

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461872

研究課題名(和文) 線内用放射線治療への応用を目指した At-211 標識生理活性ペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of At-211 labeled peptides for the targeted alpha therapy

研究代表者

渡辺 茂樹 (Watanabe, Shigeki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・主幹研究員(定常)

研究者番号：10450305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：放射性同位元素を体内に投与する内用放射線治療では、従来から用いられてきた線より少ない投与量で、より大きなダメージを細胞に与えることができる線の利用が期待されている。本研究では、線を放出するRIであるアスタチン-211(At-211)を用いた内用放射線治療の実現を目指して、新たな At-211 の分離法を開発するとともに、乳がんなどのがん細胞に多く発現する HER2 に親和性を持つことが期待される At-211 標識生理活性ペプチドを新たに合成した。

研究成果の概要(英文)：The use of alpha emitting radionuclides has been promising for development of targeted radionuclide therapy (TRT) because alpha particles give heavier damage to the cell by smaller dose than beta particles which has been employed for the TRT. In this study, we have successfully developed a novel isolation method of alpha emitting astatine-211 from an irradiated Bi target, and At-211 labeled peptides which have high affinity to HER2 overexpressing in some cancer cells such as breast cancer.

研究分野：放射化学

キーワード：At-211 内用放射線治療 アルファ線 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

内用放射線治療とは、放射性同位元素(RI)を体内に投与してがんを送達し、RIが放出する放射線を利用してがんを破壊する治療法である。これまでの内用放射線治療では、ヨウ素-131(¹³¹I)などのβ線を放出するRIが主に用いられてきた。しかし、β線を用いた場合、一定の治療効果が見られるものの、対象となる疾患は限られていた。それに対しα線は、β線に比べて線エネルギー付与(LET)が高く生物効果が大きいことから、少ない投与量で高い治療効果が得られるとともに、β線では効果が小さい固形がんに対しても応用できると考えられる。加えて、飛程が短いことから正常組織への被曝の軽減も可能となるなどの理由から内用放射線治療におけるα線の利用が期待されている。

アスタチン-211(²¹¹At)は、核医学で広く用いられる放射性ヨウ素と類似の化学的性質を持つことから同様の分子設計・標識方法が可能である点、また、加速器を使用して比較的安価で製造できる点などの特徴を持つことから、内用放射線治療での応用が期待されているα線放出RIである。²¹¹Atの内用放射線治療を実現には、生物効果が大きいα線を放出する性質と比較的短い半減期(7.2時間)を考慮すると、生体内での安定性を確保して正常組織への集積を最低限に抑え、尚且つ、がんへの選択性と速やかな送達能を有する標識薬剤の開発が不可欠である。先行研究では、抗体を²¹¹Atの運搬体とし、安息香酸誘導体を標識部位とする²¹¹At標識抗体が主に開発されており、悪性脳腫瘍をはじめとする様々ながんに対して治療効果を示すことが示されてきた。その一方で、生体内において²¹¹Atが薬剤から遊離して甲状腺、肺、脾臓などの正常組織に高く集積するという大きな問題を抱えていた。

2. 研究の目的

内用放射線治療において²¹¹Atの治療効果を最大限に発揮するためには、組織移行性や血液クリアランスが遅い抗体を運搬体として用いるよりも、抗体と同様にがん選択的な集積を示しつつ組織移行性や血液クリアランスが抗体に比べて早い生理活性ペプチドを²¹¹Atの運搬体として利用可能にすることが重要であると考えた。また高い生体内安定性を実現するために芳香族側鎖を持つアミノ酸であるフェニルアラニンに²¹¹Atを標識することが有用であると考え、これらの特徴を併せ持つ²¹¹At標識生理ペプチドの開発を行った。

3. 研究の方法

研究は、量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所のAVFサイクロトロン及びRI製造施設を用いて実施した。²¹¹Atは、AVFサイクロトロンを用いて加速した⁴He²⁺ビーム(3μA)を入射エネルギー約28MeVでBi板(10mm x 10mm x 0.25mm厚)に照射することで生成した。その後、²¹¹At製造の自動化を念頭に、湿式法によるBiターゲットからの²¹¹Atの分離を検討した。具体的には、照射したBiを濃硝酸で溶解した後、水で希釈することで²¹¹Atを含む硝酸溶液を調製し、カラムへの添加液とした。次に、添加液1mLを陰イオン交換固相抽出カラムに吸着させ、²¹¹Atの吸着率を評価した。その後、カラムを2M塩酸で洗浄してBiを除去した後、種々の濃度の水酸化ナトリウム水溶液を用いて²¹¹Atを溶離した。添加液および溶離液内の放射能カウントをオートウェル型線カウンターを用いて測定し、その値から回収率を算出した。

²¹¹Atを標識する生理活性ペプチドとして、乳がんや大腸がん細胞などに多く発現するヒト上皮成長因子受容体タンパク(HER2)に高い親和性を持つ配列(Lys-Cys-Cys-Tyr-Ser-Leu, KCCYSL)のN末端側に²¹¹At標識フェニルアラニンを導入した

2種類のパペチド (F(p-²¹¹At)KCCYSL, F(p-²¹¹At)GSGKCCYSL) を用いることとした (図 1) 。 ²¹¹At の標識は、放射性ハロゲンを室温で短時間のうちに高効率で標識できるスズ ハロゲン交換反応を用いることとした。

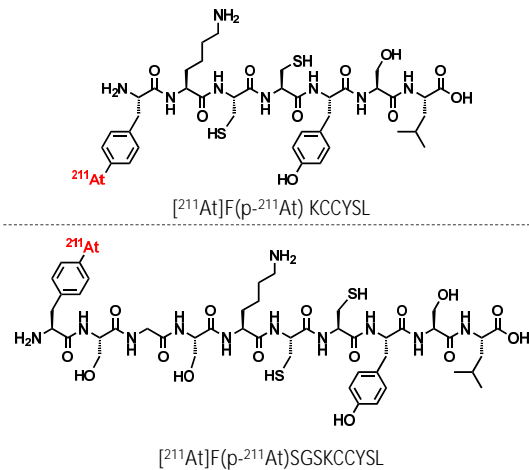


図 1 [²¹¹At]²¹¹At標識生理活性ペプチドの化学構造

合成では、初めに標識前駆体となる2種類の側鎖を保護したスズペプチド (Boc-F(p-SnBu₃)K(Boc)C(Trt)C(Trt)Y(^tBu)S(^tBu)L-OH, Boc-F(p-SnBu₃)S(^tBu)GS(^tBu)K(Boc)C(Trt)C(Trt)Y(^tBu)S(^tBu)L-OH を合成した (図 2))

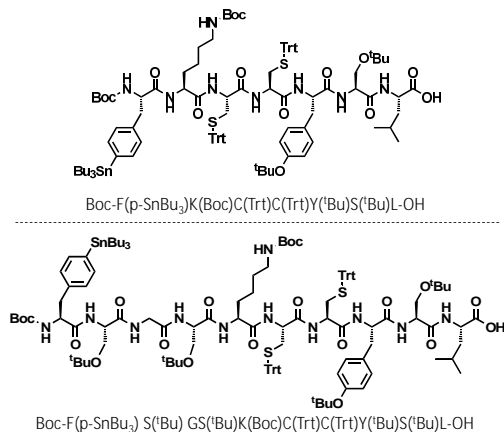


図 2 [²¹¹At]²¹¹At標識生理活性ペプチドの化学構造

次に、酸化剤存在下で同じハロゲンに属する ¹³¹I を用いて標識方法の最適化を行った後、²¹¹At を標識した。最後に酸溶液を用いて脱保護することで目的とする ²¹¹At 標識生理活性ペプチドの合成を試みた。化合物はヨウ化ナトリウム(NaI)シンチレーション検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用

いて、非放射性的の標準物質と比較することで同定した。

4. 研究成果

(1) 湿式法による ²¹¹At の分離

はじめに湿式法における吸着条件の検討を行った結果、8 M 硝酸中の ²¹¹At が最も効率よく吸着されることが明らかとなった (表 1) 。次にカラムを 2 M 塩酸で洗浄した場合の洗浄ロスはほとんどなく、カラムの ²¹¹At はほぼ全量保持される結果が得られた。さらに種々の濃度の水酸化ナトリウム水溶液を溶離液として ²¹¹At を溶離した結果、低濃度の水酸化ナトリウムを用いることで 48.0-50.8% の ²¹¹At を回収できることが明らかとなった (表 1) 。以上の結果から、添加液を 8 M 硝酸とし、溶離液を 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液として分離する方法が適している結果が得られた。

表 1 陰イオン交換固相抽出カラムの吸着率および全回収率

添加液	吸着率	2 M塩酸 洗浄ロス	溶離液	全回収率*
8 M HNO ₃ + Bi	91.7%	0.19%	0.1 M NaOH	50.6%
8 M HNO ₃ + Bi	83.6%	0.60%	0.5 M NaOH	48.0%
8 M HNO ₃ + Bi	85.3%	0.54%	1 M NaOH	50.8%
4 M HNO ₃ + Bi	74.8%	0.59%	0.1 M NaOH	37.2%
2 M HNO ₃ + Bi	36.0%	0.91%	0.1 M NaOH	18.7%

*減衰補正した値

(2) ²¹¹At 標識生理活性ペプチドの合成

²¹¹At の標識前駆体であるスズペプチドは、C 末端側から側鎖保護された N-Boc アミノ酸を固相合成法により順次伸長し、最後にスズフェニルアラニン (Boc-F(p-SnBu₃)-OH) を導入することで合成した。化合物の同定は質量分析計を用いて行い、全収率はいずれも約 65% であった。

次に、²¹¹At の標識条件を検討するために、¹³¹I を用いた標識実験を実施した。合成したスズペプチドと ¹³¹I (1 KBq) を N-クロロスクシンイミド (NCS) 存在下で 10 分間室温で反応

