

1607 Melanocortin receptor 標的ペプチドを利用した メラノーマ特異的放射性薬剤の評価

長田 瑞樹

(指導教員：川井 恵一 教授)

要旨：メラノーマは皮膚癌の一種で、転移巣が化学療法と放射線治療への抵抗性を示す極めて予後不良な悪性腫瘍であるが、 α 線放出核種を用いた内用療法であればその治療効果が期待できる。本研究では、メラノーマ細胞に過剰発現している melanocortin type 1 receptor (MC1R) に特異的に結合するペプチド α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) にキレート剤である DOTA を導入した結果、4本のカルボキシ基をもつ 4arm-DOTA- α -MSH (4arm) と3本のカルボキシ基を有する 3arm-DOTA- α -MSH (3arm) の2種類のペプチドを合成し、それぞれを PET 用核種 ^{68}Ga と SPECT 用核種 ^{111}In で標識した。MC1R 高発現メラノーマ細胞への経時的細胞集積実験を行った結果、 ^{68}Ga 標識体では 4arm と 3arm で同様の高集積を示したが、 ^{111}In 標識体では 4arm が 3arm より早期に高く集積した。 α -MSH 負荷による MC1R 結合阻害実験の結果、 ^{68}Ga 標識体では 4arm、3arm で同程度の顕著な阻害効果が確認されたが、 ^{111}In 標識 3arm は 4arm に比べて阻害効果が高くより特異的であった。以上より、4arm / 3arm-DOTA- α -MSH はメラノーマ細胞に MC1R 特異的に集積することが明らかとなった。また、DOTA のペプチドへの導入方法や、標識核種によって異なる集積性、親和性を示し、特に ^{111}In 標識体では 3arm が、より MC1R に特異的であることが確認された。

I. はじめに

メラノーマは皮膚癌の一種であり、転移性腫瘍は化学療法と放射線治療への抵抗性を示す、極めて予後の悪い悪性腫瘍である^{1,2)}。しかし、 α 線による内用療法ではその効果が期待できる³⁾ことから、メラノーマに特異的に集積する薬品を α 線放出核種で標識することにより、メラノーマの治療に効果的であると考えられる。また最近では、海外でオクトレオチドというペプチドを用いた内用療法である PRRT (peptide receptor radionuclide therapy) が盛んに行われ^{4,5)}、日本国内でもペプチドを用いた内用療法への注目が高まっており、臨床研究および治験が実施され始めている。そこで、本研究ではメラノーマ細胞膜に過剰発現している melanocortin type 1 receptor (MC1R) に高い結合親和性をもつペプチド α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)^{6,7)}に、 α 線放出核種で特にその治療効果が高いとされる ^{225}Ac ⁸⁾で唯一標識可能な DOTA⁹⁾を導入した DOTA- α -MSH のメラノーマ細胞への集積性と特異性の検討を行った。DOTA をペプチドに導入する際、DOTA 分子中に存在する4本のカルボキシ基のうち1本を使用してペプチドと反応させる場合と、全てのカルボキシ基を残したまま導入する方法があり、 ^{225}Ac で標識した際に DOTA のカルボキシ基の数が標識率や安定性に影響をおよぼす可能性があるため、本研究では両方の DOTA- α -MSH を比較検討した。Fig. 1 に4本のカルボキシ基を残した 4arm-DOTA- α -MSH (4arm) を、Fig. 2 にカルボキシ基を1本反応に使用し3本のカルボキシ基を残した 3arm-DOTA- α -MSH (3arm) の構造式を示す。また、DOTA に標識できる核種には ^{225}Ac のほかに PET 用核種である ^{68}Ga や SPECT 用核種である ^{111}In などがあり⁹⁾、これらの核種で標識すればメラノーマ特異的な画像診断が可能となる。そこで本研

