

平成 21 年 6 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591406
 研究課題名（和文） 接着分子インテグリンをターゲットにした非侵襲的な生体イメージングに関する検討
 研究課題名（英文） Non-invasive *in vivo* imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression

研究代表者
 金 朝暉 (Jin Zhao-Hui)
 独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員
 研究者番号：70324150

研究成果の概要：

本研究では、新しく開発された RAFT(cRGD)₄ペプチドを用い、⁶⁴Cu 標識による腫瘍 PET (Positron Emission Tomography) イメージングを目的とした。まず RAFT(cRGD)₄ に ⁶⁴Cu を安定に結合させるキレート剤 cyclam を導入し、RAFT(cRGD)₄-cyclam という分子が合成された。それを ⁶⁴Cu で標識し、放射化学的純度約 100% で ⁶⁴Cu(cyclam)RAFT(cRGD)₄ が得られた。一方、 $\alpha_v\beta_3$ 発現の高い細胞では ⁶⁴Cu(cyclam)RAFT(cRGD)₄ の特異的結合が見られた。また、マウス生体内分布評価では、血液からの速やかな消失、腎臓以外の非標的臓器への非常に低い放射能集積を示し、 $\alpha_v\beta_3$ 陽性腫瘍への高い集積を認めた。さらに、PET 撮像で $\alpha_v\beta_3$ 陽性腫瘍を明瞭に描出した。今後 ⁶⁴Cu(cyclam)RAFT(cRGD)₄ の PET イメージングプローブとしての応用をさらに展開する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：画像診断学（含放射線診断学、核医学）

1. 研究開始当初の背景

細胞接着分子の一つであるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ は膜貫通性糖タンパク質で、血管新生、悪性腫瘍の増殖、進展及び転移に深く関与している。血管新生時の血管内皮細胞及び一部の腫瘍細胞では $\alpha_v\beta_3$ が高発現し、腫瘍イメージングの重要なターゲット分子の一つであると認められている。 $\alpha_v\beta_3$ には RGD（アルギニン・グリシン・アスパラギン酸）の3つのアミノ酸を持つ環状ペプチドが特異的に

結合する。RGD を含む環状ペプチド(cRGD)は血管新生抑制作用を有するので、その抗腫瘍効果の phase II 臨床試験が行われている。一方、cRGD は腫瘍の分子診断にも大変有用である。¹⁸F で標識した Galacto-cRGD による PET イメージングは、臨床試験で、癌の検出の有用性が示された。一方、近赤外線蛍光色素で標識した cRGD による光イメージングの有用性についても動物腫瘍モデルを用いた研究が活発に進められている。 $\alpha_v\beta_3$ をイメー

ジングするためのプローブはこれまでに各種開発されている。最近、multimeric 環状 RGD はその単量体(monomer)に比較して、 $\alpha_v\beta_3$ への親和性が高いことが報告されている。

RAFT (cRGD)₄ はフランス Joseph Fourier 大学の Pascal Dumy 教授らによって開発された $\alpha_v\beta_3$ に高い親和性と特異性を持っている四量体(tetrameric)環状 RGD ペプチドである。RAFT というペプチドキャリアの片側に 4 つの cRGD monomer が結合し、その反対側には様々な cargo を結合することが出来るものである。cRGD は targeting domain として働き、cargo 結合サイトは functional domain として働く。この化合物は近赤外線蛍光色素 Cy5 で標識して蛍光イメージングに用いられているが、*in vivo*での使用を考え、Dumy 教授(本研究の海外共同研究者)と共同で放射線金属標識して PET イメージングを計画した。

2. 研究の目的

本研究では、RAFT (cRGD)₄ を用い、ポジトロン放出核種である ⁶⁴Cu 標識による腫瘍 PET イメージングを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PET イメージングプローブの開発・合成 : RAFT (cRGD)₄ にポジトロン放出核種である ⁶⁴Cu (半減期=12.7 時間, β^+ 壊変=17.86%) を安定に結合させるキレート剤 cyclam を導入し、RAFT (cRGD)₄-cyclam という分子を設計、合成する。RAFT (cRGD)₄-cyclam の放射能標識 (⁶⁴Cu) 法をデザインして、放射化学純度が高い PET イメージングプローブを製造する。

(2) 細胞及び腫瘍モデルの作製 : ヒトインテグリン β_1 と β_3 サブユニットのそれぞれを導入したヒト胎児腎臓由来 HEK293 β_3 細胞 ($\alpha_v\beta_3$ (+)) 及び HEK293 β_1 細胞 ($\alpha_v\beta_3$ (-)) を用いる。これらの $\alpha_v\beta_3$ の発現レベルの異なる細胞株を免疫不全マウスの皮下に移植し腫瘍モデルを作製する。

(3) 放射能標識 RAFT (cRGD)₄ の培養細胞への取り込み: $\alpha_v\beta_3$ (+) 細胞及び $\alpha_v\beta_3$ (-) 細胞を用いた ⁶⁴Cu 標識 RAFT (cRGD)₄-cyclam の培養細胞への取り込み実験を行う。取り込み量は γ -countering によって測定した radioactivity により検討する。得られた結果について $\alpha_v\beta_3$ の発現との関係を検討し、これらの分子プローブが $\alpha_v\beta_3$ に特異的に結合するかどうかを判定する。

(4) 放射能標識 RAFT (cRGD)₄ の体内動態及び分布: ⁶⁴Cu 標識 RAFT (cRGD)₄-cyclam (10 μ Ci) を腫瘍モデルマウスに静注する。投与後 3 時間から 20 時間のいくつかの時間点でマウス

を屠殺し、腫瘍、各臓器、血液を sampling する。 γ -countering によって測定した radioactivity から ⁶⁴Cu(cyclam)RAFT (cRGD)₄ の腫瘍への集積性、体内分布及び体内動態を分析する。

(5) PET イメージング : ⁶⁴Cu 標識 RAFT (cRGD)₄-cyclam を腫瘍モデルマウスに静注し、PET イメージングを行う。得られた画像から腫瘍の signal 強度及び周囲の正常組織に対する腫瘍 signal の contrast を評価する。

4. 研究成果

(1) RAFT (cRGD)₄-cyclam の合成及び ⁶⁴Cu 標識 : RAFT (cRGD)₄ に ⁶⁴Cu を安定に結合させるキレート剤 cyclam を導入し、RAFT (cRGD)₄-Cyclam という分子が設計、合成された (図 1)。⁶⁴Cu を用い、RAFT (cRGD)₄-cyclam との標識検討を行ったところ、放射化学的純度約 100% (RP-HPLC 評価法) で ⁶⁴Cu(cyclam)RAFT (cRGD)₄ を得ることに成功した。一方、血清中で 2 時間 37°C またはリン酸緩衝液中で 24 時間 4°C インキュベート後も 95% 以上が未変化体として存在しており、⁶⁴Cu 標識 RAFT (cRGD)₄-cyclam はかなり安定であることが明らかとなった。

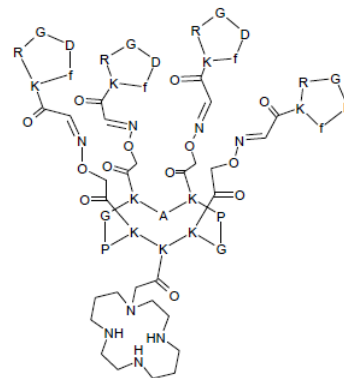


図 1 : RAFT (cRGD)₄-cyclam の構造式
(分子量=5031.6 g/mol)

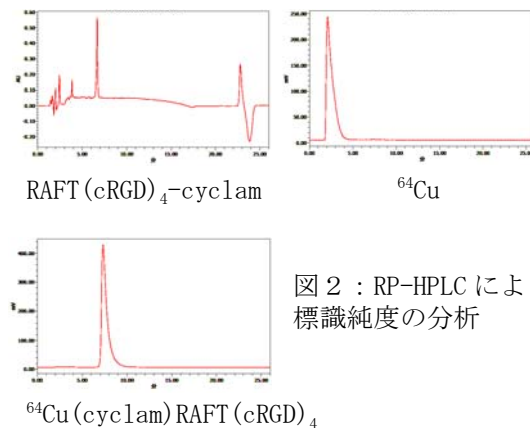


図 2 : RP-HPLC による標識純度の分析

(2) *In Vitro* Binding Assay (図3) : 細胞結合実験と競合阻害実験を行ったところ、 $\alpha_v\beta_3$ 発現の高い HEK293 β_3 細胞で $^{64}\text{Cu}(\text{cyclam})\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ の結合能が強く、特異的な結合が確認できた。

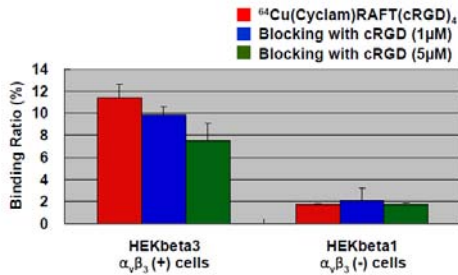


図3: $^{64}\text{Cu}(\text{cyclam})\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ の *in vitro* での細胞取り込み

(3) $^{64}\text{Cu}(\text{cyclam})\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ の体内分布 : 担癌マウス生体内分布評価では、血液からの速やかな消失 (約投与後 3 時間以内)、腎臓以外の非標的臓器への非常に低い放射能集積を示し、投与後 3 時間から 20 時間の間に $\alpha_v\beta_3$ 陽性腫瘍への高い集積を認めた (図4)。

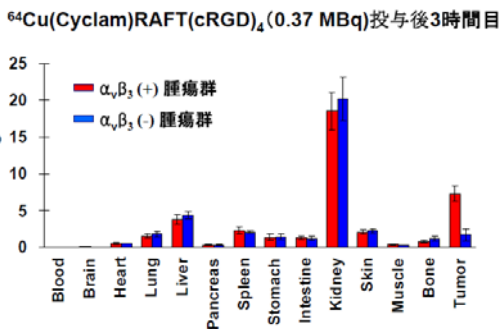


図4: 体内分布実験

又、非標識 $\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ -cyclam 或いは cRGD monomer を同時に投与した競合阻害実験では、 $\alpha_v\beta_3$ 陽性腫瘍への集積量が有意に ($P < 0.05$) 減少した。 $^{64}\text{Cu}(\text{cyclam})\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ の腫瘍への特異的な集積が示された。一方、腎臓への集積が減少していないので、高い腎臓集積が非特異的なものと示唆されている (図5)。

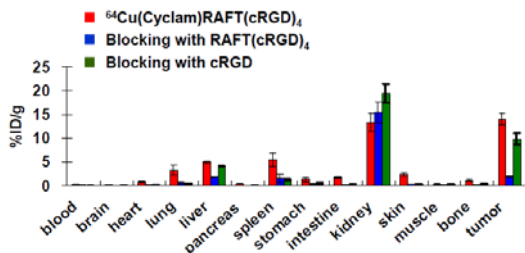
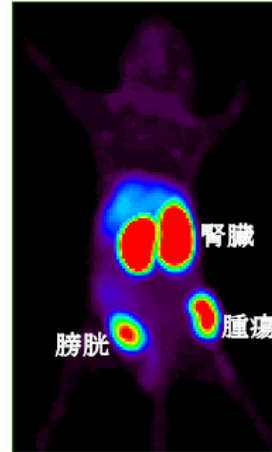


図5: 集積阻害実験

(4) PET イメージング : ^{64}Cu 標識 $\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ -cyclam (100 μCi) を $\alpha_v\beta_3$ -positive 腫瘍モデルマウスに静注し、5 時間後に PET イメージングを行った。得られた画像 (図6) から腫瘍を明瞭に描出することができた。



投与後5時間目

図6: PET 画像 (イメージング装置: Inveon Dedicated PET, Siemens; 60 分間スキャン)

結論:

以上の結果から、 $\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ を PET プローブ化することができた。

今後の予定・展望:

(1) 今後、蛍光色素と放射能の二重標識ができるような $\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ という分子を設計、合成する。蛍光色素標識 $\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ による光イメージング単独、放射能標識 $\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ による PET イメージング単独、及び二重標識した $\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ による光+PET イメージングを腫瘍モデルマウスにおいて実施する。得られた画像から腫瘍の signal 強度及び周囲の正常組織に対する腫瘍 signal の contrast ratio を求める。各 modality によるイメージングから得られた情報を比較し、それぞれの特性と有用性を評価し、PET を中心とする multi-modal imaging の開発及び $\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ の臨床分子診断への利用の可能性を検討する。

(2) 以上のマウス腫瘍モデルの代わりに、Matrigel/VEGF+bFGF をマウスの皮下に注射し、得られた皮下 plaque を新生血管モデルとして用いて $\text{RAFT}(\text{cRGD})_4$ の光イメージング/PET イメージングにより新生血管のみを画像化する可能性を検討して、腫瘍の血管新生抑制治療効果をイメージングすることを目

指する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Saga T, Koizumi M, Furukawa T, Yoshikawa K, Fujibayashi Y. Molecular imaging of cancer: evaluating characters of individual cancer by PET/SPECT imaging. *Cancer Sci*, 100 (3), 375-381, 2009.
- ② Oh M, Tanaka T, Kobayashi M, Furukawa T, Mori T, Kudo T, Fujieda S, Fujibayashi Y. Radio-copper-labeled Cu-ATSM : an indicator of quiescent but clonogenic cells under mild hypoxia in a Lewis lung carcinoma model. *Nucl Med Biol*, 36(4), 419-426, 2009. 査読有
- ③ Foillard S, Jin ZH, Garanger E, Boturyn D, Favrot MC, Coll JL, Dumy P. Synthesis and Biological characterization of targeted pro-apoptotic peptide. *Chembiochem*, 9(14), 2326-2332, 2008. 査読有
- ④ Saito Y, Furukawa T, Arano Y, Fujibayashi Y, Saga T. Comparison of semiquantitative fluorescence imaging and PET tracer uptake in mesothelioma models as a monitoring system for growth and therapeutic effects. *Nucl Med Biol*, 35(8), 851-860, 2008. 査読有
- ⑤ Jin ZH, Josserand V, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Favrot MC, Coll JL. In vivo optical imaging of alphaV-beta3 in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol Cancer*, 6, 41-50, 2007. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Zhao-hui Jin, Marie-christine Favrot, Pascal Dumy, Jean-luc Coll. Non-invasive Optical Imaging of Tumor Metastases Using Cy5-labeled RAFT(cyclicRGD)₄. 日本分子イメージング学会第2回総会・学術集会、平成19年6月28日・29日、福井フェニックス・プラザ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 朝暉 (Jin Zhao-Hui)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：70324150

(2) 研究分担者 (2007年)

藤林 康久 (Fujibayashi Yasuhisa)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授

研究者番号：50165411

古川 高子 (Furukawa Takako)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究者番号：00221557

(3) 連携研究者 (2008年)

藤林 康久 (Fujibayashi Yasuhisa)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授

研究者番号：50165411

古川 高子 (Furukawa Takako)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究者番号：00221557