

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591592

研究課題名（和文）ヨウ素 124 を用いた腫瘍イメージングのための新規 PET 用プローブの開発

研究課題名（英文）Development of new PET probe for tumor imaging using I-124

研究代表者

船木 善仁（FUNAKI YOSHIHITO）

東北大学・マイクロン・ラジオアイソトープセンター・助教

研究者番号：50261491

研究成果の概要（和文）：

ヨウ素 124 を用いた標識抗体および標識修飾抗体を作製し培養細胞を用いた *in vitro* における結合性を確認したところ、特異性が見られた。担癌マウスを作製し、*in vivo* における結合性を確認したところ、腫瘍への集積はほとんど見られず、膀胱への集積が見られた。また、ヨウ素 124 を用いた IODOGEN 法による標識の際に見られる標識率の低下は還元性のある水和電子の影響であることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

Labeled antibody and labeled modified antibody with I-124 were produced. Those labeled antibodies had specific bindings to cultured tumor cells. Labeled antibodies were not transported to the tumor in case of injection via tail vein but accumulated in urinary bladder. Moreover, it may be suggested that the hydrated electron that was high reductant produced in an aqueous solvent and the oxidized radioiodine was inhibited to generate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：核薬学

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：ヨウ素 124、腫瘍、小動物 PET

1. 研究開始当初の背景

近年の Positron Emission Tomography(PET)の普及に伴い、脳機能イメージングや腫瘍イメージングなど様々なイメージングプローブが開発されており、申請者も2種類のイメージングプローブを開発している。（・Funaki Y. et al. Evaluation of the binding characteristics of [5-¹¹C-methoxy]Donepezil in the rat brain for *in vivo* visualization of acetylcholinesterase. Journal of Pharmacological Sciences.

91(2):105-12, 2003, ・ Evaluation of the binding characteristics of [¹⁸F]fluoroproxyfan in the rat brain for *in vivo* visualization of histamine H3 receptor. Funaki Y. et al. Nucl. Med. Bio. 34:981-7 2007) 腫瘍診断におけるイメージングプローブとして[¹⁸F]FDG は非常に有名であり、また、保険適用も認められたことから国内では200を越えるPET施設でこの薬剤を用いた腫瘍診断が行われている。しかし、この[¹⁸F]FDG もすべての腫瘍に対して有効な

イメージングプローブではない。例えば、 ^{18}F FDG は尿中排泄薬であることから排泄系やその近傍、すなわち腎臓、膀胱、前立腺などの腫瘍診断には不向きである。また、脳においては糖利用が活発であることから正常細胞にも ^{18}F FDG が集積してしまい脳腫瘍との鑑別がし難い。さらに、 ^{18}F FDG は炎症部位にも集積することが知られている。従って画像診断において ^{18}F FDG の集積が見られた場合、腫瘍による集積なのか、炎症への集積なのかを見極める必要がある。このように ^{18}F FDG は腫瘍診断において万能ではない。このことから、 ^{18}F FDG に代わる新しい腫瘍診断のイメージングプローブの開発が精力的に行われている。腫瘍細胞にはその表面に CEA (癌胎児抗原) や EGF (上皮細胞成長因子) 受容体など腫瘍特異的な癌抗原が存在していることが知られており、それらを認識する抗体が多数開発されている。この癌に特異的に結合する抗体は癌治療に応用されており、その中でもセツキシマブは EGF 受容体を認識する抗体治療薬としてすでに臨床利用が開始されている。以上のことを踏まえ、本研究はこの癌特異的な抗原抗体反応に注目し、抗体を用いた腫瘍イメージングプローブの開発を行うという着想に至った。標識に用いる核種として、抗体はたんぱく質であり容易にヨウ素で標識ができることから、ポジトロン放出核種であり、かつ半減期の長いヨウ素 124 (以下 I-124) を用いて開発を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究は半減期が約 4 日と他の汎用的な PET 核種よりも長いポジトロン放出核種である I-124 を用いて癌抗原である EGF 受容体を認識する抗体を標識することにより、PET における腫瘍イメージングプローブとしての有用性を検討するものである。抗体への標識はヨウ素の標識法としてよく利用されている IODOGEN 法を用いて行い、反応条件の最適化を行う。(McBrode J.M. et al. Bispecific antibody pretargeting PET (immunoPET) with an ^{124}I -labeled hapten-peptide. J. Nucl. Med 47(10) 1678-1688, 2006) 得られた I-124 標識抗体に対して EGF 受容体を過剰に発現している A431 細胞を用いた結合実験を行い、*in vitro* におけるこの新規イメージングプローブの結合性を検討するものである。次いで、*in vivo* における動態解析を行う。A431 細胞を移植した担癌マウスを用い、尾静脈よりイメージングプローブを投与することで腫瘍における動態や血中動態などの検討を行う。また、抗体サイズを小さくした修飾抗体 (分子量: 約 8 kDa) を用い、これについても上記と同様な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ^{124}I の製造

^{124}I の製造は当施設にあるサイクロトロンを用いて行う。ターゲットとして $^{124}\text{TeO}_2$ を用い、 $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$ の核反応により ^{124}I を製造した。

(2) ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体の作製

抗体は腫瘍に特異的に発現している EGF 受容体を認識する抗体を二種類用いた。標識抗体の作成はヨウ素の標識方法として汎用的に利用されている IODOGEN 法を用いて行った。初めに ^{125}I を用いて温度、時間等反応条件およびクロマトグラフィーによる精製条件の検討を行い反応の最適化を行い、その後、最適化された反応を ^{124}I について応用し、 ^{124}I 標識抗体の作製を行った。 ^{124}I 標識修飾抗体の作製は標識前駆体として ^{124}I 標識スクシンイミジルベンゾエート (SIB) を標識合成し、それを用いて修飾抗体に対して標識を行った。

(3) ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体の *in vitro* における結合評価

用いた腫瘍細胞は ^{124}I 標識抗体の結合実験には EGF 受容体が過剰に発現している A431 細胞を ^{124}I 標識修飾抗体の結合実験にはヒト EGF 受容体を過剰に発現している SK-OV-3 細胞を用いた。この細胞の一定数と ^{124}I 標識抗体または ^{124}I 標識修飾抗体を反応させ、抗原に対する作製した ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体の結合性を確認した。また、非標識の抗体添加による結合阻害実験を行うことにより、作製した ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体の特異性を確認した。

(4) ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体の *in vivo* における結合評価

腫瘍細胞を移植した担癌マウスを作製し、*in vivo* における ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体の結合性および特異性を確認した。この確認には小動物用 PET を利用した。

4. 研究成果

(1) ^{124}I の製造

^{124}I の製造には不純物である長半減期の ^{125}I の生成が抑制できる $^{124}\text{Te}(p,n)^{124}\text{I}$ 核反応を適用した。

ターゲットは 0.28 g の $^{124}\text{TeO}_2$ に 0.02 g (6 wt%) の Al_2O_3 を加えた混合物を白金プレートに固着して作製した。

14 MeV のプロトンビームを 3~4 μA で約 5 時間照射し、ターゲットマトリックス内に ^{124}I を製造した。

照射後のターゲットを電気加熱炉で 650°C で 40 分間、さらに 700°C で 35 分間加熱することにより乾留した。遊離した ^{124}I は酸素気流

により 0.1 M NaOH 溶液 (0.5 mL) に捕集した。

^{124}I のターゲットからの回収率は 94~97% であり、NaOH 溶液への捕集率は 82~88% であった。また、5 時間の照射時間で ^{124}I の生成量は 200 MBq であった。

照射終了後 95 時間の時点で放射性核種純度は 98% であった。不純物は ^{123}I が 1%、 ^{126}I が 0.4%、 ^{124}Sb が 0.6% であった。

(2) ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体の作製

標識抗体の作成はヨウ素の標識方法として汎用的に利用されている IODOGEN 法を用いて行ったが、 ^{125}I を用いた標識率が約 70% だったのに対し、 ^{124}I を用いた標識率は約 20% と低くなることが明らかとなった。(図 1)

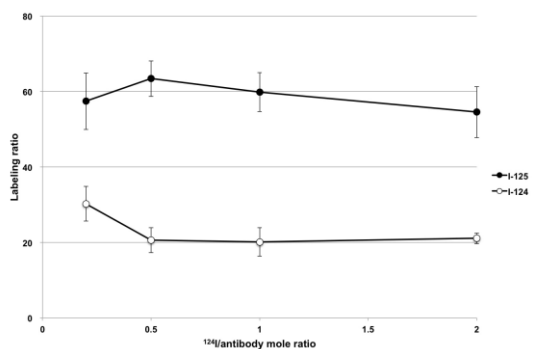


図 1: ^{125}I と ^{124}I を用いた標識における mol 比の変化に対する標識率の変化

この標識率が低い原因について詳細な検討を行ったところ、 ^{124}I は放出される陽電子のエネルギーが高いため、反応溶媒中 (PBS) に還元作用をもつ水和電子が発生し、結果として酸化されたヨウ素の数が減少するためだという知見を得た。これを改良する目的で IODOGEN を glass beads にコーティングし、反応溶媒中での水和電子の発生を抑制したところ、 ^{124}I の抗体に対する標識率は約 20% から約 45% へと上昇した。

^{124}I 標識修飾抗体の作製は上述した IODOGEN を glass beads にコーティングしたものを用い直接法にて標識を試みたが、標識率は 1% 以下だった。そこで、N-Succinimidyl-4-radioiodine-benzoate (SIB) を標識前駆体として標識合成し、これと修飾抗体を反応させた。その結果、標識率は 7%~8% と低かったものの、目的とする ^{124}I 標識修飾抗体を得ることができた。

(3) ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体の *in vitro* における結合評価

^{124}I 標識抗体と A431 細胞との結合率を図 2 に示す。

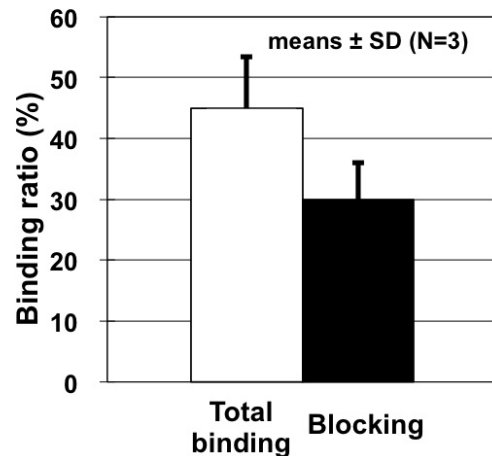


図 2: ^{124}I 標識抗体と A431 細胞との結合率

この結果から、 ^{124}I 標識抗体と A431 細胞との結合率は約 50% であった。また、非標識の抗体を過剰量添加した結合阻害実験において、結合率が全体の 1/3 程度減少したことから、 ^{124}I 標識抗体と A431 細胞の結合には特異的結合が含まれることが確認できた。

また、 ^{124}I 標識修飾抗体と A431 細胞との結合率を図 3 に示す。

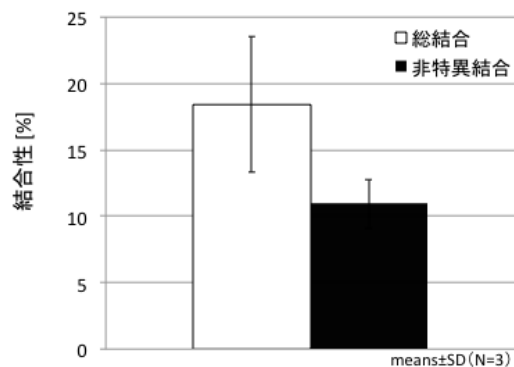


図 3: ^{124}I 標識修飾抗体と SK-OV-3 細胞との結合率

この結果、非特異結合率は 10% 程度存在するものの、総結合率と比較するとその値は小さいことから作製した ^{124}I 標識修飾抗体も特異結合を有することが確認された。

4) ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体の *in vivo* における結合評価

作製した ^{124}I 標識抗体 (1.26 MBq、比放射能 > 777 GBq/ μmol) を A431 担癌マウスに投与し、PET 撮影を行った。ベッドは 4 cm 径のものを使用し、腫瘍の中心がガントリーの中心付近になるように配置した。麻酔にはガス麻酔 (1% イソフルラン) を使用した。標識抗体投与 1, 8, 24 時間後にそれぞれ 2 時間ずつの PET 撮影を行った。画像再構成は ML-EM 法 (繰り返し 30 回) を用いた。

初めに腫瘍に直接 ^{124}I 標識抗体を投与した結果、腫瘍の外形とは異なり、壊死した部分を除いた活性のある部分だけが画像化されている絵が得られた。(図 4)

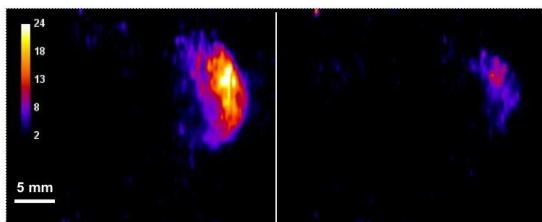


図 4：直接投与におけるがんの画像化（ガントリー中心, ML-EM(30回), coronal)
 (左) 投与後 1~3 時間 (右) 投与後 8~10 時間

また、 ^{124}I 標識抗体を尾静脈から投与した場合、投与後 1~3 時間でも腫瘍位置には集積は見られず、膀胱への集積が見られた(図 5)。8~10 時間後の画像においては、尿排泄されていたために膀胱への集積は見られなかった。

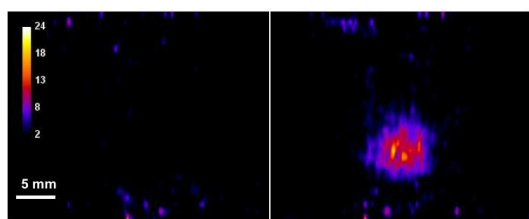
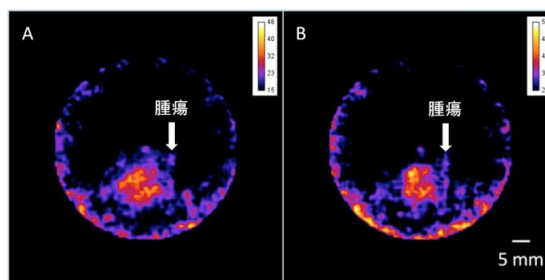


図 5：尾静脈投与における放射能分布（1~3 時間後, ML-EM(30回), coronal)
 (左) ガントリー中心付近(腫瘍高さ) (右) ガントリー中心から 8 mm 下方

この理由として、標識抗体の分子量が大きかったため、腎臓の近位尿細管細胞の管腔壁に存在する刷子縁膜酵素によりアミノ酸にまで分解され、その後、尿中へと排出されたためであると考えられる。

^{124}I 標識修飾抗体 (10.4 MBq, 比放射能: 77.7 GBq/ μmol) を SK-OV-3 担癌マウスに投与し、PET 撮影を行った。ベッドは 4 cm 径のものを使用し、腫瘍の中心がガントリーの中心付近になるように配置した。麻酔にはガス麻酔 (1% イソフルラン) を使用した。標識修飾抗体投与 1 時間後から 6 時間まで PET 撮影を行った。画像再構成は FORE-OSEM 法 (subset 数: 8 繰り返し: 4 回) を用いた。その結果を図 6 および図 7 に示す。

図 6：FORE-OSEM 法による再構成画像



(transaxial) (左: 1~3 時間, 右: 4~6 時間)

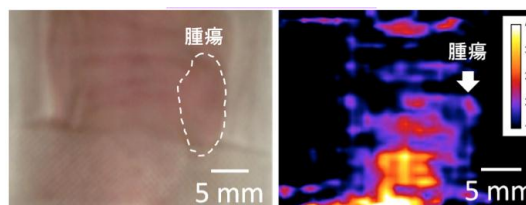


図 7：FORE-OSEM 法による再構成画像 (coronal) (左: 写真, 右: 再構成画像)

この結果、一般組織と同程度であるが、 ^{124}I 標識修飾抗体が腫瘍部位において存在していることが画像から判断できた。しかし、ほぼバックグラウンドレベルと同値であった。また、coronal 方向の集積から腫瘍のサイズと比較して集積が少ないことも確認できた。以上のことより、 ^{124}I 標識抗体を用いたイメージングでは腎臓の刷子縁膜酵素により分解され膀胱へ集積したが、 ^{124}I 標識修飾抗体を用いたイメージングではマウスの体内組織へと輸送が確認された。これは修飾抗体を用いたことで、腎臓の刷子縁膜酵素では分解されないイメージングプローブを作製することができたと考えられる。

しかし、腫瘍への集積は一般組織と同程度であり、期待した結果は得られなかった。その原因としていくつかのことが考えられる。

まず、一般に PET によるイメージングを考えた場合、重要となるのはイメージングプローブの比放射能とイメージングプローブが結合する部位の数と考えられる。すなわち、高比放射能であること、結合する部位の数が多いことである。汎用的に用いられている PET イメージングプローブの場合、比放射能は大体 37~74 GBq/ μmol 程度が普通である。本研究で用いた ^{124}I 標識修飾抗体の比放射能は 77.7 GBq/ μmol であり十分な比放射能であると考えられる。しかし、標識実験においてヨウ素 124 の 10 倍の修飾抗体が反応に用いられたため、非標識修飾抗体が多量に存在し、投与した際に腫瘍細胞の HER2 を阻害した可能性が考えられる。この解決策として、イメージングプローブの比放射能を高くすることを考える場合、原料である抗体の量を減らす、もしくは標識に用いるヨウ素 124 の量を増やす事が考えられる。また、結合部異数を

考えると腫瘍の大きさは 11 mm × 6 mm × 4 mm と比較的大きいと考えられるものの、実際に画像化を行ったところ、壊死しているであろうと思われる部分が観察できた。このことから、腫瘍の数、つまり結合数は少なかったであろうと推察できる。また、腫瘍細胞の壊死により腫瘍細胞へ血液を送る血管が十分に発達していなかった可能性が考えられる。そのため、体内のイメージングプローブは腫瘍へと運ばれず、血液循環をし、他の臓器に集積したと考えられる。

(5) 結論

ヨウ素 124 を用いて腫瘍特異的抗原を認識する抗体および修飾抗体の標識を行った。腫瘍細胞を用いた結合実験においては ^{124}I 標識抗体および ^{124}I 標識修飾抗体のいずれにおいても特異的結合があることが確認された。腫瘍細胞を移植した担癌マウスを用いた小動物 PET の実験では ^{124}I 標識抗体は腫瘍に集積せず、膀胱に集積が認められた。一方、 ^{124}I 標識修飾抗体は腫瘍に集積が認められたものの、その集積量は低かった。このことから、抗体を用いたイメージングには ^{124}I 標識修飾抗体が有用だと考えられるが、さらなる改良が必要であると考えられる。

また、**IODOGEN** を用いたヨウ素 124 の標識率がヨウ素 125 を用いたそれと比較して非常に低いことが明らかとなった。この原因として、ヨウ素 124 から放出される高エネルギーの陽電子が還元性の水和電子を生成し、それが低標識率の原因であることを見いだした。この解決法として **IODOGEN** をガラスビーズにコートしたものをを用いることによって、標識率を増加させることに成功した。

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)

船木 善仁、超高分解能PETを用いたマウスにおけるヨウ素124標識抗体によるがんの画像化の研究、原子力学会、2009.9.17、仙台市

6. 研究組織

(1)研究代表者

船木 善仁 (FUNAKI YOSHIHITO)

東北大学・サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・助教

研究者番号：50261491