究では、 ^{68}Ga と ^{111}In の両方で 4arm-DOTA- α -MSH / 3arm-DOTA- α -MSH を標識し、画像診断や内用療法において重要であるメラノーマ細胞への集積性や親和性を比較検討し、 α 線による内用照射への応用の可能性を評価した。

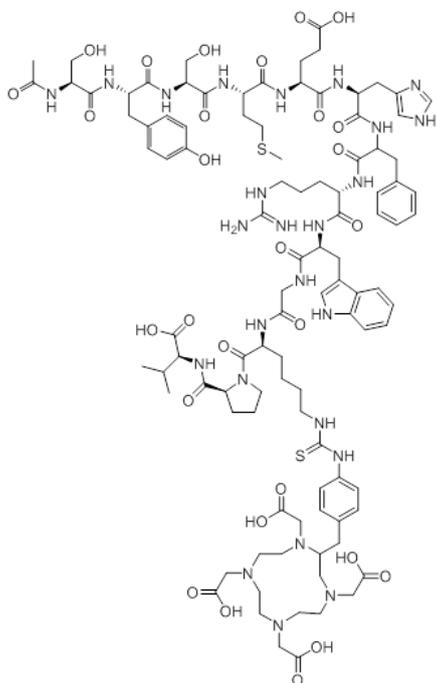


Fig. 1 4arm-DOTA- α -MSH

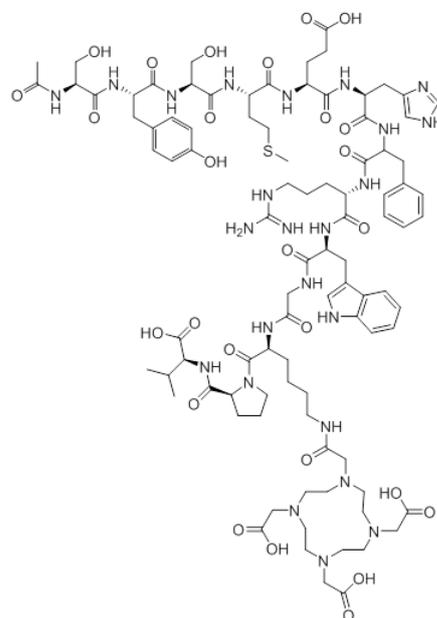


Fig. 2 3arm-DOTA- α -MSH

II. ^{68}Ga / ^{111}In 標識

A) 実験方法と材料

^{68}Ga は ^{68}Ge - ^{68}Ga ジェネレータ (千代田テクノルから譲受) から溶出し、 ^{111}In は日本メジフィジックスより購入した $^{111}\text{InCl}_3$ を使用した。エッペンドルフチューブに入った 4arm-DOTA- α -MSH と 3arm-DOTA- α -MSH 10 μg をそれぞれ 1 M 酢酸アンモニウム溶液 100 μL (pH 5.5) で溶解し、RI を加えてサーモミキサで 70 $^{\circ}\text{C}$ 、1200 rpm の条件で 5 分間反応させ、これを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離精製した。カラムは 5C₁₈-AR-II (4.6 mm \times 250 mm, Nacalai tesque) を使用し、HPLC 分析条件は、流速を 1.0 mL/min、移動相は RI 標識 4arm-DOTA- α -MSH 分析時には 0.1 % TFA in water (pH 2.0) : acetonitrile=73 : 27 とし、RI 標識 3arm-DOTA- α -MSH 分析時は、0 分で 0.01 % TFA in water (pH 2.5) : acetonitrile=76 : 24、20 分で 75 : 25 となるようにグラディエント条件で混合比率を変化させた。純度は、UV ディテクタの波長を 210 nm、ガンマディテクタの電圧を 895 V とした HPLC のクロマトグラムより算出した。細胞実験に使用する際は、窒素還流によりアセトニトリルを除去したものを 20 kBq/100 μL となるように PBS (phosphate buffered saline, pH 7.0, Takara) で調整した。

