

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591827

研究課題名(和文) インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  をターゲットにしたペプチドを用いた PET プローブの開発研究課題名(英文) Development of peptide-based PET probe targeting integrin  $\alpha 5 \beta 1$ 

研究代表者

金 朝暉 (Jin, Zhao-Hui)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：70324150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がんの診断や治療に関わる  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンをターゲットとした PR<sub>b</sub> ペプチドを用い、新たな  $\alpha 5 \beta 1$  PET イメージング剤の開発を目的として行った。NOTAを用いる新規な方法で PR<sub>b</sub> を  $^{18}\text{F}$  標識し、 $^{18}\text{F}$ -PR<sub>b</sub> というプローブの製造に成功した。インビトロ及びインビボの評価では、 $^{18}\text{F}$ -PR<sub>b</sub> は  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンに特異的に結合することが示された。さらに、 $^{18}\text{F}$ -PR<sub>b</sub> の PET 撮像によるマウスの  $\alpha 5 \beta 1$  陽性腫瘍の明瞭な描出に成功した。 $^{18}\text{F}$  標識 PR<sub>b</sub> は  $\alpha 5 \beta 1$  PET イメージング剤として有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to develop a novel PET imaging probe targeting the transmembrane glycoprotein receptor,  $\alpha 5 \beta 1$  integrin, by use of the fibronectin-mimetic peptide sequence KSSPHSRNSGSGSGSGRGRGDSP (called PR<sub>b</sub>). PR<sub>b</sub> was modified and conjugated with the chelating agent p-SCN-Bn-NOTA, and radiolabeled with  $^{18}\text{F}$  based on the chelation of  $^{18}\text{F}$ -aluminum fluoride.  $^{18}\text{F}$ -PR<sub>b</sub> was produced with a radiochemical purity of >95%; it exhibited  $\alpha 5 \beta 1$ -binding activity and specificity in cultured cells and in tumor-bearing mice, and had a rapid blood clearance and a predominant renal excretion pathway. In vivo  $\alpha 5 \beta 1$ -positive tumors could be clearly visualized by  $^{18}\text{F}$ -PR<sub>b</sub> PET imaging.  $^{18}\text{F}$ -PR<sub>b</sub> was developed as a promising PET imaging agent targeting the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin.

研究分野：医歯薬学

キーワード：alpha5beta1 integrin Fluorine-18 PET imaging Fibronectin Radioprobe

## 様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞接着分子の一つである 5 1 インテグリンは膜貫通性糖タンパク質で、がんの血管新生や浸潤または転移に関与している。新生血管の内皮細胞及び一部の腫瘍細胞では 5 1 が高発現し、がんの分子標的治療や腫瘍イメージングの重要なターゲット分子の一つであると認められている。

PR<sub>b</sub> ペプチド (アミノ酸配列 KSSPHSRN(SG)<sub>5</sub>RGDSP) はアメリカのミネソタ大学の Kokkoi 教授らによって開発されたフィブロネクチンミメティックである。PR<sub>b</sub> は RGD 配列と PHSRN 配列を導入することによって、5 1 インテグリンに特異的に結合すると報告された。PR<sub>b</sub> では RGD が main domain として、PHSRN が synergy domain として働く。

最近、フッ化アルミニウム錯体形成により PET イメージングに用いるペプチドやタンパク質のポジトロン放出核種 F18 による標識が簡単に行えることが報告された。

上記の先行研究の成果を踏まえ、新たな 5 1PET イメージング剤の開発には十分な可能性があると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、フィブロネクチンミメティックペプチドを用い、新たな 5 1PET イメージング剤の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) PET分子プローブの製造

まず、PR<sub>b</sub> をポジトロン放出核種 F18 (<sup>18</sup>F、半減期 110 分) で標識するため、PR<sub>b</sub>-NOTA 分子を構築した。PR<sub>b</sub>-NOTA の構築には、PR<sub>b</sub> ペプチドの配列 ((C16)(2-Glu-C2-KSSPHSRNSGSGSGSGSGRGRGDSP) の修飾とその部位へのキレート剤 NOTA (p-SCN-Bn-NOTA) の導入を行った。純度 95% 以上の分子が委託合成により提供された。一方、PR<sub>b</sub> の 5 1 結合モチーフである RGD 配列を RAD 配列に変えて、PR<sub>b</sub> のネガティブコントロールペプチド (PR<sub>b</sub> control) も合成した。次に、PR<sub>b</sub>-NOTA を Aluminium-<sup>18</sup>F 複合体の形成により放射能標識した。<sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> のマウス血清中安定性も検討した。

#### (2) <sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> のインビトロ (in vitro) での 5 1 インテグリンへの結合および特異性の評価:

5 1 インテグリン発現の高いマウスメラノーマ B16-F10 細胞と発現の見られなかったヒト結腸癌 SW48 細胞を用いて、<sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> の細胞への取り込み実験を行った。結合率は  $\beta$ -カウンターを用いて放射活性を測定し求めた。また、<sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> の 5 1 インテグリンへの特異性を証明するため、5 1 インテグリン高発現の B16-F10 細胞を用

いて、<sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> と非標識 PR<sub>b</sub> を用いる培養細胞への結合阻害実験も行って、競合的に阻害されるかどうかを検討した。

#### (3) <sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> の体内動態及び分布の検討:

1. 体内安定性の評価: 健常マウスに経尾静脈的に <sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> を投与し、経時的に血液を採取した。血漿を高速液体クロマトグラフィーにおいて各成分を分析し、<sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> の体内安定性を評価した。2. インビボ (in vivo) 移植腫瘍による検討: ヌードマウスに B16-F10 細胞或いは SW48 細胞を皮下移植し、腫瘍モデルを作製した。<sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> を担がんマウスに投与し、小動物用 PET 装置による PET イメージングを行った。また、撮像終了後、直ちに血液と主な臓器、腫瘍を採取し、 $\beta$ -カウンターにより放射活性を測定して、取り込み量を求めた。

#### (4) 移植腫瘍による in vitro での検討:

<sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> の腫瘍への集積の特異性を評価するため、腫瘍組織の凍結切片において、<sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> の組織結合実験及び結合阻害実験を行った。この際、オートラジオグラフィ (autoradiography) により組織への特異的な放射能集積を評価した。

### 4. 研究成果

(1) PR<sub>b</sub> プローブの合成及び <sup>18</sup>F 標識: PR<sub>b</sub> を <sup>18</sup>F 標識するためにキレート剤 NOTA を導入し、PR<sub>b</sub>-NOTA という分子を設計、合成した (図 1)。標識率 20% 以上、精製後放射化学的純度 95% 以上で <sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> を得ることに成功した (図 2)。一方、血清中で 30 分間 37°C インキュベート後も 85% 以上が未変化体として存在しており、<sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> の血漿中での安定性が確認された (図 3)。

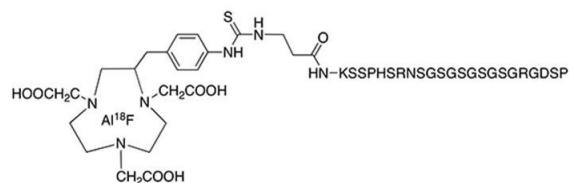


図 1: <sup>18</sup>F 標識 PR<sub>b</sub> の構造式

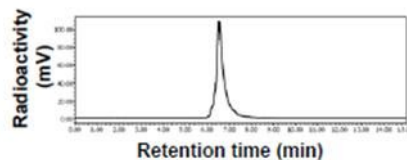


図 2: RP-HPLC による標識純度の分析

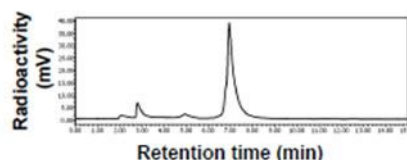


図 3: <sup>18</sup>F-PR<sub>b</sub> のマウス血漿中での安定性

(2) 培養細胞を用いた  $^{18}\text{F}$ -PR\_b の 5 1 イソトプリンへの結合および特異性の評価:

1. 細胞結合実験 (図 4)

5 1 発現の高い B16-F10 細胞において、 $^{18}\text{F}$  標識 PR\_b は細胞濃度の増加とともに、細胞への結合率が明らかに増加した。それは、5 1 発現の見られなかった SW48 細胞において、見られなかった。また、ネガティブコントロールプローブの B16-F10 細胞への集積は認められなかった。

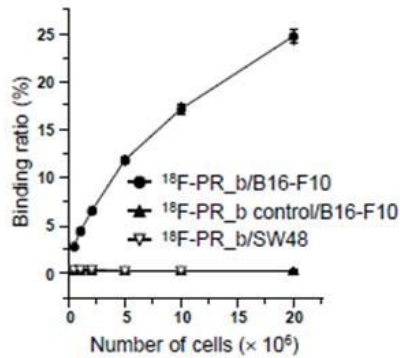


図 4:  $^{18}\text{F}$ -PR\_b の in vitro cell binding

2. 競合阻害実験 (図 5)

B16-F10 細胞においては、 $^{18}\text{F}$  標識 PR\_b の細胞への集積はあらかじめ未標識の NOTA-PR\_b または PR\_b のいずれかを添加をすることで濃度依存的に抑制された。

