

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月2日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791189

研究課題名（和文） がんの転移能診断を目的としたシグナル増幅機構を有する
新規高感度分子プローブの開発研究課題名（英文） Development of MMP dependent anchoring probe for diagnosis of
tumor malignancy

研究代表者

天満 敬（TEMMA TAKASHI）

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90378787

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、MT1-MMP 基質ペプチド、RI シグナルドメイン、細胞膜捕定ドメイン、阻害ドメインの4部位から成る MMP 依存的捕捉型プローブ（MDAP）を開発することにある。インビボイメージングに有効な MT1-MMP 基質ペプチドを見出すと共に、モデルとして MMP2 基質ペプチドを用いることで ^{111}In -MDAP の合成に成功した。MMP 高発現細胞・低発現細胞・正常マウスを用いた検討により、 ^{111}In -MDAP がインビボにおいても有効なイメージング用プローブとなる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a MT1-MMP dependent anchoring probe (MDAP) which is composed of MMP substrate peptide, RI signal domain, cell membrane anchoring domain and inhibitable domain. A MT1-MMP substrate peptide useful for *in vivo* imaging was obtained and ^{111}In -MDAP was successfully synthesized using a MMP2 substrate peptide as a model. *In vitro* study with MMP high and low expressed cells and *in vivo* study with normal mice revealed that ^{111}In -MDAP could be a promising imaging agent *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：放射性医薬品・造影剤

1. 研究開始当初の背景

がんの浸潤、転移において細胞外マトリクス（Extracellular matrix; ECM）や基底膜の分解は必須のステップであり、マトリクスメタロプロテアーゼ（MMP）はこの過程を制御する重要な一連の酵素群である。MMPはその構造に基づいて分泌型と膜結合型に大別されるが、中でも膜結合型マトリクス

メタロプロテアーゼ-1（membrane-type 1 matrix metalloproteinase; MT1-MMP）は、（1）腫瘍形成の早期より発現しその発現が腫瘍組織に限局する、（2）I・II・III型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンなど広範囲のECM構成成分に対する分解活性をもつ、（3）インテグリン、CD44などの細胞接着分子を細胞表面で制御する、（4）MMP-2、

-13 を細胞表面で活性化する、等の性質を有し、MT1-MMP の発現はがんの悪性度と相関することが示されてきており、MT1-MMP 変異体を発現させたがん細胞では増殖性・浸潤性が顕著に抑制されることが明らかとなっている。加えて、MT1-MMP はほとんどのヒトがん組織において発現していることが示されるに至って、MT1-MMP を標的としたがんの診断法・治療法の開発が急務となっている。事実、これまでに、MMP を標的とした分子イメージングプローブの開発が積極的に進められてきているが、MT1-MMP イメージングプローブとして有効なものは未だ報告されていない。

研究代表者はこれまでに、抗 MT1-MMP 抗体の ^{99m}Tc 標識体を作製し、複数の担がんモデル動物を用いて MT1-MMP イメージングプローブとしての有効性を示してきた (Biol Pharm Bull 32:1272-7:2009)。しかしながら抗体は高分子であるため非標的組織からの消失が遅く、イメージングの指標となる腫瘍対血液放射能集積比はプローブ投与 48 時間後においても 1.5 程度である問題点を有していた。そこで、この研究成果を基盤とし、がん病変への集積性の向上と循環血液中からの消失促進を同時に達成するためには、①MT1-MMP 依存的なプローブ集積増幅メカニズム、②低分子化、の両アプローチを高度に両立した新たな分子プローブ設計が必要であるという着想に至った。考案した『MT1-MMP 依存的捕捉型プローブ (MT1-MMP dependent anchoring probe; MDAP)』は、MT1-MMP 基質ペプチド配列、RI シグナルドメイン、細胞膜捕定ドメイン、阻害ドメインの 4 部位から成る。悪性度の高いがん細胞膜上に発現した MT1-MMP の酵素活性により基質ペプチド配列が切断されると MDAP から阻害ドメインが遊離し、リン脂質を主成分とした細胞膜捕定ドメインと RI シグナルドメインのみとなった結果、プローブが速やかに近傍のがん細胞膜上に捕定されることを設計概念としている。MDAP はペプチド性低分子であることから血中クリアランスは大いに向上することが期待されるのに加え、がん細胞膜への MDAP の捕定を促す駆動力は MT1-MMP の酵素活性でありプローブの母核は MT1-MMP 基質ペプチドであることから、阻害剤・抗体などの MT1-MMP 結合性分子を母核とする場合と比べ、MT1-MMP 1 分子あたりでより多くの局所プローブ集積を達成できると期待される。研究代表者は、本研究において、ファージディスプレイ法に基づくランダムスクリーニング技術を駆使して新たな MT1-MMP 特異的基質ペプチドを抽出するとともに、隣島移植細胞のコーティング分野において見出された細胞膜捕定分子

