

令和元年6月19日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18865

研究課題名（和文）核磁気共鳴法を利用したペプチドトランスポーター標的型がん診断プローブの創出

研究課題名（英文）Drug discovery for peptide transporter targeting cancer diagnostic probe using magnetic Resonance Imaging

研究代表者

荒川 大 (Arakawa, Hiroshi)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：40709028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：核磁気共鳴イメージング（MRI）は天然同位体を利用可能であるため、腫瘍における化合物の蓄積を可視的に評価できる可能性を持つ。本研究ではがんを高発現するペプチドトランスポーター（PEPT）を標的とし、フッ素誘導体PEPT基質の核磁気共鳴イメージング（MRI）プローブとしての有用性を検証することを目的とした。結果として、PEPT1およびPEPT2に良好な基質の合成に成功し、そのうち良好なMRIプローブとして期待された化合物のマウスにおける体内動態特性を調べた。一方、MRI解析を行った結果、すい臓がん細胞の担がんマウスモデルでは腫瘍への良好な集積は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチドトランスポーターを高発現する細胞の担がんマウスモデルにおいても、合成した化合物の高い集積が認められなかった。問題点として、MRIの取得には少なくとも1時間程度の時間を要し、また数mMの血中濃度を維持することが必要であった。そのため、今後核磁気共鳴法により外因的な化合物の画像取得を行うには、測定機器の感度上昇が急務と推察された。また化合物側においては高い腫瘍内集積性及び滞留性を持つことが重要であると示唆され、プローブ開発を行う上で事前により詳細な薬物動態学試験を実施する必要性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Magnetic resonance imaging (MRI) is available for natural isotopes, which has the potential to be able to visually assess the accumulation of compounds in tumors. In the present study, we aimed to synthesize a novel MRI probe targeting peptide transporters (PEPT) that are highly expressed in cancer. As a result, we succeeded in synthesis of good substrates for PEPT1 and PEPT2, among which the pharmacokinetic characteristics of the compound expected as a good MRI probe were investigated in mice. On the other hand, favorable tumor accumulation was not observed in xenograft mouse models of pancreatic cancer cells by MRI analysis.

研究分野：薬物動態学

キーワード：MRI がん トランスポーター 診断

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

ポジトロン断層法（PET）はがんの早期発見や治療の経過を観察するために広く用いられているが、放射性核種を用いることや、その半減期が短いために用事合成が必要であり、利用可能な環境や化合物が制限されている。一方、核磁気共鳴イメージング（MRI）は水素原子のみならず、酸素分子やフッ素原子、リン原子など多岐にわたる原子の天然同位体に利用可能であるため、その応用例として腫瘍における化合物の蓄積を可視的に評価できる可能性を持つ。特にフッ素は生体内にほとんど存在しない原子であるため、バックグラウンドの低い画像を取得しやすい。さらに MRI は、非放射性同位体を用いるため用事合成を必要としない利点があり、化合物の安定性が放射能の半減期に依存しないため、経時的な変化が捉えやすい性質を持つ。従来の MRI は解像度が優れず、精密な画像が取得できない問題があったが、最近 MRI 技術の進歩に伴い、高感度画像が取得できるようになった。これらの特性を利用することにより、PET の問題点を解決するプローブの開発が期待できると考えられた。

MRI を利用した新規プローブの標的として、ジペプチドを細胞内に取り込むペプチドトランスポーター（PEPT）が考えられた。PEPT は PEPT1 および PEPT2 の 2 つのサブタイプが知られており、それぞれ小腸と腎臓に高い発現を持つ一方で、その他の組織では発現量が低い。そのため、他の栄養物質を輸送するトランスポーターと比較し、正常細胞におけるプローブの集積性が低いことが期待される。また種々のがん細胞で PEPT が高発現していることが知られており、PEPT をターゲットとした<sup>[14C]</sup>glycyl sarcosine はマウス腫瘍モデルによる膵臓がん細胞への高い移行性が観察され、さらに炎症組織への移行性が低い利点を持つ。加えて、現在臨床において一部のがんに対して外科的手術時の光線力学的診断に用いられている 5-アミノレブリン酸（5-ALA）は、PEPT によってがん細胞内に取り込まれることを利用している。このため、PEPT を利用した画像診断法の開発は、<sup>[18F]</sup>FDG の欠点を克服することに加え、種々のがん種の診断に有用であることが期待された。

これまでに、研究代表者は生体に存在するペプチダーゼに耐性を持つジペプチドアナログ phenylalanine- $\phi$ -Alanine (Phe- $\phi$ -Ala) が PEPT1 の基質となることを明らかとしており、このフッ素誘導体が PEPT 高発現腫瘍の新規 MRI プローブになることが期待された。

### 2. 研究の目的

本申請研究の目的は上述した背景を踏まえ、ジペプチドアナログのフッ素誘導体の合成及び動態的な特性を把握し、また MRI 診断プローブとしての有用性を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ジペプチドアナログのフッ素誘導体を合成し、PEPT1 及び PEPT2 認識性を発現系試験を用いて調べた。代謝安定性を評価するため、ヒト凍結肝細胞とインキュベーション試験を行った。また、合成した化合物をマウスに静脈内投与し、動態特性（分布容積、半減期及び尿中排泄）を調べた。さらに (3,5)-F2-Phe- $\phi$ -Ala を 300 mg/mL/kg の投与量でマウスに尾静脈内投与し、24 時間以内の状態・行動の観察を行なった。化合物の定量については、質量分析器を用いて行った。化合物の腫瘍への集積を評価するため、すい臓がんの担がんマウスモデルを用い、小動物用 MRI 装置による観察を行った。

### 4. 研究成果

PEPT 基質認識性および代謝安定性に優れたフルオロジペプチドの創製を目指し、第一段階と

して化合物の設計および合成を行なった。ペプチダーゼ耐性かつ PEPT1 および PEPT2 に良好な基質となることを過去に見出したジペプチドを基に、5 種類のフルオロジペプチドの合成を行なった (図 1)。これらの PEPT1 および PEPT2 認識性をそれぞれの発現系を用いて調べたところ、mock と比較し全てのジペプチドにおいて良好な取り

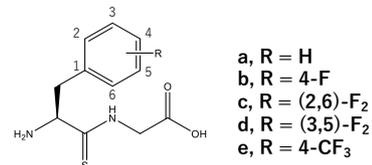


図 1 合成したフッ素誘導体の構造

込み活性が観察された (図 2 (A) 及び (B))。またすい臓がん ASPC-1 細胞においても高い取り込み活性が観察され (図 2 (C))、*in vivo* においても高い集積性が期待された。特に取り込み活性が高く、核磁気共鳴による感度が高いと考えられた (3, 5)-F<sub>2</sub>-Phe-φ-Ala を選択し、マウスを用いた単回投与による簡易毒性試験を行なった。その結果、特筆すべき外観上の変化や致死性などは認められなかった。毒性試験の結果を受け、尿中排泄試験を実施した。マウスに (3, 5)-F<sub>2</sub>-Phe-φ-Ala を尾静脈内投与した後、自由に摂餌・飲水が可能なメタポリカ内で 24 時間飼育した。24 時間分の尿を採取した結果、尿中への未変化体の排泄率は約 5%であった。そのため、検討化合物は代謝により消失すると推察された。

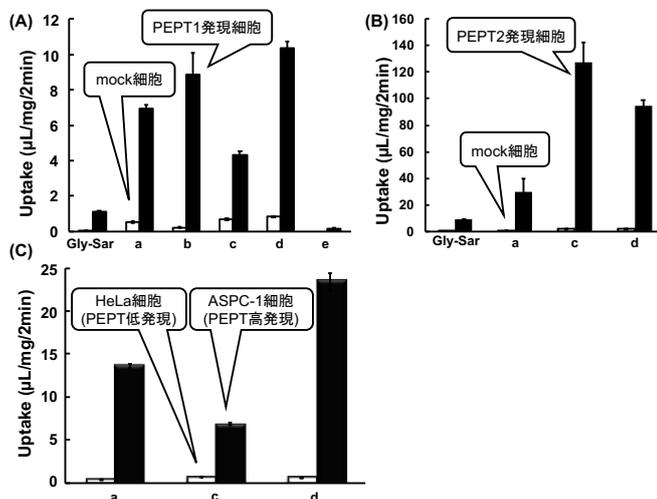


図 2 フッ素誘導体を用いた取り込み試験。(A) PEPT1発現細胞を用いた取り込み試験。(B) PEPT2発現細胞を用いた取り込み試験。(C) すい臓がんASPC-1細胞を用いた取り込み試験。

(3, 5)-F<sub>2</sub>-Phe-φ-Ala の MRI プローブとしての有用性を判断するため、膵臓がん ASPC-1 細胞の担がんマウスを作製し、(3, 5)-F<sub>2</sub>-Phe-φ-Ala を静脈内投与し、核磁気共鳴法による画像取得を行なった (図 3)。その結果、腫瘍特異的な移行は観察されなかった。一方、投与 2 時間後には膀胱への高い

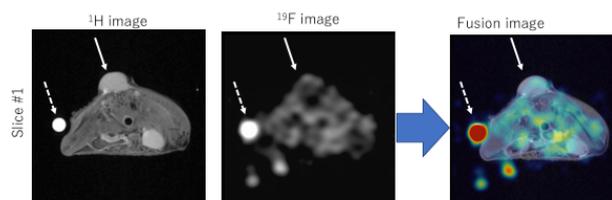


図 3 ASPC-1マウス担がんマウスモデルにおけるフッ素誘導体アナログのMRI画像。実践矢印: 腫瘍部位, 点線矢印: 画像取得確認用の内標準物質。

集積が両化合物において観察された。事前に行なった非担がんマウスにおける薬物動態学試験では、尿中排泄が 5%以下とほとんど認められなかったため、予備試験と異なる挙動を示した。これは、担がんマウスへはフッ素による核磁気共鳴法を用いた一方、予備試験では質量分析器で定量したことと起因すると考えられた。つまり、(3, 5)-F<sub>2</sub>-Phe-φ-Ala が生体内で代謝を受け、さらに尿中排泄されると推察された。肝細胞とインキュベートすることによる安定性は良好であったため、肝外組織において代謝を受けることが示唆されたが、代謝臓器の同定には至らなかった。また画像の取得には少なくとも 1 時間程度の時間を要し、また数 mM の血中濃度を維持することが必要と考えられた。そのため、今後核磁気共鳴法により外因的な化合物の画像取得を行うには、測定機器の感度上昇が急務と推察された。以上の検討から、核磁気共鳴法を利用した腫瘍特異的なプローブの作成には至らなかったものの、今後画像診断をする上で測定機器の進歩が必要であり、また化合物側においては高い腫瘍内集積性及び滞留性を持つことが重要であると示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 1 件）

山田 浩行、荒川 大、阿部 良華、矢野 健太郎、熊本 卓哉、荻原 琢男. ペプチドトランスポーターによって特異的に輸送される新規がん診断プローブの設計とその有用性. 日本薬剤学会第 31 年会, 岐阜, 5/19-21

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

該当なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：荻原 琢男（高崎健康福祉大学薬学部）

ローマ字氏名：Takuo Ogihara

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。