

令和元年6月6日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05390

研究課題名(和文) DNA修復機構を標的とする分子標的画像法の開発 - 放射線治療効果予測を目指して -

研究課題名(英文) Development of molecular target imaging method targeting DNA repair mechanism-aiming at radiation treatment effect prediction-

研究代表者

間賀田 泰寛 (Magata, Yasuhiro)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：20209399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんの治療法の一つである放射線治療は全てのがんで有効であるわけではない。そこで、治療開始前に放射線治療効果があるかどうか、あらかじめ鑑別できれば、無駄な被ばくも無く、医療経済的にも有用である。そこで、放射線治療効果が遺伝子DNA二重鎖切断により発揮されることに着目し、それに関連するEGFR-TKを対象としたPET画像法の開発を目指した。その結果、EGFR-TKのイメージングプローブが集積するがんでは放射線治療効果が高くなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの治療は大きく分けて、外科手術、化学療法、そして放射線治療の三種類に分類される。どれが選択されるかはがんの種類や状態、病期によって異なるが、痛みを伴わない放射線治療は患者にとっても有益であるものの、全てのがんに同様に効果があるわけではない。そこで、治療開始前に放射線治療が効くがんかどうかの鑑別が出来ることが望ましい。本研究により核医学イメージング技術によりその可能性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：Radiation therapy is one of the treatments for cancer. It is not effective in all cancers. If radiation treatment effects can be predicted before the start of treatment, useless exposure is prevented and it is useful for medical economics. We focused on the fact that the radiation treatment effect was induced by DNA double strand breaks, and we aimed to develop a PET imaging method of EGFR-TK which related to DNA repair system. In results, it was suggested that radiation therapeutic effect is happened in cancers in which EGFR-TK imaging probes are accumulated.

研究分野：分子イメージング・病態機能分析学

キーワード：放射性医薬品 がん PET 放射線治療 治療効果予測

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞に対する放射線感受性はがんの種類以外にも種々の要因によって規定される。すなわち、細胞分裂周期、細胞内酸素濃度、分化度、放射線の種類などがその要因となる。細胞分裂周期としてはM期からG2期を経てG1期初期までが放射線感受性が高いことが知られている。またこれ以外に細胞、特にDNA二重鎖が放射線により障害を受けたとしても、その修復機構が活発なほど放射線治療抵抗性となる。

申請者らはこれまでゲフィチニブの適用患者を、遺伝子検査をすることなく非侵襲的に鑑別することを目的として、ゲフィチニブの標的分子である変異型EGFR-TKを画像化する放射性薬剤、放射性ヨウ素標識PYK(図1)を開発し、その画像化に成功し有用性について報告してきた(図2)。またEGFRは放射線治療によりDNA二重鎖が切断された際、修復のための重要な信号を出す役割を担っ

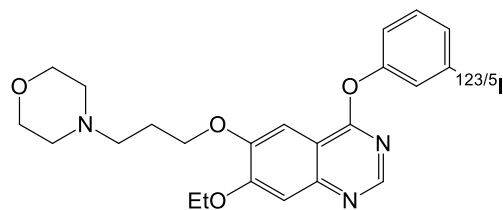


図1 放射性ヨウ素標識PYKの化学構造

ているが、この変異型EGFR-TKを有する細胞はEGFRの核内移行が出来ないためDNA修復機能が弱く放射線感受性が高いことが知られており、PYKを用いて放射線感受性の高いがんの鑑別が可能であることを細胞レベルで示した(Zhu HJ, Magata Y, Sakahara H. et al. Am J Nucl Med Mol Imaging. 4:293 2014)。また、そのようながんではゲフィチニブ処理によりS期の細胞が減少することから、その分放射線治療単独より治療効果がさらに増進することも示してきた(図3)。このような申請者らが報告した変異型EGFR-TK阻害剤処理による増感効果以外にも、COX-2阻害剤によってEGFRが阻害されCOX-2活性とは独立して放射線治療増感効果が得られることが報告されている(Klaus H, et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 70:203 2008)。また、分担研究者の中村らは、変異型EGFR-TKを有する肺腺がん患者において、EGFR-TK阻害剤が奏功する患者では放射線治療が奏功し、阻害剤の効果が認められない患者では放射線治療効果が低いことを示した(Hirata H, Nakamura K, et al. Anticancer Res. 33:1649 2013)。このことは変異型EGFR-TKにも放射線治療効果の高低があることを示しているが、このような背景の下、DNA二重鎖修復機能の強弱を画像化できれば放射線治療計画に有用な知見を与えられるものと着想した。

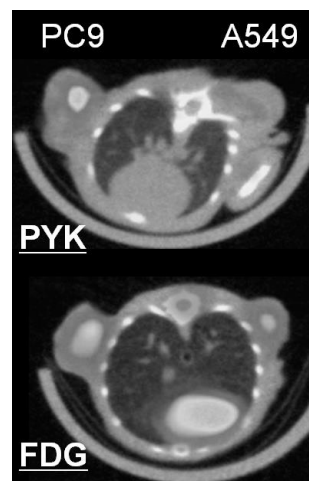


図2 ゲフィチニブが結合する変異型EGFR-TKを有するPC9と野生型EGFR-TKを有するA549でのイメージング。FDGでは両者とも明瞭に描出されるがPYKでは鑑別出来た。

### 2. 研究の目的

DNA二重鎖修復の分子機構に関しては多くの研究がなされている。また、DNA二重鎖断裂が起きた際、確率的に遺伝情報に影響を及ぼしにくく、修復の手間も少ない非同末端結合によりDNA二重鎖断裂が多くの場合修復される。この分子機構としてはDNA二重鎖切断部位にKuタンパクが結合し、DNA依存性プロテインキナーゼ(以下DNA-PK)による各修復因子の活性化により修復が始まることが知られている。さらにはDNA-PK量が上昇することで、細胞死の抑制や細胞増殖等を制御しているAkt活性が上昇し、その基質の一つでありサイクリンD1を分解するGSK3βが減少する。サイクリンD1の上昇によりDNA損傷応答を誘導し、DNA修復機構が活性化

されるため二重鎖断裂がすみやかに修復される。このような分子機構において異常発現している分子を標的とするいわゆる分子標的イメージング剤を開発し、放射線治療前に画像化することが出来れば、放射線抵抗性の程度を治療開始前に評価することが可能となり治療計画をより有効なものに出

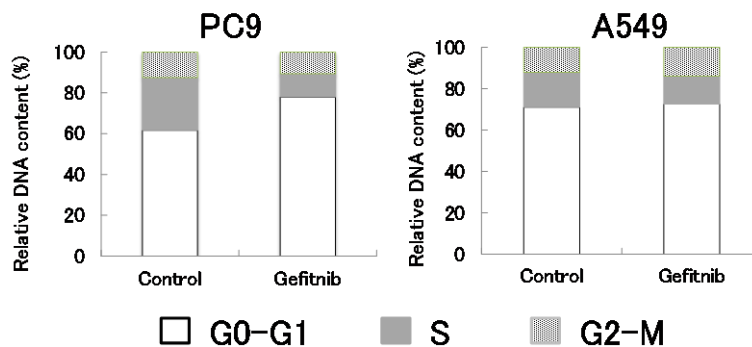


図3 ゲフィチニブ処理によりPC9ではS期の細胞が減少した。A549では変動は認められなかった。

来ると期待される。また、このことは白金製剤など直接 DNA 二重鎖を切断して抗がん作用を示すような抗がん剤の治療効果についても同様のことが期待され、DNA 修復機構を標的とした分子標的イメージング手法開発の重要性と必要性を着想するに至ったものである。

そこで、本研究では、がんの放射線治療における治療効果予測を可能とするシステムを確立し、最終的にはこれら新規分子標的イメージングプローブの安全性評価を実施し臨床利用へつなげることを目指すこととした。すなわち、これまでに検討してきた変異型 EGFR-TK を標的とする分子標的イメージングプローブである PYK (図 1) を母体化合物として用い、より定量性の高いデータが得られる PET プローブ化し、インビボでその放射線治療効果予測に関する有用性について検討することとした。

### 3. 研究の方法

以下の研究において動物を用いる実験についてはあらかじめ浜松医科大学動物実験倫理委員会による審査・承認を受けて実施した。放射性同位元素を使用する実験については関連法令および浜松医科大学医学部附属病院放射線障害予防規程を順守して実施した。その他関連法令に従い実験を遂行した。

#### F-18 標識 PYK の標識合成に関する検討

PYK の F-18 標識体については、図 1 に示す構造中、放射性ヨウ素の代わりに F-18 を導入することとして、その前駆体を検討しデザインした。当初同部位を F 化反応が容易となる事が予想された I-ylide 体として F 化反応を進める予定であったが、原料合成が煩雑となり条件検討に時間を要する可能性が高くなった。そこで、少し F 化反応には試薬の種類等手順が複雑となるものの、同部位をホウ素誘導体として F 化を進めることとし、その原料合成を行った。標識反応には、サイクロトロンで製造した F-18 を精製・回収する際の試薬種類や濃度、用いる原料の量、反応触媒の種類と量、溶媒種類、反応温度等を種々検討し、F-18 標識化に最適と考えられる条件を見出し、90%近い反応効率で HPLC 上、所期の化合物ピークが得られることを見出した。

#### EGFR-TK の遺伝子変異の異なるがん細胞担癌マウスにおける治療に関する検討

A431、PC9、A549 の各腫瘍細胞をマウス下肢皮下に移植した。腫瘍径が 5 mm 程度になったら使用次の実験に使用した。なお、A431、A549 は EGFR については WildType であり、PC9 は Exon 19 Del である。A431 を単独で皮下移植して X 線照射検討による基礎検討を実施後、A549 と PC9 を同一個体の左右大腿部にそれぞれ移植して検討に用いた。X 線外照射による放射線治療の際には、マウスは絶食せず、1.5%イソフルラン麻酔下で、腫瘍以外の体部は 1mm 厚の鉛板で遮蔽した状態で、腫瘍に X 線 (18 mA, 140 keV, 10 or 20 Gy) を照射した。X 線照射直前および照射後隔日あるいは数日おきに、腫瘍径と体重を計測した。腫瘍体積は以下の式により評価した。腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) = 長径 (mm) x 短径 (mm) x 短径 (mm) / 2。

PC9 および A549 移植マウスでは、治療前日に約半日の絶食を行い、抱水クロラール麻酔下、保温しながら FDG-PET を撮像した。静脈ラインより FDG (約 250 μCi) を投与し、FDG 投与 約 35 分後に CT を撮像した。FDG 投与 45 分後から 15 分間の PET 撮像を行った。15 分間分の画像再構成を行い、腫瘍部位に VOI を設定し、SUV を算出した。

### 4. 研究成果

#### EGFR-TK の遺伝子変異の異なるがん細胞担癌マウスにおける治療に関する検討

A431 の EGFR-TK は WildType であり、I-125-PYK による検討により高い放射能の取り込みがあることが知られている。図 4 に示すように A431 を移植した担癌マウスでの X 線照射後の体重変化については、若干高線量であるほど体重増加が少ない傾向が認められるものの、有意な差とは言えず照射した線量の妥当性が示された。また、図 5 に示すように、非

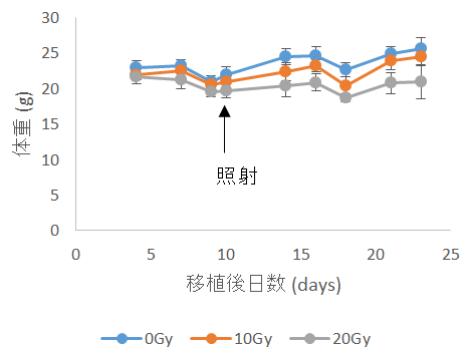


図 4 A431 担癌マウス X 線治療照射治療時の体重変化

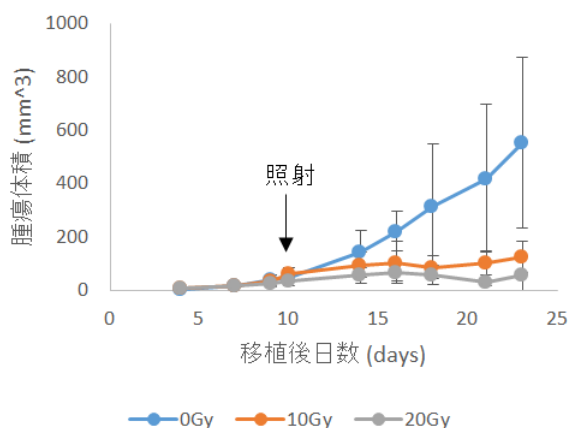


図 5 A431 担癌マウス X 線照射治療後の腫瘍体積変化

照射群では腫瘍体積が大きくなっていくものの、照射群では高い治療効果が認められた。以後の検討では本条件により X 線照射治療検討を行う事とした。

PC9 および A549 を移植したマウスにおける体重変化を図 6 に示す。若干の増減はあるものの、非照射群に比較して照射群での体重変化に差が無いことが示された。腫瘍体積変化について PC9 の結果を図 7 左に、A549 の結果を図 7 右に示した。いずれの腫瘍細胞についても非照射群では日数経過とともに腫瘍体積が増大している。PC9 では線量依存的に治療効果が示され、20Gy 照射群においてほぼ腫瘍体積の増大が認められなかった。それに対して、A549 については、照射群で若干の治療効果は認められるものの、20Gy 照射群においてもまだ腫瘍体積の持続的な増大が認められた。PYK を用いた画像化においては、図 2 に示すように、A549 では放射能の集積はほとんど認められず、PC9 では PYK 投与後の放射能が高く集積していることが示された。また、図 8 に示すように、X 線照射治療直前に施行した FDG-PET 撮像では、両者への取り込み量に有意な差は認められなかった。これらの事は、予め PYK による EGFR-TK の画像化を行う事で、高い集積を示す腫瘍については治療効果が期待される事を示すものであり、本研究の POC を得ることが出来たものと考ええる。

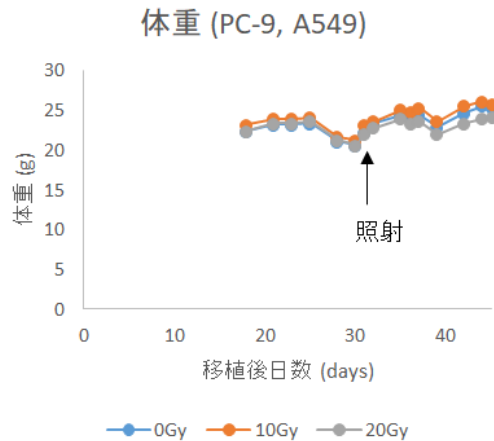


図 6 PC9 および A549 担癌マウスに X 線照射治療時の体重変化

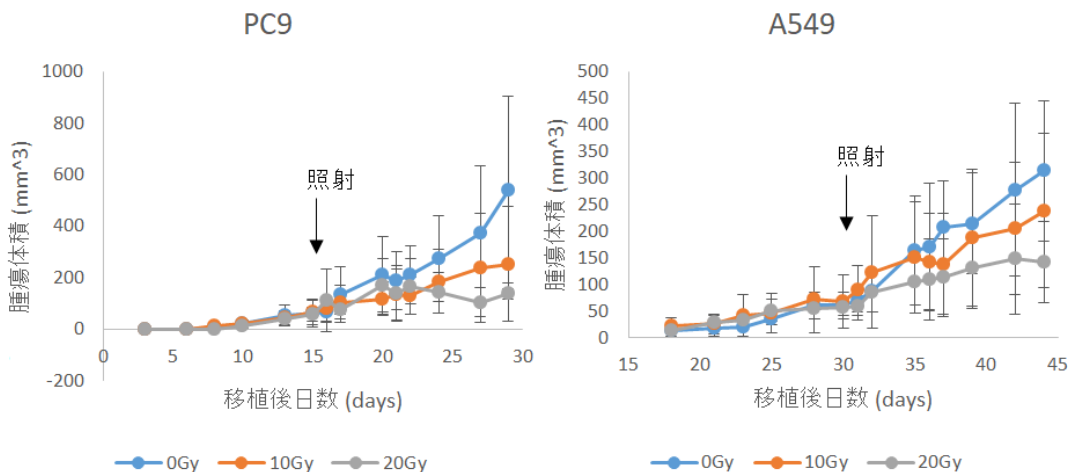


図 7 PC9(左)および A549(右)担癌マウスに X 線照射治療後の腫瘍体積変化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

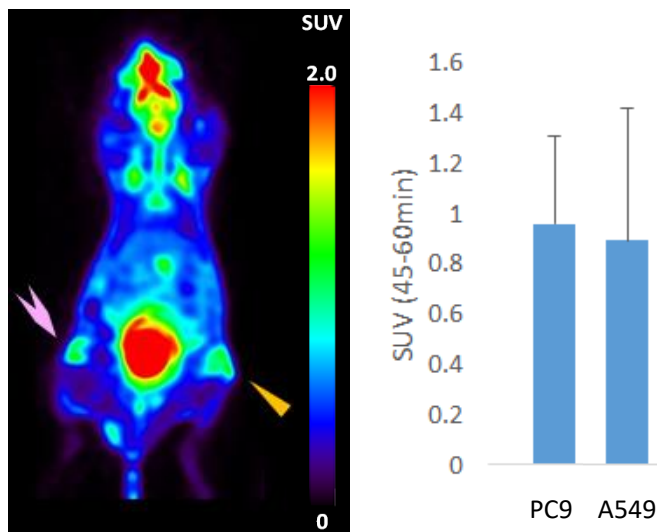


図 8 PC9 および A549 担癌マウスにおける X 線照射治療前日の FDG-PET 画像。PET 画像では、PC9(左側ピンク矢印)および A549(右側オレンジ矢印)を示す。それぞれの腫瘍の SUV 値に有意な差はない

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：阪原 晴海  
ローマ字氏名： SAKAHARA HARUMI  
所属研究機関名：浜松医科大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：10187031

研究分担者氏名：中村 和正  
ローマ字氏名：NAKAMURA KATSUMASA  
所属研究機関名：浜松医科大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：20284507

研究分担者氏名：鈴木 千恵  
ローマ字氏名：SUZUKI CHIE  
所属研究機関名：浜松医科大学  
部局名：光先端医学教育研究センター  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：20637285

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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