

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791316

研究課題名(和文)細胞内トラップ機構に基づく新規68Ga標識腫瘍イメージング剤の開発

研究課題名(英文)Development of novel 68Ga labeled tumor imaging agents based on cell trapping mechanism.

研究代表者

淵上 剛志 (FUCHIGAMI, Takeshi)

長崎大学・医歯学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：30432206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：サイクロトロンを必要としないPET用68Ga標識腫瘍イメージング剤の開発を目指し、細胞内トラップ機構に基づいて集積する葉酸受容体(FR)を標的とした低分子イメージング剤の設計、合成及び評価を行った。FRアゴニストを基本骨格とした67/68Ga-NOTA-NCS-FLおよびFRアンタゴニストを基本骨格とした67/68Ga-NOTA-NCS-TPを合成し、FRを高発現しているKB細胞への結合飽和実験および取り込み実験を行ったところ、67/68Ga-NOTA-NCS-TPの方が親和性、取込率が高く、従来のアゴニスト型FRイメージング剤に対する優位性が示された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop novel 68Ga labeled tumor imaging agents which can be produced without cyclotron. We have designed, synthesized and evaluated 68Ga labeled agents targeting folate receptor (FR), which can be internalized by cell trapping. We synthesized a FR agonist based 67Ga-NOTA-NCS-FL and an antagonist based 67Ga-NOTA-NCS-TP. In the saturation binding experiments and in vitro uptake experiments, 67Ga-NOTA-NCS-TP showed higher binding affinity and uptake efficiency than those of 67Ga-NOTA-NCS-FL. Accordingly, 67/68Ga-NOTA-NCS-TP can be a prospective tumor imaging agent targeting FR.

研究分野：放射線科学

キーワード：PET 68Ga ジェネレータ 腫瘍 葉酸受容体

### 1. 研究開始当初の背景

$^{18}\text{F}$ FDG は、腫瘍の糖代謝能が亢進していることを利用して、全身におけるがんの検出や治療効果の判定が行える優れた PET 薬剤であるが、脳や心臓及び膀胱などへの生理的な集積のため、それらの組織や周辺部位では正確ながん診断が困難になることがしばしば問題となる。そこで、核酸誘導体の  $^{18}\text{F}$ FLT (3'-Deoxy-3'-fluorothymidine) やアミノ酸誘導体の  $^{11}\text{C}$ メチオニン等が開発され、脳腫瘍などの診断において  $^{18}\text{F}$ FDG の弱点を補える PET 薬剤として臨床使用されている。しかしながら、2011 年現在、日本における PET 施設数は、284 施設に上るものの、そのうち  $^{11}\text{C}$  や  $^{18}\text{F}$  等の PET 核種を製造できるサイクロトロンを有する施設は 139 に留まり、残り半数以上の 145 施設は主に  $^{18}\text{F}$ FDG のみを購入して診断に用いているのが現状である。そこでサイクロトロンを持つ PET 施設のみならず、持たない施設においてもがん診断における適応範囲の拡大やがん診断の精度向上を支援するため、サイクロトロンを必要とせず、ジェネレータシステムにて  $^{68}\text{Ge}$  (半減期 270.8 日) より製造できるポジトロン放出核種  $^{68}\text{Ga}$  (半減期 67.7 分) にて標識した新規腫瘍イメージング剤の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

$^{68}\text{Ga}$  は半減期が約 1 時間であるため、速やかな腫瘍への集積性と正常組織からの消失が望まれており、これまでに、腫瘍のペプチド受容体を標的とした  $^{68}\text{Ga}$  標識リガンドの開発が盛んに行われてきたが、保険適応された  $^{68}\text{Ga}$  標識放射性薬剤は未だ得られていない。そこで本研究では、ペプチド性分子とは異なった機構にて腫瘍組織に集積する新規腫瘍イメージング剤の開発を目指し、多くのがん細胞に高発現している葉酸受容体 (FR) に着目し、FR に結合することで、腫瘍組織の細胞内にトラップされる新規  $^{68}\text{Ga}$  標識低分子イメージング剤の設計、合成及び基礎的評価を行い、臨床応用への可能性を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

FR アゴニストの葉酸を基本骨格とした  $^{67/68}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-FL および FR アンタゴニストを基本骨格とした  $^{67/68}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-thieno pyrimidine 誘導体 ( $^{67/68}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-TP) の設計 (図 1) 及び NOTA 前駆体の合成をそれぞれ行った後、 $^{67/68}\text{Ga}$ -citrate を用いて  $^{67/68}\text{Ga}$  標識合成を行った。 $^{67}\text{Ga}$  標識リガンドを用いて、FR を高発現している KB 細胞への結合飽和実験および取り込み実験 (30, 60, 120, 240 分) を行った。さらに、KB 細胞を移植した担癌マウスを作成し、 $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-FL (2.0 MBq) を投与した後、Triumph (Trifoil Imaging Inc.) にて PET 撮像を行った。

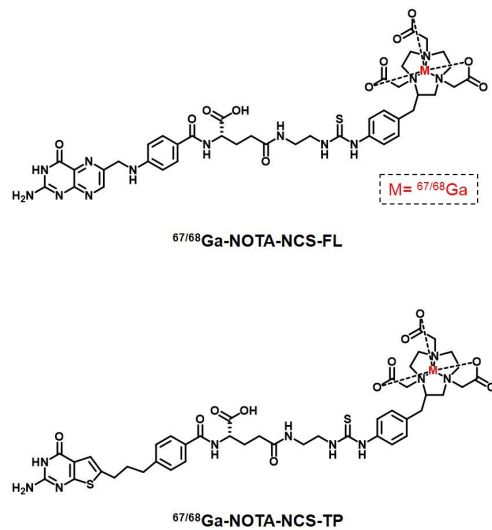


図 1  $^{67/68}\text{Ga}$  標識 FR イメージング剤の設計

### 4. 研究成果

$^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-FL および  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-TP は、NOTA 前駆体をそれぞれ合成した後 (図 2)、 $^{67}\text{Ga}$ -citrate あるいは当研究室にて開発した  $^{68}\text{Ge}$  -  $^{68}\text{Ga}$  ジェネレータシステムより製造した  $^{68}\text{Ga}$ -citrate を用いて  $^{67/68}\text{Ga}$  標識合成を行い、95%以上の純度で目的物を得た。

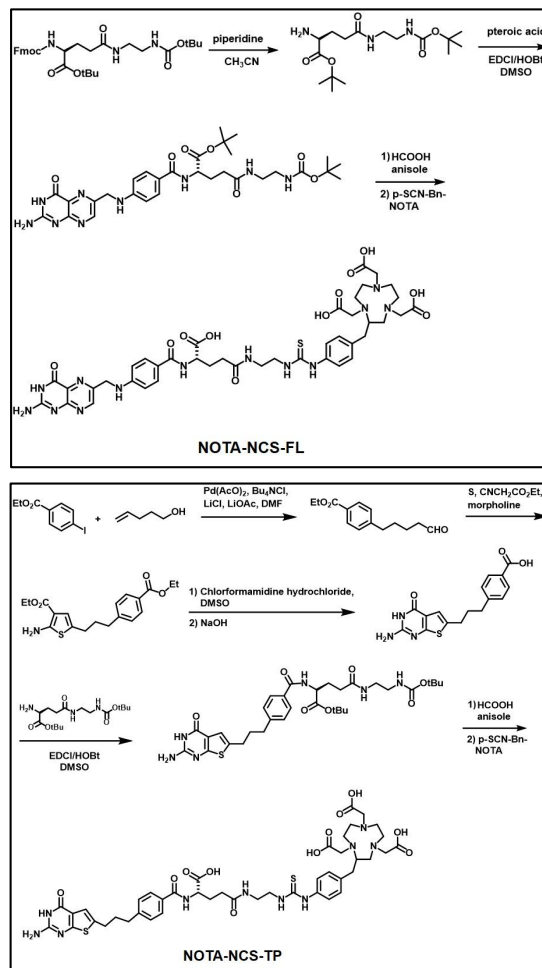


図 2  $^{67/68}\text{Ga}$  標識リガンドの標識前駆体の合成経路

KB 細胞を用いた結合飽和実験を行ったところ、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-folate および  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-TP は、いずれも濃度の上昇に伴い、結合飽和が観察され、one-binding site model にて解析したところ、直線性の Schatchard plot が得られた (図 2)。本解析手法にて、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-FL は、 $K_d$  値が  $42.3 \pm 4.49$  nM,  $B_{\text{max}}$  値が  $16.4 \pm 1.52$  pmol/mg protein と算出された。一方、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-TP は、 $K_d$  値が  $27.5 \pm 2.25$  nM,  $B_{\text{max}}$  値が  $80.8 \pm 34.4$  pmol/mg protein と算出された。続いて、FR を高発現している KB 細胞への取り込み実験 (30, 60, 120, 240 分) を行ったところ、いずれの  $^{67}\text{Ga}$  標識リガンドも KB 細胞へ 20% 以上の高い取り込み率を示し、時間経過とともに集積が向上した。また、folate 同時処置により  $^{67}\text{Ga}$  標識リガンドの集積が大幅に減少したことから、FR 選択的な取り込みであることが確認された。 $^{67}\text{Ga}$  リガンド処置後 240 分の取り込み率は、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-folate が 30% 程度であったのに対して、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-TP は約 50% まで上昇した (図 4)。以上の *in vitro* 評価より、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-TP の方が FR イメージング剤として有望であることが示唆された。

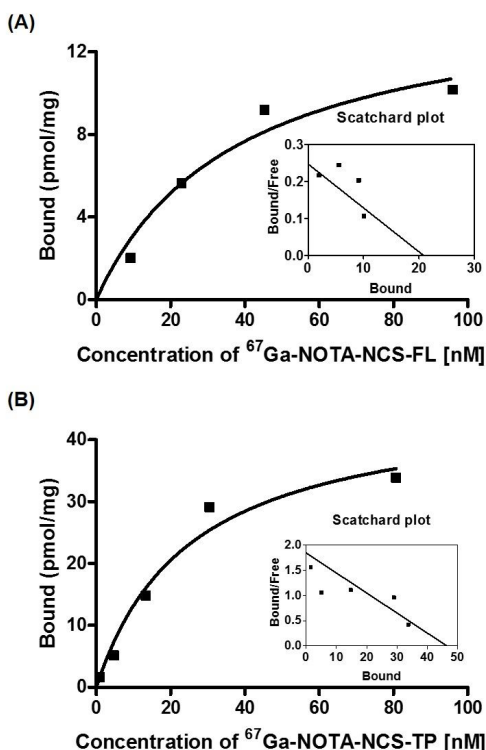


図 3  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-FL (A) と  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-TP (B) の KB 細胞への結合曲線および Scatchard plot

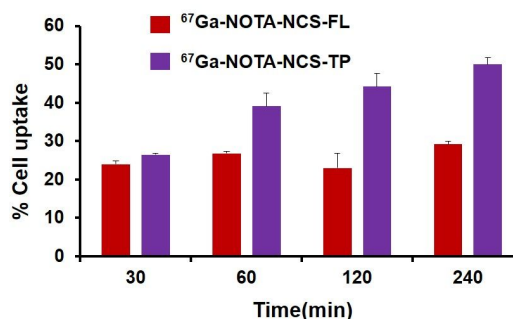


図 4  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-FL および  $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-TP の KB 細胞への時間経過による取り込み率の変化

$^{68}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-folate に関しては、小動物用 PET/CT 装置を用いて KB 細胞を移植した担癌マウスにおける腫瘍組織の PET/CT イメージングを行い、腫瘍組織の画像化に成功した (図 5)。一方で、各組織への投与 3 時間後の集積量は、腫瘍/血液比は 44.6 で腫瘍/筋肉比は 9.27 と良好な値を示したが、腫瘍/腎臓比は 0.07 であることから、非標的組織に対する選択性は改善が必要であることが示された。

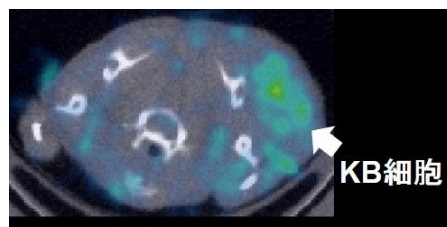


図 5  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-FL の KB 細胞移植担癌マウスにおける PET/CT 画像 (投与後 10 ~ 130 分の積算画像)

今後は引き続き、 $^{67}\text{Ga}$ -NOTA-NCS-TP や新たに開発を進めている種々化合物の KB 細胞を用いた葉酸受容体への結合性評価及び担癌マウスにおける生体内分布評価や PET/CT イメージングに関する詳細な検討を行っていく。

## 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 9 件、全て査読有)

1. T. Fuchigami, M. Nakayama, S. Yoshida; Development of PET and SPECT probes for glutamate receptors; *The Scientific World Journal*, 2015, 716514, (2015).
2. T. Fuchigami, Y. Yamashita, M. Haratake, M. Ono, S. Yoshida, M. Nakayama; Synthesis and evaluation of ethyleneoxylated and allyloxylated chalcone derivatives for imaging of amyloid  $\beta$  plaques by SPECT; *Bioorg Med Chem*, 22, 2622-2628 (2014).
3. M. Haratake, S. Yoshida, M. Mandai, T.

- Fuchigami, M. Nakayama; Elevated amyloid- $\beta$  plaque deposition in dietary selenium-deficient Tg2576 transgenic mice *Metallomics*, **5**, 479-483 (2013).
- M. Haratake, E. Takahira, S. Yoshida, S. Osei-Asante, T. Fuchigami, M. Nakayama; Improved membrane fluidity of ionic polysaccharide bead-supported phospholipid bilayer membrane systems; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **107**, 90 - 96 (2013).
  - T. Fuchigami, N. Kobashi, M. Haratake, M. Kawasaki, M. Nakayama; Synthesis and biological evaluation of radioiodinated quinacrine-based derivatives for SPECT imaging of A $\beta$  plaques; *Eur J Med Chem*, **60**, 469-478 (2013).
  - M. Haratake, E. Hatanaka, T. Fuchigami, M. Akashi, M. Nakayama; A strontium-90 sequestrant for first-aid treatment of radiation emergency; *Chem Pharm Bull*, **60**, 1258-1263 (2013).
  - M. Hongoh, M. Haratake, T. Fuchigami, M. Nakayama; A thiol-mediated active membrane transport of selenium by erythroid anion exchanger 1 protein; *Dalton Trans*, **41**, 7340-7349 (2012).
  - M. Haratake, S. Osei-Asante, T. Fuchigami, M. Nakayama; Fluorescence microscopic characterization of ionic polymer bead-supported phospholipid bilayer membrane systems; *Colloids Surf B Biointerfaces*, **100**, 190-196 (2012).
  - T. Fuchigami, A. Takano, B. Gulyás, Z. Jia, S. J. Finnema, J. D. Andersson, R. Nakao, Y. Magata, M. Haratake, M. Nakayama, C. Halldin.; Synthesis and evaluation of 2-chloro *N*-[(*S*)-1-[<sup>11</sup>C]methylpiperidin-2-yl](phenyl)methyl]-3-trifluoromethyl-benzamide ([<sup>11</sup>C]*N*-methyl-SSR504734) as a PET radioligand for glycine transporter 1; *Eur J Nucl Med Mol Imaging Res*, **2**, No.37 (2012).

〔学会発表〕(計 46 件)

- 永石 龍, 淵上 剛志, 小野 北斗, 吉田 さくら, 原武 衛, 中山 守雄; 葉酸受容体イメージング剤としての<sup>67</sup>Ga 標識チエノピリミジン誘導体の開発; 第 55 回核医学会, 2015 年 11 月 5 日~7 日, ハイアットリージェンシー東京 (東京都, 新宿区) 発表予定
- 石川夏海, 淵上剛志, 溝口達也, 吉田さくら, 原武 衛, 中山守雄; Survivin を標的とした 3-phenethyl-2-indolinone 誘導体の新規腫瘍イメージング剤としての評価; 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25 日~28 日, 神戸学院大学 (神戸市)
- 小野北斗, 親泊広大, 岩竹真弓, 吉田さくら, 淵上剛志, 原武衛, 松本博樹, 中山守雄; 多糖系高分子を用いた<sup>68</sup>Ge-<sup>68</sup>Ga ジェネレータの構築と感染症イメージングへの応用; 第 54 回核医学会, 2014 年 11 月 6 日~8 日, 大阪国際会議場 (大阪市)
- 石川夏海, 溝口達也, 淵上剛志, 原武 衛, 吉田さくら, 間賀田泰寛, 中山守雄; Survivin を標

- 的とした 4,6-ジアリール-3-シアノ-2-ピリドン誘導体の新規腫瘍イメージング剤としての評価; 第 54 回核医学会, 2014 年 11 月 6 日~8 日, 大阪国際会議場 (大阪市)
- 小野北斗, 淵上剛志, 親泊広大, 岩竹真弓, 針谷峻平, 原武衛, 中山守雄; <sup>68</sup>Ge 吸着剤として *N*-メチルグカミン基を有する多糖系高分子を用いた新規 <sup>68</sup>Ge-<sup>68</sup>Ga ジェネレータの開発; 第 12 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2014), 2014 年 7 月 14 日, 箱根高原ホテル (神奈川県, 箱根町)
  - T. Fuchigami, H. Ono, K. Oyadomari, M. Iwatake, S. Harigai, M. Haratake, M. Nakayama; Novel <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga generator system using polysaccharide polymers containing *N*-methylglucamine groups as adsorbents for <sup>68</sup>Ge; Society of nuclear medicine and molecular imaging 2014 annual meeting. 2014 年 6 月 7~11 日., St. Louis Convention Center (アメリカ, セントルイス)
  - T. Fuchigami, Y. Yamashita, A. Ogawa, M. Haratake, R. Atarashi, K. Sano, T. Nakagaki, M. Ono, N. Nishida, M. Nakayama; Synthesis and evaluation of radioiodinated flavonoid derivatives as candidate SPECT probes for imaging of cerebral prion deposits; Society of nuclear medicine and molecular imaging 2014 annual meeting. 2014 年 6 月 7~11 日. St. Louis Convention Center (アメリカ, セントルイス)
  - K. Oyadomari, M. Iwatake, S. Harigai, H. Ono, T. Fuchigami, M. Haratake, M. Nakayama; Development of a New <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga Generator System Using a Polysaccharide Polymer Containing *N*-Methylglucamine Groups as Adsorbent for <sup>68</sup>Ge; 第 23 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2013), 2013 年 6 月 21 日~22 日, 武蔵野大学 (西東京市)
  - 小野 北斗, 岩竹 真弓, 針谷 峻平, 親泊 広大, 淵上 剛志, 原武 衛, 中山 守雄; 多糖系ポリマーを高分子基材とする<sup>68</sup>Ge 吸着剤を用いた新規<sup>68</sup>Ge-<sup>68</sup>Ga ジェネレータシステムの構築; 第 53 回日本核医学会学術総会 2013 年 11 月 8 日~10 日, 福岡国際会議場 (福岡市)
  - 溝口 達也, 淵上 剛志, 原武 衛, 間賀田 泰寛, 中山 守雄; Survivin を標的とした新規腫瘍イメージングプローブの開発; 第 13 回放射線性医薬品・画像診断薬研究会, 2013 年 12 月 14 日, 京都ガーデンパレス (京都市)
  - 淵上 剛志, 松田 尚樹, 原武 衛, 工藤 崇, 中山 守雄; 感染症 *in vivo* イメージングに向けた Triumph Trimodality System の基礎的な性能評価; 第 12 回放射線性医薬品・画像診断薬研究会, 2012 年 12 月 15 日, 京都テルサ (京都市)

他 35 件

〔図書〕(計 1 件)

- T. Fuchigami, M. Nakayama, Y. Magata; Development of radioligands for *in vivo* imaging of NMDA receptors; "PET and SPECT of

*Neurobiological Systems* (Text book, Springer Verlag in Heidelberg)", 513-559 (2014).

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/hygiene/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

淵上 剛志 (FUCHIGAMI, Takeshi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・  
准教授  
研究者番号 30432206