

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05397

研究課題名(和文) PET分子画像診断によるEGFR阻害癌分子標的薬個別化医療

研究課題名(英文) PET Molecular Imaging for the molecular targeted cancer therapy focused on EGFR for personalized Medicine

研究代表者

西井 龍一 (NISHII, RYUICHI)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 分子イメージング診断治療研究部・主幹
研究員(定常)

研究者番号：60463212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌の細胞増殖、血管新生、浸潤・転移の誘導、アポトーシスと密接に関係する上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼに着目した画像診断用薬剤を開発した。高いEGFR-TK阻害活性を有する複数のイメージング化合物の新規合成に成功した。それぞれの薬剤に対するチロシンキナーゼ阻害親和性を確認した後、担癌マウスを用いたPETイメージング実験では変異型EGFR発現腫瘍細胞の描出と薬物動態解析を行った。EGFR阻害薬負荷時のPET画像検査を行い集積阻害効果も確認した。さらに薬剤の特異的臓器集積性や排泄性、血中クリアランスを評価し、臨床応用可能性を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発する画像診断は、治療前にEGFR-TK阻害剤適応患者を選別することで、分子標的薬による副作用の危険性を回避すると共に的確な治療戦略決定に寄与する。またEGF受容体の発現と活性度の定量的画像解析法によりEGFR-TK阻害剤の治療効果予測・予後予測も可能となり、種々の分子標的治療にも応用可能な画像診断として期待できる。さらには画像診断情報を基にした個々の体質に合わせた予防・治療を可能とする効果的・効率的な個別化医療(オーダーメイド医療)の実現に寄与できると共に、癌の増殖メカニズムとその診断・治療という臨床をつなぐ癌のトランスレーショナルリサーチの一翼を強力に推進することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have developed diagnostic imaging agents focusing on tyrosine kinases of the epidermal growth factor receptors, which are strictly related to cancer cell proliferation, angiogenesis, induction of invasion and metastasis, and apoptosis. We succeeded in synthesizing several new imaging radiopharmaceuticals with high EGFR-TK inhibitory activity. After confirming the tyrosine kinase inhibitory affinity for each agent in the biological assay experiments, we have performed imaging studies that have high EGFR-TK inhibitory activity in cancer-bearing mice. PET imaging experiments in cancer-bearing mice were used to visualize mutant EGFR-expressing tumor cells and analyze their pharmacokinetics. PET imaging of EGFR inhibitor-loaded mice was also performed. Furthermore, specific organ accumulation, excretion, and blood clearance of the drug were evaluated to determine its potential for clinical application.

研究分野：放射線医学

キーワード：癌 画像診断 PETイメージング 分子イメージング EGFR

1. 研究開始当初の背景

本研究は、細胞増殖、血管新生、浸潤・転移の誘導、アポトーシスと密接に関係する上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR) のチロシンキナーゼ (tyrosine kinase; TK) に着目した新規のポジロン画像診断 (PET) 用薬剤を開発し、臨床応用を行うものである。癌分子標的薬剤として注目されている gefitinib (イレッサ®) に代表される EGFR-TK 阻害剤の治療効果予測や治療効果判定等を定量評価し得る分子イメージング法を確立し、その阻害剤適応癌患者の層別化を可能にする画像診断を目指すものである。本研究での候補診断薬である F18 標識 peg-6 IPQA は臨床応用に有望であり、このような薬剤による世界に先駆けての PET 検査臨床応用は、EGFR-TK 阻害剤分子標的治療の一翼を強力に推進することが期待される。

分子標的治療薬開発・応用の目覚ましい進歩が遂げられている中、リン酸化酵素であるチロシンキナーゼ (TK) をはじめとする細胞内シグナル伝達経路を標的とする癌治療法が注目されており、中でも細胞増殖等と密接に関係する上皮成長因子受容体 (EGFR) は、細胞膜を貫通して存在する分子量 170 kDa の糖タンパクで、その TK である EGFR-TK は、ほとんどの上皮系癌 (咽頭癌、食道癌、胃癌、大腸癌、膀胱癌、卵巣癌、甲状腺癌、脳腫瘍等) で多量に発現し、活性上昇することが確認されている。また、EGFR-TK 活性の上昇は細胞における発癌の初期過程で起こり得ることから、EGFR-TK 活性の把握が癌の発生のメカニズム解明の一端になり得るとも考えられている。とりわけ肺癌における EGFR-TK 阻害剤治療は、gefitinib を初めとして広く臨床応用されている。しかしその劇的な抗腫瘍効果の一方で、EGF 受容体発現や活性度が亢進していない癌での無効例や副作用発生の問題から、患者の層別化や治療効果予測・効果判定の必要性が叫ばれている。

本研究グループは、すでにキナゾリン誘導体である IPQA 及びその誘導体に着目し、F18 標識 peg-6 IPQA が画像診断薬として有力な候補であることを見出している (Tien M. JNM 52(6) 2011, Yeh H. H. PNAS 108(4) 2011)。本研究は、この F18 標識 peg-6 IPQA 或は類似化合物の探索を行いながら基礎的検討と前臨床検討を行い、本邦初の EGFR 阻害に基づく癌分子標的 PET 画像診断の臨床応用を目指すものである。

2. 研究の目的

EGFR-TK 阻害活性を保ちつつ、in vivo での癌集積性の向上を目指す化合物を、分子の立体構造に基づくコンピュータ分子設計法である In Silico Modeling を用いてドラッグデザインする。そして、得られた複数の候補化合物に着目し、新規 EGFR-TK 活性診断薬剤の安定かつ効率的な放射性ヨウ素標識合成法を確立する。代表的な EGFR-TK 選択的阻害剤である PD153035 及び gefitinib の存在・非存在下で、合成した新規誘導体の EGFR-TK リン酸化阻害能及びヒト由来肺癌細胞に対する in vitro における取り込みを測定し、EGFR-TK に対する結合特性の評価を行う。本研究で開発された薬剤の構造確認は、¹H-NMR や高分解能マススペクトルにて確認する。具体的には、種々の EGFR-TK の活性型突然変異細胞 (gefitinib 感受性変異: L858R、gefitinib 耐性変異: T790M) 及び非活性型細胞を用いて、i) EGF 受容体の発現が少ない癌細胞、ii) EGF 受容体発現亢進している癌細胞、iii) EGF 受容体発現変異で EGFR 受容体発現や活性度が異常亢進している癌細胞、iv) さらに薬剤耐性変異が生じ EGF 受容体活性が低下した癌細胞、という実際に臨床で遭遇する 4 つの肺癌パターンを設定する。また、種々の癌細胞を移植し gefitinib による治療を行った担癌動物モデルを作成し、in vitro で癌集積性の良好だった誘導体を用いて EGFR-TK の PET 分子イメージングを行い、画像診断の有効性を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、癌細胞内シグナル伝達系で重要なリン酸化酵素 TK に着目し、特に EGF 受容体のリン酸化酵素活性をターゲットにした新規分子イメージング薬剤の開発と画像解析法の確立を目標としたトランスレーショナルリサーチを行った。Gefitinib に代表される EGFR-TK 阻害薬による肺癌治療戦略に大きく寄与し得る画像診断の開発を目指し、新規薬剤放射性フッ素標識薬剤を合成する。そして EGF 受容体の分布や EGFR-TK 活性を定量化し得る生体イメージング診断法に向けて、以下に示す基礎研究項目を行った。

EGFR-TK 選択的阻害する新規分子イメージング放射性薬剤の合成、癌細胞を用いた PET 薬剤の細胞内取り込み実験、担癌動物による PET 薬剤画像化と EGFR 活性半定量的のための画像解析。薬剤安全性試験のための薬物動態評価。

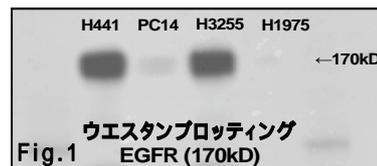
4. 研究成果

EGFR-TK 選択的阻害する新規分子イメージング放射性薬剤の合成
細胞増殖、血管新生、浸潤・転移の誘導、アポトーシスと密接に関係する上皮成長因子受容体

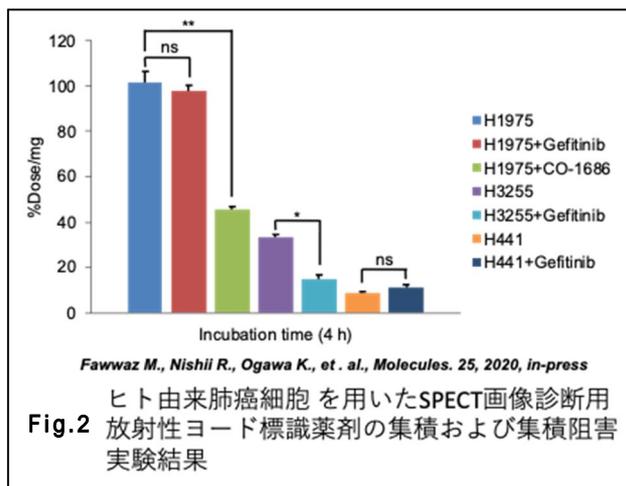
(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) のチロシンキナーゼ (tyrosine kinase, TK) に着目した新規のポジトロン画像診断 (PET) 用薬剤の開発に着手した。高い EGFR-TK 阻害活性を有するには、gefitinib を代表とするキナゾリン骨格の 4 位に芳香環が導入され、その芳香環の 3' 位にハロゲン基のような電子吸引基が必要である。今年度我々はその条件を満たす PET 用薬剤: 4-(anilino)pyrido[3,4-d]pyrimidine derivative ([¹⁸F]APP-1 および [¹⁸F]APP-2) と SPECT 画像診断用放射性ヨード標識薬剤 (I-10) の合成に成功した。

癌細胞を用いた PET 薬剤の細胞内取り込み実験

基礎実験で用いるヒト由来肺癌細胞は実際の臨床で遭遇する肺癌パターンを想定した以下の 4 種類である: PC14 (wild type EGFR 低発現: gefitinib 感受性なし) H441 (wild type EGFR 高発現: gefitinib 感受性++) H3255 (L858R mutant EGFR 高発現: gefitinib 感受性+++),



H1975 (L858R and T790M double mutant EGFR 発現: gefitinib 耐性) (Fig. 1)。単層培養した肺癌細胞に新規合成した放射性薬剤を添加・暴露させ、一定時間後に細胞及び培養液を採取・分離し秤量した後、放射能量をガンマカウンターで測定し、細胞成分と培養液中の単位重量あたりの放射能の比率を求めることにより、各放射性薬剤の肺癌細胞内への特異的取り込みを経時的に評価した。また、EGFR-TK 阻害剤を用いた、放射性薬剤の腫瘍細胞における集積阻害検討も行なった。その結果 各放射性薬剤 L858R 変異 EGFR 発現腫瘍細胞への集積し、L858R/T790M EGFR 発現腫瘍細胞への集積がないことが確認できた。



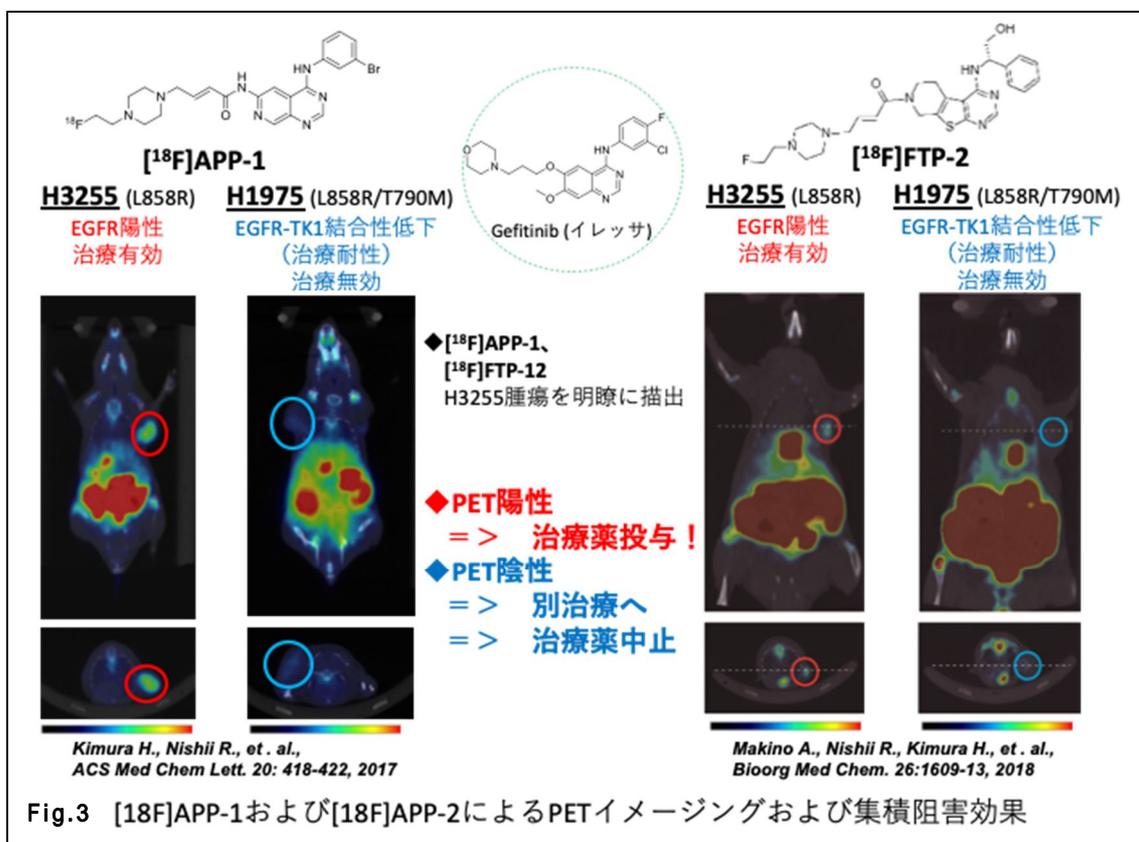
担癌動物による PET 薬剤画像化と EGFR 活性半定量のための画像解析

担癌マウスを用いた PET イメージング実験で、L858R 変異 EGFR 発現腫瘍細胞の描出に成功した。動物実験にて腫瘍集積コントラスト向上を達成できた。培養細胞実験では、この [¹⁸F]APP-1 は、L858R 変異 EGFR 発現腫瘍細胞への集積し、L858R/T790M EGFR 発現腫瘍細胞への集積がないことが確認できた。動物用 PET 装置にてダイナミックイメージングを行った結果、担癌マウスを用いた PET イメージング実験で、L858R 変異 EGFR 発現腫瘍細胞の描出に成功した。両イメージング薬剤共に良好な画像が得られた。

薬剤安全性試験のための薬物動態評価

これらの新規 PET イメージング製剤および SPECT イメージング製剤につきヌードマウス皮下に移植した担癌動物モデルを作成し、PET 薬剤の特異的臓器集積性や排泄性、血中クリアランスを評価し、臨床応用可能性を得た。EGFR 阻害薬 (gefitinib 等) 負荷時の PET 画像検査を行い、集積阻害効果を確認した。PET の臨床応用に向けた検討をすると同時に投与薬剤の動物モデルに対する毒性試験や放射線被曝線量計算により生体への安全性を検証した。放射線被曝線量計算では、投与放射能と PET ダイナミック画像データの全身の関心領域の放射能カウントから得られる各臓器の放射能残存及び排泄の経時変化を評価し、放射線被曝線量のシミュレーションに応用した。その結果、前臨床検討としては安全なイメージング薬剤であることが考察された。しかし前臨床試験としての薬剤安全性試験受託に関しては、試験費用が高額と試算され次期課題として残された。

これらの成果は国際英文雑誌に発表された。



今後も、引き続き、癌分子標的薬剤として注目されている gefitinib (イレッサ) に代表される EGFR-TK 阻害剤の治療効果予測や治療効果判定等を定量評価し得る分子イメージング法を確立し、その阻害剤適応症患者の層別化を可能にする画像診断を目指していく。本研究での PET 薬剤は臨床応用に有望であり、このような薬剤による世界に先駆けての PET 検査臨床応用は、EGFR-TK 阻害剤分子標的治療の一翼を強力に推進することが期待される。

主な論文発表

- 1) Fawwaz M, Mishiro K, Nishii R, Sawazaki I, Shiba K, Kinuya S, Ogawa K. Synthesis and Fundamental Evaluation of Radioiodinated Rociletinib (CO-1686) as a Probe to Lung Cancer with L858R/T790M Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *molecules*. 25, 2018 *In-press*
- 2) Makino A, Miyazaki A, Tomoike A, Kimura H, Arimitsu K, Hirata M, Ohmoto Y, Nishii R, Okazawa H, Kiyono Y, Ono M, Saji H. PET probe detecting non-small cell lung cancer susceptible to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Bioorg Med Chem*. 26:1609-13, 2018 (PMID:29478801)
- 3) Kimura H, Okuda H, Ishiguro M, Arimitsu K, Makino A, Nishii R, Miyazaki A, Yagi Y, Watanabe H, Kawasaki I, Ono M, Saji H. ¹⁸F-Labeled Pyrido[3,4-d]pyrimidine as an Effective Probe for Imaging of L858R Mutant Epidermal Growth Factor Receptor. *ACS Med Chem Lett*. 8(4): 418-422 (PMID:28435529)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinya Kagawa , Ryuichi Nishii , Tatsuya Higashi , Hiroshi Yamauchi , Emi Ogawa , Hiroyuki Okudaira , Masato Kobayashi , Mitsuyoshi Yoshimoto , Naoto Shikano , Keiichi Kawai	4. 巻 49
2. 論文標題 Relationship between [(14)C]MeAIB uptake and amino acid transporter family gene expression levels or proliferative activity in a pilot study in human carcinoma cells: Comparison with [(3)H]methionine uptake.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nuclear medicine and biology	6. 最初と最後の頁 8-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nucmedbio.2017.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tatsuya Higashi , Ryuichi Nishii , Shinya Kagawa , Yoshihiko Kishibe , Masaaki Takahashi , Tomoko Okina , Norio Suzuki , Hiroshi Hasegawa , Yasuhiro Nagahama , Koichi Ishizu , Naoya Oishi , Hiroyuki Kimura , Hiroyuki Watanabe , Masahiro Ono , Hideo Saji , Hiroshi Yamauchi	4. 巻 32
2. 論文標題 18F-FPYBF-2, a new F-18-labelled amyloid imaging PET tracer: first experience in 61 volunteers and 55 patients with dementia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 206-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-018-1236-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Akira Makino , Anna Miyazaki , Ayaka Tomoike , Hiroyuki Kimura , Kenji Arimitsu , Masahiko Hirata , Yoshiro Ohmomo , Ryuichi Nishii , Hidehiko Okazawa , Yasushi Kiyono , Masahiro Ono , Hideo Saji	4. 巻 26
2. 論文標題 PET probe detecting non-small cell lung cancer susceptible to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medical Chemistry	6. 最初と最後の頁 1609-1613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.02.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wen Jing Zhu , Masato Kobayashi , Kohei Yamada , Kodai Nishi , Kotaro Takahashi , Asuka Mizutani , Ryuichi Nishii , Leo G. Flores II , Naoto Shikano , Munetaka Kunishima , Keiichi Kawai	4. 巻 59
2. 論文標題 Development of radioiodine labeled acetaminophen for specific, high-contrast imaging of malignant melanoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 16-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nucmedbio.2017.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroyuki Kimura, Haruka Okuda, Masumi Ishiguro, Kenji Arimitsu, Akira Makino, Ryuichi Nishii, Anna Miyazaki, Yusuke Yagi, Hiroyuki Watanabe, Ikuo Kawasaki, Masahiro Ono, and Hideo Saji	4. 巻 8
2. 論文標題 18F-Labeled Pyrido[3,4-d]pyrimidine as an Effective Probe for Imaging of L858R Mutant Epidermal Growth Factor Receptor.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Med Chem Lett.	6. 最初と最後の頁 418-422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.6b00520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maya K Arimoto , Tatsuya Higashi , Ryuichi Nishii , Shinya Kagawa , Masaaki Takahashi , Yoshihiko Kishibe , Hiroshi Yamauchi , Satoshi Ishitoya , Hiroyuki Oonishi , Yuji Nakamoto , Kaori Togashi	4. 巻 30
2. 論文標題 (11)C-methylaminoisobutyric acid (MeAIB) PET for evaluation of prostate cancer: compared with (18)F-fluorodeoxyglucose PET.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Ann Nucl Med.	6. 最初と最後の頁 553-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-016-1098-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masato Kobayashi , Asuka Mizutani , Kodai Nishi , Syuichi Nakajima , Naoto Shikano , Ryuichi Nishii , Kazuki Fukuchi , Keiichi Kawai	4. 巻 44
2. 論文標題 Differences in accumulation and the transport mechanism of l- and d-methionine in high- and low-grade human glioma cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucl Med Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nucmedbio.2016.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinya Kagawa, Ryuichi Nishii, Tatsuya Higashi, Hiroshi Yamauchi, Emi Ogawa, Hiroyuki Okudaira, Masato Kobayashi, Mitsuyoshi Yoshimoto, Naoto Shikano, Keiichi Kawai	4. 巻 44
2. 論文標題 Relationship between [(14)C]MeAIB uptake and amino acid transporter family gene expression levels or proliferative activity in a pilot study in human carcinoma cells: Comparison with [(3)H]methionine uptake.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucl Med Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nucmedbio.2017.01.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西井 龍一, 辻 厚至, 加藤 孝一, 河村 和紀, 張 明栄, 吉永 恵一郎, 東 達也	4. 巻 50
2. 論文標題 がんの特性を標的としたがん分子PET画像診断 F-18 FEDAC PETおよび C-11 AIB PET	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床核医学	6. 最初と最後の頁 2-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muammar Fawwaz, Kenji Mishiro, Ryuichi Nishii, Izumi Sawazaki, Kazuhiro Shiba, Seigo Kinuya, Kazuma Ogawa	4. 巻 25
2. 論文標題 Synthesis and Fundamental Evaluation of Radioiodinated Rociletinib (CO-1686) as a Probe to Lung Cancer with L858R/T790M Mutations of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 molecules	6. 最初と最後の頁 in-press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加川 信也 (Kagawa Shinya) (10393191)	滋賀県立総合病院(研究所)・画像研究部門・主任研究員 (84203)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	川井 恵一 (Kawai Keiichi) (30204663)	金沢大学・保健学系・教授 (13301)	
研究 分担者	小川 数馬 (Ogawa Kazuma) (30347471)	金沢大学・新学術創成研究機構・准教授 (13301)	
研究 分担者	東 達也 (Higasghi Tatsuya) (50324629)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 分子イメージング診断治療研究部・部長（定常） (82502)	
研究 分担者	木村 寛之 (Kimura Hiroyuki) (50437240)	京都薬科大学・薬学部・准教授 (34306)	
研究 分担者	水谷 陽一 (Mizutani Youichi) (40599586)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	
研究 分担者	小川 衣未（松本衣未） (Ogawa Emi) (70752723)	宮崎大学・医学部・その他 (17601)	