

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670011

研究課題名(和文) 内用放射線治療の効果予測・評価のためのチェレンコフ光インビボイメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel Cherenkov imaging method for evaluating the effect of internal radiation therapy

研究代表者

佐治 英郎 (Hideo, Saji)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40115853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：内用放射線治療の効果予測のためのチェレンコフ光インビボイメージング法の開発を目的として、EGFRを標的とする抗体を線放出核種であるCu-64およびY-90にて標識したプローブを作製し、担がんマウスに投与してチェレンコフ光イメージングを実施した。その結果、どちらの核種も放射能の体内分布をイメージングできたが、腫瘍診断の観点では、半減期が長く、72時間後までの放射能分布を測定できるY-90標識抗体の場合に、腫瘍を明瞭に描出した。また、そのシグナル値は生体内放射能分布と相関したことから、線放出核種を用いる内用放射線治療用薬剤の体内動態をチェレンコフ光イメージングにより予測できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish a novel in vivo Cherenkov imaging methods for evaluating the effect of internal radiation therapy. Anti-EGFR monoclonal antibody was labeled with Cu-64 and Y-90, and in vivo Cherenkov imaging was performed in tumor-bearing mice. In vivo biodistribution of radioactivity was detected by Cherenkov imaging for both probes, but for tumor imaging, antibody labeled with Y-90, which has long half-life compared to Cu-64, clearly visualized tumor tissues. Signal intensity in each tissue was correlated with in vivo biodistribution of radioactivity, therefore, Cherenkov imaging has a potential for predicting biodistribution of 90Y-labeled antibody for evaluating the effect of internal radiation therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：イメージング チェレンコフ光

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療学分野におけるテーラーメイド医療の機運の高まりの中で、がんの悪性化に深く関与する特定分子の機能を狙い撃つ分子標的治療への期待が高まっており、⁸⁹Sr、⁹⁰Yなどの治療用RI(高エネルギーβ線放出核種)で標識した分子標的治療薬を用いる内用放射線治療もそのひとつとして注目されている(*Cancer Control* 2013;20:60)。従来内用放射線治療には¹³¹I が用いられてきたが、¹³¹I はβ線と同時に体外計測可能なγ線を放出するため、このγ線を対象としてインビボイメージングすることで効果予測が行われてきた。しかし、近年医療従事者への被曝の観点から、特に高線量を用いる内用放射線療法においてはγ線を放出しない純β線放出核種の利用が注目されてきている。そこで、申請者はRIイメージングと光イメージングにおける多くの実績(*J Med Chem in press, Nanomedicine in press* など)を背景に、放出放射線の測定では体外イメージングができない純β線放出核種の体内分布を純β線放出核種が生体内において生体構成成分の原子との相互作用により生じるチェレンコフ光を体外から捉えれば、その治療効果の予測および評価を光の手法により簡便に達成し得るとの着想を得た。

高エネルギーβ線放出核種が生じるチェレンコフ光は液体シンチレーションカウンターによりシンチレーターを用いずに測定できることから環境中の線量測定に用いられてきた。本研究は、近年の光計測技術の発展によりヒト生体内で生じる微弱なチェレンコフ光が測定可能となったこと(*J Nucl Med* 2014; 55:1)に注目し、これを有効に活用すれば、治療薬そのものが内包する第二の物理情報を治療効果予測・評価に外挿し得るという斬新なアイデアを着想の動機としている。

2. 研究の目的

本課題は、がんの内用放射線治療に用いられる高エネルギーβ線放出核種の放出放射線が生体内において生体構成成分の原子との相互作用により生じるチェレンコフ光の三次元分布を光イメージングの手法により検出・解析することで、透過性の問題から放射線を測定対象とした場合にはできないβ線放出核種の体内分布動態の体外からの非侵襲的かつ定量的な測定法を開発し、その治療効果の予測および評価のための方法としての原理基盤を構築することを目的とする。

具体的には、ファントム、皮下移植担がんモデルを用いて、臨床利用されている代表的な純β線放出核種(⁹⁰Y)より生じるチェレンコフ光を捉え治療効果(実効線量)との関連を解明する。本研究はβ線による治療効果を同一薬剤が生じるもう一つの物理事象で評価することを目指す挑戦的な研究課題であり、がん治療学分野におけるテーラーメイド医療の発展に寄与し得る。

3. 研究の方法

(1) ⁶⁴Cuおよび⁹⁰Y標識抗体の合成

本研究では、がんの内用放射線治療に用いることのできる高エネルギーβ線放出核種を対象として計画した。そこで、現在臨床で用いられている⁹⁰Yを対象としたが、まずは基盤研究として、わが国では現在は臨床使用されていないものの、海外での使用経験があつて将来わが国でも利用が期待されており、かつ現段階で入手が容易な⁶⁴Cuを用いて、分子標的チェレンコフ光イメージング実験を中心に進めた。

