

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10377

研究課題名(和文) 線維芽細胞増殖因子受容体を標的としたがんの質的診断用イメージングプローブの開発

研究課題名(英文) Development of the PET imaging probe targeting Fibroblast Growth Factor Receptor

研究代表者

木村 寛之 (KIMURA, HIROYUKI)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50437240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞増殖因子(Fibroblast Growth Factor, FGF)受容体であるFGFRは、広く組織に分布する膜貫通型チロシンキナーゼ受容体であり、FGF/FGFRシグナル伝達は、がん細胞の分化、増殖、転移に関与することが示唆されている。そこで、本研究では特にFGFR1に着目しPET分子イメージングプローブを開発を行うこととした。化合物 [18F]9を設計・合成し、インビトロ、インビボ評価を実施した。[18F]9はFGFR1に対して阻害活性を示し($IC_{50}=172.6 \pm 44.2$ nM)、さらにFGFR1高発現腫瘍に集積し、滞留することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、FGFRを標的としたPET/SPECT分子イメージングプローブの開発は報告が無く、本プローブ開発は独創的な研究であると考えられる。開発したプローブを用いがん化のメカニズム、薬剤耐性へのメカニズムを解明し、遺伝子情報を含んだ新規核医学診断法の開発、さらに分子標的薬の開発への効率的なワークフローの構築へと繋げることが出来ると考えている。また、FGFRを標的とした分子標的薬の開発が世界的に進められており、本研究で得られた成果を創薬に応用することも可能である。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1), known as a kind of tyrosine kinase receptor, is suggested that it promotes exacerbation of certain tumors. This research contains a drug design, synthesis, and evaluation of a new PET probe targeting FGFR1. In vitro kinase assay, nonradioactive 9 showed inhibitory activity to FGFR1 ($IC_{50} = 172.6$ nmol/L). In vivo biodistribution study, [18F]9 showed high accumulation and high retention to FGFR1 amplification tumor (3.23% dose/g). On the other hand, high blood retention of RI was observed (2.92% dose/g), which will be a cause of high background. In conclusion, though some improvements for high hydrophilicity or low protein binding rate are necessary, [18F]9 is the first compound as FGFR1-targeting nuclear medicinal imaging probe, and [18F]9 provide beneficial information to FGFR1 imaging in the future.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：線維芽細胞増殖因子受容体 PETプローブ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2015年の死因第1位は悪性新生物(がん)であり、死亡総数の28.7%を占める37万131人が亡くなっている。また、がんの死亡数と罹患数は、人口の高齢化を主な要因としてともに増加し続けており、人口の高齢化の影響を除いた年齢調整率で見ても、がんの死亡は1990年代半ばをピークに減少しているものの、罹患は1980年代以降増加している。高齢化の進む日本において、がんは健康を脅かす重要な要因であり、早期に発見し治療を行うことが必要とされている。

繊維芽細胞増殖因子(Fibroblast Growth Factor, FGF)とその受容体であるFGFRは、広く組織に分布する膜貫通型チロシンキナーゼ受容体であり、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4の4種からなる。FGF/FGFRシグナル伝達は、がん細胞の分化、増殖、転移に関与することが示唆されており(Nat Rev Cancer, 2010)、FGFR遺伝子異常陽性がんに対する特異的な薬剤の開発が進められているが、未だ有望な化合物を見出すには到っていない。最近、がん細胞でのFGFR遺伝子変異、過剰発現・転座変異などが報告され(Cancer Metastasis Rev, 2015)、これらの変異とがん細胞の増殖との関係が明らかになりつつある。特に、乳がんや肺がんに関与するFGFR1、膀胱がんに関与するFGFR3などでは、高頻度にFGFRの変質(主に遺伝子の増幅)が確認されている。

一方、がんが診断されると遺伝子検査によって患者の遺伝子の変異の有無の確認が行われている。これらの遺伝子検査は、生検によって採取されたがん組織を用いて行われる場合が多い。しかしながら、がん患者に侵襲的な生検を試みるのは様々なリスクがあり、身体的な負担も大きい。そのため、生検に伴う様々なリスクを回避しつつ、遺伝子検査にかわる新たな方法の開発が求められている。

2. 研究の目的

そこで、特にFGFR1とFGFR3に着目し乳がんや肺がん、膀胱がんの治療方針設定に資する質的診断用PET/SPECT分子イメージングプローブを開発し、さらに開発したプローブを用いがん化のメカニズム、薬剤耐性へのメカニズムを解明し、遺伝子情報を含んだ新規核医学診断法の開発、さらに分子標的薬の開発への効率的なワークフローを構築することにある。

