

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591824

研究課題名(和文)国内全域のPET施設に配達可能な新しいがん診断薬剤の開発

研究課題名(英文)Development of novel PET tracers with long half-lives using for tumor diagnosis

研究代表者

飯田 靖彦 (IIDA, YASUHIKO)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60252425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：従来のポジトロン核種より長い半減期を有するPET診断薬の開発は、核種の製造から撮像までの時間的制約の緩和やサイクロトロン未設置施設におけるPET診断の利用拡大に貢献する。本研究では、半減期12.8時間の<sup>64</sup>Cuを利用したがん診断薬開発を計画し、光線力学的治療に用いられるHematoporphyrin (HP)を母体として、種々の機能性修飾基を導入した<sup>64</sup>Cu標識HP誘導体を設計、合成し、その基礎的性質、臨床的有用性を評価した。

研究成果の概要(英文)：For positron emission tomography (PET) diagnosis, we usually use four  $\beta^+$  emitters, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, and <sup>18</sup>F. However, these radionuclides cannot allow us to take enough time of radiopharmaceuticals synthesis, preparation or delivering due to their short half-lives from 2 to 110 minutes. Therefore, the development of novel PET tracers with longer half-lives would be contributed to releasing from such time restrictions and enlarging PET utilities. <sup>64</sup>Cu is a  $\beta^+$  emitter with long half-life (12.8hr) and it has a suitable property for labeling of various PET tracers. In this study, we planned to develop novel PET tracers labeled with <sup>64</sup>Cu using for tumor diagnosis, and synthesized <sup>64</sup>Cu labeled Hematoporphyrin (HP) and its derivatives (HPDs). Hematoporphyrin has been widely used as photosensitizer in photodynamic therapy and can specifically accumulate in tumors. We evaluated their potentials as PET tracers for tumor diagnosis in mice bearing MDA-MB-231 human breast cancer cells.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：PET診断 がん診断 ヘマトポルフィリン 放射性薬剤

1. 研究開始当初の背景

PET (ポジトロン断層画像) は SPECT (シングルフォトン断層画像)、シンチカメラに比べ定量性、解像度の点で優れているが、現在 PET で用いられている放射性核種 (RI) はいずれも半減期が短く ( $^{18}\text{F}$ : 110 分、 $^{15}\text{O}$ : 2 分、 $^{13}\text{N}$ : 10 分、 $^{11}\text{C}$ : 20 分) その利用にはサイクロトロンを必要とするなど汎用性の点で劣っている。それ故 PET は研究的色彩の強い診断技術として発展してきたが、近年、がん診断における  $^{18}\text{F}$  標識グルコース ( $^{18}\text{F}$ FDG) の有用性が明らかとなり、PET の利用に対する関心が高まっている。 $^{18}\text{F}$ FDG は、がんの良悪性の鑑別、病期の判定、転移の有無、さらには治療効果の判定や再発の有無などを調べる上で有効であり、FDG-PET 検査の保険適用とともに多数の施設で PET およびサイクロトロンが導入された。さらに製薬企業による  $^{18}\text{F}$ FDG の供給が開始され、PET のみを設置し、診断を行う施設も増加している。一方で、やはり半減期が短いことから  $^{18}\text{F}$ FDG を供給できる範囲は限定されており、安定した PET 用薬剤の供給には問題が残る。

これに対し、 $^{64}\text{Cu}$  は半減期 12.7 時間で臨床利用する上で適した半減期を有する (現在臨床で広く用いられている  $^{123}\text{I}$  の半減期は約 13 時間) ポジトロン放出核種であり、新しい PET 用放射性薬剤の開発に適した RI であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、半減期 12.7 時間の  $^{64}\text{Cu}$  を利用したがん診断用 PET 薬剤開発のため、光線力学的治療に用いられるヘマトポルフィリン (HP) およびその誘導体を  $^{64}\text{Cu}$  で標識した  $^{64}\text{Cu}$ -HP 誘導体 ( $^{64}\text{Cu}$ -HPDs) を合成し、その物理化学的性質を調べるとともに、担がんモデルマウスを用いた動物実験により  $^{64}\text{Cu}$ -HPDs のがん集積性などの基礎的な性質を明らかにすることを計画した。さらに  $^{18}\text{F}$ FDG などでは診断が困難ながん、炎症との鑑別診断への適用性を調べ、臨床的有用性について検討することとした。

3. 研究の方法

(1) HPLC を用いてヘマトポルフィリン (HP) を精製し、この HP 5 - 10 mg に  $^{64}\text{Cu}$  約 250 MBq を加え、40 °C で 1.5 時間反応し、 $^{64}\text{Cu}$ HP を合成した。MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞、LS180 ヒト結腸がん細胞、SCC-7 マウス扁平上皮がん細胞を培養し、ヌードマウスの腹側部に移入し、腫瘍が約 1 cm に成長するのを待って (2 - 3 週間)  $^{64}\text{Cu}$ HP を尾静脈より投与し、24 時間後に動物用高分解能 PET 装置を用いて撮像実験を実施した。PET 撮像実験の後、臓器摘出法により  $^{64}\text{Cu}$ -HP の腫瘍集積性について予備的な検討を行った。

(2) HP の物性改善のため、アスパラギン酸 (Asp) を用いて HP を修飾した化合物

(HP-diAsp) および 2 種の HP 誘導体 HP-diTRIS amide ならびに HP-diTRIS ester を新規合成した (図 1)。前者は、HP を dioxane/ $\text{H}_2\text{O}$  に溶解し、 $\text{Et}_3\text{N}$  塩基性条件下、DMT-MM を用いて  $\text{H}_2\text{N}$ -Asp(OMe)-OMe と縮合し、NaOH によるエステルけん化後、HPLC にて精製することにより得た。後者は、まず HP と trimethylsilyl (TMS) 保護 tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) を DMT-MM を用いて縮合し、TMS 基の脱保護、HPLC 精製を行い HP-diTRIS amide を得た。次いで HP-diTRIS amide を酸触媒下、分子内転位反応により HP-diTRIS ester へと誘導した。誘導化による物性改善効果を評価するため、HP および HP 誘導体 (HPDs) の PBS (pH 7.4) における溶解度、LogD7.4 および血清タンパクとの結合率 (PB%) を測定した。さらに  $^{64}\text{Cu}$  を用いて  $^{64}\text{Cu}$ -HPDs を標識合成し、MDA-MB-231 移入マウスに投与し、43 hr 後に PET 撮像法および臓器摘出法による体内分布評価を行った。

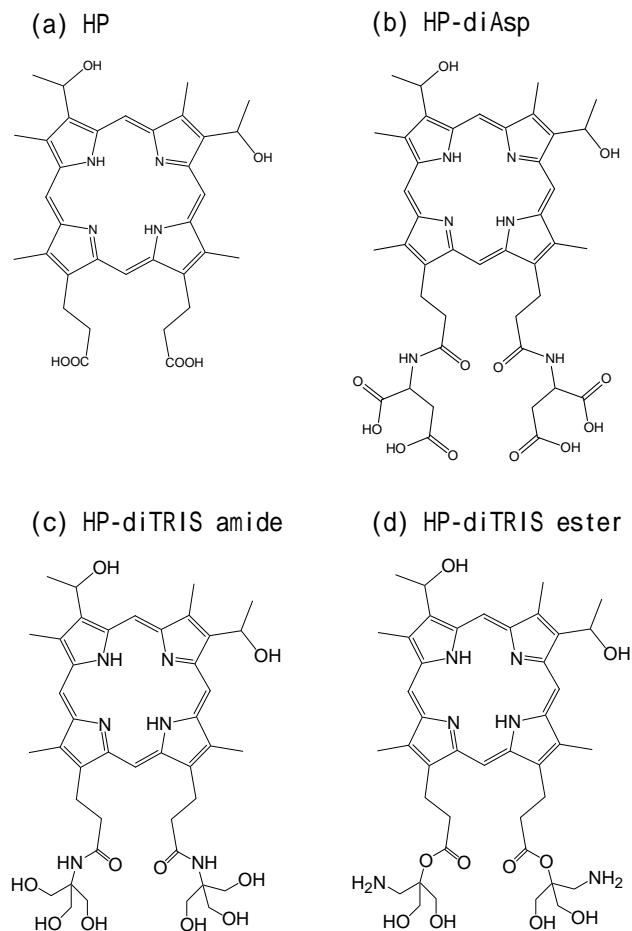


図 1  $^{64}\text{Cu}$ -HPDs の構造

(3) 水溶性で、かつ腫瘍集積量の増加が期待できる RGD peptide を用いて HP を修飾した RGD 修飾 HP 誘導体、[RGDK-ED] $_2$ -HP、[(RGD) $_2$ K-ED] $_2$ -HP および c[RGDFK] $_2$ -HP を設計、合成した。HP の修飾に必要な保護ペプチドは、

Fmoc 固相ペプチド合成法によって 2-Cl-Trt resin 上でペプチド伸長を行ったのち、保護基を保持した状態で resin より解離し、Boc-R(Pbf)GD(tBu)K-OH および [Boc-R(Pbf)GD(tBu)]<sub>2</sub>K-OH を得た。また、側鎖保護ペプチドを resin から解離後、液相中で環化反応および選択的脱保護を行うことで、c[R(Pbf)GD(tBu)-fK] を合成した。次いで、これらの保護ペプチドを ethylenediamine スペースを有する HP 誘導体 (HP-ED<sub>2</sub>) または HP と縮合したのち、脱

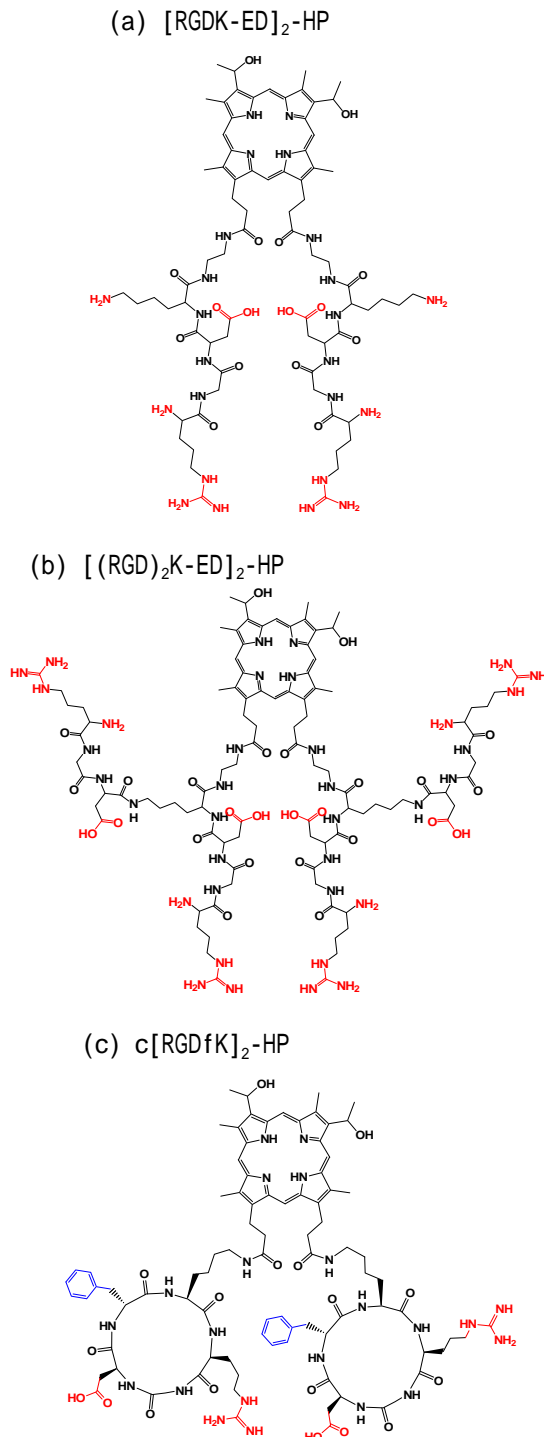


図 2 RGD 修飾 HP 誘導体の構造

保護、HPLC 精製過程を経て、目的とする RGD peptide 修飾 HP 誘導体を得た (図 2)。これらの物性を検討するため、PBS (pH 7.4) における溶解度、LogD7.4 およびマウス血清中における安定性を評価した。また各々の誘導体の血清タンパク結合率の測定、<sup>64</sup>Cu による標識条件の検討を実施した後、<sup>64</sup>Cu 標識体を MDA-MB-231 移入マウスに投与し、経時的に PET 撮像を行うとともに、臓器摘出法により各臓器への <sup>64</sup>Cu 分布を調べ、腫瘍集積性を評価した。

(4) 近年その有用性が報告されている microwave 合成装置を用いて [RGDK-ED]<sub>2</sub>-HP、[(RGD)<sub>2</sub>K-ED]<sub>2</sub>-HP、c[RGDfK]<sub>2</sub>-HP の標識法を検討した。得られた 2 種の高比放射能体 (<sup>64</sup>Cu-HP および <sup>64</sup>Cu-c[RGDfK]<sub>2</sub>-HP) を MDA-MB231 移入マウスに投与し、体内分布実験、PET 撮像実験を行った

#### 4. 研究成果

(1) 精製した HP 5 - 10 mg に <sup>64</sup>Cu 約 250 MBq を加え、加熱反応により <sup>64</sup>Cu-HP を標識率 90 - 95% で得た (図 3)。

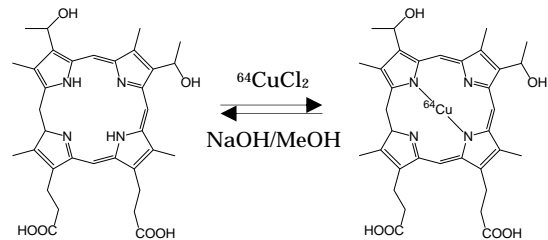


図 3 <sup>64</sup>Cu-HP の標識反応

MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞、LS180 ヒト結腸腺がん細胞、SCC-7 マウス扁平上皮がん細胞をヌードマウスの腹側部に移植し、<sup>64</sup>Cu-HP を尾静脈より投与し、24 時間後に PET 撮像実験を実施した結果、いずれのがん細胞においても <sup>64</sup>Cu-HP の集積が認められ、<sup>64</sup>Cu-HP を用いたがん診断の可能性が示された (図 4)。しかしながら HP は溶解度が低く、注射剤と

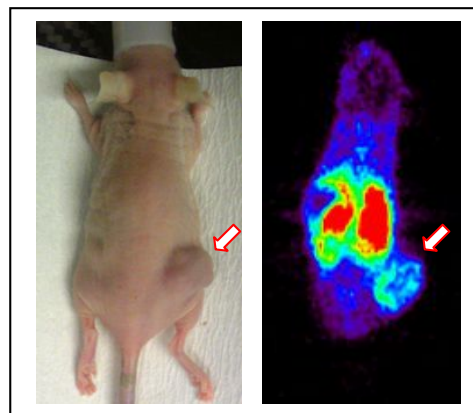


図 4 <sup>64</sup>Cu-HP 投与 24 時間後の PET 画像

して投与が困難であること、また肝臓への高い集積を認めたことから、物理化学的性質の改善を目的とした誘導体の開発が必要と考えられた。

(2) HP-diAsp は収率 29.6%で、HP-diTRIS amide は収率 21.1%で得られた。HP-diAsp、HP-diTRIS ester は各々溶解度がHPの約8倍となり、水溶性が改善された。HP-diTRIS amide の水溶性はHPと同程度であったが、血液中のタンパク結合を調べたところ、フリーの割合がHPの約4倍に上昇していた(図5)。

	HP	HP-diAsp	HP-diTRIS amide	HP-diTRIS ester
溶解度(μg/mL) pH7.4 PBS	522±41	4139±642 (×7.9)	192±47 (×0.37)	4337±350 (×8.3)
LogD <sub>7.4</sub> (1-Octanol/PBS)	1.02±0.01	-2.53±0.09	1.563±0.02	1.193±0.05

図5 <sup>64</sup>Cu-HPDsの物性

各々を<sup>64</sup>Cuで標識し、臓器摘出法により腫瘍集積性を調べた結果、HP-diAspで腫瘍/血液比、腫瘍/筋肉比が改善されたが(図6)、同時に骨への高い集積を認め、より腫瘍特異的、選択的な性質を付加することで腫瘍への集積性を高める必要があると考えられた。

	(a) HP	(b) HP-diAsp	(c) HP-diTRIS amide	(d) HP-diTRIS ester
腫瘍/血液比	2.54	5.00	2.37	2.50
腫瘍/筋肉比	4.48	5.63	5.45	3.44

図6 造臓器摘出法による腫瘍/血液比、腫瘍/筋肉比の検討結果

(3) 得られた3種類の誘導体([RGDK-ED]<sub>2</sub>-HP、[(RGD)<sub>2</sub>K-ED]<sub>2</sub>-HP、c[RGDFK]<sub>2</sub>-HP)はいずれも高い水溶性と血清中での安定性、また低いタンパク結合率など有望な性質を示したが(図7)、<sup>64</sup>Cuの標識率が大きく低下した。ヒト乳がん細胞(MDA-MB-231)移入マウスを用いて<sup>64</sup>Cu標識体の体内分布を調べたところ、<sup>64</sup>Cu-HPと同程度の腫瘍集積量を示すにとどまり、期待した結果は得られなかった(図8)。これは標識率を上げるため標識に用いる誘導体の量を大

	[RGDK-ED] <sub>2</sub> -HP	[(RGD) <sub>2</sub> K-ED] <sub>2</sub> -HP	c[RGDFK] <sub>2</sub> -HP
溶解度(μg/mL) pH 7.4	3,956 ± 145 (×7.6)	4,299 ± 334 (×8.2)	558 ± 53
LogD <sub>7.4</sub> (1-Octanol/PBS)	< -4.00	< -4.00	-1.16 ± 0.03

図7 RGD修飾HP誘導体の物性

	%dose/g (Mean±S.D.)		
	HP (48 hr), n=5	HP-diAsp (43 hr), n=1	c[RGDFK] <sub>2</sub> -HP (43 hr), n=3
腫瘍	0.78±0.08	0.45	0.93±0.15
血液	0.33±0.03	0.09	0.23±0.01
肝臓	2.65±0.21	2.32	8.97±0.14
腎臓	2.15±0.10	3.09	11.62±1.00
腸	0.92±0.08	0.44	1.10±0.16
筋肉	0.20±0.01	0.08	0.50±0.06
腫瘍/血液	2.36	5.06	4.08
腫瘍/筋肉	3.90	5.72	1.85

図8 RGD修飾HP誘導体の体内分布結果

幅に増やしたことで、溶液中に未標識の誘導体量が増加し、腫瘍組織での<sup>64</sup>Cu標識体の取込みを阻害したものと考えられた。標識条件を精査し、高比放射能体を合成することで腫瘍組織への<sup>64</sup>Cu標識体の取込み量の改善を図る必要性が示された。

(4) microwave合成装置による標識法を検討した結果、<sup>64</sup>Cuを効率的に導入することに成功し、HPおよびc[RGDFK]<sub>2</sub>-HPの高比放射能体を得ることができた。この<sup>64</sup>Cu-HPおよび<sup>64</sup>Cu-c[RGDFK]<sub>2</sub>-HPをMDA-MB231移入マウスに投与し、体内分布実験、PET撮像実験を行ったところ、両化合物ともに投与40時間後においても腫瘍に高い集積を認める一方、腫瘍/血液比および腫瘍/筋肉比は比放射能に関係なく同程度の値を示した。<sup>64</sup>Cu-c[RGDFK]<sub>2</sub>-HPは低比放射能化合物投与時に比べ、高比放射能化合物投与時に腫瘍への<sup>64</sup>Cu集積量が増加する結果となった(図8)。高比放射能<sup>64</sup>Cu-c[RGDFK]<sub>2</sub>-HPを用いることで腫瘍への<sup>64</sup>Cu集積量を増し、PET撮像において腫瘍を明瞭に描写できることを確認した。

	% dose/g (Mean±S.D.)	
	<sup>64</sup> Cu-HP (40 hr, n=2)	<sup>64</sup> Cu-c[RGDFK] <sub>2</sub> HP (41 hr, n=2)
腫瘍	0.68±0.01	1.65±0.20
血液	0.25±0.01	0.38±0.10
肝臓	9.30±0.75	16.83±3.20
腎臓	1.94±0.09	8.84±1.49
腸	1.33±0.10	2.34±0.19
筋肉	0.13±0.00	0.83±0.30
腫瘍/血液	2.74	4.32
腫瘍/筋肉	5.14	1.99

図8 高比放射能体の体内分布結果

以上の結果は、がん診断における<sup>64</sup>Cu-HPDsの有用性を示すものであり、今後さらに診断能の優れた薬剤の開発を進める予定である。また<sup>64</sup>Cuの利用は、現在多くの施設で<sup>18</sup>F PET専用となっているPET装置の利用拡大に道筋をつけるものであり、比較的半減期の長いポジトロン核種の有用性を示すものとして評価できる。本研究は、PET診断薬の時間的制約の緩和やPET診断の利用拡大に一定の成果

を上げたものと考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Yoshioka H, Yamamoto S, Hanaoka H, Iida Y, Paudyal P, Higuchi T, Tominaga H, Oriuchi N, Nakagawa H, Shiba Y, Yoshida K, Osawa R, Katagiri T, Tsunoda T, Nakamura Y, Endo K. In vivo therapeutic effect of CDH3/P-cadherin-targeting

radioimmunotherapy. Cancer Immunol. Immunother., 61, 1211-20 (2012) 査読有.

2. Michael Farwell, Derek Chong, Yasuhiko Iida, Sung A Bae, Balu Easwaramoorthy, Masanori Ichise. Imaging P-glycoprotein Function in Rats Using [<sup>11</sup>C]-N-desmethyl-loperamide. Ann. Nucl. Med. 27, 618-624. (2013) 査読有.

3. Yamaguchi A, Hanaoka H, Fujisawa Y, Zhao S, Suzue K, Morita A, Tominaga H, Higuchi T, Hisaeda H, Tsushima Y, Kuge Y, Iida Y. Differentiation of malignant tumours from granulomas by using dynamic [<sup>18</sup>F]-fluoro-L- -methyltyrosine positron emission tomography. EJNMMI Res. 5, 29, (2015) DOI 10.1186/s13550-015-0109-z. 査読有.

〔学会発表〕(計 3 件)

中須賀彩、藤澤豊、峰田麻衣子、山口藍子、富永英之、樋口徹也、対馬義人、橋本和幸、永井泰樹、飯田靖彦、「DA-MB-231 移入マウスにおける<sup>64</sup>Cu 標識ヘマトポルフィリンの腫瘍集積性評価」、第 59 回日本薬学会東海支部大会、2013 年 7 月 6 日、名城大学(名古屋市)

藤澤豊、峰田麻衣子、中須賀彩、山口藍子、富永英之、樋口徹也、対馬義人、橋本和幸、永井泰樹、飯田靖彦、「ヒト乳腺がん細胞移入マウスにおける<sup>64</sup>Cu 標識 Hematoporphyrin 誘導体の腫瘍集積性評価」、薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本大学(熊本市)

Fujisawa Y., Iida Y., Tumor imaging with <sup>64</sup>Cu labeled Hematoporphyrin derivatives in MDA-MB-231 bearing mice、EANM'14 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine、2014 年 10 月 20 日、Gothenburg, Sweden

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯田 靖彦 (IIDA YASUHIKO)  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授  
研究者番号：60252425

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

藤澤 豊 (FUJISAWA YUTAKA)  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手  
研究者番号：30511993