分子標的薬の母体分子としては、Epidermal Growth Factor Receptorに結合する抗EGFR抗体(Panitumumab)を選択した。リン酸緩衝液(0.1 M, pH8.6)中、Panitumumab(1 mg)にp-SCN-Bn-DOTA(94.3 μg, 20eq)を加え、37℃で6時間インキュベートした。限外濾過フィルター(Amicon Ultra-4(30 kDa))を用いて精製し、DOTA結合Panitumumabを得た。

続いて、⁶⁴CuCl₂(39 MBq, 0.5 mL)と混和し、酢酸バッファー(0.1 M, pH6.0)中、40℃で30分間インキュベートした。その後限外濾過フィルターを用いて精製した。放射化学的純度はサイズ排除カラム(PD-10カラム)を用いて算出した。⁹⁰Y標識体はDOTA結合Panitumumabと⁹⁰YCl₃を混和し、40℃で1時間半インキュベートした後、⁶⁴Cuと同様の精製操作を行うことで合成した。

(2) ファントム溶液を用いたチェレンコフ光の定量性評価

⁶⁴CuCl₂の段階希釈溶液(18.5 - 370 kBq / 300 μL 生理食塩水)を調製し、96ウェルプレートに加えた後、IVISを用いて(Ex: Blank, Em: Open, Exposure time: 1 min)チェレンコフ光を測定した。

(3) 体内分布実験およびチェレンコフ光イメージング実験

担がんマウスはBalb/cヌードマウスにA431細胞を移植することにより作製した。担がんマウスの尾静脈より⁶⁴Cu標識Panitumumab(約1.8MBq)を投与し、投与24時間後にIVISを用いて(Ex: Blank, Em: Open, Exposure time: 5 min)撮像した。撮像後、マウスを麻酔下にて安楽死させた。血液、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、腸、膵臓、脾臓、筋肉、腫瘍を摘出し、それぞれの湿重量測定、γカウンタによる放射能測定を行った。実験期間中、水・餌は自由に与えた。放射能集積は、組織1gあたりの投与量に対する割合%ID/g(%injected dose/g)と、組織あたりの投与量に対する割合%ID/organとして算出した。

⁹⁰Y標識Panitumumabについては、投与24時間および72時間後にIVISによる撮像実験

を実施し、72 時間後の時点でマウスを屠殺、生体内放射能分布を上記の方法により評価した。

4. 研究成果

(1) ^{64}Cu および ^{90}Y 標識抗体の合成

Panitumumab 1 分子あたりの DOTA の導入数は約 1.8 であった。 ^{64}Cu 標識 Panitumumab は放射化学的収率 86%、放射化学的純度 99% 以上で得た。また、 ^{90}Y 標識 Panitumumab は放射化学的収率 91%、放射化学的純度 92% 以上で得た。

(2) ^{64}Cu のファントム溶液を用いたチェレンコフ光の定量性評価

$^{64}\text{CuCl}_2$ の段階希釈溶液を調製し、IVIS にてチェレンコフ光を検出した(図1)。 $^{64}\text{CuCl}_2$ の濃度に依存したシグナルを観測した ($r^2=0.93$)。ただし、濃度の低い範囲においてはシグナルが微弱であり、イメージングを達成するためには、およそ 100-200kBq 程度の放射エネルギーが必要であることが示された。

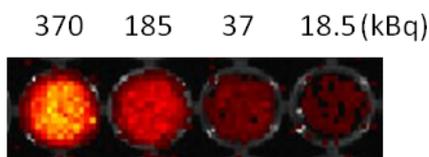


図 1. ファントムイメージング実験

(3) ^{64}Cu 標識、 ^{90}Y 標識 Panitumumab の体内分布実験およびチェレンコフ光イメージング実験

(2) の ^{64}Cu のファントム溶液中でのチェレンコフ光の定量性評価実験によるチェレンコフ光イメージングに必要な放射能に関する結果をもとに、 ^{64}Cu 標識 Panitumumab の投与量を設定し、これを腫瘍移植マウスに投与してインビボチェレンコフ光イメージング実験を行うとともに、その結果を評価するために臓器摘出法による放射能の生体内分布の定量評価を行った(図2)。

