

骨指向性輸送担体としてアスパラギン酸ペプチドを用いた放射標識化合物の基礎的検討

著者	石? 淳志
著者別表示	Ishizaki Atsushi
雑誌名	博士論文要旨Abstract
学位授与番号	13301甲第4893号
学位名	博士(創薬科学)
学位授与年月日	2019-03-22
URL	http://hdl.handle.net/2297/00058896

doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14149-7>.



氏名	石崎 淳志
学位の種類	博士（創薬科学）
学位記番号	医薬保博甲 266 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第 4 条第 1 項）
学位授与の題目	骨指向性輸送担体としてアスパラギン酸ペプチドを用いた放射標識化合物の基礎的検討

論文審査委員	主査	小川 数馬
	副査	小谷 明
	副査	大宮 寛久
	副査	檜井 栄一
	副査	北村 正典

学位論文要旨

The imaging of bone metastases using the radiopharmaceuticals is useful because detecting functional changes prior to morphological changes is possible. In neuroendocrine tumors, somatostatin receptors are highly expressed and bone metastases occur at relatively high frequency. Therefore, for simultaneous detection of multiple cancer lesion sites, compounds containing (L-Asp)_n as a carrier to bone metastases lesions and the somatostatin receptor-targeted peptide as a carrier to cancer were synthesized. From *in vitro* and *in vivo* results, the affinity of [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)₁₁-TATE for somatostatin receptor was greatly decreased than that of [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-TATE. Meanwhile, [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)_n were synthesized and evaluated. In biodistribution experiments, [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)_n showed high accumulation of radioactivity in bone as same as [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)_n. [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)₁₄ should be more stable than [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)₁₄ because the proportion of intact complex after injection of [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)₁₄ was significantly higher than that of [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)₁₄ in urine analyses. Therefore, (D-Asp)₁₄ could be useful as a carrier molecule of radionuclides to bone. Moreover, the DOTA ligand can form a stable complex with ⁹⁰Y as a therapeutic radionuclide. Therefore, to develop compound for cancer treatment of multiple lesion sites, we evaluated [⁹⁰Y]Y-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK). [⁹⁰Y]Y-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK) has potential for treatment of not only the primary cancer but also bone metastases because [⁹⁰Y]Y-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK) should possess similar characteristics as [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK).

【背景・目的】

近年、ポジトロン放出核種である ⁶⁸Ga ($t_{1/2} = 68 \text{ min}$, ジェネレータ産生核種)がその優れた物理的性質から注目を集めており、様々な薬剤が開発されている。一方、骨は増殖因子を豊富に含むため癌にとって増殖し易く、転移し易い組織である。転移性骨腫瘍の診断において、放射性薬剤を用いた核医学診断法は転移部位における機能的変化を形態変化に先行して感知できるため有用である。これまでの研究で、骨に高親和性を示すことが知られている酸性アミノ酸ペプチドであるアスパラギン酸ペプチドを骨指向性輸送担体とし、Ga とのキレート部位に 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)を選択して、Ga-DOTA 錯体と酸性アミノ酸ペプチドとを結合した化合物[⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)_n の評価を行い、有用性を示してきた。また、骨転移巣のみならず、軟部腫瘍や原発巣など複数の癌病巣部位への診断を可能とする薬剤の開発を目的として、骨指向性輸送担体としてアスパラギン酸ペプチドを、癌指向性輸送担体として、新生血管内皮細胞の他、ある種の癌細胞にも過剰に発現していることが報告されている $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに高親和性を示す RGD ペプチドを同一分子内に導入した Ga 標識化合物

[⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK)の評価を行い、有用性を示してきた。この研究では、癌指向性輸送担体として、RGD ペプチドを用いているが、他の癌指向性輸送担体への応用も可能であると考えられる。

そこで、癌指向性輸送担体としてオクトレオチド誘導体に注目した。現在、多くの神経内分泌腫瘍(neuroendocrine tumor ; NET)において高発現しているソマトスタチン受容体を標的として、放射標識オクトレオチド誘導体を用いた診断が行われている。また、NET では、肝転移やリンパ節転移の頻度が高いが、骨転移も比較的高頻度に起こる。そこで、骨指向性輸送担体と癌指向性輸送担体を同一分子内に導入するドラッグデザインコンセプトが、オクトレオチド誘導体にも応用可能であるかを調べることを目的に、骨指向性輸送担体としてはアスパラギン酸ペプチドを、癌指向性輸送担体としてオクトレオチド誘導体(TATE)を同一分子に導入した Ga 標識化合物 [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)_n-TATE (n = 0, 2, 5, 8, 11) (Fig 1A)を合成し、評価を行った。尚、本研究では、⁶⁸Ga より半減期が長く、取扱いが容易な ⁶⁷Ga (t_{1/2} = 3.3 day)を用いた。

上述の化合物で骨指向性輸送担体として用いてきたアスパラギン酸ペプチドは、L-アスパラギン酸を用いた化合物であるが、D-アミノ酸からなるペプチドは、ペプチターゼによって認識されにくいため、L-アミノ酸からなるペプチドよりも *in vivo* でより安定になりうることが知られている。そこで、D-アスパラギン酸ペプチドの骨指向性輸送担体としての有用性を評価することを目的に、[⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14) (Fig 1B)を合成し、評価を行った。

さらに、これまでに複数の癌病巣部位の同時診断を目的として評価を行ってきた [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK)の配位子として用いている DOTA は、治療用核種(β線放出核種)である ⁹⁰Y とも安定な錯体を形成することが知られている。そこで、⁶⁸Ga 標識化合物による PET 診断と ⁹⁰Y 標識化合物による治療をカップリングした包括的診断治療法の開発を目的に、[⁹⁰Y]Y-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK) (Fig 1C)を合成し、評価を行った。

【実験方法】

Fmoc 固相合成法を用いてアスパラギン酸の残基数が異なる数種類の化合物 DOTA-(L-Asp)_n-TATE を合成し、それぞれ ⁶⁷Ga と反応させることにより、[⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)_n-TATE (n = 0, 2, 5, 8, 11) を 96%以上の放射化学的純度で合成した。これらの標識化合物について、pH 7.4 緩衝溶液中での安定性実験、ハイドロキシアパタイト(HA)との結合実験、ソマトスタチン受容体発現細胞である AR42J 細胞への取り込み実験、ソマトスタチン受容体への親和性実験、担癌モデルマウスを用いた体内放射能分布実験を行った。

また、上記と同様に Fmoc 固相合成法を用いて DOTA-(D-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)を合成し、それぞれを ⁶⁷Ga と反応させることにより、[⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)を 95%以上の放射化学的純度で合成した。これらの標識化合物について、HA との結合実験、正常マウスを用いた体内放

射能分布実験、マウスへの $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(D-Asp)}_{14}$ 投与 60 分後の尿分析実験を行った。

さらに、 ^{90}Y 標識前駆体である $\text{DOTA-(L-Asp)}_{11}\text{-c(RGDfK)}$ を収率 27% で合成し、 ^{90}Y と反応させることにより、 $[^{90}\text{Y}]\text{Y-DOTA-(L-Asp)}_{11}\text{-c(RGDfK)}$ を 95% 以上の放射化学的純度で合成した。この標識化合物について、pH 7.4 緩衝溶液中での安定性実験、HA との結合実験、正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行った。

【結果・考察】

Fmoc 固相合成法により、 $\text{DOTA-(L-Asp)}_n\text{-TATE}$ ($n = 0, 2, 5, 8, 11$) をそれぞれ総収率 7%、15%、8%、12%、9% で合成し、次いで ^{67}Ga との反応により、放射化学的収率 99%、93%、86%、85%、75%、放射化学的純度 96% 以上で $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(L-Asp)}_n\text{-TATE}$ ($n = 0, 2, 5, 8, 11$) を得ることが出来た。これら標識化合物について、緩衝溶液中では、インキュベート 24 時間後において $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(L-Asp)}_n\text{-TATE}$ ($n = 0, 2, 5, 8, \text{ or } 11$) はそれぞれ、 $90.5 \pm 0.2 \%$ 、 $91.9 \pm 0.3 \%$ 、 $92.9 \pm 0.1 \%$ 、 $89.7 \pm 0.3 \%$ 、 $88.3 \pm 0.7 \%$ が未変化体として観察された。HA との結合実験の結果、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ は HA への結合を示さず、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(L-Asp)}_n\text{-TATE}$ ($n = 2, 5, 8, 11$) は、アスパラギン酸ペプチドの導入により HA への結合を示し、鎖長に依存した HA への結合を示した。しかしながら、予想と反して、ソマトスタチン受容体発現細胞である AR42J 細胞への取り込み実験の結果、培養開始 4 時間後において $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ が高く ($327.4 \pm 7.3 \%$ dose/mg protein) 取り込まれたのに対して、アスパラギン酸ペプチドを導入した化合物 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(L-Asp)}_n\text{-TATE}$ ($n = 2, 5, 8, 11$) の AR42J 細胞への取り込みは低値 ($14.1 \pm 0.7 \%$ dose/mg protein、 $0.8 \pm 0.0 \%$ dose/mg protein、 $0.8 \pm 0.0 \%$ dose/mg protein、 $0.5 \pm 0.0 \%$ dose/mg protein) を示した。また、ソマトスタチン受容体への親和性実験の結果も、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ の IC_{50} 値が 8.4 nM であったのに対して、アスパラギン酸ペプチドを導入した化合物 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(L-Asp)}_n\text{-TATE}$ ($n = 2, 5, 8, 11$) では、それぞれ IC_{50} 値が 42.7 nM、44.3 nM、59.4 nM、353.1 nM となり、ソマトスタチン受容体への親和性は低下した。この *in vitro* の結果を反映し、担癌モデルマウスを用いた体内放射能分布実験において、アスパラギン酸ペプチドを導入した $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(L-Asp)}_{11}\text{-TATE}$ は、 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(L-Asp)}_n\text{-TATE}$ ($n = 0, 2, 5, 8$) よりも骨への高い集積を示したが、投与後 1 時間で $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-TATE}$ が腫瘍への高い集積 ($21.6 \pm 4.1 \%$ injected dose/g) を示したのに対して、アスパラギン酸ペプチドを導入した化合物 $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(L-Asp)}_n\text{-TATE}$ ($n = 2, 5, 8, 11$) の腫瘍への集積は低値 ($2.4 \pm 1.1 \%$ injected dose/g、 $0.4 \pm 0.1 \%$ injected dose/g、 $0.6 \pm 0.1 \%$ injected dose/g、 $0.4 \pm 0.1 \%$ injected dose/g) を示した。また、アスパラギン酸ペプチドリンカーの導入は、腫瘍だけでなくソマトスタチン受容体発現組織である膵臓においても集積が低下した。これらの結果から、神経内分泌腫瘍と骨転移の同時検出のためにソマトスタチン受容体指向性輸送担体と骨指向性輸送担体を同一分子内に導入した今回の場合では、アスパラギン酸ペプチドの導入によりソマトスタチン受容体発現細胞への取り込みが減少する結果となっ

たため、Ga-DOTA 錯体、アスパラギン酸ペプチド、オクトレオタイト誘導体を単純に繋げただけでは、この戦略を用いることができないことが示唆された。

また、Fmoc 固相合成法を用いて DOTA-(D-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)をそれぞれ総収率 30%、40%、12%、12%、14%で合成し、次いで ⁶⁷Ga との反応により、放射化学的収率 15%、39%、38%、76%、54%、放射化学的純度 95%以上で [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)を得ることが出来た。これら標識化合物について、HA との結合実験の結果、 [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)は、アスパラギン酸ペプチドの鎖長に依存した HA への結合を示し、 [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)と同等の HA への結合を示した。この *in vitro* の結果を反映し、正常マウスを用いた体内放射能分布実験では、 [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)は、 [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)と同等の骨への集積を示し、骨以外の非標的臓器へはほとんど集積せず、速やかに尿中に排泄された。体内放射能分布実験では、 [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)と [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)_n (n = 2, 5, 8, 11, 14)との間で大きな違いは見られなかったが、マウスへの ⁶⁷Ga 標識化合物投与 60 分後の尿分析の結果から、L-アスパラギン酸を用いて合成した [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)₁₄ の未変化体の割合が 55.0 ± 19.3 %であったのに対して、D-アスパラギン酸を用いて合成した [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)₁₄ の未変化体の割合が 85.8 ± 17.4 %と高かったため、 [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)₁₄ の方が、生体内での安定性が高いことが示唆された。これら *in vitro* および *in vivo* の結果から、D-アスパラギン酸ペプチドも L-アスパラギン酸ペプチドと同様に骨指向性輸送担体としての有用性が示唆された。

さらに、DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK)と ⁹⁰Y との反応により、放射化学的収率 84%、放射化学的純度 95%以上で [⁹⁰Y]Y-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK)を得ることが出来た。緩衝液での安定性試験の結果、インキュベート 24 時間後において、97.6 ± 1.5 %が未変化体として観察された。HA との結合実験の結果、 [⁹⁰Y]Y-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK)は [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK)と同様に、HA への高い結合率を示した。この *in vitro* の結果を反映し、正常マウスを用いた体内放射能分布実験では、 [⁹⁰Y]Y-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK)は所期の通り骨への高い集積を示した。これらの結果から、 [⁹⁰Y]Y-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK)は、 [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK)と同様の薬物動態が期待でき、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン発現腫瘍部位および転移性骨腫瘍部位の包括的診断治療が期待される。

以上の結果から、本研究で評価を行った化合物 ([⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(L-Asp)_n-TATE、 [⁶⁷Ga]Ga-DOTA-(D-Asp)_n、 [⁹⁰Y]Y-DOTA-(L-Asp)₁₁-c(RGDfK))について、どれも骨指向性輸送担体としてのアスパラギン酸ペプチドの可能性が示唆され、今後の診断・治療薬剤の研究に有益な情報を提供するものと考えられる。

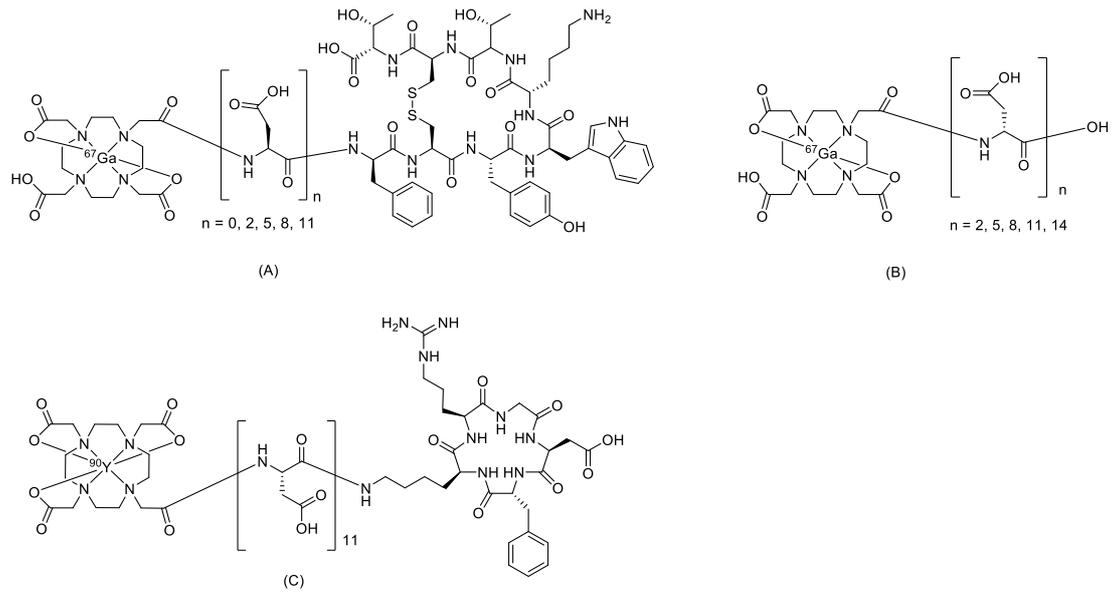


Figure 1. Chemical Structures of (A) $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(L-Asp)}_n\text{-TATE}$, (B) $[^{67}\text{Ga}]\text{Ga-DOTA-(D-Asp)}_n$,
(C) $[^{90}\text{Y}]\text{Y-DOTA-(L-Asp)}_{11}\text{-c(RGDfK)}$

審査結果の要旨

骨は増殖因子を豊富に含むため癌にとって増殖し易く、転移し易い組織である。転移性骨腫瘍の診断において、放射性薬剤を用いた核医学診断法は転移部位における機能的変化を形態変化に先行して感知できるため有用である。本研究では、アスパラギン酸ペプチドを骨指向性輸送担体として用いた放射標識プローブの評価を行った。まず、複数の癌病巣部位の同時診断を可能とするプローブ開発を目的として、骨指向性輸送担体としてアスパラギン酸ペプチドと癌指向性輸送担体としてソマトスタチン受容体高親和性のオクトレオチド誘導体を同一分子内に導入した放射標識プローブの評価を行った。その結果、本プローブは、骨へ高集積を示したが、ソマトスタチン受容体発現腫瘍への集積は低値であった。この結果は、電荷の影響によりソマトスタチン受容体への親和性が減弱したことに起因すると推測した。次いで、骨指向性担体として D-アスパラギン酸ペプチドと L-アスパラギン酸ペプチドの相違を比較し、D-アスパラギン酸ペプチドを用いることにより生体内安定性が向上することを示した。一方、グルタミン酸ペプチドを用いた場合は腎臓への放射能滞留が高く、放射プローブの骨指向性輸送担体としてはアスパラギン酸ペプチドの方が適していることを示した。これら研究は、骨指向性放射性プローブ開発に有用な知見を与えるため、本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。