

## 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 6 月 17 日現在

機関番号：82606
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659601
研究課題名（和文） マルチモダリティ分子イメージングを駆使したがん分子標的治療の最適化技術の開発
研究課題名（英文） Monitor of molecular-targeted cancer therapy using multimodal in vivo molecular imaging
研究代表者 梅田 泉 (UMEDA IZUMI) 独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・ユニット長 研究者番号：40160791

研究成果の概要（和文）：分子標的薬の薬効発現過程を非侵襲的に可視化し、感受性予測や治療最適化に繋げることを目的として、薬物の標的への結合と、それによる薬効発現を同時に可視化することを目指した。(1)近年、従来の EGFR-TK 阻害剤耐性化がんに対する新薬が開発されており、この薬の標的への結合を評価するプローブを新たに設計、合成した。(2)薬効指標として腫瘍内低酸素環境を可視化する新規プローブを作成した。(3)2事象を同時に描画するための2核種同時イメージングにつき検討を進めた。

研究成果の概要（英文）： To improve prediction of drug sensitivity, as well as optimization of cancer therapy through non-invasive imaging, we aimed at simultaneous visualization of drug-target interaction and drug efficacy. 1) Recently, new small molecules have been developed for treatment of EGFR-TKI resistant cancer, and we designed and synthesized new probes that allow the evaluation of their interaction to the intended target. 2) As indicators of the drug efficacy, we synthesized novel probes to visualize hypoxic tumor microenvironment. 3) To concurrently visualize the aforementioned events, we proceeded to develop simultaneous dual radionuclide imaging system.

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：分子イメージング・分子標的薬・治療最適化・個別化医療

## 1. 研究開始当初の背景

近年大きな発展を見せるがん分子標的治療には、その選択的な作用機序と比較的軽微な副作用などから大きな期待が寄せられている。しかしながら、標的分子発現の有無や耐性を誘導する遺伝子変異

のバイオマーカー研究が進められているが、現時点では個々の患者に対して確実な感受性を予測できる手段はない。また、分子標的治療薬の効果は必ずしも腫瘍縮小という形では現れないため、RECIST などの現行の腫瘍径の変化に基づく効果の

判定基準では評価できないことが多い。そのため、薬効判定ができないままの高価な分子標的治療薬の長期投与も決してまれではなく、治療の最適化にはほど遠い。

## 2. 研究の目的

上述の問題は、腫瘍病巣のごく一部の検体で感受性を評価せざるを得ないこと、薬効を早期に評する適切な手段がないことなどによる。そこで本研究では、腫瘍の全体像を非侵襲的に *in vivo* で観察することができる分子イメージング技術を用いて、分子標的薬が薬効に至るまでの複数の過程を可視化できるシステムの開発を目的とした。研究期間内には(1)薬物の標的への結合、(2)薬効評価指標となる腫瘍内微小環境のひとつである腫瘍内低酸素環境の2点につき、これを *in vivo* で可視化するプローブを開発し、併せて、これらを同時に観察しうる測定法の開発を進めた。

## 3. 研究の方法

(1) 上皮性増殖因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) 耐性化判定および第二世代 EGFR-TKI の標的結合性評価を目指した新規 SPECT プローブの開発

プローブ設計および合成方法は研究成果の項に記載した。以下の3種の細胞株を用い、細胞播種 24 時間後に無血清培地に置換して実験に用いた。細胞への取込は  $^{99m}\text{Tc}$  の放射活性を  $\gamma$  カウンタで測定して求めた。細胞の成長抑制評価は MTS 測定で行った。EGFR 自動リン酸化の評価は細胞を RIPA 緩衝液で溶解後リン酸化 EGFR に対する抗体を用いたウエスタンブロットにより評価した。

H1975 (L858R / T790M mutation, Gefitinib Resistance), A431 (Wild Type EGFR Overexpression), H1975 (L858R mutation, Gefitinib Sensitive) .

(2) 腫瘍内低酸素環境を可視化する新規プローブの開発

(2-1) [ $^{18}\text{F}$ ]FPINI: プローブ設計のおよび合成方法は研究成果の項に記載した。 [ $^{18}\text{F}$ ]FPINI の細胞への取り込みは、低酸素あるいは常酸素状態で 12 時間前培養した細胞 (FM3A,  $1 \times 10^6$  cells/mL) に [ $^{18}\text{F}$ ]FPINI (1 MBq/mL) を添加し、同条件下で培養後、放射

活性を測定して評価した。動物実験には FM3A 皮下移植担がんマウスを用いた。オートラジオグラフィおよび腫瘍の組織化学的検討には、摘出腫瘍から凍結薄切切片を作成して用いた。 *In vivo* イメージングは PPIS-4800 装置 (浜松ホトニクス) を用いて、120 分間連続撮像し、画像を取得した。

(2-2) HIF1 ミミックタンパク質プローブ: POH 融合タンパク質は東京工業大学 近藤科江教授より供与を受けた。 HaloTag リガンド (HL) に 2 種類の DOTA 誘導体を活性エステルを用いて結合させ、 $^{111}\text{In}$  を導入した。これを POH と結合させて POH-HL-DOTA- $^{111}\text{In}$  をプローブとして得た。動物実験には FM3A 皮下移植担がんモデルを用いた。 *In vivo* イメージングには小動物専用 SPECT/CT 装置 (Bioscan 社) を用いた。

(3) SPECT 二核種同時測定のための基礎的検討

$^{99m}\text{Tc}$  (光電子ピークエネルギー 141keV) と  $^{111}\text{In}$  (171keV, 245keV) を用い、3 本の光電子ピーク計数を評価した。 Artificial neural network (ANN) を利用した 5 種の方法を設定し、それらの精度を比較検討した。

## 4. 研究成果

(1) EGFR-TKI 耐性化判定および第二世代 EGFR-TKI の標的結合性評価を目指した新規 SPECT プローブの開発

EGFR-TKI は肺癌に対する分子標的薬として注目されているが、著効例においても数年以内に耐性化することが問題となっている。EGFR の ATP 結合部位の変異 (T790M) が、ゲフィチニブ等の第一世代 TKI に対する耐性化の主な原因である。現在、このような T790M 変異をもつ受容体にも効果のある第二世代 TKI の開発が盛んに行われている。この第二世代 TKI の基本構造は第一世代 TKI とほぼ同様だが構造内に Michael アクセプターを持つことで T790M 変異受容体と結合することが可能となる。本研究では、第一世代 TKI に対する耐性化判定、および第二世代 TKI の標的結合能 (薬剤感受性) を評価できる SPECT プローブの開発を目指し、以下の分子設計による二種類のプローブを合成した。これらは EGFR 結合部位および錯体形成部位は同一で、Michael アクセプターの有無のみが異なる。

この構造の差異によって T790M 変異受容体への親和性の違いを出すことが出来るかを検討した。

図 1 にプローブの分子設計を示す。Michael アクセプター導入により EGFR 変異体への親和性が約 100 倍増強されるという報告に基づき、同一基本骨格を有するプローブ A、B の 2 種類を設計した。

(i) EGFR 結合部位：

既存の EGFR-TKI の構造を基に 4-anilinoquinazoline 骨格を選択した。(ii) 結合能調節部位：Michael アクセプターの有無により変異型 EGFR への親和性の違いを出すよう設計した。(iii) 錯体形成部位： $^{99m}\text{Tc}$  の導入を目指し、 $^{99m}\text{Tc}$ -carbonyl 錯体とした。

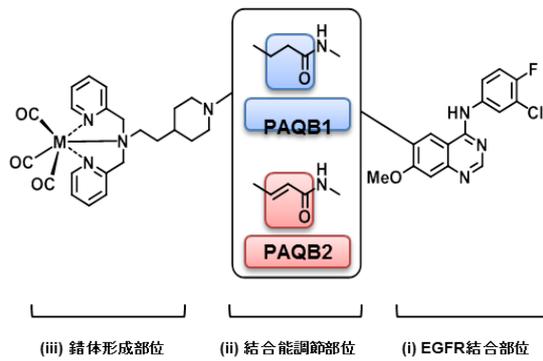


図 1 プローブの分子設計

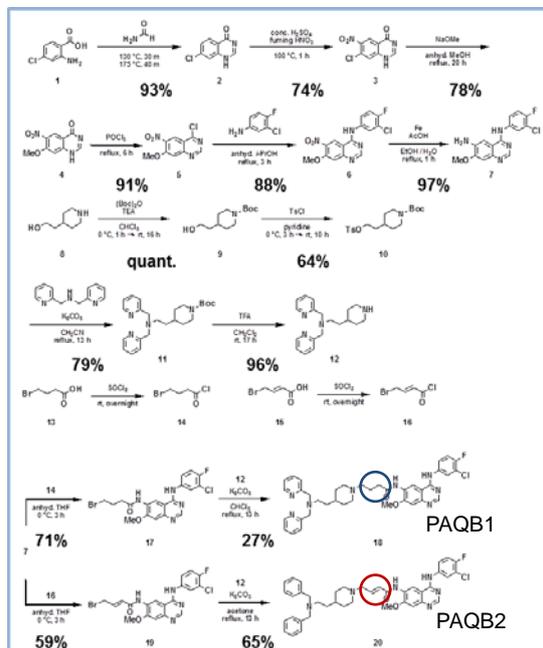


図 2 プローブの合成

この設計に基づき、図 2 の経路で配位金属結合前の 2 種のプローブを合成した。以後 Michael アクセプターを持たない第一世代型を PAQB1、

Michael アクセプターを導入した第二世代型を PAQB2 と呼ぶ。それぞれに  $^{99m}\text{Tc}$  および Re を結合させて実験に供した。 $^{99m}\text{Tc}$ -PAQB1 と Re-PAQB1、 $^{99m}\text{Tc}$ -PAQB2 と Re-PAQB2 はそれぞれ HPLC 上で同一の保持時間を示し、両者はほぼ同等の性質をもつものと推定された。

ゲフィニチブ耐性の細胞株 H1975 に対する  $^{99m}\text{Tc}$ -PAQB1 と  $^{99m}\text{Tc}$ -PAQB2 の取込の違いを評価した。後者の取込は前者に比べ有意に高いことが示された (図 3)

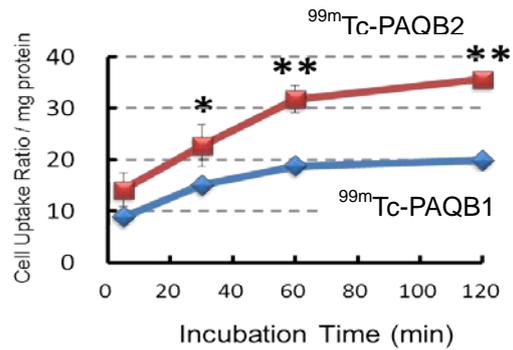


図 3 ゲフィニチブ耐性株 H1975 へ  $^{99m}\text{Tc}$ PAQB1/PAQB2 の取込

ゲフィニチブ耐性株 H1975、ゲフィニチブ高感受性株 II-18 および野生株 A431 に対する Re-PAQB1、Re-PAQB2 の増殖抑制効果を検討した結果、II-18 および A431 に対する作用には両者に差はなかったが、H1975 に対しては Re-PAQB2 のみで阻害作用が認められた (データ示さず)。さらに 3 種の細胞株において 2 種のプローブの EGFR の自動リン酸化阻害能を検討した結果、いずれの株でも Re-PAQB2 の方が阻害作用が強かったが、特に H1975 では Re-PAQB2 のみで阻害が認められた (図 4)。これらの結果より、Re-PAQB2 は T790M 変異によって耐性化を来した EGFR に結合でき、細胞への取込はこの結合を反映しているものと推察された。



図 4 Re-PAQB1/PAQB2 による EGFR リン酸化阻害

以上の検討より、新規 SPECT プローブ  $^{99m}\text{Tc}$ -PAQB1/PAQB2 の集積の相違により、EGFR の変異の有無、すなわち耐性化を判定することが可能

と考えられた。また、 $^{99m}\text{Tc}$ -PAQB2 は変異 EGFR にも結合でき、第二世代 EGFR-TKI の感受性予測にも有望と考えられた。

## (2) 腫瘍内低酸素環境を可視化する新規プローブの開発

固形がんには一般的に低酸素状態の部位が存在し、がんの悪性度、放射線治療や化学療法に対する抵抗性と強く相関する。腫瘍内低酸素環境の *in vivo* 可視化は、個々の患者の治療抵抗性予測や治療計画作成に貢献するとともに、分子標的薬投与後の早期効果判定に役立つものが考えられる。

低酸素イメージング剤には現時点では未だ実臨床の許可を受けたものはないが、臨床研究では  $^{18}\text{F}$ fluoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ FMISO) が汎用される。 $^{18}\text{F}$ FMISO は低酸素還元代謝により腫瘍内低酸素領域に集積するが、クリアランスが遅く、また正常組織への非特異的集積が高いため、可視化に必要な腫瘍/正常組織比を得るまでに、投与後長時間を要する。 $^{18}\text{F}$  の半減期は 110 分であり、投与後より早期に可視化出来るプローブの開発が望ましい。そこで我々は、(2-1)としてまず腫瘍内低酸素領域への高集積性と、高クリアランス能の両立を目指した新規な低酸素 PET プローブの開発を試みた。

### (2-1) 投与早期に高い腫瘍/正常組織比が得られる低酸素イメージングプローブの開発

ニトロイミダゾール化合物のうち、分子内に三級アミン構造を有するピモニダゾールはクリアランス速度が速いことが報告されており、これをリード化合物として、 $^{18}\text{F}$ Fluoropipenidazole ( $^{18}\text{F}$ FPINI) を設計、合成した(図 5)。

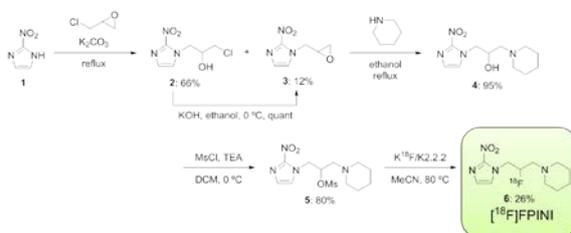


図 5  $^{18}\text{F}$ FPINI の分子設計および合成

まず  $^{18}\text{F}$ FPINI の低酸素選択的な細胞取込を評価した(図 6)。常酸素下に比べ、低酸素下では有意に細胞内に集積することが示された。

次に担がん動物に投与後の体内分布の経時変化

を  $^{18}\text{F}$ FMISO を対照として検討した。期待通り  $^{18}\text{F}$ FPINI の血中および筋肉からのクリアランスは  $^{18}\text{F}$ FMISO より早く、一方で腫瘍集積は若干低いものの、投与後 60 分で約 1%/g と比較的

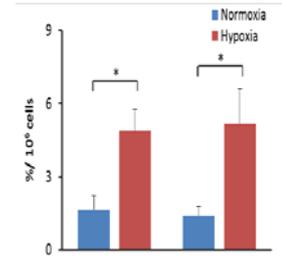


図 6  $^{18}\text{F}$ FPINI の低酸素細胞選択的集積

良好であることから、腫瘍/血液比、腫瘍/筋肉比は投与後早期から高い値を示した。投与後 4 時間で投与量の 60%以上が尿中に排泄されることも明らかとなった。PPIS による *in vivo* イメージングはこの分布の結果をよく反映し、投与後早期の腫瘍可視化に成功した(図 7)。

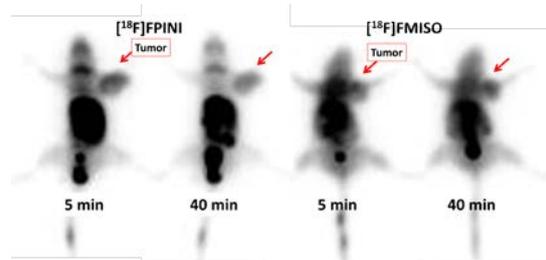


図 7 PPIS による *in vivo* イメージング

次に  $^{18}\text{F}$ FPINI の腫瘍集積が低酸素環境を反映しているものかを組織科学的に検討した(図 8)。オートラジオグラフィ (ARG) は  $^{18}\text{F}$ FPINI の腫瘍内分布を表し、ピモニダゾール免疫染色は低酸素部位を示す。(c)に示すように両者の分布はほぼ一致し、 $^{18}\text{F}$ FPINI の腫瘍内低酸素部位への選択的集積が認められた。

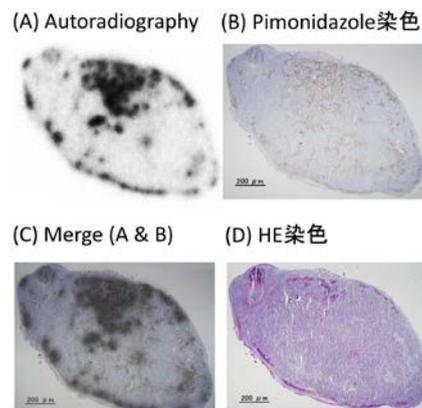


図 8  $^{18}\text{F}$ FPINI の腫瘍内低酸素部位への選択的

以上の結果より、 $^{18}\text{F}$ FPINI は投与早期に高い腫瘍/正常組織比が得られる低酸素イメージングプローブとして有望と考えられる。

(2-2)腫瘍内 HIF-1 $\alpha$  陽性領域可視化を目指した新規 SPECT プローブの開発

低酸素環境下では低酸素誘導因子 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) が発現し、腫瘍の悪性度を制御することが知られている。また、HIF1 $\alpha$  活性が存在する部位は [<sup>18</sup>F]FMISO や [<sup>18</sup>F]FPINI が示す低酸素領域より、より mild な低酸素状態であることが報告されており、より活動的ながん細胞が存在するとも予想される。従って、HIF1 $\alpha$  活性部位を可視化することは、薬物治療効果との相関を知る上でも重要である。近藤らは HIF1 $\alpha$  の酸素応答性部位と細胞膜透過性ペプチドを融合させた HIF1 ミミックタンパク質プローブを用いて、近赤外蛍光イメージングによって HIF1 $\alpha$  活性の可視化に成功している (*PLoS ONE* 5, e15736, 2010)。本研究では、この概念を元に、臨床応用が可能な核医学プローブの開発を進めた。また、次項目の 2 核種同時測定に展開するため、SPECT 核種での標識を検討した。図 9 にプローブの分子設計を示す。

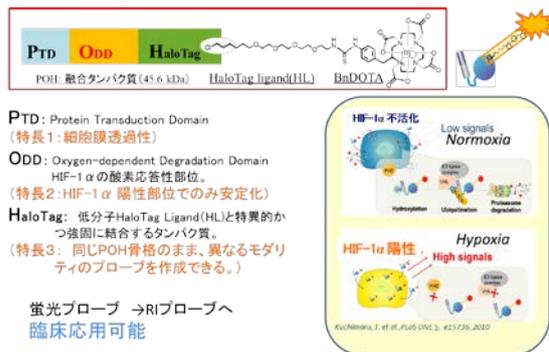


図9 プローブの分子設計

SPECT 核種 <sup>111</sup>In で標識するため、PTD-ODD 融合タンパク質に HaloTag を繋いで POH とし、HaloTag に対して強い親和性をもつ低分子化合物 HaloTag Ligand (HL) に <sup>111</sup>In と錯体を形成する配位子を結合させ、POH と HL 誘導体を結合させるという設計を行った。この概念の下、種々の検討を行い、HL-DOTA と HL-BnDOTA を合成して、<sup>111</sup>In を標識した上で、POH に結合させ、以下の検討に供した。

FM3A 担がんマウスで腫瘍および正常組織への集積の経時的変化を検討した。DOTA 型、BnDOTA 型いずれのプローブも速やかに血中から消失した。一方腫瘍への集積は、投与後 1 時間の時点で 1g あたり 2-4% であり、その後 24 時間にわたって、維持あるいはやや減少傾向を示した。バックグラウンドとなる血中や筋肉からのクリアランスが早い

ことから、腫瘍/血液比、腫瘍/筋肉比は 10 前後と良好な値を示し、イメージングの可能性が期待できると考えられた。一方、正常組織の中で肝臓および腎臓に投与直後から高い集積を示し、経時的に減少した。POH 骨格が同じにもかかわらず、BnDOTA 型の方が肝臓集積がやや低く、迅速に尿中・糞中へ排泄された。肝臓、腎臓への集積は常酸素下で分解したプローブからの <sup>111</sup>In 放出に依る非特異的なものと推察され、これを低減することは今後の課題と考えられた。他の組織への集積は軽微であった。

FM3A 担がんマウスに POH-HL-BnDOTA-<sup>111</sup>In を投与し、24 時間後に in vivo イメージングを行った。図 10 に示すように、腫瘍内の不均一な分布を in vivo で可視化することができた。組織化学検討から、HIF1 $\alpha$  活性との相関が強く示唆された。

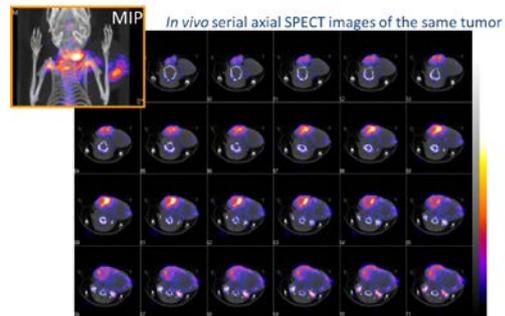


図10 HIF1 ミミックプローブによる in vivo イメージング

(3)SPECT 二核種同時測定の基礎的検討

<sup>99m</sup>Tc および <sup>111</sup>In の同時測定のため、散乱補正法に artificial neural network (ANN) を導入することを試みた。図 11 に示すような 5 種類の ANN を設定し、ファントムおよび実際の実験動物で測定、計算を行い、最も精度よく <sup>99m</sup>Tc/<sup>111</sup>In の真のカウントが得られる条件を検討した。<sup>99m</sup>Tc/<sup>111</sup>In の比によって、結果が異なった。動物実験の場合は、両核種の半減期の違いを加味する必要があり、実験を継続している。

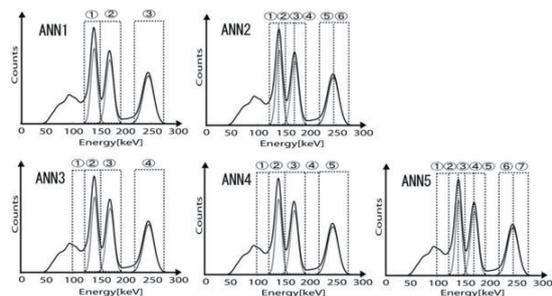


図11 ANNによる散乱補正法の検討

## まとめ

本研究では(1)薬物の標的への結合、(2)腫瘍内低酸素環境につき、各々を *in vivo* で可視化するプローブの開発を行い、有望な新規プローブを得た。また、これらを同時に観察しうる測定法の開発を進めた。今後はこれらを組み合わせて、分子標的薬が薬効に至るまでの複数の過程を可視化できるシステムの開発を推進する予定である。

## 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4件)

(1) Yoshimoto M, Hayakawa T, Mutoh M, Imai T, Tsuda K, Kimura S, Umeda IO, Fujii H, Wakabayashi K, *In vivo* SPECT imaging with <sup>111</sup>In-DOTA-c (RGDFK) to detect early pancreatic cancer in a hamster pancreatic carcinogenesis model, *J Nucl Med*, 査読有, 53(5), 2012, 765-771  
DOI : 10.2967/jnumed.111.099630

(2) Hirofumi Fujii, Masayuki Yamaguchi, Kazumasa Inoue, Yasuko Mutou, Masashi Ueda, Hideo Saji, Shinae Kizaka-Kondoh, Noriyuki Moriyama and Izumi O. Umeda, *In vivo* visualization of heterogeneous intratumoral distribution of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activity by the fusion of high resolution SPECT and morphological imaging tests, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 査読有, 2012, 2012, Article ID 262741  
DOI : 10.1155/2012/262741

(3) Umeda IO, Tani K, Tsuda K, Kobayashi M, Ogata M, Kimura S, Yoshimoto M, Kojima S, Moribe K, Yamamoto K, Moriyama N, Fujii H, High resolution SPECT imaging for visualization of intratumoral heterogeneity using a SPECT/CT scanner dedicated for small animal imaging, *Ann Nucl Med*, 査読有, 26 (1), 2012, 67-76  
DOI : 10.1007/s12149-011-0542-7

(4) Kimura S, Umeda IO, Moriyama N, Fujii H, Synthesis and evaluation of a novel <sup>99m</sup>Tc-labeled bioreductive probe for tumor hypoxia imaging, *Bioorg Med Chem Lett*, 査読有, 21 (24), 2011, 7359-7362  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.022>

[学会発表] (計20件)

(1) 服部久範、梅田泉、木村禎亮、吉本光喜、藤井博史、分子標的薬耐性化の判定を目指し

た新規 SPECT プローブの開発、日本薬学会第133 年会、2013 年 3 月 30 日、横浜

(2) Mitsuyoshi Yoshimoto, Takuya Hayakawa, Masayuki Yamaguchi, Sadaaki Kimura, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, Development of RGD-liposomes for MR imaging of pancreatic tumor, 2012 World Molecular Imaging Congress, 2012 年 9 月 8 日, Dublin, Ireland

(3) Koichi Ogawa, Shuko Abe, Yusuke Koike, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, Quantitative Estimation of Activity with an Artificial Neural Network for Multi-isotope SPECT Study, 2012 World Molecular Imaging Congress, 2012 年 9 月 5 日, Dublin, Ireland

(4) Mikako Ogawa, Izumi O. Umeda, Mutsumi Kosugi, Ayumi Kawai, Yasuhiro Magata, Development of <sup>111</sup>In-labeled phosphatidylserine liposomes for detection of atherosclerotic plaques, SNM 2012 annual meeting (米国核医学会議 2012 年年会), 2012 年 6 月 12 日, Miami, FL, US

(5) Sadaaki Kimura, Takuya Kuriyama, Yoshiki Kojima, Izumi O. Umeda, Noriyuki Moriyama, Hirofumi Fujii, A novel PET probe for tumor hypoxia imaging with excellent renal clearance, SNM 2012 annual meeting (米国核医学会議 2012 年年会), 2012 年 6 月 10 日, Miami, FL, US

(6) Shuko Abe, Koichi Ogawa, Yusuke Koike, Izumi O. Umeda, Hirofumi Fujii, Estimation of True Activity with An Artificial Neural Network for Multiple Isotope SPECT Study, 2012 World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2012 年 5 月 30 日, Beijing, China

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 泉 (UMEDA IZUMI)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・ユニット長

研究者番号 : 4 0 1 6 0 7 9 1

(2) 連携研究者

木村 禎亮 (KIMURA SADA AKI)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・研究員

研究者番号 : 1 0 5 8 5 0 2 9

山口 雅之 (YAMAGUCHI MASAYUKI)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・ユニット長

研究者番号 : 9 0 4 5 0 5 7 7

吉野 孝之 (YOSHINO TAKAYUKI)

独立行政法人国立がん研究センター・東病院・外来病棟医長

研究者番号 : 2 0 4 6 9 9 6 9