

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461785

研究課題名(和文) 新規薬剤設計に基づく高感度アポトーシスイメージング剤の開発

研究課題名(英文) Development of highly-sensitive apoptosis imaging agent based on new drug design

研究代表者

花岡 宏史 (Hanaoka, Hirofumi)

群馬大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：50361390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗がん剤や放射線治療後の早期の治療効果判定を可能とするために、治療後に起こるアポトーシスを高感度に検出可能な新規イメージング剤の開発を目指して研究を行った。アポトーシスに伴い細胞表面に現れるホスファチジルセリンに親和性を有する低分子ペプチド「LIKKPF」を母体化合物とし、安定性を考慮してアミノ酸をD体に置換したfpkkil-NH2を設計・合成した。fpkkil-NH2はホスファチジルセリンに対する親和性を保持しており、また生体内の安定性も高かった。以上より、fpkkil-NH2を母体とする放射性薬剤はアポトーシスイメージング薬剤として有用である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop highly-sensitive apoptosis imaging agent for early prediction of anti-cancer therapy. One of the early biochemical changes of apoptotic cells is exposure of phosphatidylserine (PS) on the external surface of the plasma membrane. The LIKKPF, with high affinity for PS, was selected as a mother compound, then D-amino acid peptide fpkkil-NH2 was designed and prepared considering stability. The fpkkil-NH2 maintained affinity to PS and was stable in vivo. Thus, radiolabeled fpkkil-NH2 derivatives will be useful as apoptosis imaging agents.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：放射性医薬品 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤や放射線治療により誘導されるアポトーシスは、治療効果判定の指標として注目されており、高感度にアポトーシスをイメージングすることができれば、がん治療における早期治療効果判定が可能になると考えられる。アポトーシスに伴い細胞表面に現れるホスファチジルセリンに対して親和性を有するタンパク質「アネキシンV」は、インビトロにおいて優れたアポトーシス検出能を示すことからイメージング剤への応用が期待されたが、放射性核種 (RI) 標識アネキシンVを生体内に投与した場合、がん組織への絶対的な移行量が少なく、腎臓への非特異的な集積が非常に高いことから、アポトーシスを高感度に検出することは困難であった。そこで国内外において、アポトーシスの高感度検出を目指して、アネキシンVを修飾することによる体内動態の改善、アネキシンV以外のホスファチジルセリンを標的とするイメージング剤 (タンパク質やペプチド) の開発、ホスファチジルセリン以外のアポトーシス関連分子を標的としたイメージング剤の開発等が行われているが、腫瘍移行性が不十分または非標的臓器への集積が高いといった原因で、アポトーシスを高感度に検出可能なイメージング剤の開発には至っていない。

一方、申請者らはこれまでペプチドを母体とするイメージング剤の開発研究に従事しており、RI標識ペプチドイメージング剤が、化学修飾を加えることで体内動態を制御できることを示してきた (Nucl Med Biol 34, 503-10, 2007)。また、標的分子認識素子であるペプチドを複数有するイメージング剤は、多価効果により標的分子に対する親和性が向上することを明らかにしており (JP 2009-132691)、この多価効果の概念は様々なペプチド放射性薬剤開発に応用が可能であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、「抗がん剤や放射線治療後の早期の治療効果判定を可能とする、高感度アポトーシスイメージング剤の開発」である。アポトーシスに伴い細胞表面に現れるホスファチジルセリンに親和性を有する低分子ペプチドを標的分子認識素子として選択し、放射性核種としては汎用性に優れたテクネチウム-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) を用いる。本研究では新たな薬剤設計として、①標的分子認識素子であるペプチドを複数個有することで、多価効果により親和性を向上、② $^{99m}\text{Tc}$  錯体とペプチドとの間に化学修飾 (リンカー) を挿入することで体内動態を制御、という2つの戦略を用いることで、既存のタンパク質を母体とする薬剤よりもアポトーシスを高感度に検出可能な新規イメージング剤の開発を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

## (1) ペプチド合成

ホスファチジルセリン (PS) に高い親和性を有するペプチドとして報告されている6残基のペプチド Leu-Ile-Lys-Lys-Pro-Phe-OH (LIKKPF) を選択した。また LIKKPF は生体内で不安定であることが報告されていることから、生体内で安定な LIKKPF 誘導体を設計することとした。全てのアミノ酸をD体アミノ酸へと置換し、N末からC末へのアミノ酸配列を逆にしたペプチド (retro-inverso-peptide) は、元々のL体アミノ酸からなるペプチドの標的分子に対する親和性を、比較的保つことが報告されている。そこで本研究においても全てのアミノ酸をD体とし、N末とC末の配列を逆にした D-Phe-D-Pro-D-Lys-D-Lys-D-Ile-D-Leu-OH (fpkkil-OH) および、その後の誘導体の作製を容易にするためにさらにペプチドのC末端をアミド化した fpkkil-NH<sub>2</sub> を設計した。また放射性ヨウ素標識をするためにN末にD-Tyrを導入したペプチドも作製した。これらのペプチドはFmoc固相合成法を用いて合成を行った。

## (2) PS 結合プレートを用いた結合実験法の確立

PSに対する各ペプチドの親和性は、PS結合プレートを用いた結合実験により評価することとした。リン脂質であるPSをプレートに結合させたプレートを用いる実験は一般的ではないため、論文を参考に様々な条件下でPS結合96wellプレートを作製し、PSに対する高い結合性が知られているアネキシンVの放射性ヨウ素-125 ( $^{125}\text{I}$ ) 標識体の結合性を指標として、適切なPS結合プレート作製法を検討した。

## (3) PS 結合プレートを用いた結合実験

各ペプチドのPSに対する結合親和性は、アネキシンVのPS結合に対する阻害活性として評価した。作製したPS結合プレートに対して1%DMSO入り結合バッファーに溶かした各濃度のペプチドを加え37°Cで30分間インキュベートし、その後 $^{125}\text{I}$ 標識アネキシンVを加え60分インキュベートした後に、溶液を取り除きPBSで洗浄を行った。プレートを1wellごと切り離し、放射活性を測定し、ペプチドを加えていない時に結合した放射活性を100%として阻害活性を算出した。

## (4) ペプチドの安定性実験

D-Tyr-fpkkil-NH<sub>2</sub> を $^{125}\text{I}$ 標識し、マウスから採血により調整した血漿と1時間37°Cでインキュベートした。アセトニトリルでタンパク質を沈降させて除去した後、逆相HPLCにて分析を行った。

(5)  $^{99m}\text{Tc}$  標識多価ペプチド作製法の検討

$^{99m}\text{Tc}$  と多価錯体を形成するイソニトリルを配位部位として選択した。イソニトリルとのリンカーとして3ユニットのエチレンジグリコ

ール鎖または $\gamma$ -アミノ酪酸+グリシン 2 つを導入したりガンドを設計し、合成を試みた。

一方、Lys を含む LIKKPF ペプチドでは Lys 側鎖のアミンを保護して N 末のみに配位部位が結合したりガンドを作る必要があり、合成が煩雑である。そこで  $^{99m}\text{Tc}$  標識錯体の作製条件を検討するためのモデル化合物として、ベンジルイソニトリルを用いた。またモデルペプチドとしては配位部位との結合部位を一つしか持たない RGD ペプチドを選択し、同様に  $^{99m}\text{Tc}$  標識錯体の作製条件を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PS 結合プレートを用いた結合実験法の確立

PS は加温してエタノールに溶解しプレートに入れた後、50°C に保ったままエタノールを蒸発させることで、比較的高濃度のアネキシン V の結合量が安定した PS 結合プレートを得ることができた。また加える PS の濃度としては 100、200、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で検討を行ったが、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では PS の結合量が多いため、アネキシン V に対する相対量が多くなり、阻害実験に多くのペプチドを必要とすること、また一方で 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では、PS の結合量が少なく、アネキシン V の結合量が十分でないことから、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度でプレートを作製することとした。

##### (2) PS 結合プレートを用いた結合実験

アネキシン V の PS 結合プレートに対する阻害曲線を下図 1 に示す。

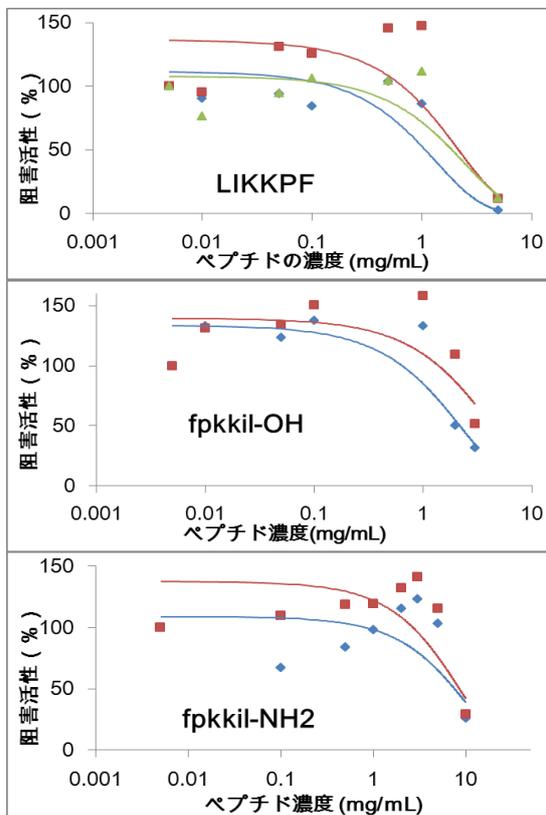


図 1. 各ペプチドの阻害活性。それぞれのペプチドで複数回実施した（異なる色で表示）。

アネキシン V の結合親和性が非常に高いため、結合阻害するために比較的高濃度のペプチドが必要ではあったが、どのペプチドも濃度依存的な阻害活性を示した。fpkkil-OH に関しては LIKKPF とほぼ同等の阻害活性を示し、fpkkil-NH<sub>2</sub> では LIKKPF よりもやや弱い阻害活性であった。LIKKPF に関しては PS に対する高い親和性がすでに報告されており、両 D アミノ酸ペプチドは、ほぼ同等の阻害活性を示していることから、これらのペプチドは PS に対する十分な親和性を有していると考えられる。

##### (3) ペプチドの安定性実験

マウス血漿中で 1 時間インキュベートしたところ、 $^{125}\text{I}$  標識 D-Tyr-fpkkil-NH<sub>2</sub> はほとんどが未変化体として存在していた（図 2）。このことから、fpkkil-NH<sub>2</sub> は生体内で一定時間安定であると予想される。

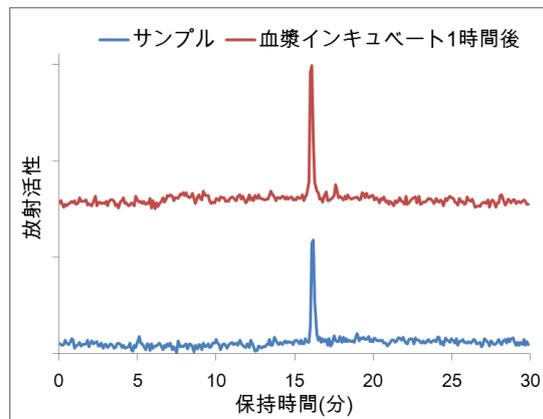


図 2.  $^{125}\text{I}$ -D-Tyr-fpkkil-NH<sub>2</sub> の HPLC 分析。

##### (4) $^{99m}\text{Tc}$ 標識多価ペプチド作製法の検討

当初の懸念通り、LIKKPF を含むペプチドのイソニトリル体を作製するのは大変であった。ペプチドの脱保護に通常用いられているトリフルオロ酢酸では脱保護されない Dde 基で Lys 側鎖を保護した状態で、リンカーが結合したイソニトリルと反応させ、その後 Dde の脱保護を行うことで目的とするリガンドの作製を試みた。リガンドを作製することには成功したが、溶解性が悪くまた十分な量が得られなかったため、 $^{99m}\text{Tc}$  標識実験の最適化実験を行うことは困難であった。そこで  $^{99m}\text{Tc}$  標識錯体の作製条件を検討するためのモデル化合物として、ベンジルイソニトリルを用いることとした。当初は従来我々が設計・合成してきた 3 価の  $^{99m}\text{Tc}$  錯体 [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})_3$ ]<sup>+</sup> (L はリガンドを示し、3 個のリガンドと 3 個の一酸化炭素が配位している  $^{99m}\text{Tc}$  錯体である) の作製を試みた。標識条件を検討することにより、3 価の錯体を得ることができたが、この 3 価の  $^{99m}\text{Tc}$  錯体作製は、反応時間が 1.5 時間かかり、 $^{99m}\text{Tc}$  の半減期が 6 時間と比較的短いことや、長時間の操作による被ばくの危険性を考慮すると、より簡便な合成反応が望まれた。そこで新規薬剤設計として、心筋の血流測定薬剤として臨床応用されている

る  $[^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6]^+$  の錯体構造に着目した。 $[^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6]^+$  は単座配位子であるイソニトリアルが  $^{99m}\text{Tc}$  に 6 分子結合した錯体であり、配位子、還元剤を含む凍結乾燥キットに  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  溶液を加え、10 分間加熱するのみの 1 ステップの反応により、簡便に作製可能である。そこで 6 価錯体の作製方法を検討した。その結果、芳香族イソニトリアルを用いることで 6 価錯体を容易に作製可能であることが明らかとなった。そこで芳香族イソニトリアルからリンカーを伸ばし、モデルペプチドである RGD ペプチドと結合したリンカーを設計・合成した。このリガンドを用いて  $^{99m}\text{Tc}$  標識反応条件を検討したところ、最終的に 1 ステップ 5 分間の反応により、最終のリガンド濃度  $100 \mu\text{M}$  において放射化学的収率 90%以上で目的の  $^{99m}\text{Tc}$  標識 6 価錯体が得られた。このことから芳香族イソニトリアルを LIKKPF 誘導体に結合することで、6 価の  $^{99m}\text{Tc}$  標識アポトーシスイメージングペプチドが作製可能であると考えられる。

#### (5) まとめ

以上の結果から、生体内での安定性が高く、ホスファチジルセリンに対する親和性を有している「fpkkil-NH<sub>2</sub>」を母体とする放射性薬剤はアポトーシスイメージング薬剤として有用である可能性が示された。また新たな  $^{99m}\text{Tc}$  標識 6 価ペプチドの作製方法を確立することができた。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 水野雄貴、小松風穂、上原知也、荒野 泰 : イソニトリアル1価配位子を用いた  $^{99m}\text{Tc}$ -6 価錯体の高収率合成法. 第56回日本核医学会学術総会, 2016. 11. 3-5, 名古屋国際会議場 (名古屋) .
- ② 小松風穂、水野雄貴、花岡宏史、上原知也、荒野 泰 : イソニトリアルを単座配位子とする  $^{185/187}\text{Re}$ および $^{99m}\text{Tc}$ -6 価錯体作製法の検討. 日本薬学会第136年会, 2016. 3. 26-29, パシフィコ横浜 (横浜) .

[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

花岡 宏史 (HANAOKA, Hirofumi)  
群馬大学・大学院医学系研究科・特任准教授  
研究者番号 : 50361390

##### (2) 研究分担者

上原 知也 (UEHARA, Tomoya)  
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号 : 10323403

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし