

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2017

課題番号：25710011

研究課題名(和文) 癌の質的診断とセラグノーシスを目的としたナノ粒子型PETプローブの精緻設計

研究課題名(英文) Sophisticate Design of Nano-Particular Type PET Probes for Qualitative Diagnosis and Theragnosis of Cancer

研究代表者

向井 英史 (Mukai, Hidefumi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：60570885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：創薬標的分子や病態関連分子の生体内での可視化は、診断や薬効評価に有用であり、その実現は、分子プローブの開発にかかっている。本研究では、標的への集積性・排泄特性などを制御したPETプローブの設計戦略を考案・作製し、腫瘍関連分子を標的としたPETイメージングコントラストの向上に成功した。特に、スイッチング型腎クリアランスを意図した戦略は、PETイメージングに加え、放射線内用療法における患者の不必要な放射線被曝の低減にも資するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In vivo visualization of drug targets and disease-related molecules is essential for diagnosis and drug efficacy evaluation. To realize that, molecular probe development is a key. We developed novel approaches for the improvement of PET imaging contrast such as urokinase injection-triggered PET probe clearance enhancement system. These results could shorten the time required to obtain sufficient contrast and decrease patient radiation exposure.

研究分野：ドラッグデリバリー、分子イメージング

キーワード：PETイメージング がん ナノ粒子 セラグノーシス 抗体 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

生きた個体内で生体分子の局在を可視化する分子イメージング技術は、癌の臨床診断を中心に医療現場への応用が進んでいる。MRIやCTなどで得られる形態画像と異なり、病態関連分子の分布など質的情報を含んだ画像を得ることができる。モダリティとしては、放射核種(RI)標識したプローブを用いるPETやSPECTが三次元方向の分解能が高く、定量性に優れている。装置の分解能や感度はかなり向上してきており、より多くの標的分子を対象とした多彩なイメージングの実現は、分子プローブの開発にかかっている。

これまでの分子プローブ開発では、プローブが細胞内に取り込まれ蓄積しやすい標的分子を対象にすることがほとんどであった。すなわち、トランスポーターやエンドサイトーシス機構を持つ受容体が主たる標的であった。こうした戦略は、確かに優れた集積性を持つ分子プローブの開発に有効だが、標的分子を著しく限定してしまう。分子イメージングの究極の目標は、細胞や組織切片で行われている免疫染色と同じ自由度で、望みの標的生体分子をも生きた個体内で可視化することである。特に、癌の様に複雑な病態の診断では、細胞内取り込み機構を持たない細胞表面タンパクや細胞外マトリックスにも重要な標的分子が存在する。こうした標的に適した分子プローブを効率的に開発する戦略が求められている。

そのためにはまず、親和性リガンドを効率的に取得することが必要だが、低分子化合物スクリーニングと比較し、アプタマーやペプチドリガンドをセレクションする進化工学的な手法であるSELEX法やファージディスプレイ法が、短期間に高確率で高い親和性を持つ分子を取得できる点で優れている。その上で、細胞外タンパクを標的とした分子プローブを開発する場合には、投与後標的タンパクに結合した分子プローブが常に血流によるウォッシュアウトを受けるため、取得したリガンドの親和性をより高める工夫が求められる。

2. 研究の目的

癌の質的診断に有用なPETプローブを、生体高分子やナノ粒子の特性を応用・融合する戦略に基づき開発し、そのセラグノーシスへの適用性についても探る。

3. 研究の方法

標的への集積性・排泄特性などを制御したPETプローブを設計し・作製し、PETイメージングなどによりその機能を評価した。

4. 研究成果

適度な血中循環の延長と多点認識を目標とした化学修飾による癌PETイメージング用ペプチドプローブの改良

多様な疾患関連分子に対するプローブ開発において、進化工学的手法などに基づくペプチドリガンドの取得は効率的な戦略の一つであるが、得られたプローブは体内動態や親和性に改善の必要がある場合が多い。我々は、化学修飾によるペプチドプローブの構造最適化に関する知見を得るため、ポリエチレングリコール(PEG)を介して高分子量化かつ多量体化した一連の誘導体を合成し、血中循環の延長と多点認識化が癌イメージングに与える影響について系統的に検討した。多様な分子構造を持つPEG(分子量:10kDa、40kDa 骨格:直鎖、4arm、8arm型)に、ガストリン放出ペプチド受容体(GRPR)親和性ボンベシナアナログのキレーター修飾誘導体を結合した。これらを⁶⁴Cuで標識し、GRPR発現株PC3細胞に対する細胞内取り込みを評価した。また、PC3担癌マウスにこれらプローブを尾静脈内投与し、PET実験及び摘出臓器の放射性測定を行った。併せて、スクランブル配列のペプチドを用いた対照実験を行い、各プローブの特異性について確認した。細胞内取り込み実験において、直鎖PEG修飾プローブはステルス効果の影響と思われる低い取り込みを示した。一方で、arm型PEG修飾プローブは取り込み量が約3倍上昇し、多量体化によるプローブと標的細胞との親和性向上が示唆された。また、各種PEG修飾プローブではマウス投与後の血中循環が延長し、腫瘍へのプローブの集積量が顕著に増加した。Tumor/muscle比を指標としてコントラストを評価すると、10kDaの4armPEG修飾プローブが最適であった。以上の知見は、適度な血中循環の延長及び多点認識を有する癌PETイメージング用ペプチドプローブの開発において有益と考えられる。

樹状型ポリエチレングリコール修飾によるボンベシナアナログ誘導体PETプローブの腫瘍内貯留性向上

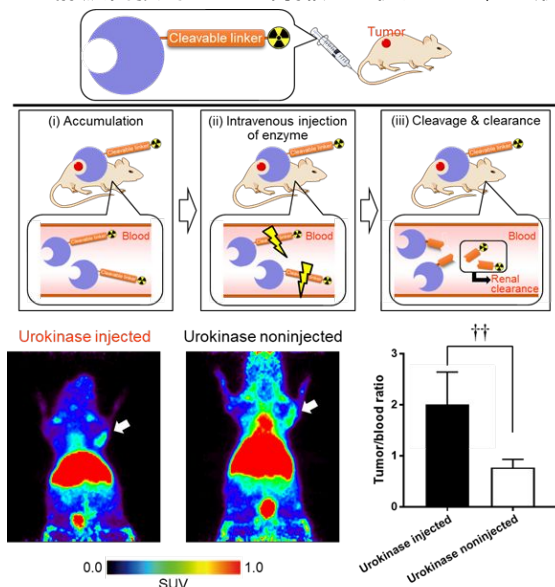
¹⁸F-FDGが細胞内取り込み後、ヘキソキナーゼによるリン酸化を受けて細胞質内に貯留される例のように、プローブの標的細胞内動態/代謝の制御は高コントラストイメージングの実現に重要な要素である。生体高分子プローブの多くはエンドサイトーシス機構により細胞内へ取り込まれるため、代謝分解などに伴う放射性核種の細胞外への漏出の抑制は、特に考慮されるべき課題の一つである。分子量や多量体効果に依存して高い標的腫瘍組織集積性を示す、樹状型ポリエチレングリコール(PEG)修飾⁶⁴Cu標識ボンベシナアナログにおいて高い腫瘍組織貯留性が示唆されたため、標的腫瘍細胞取り込み機構やその細胞内貯留性について評価した。

PET画像のTAC解析の結果、⁶⁴Cu-BBNでは腫瘍組織内のRI量は経時的に減少するが(24時間後のRI量は2時間後の約3割)対照的に⁶⁴Cu-4-armPEG-BBN投与群では2日間に渡って維持された。⁶⁴Cu-4-armPEG-BBN

の血中 RI 量は経時的に減少することから、この違いを高分子量 PEG 修飾による血中循環の延長のみから説明することは困難であった。そこで、培養系において PC3 細胞と ^{64}Cu -4-arm PEG-BBN の相互作用を検討したところ、 ^{64}Cu -BBN と同様にエンドサイトーシス機構により取り込まれることが明らかとなり、また、24 時間後には ^{64}Cu -BBN では取り込まれた RI 量の内約 50% が漏出したのに対し、 ^{64}Cu -4-arm PEG-BBN では 15% 程度であった。以上の結果から、樹状型 PEG 修飾によるエンドソーム内での ^{64}Cu 標識ボンベンシナナログの代謝安定化、あるいは高分子量化による細胞からの漏出抑制により、腫瘍内貯留性が向上しているものと考察される。

ウロキナーゼ静脈内投与による樹状 PEG 修飾 ^{64}Cu ボンベンシナナログテトラマーのスイッチング型腎クリアランスを意図した PET プローブ

一定期間安定に血中循環して腫瘍組織に選択的に集積した後、ある引き金で分解しクリアランスされる PET プローブとして、樹状 PEG 修飾 ^{64}Cu ボンベンシナナログテトラマーに既に臨床で用いられているウロキナーゼ(uPA)の酵素認識配列を導入したシステムを設計した。つまり、uPA 認識配列で架橋した PET プローブ(^{64}Cu]BBN-uPA)4-PEG を投与して腫瘍に集積させ、一定時間後に uPA を投与することでプローブを切断し尿中へ排泄することを設計コンセプトとしたものである。まず、この酵素認識配列はマウス血液中で 48 時間代謝安定でありながら、uPA 添加後 1 時間で完全に切断されることを確認した。実際に、(^{64}Cu]BBN-uPA)4-PEG を投与した PC3 担がんマウスの PET 試験から、続く uPA の静脈内投与により腎排泄が促進され、血液