させた後、反応溶液を水で希釈した。希釈した反応溶液を固相抽出逆相カラムで生成した後、トリフルオロ酢酸(TFA)/トリイソプロピルシラン(TIS)/水(H₂O)混合液中でアミノ酸側鎖の脱保護を1時間室温で行うことで [¹³¹I] F(p-¹³¹I)KCCYSL および [¹³¹I] F(p-¹³¹I)GSGKCCYSL を合成した。脱保護後に TFA/TIS/H₂O 溶液を除去した残渣について HPLC を用いて分析した結果、非放射性標準サンプル(F(p-I)KCCYSL, F(p-I)GSGKCCYSL) と同一の保持時間を持つ線ピークを検出し、目的物が合成できていることを確認した。放射化学的収率はそれぞれ約 30%と約 66%であった。

最後に ²¹¹At を用いて同様に ²¹¹At 標識生理活性ペプチド([²¹¹At] F(p-²¹¹At)KCCYSL および [²¹¹At] F(p-²¹¹At)GSGKCCYSL) の合成を実施した。²¹¹At(約 16 kBq)を NCS 存在下でスズペプチドと室温で 10 分間反応させた後、固相抽出逆相カラムで未反応 At を除去した後、TFA/TIS/H₂O 溶液で 1 時間脱保護を行った。残渣について同じく HPLC で分析した結果、非放射性標準サンプル(F(p-I)KCCYSL, F(p-I)GSGKCCYSL)および ¹³¹I 標識ペプチドと類似の保持時間を持つ放射性ピークを観測したことから ²¹¹At 標識生理活性ペプチドが合成できることを明らかにした。

今後は、本研究で得られた方法を基に体内動態や生体内安定性の評価を行い、²¹¹At 標識生理活性ペプチドの内用放射線治療薬としての有用性に関する基礎検討を進めていく予定である。

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 2 件)

I. Sasaki, S. Watanabe, Y. Ohshima, Y. Sugo, K. Yamada, H. Hanaoka, and N.S. Ishioka
Medical application of radiohalogenated peptides; synthesis and in vitro evaluation of F(p-¹³¹I)KCCYSL for targeting HER2 in vitro.

Peptide Science 2015, 査読有、2016、243-246
<https://www.prf.or.jp/ps.html>

S.Watanabe, I.Nishinaka, K.Hashimoto, I.Sasaki, S.Watanabe, Y.Sugo, H. Makii, and N.S.Ishioka,
Synthesis of astatinated phenylalanine derivatives via electrophilic destannylation for the preparation of astatinated peptides, JAEA-Review 2013-057, Tokai Tandem Annual Report 2012, 2014, 査読有, 29

〔学会発表〕(計 6 件)

渡辺茂樹、Isolation of At-211 using wet chemistry approach based on a column method、第3回核医学国際シンポジウム、2017年2月11日、東京コンベンションホール(東京都中央区)

渡辺茂樹・渡辺智・島田明彦・石岡典子、TIARA における At-211 新規大量製造法の開発、放射線プロセスシンポジウム、2016年11月8日、東京大学弥生キャンパス(東京都文京区)

渡辺茂樹・渡辺智・佐々木一郎・大島康宏・D.K.Hamlin・E.R.Balkin・M.K.Chyan、D.S.Wilbur・石岡典子、Isolation of At-211 using a solid phase anion exchange method、環太平洋国際化学会議(Pacificchem 2015)、2015年12月15日、ホノルル(米国)

渡辺茂樹・渡辺智・D.K.Hamlin・M.K.Chyan・K.Gagnon・鈴木博元・E.R.Balkin・大島康宏・D.S.Wilbur・石岡典子、乾式法および湿式法による At-211 の分離、第15回放射線医薬品画像診断薬研究会、2015年9月12日、京都勧業館「みやこめっせ」(京都市)

渡辺茂樹・E.R.Balkin・D.K.Hamlin・K.Gagnon・M.K.Chyan・D.S.Wilbur、湿式分離法を用いた Bi ターゲットからの At-211 の分離、第58回放射化学討論会、2014年9月11日、名古屋大学(愛知県名古屋市)

渡辺茂樹・E.R.Balkin・D.K.Hamlin・K.Gagnon・M.K.Chyan・D.S.Wilbur、Evaluation of Column Separation Methods for Simplification of the Wet Chemistry Approach to Isolation of At-211、第15回ターゲットおよびターゲット化学に関する国際ワークショップ、2014年8月21日、プラハ(チェコ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 茂樹 (Watanabe, Shigeki)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発
機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応
用研究部・主幹研究員
研究者番号：10450305

(2)研究分担者

鷺山 幸信 (Washiyama, Koshin)
国立大学法人金沢大学・保健学系・助教
研究者番号： 80313675

(3)連携研究者

大島 康宏 (Ohshima, Yasuhiro)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発
機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応
用研究部・主任研究員
研究者番号： 00588676

(4)研究協力者

佐々木 一郎 (Sasaki, Ichiro)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発
機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応
用研究部・任期制技術員