

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591748

研究課題名(和文)放射性臭素を用いた抗腫瘍活性ペプチドの標識合成と治療的診断法への応用

研究課題名(英文) Synthesis of radiobromine-labeled antitumor peptides and application for
theranostic probes

研究代表者

山田 圭一 (YAMADA, Keiichi)

群馬大学・理工学府・准教授

研究者番号：70323334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、難治性乳癌であるトリプルネガティブ乳癌(TNBC)に対して効果がある八ロゲン化疎水性環状ペプチドSA-Brを母骨格にもつ放射性臭素標識化ペプチドの合成法を開発し、分子改変により治療と診断の機能を兼ね備えたSA-Br類縁体の開発について研究を行った。その結果、従来法よりも効率よく放射性臭素標識化ペプチドを得るための基礎的な知見を得ることができた。一方、薬物動態の改善を指向して水溶性を向上しつつ抗TNBC活性を維持したSA-Br類縁体の合成を試みたが実現できなかった。しかし、これらの類縁体の細胞毒性試験を通じてSA-Iが誘導する細胞死メカニズムに関する新しい知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Triple negative breast cancer (TNBC) refers to any breast cancer that does not express the genes for hormone receptor and HER2/neu receptor. Unfortunately, TNBC cannot be treated with either hormone therapy and anti-HER2 antibody. Therefore, new targeted therapies are therefore an urgent unmet medical need for TNBC patients. We recently found that halogenated cyclic pentapeptides based on natural cyclic peptide sansalvamide A, namely SA-Br and SA-I, exhibit potent cytotoxicity to MDA-MB-231, one of the TNBC cell line. In this study, we tried to develop a theranostics probe based on radiobromine-labeled SA-Br and analogues. Initially, we developed a new method for preparing radiobromine-labeled peptides via silicon-halogen exchange reaction. Next, a series of cyclic peptides analogous to SA-I were synthesized via on-resin cyclization using oxime resin. Unfortunately, cytotoxicity of these peptides against MDA-MB-231 was much weaker than that of the parent peptide.

研究分野：合成化学

キーワード：抗腫瘍活性ペプチド 放射性臭素 標識合成 治療的診断

1. 研究開始当初の背景

1)トリプルネガティブ乳癌(TNBC)は、乳癌における代表的な3つの増殖因子受容体(エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、ヒト上皮細胞成長因子受容体2(HER2))が関係しない予後不良の悪性腫瘍であり、乳癌全体の約15%を占める。ホルモン療法や抗HER2抗体による治療とは異なり、TNBCの治療は化学療法に限定されるため、有効な治療法の確立に向けた増殖因子の同定とそれに基づく分子標的薬の開発が急務である。

2)研究代表者らは、天然物を改変したハロゲン含有環状ペプチド SA-X (cyclo[Phe(4-X)-Leu-MeLeu-Val-Leu]), X=I, Br) が培養TNBC細胞(MDA-MB231)に対して高い増殖阻害活性と殺細胞活性を示し、そのうちSA-Iの活性がTNBC以外の乳癌細胞(MCF-7等)よりも約9倍高いことを報告した。さらに、SA-Iは、既存の分子標的薬とは作用点が異なる可能性が示唆された。

3)上記の結果を受けて、研究代表者らはSA-Xを親化合物として治療と核医学的診断の両方の機能を持つ放射性ハロゲン標識化環状ペプチドを合成し、抗TNBC薬の開発に結び付けるための基礎研究を開始した。

まず、治療と診断を一体化して医薬品開発を目指す基盤技術であるセラノスティクスの観点から薬剤設計を行うこととした。陽電子断層撮像法(PET)により *in vivo* 薬物動態の評価と治療効果判定を行うことを念頭に置き、殺細胞活性に必須なSA-X中のハロゲン原子を対応する陽電子放出核種(^{76}Br , ^{124}I)に置換した環状ペプチドの標識合成を検討した。予備検討の結果、スズ-ハロゲン交換反応を利用して基礎研究用核種 ^{125}I で標識化したSA- ^{125}I を低収率ながら合成することに成功した。

4) SA- ^{125}I の臓器移行性をMDA-MB-231細胞を移植したマウスを用いて調べた。その結果、SA- ^{125}I は投与後早期に肝臓へ集積し、その後胆汁酸経路で排泄されて腫瘍に殆ど移行しないことが分かった。これはSA-Iの高い脂溶性に起因するものと推測されたため、実際にPET撮像による治療効果判定を実施するためにはSA-Xの分子改変による薬物動態改善が必要であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、合成化学的手法によるSA-Brの分子改変とPETイメージングによる治療効果評価を組み合わせることでSA-Brの薬物動態の最適化を図り、TNBCの治療と核医学的診断の両方の機能を持つ放射性臭素標識化環状ペプチドを開発することである。これを達成するために、以下の3つの課題を設定した。ペプチドへの直接標識化に最適な前駆体ペプチドの開発 水溶性向上に寄与するアミ

ノ酸で置換した水溶性SA-Br改変体の合成と培養乳癌細胞に対する活性評価 活性を維持した水溶性SA-Br改変体の放射性臭素標識化と小動物PETイメージング

3. 研究の方法

(1)環状ペプチド合成

環状ペプチドの合成は、固相法により行った。使用する固相担体(オキシム樹脂)は、文献既知の方法で調製し、HBTUもしくはHATUを縮合剤としてBocアミノ酸の縮合を行った。伸長終了後、酸処理にてN末端のBoc保護基を除去後、(i-Pr) $_2$ NEtと酢酸を加えて樹脂からの切り出しと同時に環化反応を行い、粗ペプチドを得た。これを逆相HPLCにて精製して目的とする環状ペプチドSA-Iを得た。

2)細胞毒性評価

6 well-plateにヒト乳癌細胞(MDA-MB-231 or MDA-MB-157)を各wellに 1.0×10^5 cellsとなるように播種し、10%FBSを含むL-15培地で37°C(CO $_2$:0%)、48時間培養した。その後、培地を除去し、各ペプチドのDMSO溶液を上記培地で希釈した最終濃度10 μM となるように薬剤溶液を調製した。この薬剤溶液1 mLを各wellに添加し、37°C(CO $_2$:0%)で24時間培養した。その後、Trypan-Blueにて染色し、生細胞数及び死細胞数をカウントした。死細胞の割合は、[死細胞数/(生細胞数+死細胞数) $\times 100$ (%)]により求めた。

3)標識合成

^{77}Br (半減期57 h)は、日本原子力研究開発機構のAVFサイクロトロン(TIARA)で製造した。ターゲットにはCu $_2$ ^{nat}Se を用い、プロトンビーム(20 MeV, 5 μA)を1時間照射後、乾式蒸留による精製を経て ^{77}Br を単離した。

標識前駆体(100 μg)をEtOH 100 μL に溶解させ、この溶液に ^{77}Br 水溶液(10-50kBq)と次亜塩素酸tert-ブチル(1 μL)を加え、室温で1~15分間反応させた。ピロ亜硫酸ナトリウムを加えて反応停止後、TLC及び逆相HPLCにより生成物の分析を行った。

4. 研究成果

(1)ペプチドの直接スタニル化によるスズ前駆体環状ペプチドの合成

従来法によるSA- ^{125}I の標識合成では、固相法による保護鎖状ペプチドの合成及びスズ前駆体への変換 ^{125}I 標識化と両末端保護基の脱保護 標識ペプチドの液相環化の3ステップで合成していたが、脱保護と環化反応の収率が悪いことがネックであった。そこで、環状ペプチドSA-Iの直接スタニル化による標識前駆体の合成を試みた(図1)。Pd(0)触媒の存在下でビス(トリブチルすず)を作用させ、トルエン中で加熱還流後シリカゲルクロマトグラフィーによる精製を経て、標識前駆体SA-SnBu $_3$ を中程度の収率で得ることが

できた。

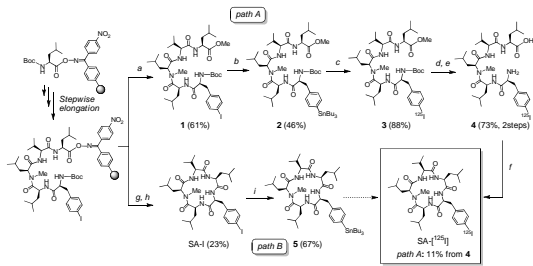


図1. 直接スタニル化による標識前駆体 SA-SnBu₃ の合成 (a)MeOH, DBU (2 eq.) in 95%THFaq., r.t., 2 h; (b)(Bu₃Sn)₂ (8 eq.), Pd(PPh₃)₄ (0.03 eq.), toluene, reflux, 4 h, (c) Na[¹²⁵I], chloramine T in 90% MeOHaq., r.t., 15 min; (d)0.5M NaOHaq. in MeOH, overnight; (e)25%TFA/CH₂Cl₂, r.t., 15 min; (f)PyBOP, DIEA in DMF, r.t., 2.5 h; (g)25%TFA/CH₂Cl₂, r.t., 30 min; (h)DIEA (3 eq.), AcOH (3 eq.) in DMF, 24 h.;(i)(Bu₃Sn)₂ (8 eq.), Pd(PPh₃)₄ (0.10 eq.), toluene, reflux, 4 h.

(2)SA-I の合成条件最適化

効率的な標識合成を達成するためにはスズ前駆体 SA-SnBu₃ の原料となる SA-I の合成収率の改善が必要であった。そこで、環化に最適な一次配列の検討を行った。まず、一次配列の異なる 4 種類の鎖状ペプチド樹脂 (図 2) を調製し、固相環化脱離反応を行った。一定時間おきに反応生成物をサンプリングし、逆相 HPLC で分析した。その結果 N 末端に Phe(4-I)を持つペプチド(Entry 1)が最も収率良く環状ペプチドを与えることが分かった。しかし、いずれの場合も SA-I と同じ分子量を持つ副生成物 (異性体ペプチド) を含まれていることが分かった。

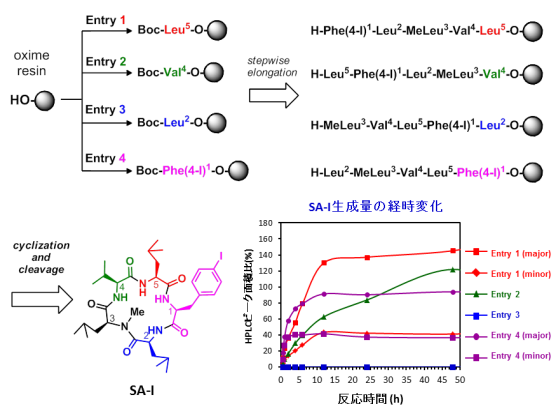


図2. 一次配列の異なる鎖状前駆体ペプチドの固相環化脱離反応と SA-I 生成量の経時変化

逆相 HPLC による精製を行い、副生成物除去に適した分離条件を確立することができた。分離した 2 つの環状ペプチドの MDA-MB-231 細胞に対する細胞毒性を調べ

た結果、逆相 HPLC で先に溶出するペプチド (SA-I major) が真の活性ペプチドであり、major 体の後に溶出する異性体ペプチド (minor 体) には活性が無いことが分かった。これらの結果を踏まえ、SA-X 中の疎水性アミノ酸残基 (Leu 及び Val) を対応する D-アミノ酸 (D-Leu, D-Val) で置換したアナログ体 (図 3) を合成し、構成アミノ酸が全て L-アミノ酸の SA-I の場合よりも収率が向上したことを確認したが、異性体ペプチドの副生を抑えることはできなかった

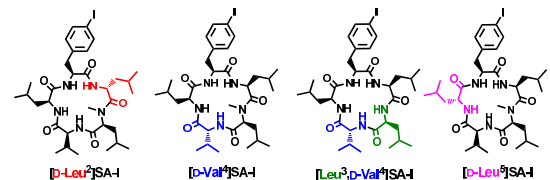


図3. D-アミノ酸置換 SA-I アナログの構造

(3)塩基性アミノ酸で置換した SA-I アナログの細胞毒性評価

親化合物である SA-I 中の疎水性アミノ酸残基 (Leu 及び Val) を塩基性アミノ酸 (Orn 及び Orn(Z)) で置換した環状ペプチドアナログ体を合成し、MDA-MB-231 細胞に対する細胞毒性を調べた。残念ながら合成した全てのアナログ体は親化合物と比較して細胞毒性が低下することが分かった (図 4)。

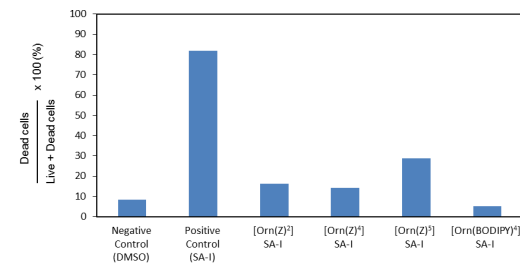


図4. 塩基性アミノ酸含有 SA-I の細胞毒性

(4)新規標識前駆体の開発に向けた基礎検討: 放射性臭素標識フェニルアラニン誘導体の標識合成

ケイ素-ハロゲン交換反応を利用したアミノ酸・ペプチドの新しい標識合成法を開発した (図 5)。まず、ケイ素置換新規フェニルアラニン誘導体 2 を合成し、次亜塩素酸 tert-ブチル (TBHC) を酸化剤として EtOH 中で ⁷⁷Br (1-50 kBq) で標識化を行い、標識化合物 2 を得た。標識反応は 15 分以内に完結し、標識率は 90% 以上であった。この反応の標識率是对応するトリブチルスタニル体よりも高く、スタニル化された標識前駆体ペプチドの合成時における弱点であった酸処理に対する安定性も向上することが分かった。

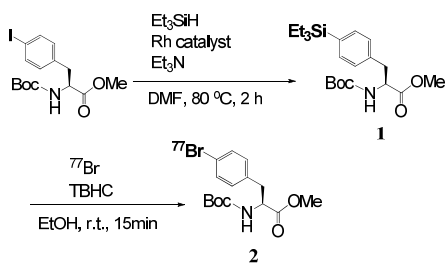


図5. ケイ素 ハロゲン交換反応を利用した ^{77}Br 標識化アミノ酸の標識合成

(5)総括

環状ペプチドへの直接スタンイル化により標識前駆体ペプチドを簡便に合成することができた。また、ケイ素 ハロゲン交換を利用した放射性臭素化が可能であることが分かった。一方、培養乳癌細胞に対して細胞毒性を示す水溶性 SA-Br 改変体は得られなかったが、これを実現するためにはさらなる検討が必要がある。

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)

〔雑誌論文〕(計 3件)

1)I. Sasaki, H. Hanaoka, K. Yamada, S. Watanabe, Y. Sugo, Y. Oshima, H. Suzuki, and N. S. Ishioka, Exploring of peptides with high affinity to HER2 from random peptide libraries using radioisotope: Random hexapeptides libraries with fixed amino acid sequence at 1 and 2 position, Peptide Science 2014, 257-260 (2015)