B) 結果と考察

Fig. 3 に ^{68}Ga 標識 3arm-DOTA- α -MSH の分離精製のクロマトグラムを示す。(b) Radioactivity において、5 分のピークがフリーの ^{68}Ga であり、14 分経過後のピークが ^{68}Ga -3arm-DOTA- α -MSH であると考えられる。その他の RI 標識ペプチドも同様にピークが観察されたが、リテンションタイムが異なり、特に 4arm-DOTA- α -MSH では 2 本のピークが確認された。(Table. 1, 2) これは立体構

造が異なる 2 種類の標識体が生成したためだと考えられる^{10, 11)}。1 本目は未標識体のペプチドとピークが重なってしまうため 2 本目のピークを分取した。標識率はどの標識ペプチドも 90 % 程度と高い標識率が得られた。

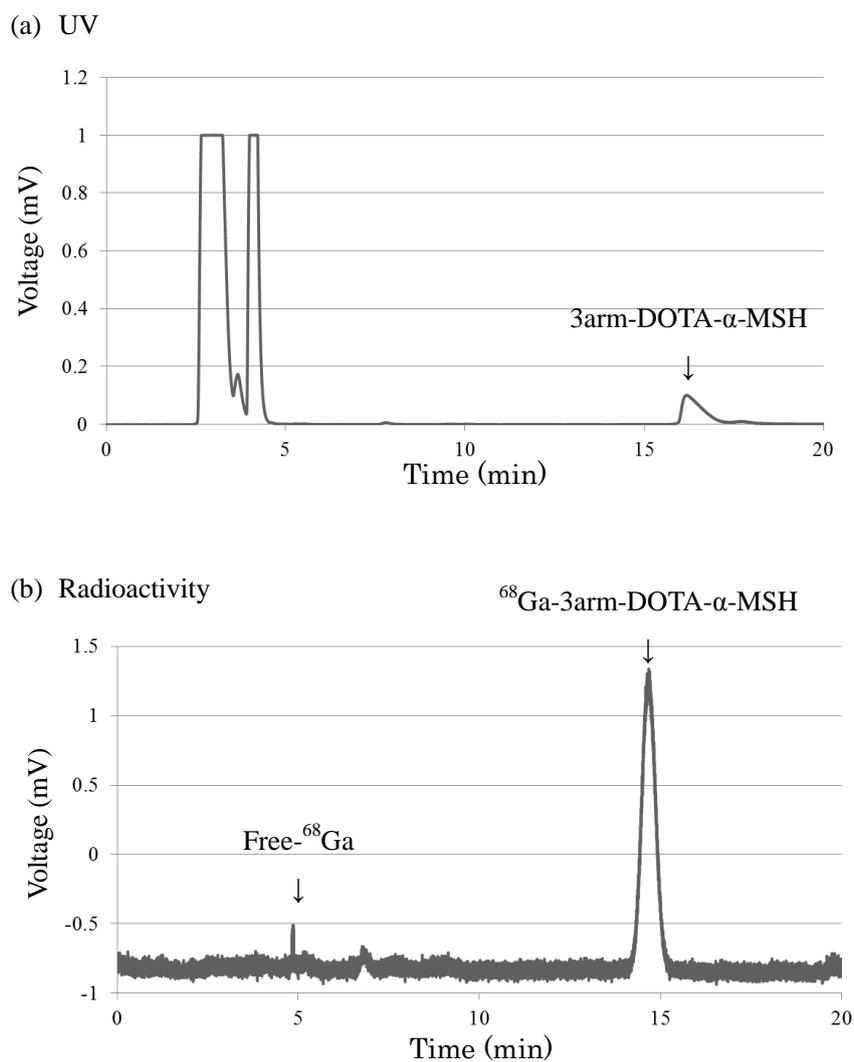


Fig. 3 ⁶⁸Ga-3arm-DOTA-α-MSH の HPLC クロマトグラム

Table. 1 ⁶⁸ Ga 標識 HPLC		Table. 2 ¹¹¹ In 標識 HPLC	
ペプチド	リテンションタイム (min)	ペプチド	リテンションタイム (min)
未標識 4arm	10	未標識 4arm	13
⁶⁸ Ga 標識 4arm	10, 13	¹¹¹ In 標識 4arm	13, 16
未標識 3arm	16	未標識 3arm	17
⁶⁸ Ga 標識 3arm	14	¹¹¹ In 標識 3arm	20

