
	$[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$	$[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$	TCO-PSMA 1 時間後 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$	TCO-PSMA 1 時間後 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$
Blood	0.55 ± 0.12	1.38 ± 0.57	0.45 ± 0.28	0.40 ± 0.10
Liver	0.30 ± 0.05	1.73 ± 0.60	0.19 ± 0.07	0.37 ± 0.18
Kidney	2.55 ± 0.37	318 ± 30.8	15.3 ± 7.00	11.3 ± 3.58
Stomach †	0.69 ± 0.96	0.31 ± 0.15	0.63 ± 0.43	0.12 ± 0.05
Intestine †	1.41 ± 1.08	1.01 ± 0.41	1.29 ± 0.18	1.12 ± 0.19
Tumor	0.36 ± 0.10	14.7 ± 6.72	0.69 ± 0.29	0.84 ± 0.22

†%ID で表記。

に $[^{125}\text{I}]\text{I-Bn-PSMA}$ を投与した検討では、無担体状態で投与していたが、担がんマウスへの TCO-PSMA 投与では、 $100\ \mu\text{g}/\text{mouse}$ で投与していること、また担がんマウスの体重は正常マウスの $2/3$ 程度であり、これらの影響により、血液中に残存する TCO-PSMA が想定よりも多くなっていると考えた。本プレターゲティング法では、血液中で $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ を生成することは非常に良くない現象である。本方法では、TCO-PSMA を大量に投与しているため、腫瘍組織では、PSMA 受容体はほぼ飽和しているものと考えられる。そのため、血液中で $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ が TCO-PSMA に結合した場合、すでに腫瘍細胞では TCO-PSMA が結合しているため、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ は腫瘍細胞へ結合できない。一方、腎細胞は絶えず再吸収を行っているため、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ は再吸収をうけ、腎臓へと集積する。以上のような結果、高い腎集積と低い腫瘍集積となってしまふ。そこで、血液中に残存する TCO-

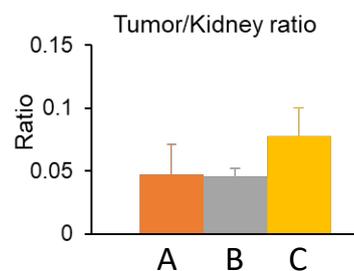


図 6. 担がんマウスに (A) $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz-TCO-PSMA}$ を投与した 1 時間後、及び TCO-PSMA 投与 1 時間後 (B) あるいは 3 時間後 (C) に $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を投与した時の投与 1 時間後の腫瘍血液比。

PSMA を減らせば、より腎臓の集積を低減でき、腫瘍組織への高い集積が達成できると考え、TCO-PSMA がより血液から消失されるように $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ を投与するタイミングを TCO-PSMA を投与してから 3 時間に設定し、再度検討を行った。その結果、わずかではあるが、腎臓の放射能が低減し、腫瘍への集積が増加した (Table1)。その結果、腫瘍血液比も増加した (図 6)。これらの結果は、血液中に残存する TCO-PSMA が腎集積の向上および腫瘍集積の低下に関与していることを示唆する。しかしながら、本状態でも十分とは言えず、さらなる改善が必要と考えられた。これまでの IgG などの高分子を用いたプレターゲットリング法では、血液中に残存する薬剤を除去する薬剤も開発されていることから、同様の手法によって、血液中に残存する TCO-PSMA を効率よく除くことが重要と考えられる。

(7) 結論

以上、本検討では、腎臓の放射活性を低減させる新たな手法としてプレターゲットリング法を提唱し、これらを実証する薬剤として、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-NOTA-Tz}$ と TCO-PSMA を開発した。血液中に残存する TCO-PSMA のため、所期の目的通りにはいかなかったが、腎臓への集積低減の可能性を見出した。今後、血液中に残存する TCO-PSMA を効率よく取り除く試薬の開発を行うことができれば、本プレターゲットリング法により高い腫瘍集積と低い腎集積が達成できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoki Yamashita, Hiroyuki Suzuki, Tahahiro Yasuda, Mizuki Hirayama, Yuta Kaizuka, Kazuhiro Takahashi, Kento Kannaka, Tomoya Uehara
2. 発表標題 Development of radio-halogen -labeled PSMA-targeting with high in vivo stability
3. 学会等名 3rd CRI-CGI-Chiba Symposium in Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究分担者	高橋 和弘 (Takahashi Kazuhiro) (20370257)	福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授 (21601)	
研究分担者	田中 浩士 (Tanaka Hiroshi) (40334544)	東京工業大学・物質理工学院・准教授 (12608)	

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
---------	---------