

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10458

研究課題名（和文）Cu-64、Cu-67イオンを用いたがんの診断、治療薬剤の開発

研究課題名（英文）Evaluation of Cu-64, Cu-67 Ions for Cancer Imaging and Therapy

研究代表者

須郷 由美（SUGO, Yumi）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 放射線生物応用研究部・上席研究員（定常）

研究者番号：90354836

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）：従来の標識反応を必要とせずにCu-64、Cu-67イオンをそのまま薬剤として利用するがんの診断および治療を実現するためには、正常組織である肝臓へのCu-64,67の生理的集積を低減させる必要がある。本研究では、血漿たんぱくからのトランスキレーション反応を指標としてキレート剤を探索し、それらを併用することでCu-64,67の肝集積の低減化を図った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果により、サイクロトロンで製造したCu-64およびCu-67イオンを、分子標的薬である高価な抗体やペプチドと化学合成する必要もなく、低コストかつ簡便迅速に利用できる。さらに、併用薬剤により代謝による生理的集積を抑え込み、特異的にがんへCu-64,67を集積させることで、無用な被ばくを生じさせずにより高精度な診断と治療が可能となる。

研究成果の概要（英文）：In PET imaging and therapy of the cancer using Cu-64 and Cu-67 ions without any labeling process, physiological accumulation of Cu-64,67 in liver needs to be reduced. In the present study, we searched for chelating agents by transchelation of Cu-64,67 from plasma proteins as an index, and a simultaneous use of them efficiently reduced the physiological accumulation in the liver.

研究分野：放射化学、放射性医薬品学

キーワード：Cu-64 Cu-67 PET診断 がん治療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの必須微量元素のひとつでもある銅の放射性同位体のうち、 $^{64}\text{Cu}$  (半減期 12.7 時間) と  $^{67}\text{Cu}$  (半減期 61.8 時間) は、それぞれポジトロン断層撮影法 (PET) によるがんの画像診断を可能とするポジトロン ( $\beta^+$ )、およびがんの RI 内用療法に適したエネルギーをもつ  $\beta^-$  線を主に放出することから、がんの診断および治療に有効な放射性薬剤への利用が大いに期待されている。

$^{64}\text{Cu}$  は、10 MeV 程度の低エネルギーのプロトンを  $^{64}\text{Ni}$  で濃縮されたターゲットに照射することで ( $p, n$ ) 反応により効率よく生成でき、続くイオン交換樹脂やキレート交換樹脂を用いた化学分離によって無担体かつ高純度で大量に製造、分離できる手法がすでに確立されていることから、 $^{64}\text{Cu}$  で標識した抗体や低分子ペプチドなど様々な標識分子プローブの開発が国内外において積極的に進められている。さらに、国内では  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Trastuzumab の臨床研究も進められ、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) 陽性乳がんの原発巣および転移巣の分子イメージングに有効であることが実証されてきた。

一方、 $^{67}\text{Cu}$  については、高エネルギー (50-100 MeV) のプロトンを  $^{68}\text{Zn}$  に照射する ( $p, 2p$ ) 反応による生成が知られているが、反応効率が低い上に副反応も多く効率的な製造法とは言い難い。臨床研究はもとより基礎研究に必要な製造量と高い品質が満足できないことから、 $^{67}\text{Cu}$  を用いた放射性薬剤の開発研究はほとんど進められていないのが実情であった。

研究代表者は、これまでにある種のがん細胞が  $^{64}\text{Cu}$  イオンに対して非常に高い取り込み能を有することを発見し、従来のがんを標的とする抗体やペプチドなどの前駆体合成および  $^{64}\text{Cu}$  の標識反応を必要としない簡便ながんイメージング法として、錯形成していないフリーの  $^{64}\text{Cu}$  イオンをそのままイメージング薬剤として利用する新たな手法を提案し、その有効性を明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らがこれまでに得た成果をふまえ、 $^{64}\text{Cu}$  イオンによるがん診断法のさらなる高度化、さらには  $^{67}\text{Cu}$  イオンによるがん治療への新たな展開を図る。研究開始当初の具体的な目標を以下に記す。

(1)  $^{64}\text{Cu}$  イオンによるがん診断法の高度化：従来の標識反応を必要とせずに  $^{64}\text{Cu}$  イオンをそのまま薬剤として利用する簡便迅速な診断法のさらなる高度化を目指し、正常組織である肝臓への生理的集積を低減させる薬剤との併用により、より安全で高精度ながん診断法を開発する。

(2)  $^{67}\text{Cu}$  イオンによるがん治療への新展開：これまで製造上の問題から立ち遅れてきた  $^{67}\text{Cu}$  を用いた薬剤開発研究を加速するべく、研究分担者や連携研究者らが実用化に向けて独自に開発を進めている加速器中性子による医療用 RI の製造技術を駆使して得られる高品質な  $^{67}\text{Cu}$  イオンを用いて、正常組織へのダメージを抑えつつ  $^{67}\text{Cu}$  イオンによるがん治療の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

#### (1) $^{64}\text{Cu}$ の製造・分離

量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所イオン照射研究施設において、サイクロトロンから生じる 11 MeV のエネルギーをもつプロトンビームを電流値  $5 \mu\text{A}$  で濃縮安定同位体  $^{64}\text{Ni}$  に照射し、( $p, n$ ) 反応により  $^{64}\text{Cu}$  を製造した (図 1)。照射後の  $^{64}\text{Ni}$  ターゲットを塩酸水溶液に溶解した後、キレート交換樹脂を用いたクロマトグラフィーによって無担体かつ高純度の  $^{64}\text{Cu}$  イオン ( $^{64}\text{CuCl}_2$ ) を単離した。

#### (2) $^{67}\text{Cu}$ の製造・分離

新学術領域研究「短寿命 RI 供給プラットフォーム」の研究支援事業により、東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンターを利用して、 $^{67}\text{Cu}$  の製造分離実験を行った。

サイクロトロンから生じる 50 MeV、 $3 \mu\text{A}$  のデューテロンをベリリウムターゲットに照射することで高速中性子を発生させ、( $n, d$ ) または ( $n, pn$ ) 反応により  $^{68}\text{Zn}$  から  $^{67}\text{Cu}$  を製造した (図 2)。照射後の  $^{68}\text{Zn}$  ターゲットを塩酸水溶液に溶解した後、カラム型フロー電解セルを用いて電気化学的に  $^{67}\text{Cu}$  イオン ( $^{67}\text{CuCl}_2$ ) の分離精製を行った。

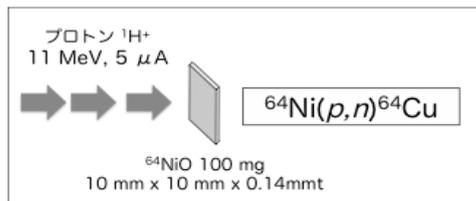


図1 プロトン照射による<sup>64</sup>Cuの製造

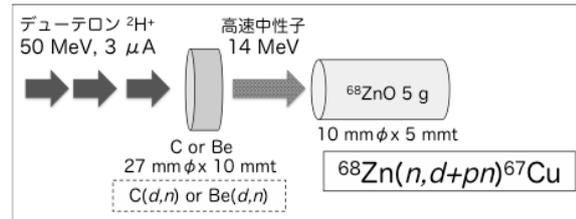


図2 加速器中性子による<sup>67</sup>Cuの製造

### (3) 肝集積低減化候補薬剤の探索

ヒト血漿またはアルブミンに<sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub>を添加することで形成される血漿たんぱくとの結合体に、各種キレート剤を添加し、37°Cで一定時間インキュベートした。血漿成分中のアルブミンから候補薬剤となるキレート剤へのトランスキレーション反応を観測するため、サイズ排除カラムクロマトグラフィーにより<sup>64</sup>Cu化合物の分析を行った。

### (4) がん細胞への<sup>64</sup>Cu集積性に及ぼすキレート剤の影響

正常組織への生理的集積の低減化が期待される候補薬剤を共存させた系で、がん細胞にキレート剤を添加するタイミングや濃度等を変えて、37°Cで一定時間インキュベートした後の細胞内に集積した<sup>64</sup>Cuの放射エネルギーを測定した。

### (5) キレート剤併用下での<sup>64</sup>Cuのマウス体内分布測定

キレート剤併用のもと、<sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub>を含む生理食塩水をノーマルマウスまたは担がんマウスの尾静脈から投与した後の血液、肝臓や腎臓等の各臓器、および腫瘍への集積を放射能測定により経時的に分析した。また、体外へ排出された尿や糞中の放射能を測定することで、キレート剤による<sup>64</sup>Cuの排泄促進効果についても検証した。

## 4. 研究成果

錯体を形成せずにフリーの<sup>64</sup>Cuイオンをそのまま薬剤として利用する簡便迅速ながんのPET診断、ならびに治療に適した<sup>67</sup>Cuイオンを用いたがんの内用療法を実現するためには、正常組織、特に肝臓への<sup>64/67</sup>Cuの生理的集積を低減させる必要がある。

そこで、血中や肝臓へ分布するたんぱくとの結合体から銅を引き離して水溶性の錯体を形成することで銅の尿排泄を促す効果を期待して、血漿たんぱくからのトランスキレーション反応を指標として候補薬剤となるキレート剤の選定を行った。

図3にサイズ排除カラム (Superdex Peptide 10/300 GL) を用いて分析したradio-HPLCのクロマトグラムを示す。上段のピークaはアルブミンに<sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub>を添加することで形成される血漿たんぱくとの結合体である。中段、下段のクロマトグラムは、それぞれ先天性銅過剰症Willson病の治療薬でもあるPenicillamine (Pen)とTrientine (TE)をさらに添加した後に測定したものである。ピークbとピークcは、それぞれのキレート剤と錯形成した<sup>64</sup>Cu化合物を示しており、血漿成分中のアルブミンからの<sup>64</sup>Cuトランスキレーション反応を明瞭に観測することができた。

次に、肝集積低減化薬剤の候補として選定したPenとTEを用いて、*in vitro*でのがん細胞への<sup>64</sup>Cu集積におよぼすこれら併用薬剤の影響について検証した。まず、DMEM培地中のがん細胞 (LS180) 懸濁液に、あらかじめ濃度の異なるキレート剤を加えた後に、<sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub>を添加し1時間インキュベートした後の細胞を生理食塩水で洗浄してから放射能を測定し、図4左に示す<sup>64</sup>Cu集積率 (%ID) を導き出した。<sup>64</sup>Cuががん細胞へ取り込まれる前、つまり事前投与ではキレート剤濃度の上昇に応じて<sup>64</sup>Cuの取込が抑制されることが、図からわかる。他方の図4右では、あらかじめ<sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub>を添加して1時間インキュベートした後の細胞懸濁液にキレート剤を添加し、さらに1時間インキュベートした後の結果である。この図から、がん細胞に一旦集積した<sup>64</sup>Cuは、キレート剤濃度に応じて若干集積率が低下してしまうものの、細胞外へ排出されにくいことがわかった。

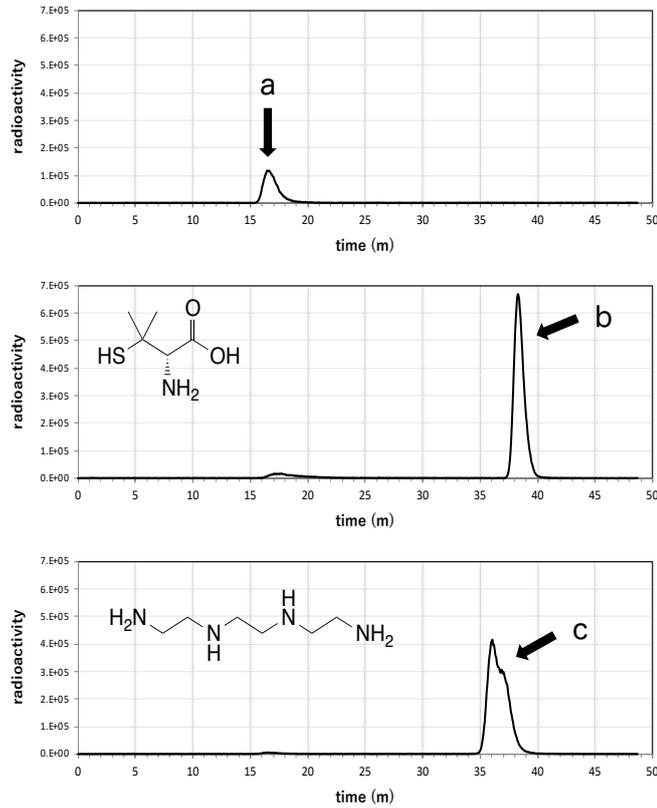


図3 アルブミン中<sup>64</sup>Cuのクロマトグラム変化

キレート剤添加前（上段）、Pen添加後（中段）、TE添加後（下段）

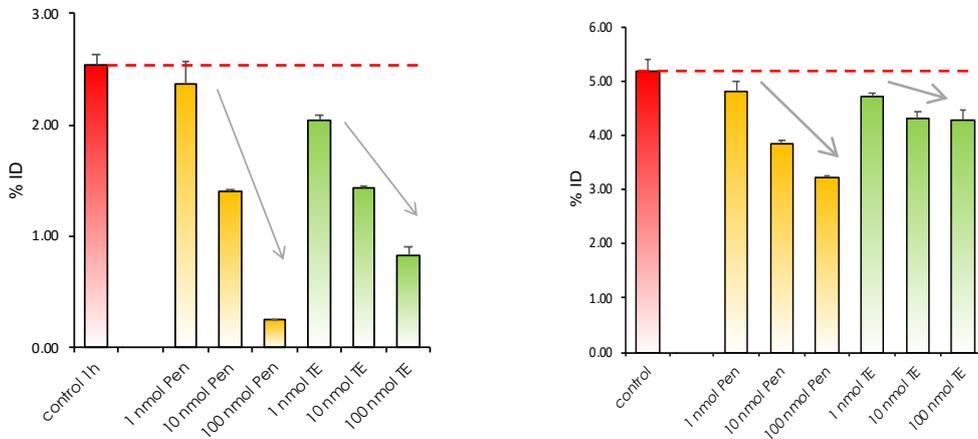


図4 併用薬剤の事前投与（左）、事後投与（右）による<sup>64</sup>Cu集積への影響

加えて、*in vivo*での併用薬剤の効果を検証するため、キレート剤併用のもと <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub>を含む生理食塩水を担がんマウスに投与し、マウス体内分布の測定を行った。その結果、<sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub>を静注した後にキレート剤を腹腔内に事後投与することで、コントロールと比較して明らかに体外への<sup>64</sup>Cu排泄が促進され肝集積が低減できるとともに、期待していたとおり腫瘍への<sup>64</sup>Cu集積も維持することができた。

本研究により、標的とするがんへの集積能を保持したまま肝臓への集積を低減させることで、無用な被ばくの軽減による安全性の向上に加えて、解像度の高いPET診断の特性を活かしたより精度の高い<sup>64</sup>Cuイオンによるがん診断、さらには正常組織へのダメージを最小限に抑えながらの<sup>67</sup>Cuイオンによるがん治療が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamaguchi Aiko, Achmad Arifudin, Hanaoka Hirofumi, Heryanto Yusri Dwi, Bhattarai Anu, Ratianto, Khongorzul Erdene, Shintawati Rini, Kartamihardja A. Adhipatria P., Kanai Ayaka, Sugo Yumi, Ishioka Noriko S., Higuchi Tetsuya, Tsushima Yoshito	4. 巻 19
2. 論文標題 Immuno-PET imaging for non-invasive assessment of cetuximab accumulation in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1186/s12885-019-6238-4">https://doi.org/10.1186/s12885-019-6238-4</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Y. Nagai, K. Hashimoto, M. Kawabata, K. Tsukada, Y. Hatsukawa, F. Minato, Y. Sugo, H. Saeki, and S. Motoishi	4. 巻 2019-001
2. 論文標題 Diagnostic (99Mo/99mTc) and Therapeutic (67Cu) Radioisotopes Produced by Neutrons from C,Be(d,n)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 CERN Proc.	6. 最初と最後の頁 333-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 H. Hanaoka, A. Achmad, A. Yamaguchi, H. T. Nguyen, Y. Sugo, N. S. Ishioka, Y. Tsushima
2. 発表標題 Usefulness of Cu-64-labeled cetuximab PET screening to predict response to cetuximab treatment in non-small cell lung cancer
3. 学会等名 12th World Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology (WFNMB2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Nagai, K. Hashimoto, M. Kawabata, K. Tsukada, Y. Hatsukawa, Y. Sugo, Y. Nakahara, H. Saeki, and S. Motoishi
2. 発表標題 Quality control tests of 99mTc-radiopharmaceuticals, biodistribution of 67CuCl2 in mice, and accelerator neutrons
3. 学会等名 SNMMI 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎直亨, 須郷由美, 大平慎一, 板橋英之, 石岡典子, 森勝伸
2. 発表標題 PET薬剤に用いるCu-64の新規分離精製方法の開発
3. 学会等名 第35回イオンクロマトグラフィー討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須郷由美, 大島康宏, 山口藍子, 花岡宏史, 塚田和明, 橋本和幸, 川端方子, 佐伯秀也, 永井泰樹, 石岡典子
2. 発表標題 64/67Cuイオンのがん診断 / 治療用薬剤としての有用性の検討
3. 学会等名 第1回日本核医学会分科会 放射性薬品科学研究会 / 第17回放射性医薬品・画像診断薬研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須郷由美, 大島康宏, 山口藍子, 花岡宏史, 石岡典子
2. 発表標題 Cu-64イオンによるがんのPETイメージング
3. 学会等名 第5回メタロミクス研究フォーラム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 分離装置、分離方法、RI分離精製システムおよびRI分離精製方法	発明者 森勝伸、大平慎一、 戸田敬、須郷由美、 渡辺茂樹、石岡典子	権利者 高知大学、熊本 大学、量子科学 技術研究開発機
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-080635	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

## 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
研究分担者	橋本 和幸  (HASHIMOTO Kazuyuki)  (80414530)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員(定常)    (82502)	
研究分担者	山口 藍子  (YAMAGUCHI Aiko)  (80609032)	群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座等教員    (12301)	
研究分担者	花岡 宏史  (HANAOKA Hirofumi)  (50361390)	群馬大学・大学院医学系研究科・特任准教授    (12301)	
連携研究者	永井 泰樹  (NAGAI Yasuki)  (80028240)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高崎量子応用研究所 東海量子ビーム応用研究センター・客員研究員    (82502)	
連携研究者	塚田 和明  (TSUKADA Kazuaki)  (30343916)	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 先端基礎研究センター・研究主席    (82110)	