

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02871

研究課題名（和文）At-211標識アミノ酸を用いた治療効果の高い 線治療法の創出

研究課題名（英文）Development of a highly effective target alpha therapy with At-211-labeled amino acid derivative

研究代表者

花岡 宏史（Hanaoka, Hirofumi）

関西医科大学・附属光免疫医学研究所・教授

研究者番号：50361390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：細胞殺傷効果の高い 線放出核種であるアスタチン-211（211At）で標識した メチルフェニルアラニン（AMP）誘導体「2-211At-AAMP」の治療効果を増強するための戦略として、腫瘍集積性・滞留性に優れた211At標識アミノ酸誘導体の開発、他の薬剤との併用による211At標識AMP誘導体の腫瘍集積・滞留性の向上、という2つを検討した。プロベネシドを前投与することで2-211At-AAMPの腫瘍集積および滞留性が大きく向上し、担がんマウスに対する治療効果を大きく向上させることができた。また、アミノ酸の前処置によってもがん細胞集積性の向上が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たな汎用性の高いがん治療薬である、線放出核種「アスタチン-211（211At）」で標識したアミノ酸誘導体「2-211At-AAMP」の研究をさらに進め、担がんマウスにおける十分な治療効果を明らかにした本研究成果は、今後の我が国のがん治療薬開発に大きく貢献するものである。またすでに臨床使用されている薬剤であるプロベネシドおよび生体成分であるアミノ酸との併用により治療効果を向上させる手法は、安全性が高く、また2-211At-AAMPのみならず他の多くの薬剤に対して応用可能な手法であることから、学術的意義の大きいものである。

研究成果の概要（英文）：To enhance the therapeutic effect of an astatine-211 (211At) labeled -methyl phenylalanine (AMP) derivative, 2-211At-AAMP, the following two strategies were investigated. 1) Development of a 211At-labeled amino acid derivative with excellent tumor accumulation and retention properties, and 2) improvement of tumor accumulation and retention properties of the 211At-labeled AMP derivative in combination with other drugs. Pre-treatment with probenecid greatly enhanced the tumor accumulation and retention of 2-211At-AAMP, which greatly improved the therapeutic efficacy in tumor-bearing mice. Pre-treatment with amino acids also improved tumor cell accumulation.

研究分野：放射線科学

キーワード：内用放射線療法 アミノ酸 At-211 薬剤併用効果

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞殺傷性の高い  $\beta$  線を放出する放射性核種 (RI) を利用した、内用放射線療法が注目されており、臨床においても優れた治療効果を示している。一方で、現在開発が進められている線放出核種標識薬剤は、神経内分泌腫瘍に発現するソマトスタチン受容体や前立腺癌に発現する前立腺特異的膜抗原といった、特定の腫瘍にのみ発現している標的に対して有効な薬剤であり、多様な腫瘍に用いることはできない。一方でアミノ酸は、タンパク質合成の材料となることから、増殖の盛んな腫瘍細胞においては普遍的に取込みが亢進していることが知られている。この知見に基づき、がんの診断薬剤として、診断用の RI で標識したアミノ酸誘導体が開発され、臨床において多種のがんに対する高い集積性を示している。このことから、 $\beta$  線を放出するハロゲン核種であるアスタチン-211 ( $^{211}\text{At}$ ) で標識したアミノ酸誘導体も、同様に腫瘍に対して特異的に集積すると予想される。 $^{211}\text{At}$  の半減期は 7.2 時間とそれほど長くないため、抗体のような腫瘍集積に時間がかかる高分子化合物での利用は難しいが、低分子であるアミノ酸には適した核種である。また  $^{211}\text{At}$  は、我が国においても、現在入手可能であり今後の供給が見込まれる核種であることから、将来的な臨床利用も問題ないと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、 $^{211}\text{At}$  標識アミノ酸を用いた効果の高いがん治療法を確立することである。我々のこれまでの研究において、1 位にメチル基を有する L 体のフェニルアラニン (AMP) の 2 位にハロゲン核種を導入した RI 標識 AMP 誘導体を開発し、高い腫瘍集積性および体内からの速やかなクリアランスを示すことを明らかにしてきた。そこで AMP の 2 位に  $^{211}\text{At}$  を導入した 2- $^{211}\text{At}$ -AAMP を作製し、評価を行ったところ、同様に高い腫瘍集積性および体内からの速やかなクリアランスを示した。また細胞実験における殺細胞効果および担がんマウスに対する抗腫瘍効果が認められ、 $^{211}\text{At}$  標識アミノ酸誘導体が、がん治療薬として有望であることが証明された。しかしながら 2- $^{211}\text{At}$ -AAMP の治療効果はまだ十分であるとはいえず、その原因として 2- $^{211}\text{At}$ -AAMP の腫瘍滞留性の低さによる放射線の照射不足が考えられた。そこで本研究期間では  $^{211}\text{At}$  標識アミノ酸誘導体を用いた治療効果の高い内用放射線療法を開発することを目的とする。そのために、新たな  $^{211}\text{At}$  標識 AMP 誘導体を設計・合成、評価を行うことで、2- $^{211}\text{At}$ -AAMP よりも腫瘍集積性・滞留性に優れた  $^{211}\text{At}$  標識アミノ酸誘導体を開発、他の薬剤との併用による腫瘍集積性・滞留性の向上効果について検証、という 2 つの戦略により併用薬を含めた総合的な治療法として効果の高い RI 治療法を開発することを計画した。

