

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09339

研究課題名（和文）前立腺特異膜抗原を標的とした中性子捕捉療法によるTheranosticsの開発

研究課題名（英文）Development of PSMA-targeting neutron capture therapy based theranostics

研究代表者

米山 徹（Yoneyama, Tohru）

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：50587649

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：前立腺特異膜抗原リガンドと放射性同位元素<sup>177</sup>Luを組み合わせた<sup>177</sup>Lu-PSMA-617による内照射療法など画像診断と治療を同時実施可能なTheranosticsにより転移性去勢抵抗性前立腺癌治療にパラダイムシフトが起きている。本研究では、低被曝かつ治療効果が高い前立腺癌特異的なTheranosticsとしてPSMAを標的としたイメージガイド下でのホウ素中性子捕捉療法の確立を目指した。その結果、PSMA標的性ペプチドとホウ素<sup>10</sup>核種薬剤とのペプチドホウ素薬剤を合成し、担癌マウスにてホウ素集積性が既存ホウ素薬と比較して、2-5.4倍高い集積性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すでに欧米諸国で使用されている<sup>177</sup>Lu-PSMA-617に代表される前立腺癌特異的なTheranosticsはPET/CTおよび放射性同位体を使用するため、被曝の問題から本邦では未承認である。本研究で確立された前立腺癌PSMA標的ペプチドホウ素薬剤に造影効果を示す薬剤を付与することができれば、前立腺癌特異的な病変の検出が可能となり、ホウ素中性子捕捉療法による前立腺癌特異的なTheranosticsの確立につながり、前立腺癌治療のbreakthroughになり得る臨床的、社会的に非常に意義が高いと研究と考えられる。

研究成果の概要（英文）：A paradigm shift in the treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer is occurring with theranostics modalities that enable simultaneous diagnostic imaging and treatment, such as internal radiation therapy using <sup>177</sup>Lu-PSMA-617, a combination of prostate-specific membrane antigen ligand and radioisotope <sup>177</sup>Lu. In this study, we aimed to establish image-guided boron neutron capture therapy targeting PSMA as a prostate cancer-specific theranostics modality with low radiation exposure and high therapeutic efficacy. As a result, we synthesized a peptide boron drug consisting of a PSMA-targeting peptide and a boron-10 drug, and found that the boron-accumulating activity was 2-5.4-fold higher than that of existing boron drugs in prostate cancer-bearing mice.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：MRI PSMA 中性子捕捉療法 Theranostics

1. 研究開始当初の背景

欧米諸国を中心に PSMA を標的とした画像診断と治療を同時実施可能な Theranostics モダリティが開発され、抗がん剤を中心とした mCRPC 治療戦略が Theranostics へと変革しつつあるが、放射性同位元素による被曝の問題から、本邦では未承認であり、低被曝で治療効果が高い前立腺癌特異的 Theranostics モダリティが必要である。その有力候補として、ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) がある。ホウ素 10 核種 ( $^{10}\text{B}$ ) に熱中性子線を照射するとホウ素中性子捕捉反応により飛程距離が細胞 1 個程度の  $\alpha$  線や Li 原子核が発生し、 $^{10}\text{B}$  が取り込まれた腫瘍組織にピンポイントで殺細胞効果を示す。切除不能な頭頸部癌に対する第 2 相臨床試験から 70% 以上の奏効率が示され、低被曝で取りこぼしの少ない放射線治療法として、2020 年 6 月に保険適用された。さらなる BNCT の適応拡大が期待される。イメージガイド化で前立腺癌特異的に  $^{10}\text{B}$  薬剤をデリバリーする薬剤を用いた BNCT の抗腫瘍効果を明らかにすることは、次世代前立腺癌特異的 Theranostics の開発を進める上で解決すべき重要な課題である。

2. 研究の目的

申請者は、PSMA 活性部位に結合する 7 残基ペプチド (L7) を同定した。L7 は、37°C 条件下で 20 分以内に PSMA 陽性癌細胞へ取り込まれ、L7-Gd 投与後、数分以内に PSMA 陽性腫瘍への集積を確認した (図 1、特許申請準備中、未発表データ)。

L7-Gd は、既存の低分子 PSMA リガンドと同様に PSMA 陽性腫瘍へ集積し、細胞内へ取り込まれることが示された。PSMA は、前立腺癌以外にも固形腫瘍の新生血管にも発現することが報告されており、L7-Gd に BNCT で使用される  $^{10}\text{B}$  薬剤を結合させた複合薬剤 (L7-Gd- $^{10}\text{B}$ ) は、PSMA 陽性腫瘍、新生血管への  $^{10}\text{B}$  薬剤のデリバリーペプチドとして有用であると期待される。さらに造影剤として使用される Gd 錯体は、熱中性子捕捉面積がホウ素の 66 倍大きく、中性子捕捉反応により飛程距離の長い (100  $\mu\text{m}$  以上) の  $\gamma$  線やオージェ電子を発生することから、 $^{10}\text{B}$  から放出される  $\alpha$  線、Li 原子核よりも広範囲の腫瘍に特異的な細胞傷害作用を与えることが可能となる。本研究では、PSMA 標的 L7-Gd 造影剤に  $^{10}\text{B}$  薬剤 (ステボロニン;  $^{10}\text{BPA}$  あるいは、ホウ素クラスター;  $^{10}\text{BSH}$ ) を結合させた薬剤を合成し、PSMA 陽性腫瘍への薬剤集積を MRI でモニタリングし、イメージガイド下での BNCT による抗腫瘍効果を検討することを目的とする (図 2)。

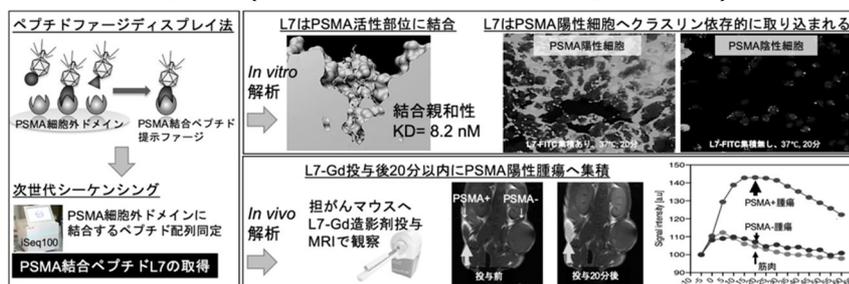


図1. PSMA結合ペプチド配列(L7ペプチド)同定とPSMA陽性腫瘍細胞への取り込みに関する解析

3. 研究の方法

令和 2 年度の計画

I. L7 ペプチド-Gd 錯体-ホウ素製剤 (L7-Gd- $^{10}\text{B}$ ) の合成および皮下腫瘍マウスモデルにおける L7-Gd- $^{10}\text{B}$  投与後の MRI によるモニタリング

MRI モニタリングのために L7 ペプチド C 末端側鎖にリンカーを介して、Gd 錯体および  $^{10}\text{B}$  薬剤を結合させた複合薬剤 (L7-Gd- $^{10}\text{B}$ ) を合成する。ヌードマウスの左大腿部に PSMA 陰性ヒト前立腺癌細胞 PC3-PM- ( $1 \times 10^6$  個/マウス) を、右大腿部に PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 PC3-PM+ ( $1 \times 10^6$  個/マウス) を播種した Dual tumor モデルに L7-Gd- $^{10}\text{B}$  を尾静脈投与 (20 mg/kg) し、小動物用 PET/MRI で L7-Gd- $^{10}\text{B}$  の PSMA 陽性腫瘍への集積を経時的にモニタリング (投与後 5 ~ 120 分) した。モニタリング後に各臓器、腫瘍組織を摘出し、ICP-AES にて  $^{10}\text{B}$  および  $^{157}\text{Gd}$  の組織内濃度を定量し、BNCT による抗腫瘍効果発揮に十分な B 濃度 (20  $\mu\text{g/g}$ ) および Gd 濃度 (200  $\mu\text{g/g}$ ) に達しているかを確認する。