III. 経時的細胞集積実験

A) 実験方法と材料

腫瘍細胞には MC1R 高発現細胞であるマウス由来メラノーマ細胞 B16F1 を使用した。この細胞を 10 % ウシ胎児血清 (大日本製薬) と 5 % sodium pyruvate (Sigma) を加えた培地 D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Wako) で 37 °C、5 % CO₂ で培養し、80 % コンフルエントな状態で培地を除去した。II で使用した PBS (pH 7.0) で細胞表面を洗浄後、0.25 % trypsin-EDTA (trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid, Sigma) 溶液で細胞を剥離した。1 well あたり 4×10^5 cells/well になるように培地で調整して、24 well 細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に細胞を播き、播種からおよそ 24 時間培養した後、実験に用いた。培養用の培地を除去し、新たに培地を 300 μ L 加えて 37 °C で約 10 分間プレインキュベーションを行った。その後標識ペプチドを 1 分間隔で 100 μ L (20 kBq) 投与し、37 °C でインキュベートした。投与後 ⁶⁸Ga 標識体は 10, 30, 60 分、¹¹¹In 標識体は 10, 30, 60, 120, 180, 300 分経過後に培地を取り除き、PBS で 2 回洗浄した。細胞を 0.1 M NaOH で溶解し、細胞に集積した薬剤の放射能をオートウェルガンマカウンター (AccuFLEX γ 7010, Aloka) で測定した。

B) 結果と考察

⁶⁸Ga 標識 4arm と 3arm の細胞集積率の経時的变化を Fig. 4 に示す。⁶⁸Ga-4arm と ⁶⁸Ga-3arm のどちらも集積の増加を認めたが、両方の集積量に有意な差は見られなかった。Fig. 5 には ¹¹¹In 標識 4arm と 3arm の細胞集積率の経時的变化を示す。⁶⁸Ga 標識体とは異なり、¹¹¹In-4arm は ¹¹¹In-3arm に比べて早期に集積したが、300 分で有意差は無くなった。この結果より、¹¹¹In 標識体では ¹¹¹In-4arm の集積速度の方が速いことが確認された。

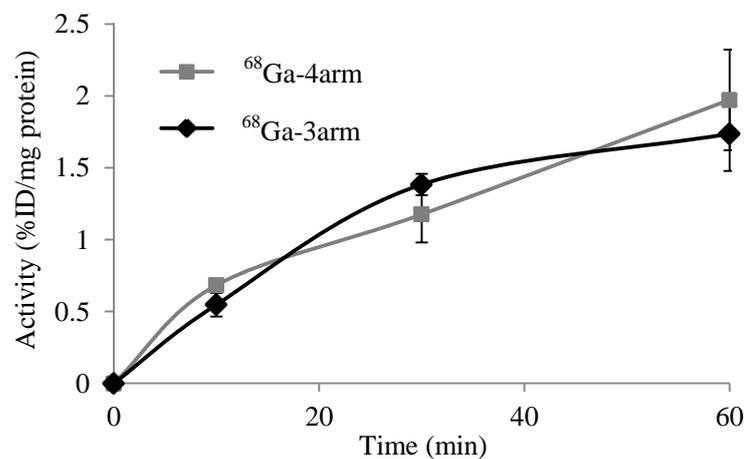


Fig. 4 ⁶⁸Ga 標識体の経時的細胞集積率

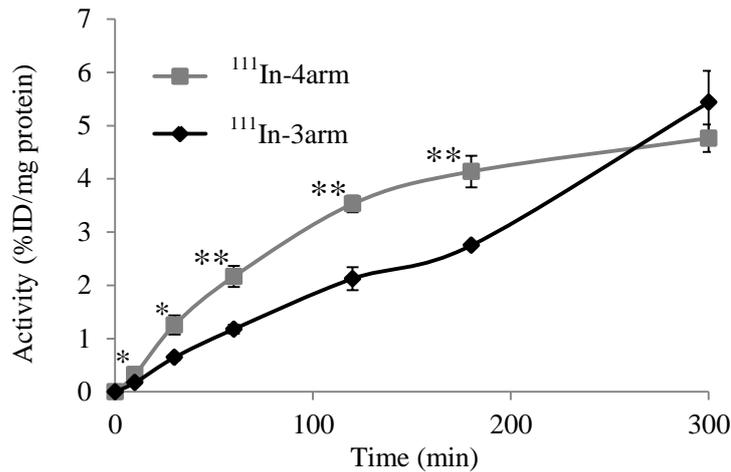


Fig. 5 ^{111}In 標識体の経時的細胞集積

* $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

IV. 阻害剤を用いた細胞内集積競合阻害実験

A) 実験方法と材料

腫瘍細胞には B16F1 に加えて MC1R 低発現細胞であるマウス由来乳がん細胞 4T1 の 2 種類の細胞を使用し、競合阻害剤として $\alpha\text{-MSH}$ (Abcam) を使用した。4T1 では培地に RPMI-1640 Medium (Sigma) を使用し、細胞培養の条件は II -(A)と同様とした。培養用の培地を除去し、新たな培地 300 μL と PBS (pH 7.0) で溶解した競合阻害剤 $\alpha\text{-MSH}$ 50 μL (12 $\mu\text{M}/\text{well}$) を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 3 時間プレインキュベーションを行った。コントロール細胞には培地 300 μL と、阻害剤の代わりに PBS 50 μL を加えた。その後標識ペプチドを 1 分間隔で 100 μL (20 kBq) 投与し、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。 ^{68}Ga 標識体は 1 時間後、 ^{111}In 標識体は 4arm と 3arm で集積性に違いが出た 3 時間後に測定用培地を取り除き、II -(A)と同条件で細胞を溶解した後、細胞に集積した薬剤の放射能を測定し、集積特性について比較検討をした。

B) 結果と考察

Fig. 6 に ^{68}Ga 標識体の競合阻害実験の結果を示す。MC1R 低発現細胞 4T1 のコントロールの集積は MC1R 高発現細胞の集積の半分以下であり、MC1R 低発現細胞のコントロールと阻害剤負荷時には有意差は見られなかった。MC1R 高発現細胞においては ^{68}Ga -4arm、 ^{68}Ga -3arm のどちらも有意な阻害効果が確認され、その集積はコントロールの 60 %程度まで低下したものの、 ^{68}Ga -4arm、 ^{68}Ga -3arm 間では阻害効果に大きな差は見られなかった。Fig. 7 には ^{111}In 標識体の競合阻害実験の結果を示す。 ^{111}In 標識体では MC1R 高発現細胞と MC1R 低発現細胞のコントロールで顕著な集積の差が見られ、MC1R 低発現細胞の集積は MC1R 高発現細胞の集積に対して ^{111}In -4arm で 20 %程度、 ^{111}In -3arm は 10 %以下にまで低下した。また、MC1R 高発現細胞においては ^{111}In -4arm、 ^{111}In -3arm どちらも ^{68}Ga 標識体に比して顕著な阻害効果が確認されたが、その阻害効果は ^{111}In -3arm の方がより大きかったことから、 ^{111}In -3arm の方が ^{111}In -4arm よりも MC1R 親和性が高いことが明らかとなった。 ^{68}Ga 標識体で阻害効果に大きな差が見られなかったのは、 ^{68}Ga -4arm と ^{68}Ga -3arm がどちらも 6 配位で錯体を形成するためだと考えられる。一方 ^{111}In 標識体で阻害効果に違いが見られたのは、 ^{111}In -4arm は 8 配位、 ^{111}In -3arm では 7 配位で錯体を形成することが阻害効果に違いをもたらしたためではないかと推測された。

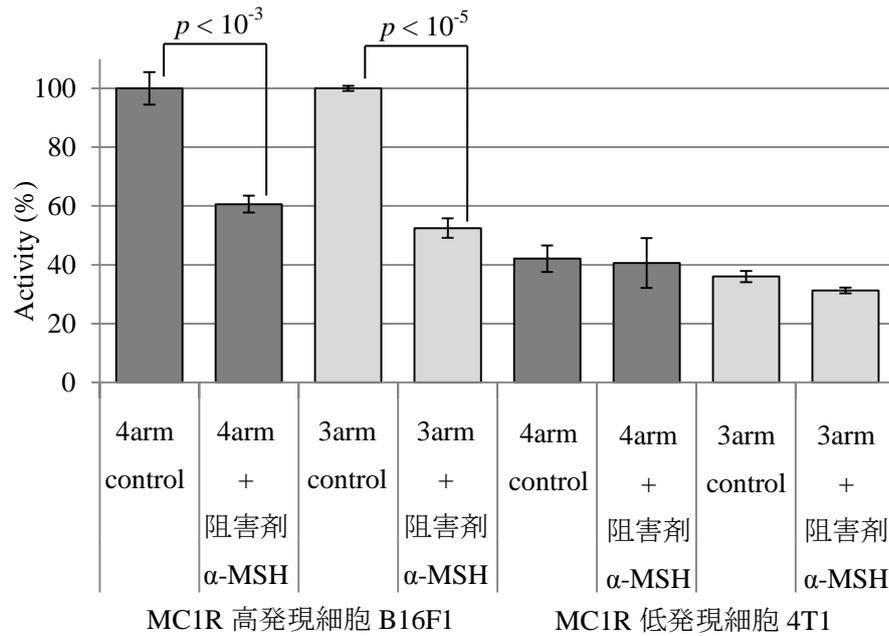


Fig. 6 ⁶⁸Ga 標識体競合阻害

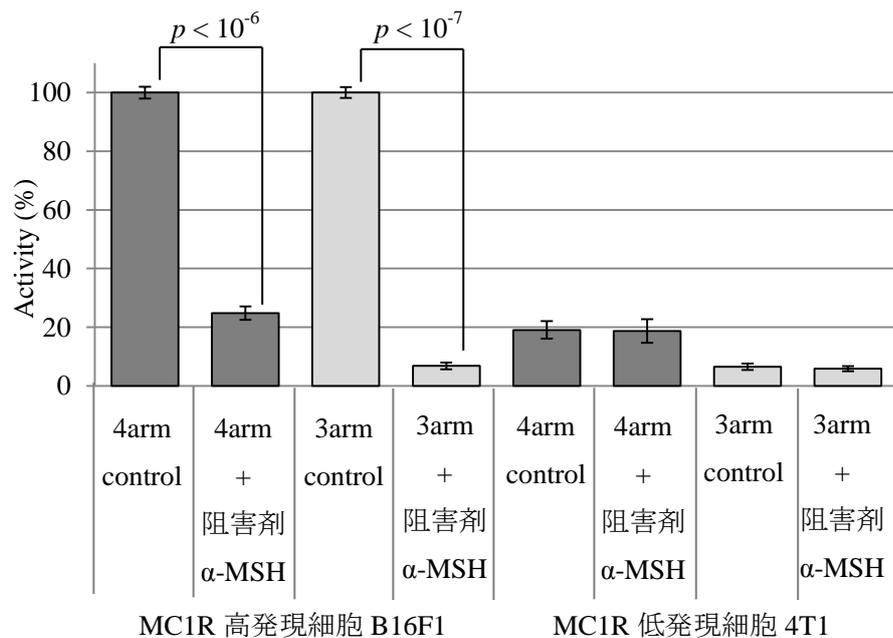


Fig. 7 ¹¹¹In 標識体競合阻害

V. 結語

4arm / 3arm-DOTA-α-MSH は MC1R 特異的にメラノーマ細胞に集積した。その集積は ⁶⁸Ga 標識体では 4arm-DOTA-α-MSH と 3arm-DOTA-α-MSH で大きな差が見られなかったのに対し、¹¹¹In 標識体では 4arm-DOTA-α-MSH で集積速度が速く、3arm-DOTA-α-MSH では高い親和性による特異性が見られた。メラノーマのイメージングに用いる際には、MC1R に対する特異性が重要であることから、¹¹¹In 標識体では 3arm-DOTA-α-MSH の方が適切であると考えられる。今回、DOTA のペプチドへの導入方法や使用した標識核種によって集積性、親和性が異なったため、今後は α 線放出核種である ²²⁵Ac 標識体の集積性や親和性の検討に加えて、⁶⁸Ga / ¹¹¹In 標識体の in vivo における検討を行い、より適切なキレート剤の導入方法を含めたペプチドの化学形を選択する必要がある。

VI. 謝辞

本研究を終えるにあたりご指導くださいました川井 恵一 教授、金沢大学医薬保健研究域附属健康増進科学センターの小林 正和 助教、ご協力いただきました大学院生修士2年加藤 俊貴さんをはじめ本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) Siegel R, Naishadham D, Jemal A : Cancer statistics. *CA.*, 62 : 10-29 (2012).
- 2) Berwick M, Halpern A. : Melanoma epidemiology. *Curr. Opin. Oncol.*, 9 : 178-182 (1997).
- 3) McDevitt MR, Ma D, Lai LT, Simon J, Borchardt P, Frank RK, Wu K, Pellegrini V, Curcio MJ, Miederer M, Bander NH, Scheinberg DA. : Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators. *Science*, 294 : 1537-1540 (2001).
- 4) Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WAP, Kooij PPM, Oei HY, Hagen M, Postema PTE, Jong M, Reubi JC, Visser TJ, Reijs AEM, Hofland LJ, Koper JW, Lamberts SWJ. : Somatostatin receptor scintigraphy with [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹]- and [¹²³I-Tyr³]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 20 : 716-731 (1993).
- 5) Dash A, Chakraborty S, Pillai MR, Knapp FF Jr. : Peptide receptor radionuclide therapy: an overview. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 30 : 47-71 (2015).
- 6) Rajora N, Boccoli G, Burns D, Sharma S, Catania AP, Lipton JM. : alpha-MSH modulates local and circulating tumor necrosis factor-alpha in experimental brain inflammation. *J. Neurosci.*, 17 : 2181-2186 (1997).
- 7) Schioth HB, Muceniece R, Wikberg JE. : Characterisation of the melanocortin 4 receptor by radioligand binding. *Pharmacol. Toxicol.*, 79 : 161-165 (1996).
- 8) Geerlings MW, Kaspersen FM, Apostolidis C, Hout R. : The feasibility of Ac-225 as a source of alpha-particles in radioimmunotherapy. *Nucl. Med. Comm.*, 14 : 121-125 (1993).
- 9) Price EW, Orvig C. : Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.*, 43 : 260-290 (2014).
- 10) Akizawa H, Arano Y, Uezono T, Ono M, Fujioka Y, Uehara T, Yokoyama A, Akaji K, Kiso Y, Koizumi M, Saji H. : Renal metabolism of ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide in vivo. *Bioconjugate Chem.*, 9 : 662-670 (1998).
- 11) Albert R, Miller K, Chong R, Hirth W, Vanderheyden JL, Deutsch K, Deutsch E. : Characterization of the two diastereomers of octreoscan-111, an In-111 labeled peptide for use in cancer imaging. *J. Nucl. Med.*, 33 : 900 (1992).