(Biomaterials 27:5828-35:2006) を分子イメージングプローブ骨格に導入して考案した MDAP の有効性をインビトロ・インビボにおいて多角的に実証することを目指す。以上の検討から高感度 MT1-MMP イメージングを実現することを通じて、ポジトロン断層撮像法 (PET) / 単光子断層撮像法 (SPECT) を用いた画像診断分野における新たながんの悪性度診断手法の開発に資する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ファージディスプレイ法に基づくランダムスクリーニングにより抽出した MT1-MMP 基質ペプチド配列を母核として、RI シグナルドメイン、細胞膜捕定ドメイン、阻害ドメインとを組み合わせることで、がんにおける MT1-MMP 活性依存的に病変局所に捕捉・濃縮される『MT1-MMP 依存的捕捉型プローブ (MT1-MMP dependent anchoring probe; MDAP)』を開発することにある。本プローブは、MT1-MMP を発現する悪性度の高いがん選択的に高濃度に蓄積し、分子イメージング法に基づくがんの画像診断分野に新たな質的診断手法を提供すると期待される。

3. 研究の方法

図 1 に MDAP の概念図を図示した。本研究では MDAP の基本骨格の設計・合成を行った後、標識合成検討を行う。その後、溶液・細胞を用いたインビトロ検討、動物を用いたインビボ検討により有効性を示す。

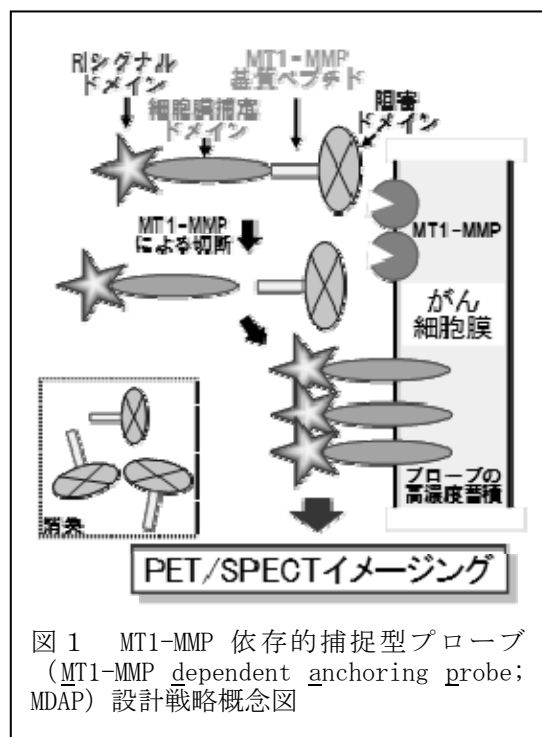


図 1 MT1-MMP 依存的捕捉型プローブ (MT1-MMP dependent anchoring probe; MDAP) 設計戦略概念図

(1) ペプチド配列抽出に関する検討

6-10 残基の基質ペプチドを見出すことを目的としてランダム DNA を作製し、ファージのキャプシドタンパク質コード領域に挿入した。ファージライブラリの固相ビーズを用いたバイオパニングを繰り返し、MT1-MMP への親和性を有するファージの濃縮を調べた。

ペプチドを蛍光色素あるいは RI で標識し、担がんマウスを用いて尾静脈内投与後の体内動態を調べた。

(2) 合成検討

RI には ^{111}In を、細胞膜捕定ドメインにはジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) 誘導体を、阻害ドメインには鎖長の異なる数種のポリエチレングリコール (PEG) 鎖を選択し、MDAP を作製した。Fmoc 固相合成法により、C 末側から PEG、基質ペプチド、DPPE 誘導体を順次結合した。樹脂から切り出したのち RI 標識のために二官能性キレート (DTPA) を結合させた。常法に従い ^{111}In 標識を行った。

(3) インビトロ検討

① 溶液系による検討

基質ペプチドの両側に阻害ドメイン (PEG)、細胞膜捕定ドメイン (DPPE 誘導体) を結合したことから、MMP に対する切断活性が損なわれる可能性がある。そこで、MMP タンパク質を用いた切断アッセイを行った。MMP タンパク質による切断は逆相 HPLC 分析により調べた。

② 細胞系による検討

MMP 高発現細胞には HT1080 細胞を、低発現細胞には MCF7 細胞を用いた。図 1 の概念図に従えば MMP により切断された後のプローブは速やかに細胞膜に捕定される必要があることから、切断後のプローブ (^{111}In -MDAPcv) を別途合成し、HT1080 細胞、MCF7 細胞を用いて添加後の経時的な放射能取込を調べた。続いて、 ^{111}In -MDAP を用いて同様に HT1080 細胞、MCF7 細胞への経時的な放射能取込を調べた。

(4) インビボ検討

プローブのインビボでの有効性を調べるため正常マウスを用いて尾静脈内投与後の経時的な体内分布変化を臓器摘出法により調べた。

4. 研究成果

(1) ペプチド配列抽出に関する検討

固相ビーズを用いたファージライブラリのバイオパニングを繰り返すことにより MT1-MMP に親和性を有するペプチドを発見することが期待されるファージの濃縮を認め

たが、有効なペプチドの抽出に至らなかった。

そこで論文検索により非天然アミノ酸を多く有する 9 残基ペプチドを見出したことから、プローブに用いる有効性を調べた。N 末側を FITC により蛍光標識し担がんマウスを用いて体内動態を調べたところ、他の臓器と比べ投与 2 分後より摘出腫瘍に強い蛍光を認め、30 分後まで保持された (図 2)。このことより本ペプチド配列のインビボにおける有効性が示唆された。

(2) 合成検討

本研究課題においては MDAP 設計概念の有効性を示すことが最も重要な課題である。MT1-MMP 基質ペプチド配列の探索に時間を要したことから、以降の検討では既知の MMP2 切断配列 (GPLGVRGK, J Biol Chem 265:20409;1990) をモデル基質ペプチドとして用い検討を行った。合成は Fmoc 固相合成法により C 末端側から順次結合し、質量分析法により生成を確認した。精製は各種クロマトグラフィー法により行った。

(3) インビトロ検討

MMP2 タンパクは 1 mM APMA とプレインキュベートすることで活性化型 MMP2 タンパクを得た。PEG 未修飾プローブについて活性化型 MMP2 タンパク質を処置したところ 3 時間後において未変化体の保持時間におけるピークが大きく減弱した。PEG 修飾プローブ

(^{111}In -MDAP) についても同様の検討を行ったところ、処置 2 時間後において未変化体の保持時間におけるピークが大きく減弱した。このことから、PEG、DPPE 誘導体を結合したことで MMP2 切断活性は損なわれないことが示

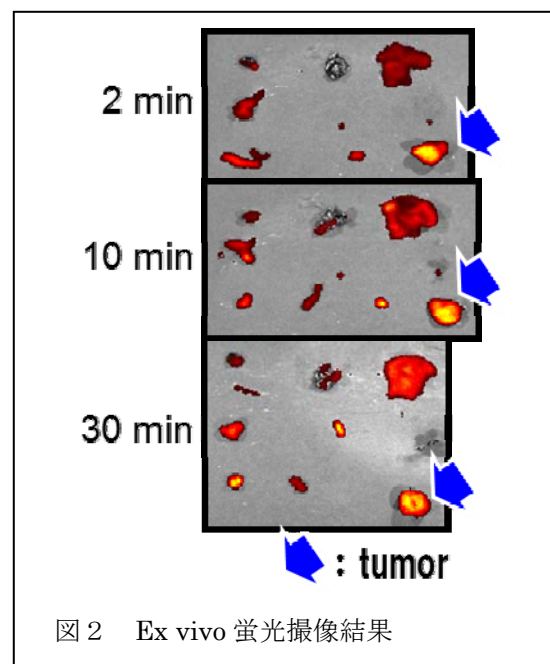
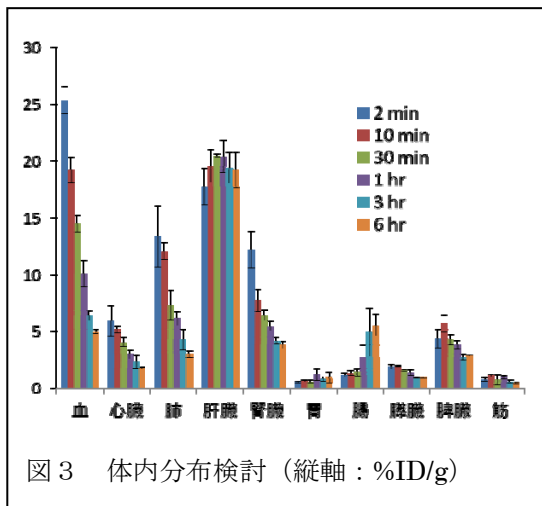


図 2 Ex vivo 蛍光撮像結果



された。

切断後のプローブ (^{111}In -MDAPcv) の HT1080 細胞、MCF 細胞への放射能取込を調べたところ、何れの細胞においても速やかに高い放射能取込を認めた。このことから、MDAP は MMP 活性により切断された後においては、MMP 活性の有無に関わらず近傍の細胞膜に捕定される可能性が示された。また、 ^{111}In -MDAP を HT1080 細胞、MCF 細胞に処置したところ、HT1080 細胞に有意に高い放射能取込を示した。このことより、 ^{111}In -MDAP は MMP2 活性に依存して HT1080 細胞に捕定される可能性が示された。

(4) インビボ検討

MDAP プローブのインビボでの有効性を基礎的に調べるため、PEG 未修飾プローブについて正常マウスを用いた体内分布評価を行った。すなわち、正常マウスに PEG 未修飾プローブを尾静脈内投与し、2 分、10 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間後の各臓器における放射能集積量を調べた (図 3)。その結果、本プローブは比較的高い血中滞留性を示し、投与 6 時間後における血中放射能は約 5%ID/g であった。投与早期における比較的高い肺への放射能滞留傾向、肝臓から腸への放射能排泄が認められたことから、本プローブはマウス生体内において高分子様の動態を示すことが明らかとなった。生体内における錯構造の崩壊の可能性は低いと考えられたことから、インビトロでの MMP2 切断活性を合わせて考えると、 ^{111}In -MDAP はインビボにおいても有効なイメージング用プローブとなる可能性を認めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Shimizu Y, Temma T, Sano K, Ono M, Saji

H. Development of membrane type-1 matrix metalloproteinase-specific activatable fluorescent probe for malignant tumor detection. *Cancer Sci.* 2011;102:1897-903 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02020.x 査読有

- ② Sano K, Temma T, Azuma T, Nakai R, Narazaki M, Kuge Y, et al. A Pre-targeting Strategy for MR Imaging of Functional Molecules Using Dendritic Gd-Based Contrast Agents. *Mol Imaging Biol.* 2011;13:1196-203. DOI: 10.1007/s11307-010-0463-1 査読有
- ③ Sano K, Temma T, Kuge Y, Kudo T, Kamihashi J, Zhao S, et al. Radioimmunodetection of membrane type-1 matrix metalloproteinase relevant to tumor malignancy with a pre-targeting method. *Biol Pharm Bull.* 2010;33:1589-95. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.1589> 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 近藤直哉、天満 敬、他 4 名、MT1-MMP を標的とする核医学分子イメージングプローブ： ^{111}In 標識抗 MT1-MMP 抗体誘導体、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、北海道大学 (北海道)
- ② 近藤直哉、天満 敬、他 4 名、MT1-MMP を標的とした新規単鎖抗体の開発と核医学イメージングへの応用、第 9 回次世代を担う若手のためのフィジカル・フォーラム、2011 年 9 月 12 日、ホテル箱根アカデミー (神奈川県)
- ③ 近藤直哉、天満 敬、他 4 名、MT1-MMP を標的とした単鎖抗体の開発及び核医学イメージングプローブとしての有効性評価、第 10 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2010 年 12 月 4 日、京都テルサ (京都府)

[図書] (計 2 件)

- ① 佐治英郎, 小野正博, 天満敬, 上田真史, 木村寛之. 生体分子イメージングと創薬・臨床画像診断. トランスレーショナルリサーチを支援する遺伝子医学 MOOK20 号ナノバイオ技術と最新創薬応用研究 (メディカルドゥ、橋田充・佐治英郎編). 2012:132-43.
- ② 上田真史, 天満敬, 佐治英郎. 悪性腫瘍の分子イメージングのための新しい分子プローブの設計. *PET journal* (先端医療技術研究所). 2010:12:32-4.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天満 敬 (TEMMA TAKASHI)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90378787

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし