

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08096

研究課題名（和文）腫瘍随伴マクロファージの性状鑑別を可能とする核医学診断剤の開発

研究課題名（英文）Development of nuclear imaging probes for detection of tumor associated macrophages

研究代表者

志水 陽一（SHIMIZU, YOICHI）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：90634212

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）：固形腫瘍組織に存在する腫瘍随伴マクロファージ（TAM）のM2型は腫瘍細胞の増殖、転移や腫瘍組織内の血管新生を促進し、腫瘍の悪性化に関与していることが最近報告されている。そこで本研究では、M2型マクロファージではマンノース受容体（CD206）、Tissue Factor（TF）が高発現していることに着目して、「機能ユニット結合型多機能分子プローブ」というプローブの分子設計概念を用いて、CD206およびTFに対して特異的に結合し、化学合成が可能なペプチドを母体とする核医学診断剤を開発し、これまで適切な手法のなかった固形腫瘍の性状診断を可能とする核医学診断法を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がんの悪性度化に関与するM2型TAMに高発現するTFおよびCD206を標的とした核医学診断剤の開発を行った。今回開発した各薬剤は体内動態等にまだ改善の余地があるものの、M2型TAMのがん悪性度化に関する研究や、TAM標的抗がん剤開発等において、本薬剤を用いた核医学イメージングによりTAMの性状鑑別（M2型分化度など）の評価が可能となり、今後のがん診断、治療研究に貢献できる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：It has been recently reported that M2 type of tumor-associated macrophages (TAM), which exist in solid tumor tissues, promote tumor cell proliferation, metastasis, and angiogenesis in tumor tissues, and are involved in tumor malignant transformation. In this study, we focused on the fact that mannose receptor (CD206) and Tissue Factor (TF) are highly expressed in M2-type macrophages and used the molecular design concept of "functional unit-bound multifunctional molecular probes" to develop peptides that bind specifically to CD206 and TF and can be synthesized chemically. We developed a peptide-based nuclear medicine diagnostic agent that binds specifically to CD206 and TF and can be chemically synthesized, aiming to develop a nuclear medicine diagnostic method that enables the diagnosis of solid tumors, for which no appropriate method has been available so far.

研究分野：核医学

キーワード：腫瘍随伴マクロファージ 核医学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍の微小環境下には、単球が血管より浸潤し、分化した腫瘍随伴マクロファージ (Tumor associated macrophage, TAM) が存在し、その浸潤量が多いとがん患者の予後が悪いことが報告されている。特に TAM の M2 型 (組織修復型) (M2 型 TAM) は炎症作用を抑制するとともにがん細胞の増殖、転移や血管新生を誘発することが報告されている。このように M2 型 TAM は腫瘍の悪性化に大きく関与することから、腫瘍組織内における M2 型 TAM の PET 診断を可能にすることは、がん性状診断、さらに治療方針の決定等において有効である。しかし、M2 型 TAM を標的とする核医学診断剤、それによる核医学診断法はこれまで開発されていなかった。

### 2. 研究の目的

M2 型 TAM を特異的に描出するには、M2 型 TAM において特異的に高発現する細胞膜タンパク質を標的とした核医学診断剤の開発が必須である。M2 型マクロファージではマンノース受容体 (CD206) および Tissue Factor (TF) を高発現していることが報告されている。また、 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  ジェネレータおよび  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  ジェネレータは他の核医学診断用核種 ( $^{18}\text{F}$  など) の産生に用いるサイクロトロン等とは異なり、小型かつ  $^{68}\text{Ga}$  および  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  を用時産生可能であり、汎用性に優れている。本研究の目的は、画質、定量性に優れた核医学核種で、 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  ジェネレータにより臨床現場で用時入手可能な汎用性の高い  $^{68}\text{Ga}$  を用いて、固形腫瘍内に存在しがんの悪性度と相關する TAM に高発現する CD206 および TF に対して特異的に結合する PET 診断剤を開発し、固形腫瘍の性状鑑別を可能とする PET 診断法を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### TF 標的核医学診断剤の開発

