

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791174

研究課題名（和文）新規放射性薬剤を用いた包括的転移性骨腫瘍診断治療法の確立を目指した研究

研究課題名（英文）Research of aiming at the establishment of comprehensive diagnosis and therapy of metastatic bone cancer using novel radiopharmaceuticals

研究代表者

小川 数馬（OGAWA KAZUMA）

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：30347471

研究成果の概要（和文）：

まず、ビスホスホネートを骨への輸送担体とした<sup>67</sup>Ga-DOTA conjugatedビスホスホネートを合成し、その錯体の有用性を評価した。<sup>67</sup>Ga-DOTA conjugatedビスホスホネートは、精製することなく、放射化学的純度95%以上で標識でき、マウスにおける体内放射能分布を検討した結果、投与後速やかに骨への高い放射能集積を示し、他の組織からは速やかにクリアランスされ、薬剤の有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：

DOTA-conjugated bisphosphonate was synthesized using bisphosphonate as a carrier to bone. <sup>67</sup>Ga-DOTA-conjugated bisphosphonate was prepared with a radiochemical purity of over 95% without purification. In biodistribution experiments, <sup>67</sup>Ga-DOTA-conjugated bisphosphonate accumulated in bone rapidly but were hardly observed in tissues other than bone. These results indicate that <sup>67</sup>Ga-DOTA-conjugated bisphosphonate has ideal biodistribution characteristics as bone-imaging agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：核医学

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：イメージング、PET、転移性骨腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

骨は増殖因子を豊富に含むため、癌にとって増殖し易い環境であり、癌が転移し易い組織である。転移性骨腫瘍の多くは激しい痛みを伴うために患者の quality of life は著しく損なわれる。以前は転移性骨腫瘍に対して

有効な治療法がほとんどなかったが、近年、治療法や治療薬剤が進歩したことから、転移性骨腫瘍に対しても、早期診断、早期治療は重要であると考えられる。実際、単発性骨転位の患者の予後は、多発性骨転位の患者に対して良好であることが報告されている。近年、

CTやMRIなどの診断装置は著しく進歩したが、PETやSPECTを用いた核医学診断はCTやMRIなどの形態診断法とは異なり、病巣部において形態変化を示す前の段階で見られる機能的変化を画像化することが可能な診断法であるため、転移性骨腫瘍を早期に発見するには依然として適した診断法であり、核医学検査において骨シンチグラフィ検査は頻度が高いものである。しかしながら、四半世紀以上もの間、新しい薬剤が開発されておらず、 $^{99m}\text{Tc}$ -MDP、 $^{99m}\text{Tc}$ -HMDPといった薬剤が未だに臨床で用いられており、より優れた薬剤の開発が求められている。一方、日本においても $^{18}\text{F}$ FDGのデリバリーがはじまり、サイクロトロン設備を有さない施設においてもPETカメラを所有していればFDG-PET検査が可能となった。しかしながら、依然として他のPET用薬剤を用いる場合には高価なサイクロトロン設備が必要となる。ところが、 $^{68}\text{Ga}$  (半減期 67.6 分) は  $^{68}\text{Ge}$  の娘核種であるため  $^{68}\text{Ge}$ - $^{68}\text{Ga}$  ジェネレータにより取り出すことが可能である。即ち、サイクロトロンを有さない施設においても、ジェネレータからのミルキングにより、病院内において容易に核種を入手することができ、標識後、検査に使用することができるといった大きなメリットを有する。そこで、この放射性ガリウムを用いた転移性骨腫瘍診断薬剤の開発に成功すれば、臨床的に非常に有用であると着想するに至った。

## 2. 研究の目的

申請者はこれまでに標的組織の認識部位と放射性同位元素の結合部位とを一分子内に独立して有する『二官能性放射性薬剤』という分子設計概念を提唱し、SPECT用核種  $^{99m}\text{Tc}$  や治療用核種  $^{186}\text{Re}$  を用いた骨指向性分子設計を行い、転移性骨腫瘍の診断薬剤、治療薬剤の開発を行ってきた。

そこで、この概念を基に PET 核種 ( $^{68}\text{Ga}$ ) への応用することにより優れた PET 用転移性骨腫瘍トレーサーの開発が可能であると考え、動態の最適化、そして、ベータ線放出核種を用いた治療への応用を行い、これら薬剤を用いた包括的診断・治療法の確立を目指した。

## 3. 研究の方法

DOTA-Bn-SCN-HBP (3) の合成 (Scheme 1)

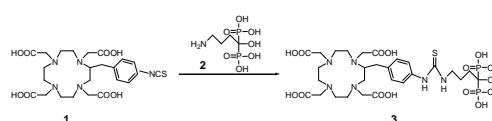
4-Amino-1-hydroxybutylidene-1,1-bisphosphonate (2) (10  $\mu\text{mol}$ , 2.5 mg) を蒸留水 (150  $\mu\text{L}$ ) に懸濁させ、triethylamine (0.2 mmol, 30  $\mu\text{L}$ ) を加え、室温で数秒攪拌すると、懸濁液は透明になった。2-(4-Isothiocyantobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (*p*-SCN-Bn-DOTA) (1) (10  $\mu\text{mol}$ , 5.5 mg)

は DMF (100  $\mu\text{L}$ ) に溶解させ、徐々に反応液に加えた。この反応液を 37°C で 15 時間反応後、逆相 HPLC で精製し、凍結乾燥を行うことにより白色結晶を得た (1.6 mg, 収率 20.0 %)。

逆相 HPLC のカラムには HydrosphereC18 を使用し、移動相には 0.1% の TFA を含有する水:メタノール 80:20 から 20 分で 50:50 へ変換するグラディエント法にて流速 4.0 mL/min の条件で行った。クロマトグラムは UV の吸収波長 254 nm で測定した。

MS (ESI) 計算値:  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_{15}\text{P}_2\text{S}$  (M-H)<sup>-</sup>, m/z 799 測定値: 799

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1.89-1.99 (m, 4H), 2.90-3.94 (m, 27H), 7.28 (d, 2H), 7.33 (d, 2H)



Scheme 1. Synthesis of DOTA-Bn-SCN-HBP

## $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-Bn-SCN-HBP の作製

DOTA-Bn-SCN-HBP (50  $\mu\text{g}$ ) を 0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液 pH 5.0 (75  $\mu\text{L}$ ) に溶解させた後、 $^{67}\text{GaCl}_3$  (25  $\mu\text{L}$ ) を加え、95°C で 30 分間加熱した。分析は TLC、CAE より行った。

## ハイドロキシアパタイトに対する結合親和性実験

ハイドロキシアパタイトを 1 mg/mL、10 mg/mL、25 mg/mL の濃度で Tris/HCl-buffered saline (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) に懸濁させ、200  $\mu\text{L}$  の懸濁液にリガンド濃度を 19.5  $\mu\text{M}$  に調整した  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-Bn-SCN-HBP 溶液もしくは  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA 溶液を 200  $\mu\text{L}$  加え、1 時間振とうした後、10,000g で 5 分間遠心し、上清の放射能を測定し、以下の式によりハイドロキシアパタイトに結合している放射能の割合を求めた。Hydroxyapatite binding (%) =  $(1 - [\text{radioactivity of supernatant of each sample}] / [\text{radioactivity of supernatant in the respective control}]) \times 100$

## 正常マウスにおける体内放射能分布

雄性ノーマルマウスにおける  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-Bn-SCN-HBP、 $^{67}\text{Ga}$ -DOTA の体内放射能分布を調べるため、それぞれの溶液 (37 kBq / 100  $\mu\text{L}$ ) をマウスに尾静脈投与した。投与後 10, 60, 180 min にマウスを屠殺、組織を採取し、それぞれの重さと放射能を測定し、自然放射線の影響と減衰の補正を行った。また、過剰量の bisphosphonate 投

与による体内放射能分布への影響を評価するため、alendronate (40 mg/kg) を<sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP を尾静脈内投与する1分前に投与した。

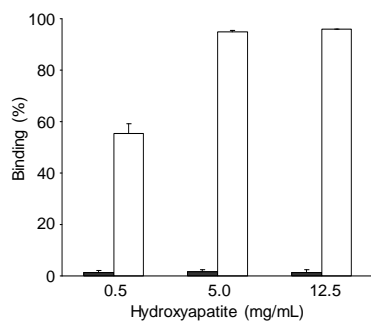
#### 4. 研究成果

<sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP の作製

<sup>67</sup>Ga 標識は、DOTA-Bn-SCN-HBP (3) と <sup>67</sup>Ga との錯形成反応により行い、精製を行うことなく、95%以上の放射化学的純度で、<sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP を得た。

ハイドロキシアパタイトに対する結合親和性実験

ハイドロキシアパタイト懸濁液中で<sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP、<sup>67</sup>Ga-DOTA をインキュベートし、ハイドロキシアパタイトへの結合を調べた結果を Figure. 2 に示す。<sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP はハイドロキシアパタイトの濃度に依存した結合親和性の増加を示した。一方、<sup>67</sup>Ga-DOTA は全くハイドロキシアパタイトへの結合は示さなかった。



**Figure 2.** Each column represents the binding of <sup>67</sup>Ga-DOTA (closed column) and <sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP (open column) to hydroxyapatite beads, respectively. Data are expressed as the mean ± SD for four experiments.

正常マウスにおける体内放射能分布

<sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP は投与後速やかに骨に高い集積を示し、骨に集積した以外の放射能は腎臓から速やかにクリアランスされた。その結果、投与60分後では、骨を除く臓器にける放射能は非常に低値を示した。一方、<sup>67</sup>Ga-DOTA は、骨への集積を示さず、投与した放射能のほとんどが速やかに腎排泄された。Alendronate の事前投与は<sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP の骨への放射能集積を低下させ、骨、筋肉、脳を除く全ての臓器における放射能集積を増加させた。これは、血液クリアランスの遅延が影響していると考えられる。以前の研究で、腎臓の尿細管上皮細胞にはalendronateの飽和性の輸送メカニズムがあることが報告されている。つまり、<sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP の血液クリアランスの遅延は過剰量のalendronateによる

腎輸送システムの飽和によるものと推測される。

<sup>67</sup>Ga-DOTA-Bn-SCN-HBP の優れた体内動態は長い間骨シンチグラフィ用薬剤として用いられている<sup>99m</sup>Tc-HMDP に匹敵する結果であり、本研究で得られた知見は、転移性骨腫瘍などの骨代謝異常疾患の診断や治療モニタリングのための<sup>68</sup>Gaを用いたPETトレーサーの薬剤設計に有用な情報を提供するものであると考えられる。

本研究では治療核種を使用するまでには至らなかったが、今後、Lu-177を用いた治療実験を行い、診断と治療をカップリングさせた核医学診断治療法の有用性を明かにしたい。

#### 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1件)

① K. Ogawa, K. Takai, H. Kanbara, T. Kiyada, Y. Kitamura, K. Shiba, A. Odani: Preparation and evaluation of a radiogallium complex-conjugated bisphosphonate as a bone scintigraphy agent. *Nucl Med Biol*, in press 査読有

[学会発表] (計4件)

① K. Ogawa, K. Takai, H. Kanbara, T. Kiyada, Y. Kitamura, K. Shiba, A. Odani: Development and evaluation of a novel radiogallium labeled peptide as a bone imaging agent for PET 240<sup>th</sup> ACS National Meeting 2010. 8. 22 Boston Convention Center (USA)

② 高井健一郎, 小川数馬, 黄檗達人, 北村陽二, 柴和弘, 小谷明 Development of radiogallium-DOTA complex conjugated bone seeking compounds for PET bone imaging 第20回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 2010. 6. 25 徳島文理大学国際会議場 (徳島)

③ 高井健一郎, 小川数馬, 黄檗達人, 北村陽二, 柴和弘, 小谷明: 放射性ガリウム標識骨イメージング薬剤の開発研究 第10回放射性医薬品・画像診断薬研究会 2010. 12. 4 京都テルサ (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 数馬 (OGAWA KAZUMA)  
金沢大学・薬学系・准教授  
研究者番号：30347471

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし