

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月26日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09948

研究課題名(和文) 癌の原発巣、造骨性・溶骨性骨転移の同時診断治療を可能とする放射性薬剤の開発研究

研究課題名(英文) Development of radiolabeled compound for diagnosis and therapy of primary tumor and bone metastases

研究代表者

小川 数馬 (Ogawa, Kazuma)

金沢大学・新学術創成研究機構・准教授

研究者番号：30347471

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)：造骨性骨転移、溶骨性骨転移、原発巣のいずれにも集積する放射性薬剤の開発を目的として、骨転移部位への輸送担体としてアスパラギン酸ペプチドを、癌組織への輸送担体としてRGDペプチドを、RI導入部位としてDOTA錯体を同一分子内に導入した化合物をFmoc固相合成により合成した。放射性Ga標識したプローブは、 $V\alpha 3$ インテグリンが過剰発現担癌マウスへの体内放射能分布実験の結果、癌組織と骨の両組織への高い放射能集積を示した。治療核種であるY-90も同等の化学的性質を示したことから、骨転移巣と原発巣の両病巣の同時診断・治療となりうる本薬剤設計の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：A probe containing an aspartic acid peptide linker (D11) as a carrier to bone metastases, an RGD peptide [c(RGDfK) peptide] as a carrier to the primary cancer, and Ga-DOTA as a stable radiometal complex for imaging in one molecule,  $^{67}\text{Ga-DOTA-D11-c(RGDfK)}$ , was prepared and evaluated to detect both the primary cancer and bone metastases simultaneously. Biodistribution experiments and single photon emission tomography (SPECT) imaging using tumor-bearing mice were performed.  $^{67}\text{Ga-DOTA-D11-c(RGDfK)}$  exhibited high uptake in bone and tumor. The accumulation of  $^{67}\text{Ga-DOTA-D11-c(RGDfK)}$  in tumor decreased when it was co-injected with c(RGDfK) peptide. Since  $^{90}\text{Y-DOTA-D11-c(RGDfK)}$  showed similar characteristics, they have great potential as theranostics system for diagnosis and therapy of both the primary cancer and bone metastases simultaneously.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：骨転移 診断 治療 放射性核種 セラノスティクス イメージング RI内用療法

1. 研究開始当初の背景

臨床で用いられている骨シンチグラフィ用薬剤 ( $^{99m}\text{Tc}$  とビスホスホネートとの多核錯体) は、ビスホスホネートが骨の主成分であるハイドロキシアパタイト (HA) に高親和性を持つことに基づき、癌骨転移部位、厳密には、造骨活性が亢進した部位に高集積を示し、転移性骨腫瘍の診断を可能とする。従って、溶骨活性が高く、造骨活性が低いタイプの癌骨転移 (溶骨性骨転移) には十分に薬剤が集積せず、偽陰性 (false negative) を示す弱点がある。一方、 $^{99m}\text{Tc}$ -ビスホスホネート錯体では、ビスホスホネートは骨への輸送担体であり、同時に  $^{99m}\text{Tc}$  と錯体を形成するための配位子となる。我々は、このことにより本来のビスホスホネートの骨への親和性が減弱していると考え、放射性核種 (RI) 標識部位と骨への輸送担体 (ビスホスホネートや酸性アミノ酸ペプチド) を独立して同一分子内に導入する分子設計を考案し、種々の放射性核種や配位子を組み合わせた新規放射性骨指向性薬剤の開発を行ってきた (図 1)。その結果、合成した新規薬剤は、骨指向性放射性薬剤として優れた骨特異的な体内動態を示し、骨転移モデルラットを用いた治療実験では、有意な疼痛緩和効果と腫瘍増殖抑制効果を示したことから、この分子設計の有用性が確認された。しかしながら、病巣部位への集積機序は既存の化合物と同様であるため、溶骨性骨転移に集積し難いといった弱点を克服するものではない。そこで、申請者は、薬剤に新しい機能 (腫瘍指向性) を付加することにより、この弱点を克服した化合物の開発を目指すこととした。

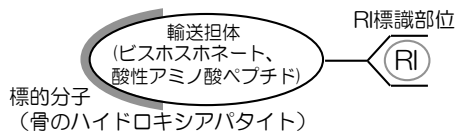


図 1. これまでに開発した薬剤の概念図

2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発してきた図 1 の分子構造に加えて、癌組織への高い親和性を有する輸送担体をも同一分子内に導入する (図 2) ことにより、造骨性骨転移 (骨) だけではなく、溶骨性骨転移 (溶骨部位に浸潤した癌)、原発巣にも集積する PET 用トレーサ ( $^{68}\text{Ga}$  標識ペプチド) を設計・合成する。まずは、本薬剤設計の有用性を立証するためのモデル化合物として、骨への輸送担体としてアスパラギン酸ペプチドを、癌への輸送担体として RGD ペプチドを、 $^{68}\text{Ga}$  錯体の配位子として DOTA を同一分子内に導入した化合物を合成し、 $^{68}\text{Ga}$  標識を行う。そして、化合物が骨と癌 (癌に発現しているインテグリン) の両方に親和性を有することを HA 結合実験・ $\alpha\beta_3$  インテグリン結合実験・担癌 (骨転移) モデルの PET 撮像により確認する。次いで、 $^{68}\text{Ga}$  の代わりに

治療用核種を用いた化合物で治療実験を行い、包括的診断治療法の構築を目指す。

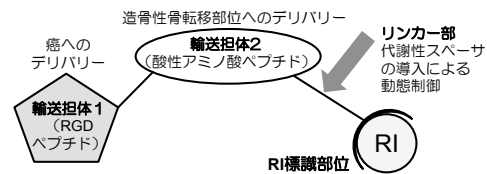


図 2. 新規放射標識ペプチドの概念図

3. 研究の方法

(1) 骨転移部位と原発巣の同時診断を可能とする新規  $^{68}\text{Ga}$  標識薬剤の設計・合成  
近年、 $^{68}\text{Ga}$  が新しい PET 核種として注目を集めている。その理由として、 $^{68}\text{Ga}$  (半減期 68 分) は  $^{68}\text{Ge}$  (半減期 271 日) の娘核種であるため  $^{68}\text{Ge}$ - $^{68}\text{Ga}$  ジェネレータにより取り出すことが可能である。即ち、高価なサイクロトロンを有さない多くの病院においても、ジェネレータからのミルキングにより、病院内において容易に核種を入手することができ、標識後、検査に使用できるといった大きなメリットを有する。 $^{68}\text{Ga}$  と安定な錯体を形成する配位子としては、治療核種である  $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$  と安定な錯体を形成する DOTA を選択する。そして、造骨性転移性骨腫瘍への RI 輸送担体として酸性アミノ酸ペプチド  $\text{D}_n$  と新生血管内皮細胞や癌細胞に過剰発現する  $\alpha\beta_3$  インテグリンに高親和性を示す癌への輸送担体として環状 RGD ペプチド [c(RGDfK)] とをそれぞれ Fmoc 固相合成法により合成後 (固相合成にてアスパラギン酸ペプチドの N 末端に DOTA を導入)、結合させた化合物  $\text{DOTA-D}_n$ -

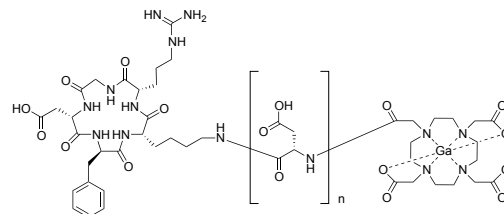


図 3. Ga-DOTA-D<sub>n</sub>-c(RGDfK)の構造

c(RGDfK)を合成し、まず、非放射性 Ga を用いた錯形成反応を行い MS により錯体の化学形 [Ga-DOTA-D<sub>n</sub>-c(RGDfK), 図3]を確認した。その後、 $^{67}\text{Ga}$  [本研究では、基礎的検討として、代替核種として半減期が長い  $^{67}\text{Ga}$  (半減期 78 時間) を用いた] を用いた標識反応を行い、HPLC にて目的の標識体を確認、精製した。尚、HA への親和性 (骨への集積性) はアスパラギン酸のペプチド鎖長に依存して変化することが予想されるため、異なった鎖長 (n=8 or 11) のペプチドを合成した。

(2) ハイドロキシアパタイト (HA) 結合実験と  $\alpha\beta_3$  インテグリン競合阻害実験  
合成した化合物は HA と結合することにより骨に集積すると想定していることから、HA 結合実験により  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-D<sub>n</sub>-c(RGDfK) と HA との親和性を評価した。一方、 $\alpha\beta_3$  インテグリンと

の結合により腫瘍に集積すると想定していることから、 $\alpha\beta_3$  インテグリンを固定化したプレート上での Ga-DOTA-D<sub>n</sub>-c(RGDfK)と <sup>125</sup>I 標識 c(RGDyK)との競合阻害実験により Ga-DOTA-D<sub>n</sub>-c(RGDfK)、ポジティブコントロールとして c(RGDfK)の  $\alpha\beta_3$  インテグリンへの親和性を測定し、D<sub>n</sub>や Ga-DOTA 構造の導入による環状 RGD ペプチド[c(RGDfK)]の  $\alpha\beta_3$  インテグリンへの親和性の変化を評価した。

#### (3) 担癌マウスにおける SPECT イメージング、体内放射能分布実験

$\alpha\beta_3$  インテグリンが過剰発現していることが報告されている U87MG ヒトグリオーマ細胞をヌードマウスに皮下移植し、担癌マウスを作製した。その担癌マウスを用い、<sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>、<sup>67</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK)、<sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)の SPECT 撮像を行った。一方、投与後、1, 4 時間後にマウスを屠殺し、各組織を摘出、重量と放射能を測定することにより体内放射能分布を評価した。

#### (4) 骨への輸送担体であるアスパラギン酸の L-体、D-体の検討

本プローブにおいて、アスパラギン酸ペプチドリンカーは L-アスパラギン酸を繰り返し結合させたペプチドを用いて作製した。しかし、D-アミノ酸ペプチドの方が L-アミノ酸ペプチドよりも生体内安定性が高いため、プローブの構成アミノ酸として適している可能性がある。そのため、L-アスパラギン酸ペプチド D<sub>n</sub>と D-アスパラギン酸ペプチド d<sub>n</sub>の RI の骨指向性キャリアとしての相違について検討した。

#### (5) 治療核種 <sup>90</sup>Y 標識化合物の基礎的検討

<sup>67</sup>Ga 標識と類似な方法により <sup>90</sup>Y-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)の合成を行った。次いで、HA との結合実験、ノーマルマウス体内放射分布実験を行うことにより <sup>90</sup>Y-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨転移部位と原発巣の同時診断を可能とする新規 <sup>68</sup>Ga 標識薬剤の設計・合成

<sup>67</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK)、<sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>8</sub>-c(RGDfK)、<sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)をそれぞれ放射化学的収率 90%、94%、92%、放射化学的純度 97%以上で合成した。

#### (2) HA 結合実験と $\alpha\beta_3$ インテグリン競合阻害実験

HA 結合実験の結果、<sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>8</sub>-c(RGDfK)と <sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)は HA への高い結合性を示し、その結合は HA の濃度依存的に上昇した。一方、アスパラギン酸ペプチドを含まない <sup>67</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK)は、HA へは全く結合しなかった。

<sup>125</sup>I 標識 c(RGDyK)とのインテグリン競合阻害実験の結果、c(RGDfK)、Ga-DOTA-c(RGDfK)、Ga-DOTA-D<sub>8</sub>-c(RGDfK)、Ga-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)それぞれの IC<sub>50</sub> 値(nM)は、15.1 ± 8.1、7.7 ± 1.8、13.5 ± 5.6、10.7 ± 1.9 であり、統計的に有意な差はみられなかった。つまり、c(RGDfK)ペプチドに Ga-DOTA 錯体やアスパラギン酸ペプチドを導入しても  $\alpha\beta_3$  イン

テグリンへの親和性には影響しないことが示された。

#### (3) 担癌マウスにおける SPECT イメージング、体内放射能分布実験

担癌マウスにおける <sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>、<sup>67</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK)、<sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)の SPECT 画像を図4に示す。<sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>は赤矢印で示す腫瘍に集積を示さず、オレンジ矢印で示す脊椎および他の骨への高い集積を示した。<sup>67</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK)は、骨へ集積を示さず、腫瘍への高い集積を示した。一方、<sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)は、骨と腫瘍への両方に高い放射能集積を示した。体内放射能分布実験の結果、SPECT 画像と矛盾ない結果を示し、c(RGDfK)過剰量投与により <sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)の腫瘍への集積は有意に低減した。以上の結果、本プローブによる原発巣、骨転移巣の同時診断の可能性が示唆され、本薬剤設計の有用性が示された。

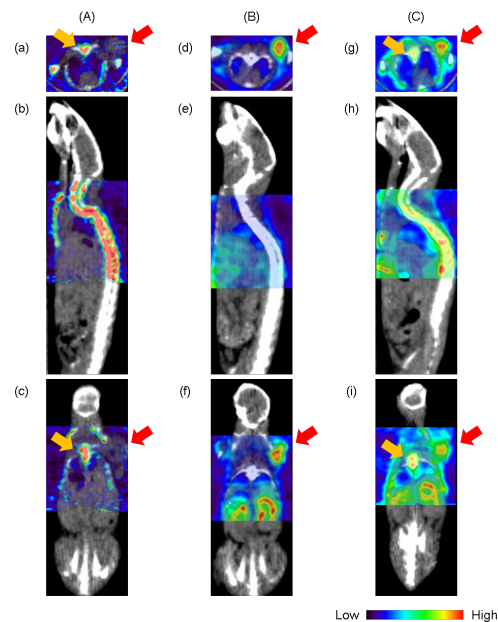


図4. 担癌マウスへのトレーサ投与 2 時間後の SPECT/CT 画像

(A) <sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub> (7.9 MBq/mouse) (a; axial, b; sagittal, c; coronal), (B) <sup>67</sup>Ga-DOTA-c(RGDfK) (7.0 MBq/mouse) (d, axial, e; sagittal, f; coronal), or (C) <sup>67</sup>Ga-DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK) (4.9 MBq/mouse) (g, axial, h; sagittal, i; coronal). Red arrows indicate the site where tumor cells were injected and orange arrows indicate the spine.

#### (4) 骨への輸送担体であるアスパラギン酸の L-体、D-体の検討

Ga-DOTA-D<sub>n</sub>と Ga-DOTA-d<sub>n</sub>を合成し、評価した結果、ハイドロキシアパタイトへの親和性は差がなく、尿分析により D-アスパラギン酸ペプチドの方が生体内安定性は高いとの結果が得られた。しかし、Ga-DOTA-D<sub>n</sub>と Ga-DOTA-d<sub>n</sub>のマウス体内放射能分布を比較した結果、両プローブの血液クリアランスが著し

くはやかだったため、安定性が体内分布に反映されず、差は観察されなかった。しかしながら、一分子内に複数のキャリアを導入する本薬剤設計コンセプトにおいては、血液クリアランスが Ga-DOTA-Dn や Ga-DOTA-dn ほどは速やかではないために、ペプチドリンカーとして D-アスパラギン酸ペプチドを用いることにより体内動態が改善する可能性があると考えられる。

(5) 治療核種  $^{90}\text{Y}$  標識化合物の基礎的検討  
治療核種である  $^{90}\text{Y}$  を用いた標識とその標識体の評価を行った結果、 $^{90}\text{Y}$ -DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)は、 $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-D<sub>11</sub>-c(RGDfK)とほぼ同様なノーマルマウスにおける体内動態を示し、HA への親和性も高かった。従って、 $^{68}\text{Ga}$  標識体による PET イメージングと  $^{90}\text{Y}$  や  $^{177}\text{Lu}$  などの治療核種で標識した対応するプローブによる RI 内用療法を組み合わせたセラノステイクスシステムの可能性が示された。

#### 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 2 件)

① K. Ogawa, J. Yu, A. Ishizaki, M. Yokokawa, M. Kitamura, Y. Kitamura, K. Shiba, A. Odani. Radiogallium complex-conjugated bifunctional peptides for detecting primary cancer and bone metastases simultaneously. *Bioconjugate Chem*, 26(8), 1561-1570 (2015)

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00186

② K. Ogawa, A. Ishizaki, K. Takai, Y. Kitamura, A. Makino, T. Kozaka, Y. Kiyono, K. Shiba, A. Odani. Evaluation of Ga-DOTA-(D-Asp)<sub>n</sub> as bone imaging agents: D-aspartic acid peptides as carriers to bone. *Sci Rep*, 7(1), 13971 (2017)

DOI:10.1038/s41598-017-14149-7

[学会発表] (計 5 件)

① 小川数馬 "がん診断・治療を目的とした放射性プローブ開発" 日本薬学会第 138 年会

② 石崎淳志, 小川数馬, 三代憲司, 柴和弘, 小谷明 "複数の癌病巣部位の同時診断を目指した PET プローブの基礎的検討" 第 15 回次世代を担う若手のためのフィジカルファーマフォーラム(PPF2017)

③ 石崎淳志, 小川数馬, 小谷明 "多機能性分子プローブによる複数の癌病巣部位の同時検出" 第 35 回分析化学中部夏期セミナー

④ K. Ogawa, J. Yu, A. Ishizaki, M. Yokokawa, Y. Kitamura, K. Shiba, A. Odani "Multifunctional radiolabeled combined peptides for theranostics of primary cancer and bone metastases." *Pacificchem2015*, Honolulu, USA

⑤ 石崎淳志, 小川数馬, 郁靖, 横川大, 小谷明 "新規多機能性 PET プローブによる原発巣と骨転移巣の同時検出" 第 34 回分析化学中部夏期セミナー

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunseki/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 数馬 (OGAWA, Kazuma)

金沢大学・新学術創成研究機構・准教授

研究者番号： 30347471

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鷺山 幸信 (WASHIYAMA, Kohshin)

福島県立医科大学・ふくしま国際医療科学センター・准教授

研究者番号 80313675

中山 守雄 (NAKAYAMA, Morio)

長崎大学・薬学部・教授

研究者番号： 60164373

(4) 研究協力者

石崎 淳志 (Ishizaki, Atusshi)