

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18390331  
 研究課題名（和文） シグナル伝達を指標にした分子イメージングによる癌分子標的薬剤治療効果予測法の開発  
 研究課題名（英文） Prediction of cancer therapeutic effect with molecular targeting agents by molecular imaging of the signal transduction.  
 研究代表者  
 吉本 光喜（YOSHIMOTO MITSUYOSHI）  
 金沢大学・保健学系・助教  
 研究者番号：00345638

## 研究成果の概要：

本研究では、キナゾリンを母体化合物とする種々のヨウ素又は臭素誘導体の合成を行った。これらの化合物は EGFR 高発現を示す A431 細胞に対し増殖阻害効果を示した。さらに、ヨウ素誘導体である IPHY や IPYK は EGFR-TK に対して高い親和性と選択性を示し、また、体内分布実験においても腫瘍への高集積を確認した。これらのことから、IPHY と IPYK に EGFR-TK イメージング剤としての有用性が確認された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2007 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	11,600,000	3,480,000	15,080,000

## 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：がん，分子イメージング，治療効果予測，EGFR-TK

## 1. 研究開始当初の背景

近年、トランスレーショナルリサーチの重要性が活発に議論されており、癌研究においてもその必要性が望まれている。2004 年に、肺癌における EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor：上皮成長因子受容体) 遺伝子の突然変異とゲフィチニブ(イレッサ<sup>®</sup>)感受性との関連が報告され、話題となった。EGFR は二量体を形成すると、細胞内ドメインのチロシンキナーゼがお互いのチロシン残基をリン酸化(自己リン酸化)することにより、細胞増殖、血管新生、浸潤・転移の誘導、アポトーシスの抑制に寄与すると考えられているこ

とから、癌治療における標的分子として注目されている。ゲフィチニブは EGFR のチロシンキナーゼドメインへの ATP の結合を競合的に阻害し、自己リン酸化を抑制することから、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤として 2002 年 7 月に世界に先駆けて本邦で進行非小細胞肺癌に対する承認が得られた分子標的薬剤である。ゲフィチニブは既治療の進行非小細胞肺癌に対して奏効率が約 18% であるが、その中に投与後早期から劇的な効果を表す症例が見られた。その一方で、発症後の死亡率の高さから、間質性肺炎が重要な副作用として注目された。ゲフィチニブの治療効果予測を行うことができれば、不要な投与を減らすこ

とにより、副作用の危険性を回避するだけでなく、医療経済効果が期待できる。

## 2. 研究の目的

Positron Emission Tomography (PET) や Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) を用いた分子イメージング法は、CT や MRI などの形態診断法とは異なり、分子イメージング剤 (放射性医薬品) を用いて遺伝子やタンパク質の発現又はその働きを画像化する非侵襲的かつ全身検索可能な診断法である。本研究課題は EGFR チロシンキナーゼ活性を評価し得る分子イメージング剤を新たに開発し、ゲフィチニブを始めとする EGFR チロシンキナーゼ阻害剤の治療効果予測を可能にする分子イメージング法の構築を目的とする。

## 3. 研究の方法

キナゾリン骨格を有する化合物がレセプターチロシンキナーゼに親和性を有していることから、本研究では放射性ヨウ素や臭素で標識可能なキナゾリン骨格を母体化合物とする種々の化合物を新たにドラッグデザインし、合成を行った。得られた化合物は、NMR、高分解マススペクトルなどを用いてその構造確認を行った。

新規誘導体及びゲフィチニブについて、MTS アッセイにより EGFR 高発現を示す A431 に対する細胞増殖抑制効果を調べ、50%増殖阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) を算出し、腫瘍細胞に対する薬剤感受性の指標とした。

細胞膜画分を用い、ヨウ素誘導体の EGFR-TK に対する結合親和性 ( $K_d$  値と  $B_{max}$ ) について検討を行った。結合実験は、種々の濃度 (0.3 ~ 40nM) の PD153035 存在下で  $^{125}I$  標識新規誘導体の結合量を測定し、そのデータをもとに結合曲線を作成する。なお、非特異的結合量 (Non-specific Binding) は PD153035 (final 10 $\mu$ M) 存在下で測定し、全結合量 (Total Binding) から非特異的結合量を差し引いた値を特異的結合量 (Specific Binding) とした。そして、グラフより得た最大結合量  $B_{max}$ 、解離定数  $K_d$  及び各細胞の EGFR チロシンキナーゼ発現量を比較検討する。また、市販の測定キット及び [ $^{32}P$ ]ATP を用いて、新規誘導体の EGFR チロシンキナーゼのリン酸化阻害能を測定した。阻害能は 100pM ~ 10  $\mu$ M の濃度の薬物存在下でリン酸化能を測定し、50%阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) 値として求めた。比較として、代表的な EGFR チロシンキナーゼ選択的阻害剤である PD153035 を用いた。

培養細胞系において、新規化合物の

EGFR-TK に対する選択性について確認を行った。さらに、ウエスタンブロッティングにより、本研究で使用した腫瘍細胞 (A431, A549, H1650, H1975, H3255) の EGFR 及び EGFR-TK 発現量を解析した。

担癌モデルマウスを用いて放射性ヨウ素誘導体の体内動態解析を行った。尾静脈より標識体を投与し、投与 1, 4, 24 時間後の各臓器及び腫瘍における重量集積率を算出した。

## 4. 研究成果

新規 EGFR-TK イメージング剤の開発を目的とし、種々の 4-フェノキシキナゾリン誘導体の開発を行った。まず、各誘導体の出発原料となる 3,4-Diethoxy anthranilic acid を大量に合成した。この出発原料から、フェノキシ基の 3 位にヨウ素又は臭素を導入したハロゲン化フェノキシキナゾリン誘導体を新規合成した。放射性ハロゲンでの標識を可能にするために、標識部位にトリブチルスズ基を導入した標識前駆体を合成した。有機スズヨウ素交換反応により放射性ヨウ素又は、放射性臭素標識を行い、標識体の分離精製を HPLC により行った。標識体の放射化学的純度は 99% 以上であった。

本研究課題で使用するヒト癌細胞の EGFR 及びリン酸化 EGFR (phospho-EGFR) の発現量をウエスタンブロッティングにより解析を行った結果、A431 と H3255 が最も高い発現を示したが、他の細胞の発現量は低くまた、細胞間で大きな差は認められなかった。MTS アッセイの結果から、EGFR 高発現を示した A431 や H3255 はゲフィチニブや新規誘導体に対して高感受性を示した。

A431 細胞膜画分を用いて、EGFR チロシンキナーゼリン酸化阻害能及び結合実験の結果、ヨウ素誘導体の中で、IPHY 及び IPYK が高いリン酸化阻害能と EGFR-TK に対する結合親和性を有していることが明らかとなった。各細胞のゲフィチニブ感受性と新規誘導体の細胞集積との関係を明らかにするために、今後全ての細胞に対する IPHY と IPYK の結合親和性について明らかにする予定である。

担癌マウスを用いて [ $^{125}I$ ]IPHY の体内動態について検討を行った。 [ $^{125}I$ ]IPHY の血中放射能は低く、投与 1 時間後で 0.77% であった。また、投与 24 時間後では 0.05% と非常に低く、速やかにクリアランスされることが確認された。 [ $^{125}I$ ]IPHY は正常組織において肝臓と腸に最も高い集積を示した。甲状腺への集積は時間経過に伴い上昇が見られたことから、脱ヨウ素化していることが確認された。腫瘍への集積は、ウエスタンブロッティングにより、EGFR と phospho-EGFR の高発現が確認さ

れた A431 や H3255 に投与 1 時間後においてそれぞれ 1.56%ID/g、2.04%ID/g と高い集積を示した。このことから、 $[^{125}\text{I}]$ IPHY の腫瘍への集積は、EGFR 発現量を反映していることが確認された。これらの結果の一部を、日本分子イメージング学会や日本核医学会学術総会において発表し、大きな関心が得られた。

これらの結果から、 $[^{125}\text{I}]$ IPHY は EGFR 発現量を反映する優れた EGFR-TK イメージング剤であることが示唆され、EGFR 発現量に基づく治療効果予測は可能であると考えられた。

A431 と H3255 は共に EGFR 高発現を示すが、H3255 は EGFR-TK ドメインに遺伝子変異を有しており、H3255 がよりゲフィチニブに対して高感受性を示す。しかしながら、 $[^{125}\text{I}]$ IPHY の A431 と H3255 への集積は同程度であり、遺伝子変異による違いを示すような動態を示さなかった。今後は、他のイメージング剤 (IPYK や臭素誘導体等) を用いて遺伝子変異を反映するイメージング剤としての評価を行い、治療効果予測方法を確立すると共に、薬剤感受性とイメージング剤の化学構造との関係についても明らかにしたい