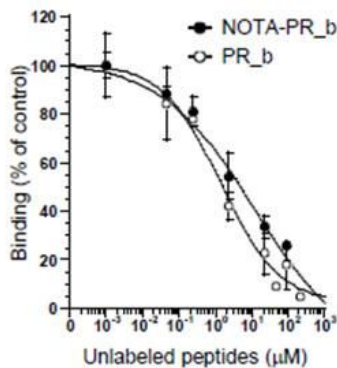


図 5:  $^{18}\text{F}$ -PR\_b の in vitro blocking assay

(3) PET イメージングと体内動態:  $^{18}\text{F}$  標識 PR\_b (~8 MBq) を 5 1 発現の高い B16-F10 腫瘍モデルマウスに静注し、投与直後から 30 分後まで 1 分/フレームの間隔でダイナミックスキャンを行った。得られた画像から、 $^{18}\text{F}$ -PR\_b の血液からの速やかな消失、腎臓以外の非標的臓器への非常に低い放射能集積が示された。一方、投与後 20 分から腫瘍が明瞭に描出された (図 6)。また、生体内において、 $^{18}\text{F}$ -PR\_b は比較的安定であることが示された。

また、PET イメージング直後に、マウスを sacrifice し、腫瘍および主な臓器の放射能集積を確認した。その結果を表 1 に示した。

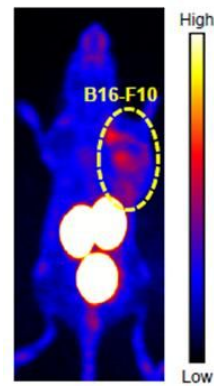


図 6: B16-F10 腫瘍マウスの  $^{18}\text{F}$ -PR\_b を投与後 25 分後から 30 分後までの 5 分間の PET 画像。

表 1.  $^{18}\text{F}$ -PR\_b の体内分布

Organ	Uptake (%ID/g)	Organ	Uptake (%ID/g)
Blood	1.82 ± 0.26	Pancreas	0.40 ± 0.05
Tumor	1.07 ± 0.14	Spleen	0.41 ± 0.02
Muscle	0.36 ± 0.03	Stomach	0.82 ± 0.34
Bone	0.72 ± 0.12	Small intestine	0.63 ± 0.04
Brain	0.05 ± 0.003	Large intestine	0.50 ± 0.06
Heart	0.61 ± 0.02	Kidney	73.4 ± 0.62
Lung	1.18 ± 0.08	Skin	1.43 ± 0.30
Liver	0.48 ± 0.04	n=10 for blood and tumor; n= 4 for other organs	

4) 腫瘍組織の in vitro の autoradiography による検討

5 1 発現陽性 B16-F10 腫瘍組織において、 $^{18}\text{F}$  標識 PR\_b はネガティブコントロールプローブより高集積を示した (図 7)。この集積は、未標識 PR\_b の添加によって抑制された。一方、5 1 発現陰性 SW48 腫瘍組織においては、 $^{18}\text{F}$  標識 PR\_b の腫瘍組織への集積を認めなかった。

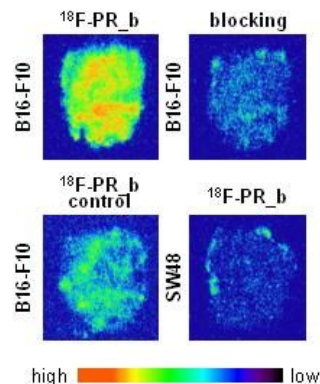


図 7:  $^{18}\text{F}$ -PR\_b の in vitro tissue binding

以上の検討結果より、本研究において、我々はフィブロネクチンミメティックペプチド

PR\_b のポジトロン放出核種である  $^{18}\text{F}$  標識方法を確立し、 $^5\text{Tb}$  PET イメージング剤の製造に成功した。 $^{18}\text{F}$  標識 PR\_b の *in vitro* 及び *in vivo* での集積は  $^5\text{Tb}$  インテグリンに特異的に結合することによると考えられた。本研究で得られた成果は今後の  $^5\text{Tb}$  インテグリンをターゲットにするプローブの開発の重要な基礎データになりうると考えられた。

#### 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)

[学会発表](計 1 件)

Zhao-Hui Jin, Takako Furukawa, Katsushi Kumata, Lin Xie, Joji Yui, Hidekatsu Wakizaka, Yasuhisa Fujibayashi, Ming-Rong Zhang, Tsuneo Saga: Development of  $^{18}\text{F}$ -labeled fibronectin-mimetic peptide for positron emission tomography imaging of  $^5\text{Tb}$  integrin expression, 2014 World Molecular Imaging Congress, Seoul, Korea, 2014 年 9 月 17 日 ~ 20 日, 口演発表

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

金 朝暉 (Jin Zhao-Hui)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号: 70324150

##### (2) 研究分担者

張 明栄 (Zhang Ming-Rong)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・プログラムリーダー

研究者番号: 80443076

##### (3) 連携研究者

古川 高子 (Furukawa Takako)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究者番号: 00221557