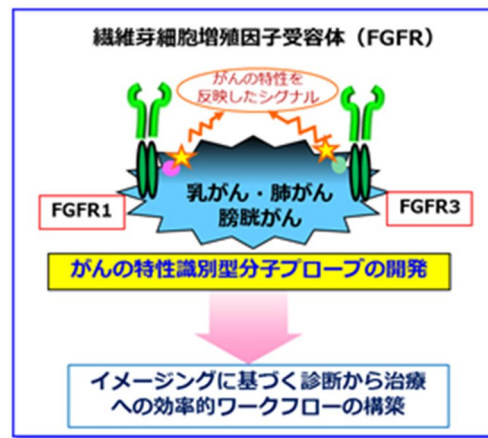
3. 研究の方法

阻害活性評価: 500 μ M 試験試料溶液を5倍ずつ希釈し、開始濃度を500 μ Mとして10段階分用意した。これを測定用試験試料溶液とした。次に、12連ピペットを用いてプレートの奇数列に4 μ Lずつキナーゼ溶液を入れた。そして、同様に2 μ Lずつ測定用試験試料溶液を加え、室温で10分間インキュベートした。続いて同様にATP + Substrate溶液を4 μ Lずつ加え、キナーゼ反応を開始させた。この段階での試験試料濃度をIC₅₀の算出に用いた。室温で120分間インキュベートした後、同様にADP-Gloキナーゼアッセイキット付属のADP-GloTM試薬を10 μ Lずつ加えて、キナーゼ反応における余剰ATPを消去した。室温で40分間インキュベートした後、同様にキナーゼ検出試薬を20 μ Lずつ加えた。遮光しながら室温で60分間インキュベートすることで、キナーゼ反応により生成したADP量を最終的に発光強度へと変換し、この発光強度をプレートリーダーにて測定した。一連の作業において、プレートにはMicroplate 384/V-PP, White wells (eppendorf, DEU)を用いた。得られた測定値から試験試料のFGFRに対するIC₅₀値を求めた。

細胞培養: FGFR1を高発現している細胞種であるH520細胞の培養を行った。

H520細胞の培養: 100 mmおよび150 mmディッシュに播種し、非働化を行ったFBSを10%含有したRPMI-1640培地中で37℃、5% CO₂条件下において培養した。2-3日に1度培地交換を行い、成長した細胞が80%コンフルエント状態に達すると、D-PBS(-)を用いてディッシュを洗浄し、2.5 g/L-トリプシン/1 mmol/L-EDTA溶液を用いて細胞を剥離したのち、125 x gで5分間遠心を行い、沈殿した細胞を懸濁してセルカウントを行った。また、この細胞を10% FBS含有RPMI-1640培地で播種した。なお、すべての培地においてペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液を1%含有したRPMI-1640培地を使用した。

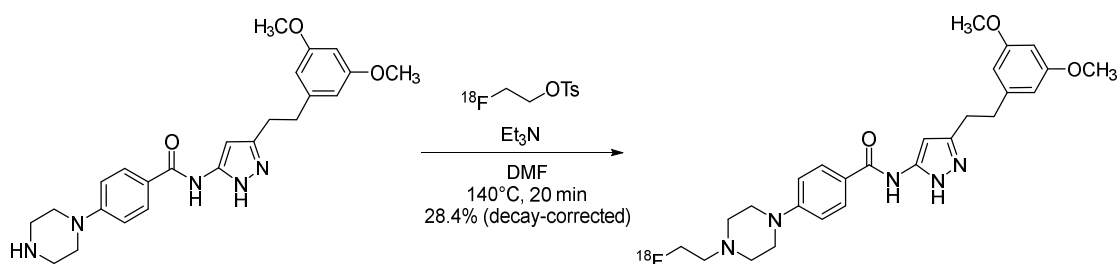
標的タンパク質の発現確認: 作成したタンパク抽出液のタンパク質濃度を、BCAプロテインアッセイキットとBSA Standard Pre-Dilutedセットを用いたBCA法により測定した。プレートには、96ウエル平底マイクロプレート(IWAKI Science Products, 静岡県)を用いた。タンパク質量により求めたタンパク抽出液の濃度をもとに、タンパク抽出液、精製水、LDSサンプルバッファー(4倍濃縮)を混合し、95℃で5分間煮沸することでサンプル溶液を調製した。このサンプル溶液を、20倍希釈したランニングバッファー(20倍濃縮)中で4-20% Mini-PROTEAN® TGXTMプレキャストゲル(Bio-Rad Laboratories, カリフォルニア州, USA)を用いた電気泳動により



