

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 7 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659581

研究課題名（和文） 進行期悪性黒色腫に対する連続壊変型アルファ線放出薬剤を用いた R I 治療の挑戦

研究課題名（英文） Challenge of radionuclide therapy using successive decay type alpha emitters for advanced malignant melanoma

研究代表者

鷺山 幸信 (WASHIYAMA KOHSHIN)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：80313675

研究成果の概要（和文）：悪性黒色腫に対して放射性同位体を利用した内用療法が研究されている。悪性黒色腫の腫瘍細胞には過剰発現するメラノコルチン-1 型受容体が発現しており、色素細胞刺激ホルモンの一つである α -MSH と結合親和性を持つことから、 α -MSH にペプチドを結合させた類似体 DOTA-Re(Arg¹¹)CCMSH に放射性同位体をキレート結合させることで、悪性黒色腫の腫瘍細胞に特異的に放射線を照射することができる。本研究では、DOTA-Re(Arg¹¹)CCMSH と標識する放射性同位体として α 線放出核種である ²²⁵Ac や ²²⁷Th の可能性を検討した。実験の結果 ¹¹¹In 標識体は腫瘍細胞および腎臓に集積することが分かった。一方、²²⁵Ac は DOTA と標識は可能であったが、DOTA-Re(Arg¹¹)CCMSH に対しては DOTA と同一条件下での標識は難しいことが分かった。これに対し、²³⁴Th の標識では反応溶液の pH を 4.5 にすることで最も効率よく標識できることが分かった。今後、²²⁷Th を用いて ²³⁴Th と同条件下の実験による標識の検討を行い、さらに Th 標識 DOTA-Re(Arg¹¹)CCMSH 溶液を生理食塩水系にし、悪性黒色腫モデルマウスへ投与し、悪性黒色腫への集積の確認が必要である。

研究成果の概要（英文）：Alpha-particle emitting radionuclides are gaining attention in the field of nuclear medicine. Because of their high linear energy transfer and the short range of alpha particles in tissues, alpha-emitters (²¹¹At, ²²³Ra, and ²²⁵Ac) show promise in treating tumors such as leukemia, melanoma, and bone metastases. In this study, labeling of alpha emitter to a peptide DOTA-Re(Arg¹¹)CCMSH, which bound specifically to a receptor expressed on melanoma cells, were evaluated. Preliminary results using gamma-ray emitter ¹¹¹In showed a high uptake of DOTA-Re(Arg¹¹)CCMSH in melanoma tumors. Therapeutic studies using ²²⁵Ac and ²²⁷Th are currently underway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：放射化学

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：放射線，癌，アイソトープ治療，アルファ放射体

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は皮膚や粘膜に存在するメラノサイトから発生する腫瘍であり、転移を生じやすく、予後は他の癌に比べて不良であり、極めて悪性度が高い。さらに他の腫瘍では治療効果がある放射線療法や化学療法に対し

て抵抗性が高く、特に転移したものに対しては国内では現時点で臨床応用された効果的な治療法は存在しない。

近年発達してきた分子標的治療では、メラノーマ細胞内の BRAF 遺伝子を活性化し癌化を促進する BRAFV600E 変異に着目した BRAF

阻害剤 (ex. PLX4032) の開発とその臨床応用や、メラノーマが発現する細胞膜抗原や受容体に着目しそれらに対応するモノクローナル抗体(ex. ipilimumab)や受容体特異的ペプチドの開発と臨床応用が報告され、欧米では臨床薬として承認され利用されている。しかし、分子標的治療は、腫瘍が薬剤耐性を獲得した場合は、さらなる治療効果が見込めないため新しい分子標的薬剤の開発が常に求め続けられる。

放射線治療のなかでも生物学的効果比 (RBE) の高い重粒子線照射療法は、皮膚や鼻腔内の悪性黒色腫治療に於いて良好な成績が報告されている。しかし皮膚疾患や頭頸部の一部組織に限られ、全身に転移した場合や体深部の原発巣は対象とならない。

癌特異的な抗原や受容体、核酸などの細胞構成要素に対して結合する分子を担体として放射性同位体 (RI) を標識し癌組織に集積させ組織内で放射線照射を行う方法 (RI 治療) は放射線治療のひとつとして認識されているが、この治療法の特徴は、分子標的治療と放射線治療の融合にある。重粒子線と同等以上の RBE を持つ α 線の効果と抗体やペプチドを利用した分子標的治療の融合は、原発巣だけでなく全身へ転移した悪性黒色腫に対して極めて有用でないかと考えられる。

悪性黒色腫の腫瘍細胞は、人やマウスの悪性黒色腫の細胞膜表面に過剰発現するメラノコルチン-1 型受容体を過剰発現している。この受容体と色素細胞刺激ホルモン (Melanocyte Stimulating Hormone) の 1 つである α -MSH は結合親和性を持つためアイソトープ治療への応用が可能である。そこで本研究では α -MSH にペプチドを結合させた類似体 DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh に放射性同位体をキレート結合させることで、悪性黒色腫の腫瘍細胞に集中的に放射線を照射することを検討した。

2. 研究の目的

本研究ではアルファ (α) 線を放出するアイソトープに着目し、 α 線が有する物理的特性の核医学利用を検討する。本研究では、放射性同位体 ²²⁵Ac の DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh との標識検討を行った。²²⁵Ac はネプツニウム系列の核種の 1 つであり、壊変過程で 4 つの α 線を放出する。 α 線は高 LET 放射線であり飛程が短い為、正常細胞の被曝を抑制しながら腫瘍細胞に対して効果的な線量を照射することができる。さらに ²²⁵Ac は極めて短時間で安定同位体 ²⁰⁹Bi まで壊変することから、腫瘍細胞外に移動することなく短時間で複数本の α 線を照射することが可能と考えられる。したがって、本研究ではまず ¹¹¹In-DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh を用いてマウスでの体内動態を調べ、その後 ²²⁵Ac と

DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh との標識検討を行った。また、研究期間中には ²²⁵Ac の供給源である東北大学金属材料研究所 α 放射体実験室が東日本大震災により被害を被ったため安定供給が見込めなかった。そこで、本研究では悪性黒色腫に集積するペプチド DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh と ²²⁵Ac と同様に治療効果を持つとされる α 線放出核種の ²²⁷Th, ²²⁶Th との標識を目指し、これらの同位体である ²³⁴Th による標識の可能性を検討した。

3. 研究の方法

3-1. ¹¹¹In-DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh の調製とマウス体内における薬物動態

① ¹¹¹In-DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh の作成

1mg/mL DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh (Bachem 社) 25 μ L に ¹¹¹InCl₃ (74MBq/mL, 日本メジフィジックス社) 50 μ L と 0.5M NH₄OH を 500 μ L を加え、75°C で 40 分間攪拌した。その後、0.5M NH₄OAc 500 μ L を加え、試料を 100 倍希釈して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で無担体に調製した。調製後の溶液に N₂ ガスを吹きつけ、アセトニトリルを除去した後に、生理食塩水を加え 1 匹当たり投与する放射エネルギーを調節した。

② 悪性黒色腫モデルマウスへの ¹¹¹In 標識体の投与と各組織における重量集積率の算出

C57BL/6J 系由来悪性黒色腫細胞 B16/F1 (ATCC 製) を 1 × 10⁶ 個 C57BL/6J マウス (日本 SLC 社, ♀, 6 週齢) の右後足部に皮下移植し、その 10 日後、腫瘍が十分に成長した段階で ¹¹¹In-DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh を 1 匹当たり 100 μ L 尾静脈から投与した。マウスは投与 30 分後、2、4、24 時間後に各 5 匹解剖し、血液、腫瘍、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、胃、腎臓、膵臓、腸、皮膚、骨、筋肉の計 14 組織を採取した。各組織を秤量後、NaI (Tl) ウェル型シンチレーションカウンタ (以降 NaI と略す) で γ 線を測定し、重量集積率 (%dose/g) を算出した。

3-2. DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSh への ²²⁵Ac の標識検討

① ²²⁵Ac の調製

本研究で使用した ²²⁵Ac は、東北大学金属材料研究所 α 放射体実験室が所蔵する ²³³U から ²²⁵Ra/²²⁵Ac の混合物としてミルキングして得た。この溶液を金沢大学に持ち帰り、3MHNO₃ 溶液として陽イオン交換樹脂に通し、まず ²²⁵Ra を分離し、その後 7M HNO₃ を流して ²²⁵Ac のみの溶液として調製した。

② ²²⁵Ac と DOTA の標識

0.1M DOTA/0.1M NaOH 25 μ L に ²²⁵Ac 溶液 50 μ L と 0.5M NH₄OAc 500 μ L を加え、75°C で 40 分間攪拌した。標識の確認には、ペーパークロマトグラフィを用いた。濾紙に ²²⁵Ac 溶液と DOTA 標識溶液をそれぞれ 5 μ L スポットし、

9%NaCl/10mM NaOH の展開溶媒で展開した。展開後直ちに乾燥し、上下半分に切り分けた切片を各々試験管に入れて、NaI でγ線を測定した。この時、²²⁵Ac (半減期 10.0 日) はγ線放出しないため、分離後約 12 時間放置して放射平衡に達した状態の娘核種の ²²¹Fr (半減期 4.9 分) や ²¹³Bi (半減期 45.59 分) のγ線を計測することで ²²⁵Ac の放射能を間接的に評価した。

③ ²²⁵Ac と DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH との標識

1mg/mL DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH 溶液 25 μL に ²²⁵Ac 溶液 50 μL と 0.5M NH₄OAc 500 μL を加え、75°C で 40 分間撹拌した。反応溶液の 100 μL を HPLC に通し、¹¹¹In-DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH の精製と同じグラジエント条件で展開を行い、UV スペクトルを取得した。標識に使用した放射能が少なく、HPLC に接続している RI 検出器で検出できないため、溶離液を 1mL ずつのフラクションにとして分取し NaI で計測を行った。

④ 撹拌時間の違いによる UV スペクトルの変化の検討

1mg/mL DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH 溶液 25 μL に ²²⁵Ac 溶液 50 μL と 0.5M NH₄OAc 500 μL を加えた後、溶液を 75°C で撹拌する時間を 0、10、20、40 分の 4 種類に分けて撹拌し、各 100 μL を HPLC に通して UV スペクトルを取得した。また基準として 1mg/mL DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH 溶液 100 μL の UV スペクトルも取得した。

3-3. ²³⁴Th 標識 DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH の標識検討

① ²³⁴Th の調製

15mL 用カラムに陰イオン交換樹脂 AG1×8 (100-200mesh) (室町化学製) を詰め、8M HCl 30mL で予備平衡を行った。²³⁸U 10g に相当する ²³⁸U 溶液を濃縮し、8M HCl 系溶液とした ²³⁸U 溶液 0.5mL (²³⁸U1g に相当) を予備平衡したカラムへ加えた。その後、8M HCl 5mL をカラムへ加え、²³⁴Th 溶液を溶離した。得られた ²³⁴Th 溶液は実験に使用するために、加熱濃縮した後で 0.1M HCl 系に調製した。

② ²³⁴Th と DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH の標識条件の検討

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) では、逆相カラムを使用しポンプ流速 1mL/min とし て展開を行い、UV 吸光度の変化を得たが、使用放射能が少なく、HPLC に接続している RI 検出器で検出できなかった。そのため、溶離液を 1mL ずつ 30 分間 (30 本) 分取し NaI オートウェルカウンターでγ線計測を行った。γ線測定では ²³⁴Th の壊変によって生ずる ^{234m}Pa のγ線 (50~128keV) を関心領域とした。

4. 研究成果

4-1. ¹¹¹In-DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH のマウス

における体内動態

経過時間と取り込み率の変化を図 1 に示す。

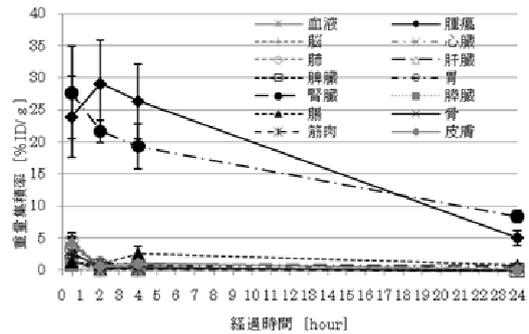


図 1 ¹¹¹In-DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH のマウス体内動態

腫瘍は経過時間 2 時間後に最も取り込み率が高く、その後は腎臓より排泄されることが分かった。またイメージングでは悪性黒色腫に特異的に集積することを確認できた。

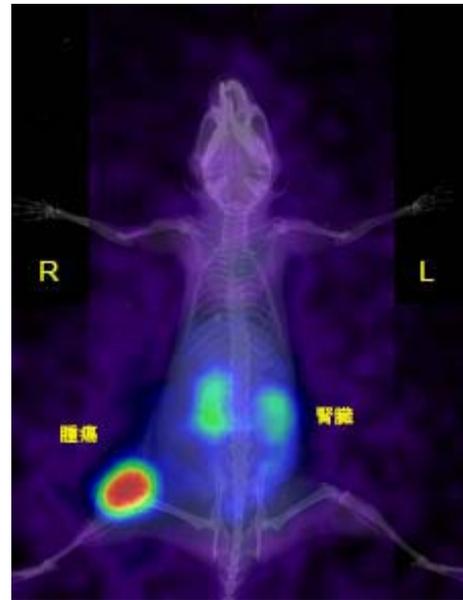


図 2 ¹¹¹In-DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH を用いた体内イメージング

¹¹¹In-DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH が腫瘍に特異的に集積することはこの結果より明らかになった。一方、腫瘍と同程度の放射線量が腎臓から排泄されることから、内用療法を行う際には放射線による腎障害につながる可能性がある。したがって、放射線による腎障害をおこさない放射線量の限度 (腎臓の最大耐用量など) を検討していく必要があると考えられる。

4-2. DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH への ²²⁵Ac の標識

① ²²⁵Ac と DOTA-Re (Arg¹¹) CCMSH の標識検討

^{111}In 標識体および ^{225}Ac の DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH 標識検討時の HPLC の UV チャートを図 3 に示す。 ^{111}In 標識体は測定

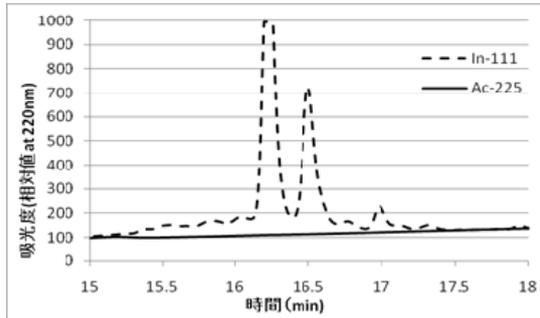


図 3 DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH 標識検討時の HPLC の UV チャート

開始 16~17 分後でピークが検出された。これは、DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH が測定開始 16~17 分後に HPLC カラムから溶出されていることを示していると考えられる。一方、 ^{225}Ac 標識体の UV チャートではピークが全く検出されなかった。また NaI で測定した γ 線は、グラジエント開始 2~5 分後にほとんど検出されており、 ^{111}In 標識体では検出されていた測定開始 16~17 分後では検出されなかった。この結果より、 ^{225}Ac はイオンの状態で存在しており、DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH とは標識されていないと考えられる。

② 攪拌時間の違いによる UV スペクトルの変化の検討

図 4 より、基準となる 1mg/mL DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH 溶液のみの UV スペクトルのピークに対して攪拌時間 0 分及び 10 分ではピークは小さくなるが存在は認められた。しかし、攪拌時間 20 分及び 40 分ではピークは全く検出されなかった。この結果より、

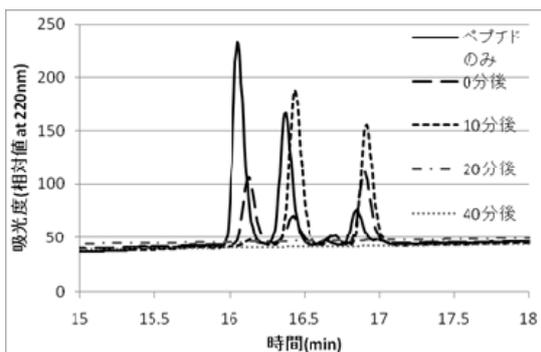


図 4 DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH 溶液のみの UV スペクトルの時間変化

攪拌時間を短縮する方が ^{225}Ac と DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH は標識しやすいとえられる。 ^{225}Ac の標識が困難な原因としては、Ac の化学的性質による可能性や、 ^{225}Ac から放出される α 線が DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH の構造を

壊してしまう可能性、攪拌の時間や温度が影響している可能性等が考えられる。今後 ^{225}Ac と DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH の標識条件を確立する為に、最適な標識条件を更に検討していく必要がある。

③ 反応溶液の反応温度と反応時間による標識率の検討

反応温度や反応時間を変化させた実験では室温と他の反応条件を比較しても ^{234}Th 標識ペプチドが溶離される 16 分のフラクションにおいて各条件間に有意な差は見られなかった。また、このとき反応させた pH は各反応条件全てにおいて pH6 であった。このことから反応溶液の pH が標識と関係していると考えられる。Th は pH3.5 付近から水酸化物である $\text{Th}(\text{OH})_4$ を形成し、ラジocolloid となること、またラジocolloid は器壁等に付着する性質を持っていることが文献上知られている。よって、反応温度や反応時間の検討を行うよりも以前に pH 条件検討の必要があると判断した。

④ 反応溶液の pH による標識率の検討

図 5 に各反応溶液 pH における ^{234}Th 標識ペプチド標識率の変化を示す。一般的に本薬剤の RI 標識ペプチドの保持時間は 16 分~17 分にかけてであることが知られている。図 5 より、 ^{234}Th 標識ペプチドは pH4.5 で最も多くカウントがあることが分かる。これは pH4.5 の条件において ^{234}Th が最もよくペプチドと標識されたことを意味している。また、pH3 において保持時間 4 分でカウントが多くなっている部分は、HPLC のグラジエント条件より、標識されなかった $^{234}\text{Th}^{4+}$ イオン由来のカウントであると考えられる。以上より pH3 では ^{234}Th はペプチドと標識される前に溶離してしまうのに対し、pH5 以上となると Th は特に水酸化物を形成しやすい状態となり、ペプチドと反応するより以前に $\text{Th}(\text{OH})_4$ を形成する。この現象を裏付けるように、溶液を反応させた容器から多くの ^{234}Th によるカウントがみられた。このことから、水酸化物の形となった Th がコロイド状となり、器壁に付着するという事実が明らかとなった。さらに、標識が上手くいかなかった原因の 1 つとして、保存容器の器壁に Th が付着することによる HPLC への投与量の減少も関係していることが反応温度、反応時間に着目し変化させ検討を行った実験結果と比較しても明らかとなった。

⑤ ^{234}Th 標識 DOTA-Re(Arg^{11})CCMSH 保持時間の検討

図 6 に pH4.5 における展開溶液の UV スペクトルと γ 線カウントを示す。15 分 42 秒から放射能が多くなり、15 分 48 秒から 15 分 54 秒にかけて特に強くなった。また 15 分 54 秒から 16 分にかけても 15 分 42 秒からの 6 秒間と同程度のカウントが見られた。UV のグラフでは 16 分~17 分にかけてピークが 3 本見ら

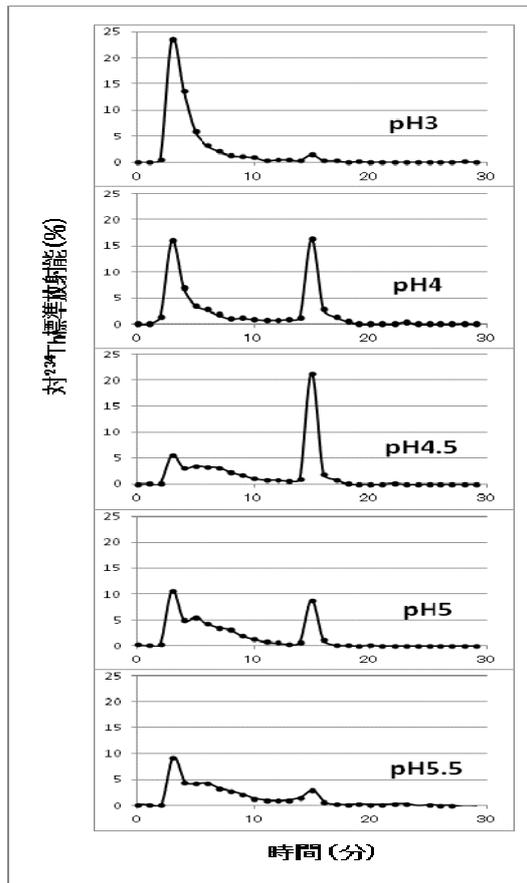


図5 各反応溶液 pH における ^{234}Th 標識ペプチド標識率の変化

れた。放射能のグラフは分取した溶離液から放射能を測定しているため、UV から得られる保持時間との間にチューブ長に基づくタイムラグがある。このことを考慮すると、ペプチドのピークよりも放射能のピークは6秒遅れてグラフ上に表現されることとなるが、

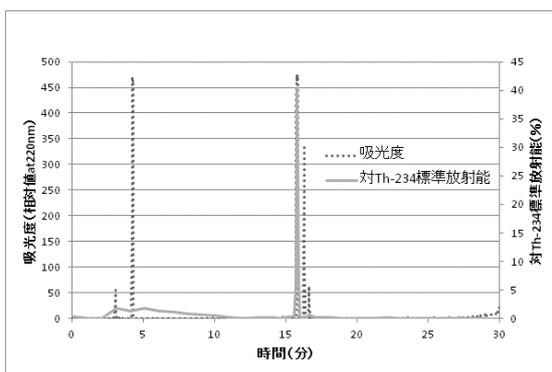


図6 pH4.5における展開溶液のUVスペクトルと γ 線カウント

図6ではその関係が見受けられない。よって15分48秒から15分54秒にかけてあるピークはUVではピークとして検出されないものによる放射能であることが考えられる。 ^{234}Th 標識ペプチドはペプチドのみとは異なるUV

スペクトルを観測する可能性があり、このことについても更なる検討が必要であると考える。今後、 α 線放出核種 ^{227}Th を用いて ^{234}Th と同条件下の実験による標識の検討を行い、さらに Th 標識 DOTA-Re(Arg¹¹)CCMSH 溶液を生理食塩水系にし、悪性黒色腫モデルマウスへ投与し、悪性黒色腫への集積の確認が必要である。

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)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Ogawa K, Washiyama K. Bone target radiotracers for palliative therapy of bone metastases. *Curr Med Chem* 2012; 19(20): 3290-300.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/092986712801215865>
- ② 鷺山幸信. α 線を出すアイソトープを利用したがん治療法. *放射線と産業.* (133):16-20 (2011) 査読なし
<http://www.rada.or.jp/radi&indu/hs maga.html>

[学会発表] (計6件)

- ① 鷺山幸信. (α 線核種への展開), 第52回日本核医学会学術総会, 2012年10月13日, ニトリ文化ホール(北海道)
- ② 鷺山幸信. (α 線放出核種による放射免疫療法の可能性), 第41回放射線による制癌シンポジウム, 2012年6月29日, カルチャーリゾートフェストーネ(沖縄県)
- ③ 鷺山幸信. (α 線を出すアイソトープを利用したがん治療法), 第14回放射線プロセスシンポジウム, 2012年6月28日, 東京大学弥生キャンパス内 弥生講堂(東京都)
- ④ 鷺山幸信. (次々と元素転換する放射性金属の体内動態とがん治療への展開), 第22回金属の関与する生体関連シンポジウム, 2012年6月1日, 金沢大学宝町キャンパス宝ホール(石川県)
- ⑤ 鷺山幸信. (α 放射体による治療とその国際的動向), 第51回日本核医学会学術総会, 2011年10月29日, つくば国際会議場(茨城県)
- ⑥ Washiyama K. (Comparative study of biodistribution of alpha-emitting bone-seeking radiopharmaceuticals. The 5th Japan-Korea-China conference on nuclear medicine), 2011年10月27日, つくば国際会議場(Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鷺山 幸信 (WASHIYAMA KOHSHIN)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：80313675

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし