

膀胱癌の包括的診断・治療を目指した ラジオセラノスティクス用プローブ開発

金沢大学 新学術創成研究機構

小川 数馬

I 要 旨

α 線放出核種である ^{211}At は、I などのハロゲンと類似した化学的性質を持つため近年注目されている核種である。本研究では、環状 RGD ペプチドをモデルペプチドとして用い、 $c(\text{RGDfK})$ のフェニルアラニンのベンゼン環パラ位にトリブチルスタニル基を導入した化合物を標識前駆体として ^{211}At 標識した化合物 $[^{211}\text{At}]c[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ を合成し、評価した。Fmoc 固相合成時に Fmoc-D-4-iodophenylalanine を用い $c[\text{R}(\text{Pbf})\text{GD}(\text{OtBu})\text{f}(4\text{-I})\text{K}(\text{Boc})]$ を合成し、ヨウ素をトリブチルスズ化することにより標識前駆体を作製した。標識前駆体を ^{211}At 標識後、保護基を脱保護することにより $[^{211}\text{At}]c[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ を作製した。U87MG 細胞担癌モデルマウスを用い、体内放射能分布実験を行った。U87MG 担癌モデルマウスにおける体内放射能分布実験を行った結果、投与後 1 時間で $[^{125}\text{I}]c[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ および $[^{211}\text{At}]c[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ は、腫瘍組織に高く集積し、両標識化合物は類似した体内分布を示し、 $[^{211}\text{At}]c[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ の RI 内用療法用薬剤としての可能性が示唆された。本標識法の応用性は高く、他の様々な腫瘍指向性ペプチドも ^{211}At 標識が可能と成り得るため、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの親和性を向上させるために RGD ペプチドのダイマーを ^{125}I 標識した化合物を作製し、評価した。

II 目 的

α 線は高い線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer ; LET) を持ち、標的部位に効率よく集積させることができれば高い治療効果が期待できる。 α 線放出核種である ^{211}At は適度な半減期 ($T_{1/2} = 7.2 \text{ hr}$) を有し、I などのハロゲンと類似した化学的性質を持つため近年注目されている核種である。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは α 鎖と β 鎖により細胞表面にて二量体を形成し、細胞接着分子として機能しているインテグリンファミリーの 1 つであり、血管新生のマーカーとして報告されている。加えて、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンはある種の癌細胞に過剰発現しており、膀胱癌イメージングの標的にもなっている。また、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに高い親和性を示す RGD ペプチドは、がん血管新生部位への有望な輸送担体として知られており¹⁾、放射標識 RGD ペプチドは $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを標的とした新しい腫瘍イメージングプローブとして研究が行われてきた。本研究では α 線による RI 内用療法を目指したペプチドの ^{211}At 標識法の確立を目的として、環状 RGD ペプチドをモデルペプチドとし、 $c(\text{RGDyK})$ の D-tyrosine の代わりに D-4-iodophenylalanine を用いて合成した $c[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ のヨウ素をトリブチルスズ化することにより標識前駆体 $c[\text{RGDf}(4\text{-SnBu}_3)\text{K}]$ とし、 ^{211}At 標識することにより $[^{211}\text{At}]c[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ (1) を作製し、評価した。また、同時に比較化合物として ^{125}I 標識化合物 $[^{125}\text{I}]c[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ (2) を作製し、評価した。そして、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの親和性の向上と、より高い腫

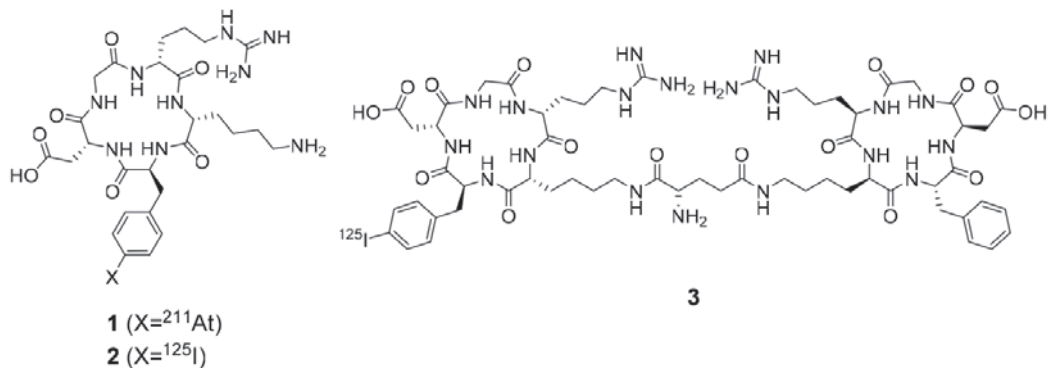


Figure 1

Structures of [²¹¹At]c[RGDf(4-At)K] (1), [¹²⁵I]c[RGDf(4-I)K] (2) and [¹²⁵I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂ (3)

瘍組織への集積を目指して、RGDペプチドのダイマーへこの標識法を応用することとし、[¹²⁵I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂ (3) を作製し、評価した。

III 方法

1 [²¹¹At]c[RGDf(4-At)K] (1) の作製

Fmoc固相合成でc[R(Pbf)GD(OtBu)f(4-I)K] を合成し、脱保護後、ヨウ素をトリブチルスズ化することにより標識前駆体を作製し、²¹¹At標識することにより化合物1を得た。

2 [¹²⁵I]c[RGDf(4-I)K] (2) の作製

Fmoc固相合成でc[R(Pbf)GD(OtBu)f(4-I)K] を合成し、脱保護後、ヨウ素をトリブチルスズ化することにより標識前駆体を作製し、¹²⁵I標識することにより化合物2を得た。

3 [¹²⁵I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂ (3) の作製

Fmoc固相合成でc[R(Pbf)GD(OtBu)fK] 及びc[R(Pbf)GD(OtBu)f(4-I)K] を合成し、両者を、グルタミン酸をリンカーとして結合させた。ヨウ素をトリブチルスズ化することにより標識前駆体を作製し、¹²⁵I標識後、保護基を脱保護することにより化合物3を得た。

4 α_vβ₃インテグリンに対する競合結合実験

過去に行われた方法²⁾ をもとに、Binding buffer (20 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 0.1% BSA) を作製し、EMEMメデイウムで5% CO₂、37°C条件下において培養したU87MGヒトグリオーマ細胞を 2×10⁵個/binding buffer 100 μLとなるように調整し、マルチスタリオン96ウェルプレート (Merck) に100 μLずつ加えた。次に、放射性リガンドとして [¹²⁵I]c[RGDy(3-I)V]、非放射性リガンドとしてc[RGDfK]、c[RGDf(4-I)K]、及びE{c[RGDf(4-H/I)K]}₂を用い、ウェルに放射性リガンド (3×10⁵ cpm) 50 μL、及び非放射性リガンド 50 μLを加え、37°Cで1時間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後、反応液を吸引除去し、ウェルをbinding buffer 150 μLで2回洗浄し、乾燥させ、パンチング後、ウェルの放射活性を測定した。GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) のNonlinear regressionによりデータ処理し、IC₅₀を算出した。

5 担癌モデルマウスにおける体内放射能分布実験

U87MGヒトグリオーマ細胞をEMEMメディアウムで5% CO₂、37°C条件下において培養し、細胞数5×10⁶をヌードマウス [4 weeks, BALB/c Slc-nu/nu, female (15-19 g; Japan SLC)] の背面皮下へ移植した。14日後、^{[211At]c[RGDf(4-At)K]} (1) と ^{[125I]c[RGDf(4-I)K]} (2) の混合溶液 (74 kBq, 37 kBq) を担癌モデルマウスに尾静脈投与した。投与1、4時間後にマウスを屠殺し、各臓器を摘出、臓器の重量と放射能を測定した。同様に、^{[125I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂} (3) 37 kBqを担癌モデルマウスに尾静脈投与し、投与1、4時間後にマウスを屠殺し、各臓器を摘出、臓器の重量と放射能を測定した。

6 非放射性リガンドによる阻害実験

前述の担癌モデルマウスと同様のモデルマウスを作製し、c(RGDfK) (0.2 mg/mouse) を ^{[211At]c[RGDf(4-At)K]} (1) と ^{[125I]c[RGDf(4-I)K]} (2) の混合溶液 (74 kBq, 37 kBq) と

同時に尾静脈投与した。投与1時間後にマウスを屠殺し、各臓器を摘出、臓器の重量と放射能を測定した。同様に、c(RGDfK) (0.2 mg/mouse) を ^{[125I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂} 37 kBqと同時に尾静脈投与した。投与1時間後にマウスを屠殺し、各臓器を摘出、臓器の重量と放射能を測定した。

IV 結果

1 ^{[211At]c[RGDf(4-At)K]} (1)、^{[125I]c[RGDf(4-I)K]} (2)、^{[125I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂} (3) の作製

^{[211At]c[RGDf(4-At)K]} (1)、^{[125I]c[RGDf(4-I)K]} (2)、^{[125I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂} (3) はそれぞれ放射化学的収率63%、83%、37%で、精製後の放射化学的純度はいずれも96%以上で得られた。このうち、^{[125I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂} (3) を逆相HPLCにより分析したクロマトグラムをFigure 2に示す。^{[125I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂} (3) と ^{[125I]c[RGDf(4-H/I)K]} (2) は同様の保持時間を示した。