## 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 20 件)

Ishida Y, Kawai K, Magata Y, Yoshimoto M, (他 7 人, 2, 7 番目): Differential expression of Fos and Zif268 in the nigrostriatal system after methamphetamine administration in a rat model of Parkinson's disease. *Synapse*, 62(12): 920-6, 2008. 査読有

Yoshimoto M, Kawai K, (他 5 人, 1, 7 番目): Integrin-targeting radionuclide therapy and imaging with monomeric RGD peptide. *Int. J. Cancer*, 123(3): 709-15, 2008. 査読有

Nishio T, Yoshimoto M, Kawai K, (他 3 人, 5, 6 番目): Influences of haemodialysis on the binding sites of human serum albumin: possibility of an efficacious administration plan using binding inhibition. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 23(7): 2304-10, 2008. 査読有

Ogawa K, Kawai K, Saji H, (他 6 人, 3 番目): Usefulness of Competitive Inhibitors of Protein Binding for Improving the Pharmacokinetics of  $^{186}\text{Re}$ -MAG<sub>3</sub>-conjugated Bisphosphonate ( $^{186}\text{Re}$ -MAG<sub>3</sub>-HBP), an Agent for Treatment of Painful Bone Metastases. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, in press, 2008. 査読有

Akhter N, Kinuya S, (他 5 人, 7 番目): Regional wall thickening in gated myocardial perfusion SPECT in a Japanese population: effect of sex, radiotracer, rotation angles and frame rates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35(9): 1608-15, 2008. 査読有

Akhter N, Kinuya S, (他 5 人, 5 番目): A change of in vivo characteristics depending on specific activity of radioiodinated (+)-2-[4-(4-iodophenyl)piperidino]cyclohexanol [(+)-pIV] as a ligand for sigma receptor imaging. *Nucl. Med. Biol.*, 35(1): 29-34, 2008. 査読有

Hirata M, Ohmomo Y, (他 4 人, 1, 6 番目): Evaluation of radioiodinated 1-[2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethyl]-4-(2-iodophenylpropyl)piperazine as a tumor diagnostic agent with functional sigma receptor imaging by single photon emission computed tomography. *Biol. Pharm. Bull.*, 31(5): 879-83, 2008. 査読有

Nakajima S, Yoshimoto M, Kawai K, (他 8 人, 6, 11 番目): Pharmacokinetics of 3- $[^{125}\text{I}]$ iodo-alpha-methyl-L-tyrosine, a tumor imaging agent, after probenecid loading in mice implanted with colon cancer DLD-1 cells. *Nucl. Med. Biol.*, 34(8): 1003-8, 2007. 査読有

Shikano N, Yoshimoto M, Kawai K, (他 7 人, 7, 10 番目): Transport of D-[1- $^{14}\text{C}$ ]-amino acids into Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells: implications for use of labeled d-amino acids as molecular imaging agents. *Nucl. Med. Biol.*, 34(6): 659-65, 2007. 査読有

Akhter N, Kinuya S, (他 4 人, 4 番目): In vivo characterization of radioiodinated (+)-2-[4-(4-iodophenyl)piperidino] cyclohexanol as a potential sigma-1 receptor imaging agent. *Nucl. Med. Biol.*, 34(6): 697-702, 2007. 査読有

Kinuya S, (他 2 人, 1 番目): Airway complication occurring during radioiodine treatment for Graves' disease. *Ann Nucl Med.*, 21(6): 367-9, 2007. 査読有

Li Y, Yang H, Kinuya S, (他 8 人, 10 番目): Changes in the levels of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes after strontium-89 chloride therapy for painful bone metastases in patients correlate with treatment efficacy. *Cancer Biother Radiopharm.*, 22(3): 367-73, 2007. 査読有

Ogawa K, Kinuya S, (他 7 人, 5 番目): Therapeutic effects of a  $^{186}\text{Re}$ -complex-

conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain in an animal model. *J. Nucl. Med.*, 48(1): 122-7, 2007. 査読有

Kinuya S, (他 9 人, 1 番目): Intraperitoneal radioimmunotherapy to treat the early phase of peritoneal dissemination of human colon cancer cells in a murine model. *Nucl. Med. Commun.*, 28(2): 129-33, 2007. 査読有

Yoshimoto M, Kinuya S, Kawai K, (他 3 人, 1, 2, 6 番目): Radio-iodinated VEGF to image tumor angiogenesis in a LS180 tumor xenograft model. *Nucl. Med. Biol.*, 33(8): 963-9, 2006. 査読有

Shikano N, Yoshimoto M, Kawai K, (他 7 人, 6, 10 番目): Detection of maleate-induced Fanconi syndrome by decreasing accumulation of <sup>125</sup>I-3-iodo-alpha-methyl-L-tyrosine in the proximal tubule segment-1 region of renal cortex in mice: a trial of separate evaluation of reabsorption. *Ann. Nucl. Med.*, 20(3): 175-81, 2006. 査読有

吉本光喜, RGD ペプチドを利用した腫瘍イメージング. 北陸地域アイソトープ研究会誌, 8: 27-30, 2006. 査読無

川井恵一, 吉本光喜, (1, 2 番目): Post-FDG を目指した新規腫瘍診断用 PET 製剤の開発動向. 日本放射線技術学会雑誌, 62(6): 764-70, 2006. 査読無

Kinuya S, (他 3 人, 1 番目): Respiratory distress caused by radioiodine therapy in patients with differentiated thyroid cancer. *Ann. Nucl. Med.*, 20(7): 99-502, 2006. 査読有

Kinuya S, (他 9 人, 1 番目): <sup>99m</sup>Tc-sestamibi to monitor treatment with antisense oligodeoxynucleotide complementary to MRP mRNA in human breast cancer cells. *Ann. Nucl. Med.*, 20(1): 29-34, 2006. 査読有

[学会発表](計 8 件)

木内智美, 吉本光喜, 平田雅彦, 大桃善朗, 川井恵一. EGFR-TK イメージング剤 (IPHY) による Gefitinib 感受性の評価, 第 48 回日本核医学会総会, 2008.10.24-26, 幕張

Yoshimoto M, Hirata M, Kawai K, Ohmomo Y. Estimation of Radioiodinated IPHY as an Imaging Agent for Assessment of EGFR-TK Activity, 2008 World Molecular Imaging Congress, 2008.9.10-13, Nice (France)

吉本光喜, 木内智美, 平田雅彦, 大桃善朗, 西井龍一, 川井恵一. [<sup>125</sup>I]IPHY による Gefitinib の感受性予測, 第 3 回日本分

子イメージング学会, 2008.5.22-23, 大宮  
加川信也, 西井龍一, 清野泰, 小川数馬, 東達也, 岸部喜彦, 岩崎甚衛, 吉本光喜, 川井恵一, Juri Gelovani. EGFR-TK 阻害剤の治療効果予測を目的とした I-mIPQA-PET 診断薬の基礎的検討, 第 3 回日本分子イメージング学会, 2008.5.22-23, 大宮

小川数馬, 柴和弘, 吉本光喜, 鷲山幸信, 絹谷清剛, 川井恵一, 森厚文. 放射性ヨウ素標識ベサミコール誘導体の腫瘍イメージング剤としての評価. 第 47 回日本核医学会総会, 2007.11.4-6, 仙台

Ogawa K, Shiba K, Yoshimoto M, Washiyama K, Akhter N, Kinuya S, Kawai K, Mori H. Evaluation of a radiolabeled sigma ligand for receptor radionuclide therapy, The 54th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, 2007.6.2-6, Washington DC (USA)

Ogawa K, Shiba K, Yoshimoto M, Akhter N, Washiyama K, Kawai K, Mori H. Evaluation of a vesamicol analog as a sigma receptor ligand for tumor imaging. 9th World Congress of Nuclear Medicine and Biology, 2006.10.22-27, Seoul (Korea)

Yoshimoto M, Ogawa K, Washiyama K, Mori H, Amano R, Kawai K. The integrin  $\alpha_3$  targeting imaging and radiotherapy with radiolabeled monomeric RGD peptide. The 53rd Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, 2006.6.3-7, San Diego (USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉本 光喜 (YOSHIMOTO MITSUYOSHI)  
金沢大学・保健学系・助教  
研究者番号: 00345638

### (2) 研究分担者

川井 恵一 (KAWAI KEIICHI)  
金沢大学・保健学系・教授  
研究者番号: 30204663

絹谷 清剛 (KINUYA SEIGO)  
金沢大学・医学系・教授  
研究者番号: 20281024

大桃 善朗 (OHMOMO YOSHIROU)  
大阪薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 70183241

平田 雅彦 (HIRATA MASAHIKO)  
大阪薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：00268301

(3)連携研究者  
なし