II. 骨転移腫瘍マウスモデルにおける L7-Gd- $^{10}\text{B}$  投与後の MRI によるモニタリング

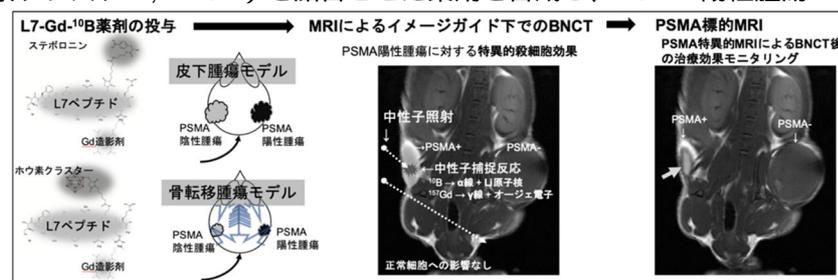


図2. イメージガイド下前立腺癌特異的中性子捕捉療法 (PSMA-BNCT)

イソフルラン麻酔下でヌードマウスの尾動脈より PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 PC3-PM+ ( $4 \times 10^6$ 個/マウス)を播種して、作製した骨転移腫瘍モデル (Kuchimaru T et al., *Nature Commun.* 2018, PMID:30061695) に L7-Gd- $^{10}\text{B}$  を尾静脈投与 (20 mg/kg) し、小動物用 PET/MRI で L7-Gd- $^{10}\text{B}$  の PSMA 陽性骨転移腫瘍への集積を経時的にモニタリング(投与後 5~120 分)する。同様に PSMA 陰性ヒト前立腺癌細胞 PC3-PM-細胞を用いた検討も行う。モニタリング後に各臓器、骨転移腫瘍組織を摘出し、計画 I と同様に ICP-AES にて  $^{10}\text{B}$  および  $^{157}\text{Gd}$  の組織内濃度を定量し、BNCT による抗腫瘍効果発揮に十分な B 濃度に達しているかを確認する。

令和 3 年度以降の計画

### III. ヌードマウスモデルを用いた L7-Gd- $^{10}\text{B}$ による BNCT の抗腫瘍効果の検討

L7-Gd- $^{10}\text{B}$  投与後、MRI イメージガイド下で、各腫瘍部位に十分に L7-Gd- $^{10}\text{B}$  が集積したタイミングで、BNCT を実施する。皮下腫瘍、骨転移モデルにおける L7-Gd- $^{10}\text{B}$  投与後のマウスに対する BNCT の抗腫瘍効果を検討する。投与後の腫瘍縮小効果は、L7-Gd 造影剤による MRI にてモニタリングする。観察期間終了後、残存腫瘍を摘出し、HE、Ki-67 index, PSMA, 腫瘍血管密度などを病理学的解析から、BNCT 後の抗腫瘍効果を検討する。

### IV. ヌードマウスあるいは、C57BL/6 マウス PSMA 陽性皮下腫瘍モデルを用いた L7-Gd- $^{10}\text{B}$ による BNCT の抗腫瘍効果と BNCT 後のアプスコパル効果による腫瘍免疫増強効果の検討

PSMA 陽性 TRAMP-C2 細胞を両足大腿部に播種した各マウスモデルにおける L7-Gd- $^{10}\text{B}$ -BNCT を実施する。照射は、片足のみとし、BNCT 後の腫瘍縮小効果は、L7-Gd 造影剤による MRI にてモニタリングする。BNCT 後、一部のヌードマウス、C57BL/6 マウスモデルの非照射皮下腫瘍を摘出し、PSMA 発現、細胞傷害性 T 細胞などの免疫細胞の腫瘍内浸潤、密度の病理学的解析から、BNCT 後のアプスコパル効果による腫瘍免疫増強効果を検討する。

## 4. 研究成果

### I. L7 ペプチド-Gd 錯体-ホウ素製剤 (L7-Gd- $^{10}\text{B}$ BSH)の合成および皮下腫瘍マウスモデルにおける L7-Gd- $^{10}\text{B}$ 投与後の MRI によるモニタリング

MRI によるモニタリングのために LHGRRSMC ペプチドの C 末端の側鎖に EMCS を介して 10BSH を結合させた LHGRRSMCK(EMCS-10BSH)を合成し、Cys 残基側鎖に DOTA-monoamide MI を介してマレイミドリンカーで Gd を結合させた。ペプチド自動固相合成機を使用し、C 末端より 9-fluorenylmethoxycarbonyl 法 (Fmoc 法)によりペプチド鎖を構築し、LHGRRSMC の保護ペプチド樹脂の合成を行った。保護ペプチド樹脂を乾燥し、トリフルオロ酢酸処理により脱保護と樹脂担体からの切り出しを行った。得られた粗ペプチドを液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した後、K 残基側鎖と EMCS のマレイミド基との結合を行い、HPLC にて中間体 LHGRRSMCK(EMCS- $^{10}\text{B}$ SH)を精製した。中間体 Cys 残基に DOTA-monoamide MI を介してマレイミドリンカーで Gd 錯体化し、再度 HPLC にて精製した。精製物を分析用 HPLC・質量分析ならびにアミノ酸分析により検定し、目的のペプチド-Gd- $^{10}\text{B}$ SH 錯体である事を確認した(図 3)。

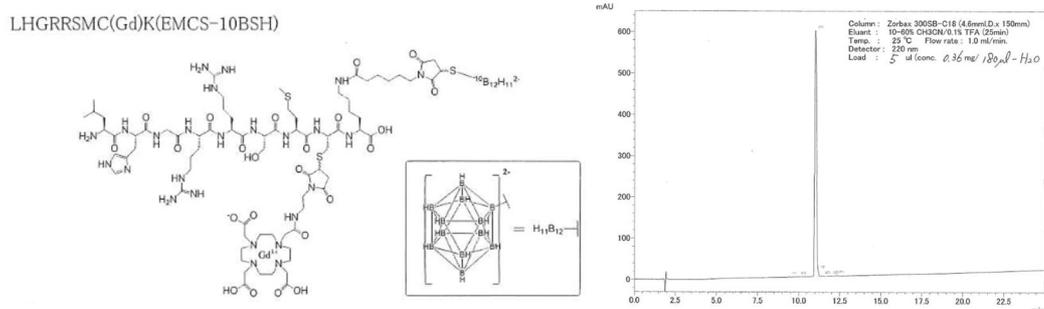


図 3. L7-Gd- $^{10}\text{B}$ SH (LHGRRSMC K-(EMCS-10BSH))の Cys 残基側鎖と DOTA-monoamide MI のマレイミドリンカーで結合させた LHGRRSMC(Gd)K-(EMCS- $^{10}\text{B}$ SH)の合成結果

MRI モニタリングのためにヌードマウスの左大腿部に PSMA 陰性ヒト前立腺癌細胞 PC3-PM- ( $1 \times 10^6$ 個/マウス)を、右大腿部に PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 PC3-PM+ ( $1 \times 10^6$ 個/マウス)を播種した Dual tumor モデルに L7-Gd- $^{10}\text{B}$ SH (図 1)を尾静脈投与 (20 mg/kg) し、小動物用 PET/MRI で L7-Gd- $^{10}\text{B}$  の PSMA 陽性腫瘍への集積を経時的にモニタリング (投与後 5~120 分)した。その結果、L7-Gd-10BSH が PSMA 陽性腫瘍(PC3-PM+)組織に集積し、造影効果が認められることを確認した(図 4)。その結果、L7-Gd- $^{10}\text{B}$ SH は、PSMA 陽性腫瘍に強い集積性を示し、PSMA 陰性腫瘍への集積はほとんど認めなかった。また腎臓への集積が認められ腎排泄であることが示唆された。以上の結果から、L7-Gd は、PSMA 陽性細胞へ投与後、直ちに集積する腫瘍集積性の Gd 錯体であることが示された (図 4)。

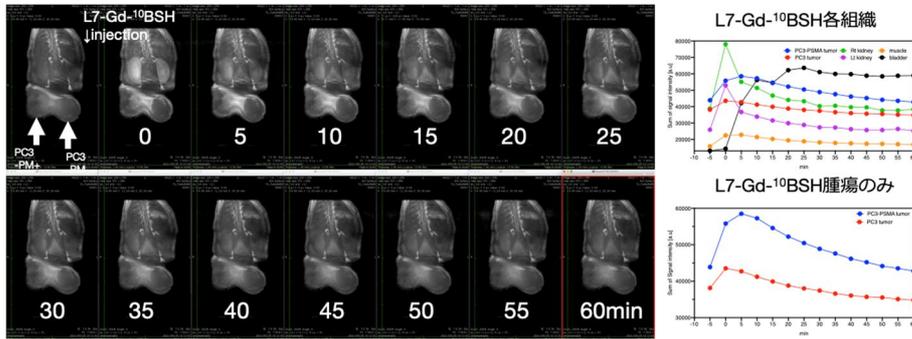


図 4 L7-Gd-<sup>10</sup>BSH の MRI モニタリング結果

モニタリング 60 分後に各臓器、腫瘍組織を摘出し、ICP-AES にて <sup>10</sup>B および <sup>157</sup>Gd の組織内濃度を定量し、BNCT による抗腫瘍効果発揮に十分な B 濃度 (20 μg/g) および Gd 濃度 (200 μg/g) に達しているかを確認したが、各組織ともに B および Gd 濃度の検出限界以下であった。MRI 造影像から、投与後 25 分程度で造影効果が消失していることから、Gd を標識していることで、血中のクリアランスが高くなり、PSMA 陽性腫瘍へのホウ素の集積効果を阻害していると考えられた。

## II. 骨転移腫瘍マウスモデルにおける L7-Gd-<sup>10</sup>B 投与後の MRI によるモニタリング

研究開始初年度より、最終年度まで *Nature Communications* volume 9, Article number: 2981 (2018) に記載されている尾動脈注入法による前立腺癌骨転移モデル構築の検討を実施した。イソフルラン麻酔下でヌードマウスの尾動脈より PSMA 陽性ヒト前立腺癌細胞 PC3-PM++-Luc

(4×10<sup>6</sup> 個/マウス) を播種して、骨転移マウスモデルの構築を試みたが、尾動脈への注入手技の難易度が高く、細胞を注入しても、図 5 のように尾の付け根で細胞が血圧に負けてとどまってしまう、うまく下肢骨へ播種することができなかった。血圧を弱めるため、イソフルラン麻酔強度を上げた検討も実施したが、同様の結果となり、うまく下肢骨へ腫瘍細胞を播種することができなかった。本研究においては、実験者の手技が未熟であるため、上記論文に記載されているような骨転移モデルの再現ができなかったと考えられる。そのため、骨転移モデル構築は断念せざるをえなかった。

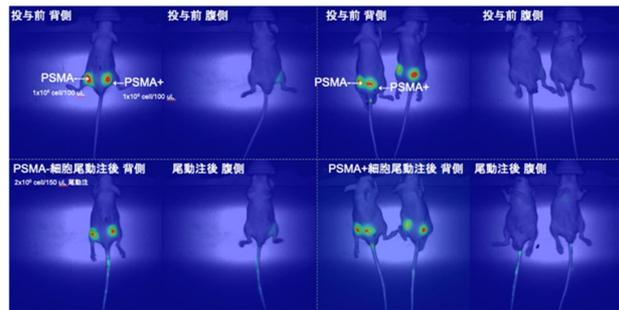


図 5. 尾動脈投与前後の Luciferase 陽性 PC3-PM+ の分布

## 令和 3 年度以降の計画

令和 3 年以降の計画に関して、MRI 集積データを踏まえ、腫瘍部位に L7 ペプチド-Gd-<sup>10</sup>BSH 錯体が集積したタイミングで中性子捕捉療法を実施する計画を立てたが、L7 ペプチド-Gd-<sup>10</sup>BSH の集積効果が非常に短時間であり、薬剤自体がすぐに排泄されることが示唆されたため、L7 ペプチドから Gd を除いた L7-<sup>10</sup>BSH におけるホウ素中性子捕捉療法実験を実施することとした。しかしながら、新型コロナ禍の影響で中性子照射施設である青森県量子科学センターの遺伝子組み換え動物実験の施設整備が当初の予定通り進まず、遺伝子組み換え動物を用いた中性子捕捉療法実験実施が不可能となった。このため、同施設での PSMA を標的とした中性子捕捉療法実施が困難と判断し、令和 5 年度から、L7-ペプチドよりも PSMA に親和性が高い新たなペプチドをファージスクリーニングプールから再検討するとともに、遺伝子組換え動物実験を実施可能な本学施設において L7 ペプチド-<sup>10</sup>BSH 薬剤投与後の腫瘍組織のホウ素濃度を検討することとした。その結果、配列濃縮率の高い 3 種類のペプチド候補 (LTRSRRL, TSAHHRH, RRQRAAP) を得た (図 6)。

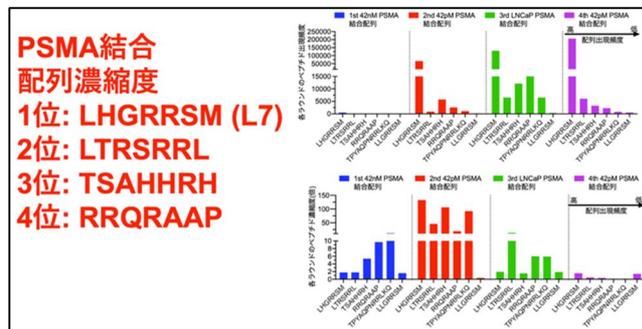


図 6 ファージディスプレイスクリーニングにおける PSMA 結合配列の配列濃縮率

配列濃縮率が高い 3 種のペプチドと L7 ペプチドの細胞内取り込みを PSMA を過剰発現させ

た PC3-PM+細胞に対して実施した ( 図 7 )。

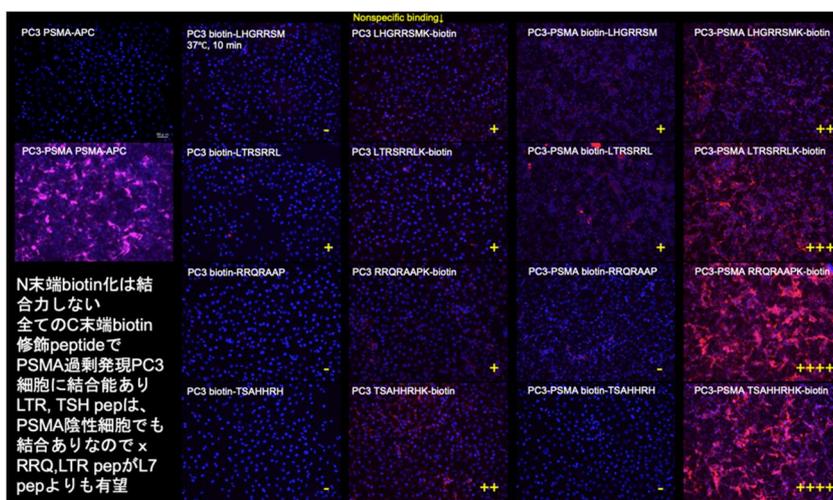


図 7. 4 種の PSMA 結合ペプチドの PSMA 陽性、陰性細胞に対する結合量の比較

図 7 の結果、L7 ペプチドの染色強度と比較し、RRQRAAP ペプチドの染色強度が非常に高く PSMA 陰性 PC3 細胞に対する非特異的結合が低いことが明らかとなり、L7 ペプチドと同様 PSMA に結合するペプチドとして、RRQRAAP (R7) ペプチドを PSMA 結合ペプチドとして選択した。以上の結果から、PSMA に結合する R7 ペプチドを新たに同定したため、R7 ペプチドについてもホウ素を結合させた薬剤 R7-<sup>10</sup>BSH を合成し、青森県量子科学センターの遺伝子組み換え動物実験施設整備が完了した段階で中性子捕捉療法による抗腫瘍効果について検討を直ちに実施できるように当該薬剤投与後の PSMA 陽性腫瘍へのホウ素集積性について検討した。PSMA 陽性 PC3-PM+ および PC3-PM- 細胞を播種した担癌マウスに <sup>10</sup>BSH 投与群 (0.625 mg 投与/25g) および <sup>10</sup>BSH 換算で同投与量となるように各 8.25mg/25g の L7-<sup>10</sup>BSH あるいは、R7-<sup>10</sup>BSH を投与後、Cy7.5 標識抗 <sup>10</sup>BSH 抗体で <sup>10</sup>BSH の集積を 96 時間モニタリングした。

その結果、図 8 に示すように投与後 96 時間後に PSMA 陽性腫瘍において <sup>10</sup>BSH 投与群 (0.625 mg 投与/25g) のホウ素濃度 0.655 ppm と比較し、<sup>10</sup>BSH 換算で同投与量となるように各 8.25mg/25g マウスで投与した L7-<sup>10</sup>BSH で 2.693 ppm, R7-<sup>10</sup>BSH で 3.596 ppm と 2~5.4 倍ホウ素集積効果が高いことが明らかとなった。BNCT による抗腫瘍効果発揮に十分な B 濃度 (20 ppm) には、達していないものの投与量を増加させることによって既存 <sup>10</sup>BSH 薬よりも PSMA 陽性腫瘍への集積効果が高い薬剤として使用できる可能性が示唆された。

以上の結果から、ホウ素を結合させた薬剤の PSMA 陽性腫瘍へのホウ素集積が既存薬よりも優れていることが明らかになったため、青森県量子科学センターの遺伝子組み換え動物実験施設整備が完了した段階で中性子捕捉療法による抗腫瘍効果について検討を実施する予定である。

現在のところ、令和 6 年度後半に中性子照射施設である青森県量子科学センターにおける遺

伝子組み換え動物実験施設整備が完了となる見込みであるため、本研究期間終了後に皮下腫瘍モデルにおける中性子捕捉療法の抗腫瘍効果検討を継続する。これらの研究成果を泌尿器科学会で発表を検討している。

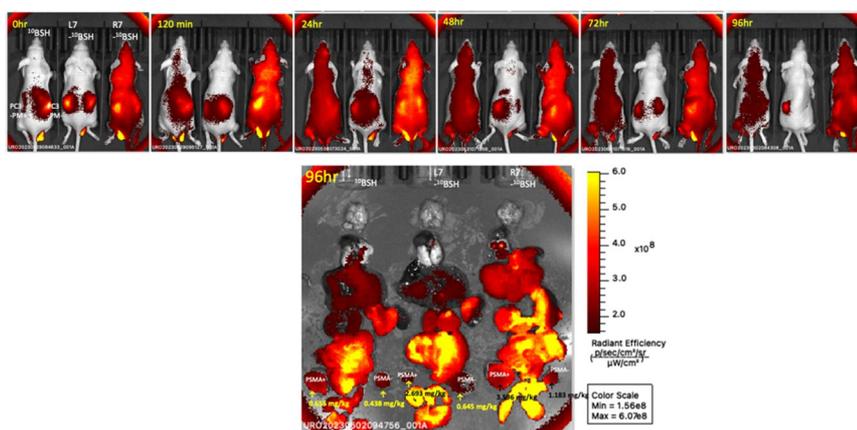


図 8 Cy7.5 標識抗 <sup>10</sup>BSH 抗体による L7-<sup>10</sup>BSH, R7-<sup>10</sup>BSH 投与後ホウ素集積のモニタリングおよび 96 時間後の ICP-MS によるホウ素濃度測定結果

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	畠山 真吾  (Hatakeyama Shingo)  (10400136)	弘前大学・医学研究科・教授   (11101)	
研究分担者	山本 勇人  (Yamamoto Hayato)  (30532759)	弘前大学・医学研究科・准教授   (11101)	
研究分担者	大山 力  (Ohyama Chikara)  (80282135)	弘前大学・医学研究科・特任教授   (11101)	

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