

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08095

研究課題名(和文) がん免疫療法の治療効果早期判定を目的としたパーフォリン標的画像診断法の開発

研究課題名(英文) Development of perforin imaging probe for early evaluation of ICI treatment

研究代表者

鈴木 千恵 (Suzuki, Chie)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：20637285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年がん免疫療法の有効性が期待されているが、既存の診断法ではその治療効果を治療開始後早期に判断することは困難であり、治療方針決定の妨げとなっている。本研究では、がん免疫療法の治療効果早期判定を可能とする画像診断法の開発を目的に、免疫応答時に腫瘍細胞表面に形成するパーフォリン重合体を標的とした新規画像診断プローブの放射標識合成法を検討し、炭素-11標識体を再現性良く得る方法を確立した。得られた[11C]PETプローブ候補化合物の体内動態を担がんモデル動物を用いて評価したところ、[11C]PETプローブ候補化合物の腫瘍集積は投与後経時的に増加し、対照組織である対側の筋肉と比較して高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は開発した[11C]PETプローブ候補化合物が腫瘍の画像診断プローブとして有用である可能性を示しており、今後開発した[11C]PETプローブ候補化合物の腫瘍集積性と免疫応答の関係性をより詳細に解析することで、がん免疫療法の治療効果早期判定法としての有用性を証明する予定である。本研究の成果を発展させることにより、がん免疫療法や放射線併用がん免疫療法の治療効果早期判定が可能となれば、治療方針の早期決定が可能となり患者の予後改善や副作用軽減につながるのみでなく、種々のがん治療法における腫瘍細胞障害機序の詳細な解明やより効果的な治療法の開発に有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although cancer immunotherapy is effective for some cancer patients, early evaluation of the therapeutic effect is difficult. In this study, we investigated a radiolabeling method to synthesize a novel imaging probe targeting perforin polymer that is formed on the surface of tumor cells during immune response, and established a method to obtain carbon-11 labeled compounds with good reproducibility. The pharmacokinetics of PET probe developed in this study evaluated using tumor-bearing mice. The tumor accumulation increased with time after administration and was higher than normal muscle tissue. These results suggest that PET probe developed in this study could be useful for tumor imaging.

研究分野：放射線科学

キーワード：PET がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

近年さまざまながん種で免疫チェックポイント阻害剤の有効性が示され、がんの免疫療法が注目されている。免疫チェックポイント阻害剤は、腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞の腫瘍細胞に対する免疫応答を抑制する機構を阻害することで、抗腫瘍効果を示す。免疫チェックポイント阻害剤奏効例では長期寛解が認められる一方で、単剤での奏効率は 10~40%程度であり、奏効率の向上を目指してさまざまな併用療法が検討されている。中でも放射線療法との併用治療は、放射線照射により局所のみではなく全身の腫瘍特異的免疫の活性化が認められる“アプスコパル効果”との相乗効果が期待され、盛んに研究が進められている。

がんの治療効果は、その後の治療方針決定や予後予測に重要であり、不必要な投薬継続による後続治療の遅延や副作用を避けるために、治療開始後早期に判定されることが望まれる。現在、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果判定には、X 線 CT (コンピュータ断層像) や FDG-PET (2-フルオロデオキシグルコースを用いたポジトロン断層像) などの画像診断が用いられているが、奏効例においても治療後に一過性の“腫瘍径増大”および“FDG の集積亢進”が認められる例があり、治療効果の早期判定は困難である。また、腫瘍組織における種々の免疫チェックポイント分子の発現量による治療効果予測も試みられているが、これらの発現量も治療効果と完全には相関しないことが報告されており、精度の高い治療効果予測は困難である。

2. 研究の目的

本研究課題では、従来の腫瘍と免疫細胞の区別が難しい画像診断法と異なり、がん免疫療法における腫瘍細胞傷害の最終段階である免疫細胞による腫瘍細胞傷害に特異的な分子機構を画像化することで、がん免疫療法および放射線併用がん免疫療法の治療効果を治療開始後早期に判定する画像診断法を開発することを目的とした。免疫チェックポイント阻害剤の投与により免疫応答の抑制が阻害された腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞が腫瘍細胞を傷害する主要な分子機構の 1 つに、パーフォリン-グランザイム系が挙げられる (図 1)。腫瘍細胞表面の腫瘍抗原を認識した腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞は、腫瘍細胞に向けパーフォリンとグランザイムを放出する (図 1)。パーフォリンは、腫瘍細胞膜を貫通する筒状の重合体を形成し (図 1)、パーフォリン重合体の孔を通じて腫瘍細胞に流入したグランザイムなどの働きにより腫瘍細胞のアポトーシスが誘導される (図 1)。

パーフォリンは免疫系細胞にのみ発現し、免疫応答が抑制された免疫細胞では単量体として細胞内顆粒に貯蔵されている一方で、免疫応答時には細胞外へと放出され標的細胞表面に重合体を形成することから、細胞表面上のパーフォリン重合体を特異的に画像化することで、免疫細胞による腫瘍細胞傷害の特異的評価が可能となると考え、細胞表面のパーフォリン重合体に特異的に結合・集積する画像診断プローブの開発を目的とした。

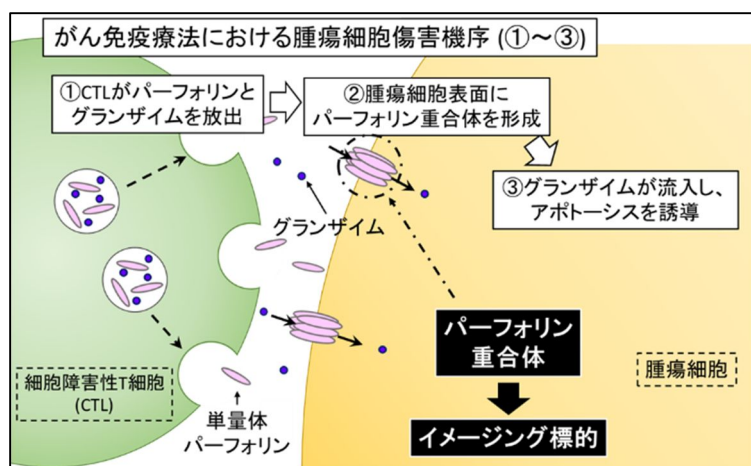


図 1 がん免疫療法治療効果早期判定のための画像化標的分子

3. 研究の方法

(1) PET プローブ候補化合物の非放射性標品および標識前駆体の合成

パーフォリン依存的細胞傷害阻害作用を有することが報告されている化合物を PET プローブ候補化合物として選択した。

非放射性標品は、既報を参考に、ハロゲン化イソインドリン-1-オン誘導体を水素化ナトリウム存在下ヨウ化メチルによりメチル化後、2ステップのパラジウム触媒を用いたクロスカップリング反応とハロゲン化により縮合し、塩化ジフルオロベンゼンスルホン酸と脱水縮合することにより合成した。

PET プローブ候補化合物の¹⁸F 標識に用いる標識前駆体 (2-ニトロ体および 4-ニトロ体) は、ハロゲン化イソインドリン-1-オン誘導体を水素化ナトリウム存在下ヨウ化メチルによりメチル化後、2ステップのパラジウム触媒を用いたクロスカップリング反応とハロゲン化により縮合し

た後、塩化フルオロニトロベンゼンスルホン酸と脱水縮合することにより合成した。フッ化物基とニトロ基の位置の異なる 2 種類の塩化フルオロニトロベンゼンスルホン酸位置異性体を用いることで、2 種類の標識前駆体 (2-ニトロ体および 4-ニトロ体) を合成した。

PET プローブ候補化合物の ^{11}C 標識に用いる標識前駆体 (デスメチル体) は、ハロゲン化イソインドリン-1-オン誘導体をメチル化せずに 2 ステップのパラジウム触媒を用いたクロスカップリング反応とハロゲン化により縮合し、塩化ジフルオロベンゼンスルホン酸と脱水縮合することにより合成した。

(2) PET プローブ候補化合物の ^{18}F 標識条件検討

サイクロトロンを用いた $^{18}\text{O}(p,n)^{18}\text{F}$ 反応により得た ^{18}F フッ化物イオンの ^{18}O 濃縮水溶液をあらかじめ炭酸イオン型に変換した陰イオン交換樹脂に導入し、 ^{18}F フッ化物イオンを吸着させ、炭酸カリウムとクリプトフィックス 222 を含む溶液もしくは重炭酸テトラエチルアンモニウム溶液で溶出させ、加熱乾燥させた。1 mL のアセトニトリルを加え、再度加熱乾燥させることで、水を完全に除去し、1 mL の DMSO、DMF、もしくはアセトニトリルに再溶解することで、 ^{18}F フッ化物イオン溶液を得た。1 mg の 2-ニトロ体もしくは 4-ニトロ体を 100 μL の DMSO、DMF、もしくはアセトニトリルに溶解し、100 μL の ^{18}F フッ化物イオン溶液と混合し、室温、80、もしくは 140 で 15 分間反応させ、反応溶液を逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) および薄層クロマトグラフィー (TLC) で分析した。

(3) PET プローブ候補化合物の ^{11}C 標識条件検討

サイクロトロンを用いた $^{14}\text{N}(p, \gamma)^{11}\text{C}$ 反応により得た ^{11}C 二酸化炭素を常法に従い、 ^{11}C ヨウ化メチルもしくは ^{11}C メチルトリフレートへと変換し、1 mL の THF、DMF にバブリングにより捕集することで、 ^{11}C ヨウ化メチルもしくは ^{11}C メチルトリフレート溶液を得た。デスメチル体 0.5 mg を 100 μL の同様の溶媒に溶解し、塩基存在下もしくは非存在下で、 ^{11}C ヨウ化メチルもしくは ^{11}C メチルトリフレート溶液 100 μL と混合し、室温、50、100、もしくは 120 で 1~5 分間反応させ、反応溶液を逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) および薄層クロマトグラフィー (TLC) で分析した。

動物実験に用いる ^{11}C PET プローブ候補化合物は、デスメチル体 0.5 mg を 300 μL の DMF に溶解し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液を 10 μL 加えた溶液に、自動合成装置で ^{11}C メチルトリフレートをバブリングにより捕集し、120 で 1 分間加熱し、HPLC 移動相で希釈した後、HPLC 精製、減圧乾燥させ、生理食塩水に再溶解させることで合成した。合成した ^{11}C PET プローブ候補化合物の構造は RP-HPLC および TLC で分析し、非放射性標品の UV 吸収プロファイルとの比較により構造を確認した。

(4) ^{11}C PET プローブ候補化合物の血漿中安定性評価

^{11}C PET プローブ候補化合物をマウス血漿と混合し、37 水浴中で 0、5、30 もしくは 90 分間インキュベートした。インキュベート終了後ただちに、サンプルの一部 (10 μL) を採取し、冷エタノール 40 μL と混合後、遠心分離し、沈殿中に含まれる放射能の割合をタンパク結合率として算出した。さらに、遠心分離後の上清をクロロホルム/メタノール (10/1, v/v) を展開相とする TLC により分析することで、タンパク非結合画分における放射化学的純度の経時変化を評価した。

(5) ^{11}C PET プローブ候補化合物の体内動態および腫瘍集積性評価

雄性 C3H マウス下肢にマウス由来腫瘍細胞 SCCVII を皮下移植することで作成した腫瘍モデルマウスに ^{11}C PET プローブ候補化合物を尾静脈より投与し、投与直後から 90 分間全身の PET 収集を施行し、腫瘍および対側下肢筋肉への ^{11}C PET プローブ候補化合物の集積を経時的に評価した。また、同腫瘍モデルマウスに ^{11}C PET プローブ候補化合物を尾静脈より投与し、90 分後に安楽死後、血液、腫瘍、および主要臓器を採取し、ガンマカウンターを用いて放射能濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) PET プローブ候補化合物の非放射性標品および標識前駆体の合成

非放射性標品、2-ニトロ体、4-ニトロ体およびデスメチル体はそれぞれ、ハロゲン化イソインドリン-1-オン誘導体からの総収率 9.05% (5 ステップ)、20.7% (5 ステップ)、14.1% (5 ステップ)、2.22% (4 ステップ) で得られた。各化合物の構造は ^1H -NMR および質量分析により確認した。

(2) PET プローブ候補化合物の ^{18}F 標識合成

2-ニトロ体もしくは 4-ニトロ体と ^{18}F フッ化物イオンとの反応溶液を RP-HPLC および TLC で分析したところ、いずれの対イオン、溶媒、反応温度を用いた反応条件においても目的とする ^{18}F PET プローブ候補化合物の生成は認められなかった。反応溶液の経時的な RP-HPLC 分析で

は、標識前駆体である 2-ニトロ体および 4-ニトロ体の速やかな分解が観察された。

(3) PET プローブ候補化合物の ^{11}C 標識合成

^{11}C ヨウ化メチルによる ^{11}C メチル化反応は、水素化ナトリウム、フッ化テトラブチルアンモニウム、水酸化ナトリウムのいずれの塩基を使用した場合においても進行せず、目的とする ^{11}C PET プローブ候補化合物の生成は認められなかった。デスメチル体 0.5 mg を水酸化ナトリウム存在下 DMF 中で ^{11}C メチルトリフレートと 120 °C で 1 分間反応させることで、目的とする ^{11}C PET プローブ候補化合物の生成が認められた。

自動合成装置を用いた遠隔自動合成により、 ^{11}C PET プローブ候補化合物は収量 584 ± 237 MBq、放射化学的純度 $96.1 \pm 1.8\%$ (図 2)、比放射能 95.0 ± 17.3 GBq/ μmol ($n = 9$) で得られた。

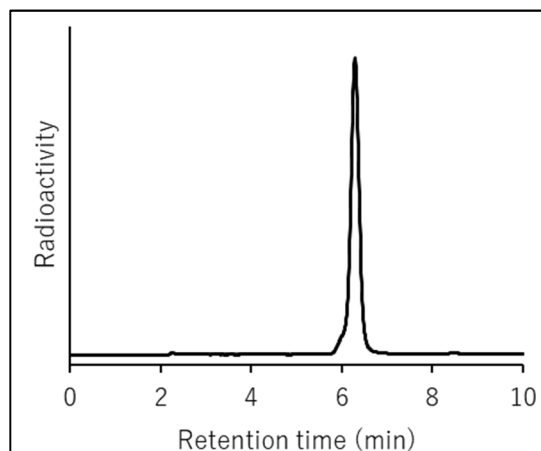


図 2 ^{11}C PET プローブ候補化合物の RP-HPLC 分析結果

(4) ^{11}C PET プローブ候補化合物の血漿中安定性

マウス血漿とのインキュベート 0、5、30 もしくは 90 分後におけるエタノール沈殿法により求めたタンパク結合率は、それぞれ $17.9 \pm 2.7\%$ 、 $17.1 \pm 4.7\%$ 、 $14.1 \pm 1.6\%$ および $13.4 \pm 0.7\%$ 、タンパク非結合画分における放射化学的純度は、それぞれ $99.9 \pm 0.2\%$ 、 $99.1 \pm 0.2\%$ 、 $99.6 \pm 0.5\%$ および $91.9 \pm 2.6\%$ であった。

(5) ^{11}C PET プローブ候補化合物の体内動態および腫瘍集積性

^{11}C PET プローブ候補化合物の腫瘍集積は投与 90 分後まで経時的に増加し、対照組織である対側の筋肉と比較して高値であった (図 3)。解剖法により求めた ^{11}C PET プローブ候補化合物の投与 90 分後の腫瘍/筋肉比は 2.6 ± 0.4 であり、正常組織においては肺、心臓、肝臓、腸管、腎臓、胸腺、リンパ節へ比較的高い集積を認めた。

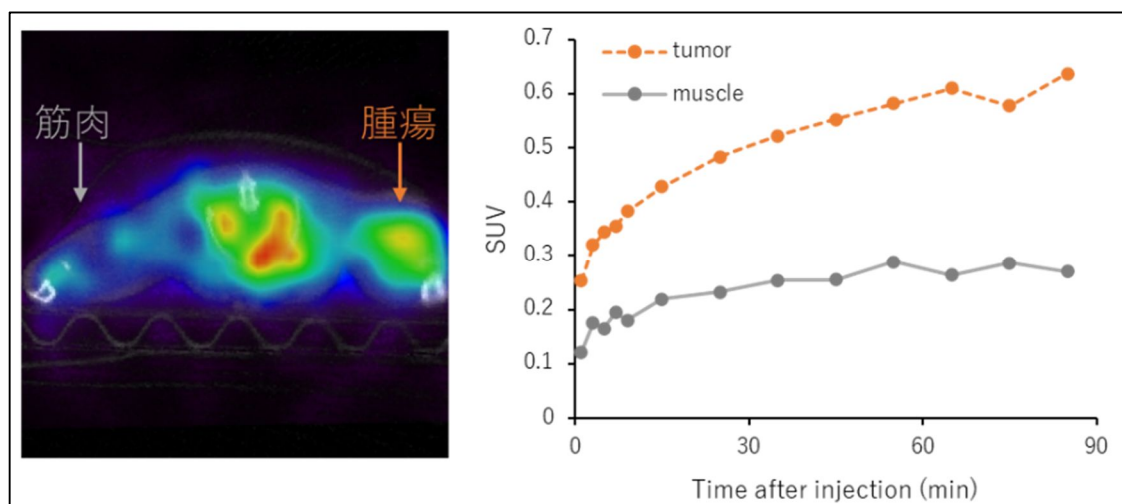


図 3 ^{11}C PET プローブ候補化合物の腫瘍集積

(左) 投与 80~90 分後の PET/CT 画像、(右) 腫瘍および筋肉における時間放射能曲線

本研究課題では、パーフォリン親和性を有する PET プローブ候補化合物の複数のポジトロン放出核種による標識合成条件を検討し、デスメチル体の ^{11}C メチルトリフレートによる ^{11}C メチル化反応により ^{11}C PET プローブ候補化合物を PET 撮像に十分な収量、純度および比放射能で再現性良く得られる標識方法を確立した。さらに ^{11}C PET プローブ候補化合物は *in vitro* においてマウス血漿中で安定に存在し、*in vivo* において正常筋肉と比較して腫瘍へ高集積を示したことから、腫瘍の画像診断プローブとして有用である可能性が示された。今後、開発した ^{11}C PET プローブ候補化合物の腫瘍集積性と免疫応答の関係性をより詳細に解析することで、がん免疫療法の治療効果早期判定法としての有用性を証明する予定である。本研究の成果を進展させることにより、がん免疫療法や放射線併用がん免疫療法の治療効果早期判定が可能となれば、治療方針の早期決定が可能となり患者の予後改善や副作用軽減につながるのみでなく、種々のがん治療法における腫瘍細胞障害機序の詳細な解明やより効果的な治療法の開発に有用なツールとなることが期待される。

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〕

〔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	間賀田 泰寛 (Magata Yasuhiro) (20209399)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授 (13802)	
研究分担者	中村 和正 (Nakamura Katsumasa) (20284507)	浜松医科大学・医学部・教授 (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