

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03600

研究課題名(和文)放射線治療効果予測を目指す分子標的画像法の開発 - DNA修復機構を対象として -

研究課題名(英文)Development of Molecular Targeted Imaging for Prediction of Radiotherapy Effectiveness: Based on DNA Repair Mechanisms

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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断の修復に関連する分子機構について着目し、臨床応用可能ながん放射線治療効果予測コンパニオン評価法の確立を目的として、新規分子標的イメージングプローブを開発することとした。代表者らが開発したF-18標識F-PYKは新規活性型EGFR-TKイメージングプローブである。本剤が集積するがん種はL858Rやex19delの活性型変異であり、所期の通り放射線治療効果は高～中感度であった。それに対し、F-PYKが集積しないがん種では放射線治療効果は中～低感度であった。これらの検討により開発したF-18標識F-PYKを用いることにより放射線治療効果に対する感度を鑑別出来る可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が実用化されれば、DNA二重鎖切断を対象としたがん放射線治療や、シスプラチンなどのがん化学療法薬を実施する前に、対象とするがんの効果が高いかどうかを、がん生検などをすることなく、非侵襲的なインビボイメージングにより評価可能となる。これにより、治療効果の少ない治療法を試す必要が無く、患者にとって最も有効な治療法選択につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the molecular mechanisms related to DNA double-strand break repair, we developed a novel molecular targeted PET imaging probe, F-18-labeled F-PYK, in order to establish a clinically applicable “cancer radiotherapy prediction companion evaluation method”. F-18-labeled F-PYK is a novel mutated EGFR-TK imaging probe. F-18-labeled F-PYK accumulates in active mutations of L858R and ex19del, and as expected, these cell lines showed a high to moderate radiotherapeutic effect. On the other hand, cancer cells that did not accumulate F-18-labeled F-PYK showed moderate to low sensitivity to radiotherapy. These results indicate that the F-18-labeled F-PYK may be used to differentiate sensitivity to radiotherapy.

研究分野：核薬学

キーワード：放射性医薬品 PET がん 放射線治療 コンパニオンイメージング 治療予測

1. 研究開始当初の背景

申請者らは多くの小動物イメージング研究を行う中で、DNA-PK 活性が低いことが知られている SCID マウスの場合、小動物用 CT 撮像後 24 時間以内に約 1/3 が死ぬ事を経験し、放射線による DNA 二重鎖切断とそれに伴う修復の重要性を体感してきた。がん細胞に対して放射線治療を行うことで惹起される DNA 二重鎖切断が起きた際、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相同末端結合により DNA 二重鎖切断が修復される。この分子機構として、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、サイクリン D1 を分解する GSK3 β 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切断がすみやかに修復される。結果として放射線や化学療法剤により切断された DNA 二重鎖の修復が早いほど治療効果が低いことになる。

また、上皮成長因子受容体 (以下、EGFR) は 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ている。この際、変異型 EGFR-チミジンキナーゼ (以下、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いる。申請者らは、申請者らが開発した図 1 左に示すイメージング薬剤、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インビトロで示した (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変異型 EGFR-TK 阻害剤である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インビトロ実験系で示してきた。また、変異型 EGFR-TK を有する肺腺がん患者で、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。これ以外にも、セレコキシブ等の COX-2 阻害剤によって野生型 EGFR-TK が阻害され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)。

以上の事から、DNA-PK や EGFR-TK などの分子を標的とするいわば分子標的イメージング薬剤を開発し、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あるいは治療開始後早期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、いわゆる放射線治療コンパニオンイメージング手法の開発が必要であるものと考えられた。

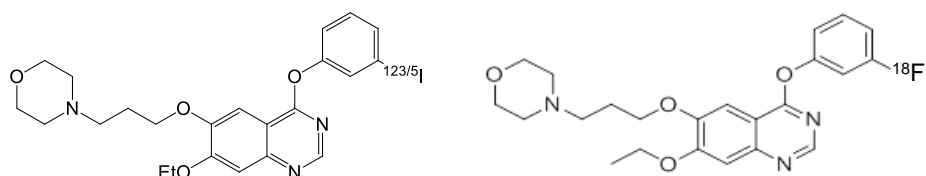


図 1 (左) ヨウ素標識 PYK、(右) F-18 標識 PYK

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究の目的は、がんの放射線治療により惹起される DNA 二重鎖切断の修復に関連する分子機構について着目し、臨床応用可能ながん放射線治療効果予測システムの確立を目指すことである。これまでにも分子生物学的手法を活用した放射線治療効果予測に関する検討が行われてきたが、インビボでの評価法についてはほとんど検討されていない。また、分子標的イメージングという概念を活用したイメージング薬剤はこれまで開発されておらず、非常に独創的であり、有効であると期待される。これにより、放射線治療コンパニオン診断法とも呼べる新しい画像診断の概念を提出しうるものと期待される。

がんは個体によるばらつきも大きいいため、線量の増減や照射時期、放射線増感剤等薬剤投与量の調節など、今後重要となってくると考えられる個々の患者に適応したテーラーメード医療の推進に、本研究の成果が重要かつ定量的な情報を与えることが可能となり、放射線科学・核医学領域にとって意義深いものと考えられる。また医療経済的にも有益と思われる。

以上の事から本研究では、DNA 二重鎖切断を修復する機構を標的とした新規分子標的イメージング薬剤を開発し、がんの放射線治療効果予測システムを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

以下の研究において、各担当者らは公正研究推進協会が実施する e-ラーニングである eAPRIN の関連科目を受講し修了証が得られたうえで参加した。動物を用いる場合は予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。また、放射性同位元素を用いる場合は

放射性同位元素等の規制に関する法律および関連法令、浜松医科大学医学部附属病院放射線障害予防規定を順守して実施した。その他、関連法令に従い実験を行った。

F-18 標識 PYK の標識合成に関する検討

本研究の趣旨から出来るだけ定量的な評価が出来る事が望ましいと考えられるので、これまで申請者が開発した PYK に加えて、F-18 標識 PYK 誘導体 (図 1 右) の開発を継続して行うこととした。これまでに、種々の標識反応原料について検討した結果、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、PYK のヨウ素導入部位と同部位でホウ素誘導体として F 化を進め、標識反応に必要な各種反応条件を見出し、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ていた。そこで、今後の各種インビトロ・インビボ試験への活用のため、自動合成装置による標識化法を構築することとした。

F-18 標識 PYK のインビトロ安定性試験・脂溶性に関する検討

上記の方法により得られた標識体について、インビトロにて PBS 中および血漿中での安定性について評価した。すなわち、F-18 標識 PYK、10 μ L (約 10,000 cpm) を PBS もしくはマウス血漿 300 μ L と混合し、37°C でインキュベートし、0、5、30、60 分後に TLC (CHCl₃:CH₃OH = 50:1) を用いて分析した。また、脂溶性を評価するため、常法に従い、オクタノール/リン酸緩衝液分配係数を測定した。

F-18 標識 PYK の EGFR 変異型結合選択性の評価

上記により得られた F-18 標識 PYK の EGFR 変異型結合親和性について、種々の EGFR 発現型が知られている腫瘍細胞を用いてインビトロに結合試験を行い、IC₅₀ を求めた。実験にはゲフィチニブ感受性のある H1650、HCC827、PC9、ゲフィチニブ耐性の T790M 変異を有する H1975、野生型である A549 を用いて評価した。

各種腫瘍細胞を移植した担癌マウスモデルにおける外照射治療効果評価

ヌードマウスに各種腫瘍細胞を移植し、腫瘍体積が約 100 (mm³) となったところで、イソフルラン麻酔下で X 線照射装置下にマウスを固定し、がん移植部位のみを露出させるように残り部位を鉛板で遮蔽した状態で、X 線 (18mA、140keV、10 あるいは 20Gy) を照射した。その後は 1 日おきに腫瘍径と体重を計測した。

各種腫瘍細胞を移植した担癌マウスモデルにおける F-18 標識 PYK による PET 撮像評価

ヌードマウスに各種腫瘍細胞を移植した担癌マウスモデルを用いて FDG および F-18 標識 PYK による PET 撮像を行った。FDG 撮像時は前日夜から絶食し、抱水クロール麻酔下で FDG を尾静注し、投与後 45 分後から 15 分間の PET 撮像を行った。また、F-18 標識 PYK 撮像時には同様に前日夜から絶食し、イソフルラン麻酔下で F-18 標識 PYK を尾静注し、投与直後から 120 分間の PET 撮像を施行した。それぞれ画像再構成後、腫瘍に VOI を設定し、SUV を算出することで評価した。

4. 研究成果

これまで SPECT 用製剤として利用してきた I-PYK の代わりに PET 用製剤の開発を目的として、F-18 標識 PYK を開発することとし、その自動合成装置を用いた標識法について検討を行った。反応自体はこれまでの検討と同条件で進むことが示されたものの、サイクロトロンで製造した F-18 イオンをターゲット水から分離して反応系に供するために使用する相関移動触媒である K222 のキレート生成に用いる K イオン量に起因すると考えられる反応の低下が認められた。このため、F-18 イオンをトラップさせるカラムの減量あるいは溶出溶液の変更を検討することで、期待する放射化学的収率を得ることができた。しかしながら、最終生成物とした際に必要な放射化学的純度が得られなかった。その原因について検討を進めたところ、HPLC 分取後の溶媒留去の際に放射線分解が起きることが示された。通常、エタノール添加やアスコルビン酸添加等により溶媒留去時の放射線分解を抑制させるが、F-PYK では奏功しなかったため、乾固する直前で取出し溶媒を添加し、ミリポアフィルターを透過させて最終生成物とした (図 2)。HPLC 溶媒中に含まれるアセトニトリルの残留が懸念されたが、ガスクロマトグラフィーにて確認したところ、臨床応用可能な濃度以下に抑えられていることを確認した。

得られた標識体についてインビトロ安定性を評価したところ、図 3 に示すように、PBS 中あるいはマウス血漿中のいずれにおいても混和後 1 時間にわたり安定であることが示された。また、脂溶性について評価した結果、オクタノール/pH7.4 リン酸緩衝液間での分配係数は 1.60 \pm 0.04 と求められた。

F-18 標識 PYK の EGFR 変異型結合選択性を評価するため、複数のインビトロ細胞実験系を用いて結合阻害実験を行ったところ、ゲフィチニブ感受性を有する細胞群への親和性が高いことが示され、T790M 変異を有するゲフィチニブ耐性の腫瘍細胞への親和性が低いことが示された。し

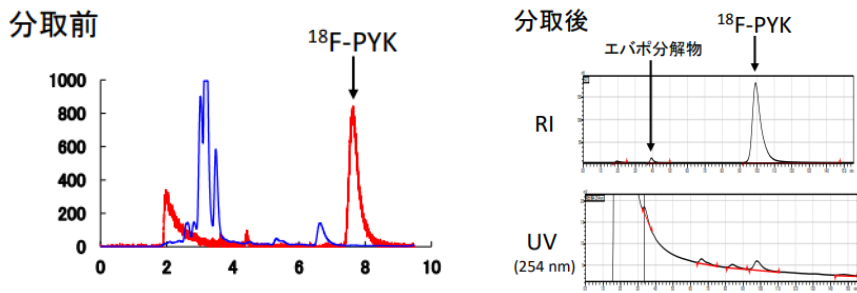


図2 F-18 標識 PYK の HPLC 分取前、分取後 HPLC チャート

かしながら同時に野生型への親和性も有していることが示された。

L859R や ex19del の活性型変異株移植マウスでは、所期の通り放射線治療効果は高～中感度であった。それに対し、F-PYK が集積しないがん種では放射線治療効果は中～低感度であった (図4)。また、X 線照射後に FDG を投与して PET 撮像を行ったところ、治療効果を示す癌種では照射後 8 日目の FDG 画像でも取り込みが低下していた (図5)。この結果は放射線治療の成否を反映しているものと考えられた。

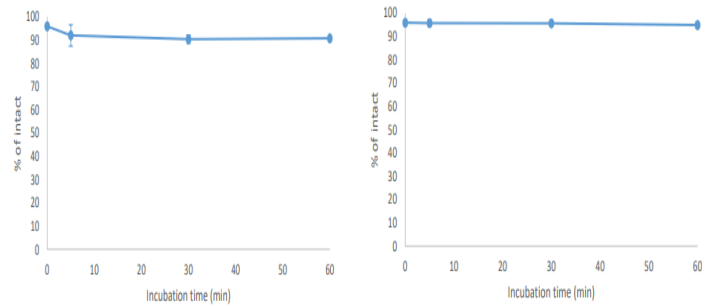


図3 (左) PBS 中安定性、(右) マウス血漿中安定性

L859R や ex19del の活性型変異株移植マウスでは、F-18 標識 PYK が高い集積を示す癌種である。

各種がん細胞を用いて担癌マウスを作成し、F-PYK を投与後、ダイナミック PET 撮像を行い時間放射能曲線を作成したところ、インビトロ実験系で親和性の低いことが示された細胞系にはインビボでも集積が低いことが示された。図4、図5で示した癌細胞と同じ細胞を移植して PET 撮像した画像の一例を図6に示した。これらの結果から F-PYK による PET-EGFR イメージングプローブとして所期の通り活用可能であると判断された。

F-PYK が集積しないがん種の EGFR 遺伝子型には野生型と T790M が加わった耐性型が含まれる。野生型は EGFR からのシグナルが元々多いため放射線治療により DNA 二重鎖切断が惹起されても速やかな修復機構が働いたためと考えられ、T790M 変異を有する耐性型では代償的に AXL 経路や IGF-1R 経路が活発化してシグナル伝達することが近年知られており、これらが働くことで DNA 修復機構が働き、放射線治療効果

でも取り込みが低下していた (図5)。この結果は放射線治療の成否を反映しているものと考えられた。

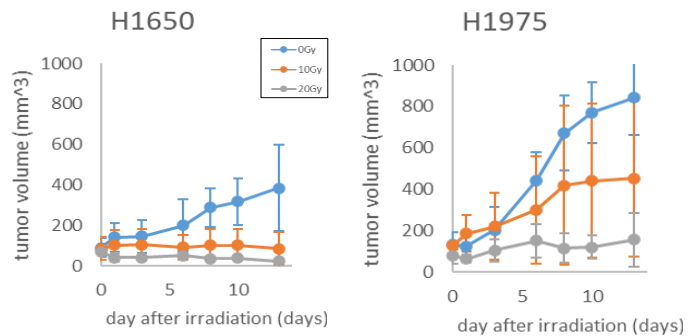


図4 放射線治療効果
(左)F-PYK が集積する活性型変異
(右)F-PYK の集積が低い耐性型変異

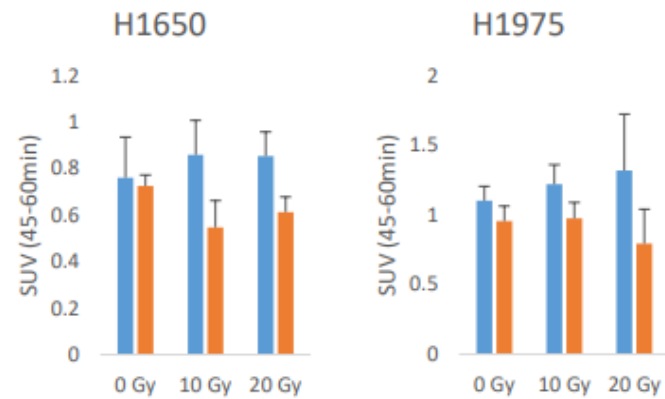


図5 放射線治療後の FDG の取り込み
(左)F-PYK が集積する活性型変異
(右)F-PYK が集積しない耐性型変異

の感度が低下したと考えられた。

また以上のような検討から、同時に下記のような問題点も明らかとなった。

- ・F-PYK の有用性について、がん細胞系をさらに増やして確認すること。
- ・F-PYK の集積が低いがん種で野生型と T790M 変異を示す耐性型の鑑別が出来ないか。
- ・放射線治療時にその効果を増強するため併用薬の最適化が出来ないか。
- ・放射線治療開始後に耐性が惹起された際に画像化による T790M の鑑別が出来ないか。
- ・F-PYK は肝臓への集積が高いので低減させることが出来ないか。

これらの問いに関して今後も引き続き検討することで、有効な放射線治療効果予測システムの開発へつながるものと期待されるとともに、併用薬の検討を進めることで、より効果的な放射線治療効果が期待される予測システムの開発につながるものと期待された。

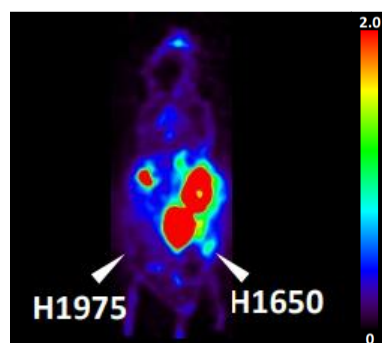


図6 F-18標識PYK投与6時間後のPET-SUV画像

期待されるとともに、併用薬の検討を進めることで、より効果的な放射線治療効果が期待される予測システムの開発につながるものと期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chie Suzuki, Mutsumi Kosugi, Kaori Araki, Masahiko Hirata, Takashi Temma, Yasuhiro Magata
2. 発表標題 Development of a novel Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase (EGFR-TK) PET probe for personalized medicine
3. 学会等名 11st China-Japan-Korea Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	中村 和正 (Nakamura Katsumasa) (20284507)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	鈴木 千恵 (Suzuki Chie) (20637285)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------