2)I. Sasaki, K. Yamada, S. Watanabe, H. Hanaoka, Y. Sugo, H. Oku, and N. S. Ishioka, Synthesis of radiohalogen-labeled peptides with high affinity to HER2/neu receptor, Peptide Science 2012, 157-160 (2013)

3)T. Murase, T. Yoshihara, K. Yamada, and S. Tobita, Fluorescent peptides labeled with environment-sensitive 7-aminocoumarines, Bull. Chem. Soc. Jpn., **86**, 510-519 (2013)

〔学会発表〕(計 8件)

1)渡邊早貴, 渡辺茂樹, 山田圭一, 奥浩之, 森口朋尚, 石岡典子, 篠塚和夫, シリル化フェニルアラニンの合成と放射性臭素による標識化, 日本化学会第95春季年会, 2015年3月26日~29日, 日本大学理工学部

2)K. Yamada, C. Takano, K. Matsumoto, H. Ueno, S. Watanabe, T. Moriguchi, H. Oku, S. Torii, and K. Shinozuka, Synthesis and biological evaluation of N-methylated cyclic pentapeptides against malignant breast cancer cell lines, 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation & 6th International

Conference on Advanced Micro-Devising Engineering, Gunma, Japan, December 5 (2014)

3)高野智香子, 山田圭一, 奥浩之, 鳥居征司, 細胞障害性環状ペプチドの合成及び構造活性相関研究, 日本化学会群馬地区地域懇談会, 2013年12月4日, 原子力機構高崎

4)松本貴太, 山田圭一, 奥浩之, 鳥居征司, トリプルネガティブ乳がんの分子標的探索を指向した分子プローブの合成研究, 日本化学会群馬地区地域懇談会 2013年12月4日, 原子力機構高崎

5)山田圭一, 渡辺茂樹, 花岡宏史, 須郷由美, 奥浩之, 石岡典子, HER2/neu に高い親和性を持つ放射性ハロゲン標識ペプチドの合成, 第8回高崎量子応用シンポジウム, 2013年10月10日~10月11日, 原子力機構高崎

6)永田祐介, 山田圭一, 渡辺茂樹, 大島康宏, 奥浩之, 石岡典子, 腫瘍の *in vivo* イメージングを指向した環状RGDペプチドの合成研究, 日本化学会群馬地区地域懇談会, 2012年12月8日, 群馬高専

7)佐々木一郎, 山田圭一, 渡辺茂樹, 花岡宏史, 須郷由美, 奥浩之, 石岡典子, HER2/neu 受容体に高い親和性を持つラジオハロゲン標識ペプチドの合成, 第49回ペプチド討論会, 2012年11月7日~9日, かごしま県民交流センター

8)Sh. Watanabe, I. Nishinaka, I. Sasaki, K. Yamada, Sa. Watanabe, Y. Sugo, H. Hanaoka, Y. Sugo, K. Hashimoto, and N. S. Ishioka, Synthesis of a biologically active peptide containing radiohalogenated pnylalanine by electrophilic destannylation reaction, 7th International Symposium on Radiohalogen, Whistler, Canada, September 15-19 (2012)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1件)

名称: ペプチド化合物及びペプチド化合物の製造方法

発明者: 山田圭一, 渡邊早貴, 渡辺茂樹, 森口朋尚, 奥浩之, 石岡典子, 篠塚和夫

権利者: 国立大学法人群馬大学, 独立行政法人日本原子力研究開発機構

種類:

番号: 特願 2015-47082 号

出願年月日: 平成 27 年 3 月 10 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://peptide-chem.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/yamada/yamada-index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 圭一 (YAMADA, Keiichi)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号：70323334

(2) 研究分担者

山口 藍子 (YAMAGUCHI, Aiko)
群馬大学・大学院医学系研究科・寄付講座
等教員
研究者番号：80609032

(3) 連携研究者

渡辺 茂樹 (WATANABE, Shigeki)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子
ビーム応用研究部門・研究員
研究者番号：10450305