

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390296

研究課題名(和文) 線を用いたがん内用放射線療法実現に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Basic research program for targeted radionuclide cancer therapy using alpha-particle radiation

研究代表者

長谷川 純崇 (HASEGAWA, SUMITAKA)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・サブリーダー

研究者番号：60415437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：高い殺細胞効果を持つ放射線の線を用いた内用療法は新たながん治療法として期待されている。本研究で治療核種として有望な線放出核種At-211(アスタチン-211)の高効率製造法を確立した。また、At-211を胃がんで高発現しているHER2に対する特異的抗体でヒト胃がん細胞に送達させることにより、At-211がHER高発現胃がん細胞に対して顕著な殺細胞効果を示し、ヌードマウスに移植した皮下腫瘍に対しても長期にわたり抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。これらの結果により、将来的な臨床応用を視野に入れた線がんRI(=放射性同位元素)内用療法の生物学的基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：Targeted radionuclide therapy using alpha particle emitters is a promising anticancer therapy. We established a reliable method for the production of At-211, an alpha particle emitter that is a promising radionuclide for targeted radionuclide cancer therapy. We further demonstrated that At-211-labeled anti-HER2 antibody showed an effective killing of HER2-positive gastric cancer cells and tumor suppression in a xenograft mouse model. These data suggest that radioimmunotherapy using At-211 is a promising anticancer therapy to HER2-overexpressing tumors.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん

1. 研究開始当初の背景

(1) がん治療におけるRI 内用療法への期待:放射線がん治療への国民の期待は大きく、低侵襲性と機能形態温存が特徴である外照射がん放射線治療は、がん治癒率向上に大きく貢献してきた。しかし、局所療法であるため、病巣が散らばったがん(播種がん)や微小転移がんは適応外となることが多い。その難点を克服する放射線治療としてRI 内用療法が注目されている。RI 内用療法は、がん集積性の放射性核種(RI)およびその標識化合物を体内に投与し、がん組織や細胞を“内から”の放射線で破壊する放射線治療の一つである。特に病巣が散らばったがん(播種がん)や微小な転移がんに有効であり、化学療法でみられる顕著な副作用が比較的少ないことから将来的にがん治療の一つの有力な選択肢となることが期待されている。国内ではすでに甲状腺がんに対する放射性ヨード(I-131)内用療法やB細胞性リンパ腫に対するY-90-抗CD20抗体(ゼヴァリン)が臨床使用され、良い治療成績を収めている。

(2) 線放出核種:未来のRI がん内用療法:内用療法に応用可能な放射線には、線、線、オージェ電子などが挙げられるが、現在、ルーチンに臨床使用されているのは線のみである。線の利用は古くから認識されていたものの、最近まで現実的ではなかった。しかし、近年の放射化学の進歩により臨床応用に適した線放出核種の製造・供給が可能となり、特に欧米では線を用いた内用療法に高い関心が集まっている。欧米ではすでに線放出核種で標識した放射性医薬品の臨床応用や臨床試験が活発に行われつつあるのに対し、わが国はあまり高い関心が払われている状況ではなく完全に立ち遅れた状態となっている。

(3) 国内での線がん内用療法実現に向けて:わが国でも線利用がん内用療法を実施するためには、早急に研究基盤を整備し、臨床使用に向けた体制を構築することが必要である。そのための第1歩として、国内において効果的な核種製造法を確立し、そのがん細胞殺傷効果をごん生物学的に検証し治療の生物学的基盤を確立することが重要である。国内における線がん内用療法実現のための研究基盤を確立すべく本研究の提案に至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的の一つは高収率および高純度なAt-211の製造法確立である。At-211は線放出核種であり、線内用療法の治療核種として国際的にも有望と思われる核種候補の一つである。

(2) 本研究の目的として、At-211のがん細胞に対する生物効果の検証とその治療最適化研究が挙げられる。ヒトがん細胞における

At-211の生物効果、特に、殺細胞効果を検証し、更に、その治療最適化のための送達法を検討する。

3. 研究の方法

(1) At-211の製造と評価:Bi(ビスマス)約1グラムを標的として、放射線医学総合研究所に設置されている大型サイクロトロンAVF-930で加速した34 MeVの粒子(標的上で28.5 MeV)を10-13 μ Aで照射した。比較的低融点であるBiの熱融解を考慮し、照射は融解を許容しうる垂直照射法を採用した。At-211の単離回収は乾留法を用いた。作業者の被ばく低減を目的に、極少量の有機溶媒でAt-211を溶液の形で回収する遠隔自動化した回収装置を構築・利用した。

(2) 細胞核等を標的とした核移行促進抗体作製とそのがん細胞へのI-125およびIn-111送達評価:At-211をがん細胞に送達する手法の最適化のため、At-211と同じハロゲンであるRIのI-125、およびオージェ電子を放出し線同様高LET(線エネルギー付与)放射線による内用療法への展開が期待できるIn-111を用いて細胞送達法の予備検証を行った。送達のキャリア分子として、ヒト乳がんや胃がん等で高発現しているHER2分子に対する抗体のトラスツマブを用いた。更に、細胞核へのRI移行性を高める方策としてトラスツマブにSV40由来の核移行シグナル(NLS)を含む人工ペプチド(CGYPGPKKKRKVGG)を付加したトラスツマブNLSも用いた。トラスツマブNLSにおける付加ペプチド数はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で推定した。I-125の抗体への標識はクロロミンT法を用い、In-111はDTPAを介して抗体標識した。細胞はマウス3T3細胞にヒトHER2分子を過剰発現させた3T3-HER2細胞およびHER2を過剰発現しているヒト乳がん細胞SKBR3を用いた。I-125やIn-111の細胞および細胞核等への送達は細胞分画法にて細胞核等を分離し、その放射能をカウンターで測定した。また、抗体の細胞内への内在化についても細胞分画法を用いて評価した。更に、In-111標識体については、細胞生存検出試薬を用いて細胞生存率を評価した。

(3) At-211標識ヒトがん細胞特異的抗体の作製とその培養細胞および異種移植皮下腫瘍モデルマウスにおけるがん細胞への生物効果検証:At-211をがん細胞に特異的に送達させるため、送達キャリアとしてトラスツマブ抗体を用いた。抗体へのRI標識はN-succinimidyl 3-(trimethylstannyl)benzoate (m-MeATE)を用いて標識を行った。標識体はメタノール沈殿法で放射化学純度を評価し、HER2高発現ヒト転移性胃がん細胞NCI-N87細胞で細胞結合性を評価した。At-211標識抗体の培養細胞レベルでの殺細胞効果の検証は、At-211標識ト

ラスツズマブ (At-211 トラスツズマブ) を NCI-N87 細胞と反応させ、一定時間後に細胞数をカウントし殺細胞効果を調べた。At-211 標識抗体の異種移植皮下腫瘍モデルマウスにおける腫瘍抑制効果を検証する目的で At-211 トラスツズマブ (1-2.5 MBq) を異種移植皮下腫瘍モデルマウスに尾静脈投与し、経時的に腫瘍サイズと体重を測定した。異種移植皮下腫瘍は、ヌードマウスに 10^7 個の NCI-N87 細胞を皮下移植し作製した。

(4) 線計測およびシミュレーションによる線量評価：細胞に取り込まれた At-211 の放射能や吸収線量を評価するための検出器プロトタイプ開発、また、線量推定のためのシミュレーションを行った。

4. 研究成果

(1) At-211 の高効率・高純度かつ安全な製造法の確立：照射時の発熱により標的 Bi の融解が起こるものの、垂直照射法の採用により、収率を維持したまま比較的高いビーム強度 ($\sim 13 \mu\text{A}$) で At-211 を製造することが出来た。具体的には $2.2 \text{ GBq}/\mu\text{Ah}$ ($0.6 \text{ mCi}/\mu\text{Ah}$) のターゲット収率を入射粒子エネルギー 28.5 MeV で得ることに成功した。副生成核種の混入 (特に At-210, Po-210) は品質上大きな課題となるが、本製造法における At-211 の核種純度は、照射終了後 5 時間において 99% 以上を示した。入射粒子エネルギーを可能な限り低く抑え、標的の熔融を問題とせず大ビーム強度での照射を可能にしたことから、単回製造量として実用量と見なせる約 0.37 GBq の得量が得られることを確認した。この後の乾留回収では、操作性を失うことなく蒸留管の死容積を減少させるなどの方法を開発することで、付着する At-211 の割合を減らすことに成功し、At-211 の回収率を約 85% にまで高めることが出来た。

(2) 細胞核等を標的とした核移行促進抗体作製とそのがん細胞への I-125 および In-111 送達、生物効果評価：NLS ペプチドの抗体に対するモル比を変えることにより 2 種類のトラスツズマブ NLS を作製し、SDS ポリアクリルアミドゲル上の分子量変化により抗体あたり約 10 個および 20 個の NLS ペプチドが付加したトラスツズマブ NLS を作製した。I-125 でトラスツズマブ NLS およびトラスツズマブを標識し、3T3-HER2 細胞に 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1-6 時間で反応させたところ、細胞核 RI 量としてトラスツズマブでは投与 RI 量の 0.5-1% が核に移行した一方、抗体あたり 20 個の NLS ペプチドが付加しているトラスツズマブ NLS では 1.5% に増加していた。ペプチドの付加数依存的に核内への RI 移行は増加しており、NLS ペプチドの抗体への付加は RI を細胞核に送達する有効な手法と考えられた。しかし、標識抗体の細胞内在化の結果からは、数時間で抗体は細胞に取り込まれるものの

I-125 が抗体から遊離することが示唆された。同様の実験を In-111 標識体で行った。In-111 標識体では DTPA 付加のため、NLS ペプチド付加数は前述の抗体に直接ペプチドを結合させる反応系と比べて減少し、4 個および 10 個の NLS ペプチドが結合したトラスツズマブ-NLS を用いた。In-111 の核移行については、反応 1 時間後でトラスツズマブでは投与 RI 量のうち細胞に結合した RI の 30% が核に移行した一方、抗体あたり 10 個の NLS ペプチドが付加しているトラスツズマブ NLS では 45% に増加し、その差は統計学的に有意であった。更に、この標識体 230 kBq を SKBR3 細胞と 5-7 日間反応させたところ、In-111 をトラスツズマブで送達させるよりも有意に細胞生存率が減少することを明らかにした。

(3) At-211 トラスツズマブの作製：m-MeATE のスズ交換反応による標識法では約 45% の標識率であった。これは Lindegren らの報告 (JNM, 2008) に比べると低く、標識率の改善が今後の課題であると考えられた。At-211 標識トラスツズマブのメタノール沈殿法による放射化学純度は 97% 以上であった。標識抗体の NCI-N87 細胞への結合は細胞数 5×10^6 個で約 65% であり、In-111 で標識した場合とほぼ同等であることから、抗体活性は保持していると考えられた。

(4) At-211 標識トラスツズマブの培養細胞レベルでの殺細胞効果：At-211 標識トラスツズマブ 37 kBq との反応 7 日後で、NCI-N87 の細胞数は非処理対照群の細胞数の約 20% であった。更に 185 kBq では約 8% であり、顕著な殺細胞効果を示した。3.7 kBq では対照群とほとんど差は見られず、殺細胞効果における放射能依存性を示した。

(5) At-211 トラスツズマブの異種移植皮下腫瘍モデルマウスにおける腫瘍抑制効果：未処理および非標識トラスツズマブ投与 18 日後に皮下腫瘍サイズはそれぞれ約 3 倍および 2.5 倍に増大した一方、1, 1.5, 2.5 MBq の At-211 標識トラスツズマブ投与では、腫瘍サイズが 2 倍になるのに 50-80 日を有し、At-211 標識トラスツズマブの顕著な腫瘍抑制効果が認められた。なお、1 から 2.5 MBq の間では投与量依存的な抑制は見られなかった。2.5 MBq 投与マウスでは、投与約 10 日まで一時的な体重減少が見られたが、その後、体重は回復した。1 および 1.5 MBq の標識体投与マウスでは、未処理および非標識トラスツズマブ投与マウスと比べて明らかな体重変化は認められなかった。

(6) 線計測およびシミュレーションによる線量評価：プラスチックシンチレータをベースとした線検出器プロトタイプを完成した。シミュレーションによる線量推定研究では、低エネルギーの荷電粒子や電子の工

エネルギー付与を詳細にシミュレーションでできる Geant4-DNA を用いて、細胞や分子レベルでのシミュレーションを行った。成果の一例としては、細胞核内に一様に DNA が存在していると仮定して、In-111 のオージェ電子の輸送から二重鎖切断数や一重鎖切断数推定を行った。DNA の主鎖近傍にエネルギー付与があった場合、しきい値を決めて切断するかを判定するものである。また 10 塩基内に二つの切断があった場合を二重鎖切断としている。これらは文献から得られる実験に基づいた値であるが、これにより核に In-111 があった場合、一崩壊あたり 1.8 個の二重鎖切断ができることが判明した。

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)

Nagatsu K, Minegishi K, Fukada M, Suzuki H, Hasegawa S, Zhang MR
Production of ²¹¹At by a vertical beam irradiation method
Appl Radiat Isot. 94, 363-371 (2014)
査読有
DOI: 10.1016/j.apradiso.2014.09.021

[学会発表](計 4 件)

長谷川純崇、古川高子、佐賀恒夫
核移行抗体による効果的な In-111 オージェ電子放射免疫療法：培養ヒトがん細胞における生物効果
第 54 回日本核医学会学術総会、2014 年 11 月 6-8 日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）

Hasegawa S, Furukawa, T, Saga T
Auger electron radioimmunotherapy using ¹¹¹In-nuclear localizing anti-HER2 antibody: A cell biological study
XI Congress of World Federation of Nuclear Medicine and Biology, 2014 年 8 月 27-31 日、Cancun (Mexico)

長谷川純崇

RI 内用療法の新展開
第 53 回日本核医学会学術総会、2013 年 11 月 8-10 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

長谷川純崇、古川高子、佐賀恒夫
RI 内用療法のための核移行促進抗体の作製
第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 純崇 (HASEGAWA, Sumitaka)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・サブリーダー

研究者番号：60415437

(2) 研究分担者

吉井 裕 (YOSHII, Hiroshi)
独立行政法人放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・主任研究員
研究者番号：20334047

永津 弘太郎 (NAGATSU, Kotaro)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員
研究者番号：30531529

佐賀 恒夫 (SAGA, Tsuneo)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・プログラマリーダー
研究者番号：40273445

(3) 連携研究者

吉井 幸恵 (YOSHII, Yukie)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員
研究者番号：10397242

松本 孔貴 (MATSUMOTO, Yoshitaka)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：70510395

高田 真志 (TAKADA, Masashi)
防衛大学校・教授
研究者番号：50291109

平野 祥之 (HIRANO, Yoshiyuki)
群馬大学・重粒子線医学研究センター・助教
研究者番号：00423129