

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 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659582

研究課題名（和文） 分子標的イメージングから分子標的放射線内用療法への展開

研究課題名（英文） Development of molecular target radiation therapy from molecular target imaging

研究代表者

間賀田 泰寛 (MAGATA YASUHIRO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授

研究者番号：20209399

研究成果の概要（和文）：本研究は、近年盛んに研究が進んでいる分子標的治療薬のがん特異性を、低分子放射線内用療法薬の薬物送達機構に適用し、同時にイメージング核種で標識することで、治療前に治療効果予測を行いながら、放射線治療を可能とする薬剤開発を行うという試みである。本研究では EGFR-TK を分子標的とするイメージング剤として開発中の PYK を用いて検討した。その集積量から、更なる集積か、非標的組織との高い取込比が得られれば、放射線内用療法として可能性があるものと考えられた。本研究により、分子標的低分子放射線内用療法剤開発の方向性を示すことが出来た。

研究成果の概要（英文）：This study is a trial to develop a novel concept which makes molecular target drug for cancer enable radiation therapy. This concept can allow not only molecular target imaging and also molecular target radiation therapy. In this study, we use our new molecular imaging compound, PYK for EGFR-TK. This compound has a great potential for in vivo imaging for EGFR-TK. In conclusion, molecular target radiation therapy might be achieved although additional compounds are required to improve target uptake or target to non-target ratio.

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：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：放射線内用療法、分子標的薬、イメージング、放射性医薬品、がん

1. 研究開始当初の背景

がん治療においては種々の方法が選択可能となっている。放射線治療はその一つであるが、外科的手技が無いか少ないこともあり、患者の QOL 向上の面からも近年は高い注目を集めている。放射線治療の方法として外部より放射線を当てる外照射療法と治療用の核種で標識された放射性物質を投与し、がんを選択的に集積させて放射線療法を行う内照射療法とがある。内照射療法は大型の機器

を必要とせず、治療薬を購入して投与すれば可能となる利点があり、放射線量によっては外来での治療の可能性もある。このためには高い選択性をもって対象部位に集積することが重要であり、薬物送達技術が必要となる。また、近年のがん化学療法も従来の抗がん剤からガン選択的に発現する分子を標的とする分子標的薬が注目され、Gefitinib のように一部は臨床応用も行われている。この分子標的薬は利用の対象者を選別することが重要

であるが、申請者らはこれまで Gefitinib をモデル化合物として、Gefitinib 感受性を有する変異型 EGFR-TK のイメージング剤開発を行い、非感受型との鑑別に有用な薬剤である PYK を見出している (図1~3)。

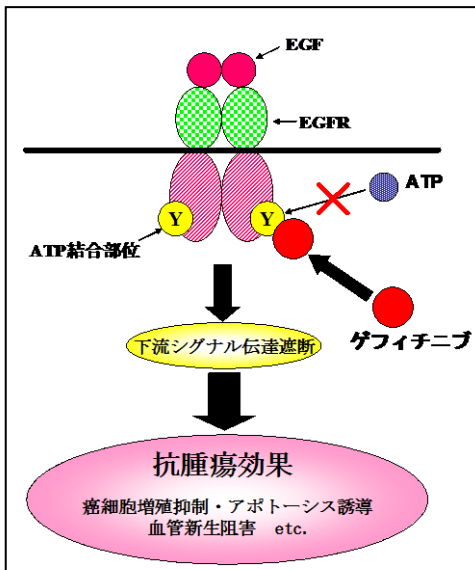


図1 EGFR-TK を分子標的とする分子標的治療薬 Gefitinib

このような背景から、本申請では分子標的イメージング薬の開発とその治療用核種標識薬剤を開発することで、特異的に治療可能な患者鑑別と、がん内用放射線療法が可能となるのではないかと着想し、その実用性について種々基礎的検討を必要とすることから挑戦的萌芽として申請したものである。

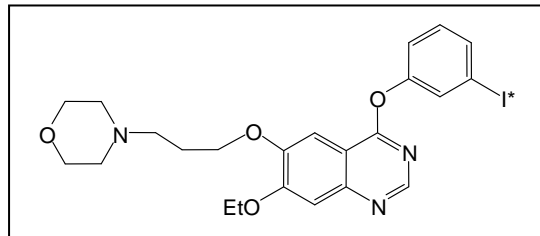


図2 EGFR-TK を分子標的とする分子標的イメージング剤、PYK の構造式

2. 研究の目的

本研究は、近年盛んに研究が進んでいる分子標的治療薬のがん特異性を、低分子放射線内用療法薬の薬物送達機構に適用し、同時にイメージング核種で標識することで、治療前に治療効果予測を行いながら、放射線治療を可能とする薬剤開発を行うという試みである。これまで分子標的を低分子放射線内用療法薬の集積目標として利用するという試みはなく、成功すれば多くの分子標的に対して活用可能である。治療開始前にイメージングにより対象患者を選択することが可能であり、患者個々人の腫瘍の性質に応じて適用の

可否を決定可能であることから、テーラーメイド医療としても有用性が高いものと期待される。

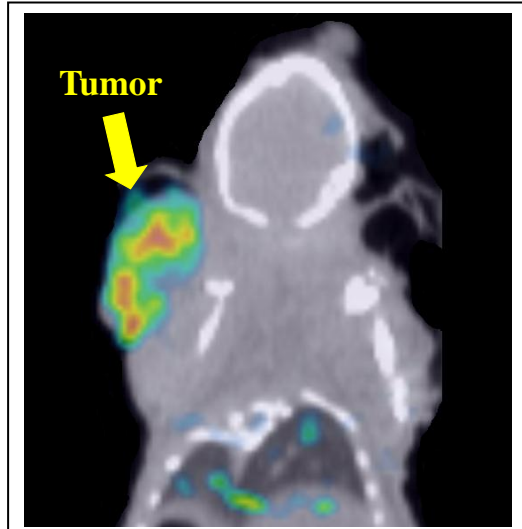


図3 I-125-PYK によるがんの SPECT イメージング

3. 研究の方法

放射性ヨウ素標識 PYK の合成

密栓バイアル中で PYK のトリブチルスズ前駆体 (25 μ l, 0.5mg/ml エタノール溶液) に 0.1M 塩酸 (25 μ l)、放射性ヨウ化ナトリウム、30w/v% 過酸化水素水 (10 μ l) を順次加え、室温で 15 分間反応させた。目的物をメタノール/0.01M クエン酸水溶液 (55:45, v/v) を移動層とした HPLC にて分離精製した。標識化合物の放射化学的純度は 95% 以上であった。

担癌マウスにおける体内分布評価

これまで行ってきたイメージング研究では生体内の各部位への放射能集積に関する詳細な情報が不足しており、治療量の放射能を投与した際の、副作用発現程度の子測が出来なかった。そこで、解剖法により、全身での放射能集積量を評価することとし、担癌マウスにおける体内分布評価を行った。

癌細胞を培養し、コンフルエント状態に達したものをトリプシン処理し、細胞を採取した。細胞は 10%FCS RPMI1640 培地に懸濁し、200 μ l 当たり 1×10^7 個になるように細胞を調製した。得られた細胞懸濁液 200 μ l を生後 4 週間の BALB/c-nu 系雄性ヌードマウス (20~25g) の大腿部に皮下注射し 2~4 週間、飼育した。癌細胞担癌マウスに放射性標識 PYK (18.5kBq/100 μ l) を尾静脈より投与し、24 時間後に屠殺後、癌および各臓器を採取し、重量並びに放射能を測定比較した。測定結果より各臓器 1g 当たりの放射能を全投与量に対するパーセント (% dose/g tissue) として算出し、各組織・臓器への集積について比較

検討した。

PYK 誘導体の合成

PYK の母体構造であるイレッサは図 4 に示すようなキナゾリン骨格を有しており、これにヨウ素導入を行ったものが PYK である。特に図 4 の構造における 6 位に置換基を導入することにより、EGFR-TK に対する親和性が変化することが知られている。PYK はここにモルフォリンプロピルを導入した構造であるが、体内動態の改善を目的として、モルフォリンエチル、ピペラジン、ジメチルアミノプロピル、イソプロピル等の置換基を導入した各種誘導体の合成を行った。

各種癌細胞の EGFR-TK に対する結合特性

各種癌細胞膜画分を 25mM HEPES buffer に懸濁し、EGF 添加後 25°C 10 分間インキュベートした。次いで、全結合量を測定するために 10%DMSO 溶液を、非特異的結合量を測定するために PD153035 (final 10 μ M) をそれぞれ 100 μ l 加えた。さらに、放射性ヨウ素標識 PYK 10%DMSO 溶液 50 μ l 及び final 1nM~100nM となるように調製した非標識 PYK を 50 μ l 加えて全量 1ml とし、25°C で 60 分間インキュベートした。反応終了後、直ちに反応液を 0.5%ポリエチレンイミン溶液に 30 分間以上浸した GF/B フィルターを用いて吸引濾過し 0.05%Triton-X100 0.2mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 3ml でフィルターとチューブを洗浄した。 γ カウンターでフィルターの放射能を測定し、全結合量と非特異的結合量を求め、全結合量と非特異的結合量の差を特異的結合量とした。得られた特異的結合量曲線から Scatchard 解析法により、親和性を評価した。

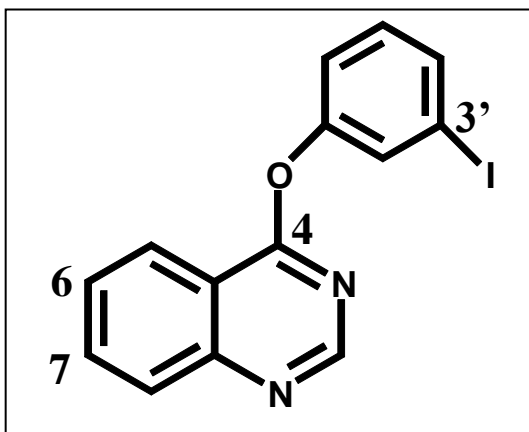


図 4 キナゾリン骨格の構造特異性：特に 6 位の部位に側鎖を結合することで、EGFR-TK に対する親和性が変化することが知られている。

4. 研究成果

本研究は、近年盛んに研究が進んでいる分子標的治療薬のがん特異性を、低分子放射線内用療法薬の薬物送達機構に適用し、同時にイメージング核種で標識することで、治療前に治療効果予測を行いながら、放射線治療を可能とする薬剤開発を行うという試みである。これまで分子標的を低分子放射線内用療法薬の集積目標として利用するという試みはなく、成功すれば多くの分子標的に対して活用可能であり、テーラーメイド医療としても有用性が高いものと期待される。本研究では EGFR-TK を分子標的とするイメージング剤として開発中である PYK を用いることとして検討を行った。

放射性標識 PYK を合成し、担癌マウスに投与し、投与 4 時間後における体内動態を評価した結果を表に示す。各がん細胞は EGFR-TK を発現していることが知られており、その発現量に応じた放射能の取り込みを示した（詳細は略）。投与 4 時間後では血中放射能はクリアランスされており、高いガン/血液比を得ることが可能であると考えられた。しかしながら、肝臓への高い取込が認められ、肝臓内で代謝されることにより、放射能が腸管へ排出されることが示された。なお、胃への集積は高くなく、生体内での脱ヨウ素化は認められなかった。

この結果より、内用療法として I-131 標識体を投与するためには、腸管内粘膜への放射線被曝を低減させるため、腸管内への放射能を減少させる必要があると考えられた。そこで、標的分子への集積を低減させず、体内動態を制御することを目的として、種々の化合物を合成した。その結果、ピペラジン誘導体が PYK と同様の EGFR-TK に対する親和性を有することが認められた。そこで放射性ヨウ素標識し、インビボ担癌マウスでの体内動態を検討したところ、その取込は PYK の約 70% であった。しかしながら、がんからの早いクリアランスが認められ、腫瘍治療用内用剤としては不適であることが示された。

以上のように分子標的の内用療法剤に関する検討を行った結果、更なる集積か、非標的組織との高い取込比が得られれば、放射線内用療法として可能性があるものと考えられた。今後の開発の方向性を本研究により得ることが出来たことは重要な成果と考えられる。これに基づき、今後更に研究を進展させ、分子標的放射線内用療法治療薬の開発を推進する予定である。

Tissue	PC-9	H1650	H1975	A549
Tumor	3.10±0.26	1.88±0.37	2.15±0.35	1.84±0.07
Blood	0.37±0.06	0.33±0.01	0.33±0.06	0.37±0.04
Pancreas	2.12±0.28	2.09±0.21	1.82±0.21	2.32±0.19
Spleen	1.33±0.09	1.43±0.20	1.29±0.17	1.61±0.05
Stomach	2.87±0.73	3.29±1.87	1.12±0.30	2.84±1.50
Small intestine	3.92±1.23	5.07±2.75	3.08±0.74	6.35±4.36
Large intestine	2.53±0.41	3.06±1.30	2.51±0.25	2.63±0.84
Liver	12.6±2.15	10.0±1.58	9.82±1.31	12.1±1.55
Kidney	5.39±0.62	5.02±0.55	4.02±0.26	5.75±0.73
Heart	0.80±0.13	0.76±0.07	0.69±0.05	0.80±0.10
Lung	2.27±0.64	2.54±0.91	1.79±0.45	3.05±0.29
Brain	0.30±0.04	0.28±0.05	0.22±0.07	0.28±0.01
Muscle	0.79±0.10	0.62±0.09	0.91±0.17	0.85±0.08

*Mean % injected dose±S.D. per gram of three mice

表 各種担癌モデルにおける PYK 投与 4 時間後の体内分布

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間賀田 泰寛 (MAGATA YASUHIRO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研

究センター・教授

研究者番号：20209399

(2) 研究分担者

阪原 晴海 (SAKAHARA HARUMI)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：10187031

堺 俊博 (SAKAI TOSHIHIRO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研

究センター・特任研究員

研究者番号：40585098