

射線腫瘍治療薬剤として、有用性が認められている^{1, 2)}。しかし、これらは腫瘍だけでなく、正常な腎臓にも非特異的に放射能が集積・滞留することが問題となっている。一方、これまでに、¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotideのN末アミノ酸へ負電荷を導入することで、腎臓への放射能集積が低減する可能性があることが報告されている。本研究ではこの点に着目し、より精度の高い核医学プローブを開発することを目的とし、DOTA結合体について、N末アミノ酸への負電荷の導入が、化合物の極性や電荷及び腎放射能集積に及ぼす影響について検討した。本研究では、対照化合物として、¹¹¹In-DOTA-D-Phe¹-octreotide (D-Phe体)を合成し、また、D-Phe体のN末アミノ酸を置換した誘導体¹¹¹In-DOTA-Asp¹-octreotide (Asp体)、¹¹¹In-DOTA-Asp-Asp¹-octreotide (Asp-Asp体)を作製し、それらの物性やマウス体内放射能動態を比較検討した。

電気泳動 (Fig. 1-1, 2) を行った結果、いずれのpHにおいても、陽極側への移動度は、D-Phe体 < Asp体 < Asp-Asp体の順に大きかった。従って、DOTA結合体のN末アミノ酸に負電荷を導入した場合、導入した負電荷の数が分子全体の電氣的性質に反映されていることが明らかとなった。この結果は、DTPA結合体における検討結果とも一致している。

n-octanol/buffer分配比 (Table 1) の結果から、いずれの化合物も脂溶性が極めて低かった。さらに、化合物間で比べると、D-Phe体 > Asp体 > Asp-Asp体の順に脂溶性が低下することがわかった。

血漿タンパク結合率 (Table 2) の結果から、いずれの化合物もインキュベーション時間による血漿タンパク結合率の変動は認められなかった。また、化合物間で比較すると、負電荷を導入したAsp体及びAsp-Asp体はD-Phe体と比べ、血漿タンパク結合率が低いことがわかった。この結果は、化合物の脂溶性が低下したことによる影響である可能性が考えられる。

各化合物を血漿中でインキュベートしたところ、Asp体と、Asp-Asp体は、D-Phe体と同様に少なくとも3時間、血漿中で安定に存在していた (Fig. 2)。この結果は、いずれの化合物も、血漿タンパクとの配位子交換や、血漿中の分解酵素による分解をほとんど受けないことを示している。

D-Phe体、Asp体、またはAsp-Asp体をマウスに投与したところ、いずれの場合も、速やかな血液からのクリアランスを示した (Fig. 3)。また、血漿中で高い安定性を考え合わせると、いずれの化合物も未変化体のまま速やかに臓器に移行すると考えられる。さらに、いずれの化合物を投与した場合にも、他の臓器に比べて高い放射能集積が腎臓で観測され、放射能は主に尿中に排泄された (Fig. 6, Table 3~5)。また、化合物間で放射能排泄率を比較すると、D-Phe体 < Asp体 < Asp-Asp体の順に排泄率が増加した。この結果は、負電荷を導入することで、体外放

射能排泄率が増加することを示しており、負電荷の導入は体内被曝量の低減につながると考えられる。

尿中に排泄された放射能を分析したところ、Asp体及びAsp-Asp体は、それぞれ93.1及び95.2%が未変化体であった。またD-Phe体の場合も、92.2%と尿中放射能の大部分が未変化体であることを確認した (Fig. 20~22)。従って、いずれの化合物も投与した放射能の多くが未変化体として腎臓に移行して糸球体濾過され、大部分がそのまま尿中に排泄される一方で、一部が、腎臓に取り込まれたことを示し、この点においては、いずれの化合物も、ほぼ同様の放射能動態を示したと考えられる。

また、血中放射能の経時変化のグラフ (Fig. 3) から、血中薬物濃度の経時変化のグラフ (Fig. 4) を作成して曲線下面積 (AUC) を算出し、全身クリアランス (CL_{tot}=Dose/AUC) から腎クリアランス (CL_{renal}=CL_{tot} · X_{urine}/Dose) を算出すると、D-Phe体、Asp体及びAsp-Asp体の値は、それぞれ0.19、0.18及び0.30 mL/minであった。一方、マウスの糸球体濾過速度 (GFR) の文献値 (0.5 mL/min) とTable 2より算出したタンパク非結合率 (f) の値を用い、マウス腎クリアランスの理論値 (CL_{renal}=GFR · f) を算出すると、D-Phe体、Asp体及びAsp-Asp体の値は、それぞれ0.27、0.33及び0.29 mL/minとなる。これらの値を比較すると、D-Phe体及びAsp体では、実際の値が理論値より低くなった一方、Asp-Asp体は実際の値と理論値にほとんど差がなかった。この結果から、D-Phe体及びAsp体は腎尿細管において再吸収を受けるが、Asp-Asp体はこれらの化合物に比べ再吸収を受けにくいと考えられる。これは、Asp-Asp体の持つ負電荷の影響によるものと推測される。

一方、注目する腎臓への放射能集積量 (Fig. 5) を比較すると、負電荷を導入したAsp体及びAsp-Asp体は、D-Phe体よりも投与1時間後以降、腎放射能集積が低い傾向がみられた。さらに、負電荷を2つ導入したAsp-Asp体は、負電荷1つのAsp体よりも腎放射能集積の低減が認められた。なお、Asp体では投与3及び24時間後において、Asp-Asp体では投与1時間後以降で、D-Phe体よりも有意に腎放射能集積が低減した。一方これまでに、DTPA結合体では、負電荷を導入した¹¹¹In-DTPA-octreotide誘導体の腎放射能集積が減少することが報告されている。¹¹¹In-DTPA-octreotide誘導体は、近位尿細管によって再吸収されると考えられているが、その近位尿細管細胞の管腔側の細胞膜は、負に帯電している。従って、負電荷を導入した誘導体は、代謝物全体が負に帯電し、管腔側細胞膜の負電荷との静電的な斥力によって再吸収が阻害されたと考えられている⁸⁾。本研究で検討したDOTA結合体においても、N末アミノ酸への負電荷の導入により、分子全体の電氣的性質が変化したため、その影響により腎放射能集積が低減する傾向があったものと考えられる。このことは、前述したAsp-Asp体の腎クリ

アランスが増加していた結果とも合致している。

また、担癌マウスを用いた検討においても、ノーマルマウスでの結果と同様、Asp-Asp体はD-Phe体よりも低い腎集積を示した (Fig. 7)。また、腫瘍への集積も確認できた。今回の検討ではAR4-2J細胞の定着率が悪く、n=1での検討であった。特に、Asp-Asp体を用いたマウスはAR4-2J細胞の定着率が非常に悪かったため、Asp-Asp体の腫瘍集積量がD-Phe体よりも低い結果になったものと思われる。

さらに、担癌マウスにおける⁶⁸Ga-PETイメージングにおいても、¹¹¹In標識体での体内分布実験の結果と同様に、Asp-Asp体はD-Phe体よりも明らかに低い腎集積を示した。前述の通り、AR4-2J細胞の定着率が悪かったため、腫瘍への集積は確認できなかったものの、⁶⁸Ga-PETイメージングにおいても腎集積が低減していた結果は、DOTA-octreotide誘導体のN末アミノ酸への負電荷の導入により、腎放射能集積による妨害の少ない、明瞭な画像が得られる可能性を示している。

以上、本研究では、D-Phe体、Asp体及びAsp-Asp体のマウス体内放射能動態を比較検討し、¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体においても、DTPA結合体と同様にN末アミノ酸への負電荷の導入により、腎放射能集積が低減する可能性があることを見出した。

E. 結論

腎臓での放射能集積・滞留を軽減した内用放射線腫瘍治療薬剤を開発する上での基礎的指針を得ることを目的とし、DOTA結合octreotide誘導体について、N末アミノ酸への負電荷の導入が、化合物の極性や電荷及び腎放射能集積に与える影響を検討した。本研究では、対照化合物として¹¹¹In-DOTA-D-Phe¹-octreotide (D-Phe体) を合成し、N末アミノ酸に負電荷を導入した¹¹¹In-DOTA-Asp¹-octreotide (Asp体)、¹¹¹In-DOTA-Asp-Asp¹-octreotide (Asp-Asp体) を合成し、それらの物性やマウス体内放射能動態を比較検討した。その結果、DOTA結合octreotide誘導体においても、DTPA結合体と同様にN末アミノ酸への負電荷の導入により腎放射能集積が低減する可能性があることを見出した。この結果は、D-Phe-octreotide誘導体においては、キレート部位の構造に関わらず、負電荷の導入が腎放射能集積の低減に有効であることを示唆している。さらに、担癌マウスを用いた検討において、腫瘍集積性も保持している可能性があることを明らかにした。本研究成果は、正常な腎臓への集積を低減した、高精度な核医学プローブの開発に有用な知見を与えるものと考えられる。

G. 研究発表

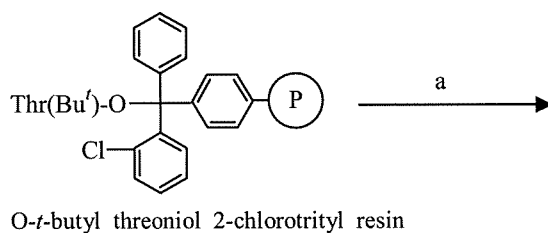
1. 論文発表 なし

2. 学会発表
- (1) 門脇 沙緒莉, 北村 陽二, 廣村 信, 神野 伸一郎, 中島 聡, 御船 正樹, 吉川 豊, 佐治 英郎, 榎本 秀一, 経口糖尿病治療薬としてのZn-DTS錯体の開発, 第8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, 岡山, 2010年3月.
- (2) 竹中 文章, 神野 伸一郎, 北村 陽二, 金山 洋介, 榎本 秀一, 秋澤 宏行, 荒野 泰, N末アミノ酸を置換した¹¹¹In-DOTA結合octreotide誘導体の体内動態に関する検討, 日本薬学会 第130年会, 岡山, 2010年3月.
- (3) 門脇 沙緒莉, 巽 朝菜, 神野 伸一郎, 中島 聡, 北村 陽二, 廣村 信, 御船 正樹, 吉川 豊, 佐治 英郎, 榎本 秀一, 糖尿病治療薬剤としてのZn-DTS錯体の開発, 日本薬学会 第130年会, 岡山, 2010年3月.

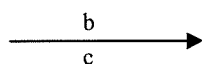
H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Scheme 1



Fmoc-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu')-Cys(Acm)-Thr(Bu')-ol-resin



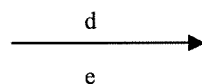
Fmoc-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu')-Cys(Acm)-Thr(Bu')-ol-resin

or

Fmoc-Asp (OBu')-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu')-Cys(Acm)-Thr(Bu')-ol-resin

or

Fmoc-Asp (OBu')-Asp (OBu')-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu')-Cys(Acm)-Thr(Bu')-ol-resin



DOTA(Bu')₃-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu')-Cys(Acm)-Thr(Bu')-ol-resin (1)

or

DOTA(Bu')₃-Asp (OBu')-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu')-Cys(Acm)-Thr(Bu')-ol-resin (2)

or

DOTA(Bu')₃-Asp (OBu')-Asp (OBu')-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys(Boc)-Thr(Bu')-Cys(Acm)-Thr(Bu')-ol-resin (3)

Reagents: (a) Stepwise Elongation; (b) 20% piperidine/DMF; (c) Fmoc-D-Phe-OH or Fmoc-Gly-OH, Fmoc-PABA-OH, HOBt anhydrous, DIPCDI; (d) 20% piperidine/DMF; (e) mDOTA, HOBt anhydrous, DIPCDI.

Scheme 2



DOTA-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys(Acm)-Thr-ol (4)

or

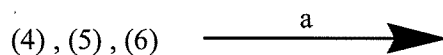
DOTA-Asp-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys(Acm)-Thr-ol (5)

or

DOTA-Asp-Asp-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys(Acm)-Thr-ol (6)

Reagents: (a) TFA, thioanisole

Scheme 3



DOTA-D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol (7)

or

DOTA-Asp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol (8)

or

DOTA-Asp-Asp-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-ol (9)

Reagents: (a) 80% CH₃COOH, 20% I₂/methanol

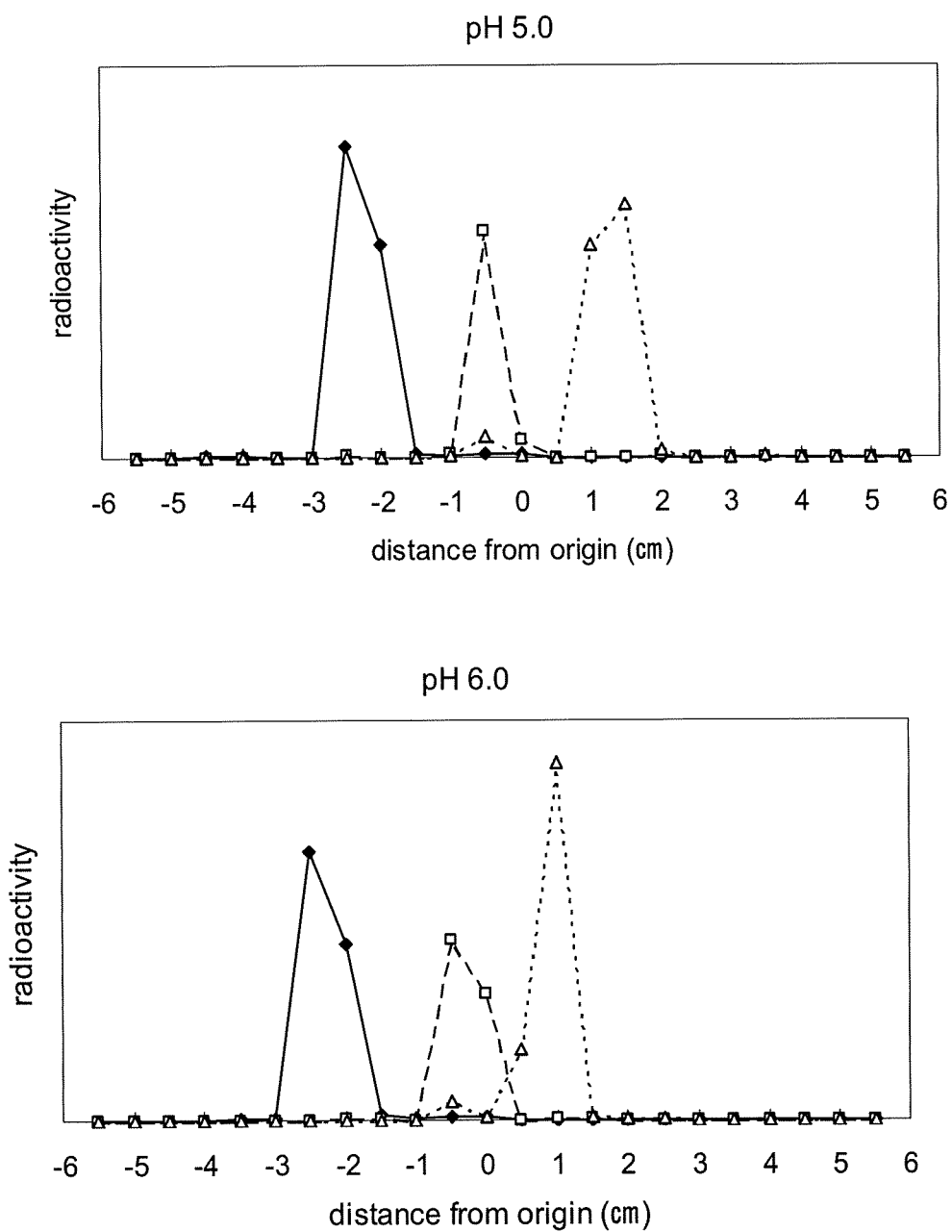


Fig. 1-1. CAE radioactivity profiles of ^{111}In -DOTA-D-Phe¹-octreotide (\blacklozenge), ^{111}In -DOTA-Asp¹-octreotide (\square), ^{111}In -DOTA-Asp-Asp¹-octreotide (\triangle) in 20 mM phosphate buffer at pH 5.0 and 6.0.

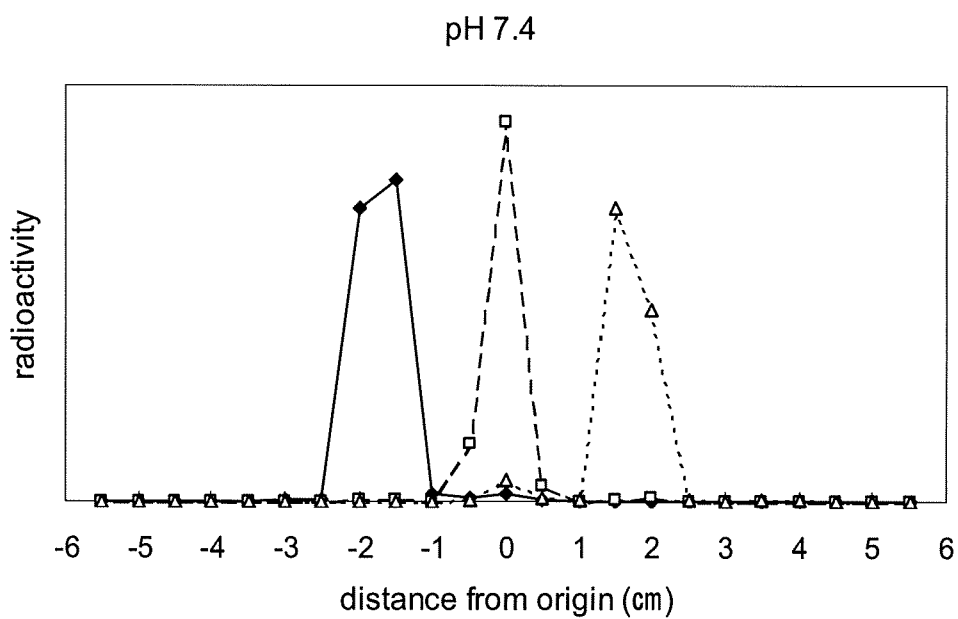
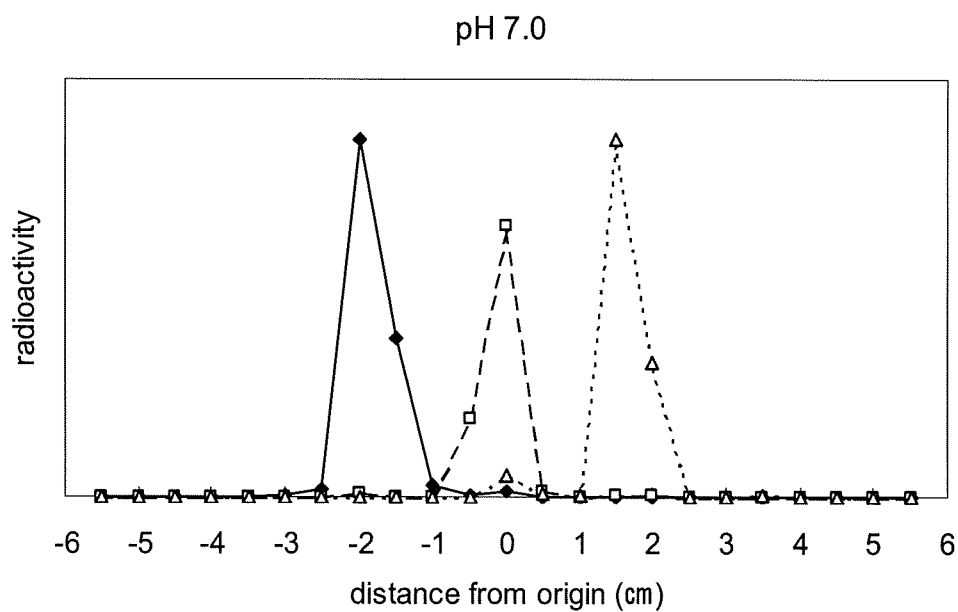


Fig. 1-2. CAE radioactivity profiles of ^{111}In -DOTA-D-Phe¹-octreotide (◆), ^{111}In -DOTA-Asp¹-octreotide (□), ^{111}In -DOTA-Asp-Asp¹-octreotide (Δ) in 20 mM phosphate buffer at pH 7.0 and 7.4.

Table 1. *n*-octanol/buffer partition coefficients of ¹¹¹In-DOTA-octreotide derivatives.

compound	pH of 0.1 M phosphate buffer			
	5.0	6.0	7.0	7.4
¹¹¹ In-DOTA-D-Phe ¹ -octreotide	1.14 (0.28)	0.64 (0.33)	1.23 (0.39)	1.32 (0.36)
¹¹¹ In-DOTA-Asp ¹ -octreotide	0.47 (0.57)	0.27 (0.41)	0.21 (0.28)	0.04 (0.04)
¹¹¹ In-DOTA-Asp-Asp ¹ -octreotide	0.05 (0.08)	0.08 (0.13)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)

Values are expressed as $PC \times 10^4$.

Each value represents the mean (S.D.) for four experiments.

Table 2. Plasma protein binding of ¹¹¹In-DOTA-octreotide derivatives.

	incubation time (h)		
	0	1	3
¹¹¹ In-DOTA-D-Phe ¹ -octreotide	44.2	43.7	49.7
¹¹¹ In-DOTA-Asp ¹ -octreotide	33.3	25.8	40.7
¹¹¹ In-DOTA-Asp-Asp ¹ -octreotide	47.7	40.4	35.0

Values are expressed as percentage of plasma protein binding.

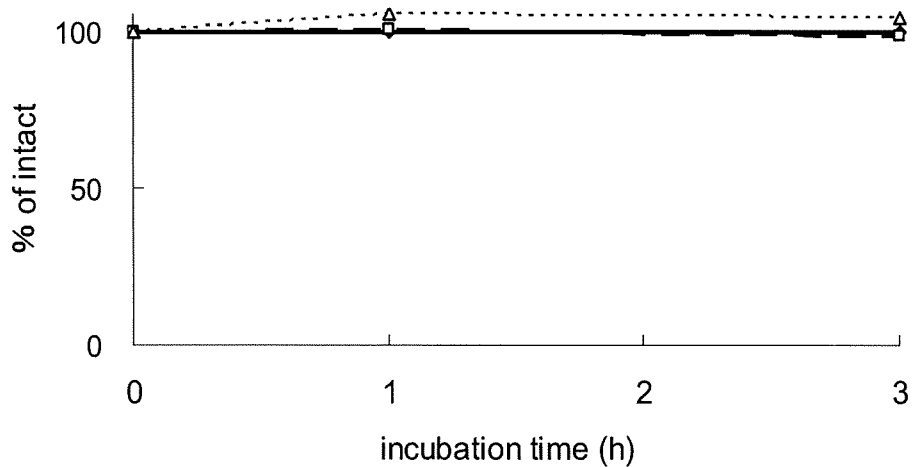


Fig. 2. Stability of ^{111}In -DOTA-D-Phe¹-octreotide (\blacklozenge), ^{111}In -DOTA-Asp¹-octreotide (\square), ^{111}In -DOTA-Asp-Asp¹-octreotide (\triangle), in the freshly prepared plasma at 37°C. Values were determined by RP-HPLC.

Table 3. Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of¹¹¹In-DOTA-D-Phe¹-octreotide in mice.^a

organ	Time after administration				
	10 min	1 h	3 h	6 h	24 h
blood	4.89 (0.35)	0.55 (0.14)	0.17 (0.03)	0.04 (0.02)	0.02 (0.00)
liver	1.79 (0.21)	0.59 (0.15)	0.68 (0.13)	0.36 (0.06)	0.26 (0.07)
kidney	17.35 (1.21)	10.84 (0.65)	11.36 (2.02)	8.38 (1.12)	4.69 (0.98)
intestine	1.19 (0.17)	0.47 (0.09)	0.82 (0.09)	0.57 (0.43)	0.16 (0.03)
stomach	1.68 (0.42)	1.22 (0.39)	1.40 (0.72)	0.69 (0.46)	0.29 (0.08)
spleen	2.05 (0.39)	0.71 (0.07)	1.03 (0.53)	0.45 (0.10)	0.54 (0.21)
pancreas	3.57 (0.80)	1.51 (0.19)	1.33 (0.15)	0.81 (0.17)	0.55 (0.10)
lung	5.60 (0.44)	1.50 (0.41)	0.99 (0.18)	0.68 (0.20)	0.50 (0.11)
^b urine					56.33 (20.77)
^b feces					14.20 (11.44)

^aExpressed as percentage of injected dose per gram. Mean (S.D.) of five animals for each point.^bExpressed as a percentage of injected dose (S.D.).

Table 4. Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{111}In -DOTA-Asp¹-octreotide in mice.^a

organ	Time after administration				
	10 min	1 h	3 h	6 h	24 h
blood	4.11 ^c (0.44)	0.43 (0.11)	0.16 (0.06)	0.12 ^c (0.06)	0.09 ^c (0.04)
liver	1.11 ^d (0.07)	0.24 ^c (0.16)	0.32 ^d (0.08)	0.34 (0.21)	0.30 (0.05)
kidney	19.24 (8.13)	10.00 (1.74)	7.90 ^c (1.92)	7.63 (2.43)	4.24 ^c (2.75)
intestine	0.71 ^d (0.04)	0.18 ^d (0.05)	0.21 ^d (0.05)	0.19 (0.05)	0.09 ^d (0.03)
stomach	3.76 ^d (0.30)	0.14 ^d (0.05)	0.17 ^c (0.14)	0.07 ^c (0.03)	0.19 (0.26)
spleen	1.06 ^d (0.33)	0.54 (0.32)	0.51 (0.20)	0.52 (0.49)	0.51 (0.14)
pancreas	0.53 ^d (0.15)	0.20 ^d (0.06)	0.04 ^d (0.04)	0.11 ^d (0.04)	0.01 ^d (0.02)
lung	3.12 ^d (0.24)	0.47 ^d (0.11)	0.12 ^d (0.02)	0.12 ^d (0.04)	0.06 ^d (0.02)
^b urine					70.07 (20.77)
^b feces					6.47 (0.94)

^aExpressed as percentage of injected dose per gram. Mean (S.D.) of five animals for each point.

^bExpressed as percentage of injected dose (S.D.).

Differences between ^{111}In -DOTA-D-Phe¹-octreotide and ^{111}In -DOTA-Asp¹-octreotide were analyzed by the unpaired Student's *t*-test. ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.005$.

Table 5. Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of ^{111}In -DOTA-Asp-Asp¹-octreotide in mice.^a

organ	Time after administration				
	10 min	1 h	3 h	6 h	24 h
blood	3.61 ^d (0.40)	0.37 (0.13)	0.13 ^c (0.01)	0.10 ^d (0.02)	0.05 ^d (0.01)
liver	1.02 ^d (0.14)	0.47 (0.18)	0.31 ^d (0.07)	0.26 (0.09)	0.27 (0.11)
kidney	17.51 (6.85)	7.57 ^c (3.03)	5.51 ^d (0.68)	5.52 ^c (1.33)	2.86 ^c (0.82)
intestine	0.61 ^d (0.07)	0.09 ^d (0.05)	0.16 ^d (0.03)	0.17 (0.05)	0.06 ^d (0.04)
stomach	4.76 (3.20)	0.08 ^d (0.02)	0.22 ^c (0.19)	0.09 ^c (0.04)	0.13 ^c (0.13)
spleen	0.95 ^d (0.25)	0.61 (0.20)	0.37 ^c (0.09)	0.41 (0.16)	0.50 (0.27)
pancreas	0.43 ^d (0.21)	0.11 ^d (0.04)	0.05 ^d (0.02)	0.07 ^d (0.02)	0.02 ^d (0.02)
lung	2.64 ^d (0.41)	0.32 ^d (0.07)	0.10 ^d (0.01)	0.10 ^d (0.01)	0.05 ^d (0.01)
^b urine					84.27 (0.08)
^b feces					5.26 (1.63)

^aExpressed as percentage of injected dose per gram. Mean (S.D.) of five animals for each point.

^bExpressed as percentage of injected dose (S.D.).

Differences between ^{111}In -DOTA-D-Phe¹-octreotide and ^{111}In -DOTA-Asp-Asp¹-octreotide were analyzed by the unpaired Student's *t*-test. ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.005$.

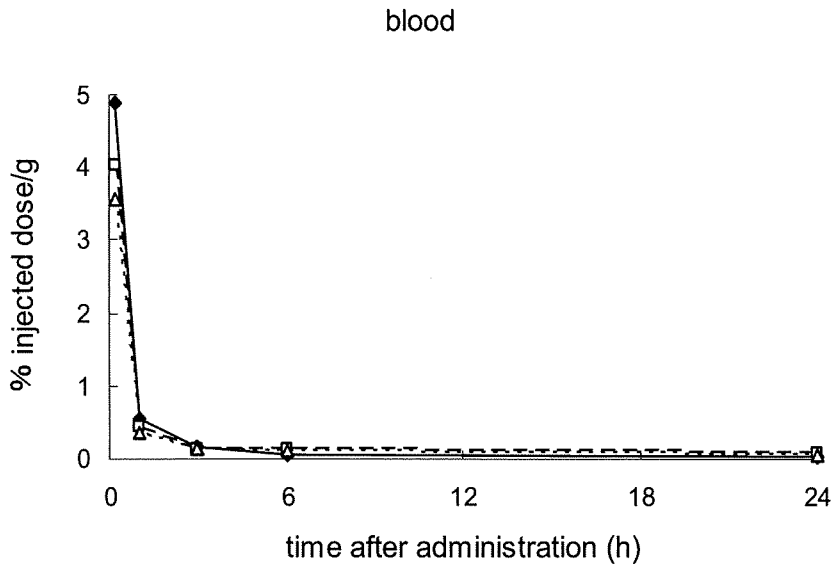


Fig. 3. Blood radioactivity after administration of $^{111}\text{In-DOTA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ (◆), $^{111}\text{In-DOTA-Asp}^1\text{-octreotide}$ (□), and $^{111}\text{In-DOTA-Asp-Asp}^1\text{-octreotide}$ (Δ).

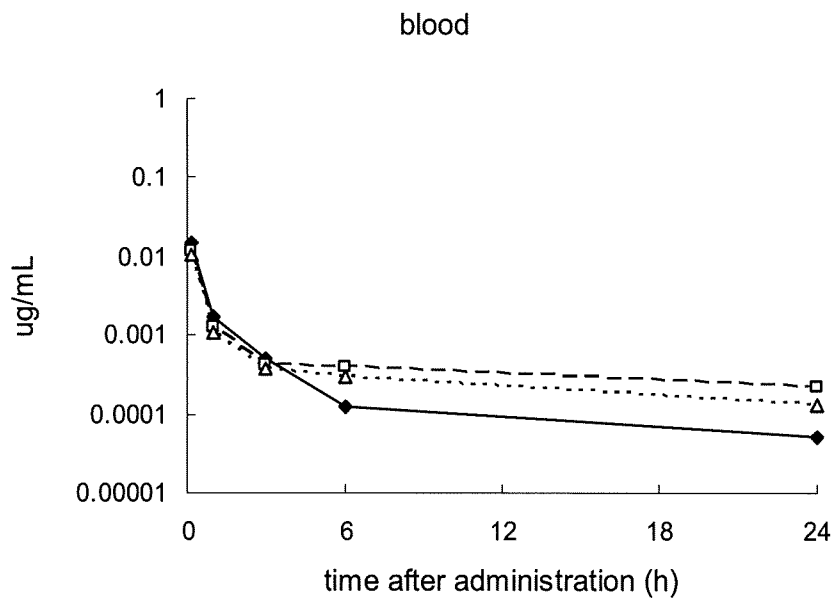


Fig. 4. Drug concentration in blood after administration of $^{111}\text{In-DOTA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ (◆), $^{111}\text{In-DOTA-Asp}^1\text{-octreotide}$ (□), and $^{111}\text{In-DOTA-Asp-Asp}^1\text{-octreotide}$ (Δ).

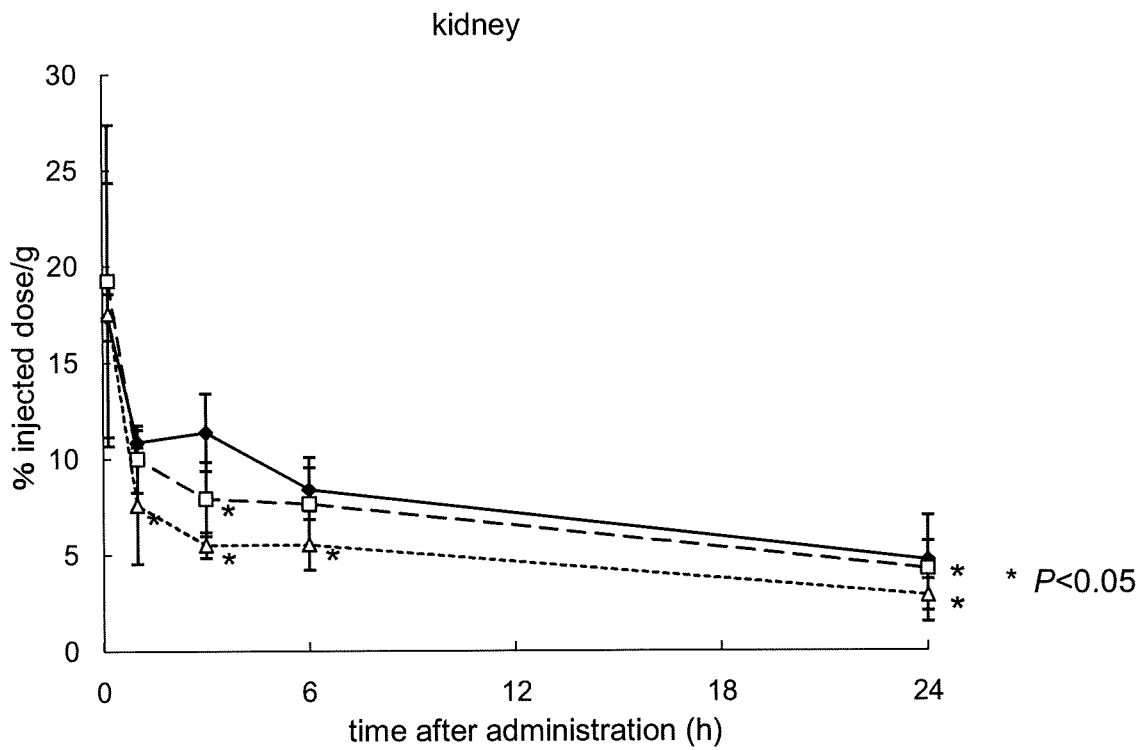


Fig. 5. Kidney radioactivity after administration of $^{111}\text{In-DOTA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$ (♦), $^{111}\text{In-DOTA-Asp}^1\text{-octreotide}$ (□), and $^{111}\text{In-DOTA-Asp-Asp}^1\text{-octreotide}$ (Δ).

* $P < 0.05$ for significantly different from $^{111}\text{In-DOTA-D-Phe}^1\text{-octreotide}$.

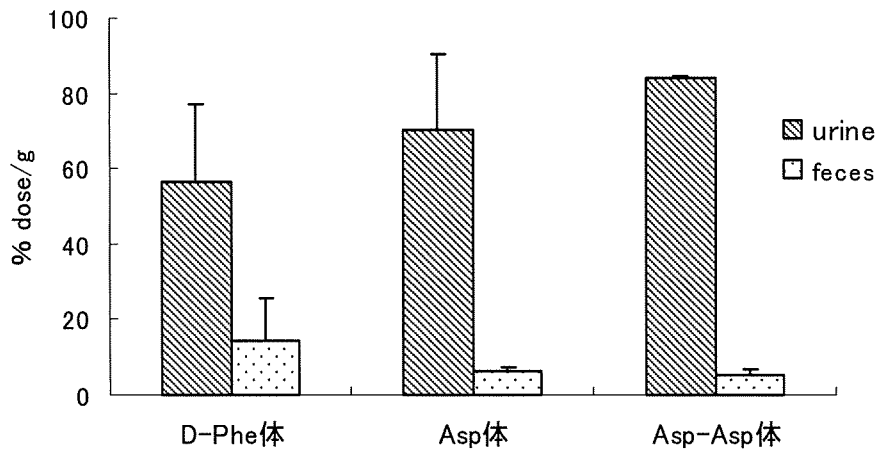


Fig. 6. Radioactivity excreted into urine and feces for 24 h postinjection of ^{111}In -DOTA-D-Phe¹-octreotide, ^{111}In -DOTA-Asp¹-octreotide, and ^{111}In -DOTA-Asp-Asp¹-octreotide.

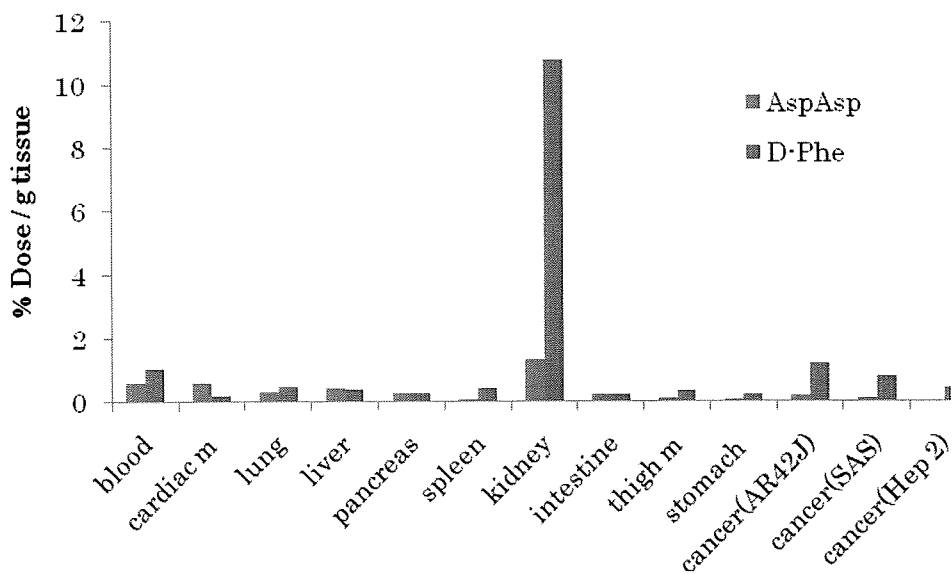


Fig. 7. Biodistribution of ^{111}In -DOTA-D-Phe¹-octreotide, and ^{111}In -DOTA-Asp- Asp¹-octreotide 4 h after injection in tumor bearing mice.

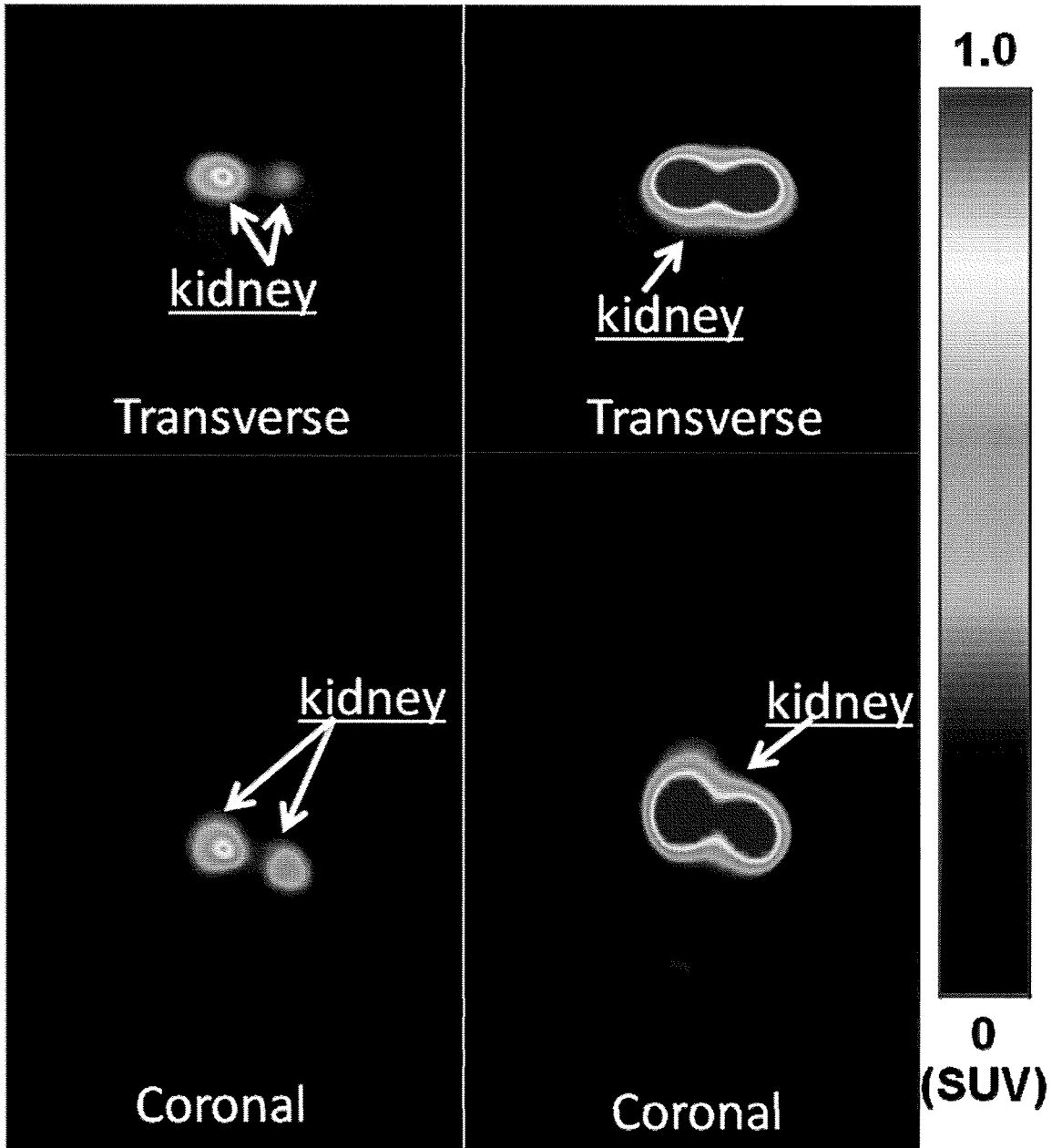


Fig. 8. PET imaging of ^{68}Ga -DOTA-D-Phe¹-octreotide and ^{68}Ga -DOTA-Asp-Asp¹-octreotide.

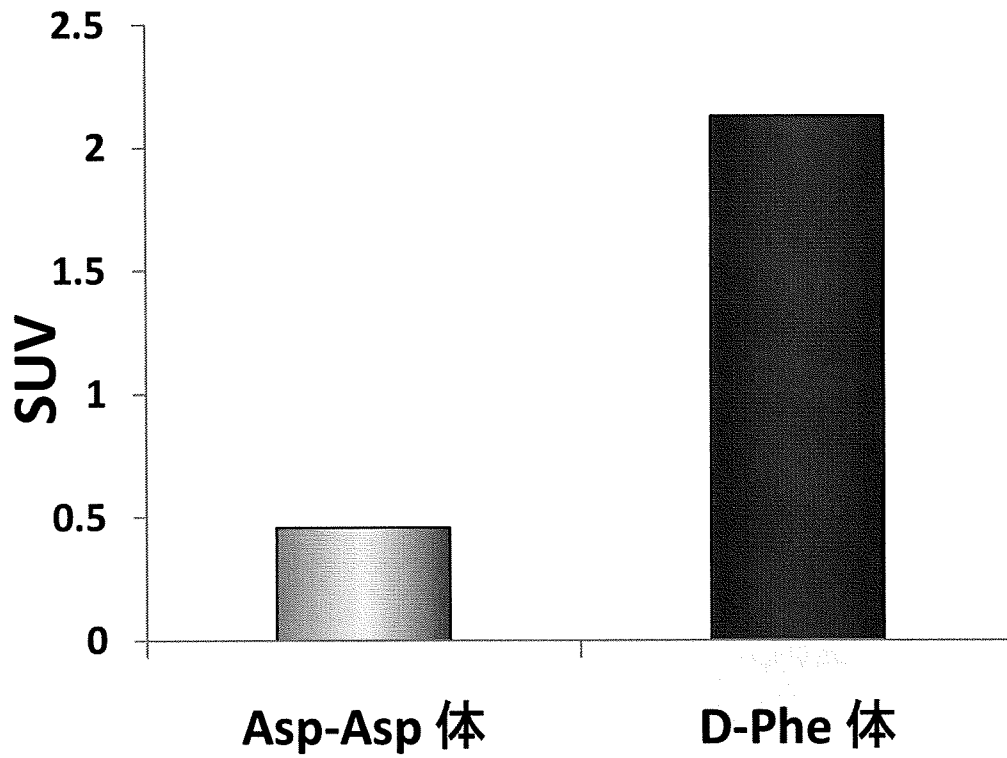


Fig. 9. Total activity (SUV) in Kidney of ^{68}Ga -DOTA-D-Phe¹-octreotide and ^{68}Ga -DOTA-Asp-Asp¹-octreotide.

DOTA-D-Phe-D-Phe-octreotideの早期糖尿病診断薬としての可能性に関する研究

分担研究者・御船正樹 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

研究要旨：本研究では、糖尿病において、血糖値の上昇に先行して膵β細胞数が減少することに着目し、膵β細胞数の減少を検出することで、糖尿病の早期診断を可能とする核医学プローブの開発を目的とした。膵β細胞に発現しているソマトスタチンレセプターのリガンドであるoctreotideを母体化合物として、そのN末アミノ酸を置換した誘導体を設計・合成し、その体内動態を検討した。その結果、¹¹¹In-DOTA-D-Phe-D-Phe-octreotide (D-Phe-D-Phe体) が膵臓に非常に高い集積を示すことを見出した。しかし、1型様糖尿病モデルであるSTZマウスを用いた検討においては、膵臓集積の減少は認められなかった。D-Phe-D-Phe体を早期糖尿病診断として用いられる可能性は低いものの、その膵臓集積のメカニズムを解明することで、新たなプローブ開発に繋がる有益な知見が得られることが期待される。

A. 研究目的

近年、日本では糖尿病患者数が急激に増加しており、今後さらに増加すると考えられている。一方、糖尿病において、血糖値の上昇に先行して、膵β細胞数が減少することが報告されている。糖尿病の発病を早期に診断できれば、重症化する前に治療を開始することができ、重篤な合併症の発現も未然に防げることが期待される。本研究では、早期糖尿病診断薬の開発を目的とし、糖尿病における膵β細胞数の減少を検出可能な核医学プローブの開発を試みた。これまでに、報告者は、本研究課題の分担研究者である北村博士と共同で、ソマトスタチンレセプターのリガンドであるoctreotideを母体化合物とした、神経内分泌系腫瘍の核医学プローブの開発を行ってきた。その研究過程にておいて、DOTA-octreotideのN末アミノ酸を、ベンゼン環を持つアミノ酸であるTyrosine 2個に置換した化合物が、他のN末アミノ酸置換型DOTA-octreotide誘導体と体内動態が異なること、特に、膵臓に比較的高い集積を示すことを見出した。そこで、本研究では、ベンゼン環を持つアミノ酸として、Tyrosineとは脂溶性の異なるD-Phenylalanine (D-Phe) に着目し、DOTA-octreotideのN末にD-Pheを2個導入した化合物を設計し、その体内動態を検討し、糖尿病における膵β細胞数の減少を検出可能な早期糖尿病診断薬としての可能性を検討した。

B. 研究方法

B-1 試薬

4,7,10-tri-(*tert*-butyloxycarbonylmethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-yl-acetic acid (mDOTA) はMacrocyclics社製のものを用いた。O-*t*-butyl threoninol 2-chlor

otritylresinはCalbiochem-Novabiochem社製のものを用いた。Fmoc-アミノ酸誘導体はペプチド研究所製のものを用いた。*N,N*-diisopropyl carbodiimide (DIPCDI) は東京化成工業社製、1-Hydroxy-1H-benzotriazole anhydrous (HOBt anhydrous) は和光純薬社製、*N,N*-dimethylformamide (DMF) はナカライテスク社製のものを蒸留して用いた。Indium chloride-111 (74 MBq/mL in 0.02 M HCl) は日本メジフィジックス社製のものを用いた。他の試薬は、原則として特級試薬を用いた。

B-2 装置

質量分析 (FAB-MS) の測定には、AutoSpec OA-T of (Micromass社) を用いた。非放射性化合物の逆相高速液体クロマトグラフィー (Reversed phase high-performance liquid chromatography; RP-HPLC) の実験において、化合物の分取時には、送液ポンプに、JASCO-PU-980 (日本分光社) を2台使用し、高圧グラジェント法により送液した。検出器には、紫外可視吸光度計SPD-10A (島津製作所) を用い、データ処理にはクロマトデータ処理ソフトJASCO-BORWIN 1.5 (日本分光社) を用いた。ガードカラムには、COSMOSIL 5C₁₈-ARII column (size 10×20 mm、ナカライテスク社)、分取カラムにはCOSMOSIL 5C₁₈-ARI I Column (size 20×250 mm、ナカライテスク社) を使用した。移動相には0.1% TFA / H₂Oとacetonitrileを用い、流速5 mL/minで、60分間でacetonitrileの割合を20から60%へ直線勾配で増加させた。また、化合物の分析時には、送液ポンプにLC-9A (島津製作所) を2台使用し、高圧グラジェント法により送液した。また、検出器には、紫外可視吸光度計SPD-6A V (島津製作所)、記録計にはC-R6A CHROMATOPAC (島津製作所) を使用した。カラムには、COSMOSIL 5C₁₈-AR II column (size 4.6×150 mm、ナカライ

テスク社) を使用し、移動相には0.1% TFA / H₂Oと acetonitrileを用い、流速0.9 mL/minで、30分間でacetonitrileの割合を20から60%へ直線勾配で増加させた。放射性化合物のRP-HPLCによる分析では、送液ポンプにWaters 600E (ウォーターズ社) を使用し、低圧グラジェント法により送液した。カラムには、COSMOSIL 5C₁₈-MS column (size 4.6×150 mm、ナカライテスク社) を使用し、移動相には0.05 M acetate buffer (pH 5.5) とmethanolを用い、流速1 mL/minで、グラジェント溶出した。最初の15分間でmethanolを0%に保ち、続く10分間でmethanolを0から65%に直線勾配で増加させ、最後の25分間はmethanolを65%に保った。また、溶出液をフラクションコレクター (FRAC200, Pharmacia Biotech社) を用いて、1分間隔で分取し、それぞれの画分の放射能を測定した。放射能の測定には、オートウェルカウンター (ARC 2000, Aloka社) を使用した。セルロースアセテート膜電気泳動 (cellulose acetate electrophoresis; CAE) の実験では、セルロースアセテート膜にSeparax-SP (Joko社) を、パワーサプライにはPS1510 (アトー社)、泳動槽にはEC-100 (アドバンテック社) を用いた。マウスの尿と糞便を分別採取するため、代謝ケージ (CM-10S, 日本クレア社) を使用した。

B-3 実験操作

¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の合成

(1) DOTA-octreotide誘導体の合成

Scheme 1に示すように、市販の*O*-*t*-butyl threoninol 2-chlorotriptyl resin (置換率; 0.50 mmol/g) を出発原料として200 mg使用し、固相法により保護ペプチド鎖を延長させた。すなわち、以下に示す (A)、(B) の操作を繰り返し行った。(A) 2.5等量の側鎖保護Fmoc-アミノ酸誘導体、DIPCDI及びHOBt anhydrousを加え、DMF (1 mL) 中で2時間の縮合反応 (本縮合反応はKaiser Testが陰性を示すまで繰り返した)。(B) 20% piperidine/DMF (2 mL) を加え、20分間攪拌し、Fmoc基を除去した。なお、Fmocアミノ酸誘導体には、Fmoc-Cys(Acm)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-D-Trp-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-D-Phe-OH、またはFmoc-PABA及びFmoc-Glyを用いた。*N*末アミノ酸であるD-Phe、またはD-Phe-D-Pheまで延長した後、2.5等量のmDOTA及びDIPCDIとHOBt anhydrousを加え、DMF (1 mL) 中で縮合反応を2時間行い、保護DOTA-D-Phe¹-octreotide樹脂 (1)、保護DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide樹脂 (2)を得た。

次に、Scheme 2に示すように0°C以下に保ちながら、保護DOTA-D-Phe¹-octreotide樹脂 (1) (202.5 mg) に、thioanisole (810 µL) とTFA (8.1 mL) を順次加えた後、室温で2時間攪拌した。0°C以下に冷却した後、diethylether (9.0 mL) を加え、粗[Cys(Acm)^{2,7}]-DOTA-D-Phe¹-octreotide (3) を沈殿させた。沈殿物を6 M guanidine hydrochloride (5.3 mL) で抽出し、ガラスフィルターを用いて樹脂 (resin) を取り除い

た。PTFEフィルター (Millex[®]-LH, MILLIPORE社) を用いた前処理を行った後、RP-HPLCにより精製した。検出波長230 nmでモニターし、目的物を含むフラクションを集め、凍結乾燥し、[Cys(Acm)^{2,7}]-DOTA-D-Phe¹-octreotide (3) (収量27.7 mg、収率17.9%) を白色粉末状物質として得た。

[Cys(Acm)^{2,7}]-DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide (4)については、保護DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide (2) (23.5.6 mg)、thioanisole (942 µL)、TFA (9.4 mL)、diethylether (27 mL)、6 M guanidine hydrochloride (8.2 mL) を用いて、上記と同様の操作を行い、羽毛状白色物質の[Cys(Acm)^{2,7}]-DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide (4) (収量; 28.5 mg、収率; 16.8%) を得た。また、得られた[Cys(Acm)^{2,7}]-DOTA-D-Phe¹-octreotide (3)、[Cys(Acm)^{2,7}]-DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide (4) を、RP-HPLCにより分析したところ、それぞれ保持時間11.9分、15.6分にメジャーピークが観測された。

さらに、Scheme 3に示すように、[Cys(Acm)^{2,7}]-DOTA-D-Phe¹-octreotide (3) (1 mg、0.65 µmol)、[Cys(Acm)^{2,7}]-DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide (4) (1 mg、0.61 µmol)、を80% acetic acid (324 µL) に溶解させ、20% I₂ / methanol (13.5 µL、10.64 µmol) を加え、室温で30分攪拌した。その後、再び20% I₂ / methanol (7.0 µL、5.52 µmol) を加え、さらに室温で30分攪拌した。1 M ascorbic acid水溶液を加え、過剰量のヨウ素を還元させ、PTFEフィルター (Millex[®]-LH, MILLIPORE社) を用いた前処理を行った後、RP-HPLCにより精製した。検出波長230 nmでモニターし、目的物を含むフラクションを集め、凍結乾燥した。上記の操作を複数回行い、最終的にDOTA-D-Phe¹-octreotide (5) (収量4.07 mg、収率16.2%)、DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide (6) (収量6.61 mg、収率25.3%) を白色羽毛状物質として得た。得られたDOTA-D-Phe¹-octreotide (5)、DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide (6) を、RP-HPLCにより分析したところ、それぞれ、保持時間12.4分、16.1分に単一のピークとして観測された。DOTA-D-Phe¹-octreotide: FAB-MS計算値; C₆₅H₉₃N₁₄O₁₇S₂(M+H)⁺: m/z 1406. 測定値; 1406、DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide: FAB-MS計算値; C₆₅H₉₃N₁₄O₁₈S₂(M+H)⁺: m/z 1551. 測定値1551.

(2) DOTA結合octreotide誘導体の¹¹¹In標識

100 µgのDOTA-D-Phe¹-octreotide、またはDOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotideを超純水 (200 µL) に溶解した。さらに0.1 M 酢酸アンモニウム溶液で5倍希釈し、0.1 mg/mL の溶液を調製した。この溶液100 µL に¹¹¹InCl₃の0.02 M 塩酸溶液 (3 µL) を加え、100°Cで1時間インキュベートした。その後、必要に応じてSPEカートリッジ (C₁₈, 1 mL-100 mg, SILICYCLE社) を用いて固相抽出による精製を行い、¹¹¹In-DOTA-D-Phe¹-octreotide (D-Phe体)、または¹¹¹In-DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide (D-Phe-D-Phe体) を得た。電氣的性質の比較には、ここで得られたサンプルを用いた。

また、体内放射能分布実験には、上記のサンプルを、0.1% BSAを含有する10 mM HEPES (2-[4-(2-hydroxy ethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid) buffer (pH 7.6) で32倍に希釈して用いた。上記サンプルをRP-HP LCで分析したところ、D-Phe体、D-Phe-D-Phe体は、ともに保持時間31分に単一のピークが観測された。なお、調製したD-Phe体、D-Phe-D-Phe体の放射化学的純度は、それぞれ96.9%、96.6%であり、これらを実験に使用した。

¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の電気的性質

D-Phe体、D-Phe-D-Phe体の電気的性質を比較するために、セルロースアセテート膜電気泳動 (CAE) を行った。セルロースアセテート膜にSeparax-SP (Joko社) を用い、尿のpHに相当するpH 5.0、6.0、7.0及び血漿のpHに相当するpH 7.4の20 mM phosphate buffer中で60分間泳動した。

¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の脂溶性

D-Phe体、D-Phe-D-Phe体の脂溶性を比較するために、*n*-octanol/buffer分配比を以下のようにして求めた。

n-octanolとphosphate bufferを混合し、一晚放置して飽和させた。有機層及び水層からそれぞれ2 mLずつ採取し、シリコンコーティング (シリコナイズ L-25、Fuji System Corporation) したプラスチックチューブに移した後、D-Phe体、D-Phe-D-Phe体の溶液 (5 µL) を加えた。“1分間ボルテックス-1分間放置”の操作を3回繰り返した後、20分間放置した。この操作を3回繰り返し、3000 rpmで、5分間、遠心分離した。上層 (*n*-octanol層) と下層 (buffer層) をそれぞれ1 mLずつ採取し、それらの放射能を測定し、分配比 (PC) を次式により算出した。

なお、bufferには、尿のpHに相当するpH 5.0、6.0、7.0 及び血漿のpHに相当するpH 7.4 の0.1 M phosphate bufferを用いた。

$$PC = [n\text{-Octanol層の放射能}] / [\text{buffer層の放射能}]$$

¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の血漿中安定性

エーテル麻酔下で、6週齢のddY系雄性マウスから心臓採血し、ヘパリン処理した後、15分間、4°C、1500 rpmの遠心分離により、マウス血漿を調製した。マウス血漿 (240 µL) に、D-Phe体 (10 µL, 0.98 µg, 21.5 kBq)、D-Phe-D-Phe体 (10 µL, 0.98 µg, 21.5 kBq) を添加し、37°Cでインキュベートした。1及び3時間後に試料溶液の一部を採取し、分画分子量10,000の限外濾過膜 (Microcon-10、Amicon社) で濾過した後、RP-HPLCにより分析した。

ノーマルマウスにおける¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の体内放射能分布

1群が5匹よりなる2群の6週齢ddY系雄性マウスに尾静脈よりD-Phe体 (100 µL, 0.3 µg, 6.74 kBq)、またはD-Phe-D-Phe体 (100 µL, 0.3 µg, 6.74 kBq) を投与し、10分、1、3、6及び24時間後、断頭採血、解剖し、関心臓器 (肝臓、腎臓、腸、胃、脾臓、膵臓及び肺) を摘出し、血液と関心臓器の重量と放射

能を測定した。また、放射能の体外排泄経路と排泄量を調べるため、マウスを24時間、代謝ケージで飼育し、投与直後から24時間までに排泄された尿と糞便を採取し、それらの放射能を測定した。

尿の分析

採取した尿をPTFEフィルター (Millex®-LH、MILLIPORE社) を用いて夾雑物を除いた後、分画分子量10,000の限外濾過膜 (Microcon-10、Amicon社) で濾過し、RP-HPLCにより分析した。

STZマウスにおける¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の体内放射能分布

4週齢ddY系雄性マウスに、50 mMクエン酸バッファー (pH 4.5) に溶解したストレプトゾトシン (STZ) を尾静脈より150 mg/kgの容量で投与した。2週間後に血糖値を測定し、高血糖を呈しているマウスを、STZ誘発1型様糖尿病モデルマウスとして、実験に用いた。作製したSTZマウスを用い、ノーマルマウスと同様の方法で、投与10分後の体内放射能分布を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、倫理面にかかわる事項はない。

C. 研究結果

¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の電気的性質

Fig. 1には、¹¹¹In-DOTA-D-Phe¹-octreotide (D-Phe体)、¹¹¹In-DOTA-D-Phe-D-Phe¹-octreotide (D-Phe-D-Phe体) の電気的性質を比較するため、セルロースアセテート膜電気泳動法 (CAE) により分析した結果を示す。Fig. 1に示すように、pH 5.0においては、D-Phe-D-Phe体の方がD-Phe体よりもわずかに陽極側にピークを移動したが、pH 6.0、7.0、7.4においては、ほぼ同じ移動度を示した。

¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の脂溶性

Table 1にはD-Phe体、D-Phe-D-Phe体の*n*-octanol/buffer分配比 (PC) を示す。Table 1 に示すように、D-Phe-D-Phe体の方がD-Phe体よりも有意に脂溶性が高かった。

¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の血漿タンパク結合率

Table 2 には、各時間37°Cでインキュベートした後のD-Phe体、D-Phe-D-Phe体の血漿タンパク結合率を示す。Table 2 に示すように、いずれの化合物もインキュベーション時間による血漿タンパク結合率の変動はみられなかった。しかし、化合物間で比較すると、D-Phe-D-Phe体は、D-Phe体に比べ、タンパク結合率が高かった。

¹¹¹In-DOTA-octreotide誘導体の血漿中安定性

Fig. 2には、D-Phe体、D-Phe-D-Phe体をマウス血漿中でインキュベートし、RP-HPLCにより分析した結果を示す。縦軸には、0時間における未変化体の