新たな TF 標的核医学診断剤として、TF との結合ドメインとして報告されている 3 種類のペプチド配列 (TP1、TP2、TP3) の N 末に二官能性キレート“DOTA”を導入した DOTA-TP1/TP2/TP3 に、 $^{68}\text{Ga}$  を標識した  $^{68}\text{Ga}$ -TP1/TP2/TP3 の開発を計画した。なお、実験の都合上、半減期が比較的長く、かつ  $^{68}\text{Ga}$  と同様に DOTA と錯体形成することが知られている  $^{111}\text{In}$  を用いて検討を行った。

まず、標識前駆体である DOTA-TP1/TP2/TP3 を Fmoc 固相合成法を用いて合成した。得られた DOTA-TP1/TP2/TP3 と  $^{111}\text{InCl}_3$  を室温条件下で反応した後、逆相 HPLC を用いて精製し、 $^{111}\text{In}$ -TP1/TP2/TP3 を得た。また陰性対照として、TP1/TP2/TP3 のスクランブルペプチド配列鎖を母核に用いた  $^{111}\text{In}$ -SCTP1/SCTP2/SCTP3 も併せて合成した。得られた各  $^{111}\text{In}$  標識薬剤について、リコンビナント TF タンパク質を結合した Ni-NTA Magnetic Agarose Beads および TF 未結合 Beads にそれぞれ添加し、各 Beads への結合量を測定した。また、TF 高発現細胞 (MDA-MB-231 細胞) および TF 低発現細胞 (MCF-7 細胞) に各  $^{111}\text{In}$  標識薬剤を添加し、各細胞への放射能集積量を測定した。さらに、TF 高発現細胞 (MDA-MB-231 細胞) 移植 BALB/c nu/nu に  $^{111}\text{In}$  標識薬剤を尾静脈投与し、投与後経時的にマウス各臓器を摘出し、モデルマウス内の放射能分布を測定した。

#### CD206 標的核医学診断剤の開発

新たな CD206 標的核医学診断剤として、CD206 特異的結合が報告されている 2 種類のペプチド配列 (CP1、CP2) の N 末に二官能性キレート“DOTA”を導入した DOTA-CP1/CP2 に、 $^{68}\text{Ga}$  を標識した  $^{68}\text{Ga}$ -CP1/CP2 の開発を計画した。なお、と同様に実験の都合上、 $^{68}\text{Ga}$  の代わりに  $^{111}\text{In}$  を用いて検討を行った。

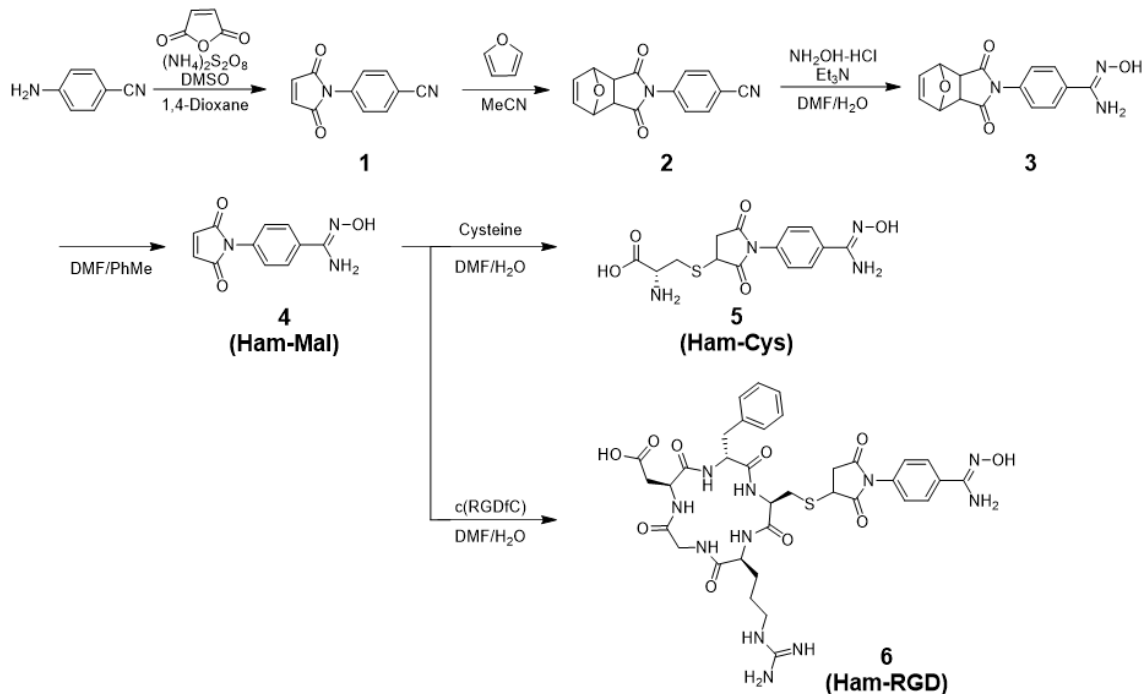
まず、標識前駆体である DOTA-CP1/CP2 を Fmoc 固相合成法を用いて合成した。得られた DOTA-CP1/CP2 と  $^{111}\text{InCl}_3$  を室温条件下で反応した後、逆相 HPLC を用いて精製し、 $^{111}\text{In}$ -CP1/CP2 を得た。得られた各  $^{111}\text{In}$  標識薬剤について、リコンビナント CD206 タンパク質を結合した Ni-NTA Magnetic Agarose Beads および CD206 未結合 Beads にそれぞれ添加し、各 Beads への結合量を測定した。また、M1 型、M2 型に分化させたマウスマクロファージ細胞 (RAW264.7 細胞) 未分化型 (M0) RAW264.7 細胞およびマウス乳がん細胞 (4T1 細胞) に各  $^{111}\text{In}$  標識薬剤を添加し、各細胞への放射能集積量を測定した。さらに、4T1 細胞移植 BALB/c マウス (TAM モデルマウス) に  $^{111}\text{In}$  標識薬剤を尾静脈投与し、投与後経時的にマウス各臓器を摘出し、モデルマウス内の放射能分布を測定した。

#### 2 価錯体を容易に形成可能とする二官能性キレート剤の開発

Hydroxamamide (Ham) は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  と温和な反応条件下で 2 : 1 の割合で錯体を形成することが知られているキレートである。また、多価リガンドは 1 価リガンドに比べて標的に対し高い親和性

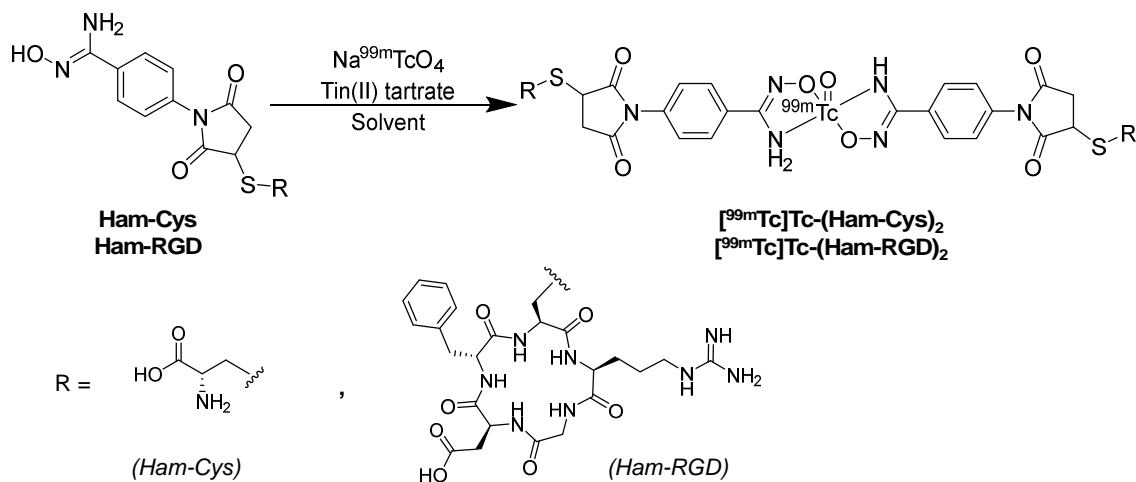
を示すことが知られていることから、Ham を利用することにより標的に対するリガンドを分子中に 2 価導入した 錯体を容易に調整することが可能であるそこで本研究では、様々なリガンドを導入した  $^{99m}\text{Tc}$ -Ham 錯体を容易に作製可能にするため、チオール基含有リガンドと容易に共有結合を形成可能なマレイミド基を導入した新規 Ham 母核二官能性キレート剤 “Mal-Ham” をの開発を考案した。

Mal-Ham は 4-アミノベンゾニトリルを出発原料とし、Scheme 1 に従い 4 段階反応で合成した。その後、モデルリガンドとしてシステイン、およびシステイン残基を含む RGD ペプチドである c(RGDfC) をそれぞれ Mal-Mam と反応させ、Ham-Cys および Ham-RGD を得た。



Scheme 1 . Ham-Mal、Ham-Cys および Ham-RGD の合成スキーム

得られた Ham-Cys および Ham-RGD をリン酸緩衝液(10mM, pH 7.4)に溶解した後、Scheme 2 に従い、 $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  と室温で 10 分間反応した後、反応液を逆相 HPLC を用いて精製し、 $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{Ham-Cys})_2$  および  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{Ham-RGD})_2$  を得た。



Scheme 2 .  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{Ham-Cys})_2$  および  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{Ham-RGD})_2$  標識反応スキーム

得られた  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{Ham-RGD})_2$  を Integrin  $\alpha_v\beta_3$  高発現細胞(U87MG 細胞)および Integrin  $\alpha_v\beta_3$  低発現細胞(PC3 細胞)にそれぞれ添加し、各細胞における放射能集積量を評価した。また、過剰量の c(RGDfC)を前処置した U87MG 細胞および PC3 細胞を用いて同様の検討を行った。

また、 $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{Ham-RGD})_2$  を U87MG/PC3 両担がんマウスに尾静脈投与し、投与後経時的に各臓器を摘出し、放射能測定を行った。さらに、U87MG/PC3 両担がんマウスに  $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{Ham-RGD})_2$  を尾静脈投与した後、投与 60 分および 180 分後に SPECT/CT 撮像を行った。

#### 4. 研究成果

##### TF 標的核医学診断剤の開発

$^{111}\text{In}$ -TP1/TP2/TP3 を放射化学的収率 10 ~ 48%、放射化学的純度 95%以上で得た。

得られた各  $^{111}\text{In}$  標識薬剤について、リコンビナント TF タンパク質結合 Ni-NTA Magnetic Agarose Beads への結合能を評価したところ、 $^{111}\text{In}$ -TP2 のみ TF 結合 Beads に有意に高い結合能を示した。また、*in vitro* 細胞取り込み実験において、 $^{111}\text{In}$ -TP2 は MCF-7 (TF 低発現) 細胞より MDA-MB-231 (TF 高発現) 細胞に有意に高い集積能を示した。一方、 $^{111}\text{In}$ -TP2 の陰性対照である  $^{111}\text{In}$ -SCTP2 は TF 結合 Beads への結合を示さず、MDA-MB-231 細胞および MCF-7 細胞いずれの細胞においても集積量は  $^{111}\text{In}$ -TP2 と比べて有意に低かった。以上の結果より、 $^{111}\text{In}$ -TP2 は TF に対して特異的結合能を有している可能性が示された。

次に、MDA-MB-231 細胞移植担癌マウスにおける  $^{111}\text{In}$ -TP2 の体内動態を評価したところ、主に腎臓から排泄され、腫瘍集積量は経時的に減少することを認めた。一方、腫瘍血液比および腫瘍筋肉比は経時的に増加し、いずれも 1 を超えたことから  $^{111}\text{In}$ -TP2 は TF 高発現組織を同定するための SPECT イメージングへ応用できる可能性が示唆された。

##### CD206 標的核医学診断剤の開発

$^{111}\text{In}$ -CP1 および  $^{111}\text{In}$ -CP2 はそれぞれ放射化学的収率 64%および 72%で得た。また、いずれの  $^{111}\text{In}$  標識薬剤も放射化学的純度 95%以上であることを確認した。

得られた各  $^{111}\text{In}$  標識薬剤について、リコンビナント CD206 タンパク質結合 Ni-NTA Magnetic Agarose Beads への結合能を評価したところ、いずれの  $^{111}\text{In}$  標識薬剤も TF 結合 Beads に有意に高い結合能を示した。また、*in vitro* 細胞取り込み実験において、 $^{111}\text{In}$ -CP1 の M2 型マクロファージにおける放射能集積量は、有意な差は認められなかったものの、M1 型マクロファージと比較して高く、M0 型マクロファージと比べて低くなり、M2 型マクロファージに対する特異的な集積は確認できなかった。一方、 $^{111}\text{In}$ -CP2 の M2 型マクロファージへの放射能集積量は、M1 および M0 型マクロファージと比較して有意に高くなった。以上の結果より、 $^{111}\text{In}$ -CP2 は CD206 を介して M2 型マクロファージに特異的に集積する可能性が示された。

次に、各  $^{111}\text{In}$  標識薬剤について 4T1 細胞移植 TAM モデル担癌マウスにおける体内動態を評価したところ、いずれの薬剤も主に腎臓から排泄され、腫瘍集積量は経時的に減少することを認めた。一方、腫瘍血液比および腫瘍筋肉比は経時的に増加し、いずれも 1 を超え、 $^{111}\text{In}$ -CP2 の方がより有意に高い腫瘍血液比および腫瘍筋肉比値を示した。以上の結果より、 $^{111}\text{In}$ -CP2 は CD206 を標的とした SPECT イメージングに応用できる可能性が示唆された。

##### 2 価錯体を容易に形成可能とする二官能性キレート剤の開発

Mal-Ham は、4-アミノベンゾニトリルを出発原料とし、フランによるマレイミドの保護、ニトリル基のヒドロキサムアミド化、脱保護を行い、総収率 4%で得た。その後、チオール基を有する化合物であるシステイン、c(RGDfC)と Mal-Ham を反応し、Ham-Cys, Ham-RGD をそれぞれ収率 23%, 38%で得た。得られた Ham-Cys, Ham-RGD を  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  と反応させた後、HPLC 分析を行ったところ、いずれの薬剤について  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ham 錯体の 2 種類の異性体由来するピークを観測し、放射化学的純度が 95%以上であることを確認した (Fig. 1)。

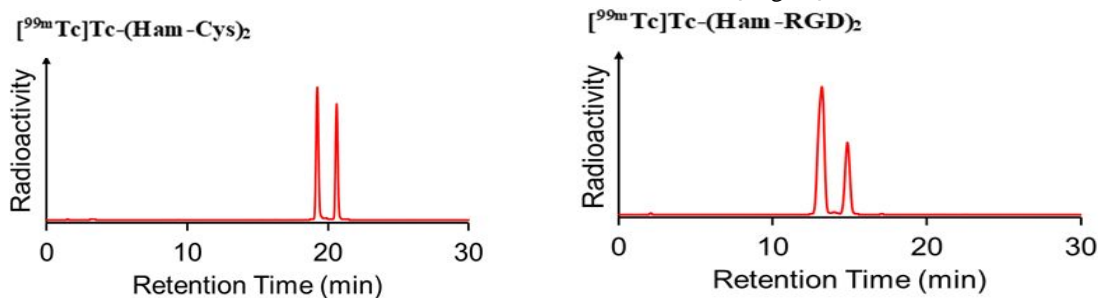
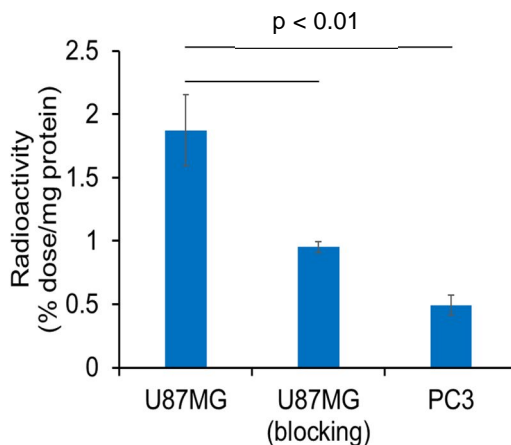


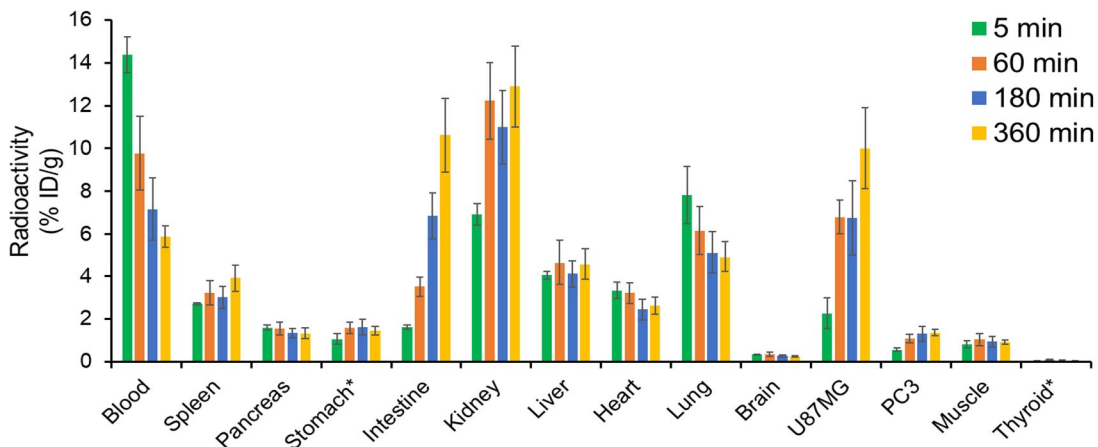
Figure 1. 各  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識薬剤の HPLC チャート

そこで、Integrin  $\alpha_v\beta_3$  高発現細胞 (U87MG) および Integrin  $\alpha_v\beta_3$  低発現細胞 (PC3) を用いて  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ham-RGD<sub>2</sub> の Integrin  $\alpha_v\beta_3$  発現細胞に対する結合選択性を評価した。また、過剰量の c(RGDfK) を事前添加することにより、Integrin  $\alpha_v\beta_3$  への特異的結合能を評価した。その結果、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ham-RGD<sub>2</sub> は PC3 細胞と比べて U87MG 細胞に有意に高く結合し (U87MG:  $1.87 \pm 0.28$  vs. PC3:  $0.49 \pm 0.08$  % dose/mg protein,  $p < 0.01$ )、また、c(RGDfK) の前処置により、U87MG 細胞への結合は有意に低下した ( $0.95 \pm 0.04$  % dose/mg protein,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2)。以上の結果より、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ham-RGD<sub>2</sub> は *in vitro* において Integrin  $\alpha_v\beta_3$  に対して特異的に結合することが示された。

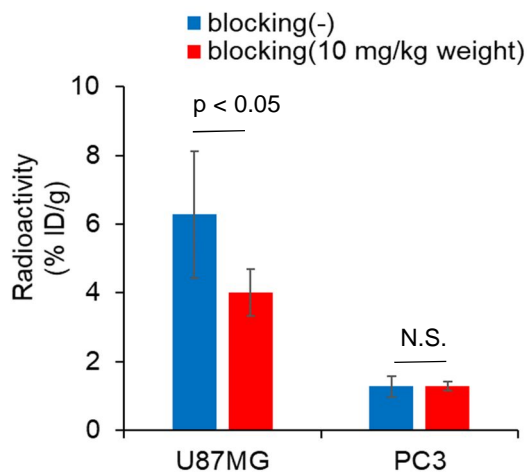
次に、U87MG 細胞および PC3 細胞を移植した両担がんマウスに $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{Ham-RGD})_2$ を投与し、投与 5, 60, 180, 360 分後の各臓器ならびに腫瘍の放射エネルギーを測定した。その結果、投与 5 分後より $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{Ham-RGD})_2$ は PC3 腫瘍への集積に比べ、U87MG 腫瘍に有意に高集積した (Fig. 3)。また、c(RGDfK)を前投与すると、PC3 腫瘍への集積は変化しなかったのに対して、U87MG 腫瘍への集積は有意に低下した (Fig. 4)。以上の結果より、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{Ham-RGD})_2$ は Integrin  $\alpha_v\beta_3$  高発現腫瘍に特異的に集積することが示された。また、 $^{99m}\text{Tc}$  が脱離して生じると考えられる  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  の主な集積臓器である胃および甲状腺において経時的な集積量の変化は認められなかったことから、生体内において  $^{99m}\text{Tc}$ -Ham 錯体が安定に保持されていることが示唆された。さらに、U87MG/PC3 両担がんマウスに $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{Ham-RGD})_2$ を投与し、SPECT 撮像を行ったところ、投与 60 分後より U87MG 腫瘍を明瞭に描出し、一方 PC3 腫瘍は描出しなかった (Fig. 5)。この結果より、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{Ham-RGD})_2$ は Integrin  $\alpha_v\beta_3$  高発現腫瘍を明瞭に描出可能であることを示した。



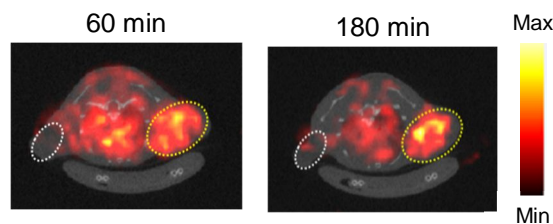
**Figure 2.** in vitro における $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{Ham-RGD})_2$ の U87MG 細胞および PC3 細胞への集積量



**Figure 3.** U87MG/PC3 細胞移植担がんマウスにおける $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{Ham-RGD})_2$ の体内分布



**Figure 4.** Integrin  $\alpha_v\beta_3$  阻害剤前処置担がんマウスにおける $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{Ham-RGD})_2$ の腫瘍集積能



**Figure 5.** U87MG/PC3 細胞移植担がんマウスにおける $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}-(\text{Ham-RGD})_2$ の SPECT/CT イメージング画像 (axial 像) r

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Shimizu Yoichi, Ando Masato, Iikuni Shimpei, Watanabe Hiroyuki, Ono Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a hydroxamamide-based bifunctional chelating agent to prepare technetium-99m-labeled bivalent ligand probes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98235-x	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 志水陽一, 小林敬三, 熊野充繁, 岡村明彦, 石守崇好, 佐賀恒夫, 中本裕士
2. 発表標題 サイクロترون liquid target systemにて製造するGa-68を用いた68Ga-DOTATOC自動合成法の検討
3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志水陽一, 小林敬三, 熊野充繁, 岡村明彦, 石守崇好, 佐賀恒夫, 中本裕士
2. 発表標題 Ga-68標識薬剤の安定供給に向けたサイクロترون liquid target system によるGa-68製造法の検討
3. 学会等名 第3 回日本核医学会 近畿支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤正登, 志水陽一, 飯國慎平, 渡邊裕之, 小野 正博
2. 発表標題 99mTc標識2価リガンドを容易に調製可能とするHydroxamamide母核二官能性キレート剤の開発
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimizu Y, Kobayashi K, Kumano M, Okamura A, Saga T, Nakamoto Y.
2. 発表標題 Optimizing of automated synthesis of 68Ga-DOTATOC with Ga-68 produced by cyclotron liquid target system for clinical use
3. 学会等名 13th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志水陽一, 野橋智美, 中本裕士
2. 発表標題 [18F]F-AraGの臨床利用に向けた多目的合成装置による製造法の検討
3. 学会等名 第62回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志水陽一
2. 発表標題 次世代核医学診療に対応可能なサイクロトロン施設の構築
3. 学会等名 PETサマーセミナー2022 in 甲府 (招待講演)
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------