分離した。分子量マーカーにはレインボーマーカーを用いた。分離されたタンパク質は Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad Laboratories、カリフォルニア州、USA) を用いて 20 倍希釈したトランスファーバッファー (20 倍濃縮) 中で PVDF 膜に転写し、TBST で洗浄を行った後、バレットブロッキングワンをを用いて、室温で 5 分間ブロッキング処理を行った。その後、TBST にバレットブロッキングワン (希釈倍率 20 倍) と FGF Receptor 1 ラビット抗体もしくは -Actin マウスモノクローナル抗体 (希釈倍率: 1,000 倍) を氷冷しながら混合し、この抗体希釈液に PVDF 膜を浸して 4 条件下において、一晚振盪した。その後、PVDF 膜を TBST で洗浄し、Anti-mouse, IgG, HRP-linked 抗体 (希釈倍率: 3,000 倍) を室温で 1 時間反応させた。抗体反応後、PVDF 膜を TBST で洗浄し、Western Lightning® Plus-ECL を反応させたのちにイメージングシステムにより撮影を行った。

担がんモデルマウスの作成: H520 細胞を生理食塩水: Matrigel の 1: 2 溶液に懸濁することにより作成した細胞懸濁液を雄性の BALB/c Slc-nu/nu マウス (5 週齢) の右肩にイソフルラン麻酔下において 1 匹あたり 100 μL (5.0×10^6 cells) 皮下注射することにより投与し、約 4 週間飼育した。

放射性標識: 標識前駆体化合物 8 (2.0 mg) を DMF (100 μL) に溶解し、DMF (100 μL) に溶解した [^{18}F]フルオロエチルトシレート (14.5 MBq) を加えて 140 °C で 20 分間反応させた。反応後、注射用水を 150 μL 加え、HPLC により精製した。



Scheme 1. Radiosynthesis of [^{18}F]9

[^{18}F]9 の生体内分布実験: [^{18}F]9 を 0.1% ツィーン 80 生理食塩水 + 10%エタノールで 37 kBq/50 μL となるように溶解した。この溶解液を H520 担がん BALB/c Slc-nu/nu マウスにイソフルラン麻酔下において 1 匹あたり 37 kBq/50 μL ずつ尾静脈投与し、投与後 60 分および 120 分において断頭を行った後に、それぞれの血液、心臓、脾臓、肺、胃、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、骨、脳、腫瘍を摘出した。その後、各臓器における放射エネルギーをガンマカウンターを用いて測定し、臓器の単位重量あたりの放射能の集積量 (%dose/g) を算出した。

4. 研究成果

設計・合成: 本研究では、FGFR に対する PET プローブを開発することで FGFR 高発現腫瘍のイメージングを行えるようにするだけでなく、がんの進行度と FGFR の発現との関連を解明し、さらに FGFR 特異的プローブの構造から更なる FGFR チロシンキナーゼ阻害剤の開発へと繋げることを目的としている。そこで、FGFR ファミリーに対する阻害薬として報告されている AZD4547 を母体化合物とする化合物 ([^{18}F]9) を設計・合成した (Figure 1)。

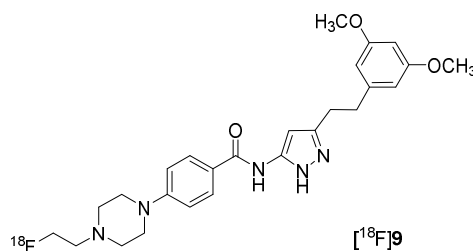


Figure 1. Structure of [^{18}F]9

阻害活性評価: 9 及び AZD4547 の FGFR1, 2 に対する IC_{50} 値 (nM) を Table 1 に示す。9 は FGFR1, 2 に対してそれぞれ AZD4547 よりも約 3 倍、11 倍大きい IC_{50} 値を示した。

Table 1. IC_{50} of compound 9 against FGFR1, 2

Compounds	IC_{50} value \pm SE (nmol/L)	
	FGFR1 (n = 3)	FGFR2 (n = 1)
9	172.6 \pm 44.20	259.9
AZD4547	56.18 \pm 5.370	24

標的タンパク質の発現確認：担癌モデルマウスを作製するにあたり、FGFR1 高発現がん細胞種として報告されている H520 細胞の導入を検討した。H520 細胞および H520 細胞の担癌モデルマウスから抽出した腫瘍における FGFR1 の発現をウエスタンブロットングにより評価した画像を Figure 2 に示す。H520 細胞およびその担癌腫瘍に FGFR1 (理論分子量：90-115 kDa) のバンドが観察され、FGFR1 が発現していることを確認した。

- H520 cell
- H520 tumor

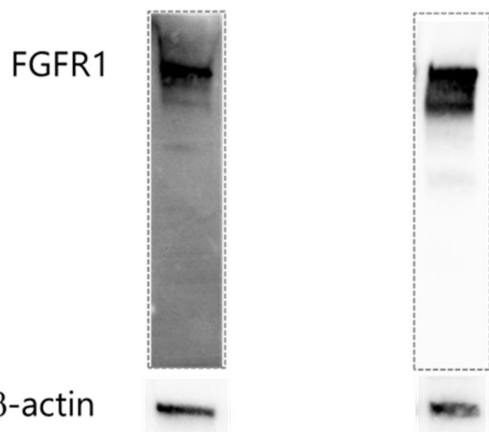
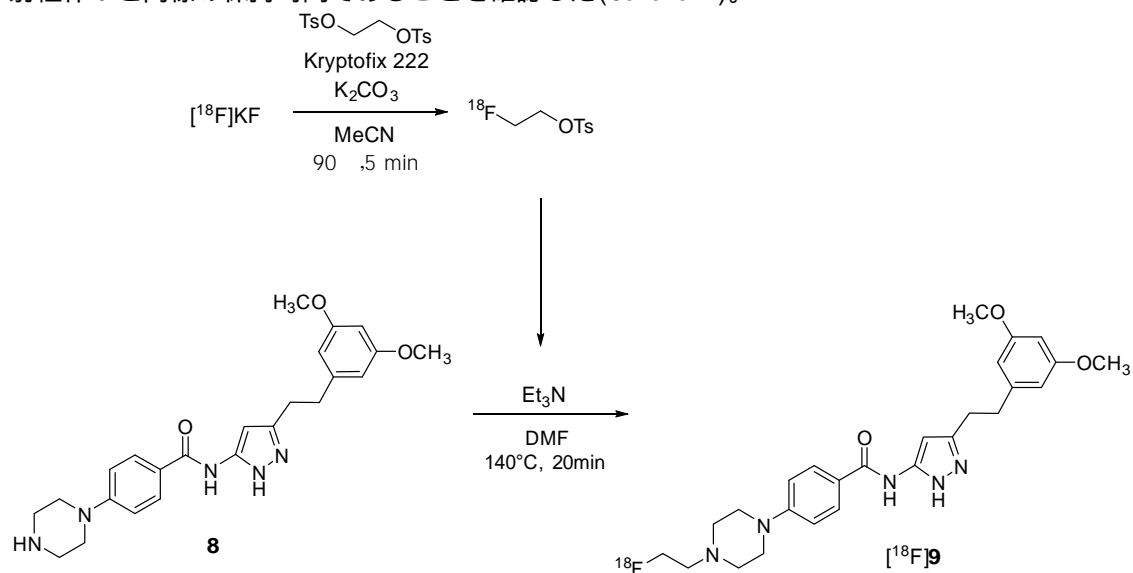


Figure 2. H520 細胞と担癌腫瘍における FGFR1 の発現

放射性標識：非放射性体 9 の合成時の条件をもとに、 $[^{18}\text{F}]\text{KF}$ から $[^{18}\text{F}]$ フルオロエチルトシレートを経て、2 段階の放射性標識で $[^{18}\text{F}]$ 9 を合成した。合成した $[^{18}\text{F}]$ 9 は HPLC により精製し、非放射性体 9 と同様の保持時間であることを確認した (Scheme 1)。



Scheme 1. Radiosynthesis of $[^{18}\text{F}]$ 9

$[^{18}\text{F}]$ 9 の生体内分布実験：各臓器のタイムポイントごとの $[^{18}\text{F}]$ 9 の集積量 \pm SD (%dose/g) を Figure 3 に、腫瘍/血液比、腫瘍/筋肉比、腫瘍/肺比を Table 2 に示す。腫瘍/筋肉比および腫瘍/肺比が比較的高く、 $[^{18}\text{F}]$ 9 は FGFR1 高発現腫瘍に集積し、滞留することが示された。

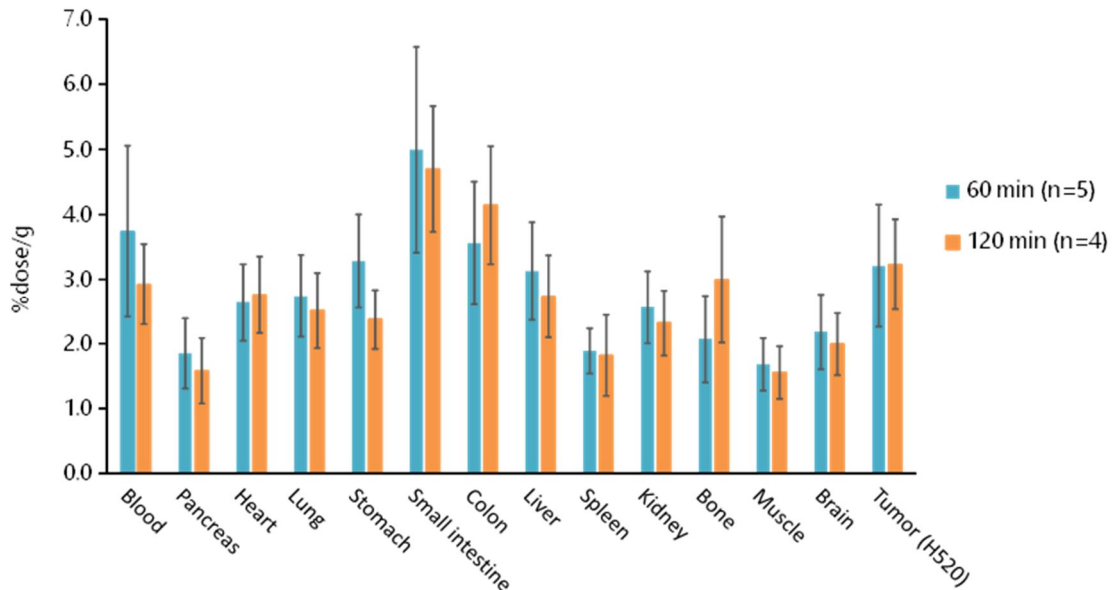


Figure 3. Respective organ distributions

Table 2. tumor-to-blood, tumor-to-muscle, tumor-to-lung ratios

	60 min	120 min
tumor/blood	0.86	1.10
tumor/muscle	1.91	2.08
tumor/lung	1.17	1.28

投与後、様々な臓器に集積が見られ、特に、血液への集積が高く見られたことから ^{18}F 9は、高いタンパク結合率を示す可能性があると考えられる。母核化合物である AZD4547 の pKa 計算値は 8.4 であるのに対し、 ^{18}F 9 の pKa 計算値は 7.4 であり、 ^{18}F 9 は AZD4547 と比較して、体内でプロトン化されたイオン形分率が低く、脂溶性が高いため、全身の臓器に滞留しやすく、クリアランスが遅くなっていると考えられる。

また、腫瘍への滞留性が高く、 ^{18}F 9 の FGFR1 に対する高い親和性が支持される結果となった。この滞留性により投与 120 分後においてバックグラウンドの低下が観察され、特に高い腫瘍/筋肉比を示した。

結論：

非標識体および標識体 ^{18}F 9の合成に成功し、PETプローブとしての有用性を評価した。 ^{18}F 9はインビトロでのFGFR1阻害活性を示したものの、 ^{18}F 9はインビボにおいて血中タンパクとの結合率が高く、腫瘍への特異性が低いという結果が得られた。今後はPET撮像による評価を行うことで、その有用性を評価する。また、その特異性評価としてFGFR2-4に対する阻害活性評価とブロッキング条件下での生体内分布実験を行う。今後は、薬剤構造の最適化としては血中アルブミンとの結合部位と考えられるジメトキシフェニル基の変換や、水溶性の向上のための構造変換を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akira Makino, Anna Miyazaki, Ayaka Tomoike, Hiroyuki Kimura, Kenji Arimitsu, Masahiko Hirata, Yoshiro Ohmomo, Ryuichi Nishii, Hidehiko Okazawa, Yasushi Kiyono, Masahiro Ono, Hideo Saji	4. 巻 26
2. 論文標題 PET probe detecting non-small cell lung cancer susceptible to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1609-1613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiroyuki Kimura, Saki Yamauchi, Hidekazu Kawashima, Kenji Arimitsu, Yusuke Yagi, Yuji Nakamoto, Kaori Togashi, Masahiro Ono, Hideo Saji	4. 巻 28
2. 論文標題 Synthesis and evaluation of a [18F]formyl-Met-Leu-Phe derivative: A positron emission tomography imaging probe for bacterial infections	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2949-2952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.07.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matthias Hoffmann, Xinyu Chen, Mitsuru Hirano, Kenji Arimitsu, Hiroyuki Kimura, Takahiro Higuchi, Michael Decker	4. 巻 13
2. 論文標題 18F-Labeled Derivatives of Irbesartan for Angiotensin II Receptor PET imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 2546-2557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.201800638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hiroyuki Kimura, Haruka Okuda, Masumi Ishiguro, Kenji Arimitsu, Akira Makino, Ryuichi Nishii, Anna Miyazaki, Yusuke Yagi, Hiroyuki Watanabe, Ikuo Kawasaki, Masahiro Ono, and Hideo Saji	4. 巻 8
2. 論文標題 18F-Labeled 4-(anilino)pyrido[3,4-d]pyrimidine as an effective imaging probe targeting L858R-mutant epidermal growth factor receptor.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 418-422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.6b00520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuneo Saga, Yuji Nakamoto, Takayoshi Ishimori, Takahiro Inoue, Yoichi Shimizu, Hiroyuki Kimura, Shusuke Akamatsu, Takayuki Goto, Hiroyuki Watanabe, Kosuke Kitaguchi, Masao Watanabe, Masahiro Ono, Hideo Saji, Osamu Ogawa, and Kaori Togashi	4. 巻 110(2)
2. 論文標題 Initial evaluation of PET/CT with 18F-FSU-880 targeting prostate-specific membrane antigen in prostate cancer patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 742-750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13911.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Yagi, Yoichi Shimizu, Kenji Arimitsu, Yuji Nakamoto, Takahiro Higuchi, Kaori Togashi, and Hiroyuki Kimura	4. 巻 62(3)
2. 論文標題 Efficient gallium-68 radiolabeling reaction of DOTA derivatives using a resonant-type microwave reactor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Label. Compd. Radiopharm	6. 最初と最後の頁 132-138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jlcr.3704.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Rudolf A. Werner, Thorsten Derlin, Constantin Lapa, Sara Sheikbahaei, Takahiro Higuchi, Frederik L. Giesel, Spencer Behr, Alexander Drzezga, Hiroyuki Kimura, Andreas K. Buck, Frank M. Bengel, Martin G. Pomper, Michael A. Gorin, and Steven P. Rowe	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 18F-labeled, PSMA-targeted radiotracers: Leveraging the advantages of radiofluorination for prostate cancer molecular imaging.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Theranostics	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/thno.37894. eCollection 2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村寛之、有光健治、屋木祐亮
2. 発表標題 乳癌PETの現状と将来の可能性「新しい診断薬の候補と可能性について」
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村寛之
2. 発表標題 18F製剤の設計と標識合成の基礎
3. 学会等名 第28回日本心臓核医学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸田力也、井上遥加、有光健治、屋木祐亮、河嶋秀和、安井裕之、木村寛之
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)標的核医学分子イメージングプローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村寛之
2. 発表標題 18F-PETプローブの迅速合成法の開発
3. 学会等名 JSPS第155委員会主催講演会「フッ素と医療の研究最前線」（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村寛之、古川武典、有光健治、戸田力也、河嶋秀和、安井裕之、佐治英郎、瀧 真清
2. 発表標題 NEXTA反応を用いた18F-ペプチド標識法の開発とPETプローブへの応用
3. 学会等名 第40回フッ素化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 屋木祐亮、有光健治、平野圭市、安井裕之、木村寛之
2. 発表標題 F-18標識用4-[18F]Fluorophenylboronic acid誘導体の合成
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yusuke Yagi, Hidekazu Kawashima, Kenji Arimitsu, Koki Hasegawa, Hiroyuki Kimura	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Wiley-VCH	5. 総ページ数 pp.151-208
3. 書名 Handbook of In Vivo Chemistry in Mice From Lab to Living System.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都薬科大学 代謝分析学分野 http://labo.kyoto-phu.ac.jp/taisya/ 京都薬科大学 代謝分析学分野 dabc.jp/?p=324

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----