図．酵素薬剤の投与により放射性核種のクリアランスを促進し、PET イメージングのコントラストを改善する戦略 (International Journal of Pharmaceutics, 545, 2018, 206-214 から許可を得て転載)

中の放射活性が速やかに低下することを示した。この際、腫瘍組織の放射活性は、期待通り uPA 投与 / 非投与に関わらず同じレベルで維持されており、uPA 投与群では非投与群と比較して T/B が有意に向上した。以上の結果から、uPA とその酵素認識配列を活用したスイッチング型のクリアランス促進により腫瘍集積性を低下させることなく画像コントラストの向上に成功した。

がん組織イメージングコントラストの改善を目的としたウロキナーゼ薬剤に対する基質ペプチドを有する免疫 PET プローブの開発

モノクロナール抗体をポジトロン放出核種で標識した免疫 PET プローブは、低分子トレーサーに比べて高い標的分子特異性を発揮するため、がん疾患を含む疾患画像診断への応用が期待されている。しかしながら、全長抗体の血中半減期が長いことがバックグラウンドレベルの上昇に繋がり、十分なコントラストの組織画像を得るためには長い時間を要することが問題となる。本研究では、がん組織イメージングのコントラストの改善を目的に、ウロキナーゼ薬剤 (u-PA) の静脈内投与により標識核種のクリアランスを改善できる免疫 PET プローブの有用性を評価した。

u-PA に対する基質ペプチドを介して、抗 HER2 抗体トラスツズマブにキレーターを結合させた。 ^{64}Cu 標識を施すことで、u-PA 基質ペプチドをリンカーとして有する免疫 PET プローブを作製した。作製したプローブは、リンカーである基質ペプチドが u-PA により切断されることを確認した。免疫 PET プローブは、u-PA 濃度依存的にリンカーの切断効率が向上し、最適条件下で約 90% が切断された。PET イメージングでは、u-PA 投与毎に血中及び肝臓中の放射活性が低下し、それ伴って膀胱への集積が増大した。腫瘍組織では、u-PA 投与前後で放射活性の顕著な変化は認められず、バックグラウンドレベルの低下に伴って腫瘍組織のコントラストが大きく改善した。摘出した腫瘍 / 血液の放射活性比は、生理食塩水投与群に比べて約 3 倍向上したことから、投与された u-PA により免疫抗体から切断された標識核種のクリアランスが促進したと推察した。以上、本研究では u-PA 基質ペプチドをリンカーとして有する免疫 PET プローブの開発に成功し、同プローブががん組織イメージングコントラストの改善に有用であることを見出した。

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 1 件)

Kazushi Matsumura, Maki Zouda, Yasuhiro Wada, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida,

Yasuyoshi Watanabe, Hidefumi Mukai,
Urokinase injection-triggered clearance
enhancement of a 4-arm PEG-conjugated
⁶⁴Cu-bombesin analog tetramer: A novel
approach for the improvement of PET imaging
contrast. International Journal of Pharmaceutics,
査読有、545, 2018, 206-214
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.05.014

[学会発表](計20件)

毛利浩太、仁欽、藁科翔太、林中恵美、和田康弘、渡辺恭良、向井英史、がん組織イメージングコントラストの改善を目的としたウロキナーゼ薬剤に対する基質ペプチドを有する免疫 PET プロープの有用性評価、日本分子イメージング学会第13回総会・学術集会、東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区)、2018年5月31日~6月1日

仁欽、毛利浩太、藁科翔太、林中恵美、和田康弘、渡辺恭良、向井英史、ウロキナーゼ静脈内投与により腎クリアランスが促進されコントラストが向上する免疫 PET プロープの開発、日本薬学会第138年会、TKP 金沢カンファレンスセンター(石川県金沢市)、2018年3月28日

向井英史、PET 分子イメージングを活用した創薬・医療と DDS 研究、金沢大学がん進展制御研究所/金沢大学新学術創成研究機構 異分野融合セミナー、金沢大学がん進展制御研究所(石川県金沢市)、2018年3月26日

向井英史、イメージング活用創薬とバクテリアを使ったがん治療、第10回関西バイオ創薬研究会、グランフロントタワーB(大阪府大阪市)、2017年12月22日

Hidefumi Mukai, Advanced drug delivery systems for medical innovation, The 4th RIKEN / Karolinska Institutet / SciLifeLab Joint Symposium, 神戸大学 先端融合研究環 統合研究拠点 コンベンションホール(兵庫県神戸市)、2017年11月17日

向井英史、生体高分子・微粒子・細胞の PET イメージング、分子イメージングサマースクール2017、融合連携イノベーション推進棟(兵庫県神戸市)、2017年8月4日

藁科翔太、造田真希、和田康弘、渡辺恭良、向井英史、PET イメージングによる ⁶⁴Cu 標識エクソソームの動態評価、第33回日本 DDS 学会学術集会、京都市勤業館 みやこめっせ(京都府京都市)、2017年7月7日

向井英史、渡辺恭良、創薬・DDS 評価における PET イメージングの活用、日本薬剤学会第32年会、大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)、2017年5月12日

藁科翔太、造田真希、仁欽、渡辺恭良、向井英史、PET による体内動態解析を指向したエクソソーム表面への ⁶⁴Cu 標識、日本薬学会 第137年会、仙台国際センター(宮城県仙台市)、2017年3月27日

向井英史、松村一史、造田真希、林中恵美、山下富義、橋田充、和田康弘、渡辺恭良、ウロキナーゼ静脈内投与による樹状 PEG 修飾 ⁶⁴Cu ボンベシンアナログテトラマーのスイッチング型腎クリアランスを意図した PET プロープ、日本分子イメージング学会 第11回総会・学術集会、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)、2016年5月28日~29日

向井英史、渡辺恭良、核酸創薬におけるポジトロンエミッショントモグラフィーの活用、日本薬学会 第136年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2016年3月29日

向井英史、渡辺恭良、PET を中心とした分子イメージングによる個体レベルでの病態解明と診断・創薬への展開、日本分析化学会第64年会、九州大学伊都キャンパス(福岡県福岡市)、2015年9月9日

松村一史、向井英史、造田真希、高橋麻衣子、林中恵美、山下富義、橋田充、和田康弘、渡辺恭良、生理的条件下代謝開裂部位導入による ⁶⁴Cu 標識ボンベシンアナログテトラマーを用いた癌 PET イメージングの画像コントラスト改善、第31回日本 DDS 学会学術集会、京王プラザホテル(東京都新宿区)、2015年7月2日

Kazushi Matsumura, Hidefumi Mukai, Maki Zouda, Maiko Takahashi, Emi Hayashinaka, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Yasuhiro Wada, Yasuyoshi Watanabe, Structure/biodistribution relationship of multi-arm PEGylated ⁶⁴Cu-bombesin analogs as tumor imaging PET probes, World Molecular Imaging Congress 2014, 韓国ソウル、2014年9月17日~20日

松村一史、向井英史、造田真希、高橋麻衣子、林中恵美、山下富義、橋田充、和田康弘、渡辺恭良、化学修飾による ⁶⁴Cu 標識ペプチド PET プロープの高機能化、第54回夏の学校 - 生化学若い研究者の会、白浜荘(滋賀県高島市)、2014年8月28日~31日

向井英史、松村一史、造田真希、高橋麻衣子、林中恵美、山下富義、橋田充、和田康弘、渡辺恭良、樹状型ポリエチレングリコール修飾によるボンベシンアナログ誘導体 PET プロープの腫瘍内貯留性向上、日本分子イメージング学会第9回総会・学術集会、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)、2014年5月22日~23日

松村一史、向井英史、造田真希、高橋麻衣子、林中恵美、山下富義、橋田充、和田康弘、渡辺恭良、⁶⁴Cu 標識前立腺癌標的ペプチド DUP-1 の化学修飾がもたらす代謝安定性と腫瘍集積性の向上、日本分子イメージング学会第9回総会・学術集会、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)、2014年5月22日~23日

松村一史、向井英史、造田真希、高橋麻衣子、林中恵美、川上茂、山下富義、橋田充、和田康弘、渡辺恭良、適度な血中循環と多点認識を目指した化学修飾による癌 PET イ

イメージング用ペプチドプローブの改良、日本薬学会 第 134 年会、熊本大学黒髪キャンパス（熊本県熊本市）、2014 年 3 月 28 日
向井英史、渡辺恭良、核酸医薬と分子イメージング、第 5 回探索臨床試験研究会、京都市、2014 年 2 月 20 日
向井英史、渡辺恭良、核酸医薬・DDS 開発における PET イメージング、第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都テルサ（京都府京都市）、2013 年 7 月 4 日～5 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向井 英史 (MUKAI, Hidefumi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：60570885