

## 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25年 6月 9日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791218

研究課題名（和文） 酵素感受性標識試薬の開発に基づくラジオアイソトープ標識ペプチドの腎集積低減研究

研究課題名（英文） Enzyme-sensitive radiolabeling reagent to reduce renal radioactivity after administration of radiolabeled peptide for cancer therapy

研究代表者

秋澤 宏行（AKIZAWA HIROMICHI）

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：90311795

研究成果の概要（和文）：放射性核種（RI）標識ペプチドを投与して行うがんの治療では、正常腎臓への高い放射能集積による腎毒性が問題となる。申請者らは以前、この腎集積を低減する標識試薬（HML）の開発に成功した。本研究は、その継続として、腎集積の低減だけでなく、高いがん細胞内滞留性を示す標識試薬の開発を目的として行った。その結果、HMLと比べて腎集積は高いが、従来の標識法と比べた場合には腎集積を低減する標識試薬の開発に成功した。今後、がん滞留性の評価を行っていく。

研究成果の概要（英文）：When radiolabeled carcinophilic peptides are administered for cancer therapy, high radioactivity is observed in the normal kidneys. I previously developed a radiolabeling reagent (HML) to reduce the renal radioactivity. The goal of this study is to develop the radiolabeling reagent which realizes not only reduction of the renal radioactivity but also elevation of radioactivity levels in the tumor. The new radiolabeling reagent showed low renal radioactivity levels compared with a conventional reagent although the renal radioactivity was higher than that for HML. Radioactivity levels in the tumor will be evaluated in the near future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：がん、アイソトープ内用療法、体内動態制御、放射性医薬品、octreotide、刷子縁膜酵素、腎臓、ペプチド

## 1. 研究開始当初の背景

最近、抗体を用いるがんのアイソトープ治療が認可された。このことを受け、様々なラジオアイソトープ（RI）標識ペプチドを用いるがんのアイソトープ治療の可能性が、精力的に検討されている。しかし、多くのRI標

識ペプチドでは、投与早期から腎臓で非特異的な放射能の集積・滞留が観察され、臨床応用を阻む高いハードルとなっている。

RI標識ペプチドを用いるアイソトープ治療の成否は、この腎放射能集積を低減できるか否かに懸かっている。これまでに、再吸収

阻害剤や塩基性アミノ酸の前投与や同時投与などが検討されてきたが、十分な成果があげられていない。また、申請者らは、RI 標識ペプチドに負電荷を導入することで、腎放射能レベルを半減することに成功したが、さらなる低減は未だ実現されていない。そこで申請者は、HML (3'-[<sup>123/125/131</sup>I]iodohippuryl *N*-maleoyl-L-lysine) の戦略に基づいた、RI 標識ペプチドの腎集積低減法の開発に取り組み始めた。

HML とは、RI 標識抗体 Fab フラグメントの非特異的な腎放射能集積を低減するために、申請者らが、次の仮説に基づいて開発した放射性ヨウ素標識試薬である。「HML 標識 Fab は、糸球体濾過を受けた後、尿管細胞に再吸収される前に、腎刷子縁膜酵素に感受性を持つ HML 構造中のペプチド配列 (Gly-Lys 配列) が開裂し、*m*-ヨウ素馬尿酸を放射性代謝物として遊離する。この代謝物は尿排泄性が高く、速やかに尿中へ排泄されることから、腎放射能レベルを低減できる。」実際、HML 標識 Fab を担がんマウスに投与したところ、がんへの集積を損うことなく、腎放射能レベルを大きく低減した。

申請当時、科学研究費補助金の助成を受け、世界的に注目されているソマトスタチン受容体発現腫瘍の治療薬、<sup>90</sup>Y 標識 octreotide をモデル化合物として、新規 HML 類似標識薬剤開発のための検討を進めていたが、申請時まで *in vitro* で <sup>90</sup>Y 標識化合物を遊離するペプチド配列を見出したものの、*in vivo* では十分な腎放射能の低減を認めるに至っていなかった。このことから、<sup>90</sup>Y に限定せずに様々な  $\beta$ -線放出 RI に目を向け、より尿排泄性の高い放射性化合物を選択し、その化合物を刷子縁膜酵素の作用で、より効率よく遊離する標識試薬を開発することにより、研究が大きく進展する可能性があると考えた。