### 3. 研究の方法

#### < 薬剤併用効果の検討 >

2 位にトリメチルスズ基を導入した標識前駆体を  $^{211}\text{At}$  標識し、保護基を脱保護することで 2- $^{211}\text{At}$ -AAMP を作製した。これまでの研究において、有機アニオントランスポーター阻害剤であるプロベネシドを前投与することにより、2- $^{211}\text{At}$ -AAMP の血液クリアランスが遅延し、腫瘍集積性及び滞留性が増加することを明らかにしてきた。そこで担がんマウスを用いて、プロベネシドを薬剤投与の 1 時間前に前投与、2- $^{211}\text{At}$ -AAMP を投与した場合の治療効果について、経時的に腫瘍サイズを計測することにより評価した。

また、AMP 誘導体は L 型アミノ酸トランスポーター-1 (LAT-1) により細胞内に取込まれるが、それと同時に細胞内よりアミノ酸が放出される。すなわち一度取込まれた AMP 誘導体も徐々に細胞外に放出されてしまう。従って細胞内において LAT-1 の基質となるアミノ酸量をあらかじめ増やしておけば、取込まれた  $^{211}\text{At}$ -AAMP の細胞外放出を競合的に抑制できると予想された。そこで、2- $^{211}\text{At}$ -AAMP と同様に LAT-1 を基質とする  $^{18}\text{F}$  標識メチルチロシン ( $^{18}\text{F}$ -FAMT) をモデル化合物として用い、インビトロおよびインビボにおけるアミノ酸前投与の効果を検討した。

#### < 新規 $^{211}\text{At}$ 標識 AMP 誘導体の設計・合成と $^{125}\text{I}$ 標識体を用いた初期評価 >

我々のこれまでの研究において、側鎖ベンゼン環のフッ素導入位置によって、AMP 誘導体の血液クリアランスが大きく異なることを明らかにしてきた。従って、2- $^{211}\text{At}$ -AAMP においても側鎖ベンゼン環の適切な位置にフッ素を導入すれば、適度な血中滞留性を有し、腫瘍集積性及び滞留性が向上した 2- $^{211}\text{At}$ -AAMP 誘導体が開発可能ではないかと考えられた。そこでベンゼン環の様々な位置にヨウ素およびフッ素を導入した AMP 誘導体の合成を行い、そのヨウ素を同位体交換反応により  $^{125}\text{I}$  に置換した  $^{125}\text{I}$  標識体を作製、健常マウス体内分布実験を実施し、各誘導体の有用性について評価した。

### 4. 研究成果

#### ・プロベネシドとの併用効果

プロベネシドを治療薬剤投与 1 時間前に腹腔内に前投与し、その後 2MBq の 2- $^{211}\text{At}$ -AAMP による治療を行ったところ、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた (次頁図 1)。一方、プロベネシドのみを投与した場合には治療効果は認められなかった。また以前実施した実験において、プロ

ベネシドを併用しない場合には、2MBq の  $2\text{-}^{211}\text{At-AAMP}$  では十分な治療効果が認められなかった。従って、プロベネシド投与により  $2\text{-}^{211}\text{At-AAMP}$  の治療効果が大きく増強したものと考えられる。また  $2\text{-}^{211}\text{At-AAMP}$ +プロベネシド群においては、マウスの生存期間を有意に延長し、その一方で、体重減少等の副作用は認められなかった。

以上のことから、プロベネシドは  $^{211}\text{At}$  標識アミノ酸の併用薬剤として優れた作用を有することが明らかとなった。

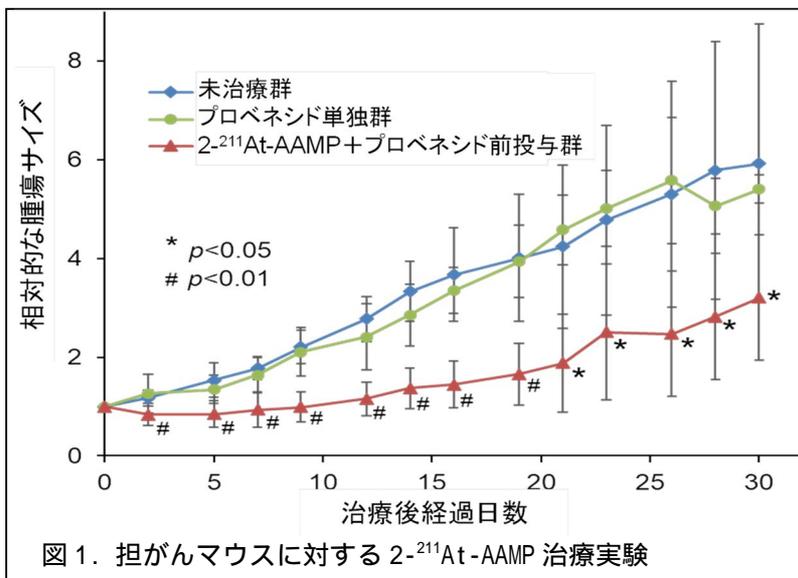


図1. 担がんマウスに対する  $2\text{-}^{211}\text{At-AAMP}$  治療実験

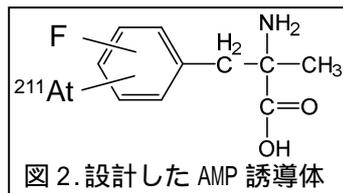
### ・アミノ酸の併用効果

細胞実験において、AMT の濃度依存的に  $^{18}\text{F-FAMT}$  の取込み量が増加した。また前処理時間としては2時間が最も効果的であった。そこで前処理条件を「AMT 濃度 2mM で2時間処理」とし、 $^{18}\text{F-FAMT}$  取込みの経時的変化を検討したところ、30分後まではAMT 添加群の方が有意に高い取込みを示したが、その後はAMT 添加群において細胞の放射活性の減少が認められた。この結果は、AMT 添加群において、早期では細胞内に多く存在しているAMT が排出されるため未添加群に比べて高い取込みを示すが、30分以降は細胞外のAMT が増えることによって、 $^{18}\text{F-FAMT}$  ではなくAMT が細胞内に取り込まれ  $^{18}\text{F-FAMT}$  が細胞外に排出されることで細胞の放射活性が減少したものと考えられる。担がんマウスを用いた検討を行ったところ、投与1時間後を比べるとAMT 投与群において、腫瘍滞留性の向上が認められ、腫瘍対血液比の有意な増加が認められた。

以上のことから、適当な条件でアミノ酸を前投与することによりRI 標識アミノ酸の腫瘍集積性を向上させる可能性が示唆された。

### ・新規 AMP 誘導体の評価

体内動態および腫瘍集積性・滞留性に優れた薬剤として、右図2のようなAMP のベンゼン環に対して  $^{211}\text{At}$  とフッ素が導入された  $^{211}\text{At}$  標識 AMP 誘導体を開発することを目標に、入手および実験が容易な  $^{125}\text{I}$  で標識した ( $^{211}\text{At}$  の代わりに  $^{125}\text{I}$  を導入) AMP 誘導体を作製し、評価を行った。



不斉合成によりAMP のベンゼン環にヨウ素およびフッ素が一つずつ導入された誘導体を作製した。今回の検討においては、2位にヨウ素4位にフッ素が入った2I4F 体、同様に2F4I 体および2F5I 体を作製した。この作製したAMP 誘導体に対して、ヨウ素- $^{125}\text{I}$  交換反応を行うことにより、 $^{125}\text{I}$  標識AMP 誘導体を得た。これらの標識体に関しては、標識反応条件においてラセミ化が起こる可能性が考えられたことから、キラルカラムを用いてL 体であることを確認した。それぞれの  $^{125}\text{I}$  標識体の健常マウスにおける体内動態を検討したところ、各誘導体によって血液クリアランスは大きく異なっており、2F5I 体が最も血液クリアランスが緩徐であった(右図3)。血中濃度がある程度保つことが、腫瘍集積性・滞留性を高くするために重要であると考えられることから、検討した3つのAMP 誘導体の中で、2F5I 体が最も有望であることが示唆された。今後、担がんマウスを用いて腫瘍集積性を検討する予定である。

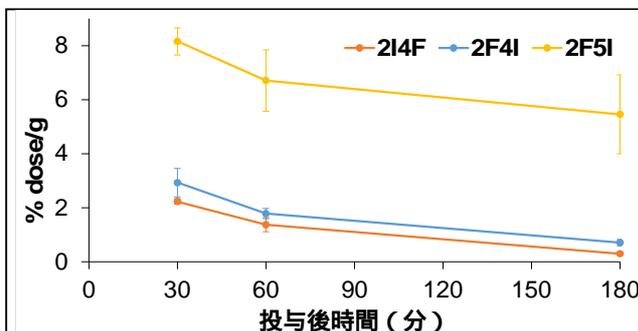


図3.  $^{125}\text{I}$  標識 AMP 誘導体の血液クリアランス

以上の検討結果より、 $^{211}\text{At}$  標識AMP 誘導体はがん治療薬として有用であり、さらに体内動態に優れた誘導体を開発し、プロベネシドおよびアミノ酸を併用することで、大きな治療効果が得られることが示された。今後さらに開発を進めていく予定である。

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 1件）

1. 著者名 Kanai Ayaka, Hanaoka Hirofumi, Yamaguchi Aiko, Mahendra Isa, Palangka Citra, Ohshima Yasuhiro, Higuchi Tetsuya, Tsushima Yoshito	4. 巻 104-105
2. 論文標題 Enhancing the accumulation level of 3-[18F]fluoro-L- -methyltyrosine in tumors by preloading probenecid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 47 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nucmedbio.2021.11.006	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 Hanaoka Hirofumi, Ohshima Yasuhiro, Suzuki Hiroyuki, Sasaki Ichiro, Watabe Tadashi, Ooe Kazuhiro, Watanabe Shigeki, Ishioka Noriko S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Enhancing the Therapeutic Effect of 2-211At-astato- -methyl-L-phenylalanine with Probenecid Loading	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5514 ~ 5514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13215514	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 花岡宏史、金井彩香、対馬義人
2. 発表標題 薬剤併用による RI標識アミノ酸の体内動態制御
3. 学会等名 第6回日本核医学会分科会・放射性薬品科学研究会
4. 発表年 2023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	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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	金井 彩香  (Kanai Ayaka)  (10847495)	群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座等教員    (12301)	
研究分担者	渡部 直史  (Watabe Tadashi)  (90648932)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教    (14401)	

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