

機関番号： 22701

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008~2010

課題番号： 20591498

研究課題名 (和文) IL13-PE38QQR ポジトロン製剤と放射免疫治療薬開発の基礎研究

研究課題名 (英文) Development of radiated immunotoxin anti-cancer drug and IL13-PE38QQR positron tracer

研究代表者

チュンポール ティラダノン (CHUMPOL THEERALADANON)

横浜市立大学・医学研究科・特任准教授

研究者番号： 20448682

研究成果の概要 (和文)：

我々は、FDA CBER と物質移動合意契約を結び、⁹⁰Y 標識化 IL-13PE 細胞毒素の開発を目的とした基礎研究 (*in vitro* や *in vivo*) を行った。IL-13PE 細胞毒素は、FDA CBER の Puri 博士より提供された物を用いた。⁹⁰Y 標識化 IL-13PE 細胞毒素癌治療の標的である IL-13 受容体 (IL-13R) への効果【腫瘍細胞への細胞毒性活性】と・線による細胞【周辺の腫瘍細胞】への損傷の両方が期待され、⁹⁰Y 標識化 IL-13PE 細胞毒素は新規放射線-抗腫瘍免疫毒素治療物質になると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

We performed the basic research *in vitro* and *in vivo* experiments with Y-90 labeled IL-13PE Cytotoxin after agreement of material transfer with FDA CBER, and using IL-13 PE Cytotoxin that had been offered from FDA CBER Dr. Puri. Y-90 labeled IL-13PE Cytotoxin is expected the both effect to target IL-13 receptors (IL-13R) for cancer therapy and cellular damage by β -emitter, so Y-90 labeled IL-13PE Cytotoxin is expected for the new radiation anti-cancer Immunotoxin treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：(1) IL-13 受容体 (2) ポジトロン製剤 (3) 腫瘍イメージング (4) ⁹⁰Y 標識

1. 研究開始当初の背景

近年、IL13-PE38QQR (IL-13 PE Cytotoxin)

は IL-13 受容体を標的として開発された分子

標的抗腫瘍薬剤であり、米国では glioblastoma 患者を対象に第三相臨床試験が行われ高い効果と安全性が確認されてい

る。すでに Y-90 を用いた新しい放射免疫療法としては Ibritumomab tiuxetan⁹⁰ (Y-Zevalin) が米国で高い臨床実績を上げ期待されているが、IL-13 PE Cytotoxin の放射抗癌イムノトキシン療法の報告はまだない。

2. 研究の目的

今回我々はFDA CBERとMaterial Transfer Agreementを結び、FDA CBER Dr. Puriより提供されたIL-13 PE Cytotoxinを用いてY-90標識 IL-13PE Cytotoxinの開発に向けた基礎的検討を行った。Y-90標識 IL-13PE Cytotoxinは、IL-13PE Cytotoxinによる殺腫瘍細胞効果の他にβ-emitterによる標的抗原を発現していない隣接腫瘍細胞にも効果が期待でき、新たな放射抗癌イムノトキシン療法として期待される。またポジトロン核種をIL-13PE Cytotoxinに標識したイメージング製剤の開発をあわせて行った。このイメージング薬剤により、PETカメラを用いて分子標的となる腫瘍へのIL-13PE Cytotoxinの集積を非侵襲的評価でき、治療患者選択や治療効果の早期判定に有用性が期待される。

準備として我々は新しいポジトロン核種標識したアミノ酸製剤での腫瘍イメージングの成功を論文発表 (J Nucl Med. 1999 Mar;40(3):399-405.) や、国際学会で成果を発表してきた (THE 49thSociety of Nuclear Medicine, Los Angeles, 2002)。また米国のMD アンダーソン癌センターと腫瘍イメージング用⁶⁸Ga標識PET製剤や治療用の¹⁸⁸Re標識製剤の共同研究を行い、これまでも新しい腫瘍イメージング製剤の研究開発結果を論文発表してきた (Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007 Mar;34(3):354-62, Acad Radiol. 2007 Sep;14(9):1050-7)。本研究を実施するために使用する研究施設・設備、として、横浜市立大学付属病院では1999年から院内に設置さ

れたサイクロトロン装置により実験でもポジトロン製剤が使用できる環境となっている。さらに2006年には横浜市立大学における初のベンチャー企業である、Bay Bio Imagingとの連携により、世界でも数少ない、動物用PET装置、CT装置、質量分析装置などイメージング装置や解析装置を駆使したtranslational researchの環境が整備されている。

FDA CBER Dr. Puriより提供され、Material transfer agreementを締結したIL-13 PE Cytotoxinを用いてポジトロン核種標識イメージング製剤であるGa-68標識IL-13PE Cytotoxinと放射抗癌イムノトキシン製剤であるY-90標識IL-13PE Cytotoxinの合成を行う。

3. 研究の方法

薬剤合成および標識方法

標識方法の基本的な概念としては、IL-13の2個所のreceptor binding siteであるsiteI (Glu-13, Arg-66, Ser-66で構成)およびsiteII (Lys-105, Lys-106, Arg-109で構成)に影響しない、Cysteineに注目し、このCysteineのSH基にBromo基を持ったDOTA-Bridgeを反応させ、DOTAをキレート剤として、Ga-68およびY-90の標識を行う。

具体的には

DOTA, 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide (EDC), HOBT, 2-Bromoethylamine を1:4:4:1のmolar ratioで加え室温で一昼夜反応させる。

このDOTA-bromoethylamide (DOTA-BEA) を60°C AcOEtで反応させ、生成・再結晶化したのち、IL-13PE Cytotoxinと1:5 (300 mg : 1.47x10⁻² mg)のtheoretic stiochiometry比率で室温・1昼夜反応させ、DOTA-IL-13PE Cytotoxinを合成する。

このDOTA-IL-13PE Cytotoxin conjugateに⁹⁰Yを加え、0.1N NaOAc (pH 5.5) をbufferとし45分間室温で静置し、最終的に5 mL of 10 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid 溶液を加えて調整を行った。

Radiochemical purity 測定

radiochemical purity を Whatman MKC18F TLC plates を用いて saline 溶液にて確認した

U-87 human glioblastoma腫瘍細胞を用いた IL-13 PE CytotoxinおよびY-90標識IL-13 PECytotoxinによるタンパク合成抑制効果 (IL-13処置・非処置群の比較)

Group 1-4を以下のように振り分けた。

Group1 : IL-13のpreincubationを行わない IL-13 PE Cytotoxin処理群

Group2 : IL-13のpreincubation (2 μg/ml45分間) を行ったIL-13 PE Cytotoxin処理群

Group3: IL-13のpreincubationを行わない Y-90標識IL-13 PE Cytotoxin処理群

Group2 : IL-13のpreincubation (2 μg/ml45分間) を行ったY-90標識IL-13 PE Cytotoxin 処理群

Group1およびGroup2はIL-13 PE Cytotoxinは濃度 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1000ng/mlで実験を行った。

Group3およびGroup4はY-90 標識 IL-13 PE Cytotoxinは濃度0.1ng/ml, 1ng/mlで実験を行った。

以上4グループはIL-13 PE CytotoxinのコントロールとしてIL-13 PE Cytotoxinの変わりにleucine-free mediumを添加した。

Group1および2の調整

U87 human glioblastoma cells を 10⁴/well に調節し、一日培養する。well の培地を捨て、電気ピペットで leucine-free medium (10% FBS, P/S included) を 100 μl 添加する。手動ピペットで 4 μg/ml の leucine-free

medium (10% FBS, P/S included) に溶かした IL-13 を 100 μl 添加する。コントロールとして leucine-free medium (10% FBS, P/S included) を 100 μl 添加する。37 °Cにて 45 分間培養する。well の培地を捨て、電気ピペットで leucine-free medium (10% FBS, P/S included) を 100 μl 添加する。

200 μl の leucine-free medium にとかした IL-13 PE Cytotoxin (10% FBS, P/S included) を添加する (IL-13 PE Cytotoxin 濃度はそれぞれ 0.1, 1, 10, 100, 1000 ng/ml)。コントロールとして leucine-free medium (10% FBS, P/S included) を 200 μl 添加する。37°C にて 20-24 時間培養。 [³H]leucine (1 μCi/20 μl) を 20 μl ずつ well plate に添加する (1 μCi/well)。37°C にて 4 時間培養。上清を捨て、PBS で 2 回洗浄する。シンチを 200 μl 加え、Top count を用いて cell-incorporated radioactivity をカウントした。