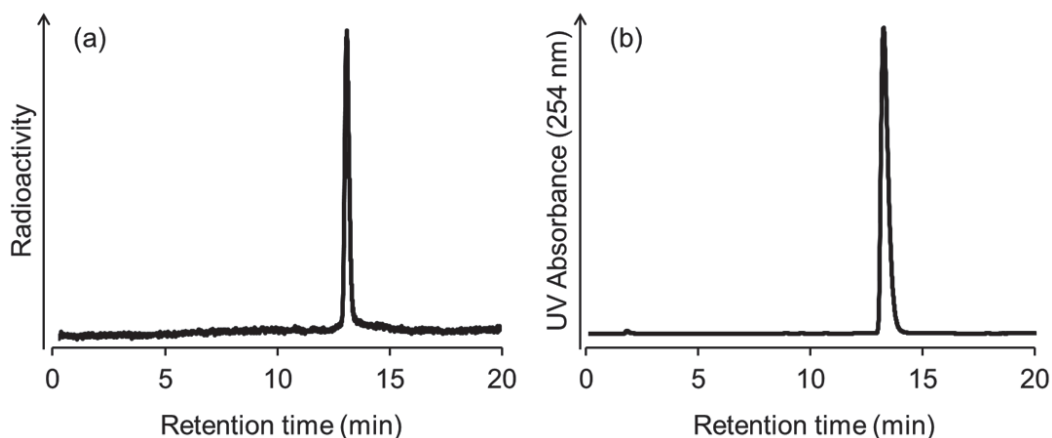


Figure 2

RP-HPLC chromatograms of (a) ^{[125I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂} (3) and (b) ^{[125I]E{c[RGDf(4-H/I)K]}₂}. HPLC condition: a flow rate of 1 mL/min with a gradient mobile phase of 35% methanol in water with 0.1% TFA to 55% methanol in water with 0.1% TFA for 20 min.

2 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する競合結合実験

放射性リガンドを $[^{125}\text{I}]\text{c}[\text{RGDy}(3\text{-I})\text{V}]$ とした、非放射性リガンド $\text{c}(\text{RGDfK})$ 、 $\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ 及び $\text{E}\{\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-H/I})\text{K}]\}_2$ の $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対する IC_{50} 値を Table 1 に示す。 $\text{E}\{\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-H/I})\text{K}]\}_2$ は $\text{c}(\text{RGDfK})$ 及び $\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ に比べ、高い結合親和性を示した。

3 担癌モデルマウスにおける体内放射能分布

$[^{211}\text{At}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ (1)、 $[^{125}\text{I}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ (2)、 $[^{125}\text{I}]\text{E}\{\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-H/I})\text{K}]\}_2$ (3) の担癌モデルマウスにおける体内放射能分布を測定した結果を Figure 3 に示す。いずれも腫瘍組織に高く集積し、投与 4 時間後の $[^{125}\text{I}]\text{E}\{\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-H/I})\text{K}]\}_2$ (3) の腫瘍組織への集積は、 $[^{211}\text{At}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ (1)、 $[^{125}\text{I}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ (2) に比べ有意に増加した。

Table 1 Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of $\text{c}(\text{RGDfK})$, $\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ and $\text{E}\{\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-H/I})\text{K}]\}_2$

	IC_{50}
$\text{c}(\text{RGDfK})$	10.9 ± 4.2
$\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$	23.2 ± 17.2
$\text{E}\{\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-H/I})\text{K}]\}_2$	1.2 ± 0.5

Each result is shown as mean with SD for three experiment

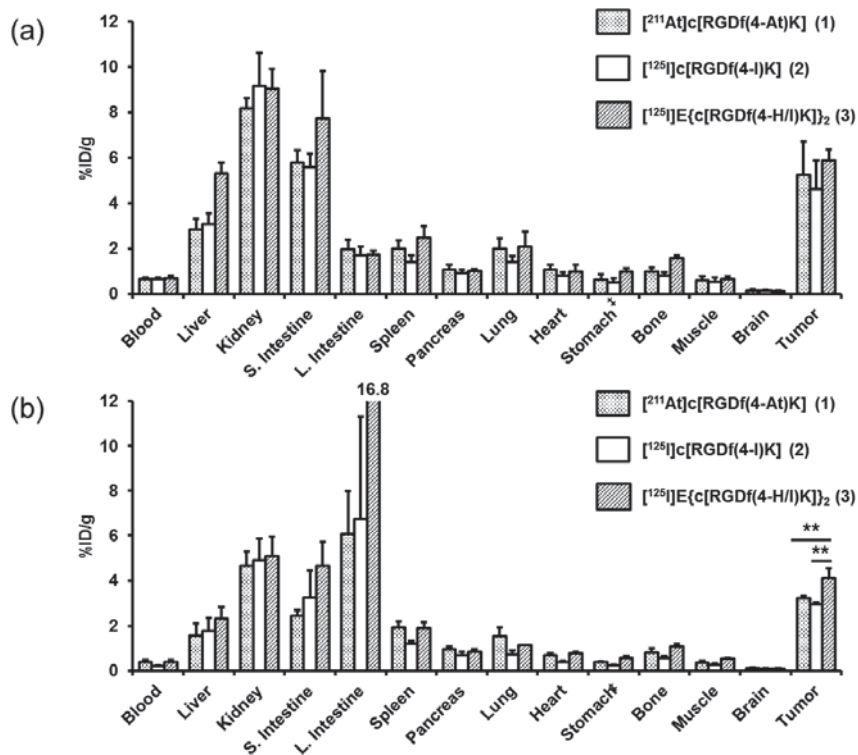


Figure 3

Biodistribution of radioactivity at 1 h postinjection (a) and 4 h postinjection (b). $**p < 0.01$ vs. $[^{211}\text{At}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ (1) and $[^{125}\text{I}]\text{c}[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ (2). *expressed as %ID.

4 非放射性リガンドによる阻害実験

$[^{211}\text{At}]c[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ (1)、 $[^{125}\text{I}]c[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ (2)、 $[^{125}\text{I}]\text{E}\{c[\text{RGDf}(4\text{-H/I})\text{K}]\}_2$ (3) の担癌モデルマウスにおける $\alpha_v\beta_3$ インテグリン阻害実験を行った結果を Figure 4 に示す。過剰量 (0.2 mg/mouse) の非放射性リガンド c(RGDfK) との同時投与により、いずれも腫瘍組織への集積は有意に減少した。

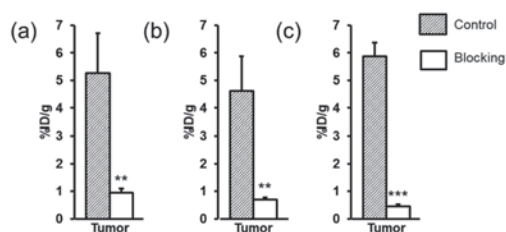


Figure 4

Blocking study of (a) $[^{211}\text{At}]c[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ (1),
(b) $[^{125}\text{I}]c[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ (2)
and (c) $[^{125}\text{I}]\text{E}\{c[\text{RGDf}(4\text{-H/I})\text{K}]\}_2$ (3)
with c(RGDfK) (0.2 mg/mouse) at 1 hour
postinjection. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control.

V 考 察

$\alpha_v\beta_3$ インテグリン阻害実験の結果 (Table 1)、c [RGDf (4-I) K] は c (RGDfK) と同程度の結合親和性を示したことから、c (RGDfK) のフェニルアラニンベンゼン環パラ位へのヨウ素の導入は、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの結合親和性に影響しないことが示唆された。また、E {c [RGDf (4-H/I) K]}₂ は c (RGDfK) 及び c [RGDf (4-I) K] に比べ、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの高い結合親和性を示した。アスタチンに関しては、安定同位体が存在しないため、この方法で結合親和性の評価は行えないが、ヨウ素とアスタチンの類似性より、この実験結果から、アスタチン標識体においても $\alpha_v\beta_3$ インテグリンとの結合親和性は保たれると推測される。

U87MG 担癌モデルマウスを用いた体内放射

能分布実験の結果 (Figure 4)、 $[^{211}\text{At}]c[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ (1) 及び $[^{125}\text{I}]c[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ (2) は生体内で類似した体内分布を示したことから、 ^{123}I 標識した $[^{123}\text{I}]c[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ の SPECT イメージング、 $[^{211}\text{At}]c[\text{RGDf}(4\text{-At})\text{K}]$ の RI 内用療法を組み合わせたラジオセラノスティクスの可能性が示唆された。また、ヨウ素アニオンの集積臓器として知られている胃への放射能集積が低いことから、生体内で顕著な脱ヨウ素化は起こっていないことが示唆された。また、 $[^{125}\text{I}]\text{E}\{c[\text{RGDf}(4\text{-H/I})\text{K}]\}_2$ (3) も腫瘍組織に高く集積し、投与 4 時間後の集積は、 $[^{125}\text{I}]c[\text{RGDf}(4\text{-I})\text{K}]$ (2) に比べ有意に増加し、ダイマーペプチドによるインテグリンへの親和性増加が確認され、今後、非標的組織への集積低下を目指したペプチドを作製、評価していく。

VI 結 語

^{123}I 標識 RGD ペプチドによる SPECT イメージングと ^{211}At 標識 RGD ペプチドによるアルファ線治療を組み合わせた膀胱癌に対するラジオセラノスティクスの可能性が示唆された。

参考文献

- 1) S. Liu *et al*, *Bioconjug Chem* 2015,26:1413-1438
- 2) Y. Mizuno *et al*, *J Med Chem.* 2016,59:3331-3339