以上を踏まえ、本研究では、HML に基づく戦略を更に発展させ、最適な酵素感受性標識試薬を新たに開発することを目指した。

## 2. 研究の目的

ペプチドのほとんどは、多くの抗体とは異なり、がん細胞に内在化し、リソソーム代謝を受け、刷子縁膜酵素が作用した場合と同じ代謝物を遊離する可能性が高い。そのため、仮に、HML のように *m*-ヨウ素馬尿酸を遊離する標識試薬を設計した場合には、腎臓だけでなく、がんの放射能レベルも低減させてしまう。

そこで本研究では、高い尿排泄性だけでなく、高い細胞内滞留性をも具備する放射性代謝物を遊離することで、がん集積を損なうことなく腎集積を低減する酵素感受性標識試薬を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 標識試薬から遊離させるべき放射性化合物、すなわち、高い尿排泄性に加えて、高いがん細胞内滞留性を具備する放射性化合物を探索することを目的とし、それら二つの性質を有することが期待される放射性化合物を設計し、その標識前駆体の合成法、および、目的とする放射性化合物の標識合成法を確立する。

(2) 高い尿排泄性に加えて、高いがん細胞内滞留性を具備する放射性化合物を遊離する酵素感受性標識試薬を設計し、その前駆体の合成法と標識合成法、および、その標識試薬を用いた低分子量タンパク、ペプチドの標識法を確立する。

(3) 設計した酵素感受性標識試薬が、申請者らが以前開発した標識試薬 (HML) と比べ、高いがん細胞内滞留性を示すか否かを評価することを目的として、がん細胞に内在化するモデル化合物を合成し、それを新規標識試薬で標識、得られた標識化合物について、がん細胞内滞留性を評価する *in vitro* 実験を計画した。すなわち、モデル化合物として、あるタイプのがん表面に高発現するガストリン受容体に結合後に内在化することが知られているミニガストリンを選択し、その合成を行う。ついで、そのミニガストリンを新規標識試薬で標識し、得られた標識体を培養がん細胞とインキュベートし、内在化後の放射能滞留性を、以前開発した標識試薬 (HML) の場合と比較する。

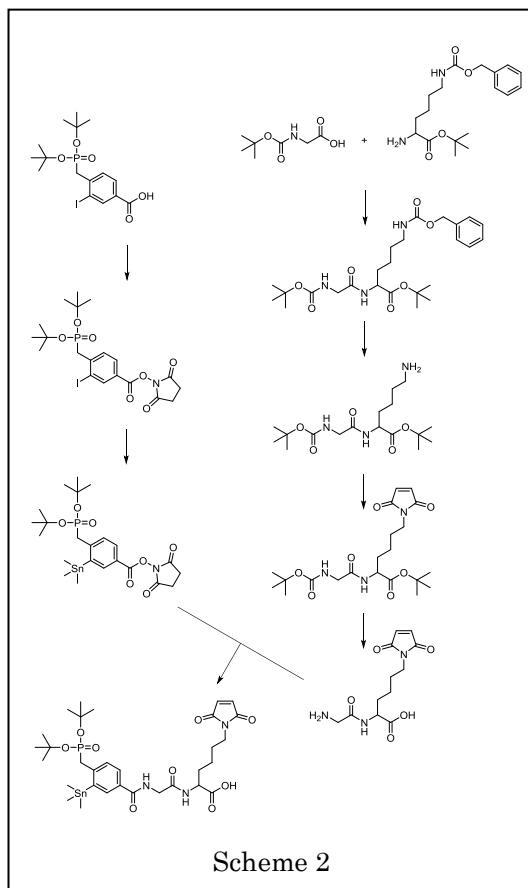
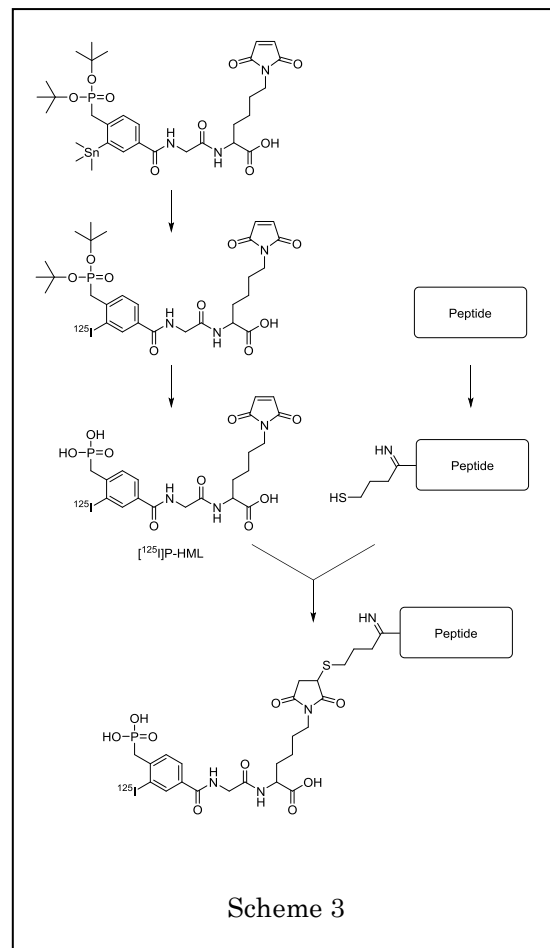
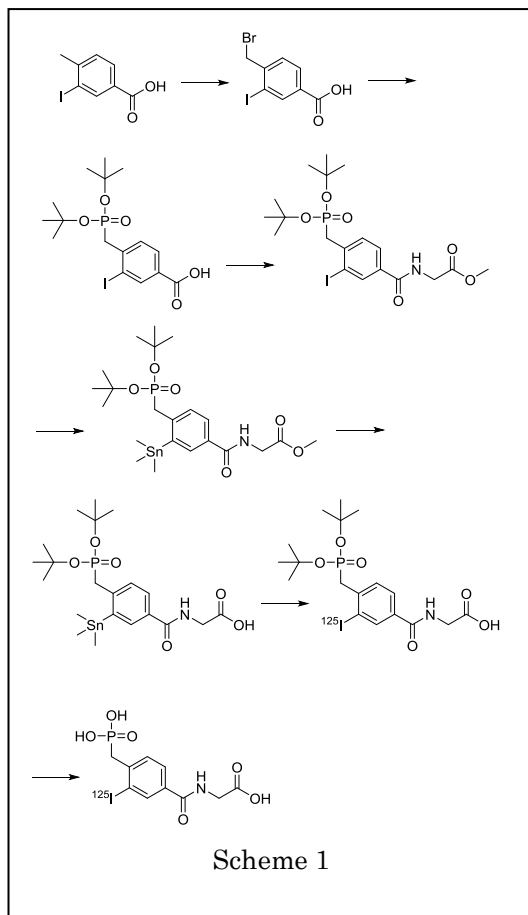
(4) 設計した酵素感受性標識試薬 ([<sup>125</sup>I]P-HML) が、申請者らが以前開発した標識試薬 ([<sup>125</sup>I]HML) と同様に腎集積を低減するか否かを評価するため、モデルペプチドとして抗体 Fab フラグメント選択し、これを新規標識試薬 ([<sup>125</sup>I]P-HML) で標識し、正常マウスにおける体内分布を検討し、以前開発した標識試薬 ([<sup>125</sup>I]HML) の場合と比べる。

## 4. 研究成果

(1) 高い尿排泄性に加えて、高いがん細胞内滞留性を具備する放射性化合物を設計し、それらの合成法を確立した (Scheme 1)。

(2) 高い尿排泄性に加えて、高いがん細胞内滞留性を具備する放射性化合物を遊離する酵素感受性標識試薬 ([<sup>125</sup>I]P-HML) を設計し、その前駆体の合成法を確立した (Scheme 2)。

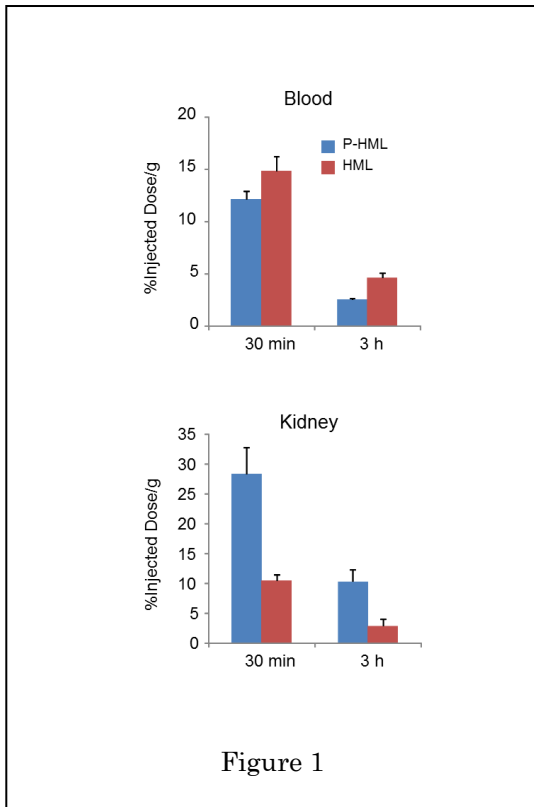
また、その標識合成法およびその標識試薬を用いた低分子量タンパク、ペプチドの標識法を確立した (Scheme 3)。



(3) Fmoc アミノ酸を用いる固相ペプチド合成により、ミニガストリンを合成した。

(4) Figure 1 には、新規標識試薬で標識した抗体 Fab フラグメント (P-HML-Fab) と申請者らが以前開発した標識試薬で標識した抗体 Fab フラグメント (HML-Fab) をマウスに投与後の血液および腎臓における放射能集積量を示す。期待に反し、HML-Fab と比べ、P-HML-Fab では腎集積が 3 倍程度高かった。しかし、一般に用いられている標識法によって作製した RI 標識 Fab フラグメントと比べれば、腎集積レベルは 1/2 程度であり、以前開発した HML ほどではないが、腎集積低減効果をもつことが判明した。

今後、腫瘍集積性が向上するか否かを確認する検討を行うと共に、より効率よく腎刷子縁膜酵素によって開裂される構造を見出す検討を進めることにより、本研究の最終目的である「がん細胞で内在化されて代謝されるペプチドやタンパクを母体とする放射性医薬品にも適用可能な、腎集積を低減する酵素感受性標識試薬の開発」を達成できる可能性があると考える。



## 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)

[学会発表] (計2件)

- ① 大島伸宏、秋澤宏行、趙 松吉、趙 莞、西嶋剣一、北村陽二、荒野 泰、久下裕司、大倉一枝、アスパラギン酸で負電荷を付与した  $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-オクトレオチド誘導体の受容体親和性および体内動態の評価、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日、札幌
- ② 大島伸宏、秋澤宏行、趙 松吉、趙 莞、藤岳夕歌、西嶋剣一、北村陽二、荒野 泰、久下裕司、大倉一枝、アスパラギン酸で負電荷を付与した  $^{111}\text{In}$ -DTPA-オクトレオチドの腎集積性および *in vitro* における腫瘍集積性の評価、日本薬学会北海道支部第 136 回例会、2011 年 5 月 22 日、札幌

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋澤 宏行 (AKIZAWA HIROMICHI)  
 北海道医療大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：90311795