Group3および4の調整

U87 human glioblastoma cells を 10⁴/well に調節し、一日培養する。well の培地を捨て、電気ピペットで leucine-free medium (10% FBS, P/S included) を 100 μl 添加する。手動ピペットで 4 μg/ml の leucine-free medium (10% FBS, P/S included) に溶かした IL-13 を 100 μl 添加する。コントロールとして leucine-free medium (10% FBS, P/S included) を 100 μl 添加する。37 °C にて 45 分間培養する。well の培地を捨て、電気ピペットで leucine-free medium (10% FBS, P/S included) を 100 μl 添加する。

leucine-free medium (10% FBS, P/S included) に溶けている Y-90 標識 IL-13PE Cytotoxin 100 μl を手動ピペットで添加する (Y-90 標識 IL-13PE Cytotoxin 最終濃度はそれぞれ 0.1, 1 ng/ml)。コントロールとして leucine-free medium (10% FBS, P/S

included)を100 μ l 添加する。

37°Cにて20-24時間培養。[³H]leucine (1 μ Ci/20 μ l)を20 μ lずつwell plateに添加する(1 μ Ci/well)。37°Cにて4時間培養。

上清を捨て、PBSで2回洗浄する。シンチを200 μ l 加え、Top countを用いてcell-incorporated radioactivityをカウントした。

U-87 human glioblastoma 腫瘍細胞を用いた IL-13 PE Cytotoxin の作用による腫瘍細胞 viability 評価

U87 human glioblastoma cells を5 x 10³cells/ml に調整する。

1ml ずつ24 well cultureplateにとり、一日培養。wellの培地を捨て、1mlのIL-13PE Cytotoxin とEMEM medium (10% FBS, P/S included)を手動ピペットで添加する(IL-13PE Cytotoxin 最終濃度はそれぞれ0.1, 100 ng/ml)。コントロールとしてEMEM medium (10% FBS, P/S included)を1ml添加する。37°Cで培養し、IL-13PE Cytotoxin 添加後1, 3, 6日目細胞を回収する。trypanblueで染色し、細胞の生存率を計算した。

IL-13 PE Cytotoxin および Y-90 標識 IL-13 PE Cytotoxin による U-87 human glioblastoma 腫瘍細胞治療効果比較実験。

U87 human glioblastoma cells を5x10⁶個(100 μ l PBS 0.2%human serum albumin)

移植したBALB/c nude mouseの移植8日後から以下の3群で処置を加え、比較検討した。

Group A) Control 群(No treatment group)。

Group B) 移植8日後からY-90 標識 IL-13PE Cytotoxin 10 μ g/kg 連続5日間腫瘍内注射治療した群。

Group C) 移植8日後からY-90 標識 IL-13PE Cytotoxin 10 μ g/kg (Y-90 15MBq/kg)連続5日間腫瘍内注射治療した群。

約40日間観察を行い、腫瘍サイズ(長径お

よび短径)を測定した。

U-87 human glioblastoma 移植 Balb/c Nude Mouse を用いた ⁶⁸Ga 標識 IL-13 PE Cytotoxin PET イメージング

⁶⁸Ga 標識 IL-13 PE Cytotoxin は1 μ g/150 μ l (4.5MBq, PH5.8)に調節し、U87 human glioblastoma cells を5x10⁶個(100 μ l PBS 0.2%human serum albumin)移植したBALB/c nude mouse に注射し、PET image とCT imageの比較を行った。

4. 研究成果

Radiochemical purity 測定

Y-90 標識 IL-13 PE Cytotoxin の Radiochemical purity はRTLCにて98.5%であり、Rf値は0.88であった(Figure1)。

U-87 human glioblastoma腫瘍細胞を用いた IL-13 PE Cytotoxin および Y-90 標識 IL-13 PE Cytotoxin によるタンパク合成抑制効果 (IL-13処置・非処置群の比較)

U-87 human glioblastoma腫瘍細胞を用いた In vitro実験ではIL-13 PE Cytotoxin は濃度依存性にタンパク合成を抑制し、

recombinant human IL-13の前処置によりこの効果はブロックされた(Figure2)。

U-87 human glioblastoma腫瘍細胞を用いた In vitro実験ではY-90標識 IL-13 PE Cytotoxin は濃度依存性にタンパク合成を抑制し、recombinant human IL-13の前処置によりこの効果はブロックされる傾向を示した(Figure3)。

U-87 human glioblastoma 腫瘍細胞を用いた IL-13 PE Cytotoxin の作用による腫瘍細胞 viability 評価

IL-13 PE Cytotoxin による濃度依存性の

U-87 human glioblastoma 腫瘍細胞増殖抑制効果が認められた(Figure4)。

IL-13 PE Cytotoxin および Y-90 標識 IL-13 PE

Cytotoxin による U-87 human glioblastoma 腫瘍細胞治療効果比較実験

IL-13 PE Cytotoxin は Control に比較して U-87 human glioblastoma 腫瘍増殖抑制効果が高く、⁹⁰Y 標識 IL-13-PE Cytotoxin は IL-13-PE Cytotoxin と比較してさらに U-87 human glioblastoma 腫瘍増殖抑制効果が高いことが示された (Figure5,6)。

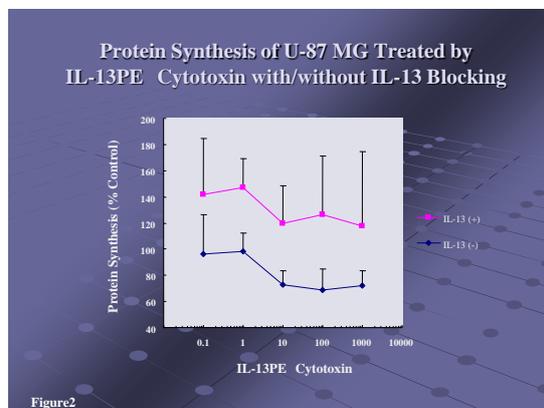
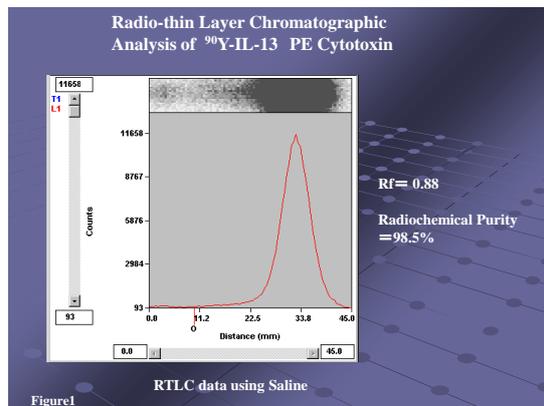
U-87 human glioblastoma 移植 Balb/c Nude Mouse を用いた ⁶⁸Ga 標識 IL-13 PE Cytotoxin PET イメージング

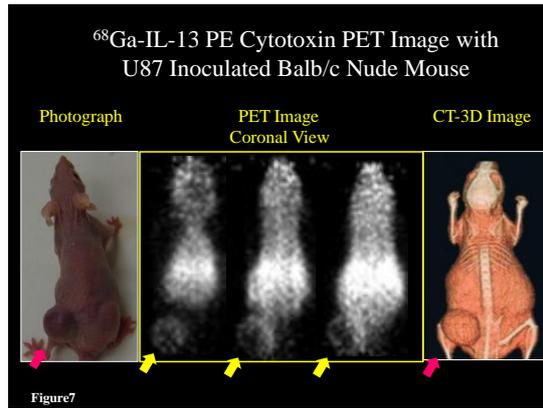
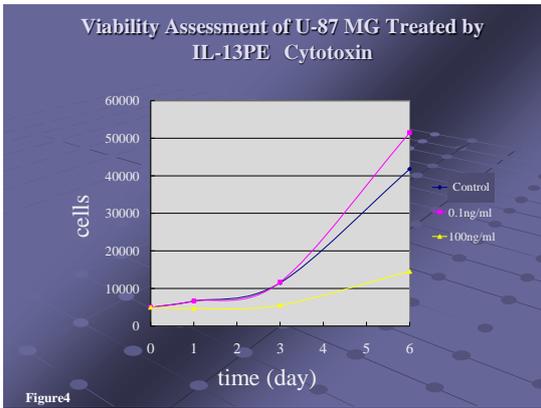
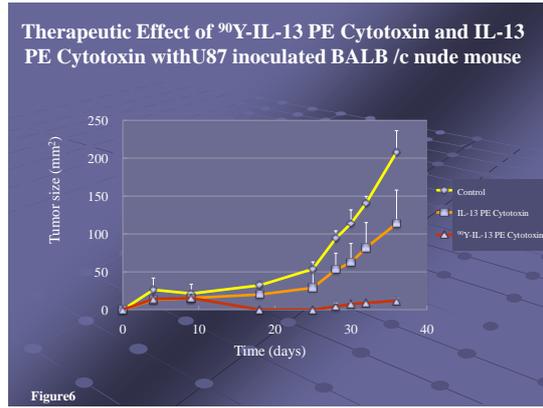
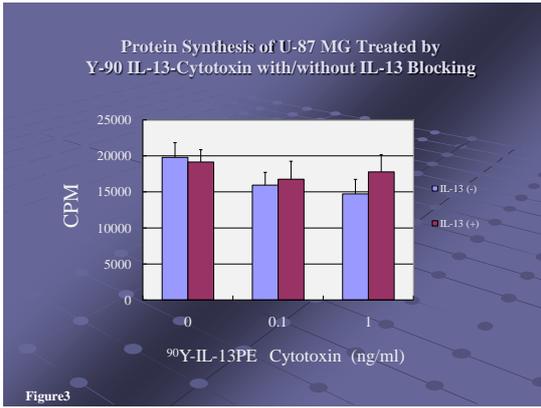
Balb/c Nude Mouse に移植した U-87 human glioblastoma 腫瘍は肉眼的な位置と CT での解剖学的な位置は一致しており、PET イメージでは中心の壊死部集積低下と周囲の残存腫瘍細胞への ⁶⁸Ga 標識 IL-13 PE Cytotoxin 集積が確認された (Figure7)。

考察および総括

IL-13 PE Cytotoxin は IL-13R を標的として開発された分子標的抗腫瘍薬剤であり、米国では脳腫瘍や腎細胞癌の治療の第三相臨床治験が行われ高い効果が確認されている。一方、Y-90 標識 IL-13 PE Cytotoxin による、放射抗癌イムノトキシン療法の報告やポジトロン核腫標識による in vivo 腫瘍イメージングの報告はまだない。IL-13 PE Cytotoxin についてはすでに FDA CBER Dr.Puri により腎細胞癌や glioblastoma での腫瘍抑制効果が 2000 年以降多数論文報告されており、今回の U-87 腫瘍移植動物を用いた in vivo 実験からも Y-90 標識 IL-13 PE Cytotoxin による腫瘍抑制効果は大いに期待される。米国ではすでに Y-90 を用いた新しい放射免疫療法として Ibritumomab tiuxetan (⁹⁰Y-Zevalin) が高い臨床実績を上げ、このような分子標的放射抗癌イムノトキシン治療薬は癌治療の中でも注目される分野である。今回 FDA CBER と共同研究により、我々が示

した Y-90 標識 IL-13 PE Cytotoxin の結果は独自の治療薬開発に対して充分期待しうるものとする。また、⁶⁸Ga 標識 IL-13 PE Cytotoxin による U-87 腫瘍移植動物 PET イメージの結果、中心の壊死部集積低下と周囲の残存腫瘍細胞への ⁶⁸Ga 標識 IL-13 PE Cytotoxin 集積が確認されたことから、この ⁶⁸Ga 標識 IL-13 PE Cytotoxin は今後 PET/CT を用いた非侵襲的な治療効果測定の間からも期待しうるものとする。





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)

[学会発表] (計 1 件)
Chumpol Theeraladanon, Ukihide Tateishi, Masaaki Shiina, Ryogo Minamoto, Hisashi Endo, Takashi Oka, Nobukazu Takahashi, Tomio Inoue. Synthesis and labeling of a novel EGFR and HER-2 tyrosine Kinase inhibitor containing 4-anilinoquinoline-3-carbonitrile nucleus. Society of Nuclear Medicine Annual Meeting, June 2009, Toronto, Canada.

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 チュンポール ティアラダノン (CHUMPOL THEERALADANON)
 横浜市立大学・医学研究科・特任准教授
 研究者番号：20448682

(2) 研究分担者
 井上 登美夫 (INOUE TOMIO)
 横浜市立大学・医学研究科・教授
 研究者番号：80134295

(3) 連携研究者 なし