

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861031

研究課題名(和文) 短寿命PET核種を用いた腫瘍細胞浸透オリゴペプチドの標識合成と評価

研究課題名(英文) Radiosynthesis and evaluation of tumor cell-penetrating oligopeptides containing short-lived positron-emitting radionuclides

研究代表者

破入 正行 (Hanyu, Masayuki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 標識薬剤開発部・研究員(任常)

研究者番号：80435552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：短寿命PET核種である炭素11を用いた腫瘍細胞浸透オリゴペプチドへの標識反応を試み、以下の結果が得られた。(1) Cys塩酸塩を用いた炭素11ホルムアルデヒドによるピクテスベングラー反応を検討したところ反応が進行し、[2-<sup>11</sup>C]チオプロリンを得た。(2) TrpをN末端側に導入した腫瘍細胞浸透オリゴペプチドと炭素11ホルムアルデヒドの反応を手合成で検討し中程度の転換率で得ることに成功した。さらに遠隔合成装置を用いた合成検討を行ったところ、合成時間の平均が35分、合成終了時の収率が4.2 ± 3.2% (n=3)、比放射能が75.7 ± 12.3 GBq/μmolであった。

研究成果の概要(英文)：A procedure for the synthesis of a carbon-11 labeled oligopeptide containing [<sup>11</sup>C]1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid ([<sup>11</sup>C]Tpi) from the corresponding Trp·HCl-containing peptides has been developed involving a Pictet-Spengler reaction with [<sup>11</sup>C] formaldehyde. The radiolabeling of a Trp·HCl-containing iRGD peptide using the Pictet-Spengler reaction was successful. Furthermore, the remote-controlled synthesis of a [<sup>11</sup>C]Tpi-containing iRGD (1) peptide was attempted using an automatic production system to generate [<sup>11</sup>C]CH3I. The radiochemical yield of the compound 1 at the end of synthesis was 4.2 ± 3.2% (n=3), for a total synthesis time of about 35 min. The usefulness of our synthesis was demonstrated PET studies using the compound 1 for the mouse bearing MIAPaca-2 and BxPC-3, a small cell pancreatic cancer cell line. The BxPC-3 cell-to-muscle and MIAPaca-2 cell-to-muscle of 1 at 22 min were not retained.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PETイメージング オリゴペプチド ピクテスベングラー反応

### 1. 研究開始当初の背景

分子イメージングはペプチド性薬剤、核酸医薬、抗体医薬、蛋白質製剤などの生体中高分子量物質を利用したバイオ医薬品の開発が進み、前臨床および臨床試験での薬物効果を非侵襲的、継時的に評価するためなどに役立つと期待されている。ペプチド性薬剤・蛋白質製剤の特性はその他の低分子放射性薬剤 (PET 薬剤) と異なっており、さらにそれぞれの間でもその特性が大きく異なっている。バイオ医薬品などの分子イメージングにおいて、構造や分子量など様々な条件を考慮して標識反応を行うにはまだまだ多くの課題が残されているのが現状である。

申請者は、これまでペプチドおよび糖鎖の合成を有機化学的および生物学的アプローチを用いて研究を行ってきた。さらに短寿命 PET 薬剤の合成検討も併せて行ってきた。本申請課題は其中で、オリゴペプチドの標識技術的な問題点などから着想に至った。PET 薬剤を製造する観点から推察すると高い放射エネルギーを用いて製造する場合、被爆することを考慮して遠隔装置を用いた合成方法の検討が必要となる。しかしながら、遠隔装置における合成方法は種々の制限がある。多段階反応を行うには設備などを大幅に変更する必要があり、また操作も非常に複雑となる。さらに反応に用いられる試薬数が多ければ精製および品質検査における煩雑さが増えることも容易に予測される。そこで申請者は遠隔装置を用いたオリゴペプチドの簡便な直接標識方法の開発に成功した。(Hanyu, M., *et al.*, *Journal of Peptide Science*, 2013) この方法は標識部位である Trp のアミノ基が塩酸塩であれば、酸触媒の添加が必要でなく、かつ無保護のペプチドで位置特異的に炭素 11 標識ができる。

### 2. 研究の目的

炭素 11 標識環状 RGD は、膵がん細胞の一つである BxPC3 細胞を用いた胆癌マウスでの PET 撮像を行ったところ癌細胞に集積することを確認した。すなわち様々なイメージングの目的となるオリゴペプチドに Trp 塩酸塩を導入するのみで炭素 11 標識が可能となることを明らかにした。しかしながら、Trp 塩酸塩をもつペプチドで標識した場合、体内に存在する分解酵素によって標識ペプチドが加水分解され、目的とするイメージングが困難になることが予想される。様々な RGD ペプチドが報告されている中、RGD 配列を有する腫瘍細胞浸透促進オリゴペプチドに注目した。

### 3. 研究の方法

標識するペプチドとして、腫瘍細胞浸透促進オリゴペプチド (Tumor-penetrating peptides) iRGD (CRGDKGPDC) を用いる。そして標識部位として腫瘍細胞浸透促進オリゴペプチドに導入するアミノ酸の構造式を図 1 に示す。

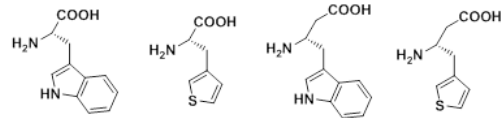


図 1 腫瘍細胞浸透促進オリゴペプチドの N 末端側に導入する α-アミノ酸および β-アミノ酸の構造

さらに N 末端側にシステイン残基を有する iRGD の炭素 11 標識の検討もおこなった。

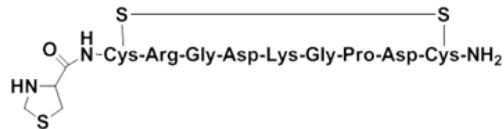


図 2 チアゾリジン骨格 (チオプロリン残基) を有する iRGD ペプチドの構造式

### 4. 研究成果

Cys 塩酸塩、種々のヘテロ環を含むアミノ酸塩酸塩を用いた炭素 11 ホルムアルデヒドによるピクテスベングラー反応も検討した。基質として Cys 塩酸塩を用いたところ反応が進行し、[2-<sup>11</sup>C]チオプロリンを得ることに成功した。また [2-<sup>11</sup>C]チオプロリンを用いて PET 撮像も行った。その結果、ガン細胞への集積も確認されたものの、他の組織にも集積が見られることから、主に肝臓なので代謝され炭素 11 ホルムアルデヒドとシステインになったことが考えられた。つまり、ペプチド鎖への標識部位として炭素 11 ホルムアルデヒドは不適當であることが示唆された。(図 3)

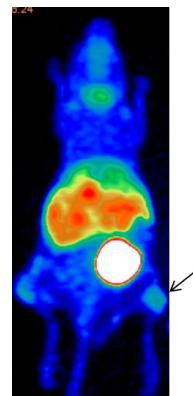


図 3 [2-<sup>11</sup>C]チオプロリン投与 50-60 分後の PET 画像 (矢印 BxPC-3 細胞)

Trp 塩酸塩を含む腫瘍細胞浸透促進オリゴペプチド (Tumor-penetrating peptides) iRGD (CRGDKGPDC) の合成、標識化および PET 撮像も行った。Trp-iRGD と炭素 11 ホルムアルデヒドの標識反応を手合成で検討し中程度の転換率で [1-<sup>11</sup>C]Tpi-iRGD を得ることに成功した。さらに遠隔合成装

置を用いた合成検討を行ったところ、合成時間の平均が 35 分、合成終了時の収率が  $4.2 \pm 3.2\%$  ( $n=3$ )、比放射能が  $75.7 \pm 12.3$  GBq/ $\mu\text{mol}$  であった。膵がん細胞である BxPC3, MIA PaCa-2 および AsPC-1 細胞を用いた胆癌マウスでの PET 撮像を行ったところ、標識ペプチドは癌細胞に集積しなかった。

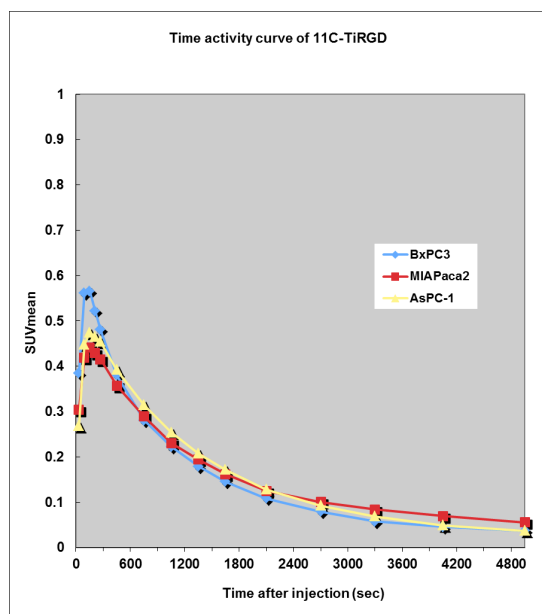


図 4 [1-<sup>11</sup>C]Tpi-iRGD の癌細胞における時間放射能曲線

iRGD(CRGDKGPDC) および iNGR(CRNGRPDC)の合成は固相法を用いたペプチド合成を行い調製した。さらに Fmoc- $\beta$ -Trp を導入後、脱保護次いで樹脂からの脱離を行い、前駆体 ( $\beta$ -Trp-iRGD および  $\beta$ -Trp-iNGR)を調製した。次に  $\beta$ -Trp とホルムアルデヒドを反応後、Fmoc 基を導入した Fmoc- $\beta$ -Tpi を調製した後、固相合成によりそれぞれの標品を調製した。しかしながら前駆体の水溶性が Trp-iRGD と比較して著しく低下した。これは疎水性が向上したためだと考えられる。様々な溶媒を検討した結果、DMSO が一番溶解することを確認したが、炭素 11 ホルムアルデヒドによるピクテスベングラー反応を手合成により検討した結果、収率が大幅に減少した。様々な条件を試みたが、改善が見られなかった。また、 $\beta$ -Trp-iNGR を用いた標識反応も上記と同じ傾向を示した。

## 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 4 件)

(1) Masayuki Hanyu, Kazunori Kawamura, Makoto Takei, Kenji Furutsuka, Satoshi Shiomi, Tomoya Fujishiro, Masanao Ogawa,

Nobuki Nengaki, Hiroki Hashimoto, Toshimitsu Fukumura, Ming-Rong Zhang, Radiosynthesis and quality control of [<sup>11</sup>C]TASP457 as a clinically useful PET ligand for imaging of histamine H3 receptors in human brain, Nuclear Medicine and Biology, 43(11), 679 - 684, 2016, DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2016.08.004 (査読有)

(2) Tomoyuki Ohya, Kotaro Nagatsu, Hisashi Suzuki, Masami Fukada, Katsuyuki Minegishi, Masayuki Hanyu, Toshimitsu Fukumura, Ming-Rong Zhang, Efficient preparation of high-quality <sup>64</sup>Cu for routine use, Nuclear Medicine and Biology, 43(11), 685 - 691, 2016, DOI:10.1016/j.nucmedbio.2016.07.007 (査読有)

(3) Kazumi Koga, Jun Maeda, Masaki Tokunaga, Masayuki Hanyu, Kazunori Kawamura, Mari Ohmichi, Toshio Nakamura, Yuji Nagai, Chie Seki, Yasuyuki Kimura, Takafumi Minamimoto, Ming-Rong Zhang, Toshimitsu Fukumura, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi, Development of TASP0410457 (TASP457), a novel dihydroquinolinone derivative as a PET radioligand for central histamine H3 receptors, EJNMMI Research, 6(1), 11, 2016, DOI:10.1186/s13550-016-0170-2, (査読有)

(4) Masayuki Hanyu, Aya Sugyou, Atsushi Tsuji, Kazunori Kawamura, Tsuneo Saga, Ming-Rong Zhang, Toshimitsu Fukumura, Preliminary PET Study of Carbon-11 Labeled RGD Peptide by Using Carbon-11 Formaldehyde, PEPTIDE SCIENCE 2015, 663 - 668, 2016.

(5) Masayuki Hanyu, Development of radiolabeling technique for cyclic RGD peptide by using carbon-11 formaldehyde, National Institute of Radiological Sciences Annual Report 2013,36-37, 2014 (査読有)

[学会発表](計 8 件)

(1) 永津弘太郎, 峯岸克行, 鈴木寿, 深田正美, 大矢智幸, 破入正行, 河村和紀, 張明榮, 加速器による診断・治療用放射性核種製造技術の確立, 放射線医学総合研究所第 3 期中期計画成果発表会, 東京国際フォーラム, 東京都, 2016-01-26

(2) Koutarou Nagatsu, Katsuyuki Minegishi, Hisashi Suzuki, Tomoyuki Ohya, Masami Fukada, Masayuki Hanyu, Kazunori Kawamura, Ming-Rong Zhang, PRODUCTION OF NON-CONVENTIONAL RADIONUCLIDES WITH EMPHASIS ON TARGETRY SYSTEM DEVELOPMENT, Ninth Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, the secretariat: jsrc2015, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, 2015-11-09

(3) Masayuki Hanyu, Aya Sugyou, Atsushi Tsuji, Kazunori Kawamura, Tsuneo Saga, Ming-Rong Zhang, Toshimitsu Fukumura,

Carbon-11 Formaldehyde: Development of radiolabeling technique for carbon-11 labeled peptides, Ninth Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, the secretariat: jsrc2015, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, 2015-11-09

(4) 破入正行, 須堯綾, 辻厚至, 河村和紀, 張明栄, 福村利光, 炭素 11 標識した RGD ペプチド誘導体の合成と評価, 第 55 回日本核医学会学術総会, ハイアットリージェンシー東京, 東京, 2015-11-05

(5) 大矢智幸, 鈴木寿, 深田正美, 永津弘太郎, 峯岸克行, 破入正行, 張明栄, 共沈を用いた  $^{67}\text{Cu}$  製造法についての検討, 第 55 回日本核医学会学術総会, ハイアットリージェンシー東京, 東京, 2015-11-05

(6) 鈴木寿, 深田正美, 大矢智幸, 永津弘太郎, 峯岸 克行, 破入正行, 山崎慎之介, 張明栄, 臨床利用を目的とした  $^{64}\text{Cu}$  の大量製造と品質評価, 第 55 回日本核医学会学術総会, ハイアットリージェンシー東京, 東京, 2015-11-05

(7) 破入正行, 武井誠, 橋本裕輝, 古塚賢士, 潮見聡, 藤代智也, 小川政直, 念垣信樹, 河村和紀, 福村利光, 張明栄, 2- $^{11}\text{C}$  メトキシピリジル基を有する H3 受容体 PET プロブの合成最適化の検討, 第 54 回日本核医学会学術総会, 大阪国際会議場, 大阪, 2014-11-08

(8) 破入正行, 須堯綾, 辻厚至, 河村和紀, 張明栄, 福村利光, 炭素 11 標識した環状 RGD ペプチドの合成と評価, 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 岡山大学津島キャンパス一般教育棟, 岡山, 2014-09-12

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

破入 正行 (Hanyu Masayuki)

国立研究開発法人・量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・標識薬剤開発部・研究員

研究者番号: 80435552