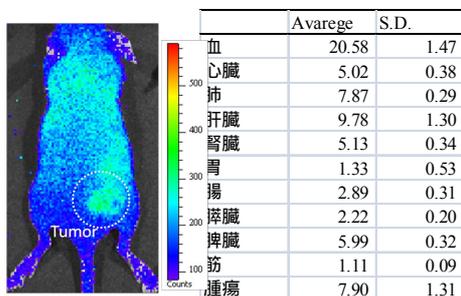


図 2. ^{64}Cu 標識 Panitumumab を用いた *In vivo* チェレンコフ光イメージング実験と体内分布評価(投与 24 時間後)

その結果、図 2 に示すように、 ^{64}Cu 標識 Panitumumab は投与 24 時間後に EGFR 陽性 A431 腫瘍を描出することには成功したが、体内分布実験データから明らかなように血

液との比が低く、コントラストの改善が必要であった。以上の結果から、 ^{64}Cu 標識 Panitumumab の場合には、1 日より長い投与後後期(数日後)での撮像が有効であることが示されたが、 ^{64}Cu は物理的な半減期が約 12 時間と短く、このような長い時間後の撮像は困難であり、血中に長く滞留する抗体を用いたチェレンコフイメージングを実施するためには、より半減期の長い核種の使用が必要であると考えられた。

そこで、半減期が約 2.8 日と ^{64}Cu の約 6 倍の半減期を有する ^{90}Y にて標識した Panitumumab を用いた検討を行った。その結果、図 3 に示したように、腫瘍を明瞭にイメージングすることに成功し、コントラストの指標となる腫瘍対血液比は 2.3、腫瘍対筋肉比は 25.6 であり、 ^{64}Cu 標識体(腫瘍対血液比 0.4、腫瘍対筋肉比 7.1)と比較して有意に高い値を示した。

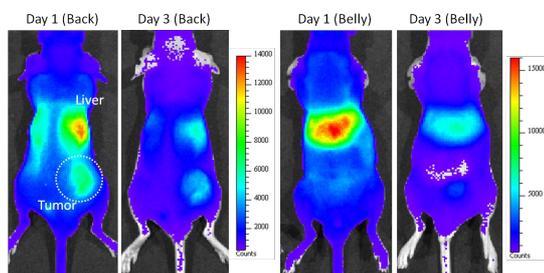


図 3. ^{90}Y 標識 Panitumumab を用いた *In vivo* チェレンコフ光イメージング実験(投与 24、72 時間後)(左:背側、右:腹部側)

	Average	S.D.
血	2.46	0.42
心臓	1.18	0.23
肺	1.84	0.24
肝臓	11.02	0.48
腎臓	3.21	0.21
胃	0.38	0.03
腸	0.31	0.06
膵臓	0.33	0.07
脾臓	23.34	2.04
筋	0.22	0.08
腫瘍	5.63	1.12

図 4. 担がんマウスにおける ^{90}Y 標識 Panitumumab の生体内分布

さらに、イメージング実験終了後、臓器を摘出し、*Ex vivo* イメージングを実施した(図5)。その結果、腫瘍において、肝臓を除く他の全ての臓器と比較して高いシグナルを認めた。

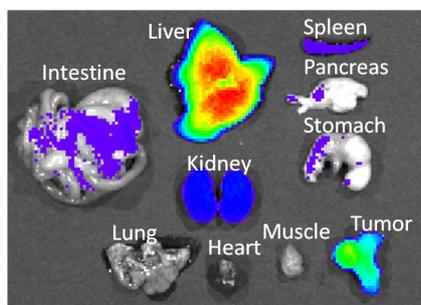


図 5. ^{90}Y 標識 Panitumumab を用いた *Ex vivo* チェレンコフ光イメージング実験(投与 72 時間後)

以上のことから、⁹⁰Y 標識 Panitumumab を用いて担癌マウスにおけるインビボチェレンコフ光イメージングによる腫瘍イメージングに成功した。また、ファントム実験の結果より、シグナル値を基に放射能の集積量を予測できる可能性を示した。今後治療実験とリンクさせた検討を実施する必要があるが、インビボにおいてチェレンコフ光シグナルより ⁹⁰Y 標識抗体の腫瘍集積量を算出することにより、治療効果を予測できる可能性を示した。

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)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byotai>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐治 英郎 (SAJI, Hideo)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：4 0 1 1 5 8 5 3

(2) 研究分担者

木村 寛之 (KIMURA, Hiroyuki)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：5 0 4 3 7 2 4 0

天満 敬 (TEMMA, Takashi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・室長

研究者番号：9 0 3 7 8 7 8 7

(3) 連携研究者

小野 正博 (ONO, Masahiro)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：8 0 3 3 6 1 8 0

佐野 紘平 (SANO, Kohei)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：0 0 5 4 6 4 7 6