

がんにおける膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 の  
インビボ機能解析を目的とした  
核医学分子イメージングプローブ開発に関する研究

2014

近藤 直哉



# 目次

緒言.....	1
第1章 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1の発現量評価を目的とした	
核医学イメージングプローブ開発.....	4
第1節 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1の発現量評価を目的とした	
低分子化抗体プローブの開発.....	6
薬剤設計.....	7
実験方法.....	9
結果.....	14
考察.....	22
第2節 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1の発現量評価を目的とした	
ペプチドプローブの開発.....	24
薬剤設計.....	25
実験方法.....	26
結果.....	31
考察.....	40

## 第2章 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1の活性評価を目的とした

核医学イメージングプローブ開発 .....	43
薬剤設計.....	45
実験方法.....	48
結果.....	55
考察.....	65
結語.....	68
引用文献.....	70
謝辞.....	76

## 緒 言

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) は、多くのがん細胞膜上に過剰発現する酵素であり<sup>[1]</sup>、細胞外基質の分解や、細胞へのシグナル伝達を介して、腫瘍の浸潤、転移に関与している<sup>[2-6]</sup>。したがって、MT1-MMP の発現量や酵素活性のインビボ評価はがんの悪性度診断に有益な情報を提供し得る。一方、核医学分子イメージング法は、陽電子断層撮像法 (PET) や単光子断層撮像法 (SPECT) を用いて、体内に投与された放射性分子プローブと標的分子との生体内相互作用を非侵襲的かつ高感度に捉える臨床画像診断法である。この手法を用い、これまでに MT1-MMP 発現量のインビボ評価を目的とした放射標識抗体プローブ<sup>[7]</sup>が開発されてきたが、抗体は血中からの消失が遅く投与後撮像までに長時間を要する問題を有していた。そこで本研究では、MT1-MMP 発現量及び酵素活性を対象として、投与後早期での核医学画像解析によるインビボ評価を可能とする核医学イメージングプローブの開発について計画した。

まず、MT1-MMP の発現を標的としたイメージングプローブの創製を目的として、MT1-MMP 特異的な結合性を示す低分子化抗体 (scFv、diabody) 及びペプチドを母体とする結合型プローブの開発を計画した。

低分子化抗体は標的への高い親和性、特異性を有し、かつ抗体と比較して速やかに血中より消失するため<sup>[8]</sup>、低分子化抗体プローブの開発により、投与後早期でのイメージングが可能となると期待される。そこで、MT1-MMP へ高い親和性を示す低分子化抗体をファージディスプレイ法により取得し、二官能性キレート試薬 *p*-SCN-Bn-DTPA を介し、SPECT での撮像に適した <sup>111</sup>In を導入した低分子化抗体プローブ (<sup>111</sup>In]scFv、<sup>111</sup>In]diabody) を設計、合成した。MT1-MMP を高発現するがん細胞を皮下移植したモ

デルマウスを用いた体内分布実験の結果、 $[^{111}\text{In}]\text{scFv}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{diabody}$  は投与後速やかに血液より消失し、また早期より腫瘍へ集積したため、イメージングの指標となる腫瘍対血液放射能集積比は投与後早期より抗体プローブを上回る値を示した。さらに両プローブを用いた SPECT 撮像の結果、投与 3 時間後からの撮像により腫瘍の描出が可能であり、また腫瘍内の放射能分布は MT1-MMP 免疫染色による MT1-MMP 発現陽性部位と一致する傾向を示した。以上より、 $[^{111}\text{In}]\text{scFv}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{diabody}$  は投与後早期において MT1-MMP の発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを示した。

一方、ペプチドプローブは生物活性と速やかな体内動態を両立でき、抗体誘導体の場合と異なり標識前駆体との分離精製が容易であることから、比放射能の高い均一なプローブの取得が可能となる利点を有する。

そこで、ペプチドプローブの開発のため、MT1-MMP 結合性ペプチド<sup>19)</sup>を基に、安定性向上、親和性保持を考慮して、C 末に標識用 Cys 残基を追加した D 体ペプチド誘導体 (DC) を設計した。標識には SPECT に適した  $^{123}\text{I}$  を選択し、N-(m- $[^{123}\text{I}]\text{iodophenyl}$ ) maleimide と Cys 残基側鎖チオール基との反応を介し、標識体 ( $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$ ) を低分子化抗体プローブの場合と比較して 5,000 倍以上高い比放射能で得た。基礎実験には  $^{123}\text{I}$  より半減期が長く取扱いの容易な  $^{125}\text{I}$  を用いた。MT1-MMP タンパク質に対する  $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  の結合飽和実験の結果、MT1-MMP への親和性が認められた。担がんモデルマウスを用いた体内放射能分布実験の結果、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  は投与後早期より腫瘍へ集積し、 $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$  投与 30 分後での SPECT 撮像により腫瘍の描出が可能であった。また腫瘍内の放射能分布は MT1-MMP 発現陽性部位と一致する傾向を示した。以上より、 $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$  は投与後早期において MT1-MMP の発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを示した。

また、MT1-MMP イメージングの第二のアプローチとして、その酵素活性を標的としたイメージングプローブの創製を目的に、MT1-MMP 依存的に活性化され標的に集積する機序を有する活性化型プローブの開発を計画した。活性化型プローブの場合、MT1-MMP 1 分子に対し複数のプローブが反応できるため、結合型プローブと比較してより効率的な標的への集積が期待される<sup>[10]</sup>。そこで、活性化型プローブとして、MT1-MMP 基質ペプチド<sup>[11]</sup>によりポリエチレングリコール (PEG) と <sup>18</sup>F 標識蛍光団 (<sup>18</sup>F]BODIPY) を連結したプローブ (<sup>18</sup>F]MBP-2k) を設計した。<sup>18</sup>F]MBP-2k は、がん組織において MT1-MMP による基質ペプチドの切断を経て PEG が離脱すると、<sup>18</sup>F]BODIPY の高い細胞膜透過性<sup>[12]</sup>によりプローブが近傍がん細胞に効率的に取り込まれると期待される。<sup>18</sup>F]MBP-2k は MT1-MMP 高活性細胞に低活性細胞より高く取り込まれ、MT1-MMP 高活性及び低活性腫瘍を移植した担がんモデルマウスを用いた体内放射能分布実験の結果、<sup>18</sup>F]MBP-2k は高活性腫瘍へより高く集積し、投与 2 時間後での PET 撮像により高活性腫瘍の描出が可能であった。以上より、<sup>18</sup>F]MBP-2k は MT1-MMP の活性評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを示した。

以上、本研究は MT1-MMP の発現量及び酵素活性のインビボ解析によりがんの悪性度診断への貢献が期待される核医学イメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものであり、これらの知見は、今後のがんの病態評価、医薬品開発、基礎研究に有益な情報を提供すると考えられる。

これらの結果について、以下に詳述する。

## 第 1 章

### 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 の発現量評価を目的とした 核医学イメージングプローブの開発

がんは、先進国において最大の死因であり、またその死因のほとんどは転移によるものとされている<sup>[13]</sup>。腫瘍の転移には、腫瘍細胞による基底膜、及び周囲の細胞外基質の分解が必須の過程であり<sup>[14]</sup>、この分解の制御に重要な役割を担うのが、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase、MMP) と呼ばれる一群の酵素である。MMP はその構造に基づき、可溶性 MMP と膜型 MMP (Membrane Type MMP、MT-MMP) の二つに大別される。可溶性 MMP は分泌型の酵素であり、分泌細胞より離れた遠位部においてもその活性を発現する一方で、MT-MMP は、C 末端に細胞膜貫通領域を有しており、細胞膜表面に発現することにより、産生細胞近傍において活性を発現する<sup>[15,16]</sup>。MT-MMP の中でも膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) は、多くの腫瘍の細胞膜に過剰発現しており<sup>[1]</sup>、細胞外基質の構成成分である I 型コラーゲンの主要な分解酵素であること<sup>[2]</sup>、がんの浸潤に寄与する遊離型 MMP (MMP-2、MMP-13) を活性化すること<sup>[3,4]</sup>、シグナル伝達経路の刺激により腫瘍細胞の遊走を促進すること<sup>[5,6]</sup>から、MT1-MMP の発現量は多くのがんにおいて、悪性度との相関が示されている<sup>[17,18]</sup> (Figure 1)。したがって、MT1-MMP の発現量のインビボ評価はがんの悪性度診断において有益な情報を提供し得ると考えられる。

一方で、核医学分子イメージング法は、陽電子断層撮像法 (PET) 及び単光子断層撮像法 (SPECT) により、放射性分子プローブと標的分子の生体内相互作用を捉える臨床画像診断法であり、その特徴として非侵襲的かつ高感度に標的分子をインビボ検出可能であることが挙げられる。



したがって、核医学イメージングの手法を用いた MT1-MMP のインビボイメージングにより、がんにおける MT1-MMP についてのインビボ機能解析が実現できると考えられ、その結果として、がんの病態評価、医薬品開発、基礎研究に有益な情報を提供し得ると考えられる。

この MT1-MMP インビボイメージングに有効な方法のひとつとして、MT1-MMP に特異的に結合する結合型プローブの利用が考えられる。これまでの研究においても、モノクローナル抗体の標的への高い親和性、特異性に着目した放射標識抗体 ( $[^{99m}\text{Tc}]\text{mAb}^{[7]}$ ) が MT1-MMP 結合型イメージングプローブとして開発されてきた。抗体プローブは、担がんモデル動物への投与 2 日後において MT1-MMP 発現腫瘍への高い集積を示し、他臓器と比較した集積比に関しても良好であったため、MT1-MMP のインビボイメージングに有効である可能性が示されている。しかしながら、抗体プローブは高分子量であり、また構造中に Fc 領域を含むため、FcRn (neonatal Fc receptor) を介したリサイクリングを受けることから、血中半減期は長い。したがって、抗体プローブ投与後早期においては、血中の放射能残存が著しく、標的の明瞭なイメージングを実現する上で必要な放射能集積の腫瘍対血液比 (T/B 比) を得るには、投与後 2 日以上が必要となり、短半減期放射性同位元素を用いる核医学イメージングにおいては、抗体プローブの利用は制限される。

以上のような背景より、投与後早期における核医学画像解析によるインビボでの MT1-MMP の発現量評価を可能とする、新たな核医学イメージングプローブの開発を計画した。

## 第 1 節

### 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 の発現量評価を目的とした 低分子化抗体プローブの開発

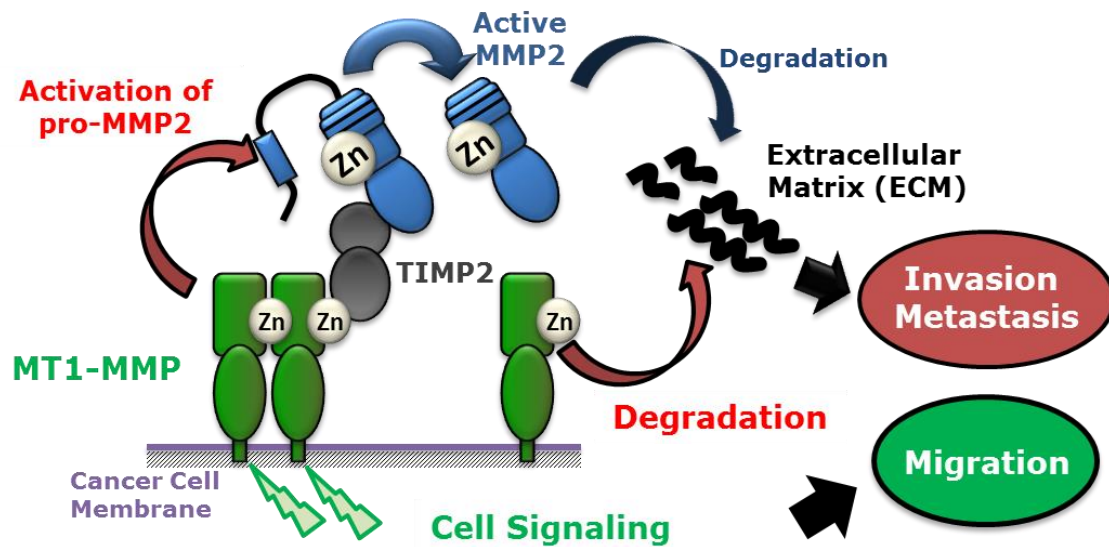
MT1-MMP のインビボイメージングの投与後早期での達成を可能とする分子プローブ開発のためには、抗体プローブの場合と比較してかなり血中半減期を短縮することが不可欠であることから、プローブ設計として、抗体の低分子化に着目した。すなわち、血中への長期滞留の原因の 1 つである Fc 領域を除去し、かつ抗体の抗原認識を担う領域である可変部領域を構成する重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) のみを用いて、それらをリンカーにより連結した構造である scFv、及びその二量体構造である diabody<sup>[19]</sup>をプローブの基本構造として選択した (Figure 2)。これらの低分子化抗体は IgG 抗体 (150 kDa) と比較して低分子化されており (scFv, 30 kDa ; diabody, 60 kDa)、Fc 領域を構造中に含まないため、抗体に由来する高い標的親和性、特異性を保持したまま、血中半減期の短縮が可能であると期待される<sup>[8]</sup>。したがって、低分子化抗体プローブを用いることで、投与後早期においてコントラストの高いイメージングが可能となると考えられる。

以上のような背景のもと、低分子化抗体を母体とした MT1-MMP イメージングプローブの開発を計画した。

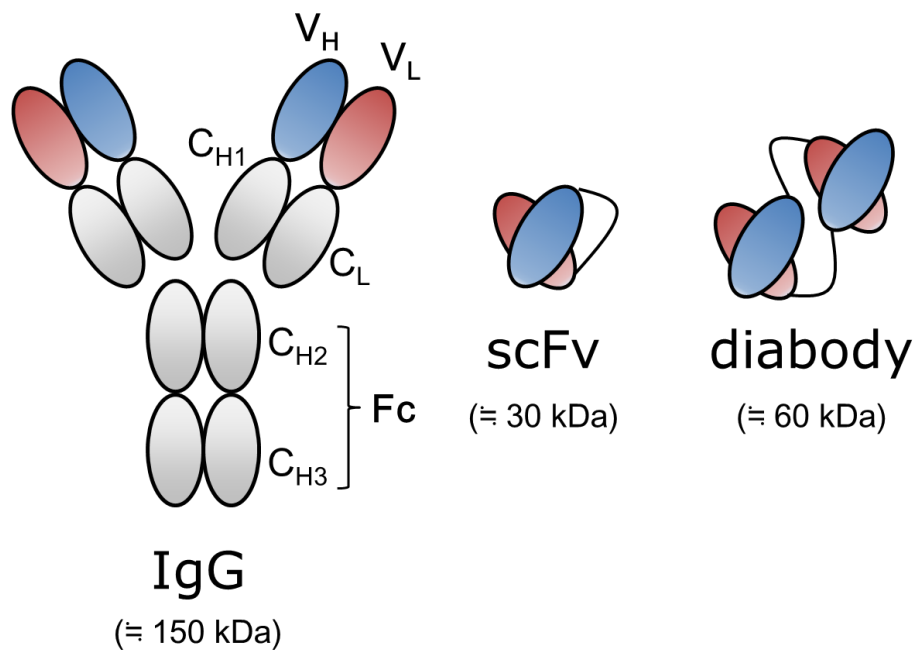
### 1-1-1 薬剤設計

MT1-MMP を特異的に認識する低分子化抗体 (scFv、diabody) の取得のため、ファージディスプレイ法によるスクリーニングを計画した。低分子化抗体の放射標識に用いる核種としては、 $^{111}\text{In}$  を選択した。 $^{111}\text{In}$  は SPECT に適した線質の放射線を放出し、基礎研究、臨床研究の双方に適した半減期 ( $T_{1/2} = 2.8 \text{ d}$ ) を有する金属核種であり、キレート剤を介した低分子化抗体への導入が容易である利点を有する。

以上を背景として、MT1-MMP へ特異的な結合性を有する低分子化抗体 (scFv、diabody) に二官能性キレート試薬 ( $p\text{-SCN-Bn-DTPA}$ ) を介して  $^{111}\text{In}$  標識した低分子化抗体プローブ ( $[^{111}\text{In}]\text{scFv}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{diabody}$ ) を設計した。



**Figure 1.** The mechanism of MT1-MMP driven cancer-cell invasion, metastasis and migration.



**Figure 2.** Schematic representation of the structures of immunoglobulin G, scFv and diabody molecules.

## 1-1-2 実験方法

### 試薬・機器

実験には、ナカライテスク株式会社、和光純薬工業株式会社から購入した特級試薬を用いた。陰性対照として用いた NC-scFv は、京都電子工業より購入した。 [ $^{111}\text{In}$ ]InCl<sub>3</sub> は日本メジフィジックス株式会社より提供を受けた。放射能の測定には、キオートウェルガンマカウンター (Wallac 1480 WIZARD 3、PerkinElmer 社) を用いた。SPECT/CT 撮像には、U-SPECT-II/CT system (MILabs 社) を用いた。オートラジオグラフィ実験にはイメージングプレート (BAS-SR、富士フイルム株式会社) を用い、画像解析装置 (BAS2500、富士フイルム株式会社) を用いて、オートラジオグラムを得た。得られた画像の解析には Image Gauge Software (富士フイルム株式会社) を用いた。

### 低分子化抗体の調製

MT1-MMP のヒンジ領域にあたるペプチド配列 (291Thr-311Asn) について、BSA (牛血清アルブミン) をキャリアタンパク質として用いて BALB/c マウスに免疫した。免疫反応後、脾臓細胞から mRNA を抽出し、重鎖及び軽鎖可変領域に対応する配列を増幅後、配列に適したリンカー (scFv の場合 (GGGGS)<sub>3</sub>、diabody の場合 GGGGGS) により両者を連結した。その後、ファージディスプレイに用いるベクター (pCANTAB5E, GE Healthcare 社) への導入を行った (ライブラリサイズ:  $5 \times 10^7$ )。得られたライブラリについて 5 回にわたりクローン濃縮 (パニング) を行い、有望なクローンについて大腸菌による発現を行い、His Tag カラム (HisTALON Gravity Columns, タカラバイオ社) による精製を行った。精製後の scFv、diabody について SDS-PAGE (5% - 20%) を用いて純度を分析した。

### <sup>111</sup>In 標識体の合成

scFv、diabody 及び NC-scFv を 50 mM NaHCO<sub>3</sub> に溶解し、20 当量の *p*-SCN-Bn-DTPA (10 µg/µL in DMF, Macrocyclics 社) と混和し、室温で 1 時間反応させた。反応後、未反応の *p*-SCN-Bn-DTPA を Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit (10 k, Millipore 社) によりサイズ排除し、0.1 M 酢酸バッファー (pH 6.0) に溶媒を置換した。続いて、等量の 1 M CH<sub>3</sub>COONa と混和した [<sup>111</sup>In]InCl<sub>3</sub> (37 kBq/µg protein) を添加し、室温で 1 時間反応させた。<sup>111</sup>In 標識後の scFv ([<sup>111</sup>In]scFv)、diabody ([<sup>111</sup>In]diabody)、及び NC-scFv ([<sup>111</sup>In]NC-scFv) について、PBS (-) を溶出バッファーとしたサイズ排除カラム (Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare 社、流速 0.5 mL/min) によりそれぞれ分離を行い、各フラクション (250 µL × 60 fractions) の放射能を測定した。

### 親和性評価

ProteOn XPR36 system (Bio-rad Laboratories 社) により、表面プラズモン共鳴を分析した。MT1-MMP タンパク質 (ag6062, Proteintech 社) または、BSA 結合 MT1-MMP ヒンジ領域ペプチド配列 (TKMPPQPRRTTSRPSVPDKPKN) を GLM Chip に固相化した。陰性対照として、ヒンジ領域ペプチドのスクランブル配列 (RKPRQPTSPTKPMVSNPTDK) を結合させたものを GLM Chip に固相化した。*p*-SCN-Bn-DTPA 反応前後の scFv、diabody 及び NC-scFv を段階希釈し (0, 7.7-625 nM)、GLM Chip 上にそれぞれインジェクトした。得られたセンサーグラムは ProteOn analysis software により解析し、それぞれの解離定数 (K<sub>d</sub>) を得た。

## 細胞培養

MT1-MMP 発現細胞としては、ヒト繊維肉腫細胞 (HT1080) を、MT1-MMP 非発現細胞としてはヒト乳がん細胞 (MCF7) を実験に用いた<sup>[20]</sup>。これらは、ATCC (American Type Culture Collection) より購入し、培養には 10% Fetal Bovine Serum (FBS) 含有 DMEM (日水製薬株式会社) を用いた。培地にはグルタミン (1 mM)、ペニシリン (100 U/mL) ストレプトマイシン (10 mg/mL) を混合し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下にて培養した。

## 細胞への取り込み評価

HT1080 細胞または MCF7 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells) を FBS 不含 DMEM 中で [<sup>111</sup>In]scFv、 [<sup>111</sup>In]diabody、または [<sup>111</sup>In]NC-scFv と混和した。37°C で 1 時間または 3 時間インキュベート後、0.2 N 水酸化ナトリウム水溶液により細胞を溶解し、放射能を測定した。細胞のタンパク質定量は BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific 社) により行った。

## 担がんモデル動物の作製

BALB/cSlc-*nu/nu* マウス (雌性、5 週齢) は日本エスエルシー株式会社より購入し、C.B-17/Icr-*scid/scid* マウス (雌性、5 週齢) は日本クレア株式会社より購入した。動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し、飼料、水は自由に与えた。HT1080 細胞は PBS (-) に懸濁し ( $5 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L)、BALB/cSlc-*nu/nu* マウスまたは、C.B-17/Icr-*scid/scid* マウスに皮下投与し、2 週目に実験に使用した。MCF7 細胞は PBS (-) に懸濁し ( $2 \times 10^7$  cells/100  $\mu$ L)、C.B-17/Icr-*scid/scid* マウスに皮下投与し、5 週目に実験に使用した。動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を受けて行った。

### 体内分布評価

担がんモデル動物は腫瘍サイズが均等になるよう配分し、プローブ投与6時間前から絶食した。HT1080細胞を移植したBALB/cSlc-*nu/nu*マウスを $^{111}\text{In}$ scFv または $^{111}\text{In}$ diabody (18.5 kBq/100  $\mu\text{L}$  Saline) の投与、15分、1、3、6、24時間後に屠殺し、血液、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、腸、膵臓、脾臓、筋肉、腫瘍を摘出した。各臓器の重量と放射能とを測定し、単位重量あたりの放射能から集積量 (%ID/g) を算出した。HT1080細胞とMCF7細胞を同時移植したC.B-17/*Icr-scid/scid*マウスを、 $^{111}\text{In}$ scFv に関しては投与1、24時間後に、 $^{111}\text{In}$ diabody に関しては投与3、24時間後に屠殺し、同様に集積量 (%ID/g) を算出した。

### SPECT/CT 撮像

HT1080細胞を移植したBALB/cSlc-*nu/nu*マウスに $^{111}\text{In}$ scFv 及び $^{111}\text{In}$ diabody (13.0 MBq/mouse) 投与3時間後より、イソフルランによる麻酔下、SPECT撮像 (30 min  $\times$  1 frame, 1.0-mm pinhole collimators) 及びCT撮像 (65 kV, 615  $\mu\text{A}$ ) を行った。画像再構成はOSEM法 (Iteration, 40 ; Subset, 1) にて行った。



### オートラジオグラフィ (Ex vivo ARG)

HT1080 細胞を移植した BALB/cSlc-*nu/nu* マウスを [<sup>111</sup>In]scFv (740 kBq/mouse) の投与 3 時間後、 [<sup>111</sup>In]diabody (740 kBq/mouse) の投与 24 時間後で屠殺し、腫瘍を摘出後、super cryoembedding medium (SCEM、Section Lab 社) にて包埋を行った。ドライアイス-ヘキサン (-78 °C) で凍結後、マイクロトーム (CM1900, Leica Microsystems 社) を用いて、厚さ 10 μm の凍結切片を作製した。得られた組織切片をイメージングプレートに 10 日間露光し、画像解析装置を用いてオートラジオグラムを得た。

### 免疫組織染色 (IHC)

オートラジオグラフィに用いた切片の隣接切片に対し、親水化後、0.1%過酸化水素水を室温で 30 分反応させた。1.0%BSA 含有 PBS (-)と室温で 30 分反応させた後、抗ヒト MT1-MMP マウスモノクローナル抗体 (F-84、第一ファインケミカル株式会社) を 1 次抗体として、4 °C で一晩反応させた。2 次抗体として Dako Envision + kit (K4000、Dako 社) を用い、室温で 30 分反応させ、続いて 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB、Sigma-Aldrich 社) と反応させた。その後、核の同定のためヘマトキシリンによる対比染色を常法にて行った。

### 統計解析

データは平均値 ± 標準偏差で表した。有意差検定は Mann-Whitney U test により行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

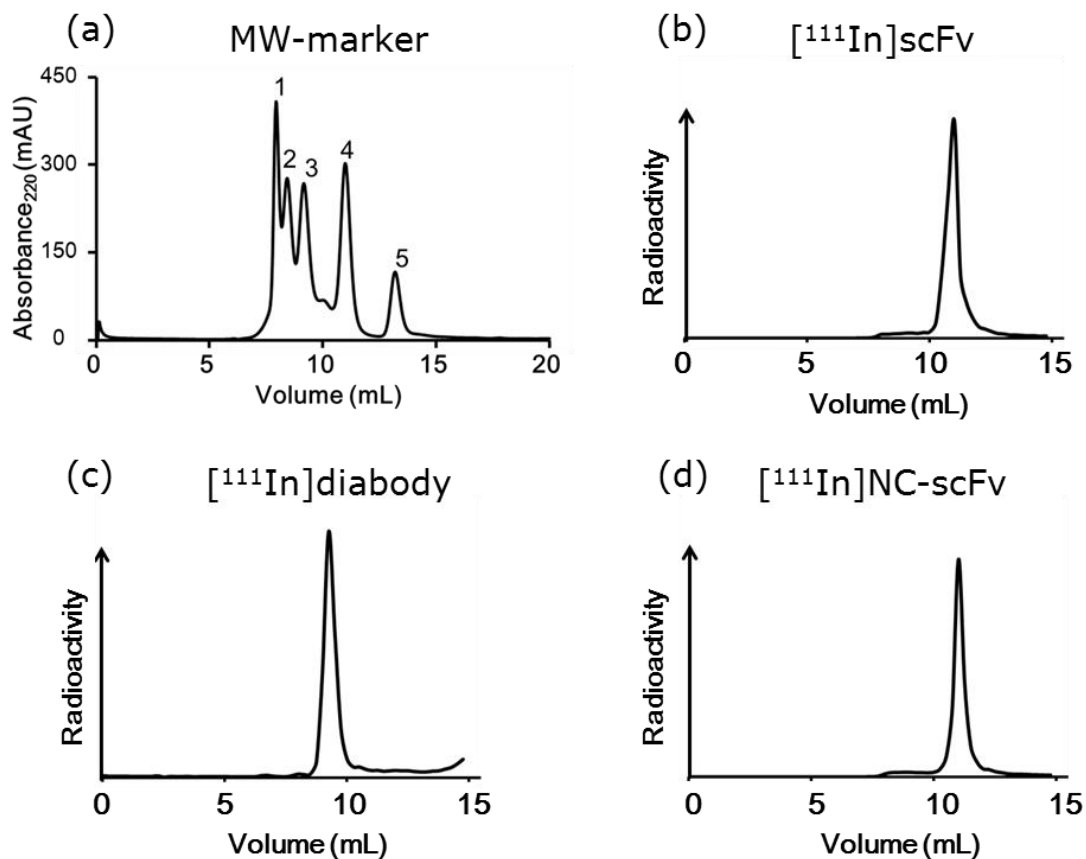
### 1-1-3 結果

#### 低分子化抗体の調製

精製後の scFv、diabody について SDS-PAGE により分析したところ、それぞれが単一のバンドとして認められた。表面プラズモン共鳴法により算出した固相化 MT1-MMP タンパク質に対する  $K_d$  は、*p*-SCN-Bn-DTPA 結合前の scFv、diabody については、それぞれ  $29.8 \pm 4.1$ 、 $17.1 \pm 4.0$  nM であり、結合後については  $38.5 \pm 1.3$ 、 $26.5 \pm 2.9$  nM であった。*p*-SCN-Bn-DTPA 結合前の scFv、diabody について、固相化ヒンジ領域ペプチドに対する  $K_d$  は、それぞれ  $51.1 \pm 30.3$ 、 $0.27 \pm 0.21$  nM であったのに対し、固相化スクランブルペプチドに対しては結合性を示さなかった。NC-scFv に関しては固相化 MT1-MMP タンパク質、ペプチドいずれに対しても結合性を示さなかった。

#### $^{111}\text{In}$ 標識体の合成

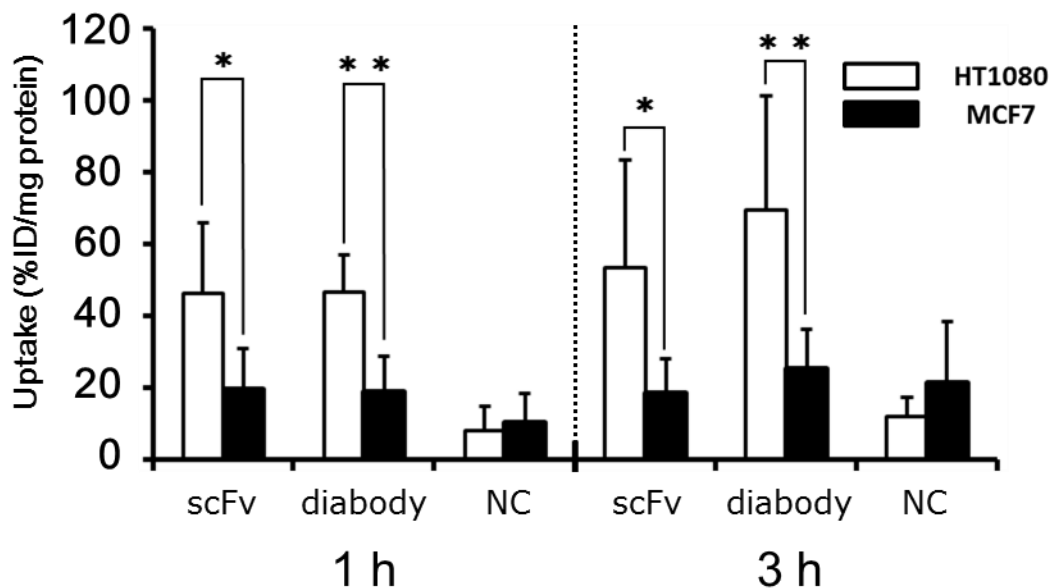
$^{111}\text{In}$  標識後のプローブ ( $^{111}\text{In}$ ]scFv、 $^{111}\text{In}$ ]diabody、及び  $^{111}\text{In}$ ]NC-scFv) についてのサイズ排除クロマトグラフィーにより得られたクロマトグラムを Figure 3 に示す。 $^{111}\text{In}$ ]scFv、 $^{111}\text{In}$ ]NC-scFv の保持容量は 11.0 mL であり、 $^{111}\text{In}$ ]diabody の保持容量は 9.25 mL であった。



**Figure 3.** (a) Chromatogram of MW-marker; 1 (7.93 mL), Glutamatedehydrigenase 290 kDa: 2 (8.43 mL), Lactate dehydrogenase 142 kDa: 3 (9.15 mL), Enolase 67 kDa: 4 (10.98 mL), Myokinase 32 kDa: 5 (13.18 mL), Cytochrome C 12.4 kDa. (b) Chromatogram of [<sup>111</sup>In]scFv (11.0 mL). (c) Chromatogram of [<sup>111</sup>In]diabody (9.25 mL). (d) Chromatogram of [<sup>111</sup>In]NC-scFv (11.0 mL).

#### 細胞への取り込み評価

HT1080 細胞及び MCF7 細胞への [<sup>111</sup>In]scFv、[<sup>111</sup>In]diabody、及び [<sup>111</sup>In]NC-scFv の添加 1 時間、3 時間後の取り込み量を Figure 4 に示す。[<sup>111</sup>In]scFv、[<sup>111</sup>In]diabody の HT1080 細胞への取り込み量は MCF7 細胞と比較して有意に高い値を示した一方、[<sup>111</sup>In]NC-scFv の HT1080 細胞への取り込み量は低く、MCF7 細胞への取り込み量と比較して有意な差は認められなかった。



**Figure 4.** The radioactivity of HT1080 cells and MCF7 cells after incubation for 1 and 3 h with [<sup>111</sup>In]scFv (scFv), [<sup>111</sup>In]diabody (diabody) and [<sup>111</sup>In]NC-scFv (NC). Data are expressed as radioactivity per cell protein (mg) (mean ± SD). Comparison between HT1080 and MCF7 cell groups was performed with the Mann-Whitney U-Test (\*P< 0.005, \*\*P< 0.0001 vs MCF7).

#### 体内分布評価

[<sup>111</sup>In]scFv、[<sup>111</sup>In]diabody の体内分布データを Table 1、2 にそれぞれ示す。両プローブは速やかな血中からの消失を示し、[<sup>111</sup>In]scFv の血中放射能は投与 1 時間後に  $0.75 \pm 0.14$ 、24 時間後に  $0.10 \pm 0.01\%ID/g$  となり、[<sup>111</sup>In]diabody の血中放射能は投与 1 時間後に  $3.26 \pm 0.37$ 、24 時間後に  $0.09 \pm 0.03\%ID/g$  となった。[<sup>111</sup>In]scFv、[<sup>111</sup>In]diabody の集積放射能の腫瘍対血液 (T/B) 比について既報の抗体プローブ ([<sup>99m</sup>Tc]mAb) のデータ<sup>7)</sup>と共に Figure 5 に示す。また、HT1080 細胞と MCF7 細胞を同時移植した C.B-17/Icr-scid/scid マウスにおける両腫瘍への集積は Figure 6 に示す。[<sup>111</sup>In]scFv、[<sup>111</sup>In]diabody は共に MCF7 腫瘍と比較して HT1080 腫瘍に有意に高い集積を示した。

**Table 1.** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>111</sup>In]scFv in tumor-bearing mice<sup>§</sup>

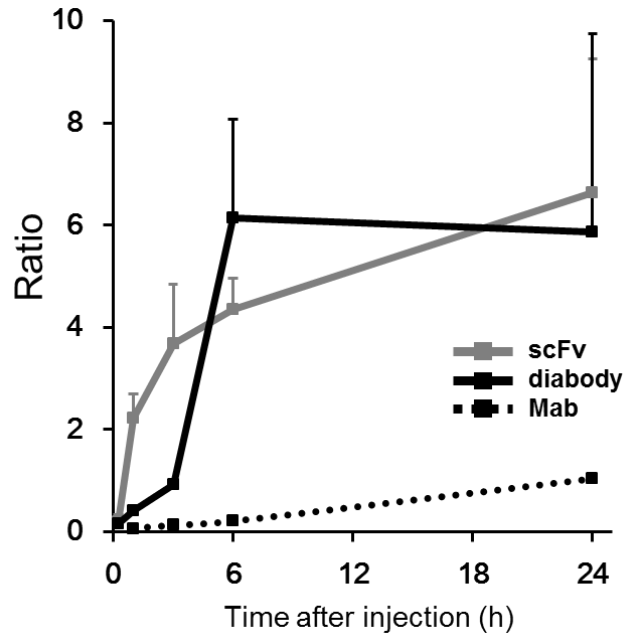
	Time after injection (h)				
	0.25	1	3	6	24
Blood	3.36 ± 0.53	0.75 ± 0.14	0.38 ± 0.07	0.26 ± 0.03	0.10 ± 0.01
Heart	0.82 ± 0.36	1.33 ± 0.27	0.71 ± 0.19	0.70 ± 0.07	0.49 ± 0.08
Lung	6.36 ± 1.58	1.72 ± 0.32	0.80 ± 0.26	0.62 ± 0.26	0.41 ± 0.17
Liver	25.87 ± 3.03	23.41 ± 2.38	21.24 ± 7.83	23.29 ± 0.91	14.80 ± 1.38
Kidney	249.93 ± 15.08	237.53 ± 23.96	220.34 ± 48.95	225.90 ± 8.71	182.00 ± 8.53
Stomach <sup>¶</sup>	0.34 ± 0.07	0.20 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.19 ± 0.00	0.14 ± 0.04
Intestine	1.51 ± 0.11	0.85 ± 0.26	1.59 ± 0.62	1.48 ± 0.22	0.73 ± 0.11
Pancreas	1.66 ± 0.45	1.19 ± 0.22	0.85 ± 0.19	0.90 ± 0.03	0.64 ± 0.17
Spleen	16.90 ± 2.66	7.87 ± 1.71	6.00 ± 2.76	6.14 ± 1.16	5.77 ± 0.37
Muscle	0.96 ± 0.59	0.71 ± 0.04	0.65 ± 0.12	0.58 ± 0.19	0.45 ± 0.08
Tumor	0.71 ± 0.50	1.68 ± 0.51	1.35 ± 0.20	1.14 ± 0.22	0.64 ± 0.17

<sup>§</sup>Tissue radioactivity is expressed as % injected dose per gram. <sup>¶</sup>Expressed as % injected dose.

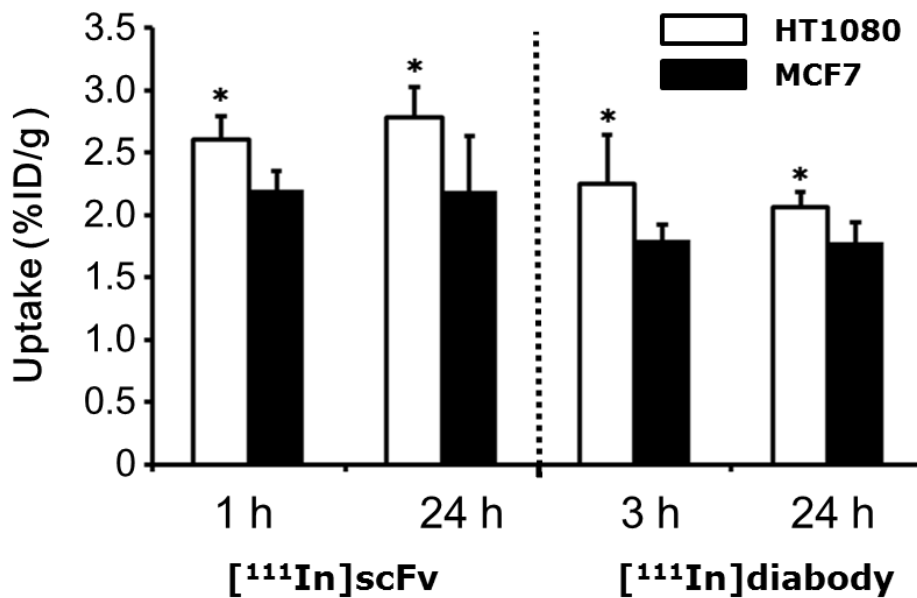
**Table 2.** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>111</sup>In]diabody in tumor bearing mice<sup>§</sup>

	Time after injection (h)				
	0.25	1	3	6	24
Blood	7.30 ± 1.18	3.26 ± 0.37	1.64 ± 0.12	0.21 ± 0.04	0.09 ± 0.03
Heart	1.78 ± 0.42	1.80 ± 0.32	1.34 ± 0.15	0.82 ± 0.06	0.59 ± 0.13
Lung	4.34 ± 0.55	2.04 ± 0.34	1.51 ± 0.24	0.40 ± 0.2	0.61 ± 0.10
Liver	47.00 ± 4.61	39.68 ± 3.56	40.63 ± 3.13	26.75 ± 1.64	15.96 ± 3.03
Kidney	65.98 ± 11.65	108.2 ± 15.05	131.98 ± 8.44	97.98 ± 10.66	241.74 ± 28.36
Stomach <sup>¶</sup>	0.71 ± 0.06	1.27 ± 0.32	0.98 ± 0.33	1.29 ± 1.03	0.49 ± 0.22
Intestine	0.56 ± 0.12	1.14 ± 0.17	2.21 ± 0.13	2.14 ± 0.91	0.85 ± 0.17
Pancreas	0.52 ± 0.08	0.47 ± 0.07	0.56 ± 0.12	0.57 ± 0.07	0.83 ± 0.06
Spleen	13.03 ± 2.43	8.77 ± 1.47	8.34 ± 0.65	6.31 ± 0.36	6.50 ± 1.33
Muscle	0.29 ± 0.12	0.35 ± 0.08	0.29 ± 0.09	0.47 ± 0.53	0.94 ± 0.58
Tumor	1.14 ± 0.18	1.35 ± 0.33	1.52 ± 0.13	1.37 ± 0.73	0.47 ± 0.24

<sup>§</sup>Tissue radioactivity is expressed as % injected dose per gram. <sup>¶</sup>Expressed as % injected dose.



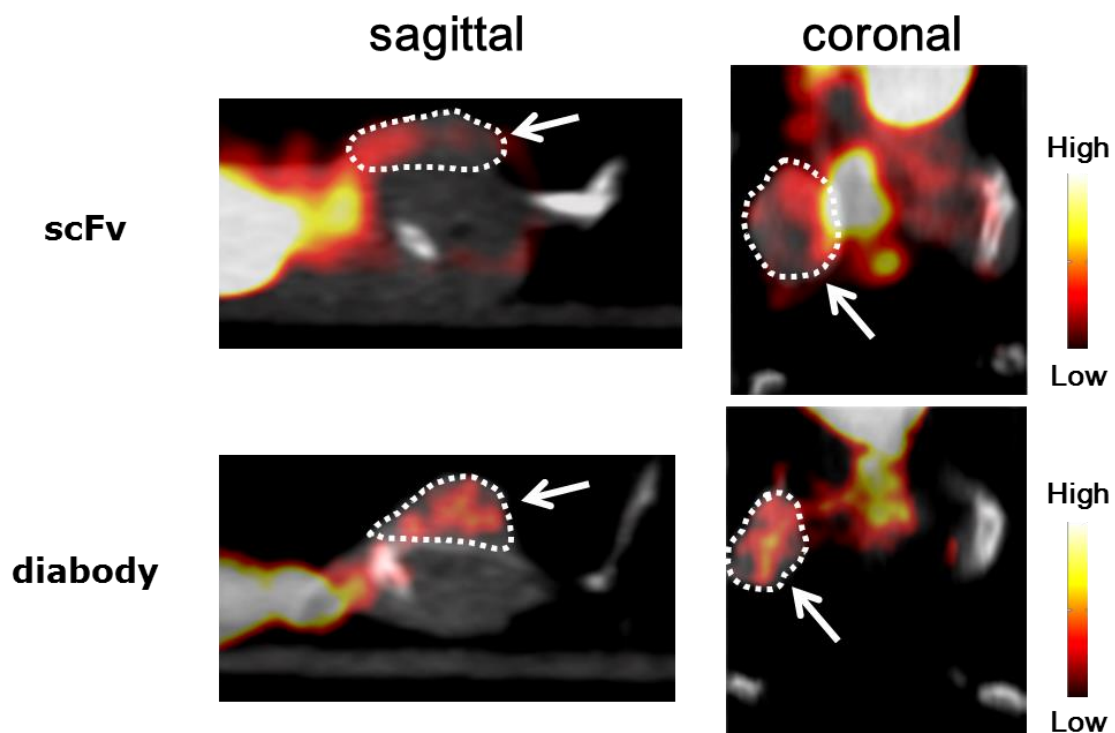
**Figure 5.** Tumor to Blood radioactivity ratio (T/B) of [ $^{111}\text{In}$ ]scFv, [ $^{111}\text{In}$ ]diabody and [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]mAb<sup>[7]</sup>.



**Figure 6.** Accumulations of [ $^{111}\text{In}$ ]scFv (1, 24 h) and [ $^{111}\text{In}$ ]diabody (3, 24 h) in HT1080 and MCF7 tumors. Comparisons of accumulations between HT1080 and MCF7 were performed with the Mann-Whitney U-Test (\* $P < 0.05$  vs MCF7).

### SPECT/CT 撮像

$[^{111}\text{In}]\text{scFv}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{diabody}$  の投与 3 時間後からの SPECT/CT 撮像により得られた画像について、矢状面、冠状面の画像を Figure 7 に示す。 $[^{111}\text{In}]\text{scFv}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{diabody}$  共に HT1080 腫瘍を描出し、その放射能集積の分布は不均一性を示した。

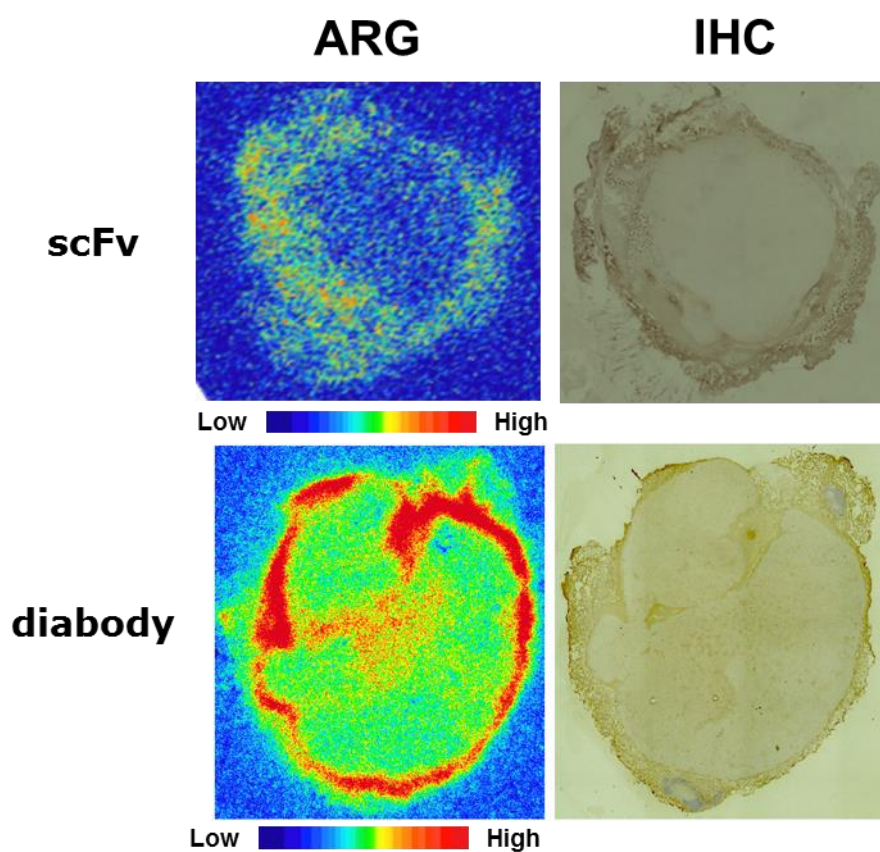


**Figure 7.** SPECT/CT images of tumor-bearing mice 3 h after injection with  $[^{111}\text{In}]\text{scFv}$  and  $[^{111}\text{In}]\text{diabody}$ . White arrows indicate tumors.



Ex vivo ARG、IHC

[<sup>111</sup>In]scFv、[<sup>111</sup>In]diabody についてのオートラジオグラムと、それぞれの隣接切片における免疫染色像を Figure 8 に示す。[<sup>111</sup>In]scFv、[<sup>111</sup>In]diabody のオートラジオグラムと免疫染色による MT1-MMP 陽性領域の局在は一致する傾向にあった。



**Figure 8.** Representative images of autoradiograms of [<sup>111</sup>In]scFv and [<sup>111</sup>In]diabody (ARG) and images of MT1-MMP immunostainings (IHC).

#### 1-1-4 考察

本研究では、がんの MT1-MMP を標的とした投与後早期におけるインビボイメージングを目的に、低分子化抗体を母体とした核医学イメージングプローブの開発を計画し、低分子化抗体として scFv 及び diabody を選択し、SPECT 用核種  $^{111}\text{In}$  で標識した [ $^{111}\text{In}$ ]scFv 及び [ $^{111}\text{In}$ ]diabody を設計し、そのイメージングプローブとしての有効性を評価した。

表面プラズモン共鳴法を用いた評価において、新規開発した scFv 及び diabody は MT1-MMP イメージングの母体として利用できる十分な親和性を有した。なお、diabody は scFv と比較して高い親和性を示したが、これは diabody が二価での抗原認識が可能であるためと考えられる。また、二官能性キレート剤 *p*-SCN-Bn-DTPA の結合前後で親和性に大きな変化は認められず、 $^{111}\text{In}$  標識を目的としたキレート剤の導入が低分子化抗体の免疫反応性に与える影響は少ないことが示された。また、BSA 結合ペプチドを用いた評価により、ヒンジ領域ペプチドへの特異的な結合性が示されたが、当該ヒンジ領域ペプチド配列は他の MMP との相同性が低い配列であるため、プローブの MT1-MMP への特異性を示す結果となった。

MT1-MMP は構造として、N 末から順にプロペプチド領域、触媒領域、ヒンジ領域、ヘモペキシン領域、膜貫通領域、細胞質側末端領域に分けられるが<sup>[21]</sup>、結合型のイメージングプローブの標的としては、N 末からヘモペキシン領域までを標的とする必要がある。その中でも、プロペプチド領域、触媒領域は、MT1-MMP の活性制御のために起こる自己分解の際に切断され、細胞膜より遊離すること<sup>[22,23]</sup>、ヘモペキシン領域は他のタンパク質との相互作用に多く寄与する領域であり<sup>[24,25]</sup>、プローブの結合の阻害を受ける可能性があることから、ヒンジ領域を標的とする今回開発したプローブは他の領域を標的とする場合と比較して有効である可能性が考えられる。

$^{111}\text{In}$  標識反応は高純度、高収率で進行し、得られた標識体は、分子量マーカーと比較したサイズクロマトグラフィーによる分析により、scFv、diabody の構造として適切な分子量を有していた。標識体 ( $^{111}\text{In}$ scFv、 $^{111}\text{In}$ diabody) をモデルマウスに投与したところ、所期の通り、血液から速やかに消失した。明瞭なインビボイメージングの指標となる T/B 比は投与 6 時間後において両者とも IgG を母体とした抗体プローブと比較して約 20 倍の高値をとり、実際に SPECT による投与 3 時間後からの撮像で腫瘍を描出することができた。したがって、血中半減期の短縮を狙った抗体の低分子化が投与後早期でのイメージングに有効な方策である事が示され、低分子化抗体プローブは臨床上汎用される  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  ( $T_{1/2} = 6 \text{ h}$ ) などの短半減期核種を用いたイメージングへの応用性についても期待される結果となった。

また、両プローブは MT1-MMP 発現腫瘍 HT1080 に非発現腫瘍 MCF7 と比較して有意に高く集積し、また集積放射能の腫瘍内分布が MT1-MMP 発現部位と一致する傾向にあったことから、 $^{111}\text{In}$ scFv、 $^{111}\text{In}$ diabody 共にインビボにおいて MT1-MMP 認識性を有することが示された。

以上、低分子化抗体を母体とした核医学イメージングプローブとして  $^{111}\text{In}$ scFv、 $^{111}\text{In}$ diabody を設計、作製した。得られた低分子化抗体プローブは MT1-MMP へ良好な親和性を示し、また抗体プローブと比較して顕著に血中半減期が短縮したため、投与後早期より良好な T/B 比を示した。また、MT1-MMP 高発現腫瘍に、低発現腫瘍と比較して有意に高く集積した。これらの結果より、新規開発した  $^{111}\text{In}$ scFv、 $^{111}\text{In}$ diabody は核医学画像診断によるインビボでの MT1-MMP の発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを明らかとした。

## 第 2 節

### 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 の発現量評価を目的とした ペプチドプローブの開発

投与後早期での MT1-MMP のインビボイメージングを達成するプローブ開発として、第 1 節において低分子化抗体の母体としての有効性を示したが、MT1-MMP に結合性を有するペプチドについてもイメージングプローブの母体としての有効性が期待される。

一般に、抗体や抗体誘導体を母体としたイメージングプローブでは、標識可能な部位が複数存在するため、得られた標識体は不均一なものとなる<sup>[26]</sup>。また、標識体は標識前駆体との分離が困難であり、プローブ投与時には、投与液に過剰量の前駆体が混入する状態となるため、見かけの比放射能（単位質量あたりの放射能）が低く抑えられる。

一方で、ペプチドをイメージングプローブの母体とした場合、低分子サイズによる速やかな動態に加え、抗体や低分子化抗体などの抗体誘導体と比較して化学合成による安価な調製が可能となる<sup>[27]</sup>。さらに、ペプチドを適切に設計することにより部位特異的な標識が可能であり、得られた標識プローブは HPLC 等の分離精製による標識前駆体との分離が可能である。

このように、ペプチドプローブは比放射能の高い均一なプローブを比較的容易に取得できるため、臨床研究や基礎研究においての高い汎用性が期待され、その開発は意義深い。

以上のような背景のもと、ペプチドを母体とした MT1-MMP イメージングプローブの開発を計画した。

## 1-2-1 薬剤設計

MT1-MMP を標的としたペプチドプローブの母体として、MT1-MMP へ高い特異性及び親和性を有する直鎖ペプチド配列 (HWKHLHNTKTFL<sup>[9]</sup>) を選択した。標識核種には、放射性ハロゲン核種 <sup>123</sup>I を選択した。<sup>123</sup>I は SPECT に適した線質の放射線を放出し、*N*-(*m*-[<sup>123</sup>I]iodophenyl) maleimide ([<sup>123</sup>I]IPM) を標識試薬とすることで、低分子量ペプチド中の Cys 残基に安定して導入可能である<sup>[28]</sup>。

以上を背景として、Cys 残基を配列の N 末端または C 末端側に追加したペプチド (LN、LC) を前駆体とし、[<sup>123</sup>I]IPM により標識したプローブ ([<sup>123</sup>I]I-LN、[<sup>123</sup>I]I-LC) を設計した。同時に、アミノ酸を非天然型に置換することによる生体内での安定性向上の知見<sup>[29]</sup>に着目し、LN、LC の構成アミノ酸を D 体に変更した誘導体である DN、DC を前駆体とし、[<sup>123</sup>I]IPM により標識したプローブ ([<sup>123</sup>I]I-DN、[<sup>123</sup>I]I-DC) も設計した。なお、一部実験には、<sup>123</sup>I の代わりに半減期が長く取り扱いの容易な <sup>125</sup>I を用いた。

## 1-2-2 実験方法

### 試薬・機器

実験には、ナカライテスク株式会社、和光純薬工業株式会社から購入した特級試薬を用いた。ペプチドの合成には、渡辺化学工業株式会社から購入した試薬を用いた。 $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$  は MP Biomedicals 社より購入した。 $\text{NH}_4[^{123}\text{I}]\text{I}$  は日本メジフィジックス株式会社より購入した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は定速ポンプ (LC-20A、株式会社島津製作所) に分光光度検出器 (SPD-20A、株式会社島津製作所) 及びオンライン NaI (TI) シンチレーション検出器 (NDW-351D、日立アロカメディカル株式会社) を接続した系を用いた。MS の測定には MALDI-TOF-MS (AXIMA-CFR Plus, 株式会社島津製作所) を用いた。免疫染色像の観察には蛍光顕微鏡 (BZ9000、KEYENCE 社) を用いた。

### ペプチド合成

Fmoc-Cys(Trt)-Gly-His(Trt)-Trp(Boc)-Lys(Boc)-His(Trt)-Leu-His(Trt)-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Phe-Leu-NH<sub>2</sub> (LN) について Fmoc-NH-SAL-PEG Resin を担体とした Fmoc 固相合成法により合成した。常法により Fmoc 基を脱保護後、無水酢酸/ジクロロメタン=1 : 1 の溶液と反応させることで N 末端アミノ基をアセチル化した。その後、トリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液 (TFA: H<sub>2</sub>O: トリイソプロピルシラン= 95: 2.5: 2.5) を加え、4 時間攪拌し、脱樹脂を行った。得られた未精製体は逆相 HPLC により精製を行い、MS を確認した。LC、DN、DC の配列についても同様の条件で合成、精製を行った。HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID × 250 mm, 2.5 mL/min, 254 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 90 : 10 (0 min) → 30 : 70 (30 min)

### <sup>123/125</sup>I 標識体の合成

[<sup>123/125</sup>I]IPM は文献<sup>[28]</sup>を参考に合成した。100 µg の LN を PBS (-) に溶解し、アセトニトリル中の [<sup>123/125</sup>I]IPM と混和した。室温で 30 分反応後、得られた [<sup>123/125</sup>I]I-LN は逆相 HPLC により精製を行った。非標識体の I-LN は非標識体の IPM を用いた同様の反応により得た。また LC、DN、DC についても同様の条件により標識体を合成した。

HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID × 250 mm, 2.5 mL/min, 254 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 90 : 10 (0 min) → 30 : 70 (30 min)

### MT1-MMP への親和性評価

#### **結合飽和実験**

評価に用いる MT1-MMP タンパク質は pFC30A His6HaloTag T7 Flexi Vector (Promega 社) を発現ベクターとして用いた大腸菌による発現系により得た。 [<sup>125</sup>I]I-LN (185 kBq) を I-LN ( $1.6 \times 10^{-9}$  mol) へ添加後、段階希釈を行い、これらについて、MT1-MMP タンパク質を固相化した Ni-NTA-Magnetic Beads (5 µL, Qiagen 社) に添加し、室温で 90 分間反応させた。反応後、MT1-MMP に結合した [<sup>125</sup>I]I-LN を Elution Buffer にて溶出し、放射能を測定した。同時に、過剰量 ( $2 \times 10^{-6}$  mol) の I-LN を添加した阻害群により、 [<sup>125</sup>I]I-LN の非特異的結合について評価した。  $K_d$  は GraphPad Prism 5.0 により飽和曲線から計算した。 [<sup>125</sup>I]I-LC、 [<sup>125</sup>I]I-DN、 [<sup>125</sup>I]I-DC についても同様に  $K_d$  を得た。

### 結合阻害実験

I-LN ( $2 \times 10^{-13}$  -  $2 \times 10^{-8}$  mol) を MT1-MMP タンパク質を固相化した Ni-NTA- Magnetic Beads (5  $\mu$ L) に添加した。その後、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$  (3.7 kBq) をビーズに添加し、室温で 90 分間反応させた。反応後、MT1-MMP に結合した $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$  を Elution Buffer にて溶出し、放射能を測定した。阻害定数 ( $\text{IC}_{50}$ ) は GraphPad Prism 5.0 により阻害曲線から計算した。I-LC、I-DN、I-DC についても同様に  $\text{IC}_{50}$  を得た。

### 血漿中安定性評価

ddY マウス (雄性、7-13 週齢、日本エスエルシー社) から採取した血漿 100  $\mu$ L に、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$  の PBS (-) 溶液 10  $\mu$ L を添加し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分、1 時間、または 2 時間インキュベートした。終了後、アセトニトリル 300  $\mu$ L を加えてボルテックスし、遠心分離した (2,500 g、10 分)。上清をフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ 、Millex-LH、Merck Millipore 社) に通じた後に下記の HPLC 条件にて分析した。

HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID  $\times$  250 mm, 2.5 mL/min, 220 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 90 : 10 (0 min)  $\rightarrow$  30 : 70 (30 min)

$[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  についても同様に実験を行った。

### 担がんモデル動物の作製

BALB/cSlc-*nu/nu* マウス (雌性、5 週齢) は日本エスエルシー株式会社より購入した。動物は第 1 章第 1 節と同様の条件で飼育し、HT1080 細胞は PBS (-) に懸濁し (5  $\times 10^6$  cells/100  $\mu$ L)、マウスに皮下投与し、2 週目に実験に使用した。



### 体内分布評価

モデル動物は腫瘍サイズが均等になるよう配分し、プローブ投与 6 時間前から絶食した。モデルマウスを $^{125}\text{I}$ I-LN (37 kBq/100  $\mu\text{L}$  Saline) の投与、2、10、30、60、120 分後に屠殺し、第 1 章第 1 節と同様に集積量 (%ID/g) を算出した。 $^{125}\text{I}$ I-LC、 $^{125}\text{I}$ I-DN、 $^{125}\text{I}$ I-DC についても同様に実験を行った。

### SPECT/CT 撮像

モデルマウスに $^{123}\text{I}$ I-DC (33.3 MBq/mouse) を投与 30 分後より、イソフルランによる麻酔下 SPECT 撮像 (30 min  $\times$  1 frame, 0.6-mm pinhole collimators) 及び CT 撮像 (65 kV, 615  $\mu\text{A}$ ) を行った。画像再構成は OSEM 法 (Iteration, 6 ; Subset, 16) にて行った。

### Ex vivo ARG

モデルマウスに $^{123}\text{I}$ I-DC (33.3 MBq/mouse) 投与 30 分後に屠殺し、第 1 章第 1 節と同様の方法で露光時間を 6 時間とし、オートラジオグラムを得た。

### IHC

ARG に用いた切片の隣接切片に対し、1.0%BSA 含有 PBS (-) と室温で 30 分反応させた後、抗ヒト MT1-MMP マウスモノクローナル抗体 (F-84) を 1 次抗体として、4  $^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させた。2 次抗体として Alexa Fluor 647 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody (Molecular Probes 社) を用い、室温で 1 時間反応させた後、蛍光顕微鏡により観察した。観察には以下のフィルターを用いた。

(excitation wavelength, 590 to 650 nm; emission wavelength, 663 nm to 737 nm.)

### 統計解析

データは平均値 ± 標準偏差で表した。有意差検定は two-way ANOVA による分散分析及び Bonferroni 法による多重解析検定により行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

### 1-2-3 結果

#### $^{123/125}\text{I}$ 標識体の合成

$^{125}\text{I}$ I-LN、 $^{125}\text{I}$ I-LC、 $^{125}\text{I}$ I-DN 及び $^{125}\text{I}$ I-DC それぞれについて、放射化学的収率は、77.5%、79.3%、76.6%、及び 77.2%であり、放射化学的純度は全てにおいて 99%以上で得た。 $^{125}\text{I}$ I-LN、 $^{125}\text{I}$ I-LC の構造について Figure 9 に示す。HPLC 分析により、未反応の標識前駆体と反応後の標識体は完全に分離可能であり (Figure 10)、標識体の比放射能は 88.8 MBq/ $\mu\text{g}$  以上と見積もられた。SPECT 撮像に用いた $^{123}\text{I}$ I-DC に関しては放射化学的収率 70.2%、純度 99%以上、比放射能は 260 MBq/ $\mu\text{g}$  以上で得た。

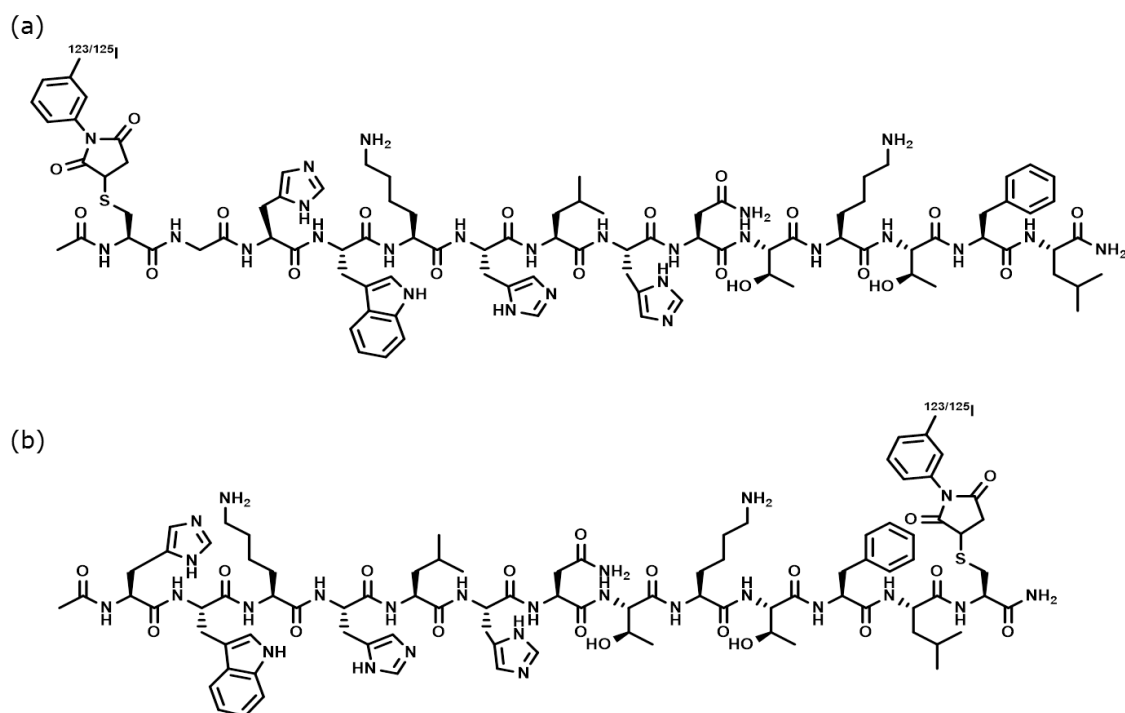
#### MT1-MMP への親和性評価

得られた各プローブの  $K_d$ 、 $\text{IC}_{50}$  について Table 3 にまとめた。C 末側の標識体が N 末側の標識体と比較して良好な親和性を示した。

**Table 3.** Probes evaluated in this study

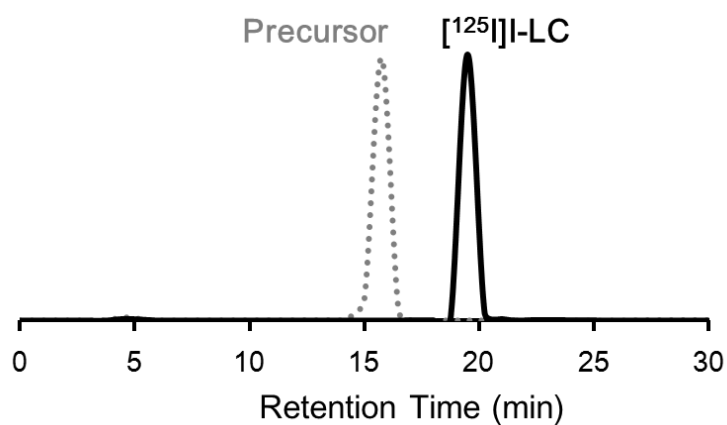
Name	Amino acid sequence	MS	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )
I-LN	Ac-C(IPM)GHWKHLHNTKTFL	$\text{C}_{91}\text{H}_{125}\text{IN}_{26}\text{O}_{20}\text{S}$ $m/z$ calcd: 2060.83 found: 2061.59 (M+H) <sup>+</sup>	$1.43 \pm 0.47$	$0.71 \pm 0.44$
I-LC	Ac-HWKHLHNTKTFLC(IPM)	$\text{C}_{89}\text{H}_{122}\text{IN}_{25}\text{O}_{19}\text{S}$ $m/z$ calcd: 2003.81 found: 2004.84 (M+H) <sup>+</sup>	$0.52 \pm 0.04$	$0.42 \pm 0.13$
I-DN	Ac-c(IPM)Ghwkhlhntkfl	$\text{C}_{91}\text{H}_{125}\text{IN}_{26}\text{O}_{20}\text{S}$ $m/z$ calcd: 2060.83 found: 2061.77 (M+H) <sup>+</sup>	$1.76 \pm 0.52$	$0.97 \pm 0.25$
I-DC	Ac-hwkhlhntkflc(IPM)	$\text{C}_{89}\text{H}_{122}\text{IN}_{25}\text{O}_{19}\text{S}$ $m/z$ calcd: 2003.81 found: 2004.85 (M+H) <sup>+</sup>	$1.03 \pm 0.14$	$0.81 \pm 0.19$

Lower case letters designate D-amino acids. IPM, *N*-(*m*-iodophenyl) maleimide.



**Figure 9.** Structures of developed radioiodinated probes in this study:

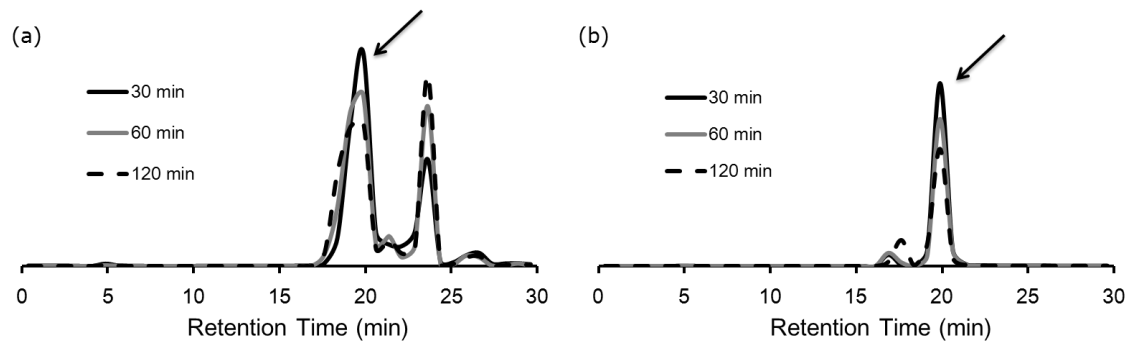
- (a) [ $^{123/125}\text{I}$ ]I-LN, (Ac-C(IPM)GHWKHLHNTKTFL) and  
 (b) [ $^{123/125}\text{I}$ ]I-LC, (Ac-HWKHLHNTKTFLC(IPM)).



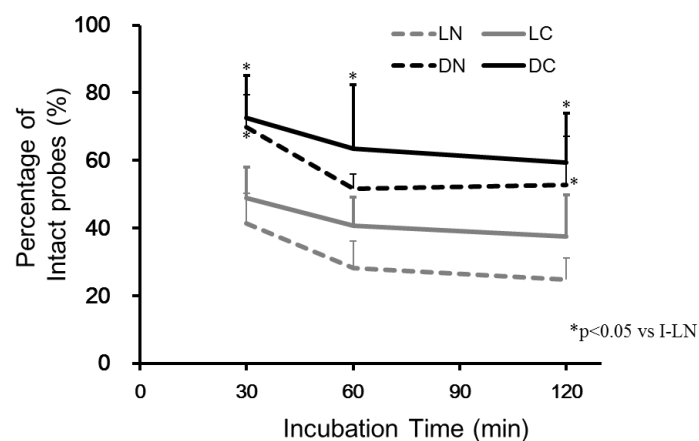
**Figure 10.** Representative chromatograms after radioiodination. Peaks of precursors (LC) at 15.5 min (gray) detected by UV absorbance (254 nm). Peaks of radioiodinated probes ( $^{125}\text{I}$ ]I-LC) at 19.2 min (black) detected by RI detector.

## 血漿中安定性評価

$[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$  は血漿とのインキュベート後、クロマトグラムに脂溶性の高い分解物のピークが見られ (Figure 11a)、30 分後における未変化体の割合は、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$  についてそれぞれ、41.4%、48.8%となった。一方、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  におけるクロマトグラムには顕著な分解物のピークは認められず (Figure 11b)、30 分後における未変化体の割合は、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  について、69.9%、72.5%となった (Figure 12)。



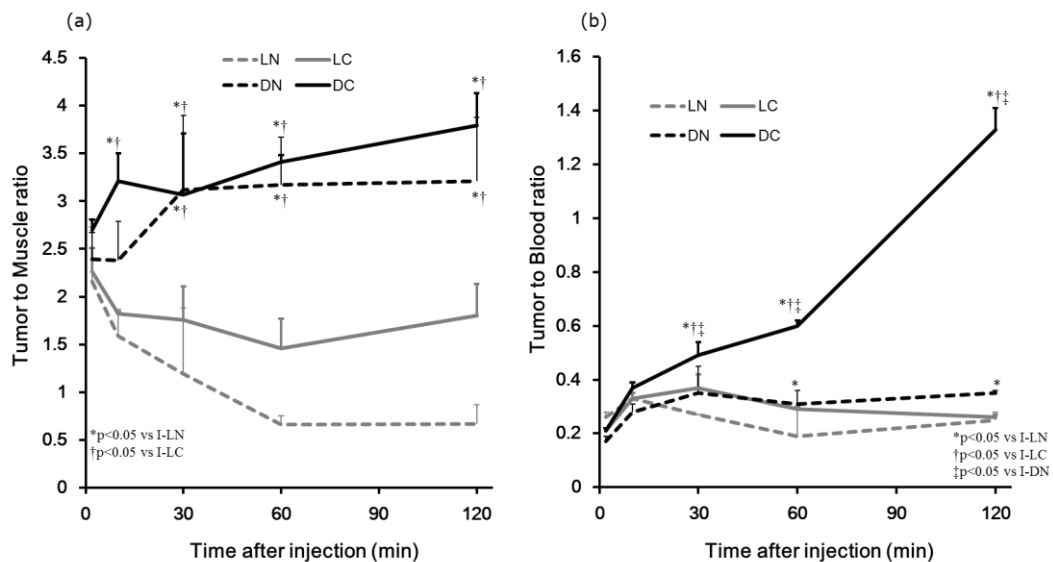
**Figure 11.** (a) Representative chromatograms of  $[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$  or (b)  $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  after incubation with mice plasma. Black arrows indicate peaks of intact probes.



**Figure 12.** Percentage (mean  $\pm$  SD) of intact probes after incubation with mice plasma for 30, 60, and 120 min. \* $P < 0.05$  vs  $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$ .

## 体内分布評価

$[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DN}$  及び  $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  それぞれについてのモデルマウスにおける体内分布を Table 4-7 に示す。また、それぞれの血中、腫瘍への放射能集積、腫瘍対筋肉 (T/M) 比、腫瘍対血液 (T/B) 比については Figure 13 に示す。 $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$  の血中放射能は投与 30 分後において、それぞれ 0.98、3.72%ID/g と速やかに消失したのに対し、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  はそれぞれ 11.73、8.19%ID/g とやや滞留傾向を示した。 $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$  は投与 2 分後においてそれぞれ 3.80、3.27%ID/g と腫瘍集積のピークを示し、その後速やかに消失したのに対し、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  は、投与 10 分後に、それぞれ 4.60、4.79%ID/g と集積のピークを示し、その後滞留する傾向にあった。 $[^{125}\text{I}]\text{I-DN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  の腫瘍集積及び T/M 比は  $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$  に対して有意に高く、T/B 比に関しては投与 10 分後以降において  $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  が最も高い値を示した。



**Figure 13.** (a) Tumor to Muscle and (b) Tumor to Blood ratios of radioactivity accumulation of each probe at 2, 10, 30, 60 and 120 min after injection. \*P < 0.05 vs  $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$ , †P < 0.05 vs  $[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$ , ‡P < 0.05 vs  $[^{125}\text{I}]\text{I-DN}$ .

**Table 4.** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>125</sup>I]I-LN in tumor-bearing mice<sup>§</sup>

	Time after injection (min)				
	2	10	30	60	120
Blood	14.98 ± 2.81	3.20 ± 0.33	0.98 ± 0.21	1.10 ± 0.21	0.41 ± 0.02
Heart	3.90 ± 0.34	0.82 ± 0.12	0.29 ± 0.08	0.19 ± 0.04	0.16 ± 0.04
Lung	7.08 ± 1.38	2.05 ± 0.17	1.33 ± 0.59	0.94 ± 0.28	0.54 ± 0.21
Liver	40.20 ± 6.63	21.21 ± 4.63	7.56 ± 0.68	1.19 ± 0.68	1.35 ± 0.31
Kidney	47.56 ± 7.88	16.59 ± 3.08	3.78 ± 0.81	1.32 ± 0.36	1.26 ± 0.22
Stomach <sup>¶</sup>	0.40 ± 0.02	1.51 ± 1.03	0.25 ± 0.14	0.29 ± 0.17	0.44 ± 0.26
Intestine	2.99 ± 0.83	17.83 ± 5.01	22.57 ± 6.69	25.20 ± 5.52	22.03 ± 2.24
Pancreas	2.53 ± 0.35	1.28 ± 0.06	0.55 ± 0.23	0.43 ± 0.06	0.44 ± 0.14
Spleen	3.28 ± 0.97	1.29 ± 0.34	0.69 ± 0.23	0.41 ± 0.10	0.41 ± 0.05
Muscle	1.90 ± 0.58	0.68 ± 0.14	0.32 ± 0.22	0.30 ± 0.08	0.17 ± 0.09
Tumor	3.80 ± 0.55	1.04 ± 0.08	0.26 ± 0.05	0.19 ± 0.06	0.10 ± 0.01

<sup>§</sup>Tissue radioactivity is expressed as % injected dose per gram. <sup>¶</sup>Expressed as % injected dose.

**Table 5.** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>125</sup>I]I-LC in tumor-bearing mice<sup>§</sup>

	Time after injection (min)				
	2	10	30	60	120
Blood	15.71 ± 0.59	7.08 ± 0.44	3.72 ± 0.09	2.64 ± 0.38	1.24 ± 0.02
Heart	5.26 ± 0.20	2.87 ± 0.18	1.34 ± 0.09	0.84 ± 0.08	0.39 ± 0.05
Lung	11.07 ± 2.25	5.54 ± 0.89	2.93 ± 0.11	1.81 ± 0.29	1.06 ± 0.10
Liver	33.69 ± 1.74	15.92 ± 1.37	8.45 ± 0.27	3.54 ± 0.47	1.72 ± 0.02
Kidney	25.88 ± 1.96	22.02 ± 3.38	8.53 ± 0.06	5.32 ± 0.56	3.69 ± 0.05
Stomach <sup>¶</sup>	0.39 ± 0.01	0.53 ± 0.06	0.79 ± 0.40	0.31 ± 0.17	0.07 ± 0.02
Intestine	3.26 ± 0.44	6.72 ± 0.91	9.03 ± 0.52	10.21 ± 2.68	7.94 ± 1.70
Pancreas	3.87 ± 0.52	3.59 ± 0.10	2.20 ± 0.08	1.21 ± 0.25	0.37 ± 0.03
Spleen	6.69 ± 0.52	2.93 ± 0.17	1.50 ± 0.10	0.86 ± 0.16	0.43 ± 0.03
Muscle	1.46 ± 0.12	1.30 ± 0.16	0.79 ± 0.04	0.57 ± 0.22	0.18 ± 0.03
Tumor	3.27 ± 0.12	2.37 ± 0.26	1.39 ± 0.22	0.76 ± 0.12	0.32 ± 0.01

<sup>§</sup>Tissue radioactivity is expressed as % injected dose per gram. <sup>¶</sup>Expressed as % injected dose.



**Table 6.** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>125</sup>I]I-DN in tumor-bearing mice<sup>§</sup>

	Time after injection (min)				
	2	10	30	60	120
Blood	22.77 ± 3.40	16.69 ± 0.76	11.73 ± 1.22	8.50 ± 0.94	4.89 ± 0.17
Heart	6.85 ± 1.57	4.96 ± 0.93	3.91 ± 0.52	2.61 ± 0.44	1.71 ± 0.28
Lung	22.99 ± 7.25	18.52 ± 1.26	15.59 ± 3.15	10.49 ± 0.80	7.43 ± 0.98
Liver	22.18 ± 3.73	17.00 ± 1.00	15.35 ± 1.43	13.35 ± 0.86	12.00 ± 1.55
Kidney	38.36 ± 7.58	64.04 ± 7.39	113.46 ± 14.95	137.11 ± 5.61	160.82 ± 4.38
Stomach <sup>¶</sup>	0.52 ± 0.05	0.55 ± 0.03	0.51 ± 0.15	0.48 ± 0.07	0.31 ± 0.05
Intestine	2.55 ± 0.57	2.60 ± 0.24	2.73 ± 0.43	2.58 ± 0.14	2.61 ± 0.26
Pancreas	3.68 ± 0.48	2.52 ± 0.37	2.17 ± 0.28	1.54 ± 0.18	0.90 ± 0.20
Spleen	8.66 ± 2.62	11.38 ± 2.67	7.83 ± 0.72	5.78 ± 0.36	4.28 ± 0.32
Muscle	1.69 ± 0.47	1.99 ± 0.36	1.40 ± 0.56	0.83 ± 0.11	0.57 ± 0.16
Tumor	3.93 ± 0.69	4.60 ± 0.43	4.03 ± 0.85	2.60 ± 0.13	1.73 ± 0.09

<sup>§</sup>Tissue radioactivity is expressed as % injected dose per gram. <sup>¶</sup>Expressed as % injected dose.

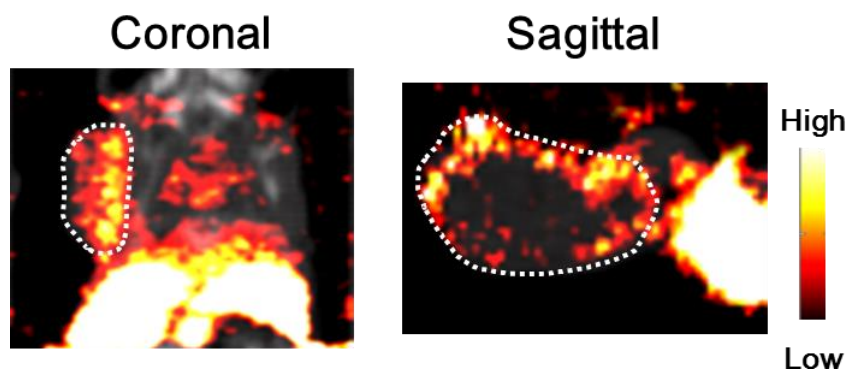
**Table 7.** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>125</sup>I]I-DC in tumor-bearing mice<sup>§</sup>

	Time after injection (min)				
	2	10	30	60	120
Blood	18.83 ± 0.85	12.99 ± 1.38	8.19 ± 0.34	4.66 ± 0.26	1.54 ± 0.07
Heart	6.39 ± 0.79	4.63 ± 0.55	3.72 ± 0.25	2.71 ± 0.06	1.87 ± 0.06
Lung	12.80 ± 1.28	9.87 ± 1.64	7.88 ± 0.37	4.83 ± 0.10	3.31 ± 0.33
Liver	27.73 ± 2.37	19.15 ± 1.85	24.13 ± 0.85	24.50 ± 2.01	28.65 ± 0.52
Kidney	25.38 ± 2.66	40.89 ± 4.61	98.19 ± 12.22	110.64 ± 4.09	123.46 ± 2.40
Stomach <sup>¶</sup>	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.08	0.40 ± 0.03	0.37 ± 0.02	0.25 ± 0.03
Intestine	2.51 ± 0.22	1.93 ± 0.17	2.08 ± 0.21	2.14 ± 0.20	3.69 ± 0.55
Pancreas	3.19 ± 0.11	3.03 ± 0.46	1.85 ± 0.08	1.67 ± 0.02	1.18 ± 0.06
Spleen	8.76 ± 1.07	7.98 ± 1.08	7.42 ± 0.75	7.21 ± 0.73	5.62 ± 0.20
Muscle	1.44 ± 0.08	1.51 ± 0.20	1.35 ± 0.19	0.82 ± 0.01	0.54 ± 0.01
Tumor	3.88 ± 0.18	4.79 ± 0.35	4.02 ± 0.25	2.81 ± 0.09	2.06 ± 0.18

<sup>§</sup>Tissue radioactivity is expressed as % injected dose per gram. <sup>¶</sup>Expressed as % injected dose.

### SPECT/CT 撮像

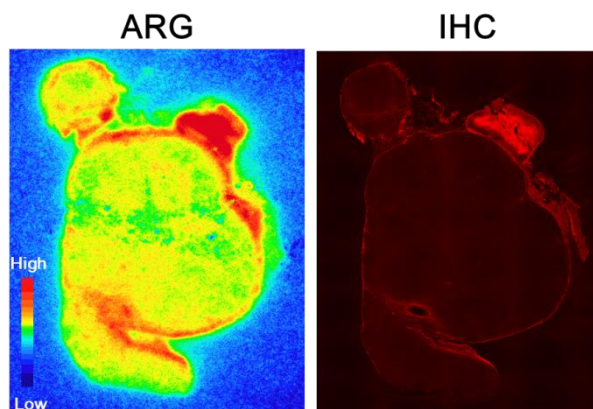
[<sup>123</sup>I]I-DC 投与 30 分後からの、胸部を撮像範囲とした SPECT/CT 撮像において得られた画像について、矢状面、冠状面の画像を Figure 14 に示す。[<sup>123</sup>I]I-DC は腫瘍を描出し、その放射能集積の分布は不均一性を示した。



**Figure 14.** Coronal and sagittal images of a tumor-bearing mouse 30 min after injection with [<sup>123</sup>I]I-DC in focusing on the thoracic region as the field of view.

### Ex vivo ARG, IHC

[<sup>123</sup>I]I-DC についてのオートラジオグラムと、隣接切片における免疫染色画像を Figure 15 に示す。[<sup>123</sup>I]I-DC の放射能分布は腫瘍の辺縁部に見られ、免疫染色による MT1-MMP 陽性領域と一致する傾向を示した。



**Figure 15.** Representative images of an autoradiogram 30 min after intravenous injection of [<sup>123</sup>I]I-DC (ARG) and MT1-MMP immunostaining (IHC).

#### 1-2-4 考察

がんの MT1-MMP を標的とした投与後早期におけるインビボイメージングを目的に、ペプチドを母体とした核医学イメージングプローブの開発を計画し、MT1-MMP への特異的結合性を有するペプチドを基にした標識部位及び光学異性の異なる 4 種の誘導体を合成し、これらに SPECT 用核種  $^{123}\text{I}$  を導入した分子プローブを創製し、それらの有効性を評価した。

プローブの  $^{123/125}\text{I}$  標識合成はマレイミドとチオール基による反応性の高い反応を介した部位特異的な標識により行い、高い放射化学的純度、収率で目的物を得た、また HPLC にて標識前駆体ペプチドと標識プローブとを完全に分離することに成功した。その結果、SPECT イメージングに用いた  $^{123}\text{I}$ -DC の比放射能 ( $> 260 \text{ MBq}/\mu\text{g}$ ) は、第 1 節にて開発した低分子化抗体プローブの見かけの比放射能 ( $37 \text{ kBq}/\mu\text{g}$ ) と比較して 5,000 倍以上高い値となった。

一般に、抗体や抗体誘導体を母体としたイメージングプローブにおいては標識体と標識前駆体の分離が困難であるため、プローブ投与時に過剰量の前駆体を共投与することとなる。その場合、共投与された過剰量の前駆体が標的分子に対するプローブの結合を競合的に阻害する可能性が懸念される。特に MT1-MMP は、代表的な高発現細胞である HT1080 細胞においても、その発現量が多くとも  $1.6 \times 10^5 \text{ molecules/cell}$  であり<sup>[30]</sup>、EGFR ( $1.6 \times 10^6 \text{ molecules/SKOV-3 cell}$ )<sup>[31]</sup> のような他の腫瘍マーカーと比較して発現レベルが低い。したがって、MT1-MMP を標的とするイメージングプローブにおいて共投与される前駆体量の減少は、腫瘍集積性の向上により効果的であると考えられる<sup>[32]</sup>。

今回開発したプローブの基本構造となる直鎖ペプチド配列 (HWKHLHNTKTFL) は MT1-MMP の構造中の触媒領域に含まれる MT-loop と呼ばれる部位 (160Glu-174Gln)

を認識部位としている<sup>[9]</sup>。MT-loop は MMP2 の活性化の際に重要な役割を果たし、MT1-MMP 分子の表面に露出した部位に存在するため、分子プローブによる認識が起こりやすい標的部位であると考えられる<sup>[33,34]</sup>。また、MT-loop の配列は MT1-MMP 特異的なものであるため、開発したイメージングプローブは MT1-MMP 特異的な認識能を有するプローブとなる事が想定される。

抗体等の高分子プローブと比較して、低分子量であり堅固な構造を持たないペプチドをイメージングプローブの母体とする場合、標識による構造変化や、標的親和性に与える影響についてより慎重に考慮する必要がある<sup>[35]</sup>。本研究でのプローブ開発にあたり、配列中に存在する 2 つのいずれかの Lys 残基のアミノ基に IB (3-ヨードベンジル) 基を導入した誘導体 (I-K3, HWK(IB)HLHNTKTFL ; I-K9, HWKHLHNTK(IB)TFL) についても作製し、親和性を結合阻害実験により評価したところ、これらの誘導体の阻害能は Cys 残基を標識した誘導体と比較して著しい低下が認められた。この結果は、配列中の Lys 残基のアミノ基の MT1-MMP 認識への寄与を示唆し、配列に標識用の Cys 残基を導入することで親和性への影響を軽減することができ、今回の薬剤設計の妥当性を支持している。また本研究で開発した 4 種の誘導体においても、C 末端側の Cys に標識した誘導体である [<sup>125</sup>I]I-LC、 [<sup>125</sup>I]I-DC がそれぞれの N 末端側標識体 [<sup>125</sup>I]I-LN、 [<sup>125</sup>I]I-DN と比較して高い阻害能を示したことから、親和性維持の観点からも、C 末端側の標識が適切であることが示された。

ペプチドプローブの開発においては、プローブの生体内安定性がしばしば問題となる。例えば、ソマトスタチンやグルカゴン様ペプチド-1 等のペプチドプローブは、生体内での不安定性により血中半減期が極めて短いため、イメージングプローブとしての利用は困難である<sup>[36,37]</sup>。このような背景のもと、多くのペプチドプローブにおいて非天然型アミノ酸である D 体アミノ酸の導入がなされており、その結果、インビボイメージング

に資するプローブ開発の成果をあげている<sup>[38]</sup>。本研究においても、D 体プローブ  $[^{125}\text{I}]\text{I-DN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  は L 体プローブ  $[^{125}\text{I}]\text{I-LN}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{I-LC}$  と比較してマウス血漿中での高い安定性を示し、腫瘍への集積量についても有意に高い値を示した。また、コントロール組織である筋肉への集積量と比較した腫瘍/筋肉比に関しても有意に高い値を示し、特に  $[^{125}\text{I}]\text{I-DC}$  については、イメージングの指標となる腫瘍/血液比が 4 種のプローブの中で最も高値を示した。

さらに、この  $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$  は、抗体プローブと同等の腫瘍/筋肉比を示し、SPECT によるイメージング検討において投与 30 分後で、MT1-MMP 発現腫瘍の描出に成功した。また、その腫瘍内の放射能局在は MT1-MMP 発現領域に一致する傾向を示したことから、 $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$  は生体内で MT1-MMP に結合している事が示された。

以上、MT1-MMP 結合型ペプチドプローブとして、適切な標識部位を選択し、D 体アミノ酸による安定化を図った  $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$  を創製した。 $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$  は、化学合成により安価かつ容易に合成できる均質なプローブであり、その比放射能は低分子化抗体プローブと比較して 5,000 倍以上高いものであった。そして、マウスに静脈内投与して 30 分後からの SPECT 撮像により MT1-MMP 発現腫瘍の描出に成功した。これらの結果より、新規開発した  $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$  はインビボでの MT1-MMP の発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを明らかとした。

## 第2章

### 膜型マトリックスメタロプロテアーゼ1の活性評価を目的とした 核医学イメージングプローブの開発

MT1-MMP を標的としたイメージングプローブとして、MT1-MMP への結合を機序とした結合型プローブの有用性を第1章にて見出した。一方で、膜型のプロテアーゼである MT1-MMP の酵素活性を活かした集積機序を示す活性化型プローブについても MT1-MMP イメージングへの利用が期待できる。活性化型プローブとは、MT1-MMP に特異的に切断される基質ペプチド配列を構造中に含み、MT1-MMP の酵素活性によりペプチドが切断され、その結果、プローブの性質に変化が生じ、シグナルを発する、或いはその部位に貯留するというタイプの分子である。結合型プローブが、MT1-MMP 分子に対し、プローブが1対1で反応するのに対し、活性化型プローブは MT1-MMP 分子が触媒となりプローブを連続的に活性化するため、MT1-MMP 分子に対し、プローブが1対多で反応する。したがって、活性化型プローブは結合型プローブと比較して、効率的な標的へのシグナル集積が期待できる<sup>[10]</sup>。

MMP を標的とした活性化型プローブとしては、消光剤を用いた蛍光のオフ/オン機構を利用したいくつかの蛍光プローブがすでに開発されている<sup>[39]</sup>。これらのプローブは、消光剤により消光状態であるプローブが MMP による基質配列の切断を受けることで、消光剤が離脱し、蛍光が回復することを利用して、がんの蛍光イメージングに成功している。しかしながら、蛍光プローブを用いたインビボイメージングにおいては、組織による蛍光の吸収や、散乱、自家蛍光等が蛍光の検出に強い影響を及ぼすため、検出深度が浅く標的のインビボ定量の達成には不十分である<sup>[40]</sup>。

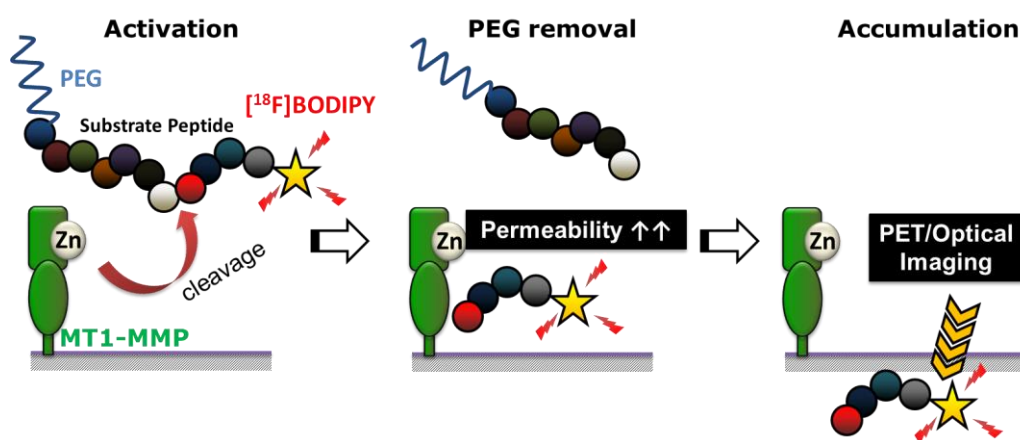
したがって、本研究では体深部まで定量的な検出が可能な核医学分子イメージング法

を用いて、MT1-MMP の活性をインビボ評価できる活性化型核医学分子イメージングプローブの開発を計画した。



## 2-1 薬剤設計

MT1-MMP による活性化を受け、その部位に貯留できる活性化型プローブとして、MT1-MMP 選択的に切断を受けるペプチドに、ポリエチレングリコール (PEG) と蛍光色素 BODIPY (boron-dipyrrromethene) 誘導体 BODIPY650/665 を結合した分子を設計した。PEG はプローブの分子量を増大させることで細胞膜透過を阻害する性質を有し<sup>[41]</sup>、また腫瘍への送達量を向上させる性質を有している<sup>[42]</sup>。一方 BODIPY650/665 は、細胞膜透過性の高い近赤外蛍光色素であり<sup>[12]</sup>、また  $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$  交換反応により、 $^{18}\text{F}$  標識体 ( $^{18}\text{F}$  BODIPY650/665) とすることが可能であるため、蛍光色素の性質に影響無く、PET プローブ化が可能である<sup>[43]</sup>。したがって、BODIPY650/665 を用いることにより、蛍光を用いた、簡便なインビトロ、インビボ評価と、PET を用いた、感度、定量性に優れたイメージングを同一分子により行う事の出来るプローブ開発が可能となる。この  $^{18}\text{F}$  標識 BODIPY 結合 PEG 化ペプチドプローブは、本来 PEG を含むために膜透過性の低い性質を有するが、MT1-MMP の酵素活性による切断を受け、PEG 部位が離脱することで、 $^{18}\text{F}$ BODIPY650/665 を含む膜透過性の高い断片となり、この断片が細胞膜を透過することでがん組織へ取り込まれることとなる (Figure 16)。この集積量は MT1-MMP の活性



**Figure 16.** The intended mechanism for imaging MT1-MMP using activatable probes.

に応じたものとなり、 [ $^{18}\text{F}$ ]BODIPY650/665 のシグナルを PET や蛍光イメージングにより検出することで、MT1-MMP のインビボ評価が可能となることが期待できる。

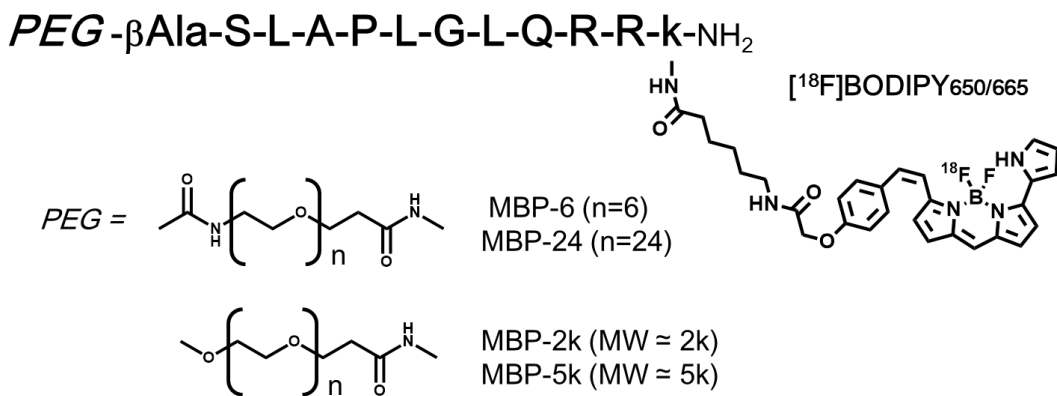
この  $^{18}\text{F}$  標識 BODIPY 結合 PEG 化ペプチドプローブにおいて、母体となる基質ペプチドは MT1-MMP 特異的な組織への集積において最も重要な構成要素である。このプローブは、インビボにおいて安定に存在し、腫瘍組織へ送達され、そこで MT1-MMP による切断を受けること、さらに切断後の [ $^{18}\text{F}$ ]BODIPY を含む配列が、細胞集積性を有することが必要となるが、これらの性質は基質ペプチドに大きく依存すると考えられる。したがって、プローブ開発の最初の過程として適切な基質ペプチドの選択が必要であると考え、消光剤による蛍光のオフ/オン機構を用いた基質配列の選別を計画した。すなわち、候補となる基質ペプチド<sup>[12,11,44,17,20]</sup>により、BODIPY650/665 及び BODIPY650/665 の消光に適したスペクトルを有する消光剤 BHQ-3 を連結した蛍光オフ/オン型プローブ (MBP1-5) を設計し、それぞれの基質配列のイメージングプローブへの有効性について蛍光を用いて評価することとした。

**Table 8.** Sequence of MBP1-5

Name	Sequence
MBP1	BHQ- $\beta$ Ala-Gly-Gly-Pro-Leu-Ala-Gly-Gly-Lys(BOD)-NH <sub>2</sub>
MBP2	BHQ- $\beta$ Ala-Ser-Leu-Ala-Pro-Leu-Gly-Leu-Gln-Arg-Arg-Lys(BOD)-NH <sub>2</sub>
MBP3	BHQ- $\beta$ Ala-Val-Arg-Pro-Ala-His-Leu-Arg-Asp-Ser-Gly-Lys(BOD)-NH <sub>2</sub>
MBP4	BHQ- $\beta$ Ala-Ser-Gly-Arg-Ile-Gly-Phe-Leu-Arg-Thr-Ala-Lys(BOD)-NH <sub>2</sub>
MBP5	BHQ- $\beta$ Ala-Arg-Ser-Cit-Gly-Hphe-Tyr-Leu-Tyr-Lys(BOD)-NH <sub>2</sub>

BHQ, BHQ-3; BOD, BODIPY650/665

また、この  $^{18}\text{F}$  標識 BODIPY 結合 PEG 化ペプチドプローブにおいて、PEG の分子サイズは、プローブの MT1-MMP による認識性、活性化前のプローブの細胞膜透過性、体内動態などの要素に影響を及ぼす重要な因子であると考えられる。したがって、基質配列の選別後には、腫瘍集積性の向上が認められ<sup>[42]</sup>、かつ細胞膜透過性の阻害<sup>[41]</sup>が示されているサイズの PEG の中から、イメージングに最適な分子サイズの選別を計画した。すなわち、PEG サイズがおよそ 0.3、1.1、2、5 kDa である PEG を用いた  $^{18}\text{F}$  標識 BODIPY 結合 PEG 化ペプチドプローブ MBP-6、MBP-24、MBP-2k、MBP-5k (Figure 17) を設計した。なお、BODIPY を結合させる Lys 残基については基質認識に関与しない残基であるため、第 1 章での知見や既報の活性化型プローブ<sup>[45]</sup>の知見を基に、安定性の向上を期待して、D-Lys を用いた。



**Figure 17.** Structures of [ $^{18}\text{F}$ ]BODIPY-labeled PEGylated peptide probes.

## 2-2 実験方法

### 試薬・機器

実験には、ナカライテスク株式会社、和光純薬工業株式会社から購入した特級試薬を用いた。ペプチドの合成は、渡辺化学工業株式会社から購入した試薬を用いた。 $^{18}\text{F}$  は京都大学医学部附属病院設置の超小型サイクロトロン CYPRIS HM-18 (住友重機械工業株式会社) を用いて製造した。MS は MALDI-TOF-MS を用いて測定した。PET/CT 装置による画像の収集は、FX-3300 Pre-Clinical Imaging System (GMI 社) を用いた。蛍光の観察は蛍光顕微鏡 (BZ9000、KEYENCE 社) を用いた。インビボ蛍光撮像には、IVIS Spectrum (PerkinElmer 社) を用いた。

### 合成

#### 蛍光オフ/オン型プローブ

MBP1 について、Fmoc- $\beta$ Ala-Gly-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Ala-Gly-Gly-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>、MBP2 について、Fmoc- $\beta$ Ala-Ser(tBu)-Leu-Ala-Pro-Leu-Gly-Leu-Gln(trt)-Arg(pbf)-Arg(pbf)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>、MBP3 について、 $\beta$ Ala-Val-Arg(pbf)-Pro-Ala-His(Trt)-Leu-Arg(pbf)-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Gly-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>、MBP4 について、 $\beta$ Ala-Ser(tBu)-Gly-Arg(pbf)-Ile-Gly-Phe-Leu-Arg(pbf)-Thr(tBu)-Ala-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub>、MBP5 について、 $\beta$ Ala-Arg(pbf)-Ser(tBu)-Cit-Gly-Hphe-Tyr(tBu)-Leu-Tyr(tBu)-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub> をそれぞれ、第 1 章第 2 節と同様に合成し脱樹脂を行った。得られた未精製体について HPLC による精製を行い、凍結乾燥後、BODIPY® 650/665-X NHS Ester (life technologies 社) と *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 中 2% *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (DIEA) 存在下で室温 2 時間反応させた。反応後、Fmoc 基を脱保護し、逆相 HPLC 精製、凍結乾燥を行った。凍結乾燥後、BHQ-3

Carboxylic Acid, Succinimidyl Ester (BIOSEARCH 社) と DMF 中 2% DIEA 存在下で室温 2 時間反応させた。反応後、逆相 HPLC 精製、凍結乾燥を行い、MS を確認した。精製後の MBP1-5 及び BODIPY® 650/665-X NHS Ester (1 µM) について、マイクロプレートリーダー (Infinite M200 Pro、Tecan 社) を用いて蛍光強度を測定した (excitation wavelength, 620 nm; emission wavelength, 680 nm)。さらに、マイクロチューブ内の MBP1-5、及び BODIPY® 650/665-X NHS Ester (3 µM) について、IVIS Spectrum を用いて撮像を行った。

HPLC 条件: COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID × 250 mm, 4 mL/min, 254 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 90 : 10 (0 min) → 10 : 90 (20 min)

## PEG 化誘導体

基質配列部位 Fmoc-βAla-Ser(tBu)-Leu-Ala-Pro-Leu-Gly-Leu-Gln(trt)-Arg(pbf)-Arg(pbf)-D-Lys(Boc)-NH<sub>2</sub> を第 1 章第 2 節と同様に合成後、Fmoc 基を脱保護した。MBP-6、MBP-24 に関しては、*N*-Fmoc-amido-dPEG6-acid (Quanta Biodesign 社)、*N*-Fmoc-amido-dPEG24-acid (Quanta Biodesign 社) を反応後、Fmoc 基を脱保護し、第 1 章第 2 節と同様の手法で N 末アミノ基をアセチル化した。MBP-2k、MBP-5k に関しては、ME-020CS 及び ME-050CS (日油株式会社) を反応させた。合成後第 1 章第 2 節と同様の手法で、脱樹脂を行い、得られた未精製体について逆相 HPLC 精製、凍結乾燥を行った。<sup>18</sup>F 標識反応の前駆体としては、ここまでの反応で得られた精製ペプチドを用いた。非標識体の合成には蛍光オフ/オン型プローブと同様に BODIPY® 650/665-X NHS をペプチドに反応させた。反応後、逆相 HPLC 精製、凍結乾燥を行い、生成物の MS を確認した。

HPLC 条件: COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID × 250 mm, 4 mL/min, 254 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 90 : 10 (0 min) → 10 : 90 (20 min)

### MT1-MMPによる切断活性の評価

ヒト MT1-MMP タンパク質 (hMT1-MMP) は京都電子工業株式会社より購入した。TCN バッファー (50 mM Tris, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.5, containing 3% DMSO) 中で hMT1-MMP (5 µg) 及び MBP1-5 (各 1 µM) を混合し、37 °C でインキュベートし、1、2、3、4、6、9、24 時間後においてマイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した (excitation wavelength, 620 nm; emission wavelength, 680 nm)。各プローブの活性化は hMT1-MMP 添加前の蛍光強度との比率により評価した。阻害群においては、GM6001 (TOCRIS 社) を最終濃度 100 µM となるよう添加し、同様に検討した。

### 細胞培養

MT1-MMP 高活性細胞として HT1080 を、低活性細胞としてはヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549) を実験に用いた<sup>[46]</sup>。これらの細胞は ATCC より購入し、第 1 章と同様の条件で培養した。

### 細胞内への蛍光の取り込み評価

HT1080 細胞を 6 ウェルプレート (BD フェルコン社) に播種し、実験に用いる 24 時間前に FBS 不含 DMEM に培養液を置換した。各ウェルに MBP1-4 及び BODIPY® 650/665-X NHS Ester を添加し (5 µM in FBS-free DMEM, 1% DMSO)、37 °C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、PBS (-)により 2 度洗浄を行い、蛍光顕微鏡観察を行った。フィルターは以下のものを用いた。

(excitation wavelength, 590 to 650 nm; emission wavelength, 663 nm to 737 nm)

阻害群においては、GM6001 を最終濃度 100 µM となるよう添加し、同様に検討した。

### In vitro 血漿中安定性評価

ddY マウス（雄性、6-9 週齢、日本エスエルシー社）から採取した血漿に、MBP1-4 を添加し（1% DMSO）、経時的にマイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した（excitation wavelength, 620 nm; emission wavelength, 680 nm）。蛍光強度が最大に達した時間の蛍光強度と各タイムポイントでの蛍光強度の割合を分解率とし、下記の計算式を用いて、各タイムポイントでの未変化体の割合を算出した。

$$\text{未変化体(\%)} = (1 - \text{各時間の蛍光強度} / \text{最大蛍光強度}) \times 100$$

### 担がんモデル動物の作製

BALB/cSlc-*nu/nu* マウス（雌性、5 週齢）は日本エスエルシー株式会社より購入した。無蛍光飼料（AIN-76A 配合）はエルエスジー株式会社より購入し、第 1 章と同様に飼育した。HT1080 細胞及び A549 細胞は PBS に懸濁し（ $5 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L）、マウス右下肢に HT1080 細胞を、左下肢に A549 細胞を皮下投与し、2 週目に実験に使用した。

### インビボ蛍光イメージング

モデル動物に 1%DMSO 含有 5%ブドウ糖溶液に溶解した MBP1-4、及び MBP-6、MBP-24、MBP-2k、MBP-5k（100  $\mu$ M/100  $\mu$ L）を投与し、MBP1-4 については 4 時間後、MBP-6、MBP-24、MBP-2k、MBP-5k については 2 時間後に、IVIS Spectrum を用いてマウスを全身撮像した。撮像後屠殺し、HT1080 腫瘍、A549 腫瘍について摘出後、撮像を行った。撮像は下記の条件で行い、画像解析には Living Image（PerkinElmer 社）を用いた。

撮像条件：（excitation wavelength, 640 nm; emission wavelength, 700 nm）

### MBP-2k の <sup>18</sup>F 標識体合成

BODIPY® 650/665-X NHS Ester を無水アセトニトリルに溶解し (0.15 μmol/10 μL)、四塩化スズ (4.3 μmol/10 μL) と混合した。 [<sup>18</sup>F]KF を TBAB (tetrabutylammonium bicarbonate, 25 μL) と混合し、バイアル中で無水アセトニトリルと 100 °C にて 2 度共沸させた。 BODIPY® 650/665-X NHS Ester をバイアルに加え室温で 10 分反応させた。反応後逆相 HPLC 精製 (条件 A) を行い、 [<sup>18</sup>F]BODIPY® 650/665-X NHS Ester を得た。 [<sup>18</sup>F]BODIPY® 650/665-X NHS Ester についてエバポレータにより溶媒を蒸発後、DMF 中 2% DIEA 存在下で MBP-2k の前駆体と 40 °C にて 1 時間反応させた。反応後、逆相 HPLC 精製を行った (条件 B)。

HPLC 条件 A : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID × 250 mm, 4 mL/min, 254 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 45 : 55 (0 min) → 5 : 95 (20 min)

HPLC 条件 B : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID × 250 mm, 6 mL/min, 254 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 70 : 30 (0 min) → 30 : 70 (20 min)

### 細胞内への放射能の取り込み評価

HT1080 細胞、及び A549 細胞を 6 ウェルプレート (BD フェルコン社) に播種し、実験に用いる 24 時間前に FBS 不含 DMEM に培養液を置換した。各ウェルに [<sup>18</sup>F]MBP-2k を添加し (111 kBq in FBS-free DMEM, 1% DMSO)、37 °C で 2 時間インキュベートした。インキュベート後、PBS (-)により 3 度洗浄を行い、0.2 N 水酸化ナトリウム水溶液により細胞を溶解し、放射能を測定した。細胞のタンパク質定量は BCA protein assay により行った。阻害群においては、GM6001 を最終濃度 100 μM となるよう添加し、同様に検討した。



### 体内分布評価

モデル動物は腫瘍サイズが均等になるよう配分し、プローブ投与 6 時間前から絶食し、1% DMSO 含有 5%ブドウ糖溶液に溶解した $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$  (185 kBq/100  $\mu\text{L}$ ) の投与、1、2、4 時間後に屠殺し、血液、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、腸、膵臓、脾臓、筋肉、腫瘍、骨を摘出した。各臓器の重量と放射能を測定し、単位重量あたりの放射能から集積量 (%ID/g) を算出した。

### 代謝物評価

モデルマウスを 1% DMSO 含有 5%ブドウ糖溶液に溶解した $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$  (37 MBq/100  $\mu\text{L}$ ) の投与 1 時間後に屠殺し、血液の採取及び腫瘍の摘出を行い、腫瘍を断片化後、PBS (-) 1.0 mL を氷上で加え、ホモジナイズを行った。ホモジナイズを行った腫瘍組織及び血液に 3.0 mL のアセトニトリルを加えてボルテックス後、遠心分離 (3,500 g、15 分) を行い、上清をフィルターに通じた後に逆相 HPLC にて分析した。

HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID  $\times$  250 mm, 6 mL/min, 220 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 90 : 10 (0 min)  $\rightarrow$  0 : 100 (20 min)

### PET/CT 撮像

モデルマウスに 1% DMSO 含有 5%ブドウ糖溶液に溶解した $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$  (20.4 MBq/100  $\mu\text{L}$ ) の投与 115 分後からイソフルラン (2.0%) 吸引麻酔し、投与 120 分後から PET/CT 装置を用いて 15 分間撮像した。その後、CT 撮像 (60 kV、320  $\mu\text{A}$ ) を行った。画像再構成は 3D OSEM 法を用いて行った。HT1080、A549 両腫瘍の関心領域 (ROIs) については Pmod ver. 3.3 を用いて指定し、すべての ROI を結合させ容積関心領域を決定後、両者の放射能集積比を算出した。

### 統計解析

データは平均値 ± 標準偏差で表した。有意差検定は Mann-Whitney U test により行い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 2-3 結果

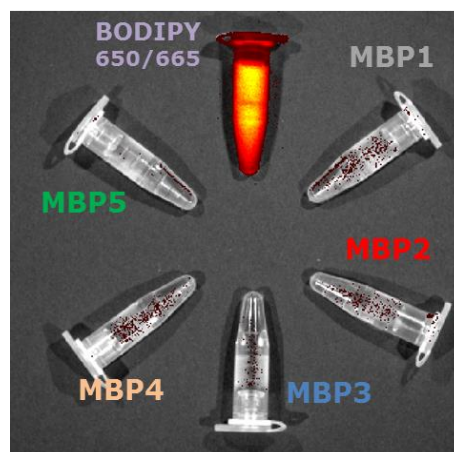
### 蛍光オフ/オン型プローブ合成

MBP1-5 をそれぞれ HPLC 純度 99% 以上で得た。MBP1-5 の蛍光強度はいずれも、同濃度の BODIPY® 650/665-X NHS Ester と比較して 2% 以下となった (Table 9)。マイクロチューブを用いた蛍光イメージングにおいて、BODIPY® 650/665-X NHS Ester が MBP1-5 と比較して強い蛍光強度を示した (Figure 18)。

**Table 9.** Characteristics of MBP1-5

Name	MS	*Normalized F.I
MBP1	$C_{101}H_{129}BF_2N_{23}O_{15}$ <i>m/z</i> calcd: 1954.01 found: 1955.11 (M+H) <sup>+</sup>	0.007
MBP2	$C_{119}H_{165}BF_2N_{31}O_{18}$ <i>m/z</i> calcd: 2366.30 found: 2367.36 (M+H) <sup>+</sup>	0.004
MBP3	$C_{117}H_{156}BF_2N_{32}O_{19}$ <i>m/z</i> calcd: 2363.23 found: 2364.31 (M+H) <sup>+</sup>	0.012
MBP4	$C_{118}H_{158}BF_2N_{30}O_{18}$ <i>m/z</i> calcd: 2333.25 found: 2334.22 (M+H) <sup>+</sup>	0.014
MBP5	$C_{122}H_{151}BF_2N_{27}O_{18}$ <i>m/z</i> calcd: 2332.18 found: 2333.25 (M+H) <sup>+</sup>	0.007

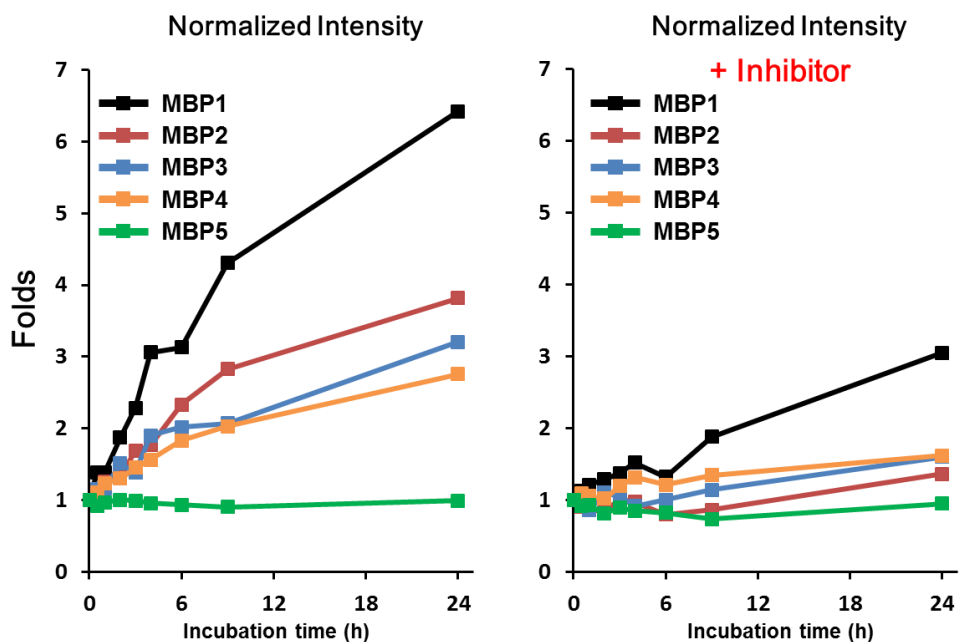
\* Normalized fluorescence intensity  
(F.I of BODIPY<sub>650/665</sub> = 1)



**Figure 18.** Fluorescence images of MBP1-5 and BODIPY<sub>650/665</sub>.

### MT1-MMP による切断活性の評価

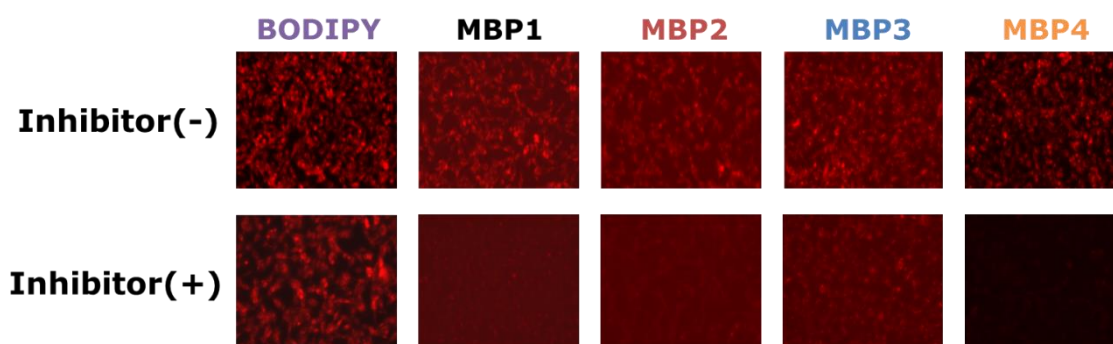
MBP1-4 の蛍光強度は hMT1-MMP 添加後、経時的に蛍光強度が上昇した。一方で、MBP5 については蛍光強度の上昇は認められなかった。また MBP1-4 は、阻害剤 GM6001 存在下においては蛍光強度の上昇は抑制された (Figure 19)。



**Figure 19.** Normalized fluorescence intensity of MBP1-5 treated with or without GM6001 at 1, 2, 3, 4, 6, 9, or 24 h after incubation with hMT1-MMP. Normalized intensities were calculated as such;  $\text{Folds} = (\text{Intensity at each time point}) / (\text{Intensity before incubation})$

### 細胞内への蛍光の取り込み評価

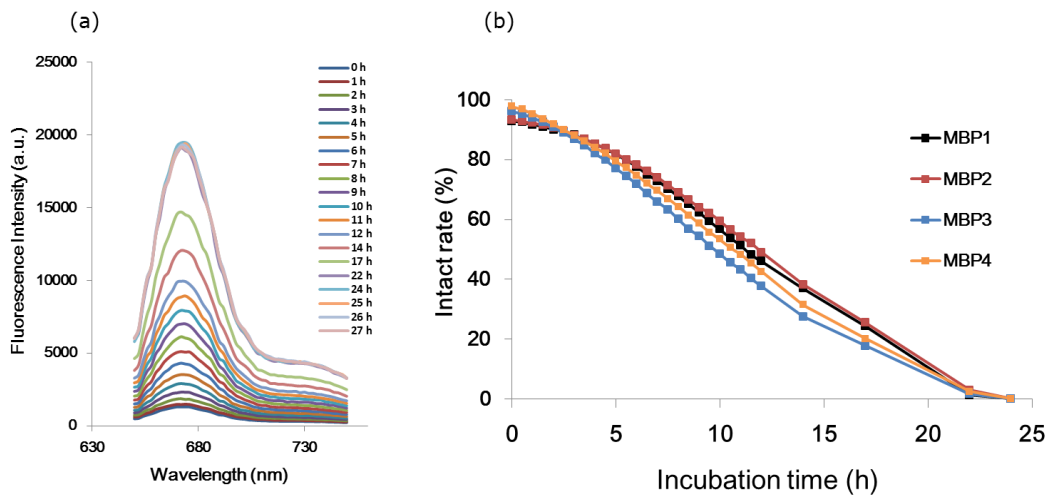
MBP1-4 及び BODIPY® 650/665-X NHS Ester は、いずれも HT1080 細胞への蛍光集積を示した。GM6001 存在下においては、BODIPY® 650/665-X NHS Ester の細胞における蛍光集積に変化は認められなかった。一方で、MBP1-4 の細胞への蛍光集積は抑制が認められた (Figure 20)。



**Figure 20.** Fluorescence images of HT1080 cells incubated with MBP1-5 or BODIPY® 650/665-X NHS Ester (5  $\mu$ M) at 37 °C for 30 min in the presence (bottom) or the absence (top) of the inhibitor GM6001 (100  $\mu$ M).

### In vitro 血漿中安定性評価

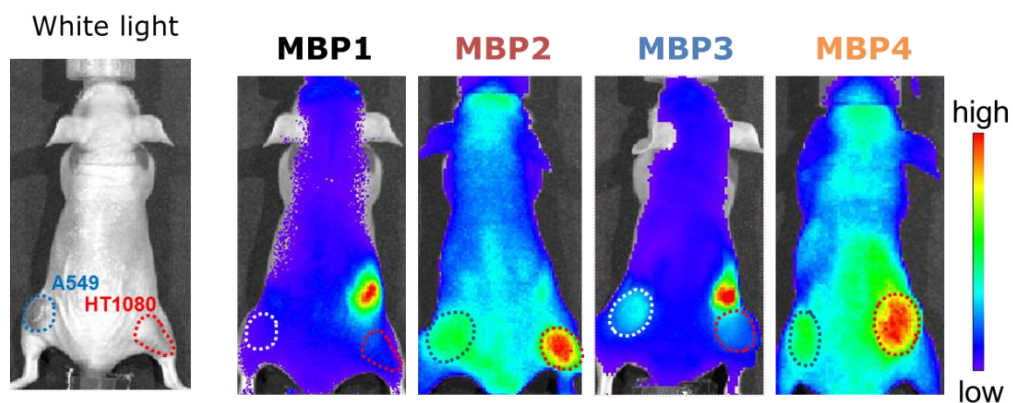
MBP1-4 は血漿とのインキュベート後、約 24 時間で蛍光強度が最大となった (Figure 21a)。各タイムポイントにおける未変化体の割合を Figure 21b にまとめた。MBP1-4 はインキュベート後 5 時間まで 80%以上が消光状態であった。



**Figure 21.** (a) The fluorescence spectra of MBP2 after incubation of mice plasma and (b) Intact rate of MBP1-4. Intact rate was calculated as such;  $(1 - \text{F.I. at the time point} / \text{max F.I.}) \times 100$ . F.I., Fluorescence intensity

#### インビボ蛍光イメージング (MBP1-4)

MBP1-4 投与 4 時間後での蛍光画像 (背面) を Figure 22 に示す。各プローブのうち、MBP2、MBP4 に関して HT1080 腫瘍が明瞭に描出された。また、それぞれの腫瘍を抽出後、その腫瘍をイメージングした結果、A549 腫瘍の蛍光強度に対する HT1080 腫瘍の蛍光強度の比率は、MBP2 が 1.8、MBP4 が 1.4 となり、MBP2 の方が、MT1-MMP 高活性腫瘍への集積特異性が高いことが認められた。



**Figure 22.** White light and fluorescence images of HT1080 and A549 tumor-bearing mice (HT1080, right; A549, left) at 4 h after injection of MBP1-4.

## PEG 化誘導体合成

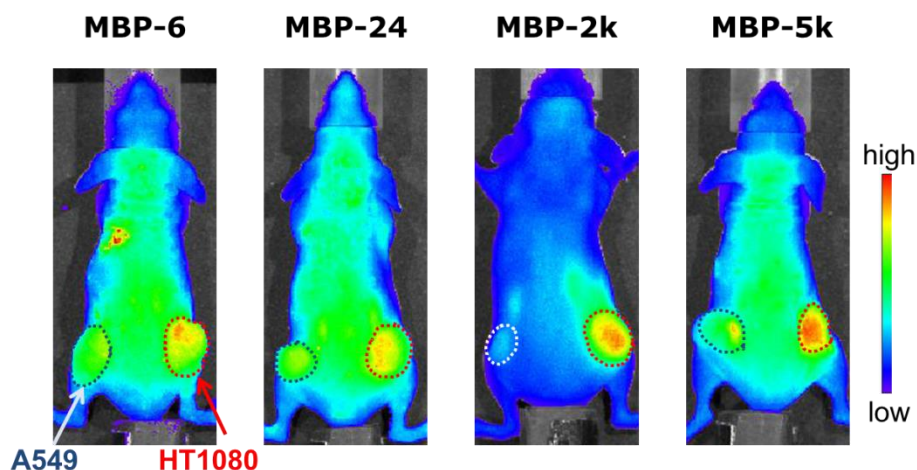
MBP2 を基質配列とした PEG 化誘導体 MBP-6、MBP-24、MBP-2k、MBP-5k 及び MBP-2k の前駆体はそれぞれ HPLC 純度 99%以上で得られた (Table 10)。

**Table 10.** Characteristics of MBP-6, 24, 2k, and 5k

Name	MS
MBP-6	$C_{103}H_{164}BF_2N_{25}O_{25}$ $m/z$ calcd: 2201.24 found: 2202.26 (M+H) <sup>+</sup>
MBP-24	$C_{136}H_{236}BF_2N_{25}O_{43}$ $m/z$ calcd: 2993.71 found: 2994.56 (M+H) <sup>+</sup>
MBP-2k	found: around 3844 (M+H) <sup>+</sup>
MBP-5k	found: around 6866 (M+H) <sup>+</sup>

## インビボ蛍光イメージング (MBP-6, 24, 2k, 5k)

MBP-6、MBP-24、MBP-2k、及び MBP-5k の投与 2 時間後での蛍光画像 (背面) を Figure 23 に示す。各プローブのうち、MBP-2k、MBP-5k において、高活性腫瘍である HT1080 に高い蛍光強度を認めた。特に MBP-2k において、腫瘍部位以外の蛍光強度が低く、最も明瞭に HT1080 腫瘍が描出された。



**Figure 23.** Fluorescence images of HT1080 and A549 tumor-bearing mice (HT1080, right; A549, left) at 2 h after injection of MBP-6, MBP-24, MBP-2k and MBP-5k.

#### MBP-2k の $^{18}\text{F}$ 標識体標識

BODIPY® 650/665-X NHS Ester の  $^{18}\text{F}/^{19}\text{F}$  交換反応による [ $^{18}\text{F}$ ]BODIPY® 650/665-X NHS Ester 合成について放射化学的収率は、 $16 \pm 3.9\%$  であり、放射化学的純度は 99% 以上であった。 [ $^{18}\text{F}$ ]BODIPY® 650/665-X NHS Ester と MBP-2k 前駆体との反応については、 [ $^{18}\text{F}$ ]BODIPY® 650/665-X NHS Ester からの放射化学的収率で、 $78 \pm 5.6\%$ 、放射化学的純度は 99% 以上で [ $^{18}\text{F}$ ]MBP-2k を得た。

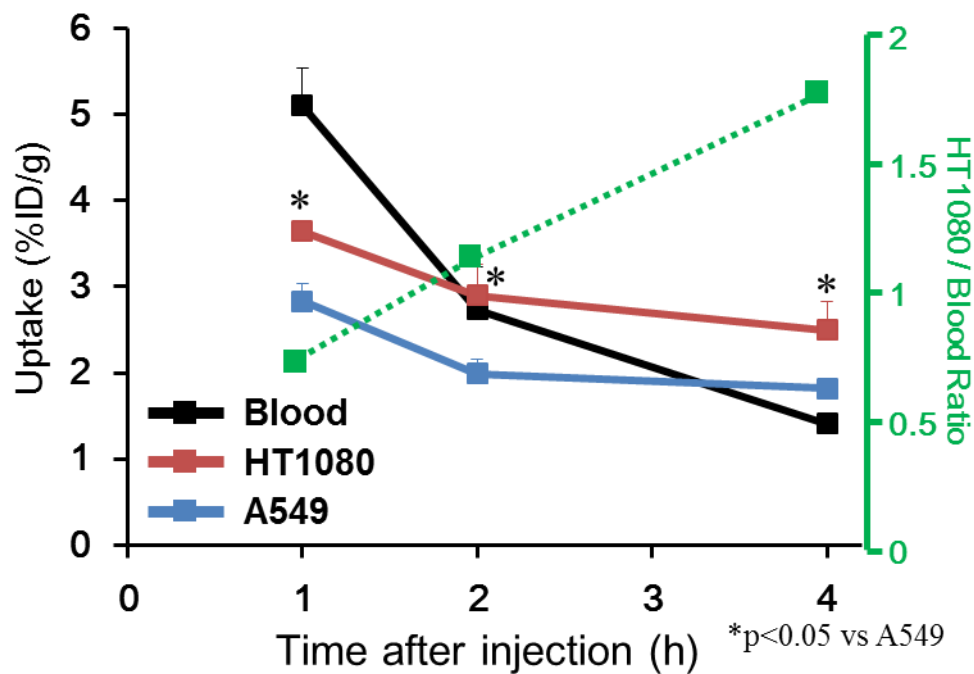
#### 細胞内への放射能の取り込み評価

[ $^{18}\text{F}$ ]MBP-2k 添加後 2 時間における、HT1080 細胞、A549 細胞への取り込み量はそれぞれ、 $57 \pm 2.8$ 、 $40 \pm 2.3\%$  ID/mg protein となり HT1080 細胞に有意に高い集積性を示した。また阻害群における HT1080 細胞への取り込み量は  $26 \pm 2.5\%$  ID/mg protein となり、阻害剤により有意に集積が抑制された。



## 体内分布評価

[<sup>18</sup>F]MBP-2k の体内分布は Table 11 に示す。腫瘍集積に関しては、HT1080 腫瘍について、投与 1、2、4 時間後においてそれぞれ  $3.6 \pm 0.1$ 、 $2.9 \pm 0.4$ 、 $2.5 \pm 0.3\%$ ID/g であった一方で、A549 腫瘍については  $2.8 \pm 0.2$ 、 $2.0 \pm 0.2$ 、 $1.8 \pm 0.1\%$ ID/g となり HT1080 腫瘍に各タイムポイントで有意に高く集積した。腫瘍/血液比は投与 1、2、4 時間後において  $0.7 \pm 0.1$ 、 $1.1 \pm 0.4$ 、 $1.8 \pm 0.3$  と経時的に上昇した (Figure 24)。



**Figure 24.** Accumulations of [<sup>18</sup>F]MBP-2k in Blood, HT1080 and A549 tumors. Tumor to Blood ratio of radioactivity accumulation was shown with dotted line. Comparisons of accumulation between HT1080 and A549 tumor was performed with the Mann-Whitney U-Test (\*P < 0.05 vs A549).

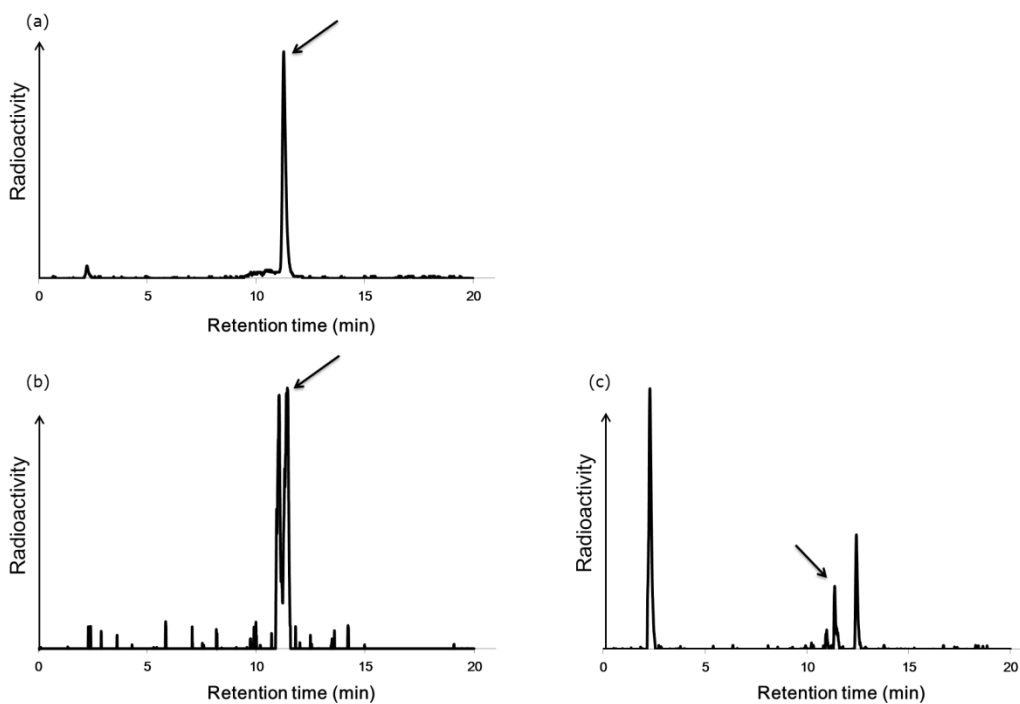
**Table 11.** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>18</sup>F]MBP-2k in tumor-bearing mice<sup>§</sup>

	Time after injection (h)		
	1	2	4
Blood	5.10 ± 0.43	2.74 ± 0.49	1.41 ± 0.04
Heart	3.10 ± 0.35	2.31 ± 0.50	1.46 ± 0.20
Lung	4.23 ± 0.34	3.11 ± 0.25	2.10 ± 0.19
Liver	56.72 ± 5.84	50.49 ± 2.18	44.87 ± 1.34
Kidney	22.57 ± 1.28	19.23 ± 1.43	15.09 ± 0.91
Stomach <sup>¶</sup>	0.30 ± 0.04	0.30 ± 0.04	0.19 ± 0.05
Intestine	7.51 ± 0.61	13.58 ± 2.39	16.42 ± 1.44
Pancreas	2.57 ± 0.14	2.12 ± 0.36	1.65 ± 0.46
Spleen	7.50 ± 0.37	6.51 ± 1.13	6.14 ± 0.45
Muscle	0.93 ± 0.09	0.97 ± 0.17	0.55 ± 0.02
Bone	2.64 ± 0.17	2.08 ± 0.63	1.81 ± 0.36
HT1080	3.65 ± 0.09	2.90 ± 0.35	2.50 ± 0.34
A549	2.34 ± 0.20	1.99 ± 0.17	1.82 ± 0.11

<sup>§</sup>Tissue radioactivity is expressed as % injected dose per gram. <sup>¶</sup>Expressed as % injected dose.

## 代謝物評価

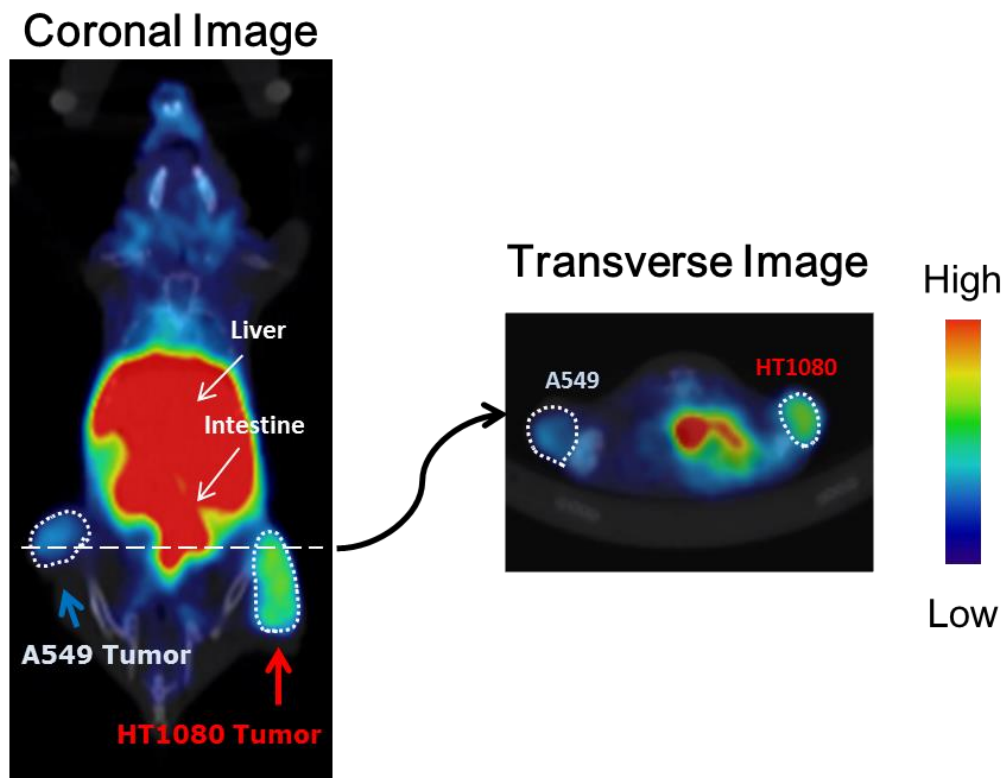
HPLCにより得たクロマトグラムを Figure 25 に示す。 $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$  投与 1 時間後で血液においては 54% が未変化体であった一方で、HT1080 腫瘍での未変化体の割合は 11% であった。また腫瘍においてのみ脂溶性の高い分解物を認めた。



**Figure 25.** Chromatograms of (a) injection solution of  $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$  and (b) radioactivity in Blood and (c) HT1080 tumor after 1 h injection of  $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$ . Black arrows indicate peak of intact probe.

## PET/CT 撮像

[<sup>18</sup>F]MBP-2k 投与 2 時間後における PET/CT 撮像による冠状面、横断面図を Figure 26 に示す。[<sup>18</sup>F]MBP-2k は高活性腫瘍 HT1080 を明瞭に描出し、低活性腫瘍 A549 と比較して高い放射能集積を示した。画像解析により得た HT1080/A549 の放射能集積比は 1.51 となった。



**Figure 26.** PET/CT images in HT1080 and A549 tumor-bearing mice (HT1080, right; A549, left) at 2 h after injection of [<sup>18</sup>F]MBP-2k.

## 2-4 考察

本研究では、MT1-MMP を標的とした活性化型プローブとしての利用が考えられる<sup>18</sup>F 標識 BODIPY 結合 PEG 化ペプチドプローブについて、まず、オフ/オン型プローブ (MBP1-5) を用いた配列選別評価を行い、有効性を見出した基質配列 MBP2 を用いて PEG サイズの異なる PEG 化ペプチドプローブ (MBP-6, 24, 2k, 5k) を設計、合成後、それぞれについて、蛍光によるスクリーニングを行い、PEG サイズが 2 kDa の誘導體 MBP-2k を選別した。さらに <sup>18</sup>F 標識体 (<sup>18</sup>F]MBP-2k) によるインビボ PET イメージングについて検討した。

基質配列候補として挙げた 5 種類のペプチド配列をリンカーとした 5 種のオフ/オン型プローブ、MBP1-5 は高純度で得た。MBP1-5 は同濃度の BODIPY® 650/665-X NHS Ester と比較して 2%以下の蛍光強度となり、消光剤 BHQ-3 によるプローブの消光が示された。また、MT1-MMP タンパク質により MBP1-4 は活性化され、その活性化は MMP 阻害剤により抑制されたため、MBP1-4 は MT1-MMP により基質として認識されることを示した。MBP5 に関しては他のプローブと比較して、脂溶性が高く、水系での評価に適した物性を有していなかったものと考えられる。

また MBP1-4 は MT1-MMP 高活性細胞である HT1080 細胞に添加後、速やかな蛍光集積を示し、またこの蛍光集積は阻害剤により抑制された。したがって、MBP1-4 は細胞に発現した MMP により活性化され、蛍光を回復し、また活性化後の BODIPY650/665 を含む断片が、細胞へ集積することが示された。

マウス血漿とのインキュベーションにより MBP1-4 は 5 時間まで、8 割以上が消光状態であったことから、インビボ評価に用い得る安定性を有する事が示唆された。インビボ蛍光イメージング検討では、MBP2、MBP4 の投与 4 時間後での撮像により明瞭に HT1080

腫瘍を描出したため、MBP2、MBP4 の腫瘍への送達性、及び腫瘍組織における活性化が示された。さらに、インビボでの活性化についての特異性評価のため、活性の異なる腫瘍 HT1080、A549 における蛍光強度を比較したところ、両者ともに高活性腫瘍 HT1080 により高い蛍光強度を示した。中でも、MBP2 がより良好な蛍光強度比を示したため、MBP2 の基質配列としての有効なものであると評価された。すなわち MBP2 の基質配列は、MT1-MMP による活性化を受け、また活性化後の断片は細胞集積性を有していた。さらに血漿において安定に存在し、インビボにおいて腫瘍への集積性及び MT1-MMP 発現特異的な活性化を示したため、MBP2 の基質配列が MT1-MMP を標的とした活性化型プローブへの利用に有望な配列であることを見出した。

次に、この基質配列を用いて PEG サイズの異なる PEG 化ペプチドプローブを設計、合成した。今回開発したプローブにおける PEG 分子に期待する役割としては、プローブ全体としての膜透過性の低下と、腫瘍への送達性の向上であるが、一方で PEG を修飾することで分子サイズが増大するため、体内動態が遅延する可能性が考えられる。本研究では投与後早期におけるイメージングを目的としており、過度な動態の遅延は問題となる。したがって、数 kDa の PEG の修飾により膜透過性を減少させる知見<sup>[41]</sup>と、高分子サイズによる体内動態の遅延<sup>[47]</sup>の情報を基に、分子量が 0.3-5 kDa の PEG を候補として選択した。PEG 誘導体の選別は MT1-MMP 高活性腫瘍 HT1080、低活性腫瘍 A549 を同時移植したモデルマウスを用いたインビボ蛍光イメージングにより行い、PET による撮像を見据えて投与 2 時間後で得られたイメージを評価対象とした。蛍光イメージングの結果、MBP-2k、MBP-5k について HT1080 腫瘍への高集積性を示し、2 kDa、5 kDa の PEG 修飾による腫瘍移行性の向上が示唆された。また、A549 腫瘍と比較して HT1080 腫瘍に両プローブとも高く集積したことから、MT1-MMP の活性に依存したプローブの活性化及び集積が示された。MBP-2k、MBP-5k を比較すると、より高分子となる MBP-5k

では血液由来と考えられるバックグラウンドの蛍光が高く認められたため、MBP-2k がより明瞭に腫瘍を描出した。したがって、投与 2 時間後における撮像には MBP-2k が最も有効であることが示され、PET 評価には MBP-2k の  $^{18}\text{F}$  標識体を用いることとした。

$^{18}\text{F}$  標識体である  $^{18}\text{F}$ MBP-2k は A549 細胞と比較して、MT1-MMP の活性が高い HT1080 細胞に有意に高く集積し、また MMP 阻害剤により有意に集積が低下したため、活性化型プローブのインビトロでの活性化機序が機能しているものと評価された。さらに、インビボにおいても HT1080 腫瘍に、A549 腫瘍と比較して 1.5 倍と有意に高い集積量を示した。また、代謝物を調べた結果、血液と比較して腫瘍においてより分解され、脂溶性側に  $^{18}\text{F}$ BODIPY650/665 を含む断片と考えられるピークを認めた。したがって、インビボにおいて本化合物は安定に腫瘍へ送達された後、腫瘍組織において MT1-MMP によって分解され、その断片が集積しているものと評価された。

また、 $^{18}\text{F}$ MBP-2k は PET/CT イメージングにおいて、投与 2 時間後に HT1080 腫瘍を明瞭に描出し、また画像解析の結果 HT1080/A549 の放射能集積比は 1.51 となった。この値は、体内動態評価で示した集積量の割合と同等の値となっており、集積量をインビボイメージングにより定量的に評価可能であることが示された。

以上、本研究では MT1-MMP の酵素活性により活性化を受ける核医学イメージングプローブ開発のため、 $^{18}\text{F}$  標識 BODIPY 結合 PEG 化ペプチドプローブを設計し、薬剤設計に適した基質ペプチド、PEG 分子の選別により最適化された構造を持つプローブ、 $^{18}\text{F}$ MBP-2k を開発した。この  $^{18}\text{F}$ MBP-2k は、MT1-MMP 高活性腫瘍に低活性腫瘍と比較して有意に高く集積し、 $^{18}\text{F}$ MBP-2k 投与 2 時間後からの PET 撮像により MT1-MMP 高活性腫瘍の明瞭なイメージングに成功した。

これらの結果より、新規開発した  $^{18}\text{F}$ MBP-2k は核医学画像診断による MT1-MMP の活性評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを明らかとした。

## 結 語

本研究では、がんの質的診断のため、膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) の発現量、酵素活性についてのインビボ解析を目的とした核医学分子イメージングプローブ開発及びその評価を行い、以下の知見を得た。

1、血中半減期短縮を目的として、低分子化抗体プローブ ( $[^{111}\text{In}]\text{scFv}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{diabody}$ ) を設計し、速やかな血中消失、腫瘍集積、及び投与 3 時間後の SPECT 撮像による MT1-MMP 発現腫瘍のイメージングに成功した。また、汎用性がより期待されるペプチドを母体とし、親和性、安定性を考慮したプローブ ( $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$ ) を設計し、化学合成により比放射能の高い均質なプローブを合成し、投与 30 分後の SPECT 撮像で MT1-MMP 発現腫瘍イメージングに成功した。以上より、新規開発した  $[^{111}\text{In}]\text{scFv}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{diabody}$ 、及び  $[^{123}\text{I}]\text{I-DC}$  は投与後早期での核医学画像診断による MT1-MMP の発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを明らかとした。

2、MT1-MMP の酵素活性により活性化を受ける核医学イメージングプローブ開発のため、 $^{18}\text{F}$  標識 BODIPY 結合 PEG 化ペプチドプローブを設計し、基質ペプチド、PEG 分子の選別により最適化された構造を持つプローブ ( $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$ ) を開発した。 $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$  は、MT1-MMP 高活性腫瘍に低活性腫瘍と比較して有意に高く集積し、 $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$  投与 2 時間後からの PET 撮像により MT1-MMP 高活性腫瘍の明瞭なイメージングに成功した。以上より、新規開発した  $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$  は核医学画像診断による MT1-MMP の活性評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを明らかとした。



以上、本研究は **MT1-MMP** の発現量及び酵素活性のインビボ解析によりがんの悪性度診断への貢献が期待される核医学イメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものであり、これらの知見は、今後のがんの病態評価、医薬品開発、基礎研究に有益な情報を提供すると考えられる。

## 引用文献

1. Lafleur, M. A.; Xu, D.; Hemler, M. E. Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol Biol Cell.* **2009**, *20*, 2030-40.
2. Ohuchi, E.; Imai, K.; Fujii, Y.; Sato, H.; Seiki, M.; Okada, Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem.* **1997**, *272*, 2446-51.
3. Knäuper, V.; Will, H.; López-Otin, C.; Smith, B.; Atkinson, S. J.; Stanton, H.; Hembry, R. M.; Murphy, G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem.* **1996**, *271*, 17124-31.
4. Itoh, Y.; Seiki, M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol.* **2006**, *206*, 1-8.
5. Yang, C. C.; Zhu, L. F.; Xu, X. H.; Ning, T. Y.; Ye, J. N.; Liu, L. K.; Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *BMC Cancer.* **2013**, *13*, doi: 10.1186/1471-2407-13-171.
6. D'Alessio, S.; Ferrari, G.; Cinnante, K.; Scheerer, W.; Galloway, A. C.; Roses, D. F.; Rozanov, D. V.; Remacle, A. G.; Oh, E. S.; Shiryaev, S. A.; Strongin A. Y.; Pintucci, G.; Mignatti, P. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism. *J Biol Chem.* **2008**, *283*, 87-99.
7. Temma, T.; Sano, K.; Kuge, Y.; Kamihashi, J.; Takai, N.; Ogawa, Y.; Saji, H. Development of a radiolabeled probe for detecting membrane type-1 matrix metalloproteinase on malignant tumors. *Biol Pharm Bull.* **2009**, *32*, 1272-7.

8. Sundaresan, G.; Yazaki, P. J.; Shively, J. E.; Finn, R. D.; Larson, S. M.; Raubitschek, A. A.; Williams, L. E.; Chatziioannou, A. F.; Gambhir, S. S.; Wu, A. M. <sup>124</sup>I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med.* **2003**, *44*, 1962-9.
9. Zhu, L.; Wang, H.; Wang, L.; Wang, Y.; Jiang, K.; Li, C.; Ma, Q.; Gao, S.; Wang, L.; Li, W.; Cai, M.; Wang, H.; Niu, G.; Lee, S.; Yang, W.; Fang, X.; Chen, X. High-affinity peptide against MT1-MMP for in vivo tumor imaging. *J Control Release.* **2011**, *10*, 248-255.
10. Law, B.; Tung, C. H. Proteolysis: a biological process adapted in drug delivery, therapy, and imaging. *Bioconjug Chem.* **2009**, *20*, 1683-95.
11. Jabaiah, A.; Daugherty, P. S. Directed evolution of protease beacons that enable sensitive detection of endogenous MT1-MMP activity in tumor cell lines. *Chem Biol.* **2011**, *18*, 392-401.
12. Myochin, T.; Hanaoka, K.; Komatsu, T.; Terai, T.; Nagano, T. Design strategy for a near-infrared fluorescence probe for matrix metalloproteinase utilizing highly cell permeable boron dipyrromethene. *J Am Chem Soc.* **2012**, *134*, 13730-7.
13. Weigelt, B.; Peterse J. L.; Van 't Veer L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer.* **2005**, *5*, 591-602.
14. Yamaguchi, H.; Wyckoff, J.; Condeelis, J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol.* **2005**, *17*, 559-64.
15. Page-McCaw, A.; Ewald, A. J.; Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2007**, *8*, 221-33.
16. Jones, J. L.; Glynn, P.; Walker, R. A. Expression of MMP-2 and MMP-9, their inhibitors, and the activator MT1-MMP in primary breast carcinomas. *J Pathol.* **1999**, *189*, 161-8.
17. Watkins, G. A.; Jones, E. F.; Shell, M. S.; vanBrocklin, H. F.; Pan, M. H.; Hanrahan; S. M.;

- Feng, J. J.; He, J.; Sounni, N. E.; Dill, K. A.; Contag, C. H.; Coussens, L. M.; Franc B. L. Development of an optimized activatable MMP-14 targeted SPECT imaging probe. *Bioorg Med Chem.* **2009**, *17*, 653-9.
18. Zarrabi, K.; Dufour, A.; Li, J.; Kuscu, C.; Pulkoski-Gross, A.; Zhi, J.; Hu, Y.; Sampson, N. S.; Zucker, S.; Cao, J. Inhibition of matrix metalloproteinase-14 (MMP-14)-mediated cancer cell migration. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 33167–33177.
19. Holliger, P.; Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* **2005**, *23*, 1126-36.
20. Atkinson, J. M.; Falconer, R. A.; Edwards, D. R.; Pennington, C. J.; Siller, C. S.; Shnyder, S. D.; Bibby, M. C.; Patterson, L. H.; Loadman, P. M.; Gill, J. H. Development of a novel tumor-targeted vascular disrupting agent activated by membrane-type matrix metalloproteinases. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 6902-12.
21. Nagase, H.; Woessner, J. F. Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **1999**, *274*, 21491-4.
22. Yana, I.; Weiss, S.J.; Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell.* **2000**, *11*, 2387-401.
23. Toth, M.; Hernandez-Barrantes, S.; Osenkowski, P.; Bernardo, M. M.; Gervasi, D.C.; Shimura, Y.; Meroueh, O.; Kotra, L. P.; Gálvez, B. G.; Arroyo, A. G.; Mobashery, S.; Fridman, R. Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme. *J Biol Chem.* **2002**, *277*, 26340-50.
24. Itoh, Y.; Ito, N.; Nagase, H.; Evans, R. D.; Bird, S. A.; Seiki, M. Cell surface collagenolysis requires homodimerization of the membrane-bound collagenase MT1-MMP. *Mol Biol Cell.* **2006**, *17*, 5390-9.
25. Mori, H.; Tomari, T.; Koshikawa, N.; Kajita, M.; Itoh, Y.; Sato, H.; Tojo, H.; Yana, I.; Seiki

- M. CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *EMBO J.* **2002**, 21, 3949-59.
26. Schumacher, F. F.; Sanchania, V. A.; Tolner, B.; Wright, Z. V.; Ryan, C. P.; Smith, M. E.; Ward, J. M.; Caddick, S.; Kay, C. W.; Aeppli, G.; Chester, K. A.; Baker, J. R. Homogeneous antibody fragment conjugation by disulfide bridging introduces 'spinostics'. *Sci Rep.* **2013**, 3, 1525.
27. Kenanova, V.; Wu, A. M. Tailoring antibodies for radionuclide delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* **2006**, 3, 53-70.
28. Khawli, LA.; van den Abbeele, A. D.; Kassis, A. I.; N-(m-[<sup>125</sup>I]iodophenyl) maleimide: an agent for high yield radiolabeling of antibodies. *Int J Rad Appl Instrum B.* **1992**, 19, 289-95.
29. Luo, Z.; Zhang, S. Designer nanomaterials using chiral self-assembling peptide systems and their emerging benefit for society. *Cham Soc Rev.* **2012**, 41, 4736-54.
30. Zucker, S.; Hymowitz, M.; Conner, C. E.; DiYanni, E.A.; Cao, J. Rapid trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase to the cell surface regulates progelatinase a activation. *Lab Invest.* **2002**, 82, 1673-84.
31. Tolmachev, V.; Wällberg, H.; Sandström, M.; Hansson, M.; Wennborg, A.; Orlova, A. Optimal specific radioactivity of anti-HER2 Affibody molecules enables discrimination between xenografts with high and low HER2 expression levels. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2011**, 38, 531-9.
32. Tolmachev, V.; Tran, T. A.; Rosik, D.; Sjöberg, A.; Abrahmsén, L.; Orlova, A. Tumor targeting using affibody molecules: interplay of affinity, target expression level, and binding site composition. *J Nucl Med.* **2012**, 53, 953-60.
33. Fernandez-Catalan, C.; Bode, W.; Huber, R.; Turk, D.; Calvete, J. J.; Lichte, A.; Tschesche, H.; Maskos, K. Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix

- metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J.* **1998**, 17, 5238-48.
34. English, W. R.; Holtz, B.; Vogt, G.; Knäuper, V.; Murphy, G. Characterization of the role of the "MT-loop": an eight-amino acid insertion specific to progelatinase A (MMP2) activating membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* **2001**, 276, 42018-26.
35. Jodal, A.; Lankat-Buttgereit, B.; Brom, M.; Schibli, R.; Béhé, M. A comparison of three (<sup>67/68</sup>Ga)-labelled exendin-4 derivatives for  $\beta$ -cell imaging on the GLP-1 receptor: the influence of the conjugation site of NODAGA as chelator. *EJNMMI Res.* **2014**, 4, doi: 10.1186/s13550-014-0031-9.
36. Deacon, C. F.; Nauck, M.A.; Toft-Nielsen, M.; Pridal, L.; Willms, B.; Holst, J. J. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes.* **1995**, 44, 1126-31.
37. Bohuslavizki, K. H. Somatostatin receptor imaging: current status and future perspectives. *J Nucl Med.* **2001**, 42, 1057-8.
38. Fani, M.; Maecke, H. R. Radiopharmaceutical development of radiolabelled peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* **2012**, 39 Suppl 1:S11-30.
39. Zhu, L.; Zhang, F.; Ma, Y.; Liu, G.; Kim, K.; Fang, X.; Lee, S.; Chen, X. In vivo optical imaging of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) activity. *Mol Pharm.* **2011**, 8, 2331-8.
40. Ntziachristos, V. Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology. *Nat Methods.* **2010**, 7, 603-14.
41. Temma, T.; Hanaoka, H.; Yonezawa, A.; Kondo, N.; Sano, K.; Sakamoto, T.; Seiki, M.; Ono, M.; Saji, H. Investigation of a MMP-2 activity-dependent anchoring probe for nuclear imaging of cancer. *Pros One.* **2014**, 9, e102180.

42. Zhu, L.; Xie, J.; Swierczewska, M.; Zhang, F.; Quan, Q.; Ma, Y.; Fang, X.; Kim, K.; Lee, S.; Chen, X. Real-time video imaging of protease expression in vivo. *Theranostics*. **2011**, *1*, 18-27.
43. Liu, S.; Lin, T. P.; Li, D.; Leamer, L.; Shan, H.; Li, Z.; Gabbai, F. P.; Conti, P. S. Lewis acid-assisted isotopic  $^{18}\text{F}$ - $^{19}\text{F}$  exchange in BODIPY dyes: facile generation of positron emission tomography/fluorescence dual modality agents for tumor imaging. *Theranostics*. **2013**, *3*, 181-9.
44. Lu, S.; Wang, Y.; Huang, H.; Pan, Y.; Chaney, E. J.; Boppart, S. A.; Ozer, H. Strongin, A. Y.; Wang, Y. Quantitative FRET imaging to visualize the invasiveness of live breast cancer cells. *Pros One*. **2013**, *8*, e58569.
45. Zhu, L.; Ma, Y.; Kiesewetter, D. O.; Wang, Y.; Lang, L.; Lee, S.; Niu, G.; Chen, X. Rational design of matrix metalloproteinase-13 activatable probes for enhanced specificity. *ACS Biol*. **2014**, *9*, 510-6.
46. Atkinson, J. M.; Pennington, C. J.; Martin, S. W.; Anikin, V. A.; Mearns, A. J.; Loadman, P. M.; Edwards, D. R.; Gill, J. H. Membrane type matrix metalloproteinases (MMPs) show differential expression in non-small cell lung cancer (NSCLC) compared to normal lung: correlation of MMP-14 mRNA expression and proteolytic activity. *Eur J Cancer*. **2007**, *43*, 1764-71.
47. Däpp, S.; Müller, C.; Garayoa, E. G.; Bläuenstein, P.; Maes, V.; Brans, L.; Tourwé, D. A.; Schibli, R. PEGylation, increasing specific activity and multiple dosing as strategies to improve the risk-benefit profile of targeted radionuclide therapy with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-bombesin analogues. *EJNMMI Res*. **2012**, *2*, doi:10.1186/2191-219X- 2-24.

## 謝 辞

本研究の終わりに鑑み、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 佐治 英郎 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

同時に、本研究の遂行及び本論文の作成において終始懇切なる御指導と御教示を戴きました、国立循環器病研究センター研究所 天満 敬 室長に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行において有益な御助言と御指導、御協力を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 小野 正博 准教授、京都大学医学部附属病院 佐野 紘平 助教、北海道大学アイソトープ総合センター 志水 陽一 助教に厚く御礼申し上げます。

多くの有益な御助言を戴きました、京都大学環境安全保健機構 木村 寛之 助教、北海道医療大学薬学部 河嶋 秀和 准教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 上田 真史 准教授、福井大学高エネルギー医学研究センター 牧野 顕 助教、京都大学大学院薬学研究科 渡邊 裕之 特定助教、天野 博夫 研究員に厚く御礼申し上げます。

低分子化抗体作製に御協力戴きました、京都電子工業株式会社 日向野 桂一 様、高木 陽子 様に厚く御礼申し上げます。

御協力、御激励を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 米澤 晶 学士、渡邊 裕之 修士、西郡 寛太郎 博士、尾江 悟 修士、依田 敬子 学士、三平 崇太郎 氏、出口 諄 氏、松田 洋和 博士、原田 直弥 博士、屋木 祐亮 博士、松村 憲志 修士、小川 京 修士、山内 早紀 修士、吉村 優志 修士、神戸 香織 学士、友池 文佳 氏、土井 雄貴 氏をはじめ、病態機能分析学分野の方々に深く感謝致します。

最後に、著者が研究に専念できるよう支えて戴いた家族、友人に感謝致します。