

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19591838
研究課題名（和文） モノクローナル抗体RM2を用いたPET用前立腺癌イメージング薬剤の開発
研究課題名（英文） Monoclonal antibody RM2 as a new tracer of nuclear imaging for prostate cancer
研究代表者 大山 伸幸（OYAMA NOBUYUKI） 福井大学・医学部附属病院・講師 研究者番号：20223977

研究成果の概要：本研究では、モノクローナル抗体RM2を放射性同位体で標識した ^{125}I -RM2が前立腺癌画像診断において有用なトレーサーとなり得るかを基礎的実験を用いて検討した。具体的な項目として① ^{125}I -RM2は前立腺癌細胞に集積するか、② ^{125}I -RM2の前立腺癌細胞集積はRM2抗原に特異的に結合することによるの、③動物実験において、 ^{125}I -RM2は前立腺癌に集積するか、について検討した。実験結果としては、①前立腺癌細胞である、PC-3、LNCaPいずれの細胞においても、 ^{125}I -RM2は経時的に集積することを示した。②また、乳癌細胞であるMCF-7への ^{125}I -RM2の集積は少なく、経時的な集積の増加もほとんど認めなかった。③あらかじめ、癌細胞にRM2を添加しておくこと、PC-3に対する ^{125}I -RM2集積は抑制されたが、MCF-7に対する影響はほとんど認めなかった。④ヌードマウスにヒト前立腺癌細胞を移植し、動物に ^{125}I -RM2を投与すると、 ^{125}I -RM2は腫瘍組織に高集積を示した。これら結果より、 ^{125}I -RM2は前立腺癌細胞に集積し、その集積はRM2による前処置により抑制されることから、 ^{125}I -RM2の集積は、前立腺癌細胞のRM2抗原に特異的に結合することによると推測された。よって、RM2を用いた核医学画像診断法が、前立腺癌の画像診断に有用となる可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌・モノクローナル抗体・PET

1. 研究開始当初の背景

(1) 前立腺癌は米国においては40歳以上の

男性の癌において、罹患率第一位、死亡率第二位の悪性腫瘍であり、本邦でも、生活様式

や食生活の欧米化に伴い、罹患者数は年々増加している。前立腺癌の早期診断において、PSA は多大な貢献をしてきたが、その癌特異性には問題が残っている。よって、前立腺癌に特異性の高い、新たなマーカーが強く期待されている。その中で、斉藤らは、RM2 という全く新しい前立腺癌マーカーを見出して注目されている (Saito et al, Int J Cancer 115:105-113, 2005)。RM2 とはモノクローナル抗体の名称であり、RM2 抗原はモノクローナル抗体 RM2 が認識する糖鎖抗原のことをいう。RM2 抗原は、ラクトシリース I 型糖鎖とガングリオシリース糖鎖のきわめてユニークなハイブリッド構造をしているのが特徴である。ラクトシリース I 型糖鎖は、上皮、腺に広く分布しており、ガングリオシリース糖鎖は神経外胚葉由来の細胞に豊富に存在する特徴がある。斉藤らは、前立腺癌細胞において RM2 抗原が発現していることを示した。また、RM2 抗原は前立腺の良性腺管では発現していないか発現レベルが弱いこと、前立腺癌の悪性度 (Gleason grade) を反映して発現が高くなること、特に Gleason grade 3 と 4 ではその染色レベルに明らかな違いがあることを明らかにした。さらに、RM2 抗原の発現レベルが高い群では、低い群に比して 5 年 PSA 無再発生存率が有意に低いことも示した。また、血清中の RM2 発現についても検討し、血清 PSA < 10ng/mL レベルの血清中では、前立腺癌と良性前立腺疾患の間で約 4050kDa の糖蛋白上の RM2 抗原発現に差がみられ、血清における RM2 抗原発現は前立腺癌検出において高い感度と比較的高い特異度を有することを示した。このように、モノクローナル抗体 RM2 を用いた RM2 免疫組織診断、および血清 RM2 値の診断は、前立腺癌臨床診断に大きく貢献するものと期待されている。

一方、前立腺癌の画像診断については、従来から、超音波、CT、MRI を用いた診断が試みられてきたが、いずれの診断法も癌検出能は十分でなく、前立腺癌の TNM 分類のうち、T 分類は、いまだに前立腺触診により行われている。この分野において、研究代表者らは、これまで主に核医学診断的手法を用いて、前立腺癌の画像化を試みる研究を行ってきた。その結果、いくつかのトレーサーが前立腺癌の診断に有用であることを、基礎レベル、臨床レベルで示してきた。すなわち、糖代謝のトレーサーである ^{18}F -FDG の癌集積は、癌の悪性度や癌患者の予後予測に一定の有用性を有すること (Oyama, et al. Jpn J Clin Oncol 12: 623-629, 1999)、リン脂質代謝のトレーサーである ^{11}C -acetate は前立腺癌の 90%以上で高集積を示し、その高検出率が癌の再発病変診断に有用であること (Oyama, et al. J Nucl Med 43:181-186, 2002; Oyama et al. J Nucl Med 44: 549-555, 2003)、リン脂質

のトレーサーである ^{18}F -fluoroacetate は半減期が 110 分と ^{11}C -acetate の 20 分より長く、前立腺癌検出の臨床応用に優れていること (Ponde, et al. J Nucl Med, in press)、核酸代謝のトレーサーである ^{18}F -fluorothymidine の集積の変化が、内分泌療法によっておこる前立腺癌の増殖能の変化を鋭敏に検出できること (Oyama, et al J Nucl Med, in submission)などを示してきた。ただし、いずれのトレーサーも前立腺癌に非特異的であり、問題が残る。よって、より、前立腺癌に特異性の高いトレーサーの開発は、前立腺癌の画像診断において急務とされてきた。

2. 研究の目的

(1) そこで研究代表者らは、前立腺癌に対して特異性が高い RM2 を用いたトレーサーの開発に着手した。RM2 トレーサーの開発は、前立腺癌の病変検出率を飛躍的に向上させるとともに、トレーサーの集積の程度を評価することで癌の悪性度も診断できる可能性を有している。研究代表者らは、RM2 を標識するアイソトープにヨード 125 を用い、 ^{125}I -RM2 の合成に成功した。この、 ^{125}I -RM2 を用いて基礎実験において、 ^{125}I -RM2 は前立腺癌細胞株である PC-3 および LNCaP のいずれにおいても、トレーサー投与後 20 時間までの観察で、時間とともに癌細胞内に集積することを明らかにした。この予備実験の結果を踏まえて、代表研究者らは前立腺癌に対して特異性が高い RM2 を用いた前立腺癌画像診断用のトレーサーの開発に着手し、本研究では、独自に開発した ^{125}I -RM2 を用いて、前立腺癌の画像化において有用なトレーサーとなりうるかどうかを、細胞実験、動物実験を行って、基礎的に検討する。

本研究で明らかにすべき疑問点は以下の 2 点である。

- ① ^{125}I -RM2 の前立腺癌細胞集積は RM2 抗原に特異的に結合することによるのか?
- ② 動物実験において、 ^{125}I -RM2 は前立腺癌に集積するか?

3. 研究の方法

(1) RM2 の標識

- 1) ^{125}I をクロラミン T の存在下で、モノクローナル抗体 RM2 と反応させ標識する。
- 2) 1) の反応液をスピニングカラム流して、 ^{125}I -RM2 を精製する。

(2) ^{125}I -RM2 の前立腺癌細胞結合能に関する基礎的実験

1) 培養細胞を用いた実験

①2種類の前立腺癌細胞株、LNCaP (アンドロゲン依存性前立腺癌細胞株)、PC-3 (アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株)

およびネガティブコントロールとして1種類の乳癌細胞株、MCF-7 (乳癌細胞株)を用いる。上記3種類の細胞 2×10^5 個をそれぞれ24ウェルプレートフラスコに培養する。48時間培養後に、フラスコに $0.1 \mu\text{Ci}$ の ^{125}I -RM2を加えて、1時間、3時間、6時間培養する。

②培養液と細胞を分離し、ガンマカウンターを用いてそれぞれの放射能を測定する。

③②で得られた結果より、前立腺癌細胞および乳癌細胞における ^{125}I -RM2 の集積率を比較する。

④①の順に加えて、未標識のRM2を培地に投与する。投与後、②の順と同様に各癌細胞における ^{125}I -RM2 の集積率を比較する。 ^{125}I -RM2 の癌細胞集積がRM2抗原に結合することによるならば、未標識RM2を投与すると、トレーサの集積は、前立腺癌細胞においてのみ低下するはずである。

2) マウス移植腫瘍細胞を用いたトレーサー組織分布実験

①ヌードマウスにPC-3細胞を皮下移植する。

②腫瘍細胞が直径約1cmの大きさに成長したところで、マウスの尾静脈より $10 \mu\text{Ci}$ の ^{125}I -RM2を投与する。

③ ^{125}I -RM2投与後、24時間、48時間、72時間後に腫瘍、および各臓器を摘出して、ガンマカウンターを用いて臓器単位重量あたりのトレーサー集積量を測定する。

4. 研究成果

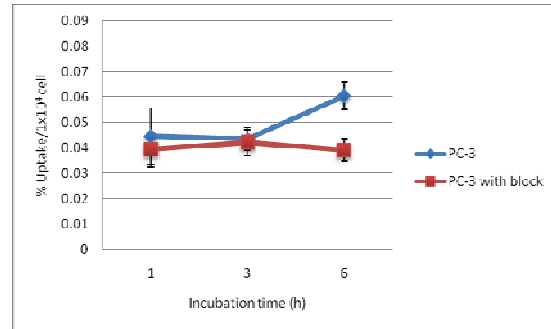
(1) ^{125}I -RM2 の合成

^{125}I をクロロミンTの存在下で、モノクローナル抗体RM2と反応させ標識した。次に、反応液をスピニングカラム流して、 ^{125}I -RM2を精製した。以上により、30.1-70.3%の標識率で ^{125}I -RM2を合成することが可能となった。

(2) ^{125}I -RM2 の前立腺癌細胞結合能に関する基礎的実験

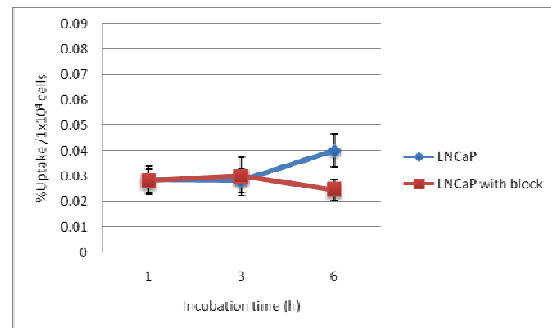
1) 培養細胞を用いた実験

①PC-3において、 ^{125}I -RM2は経時的に腫瘍細胞に高集積を示した。この集積は、あらかじめ未標識のRM2を培地に投与しておくことで抑制された。



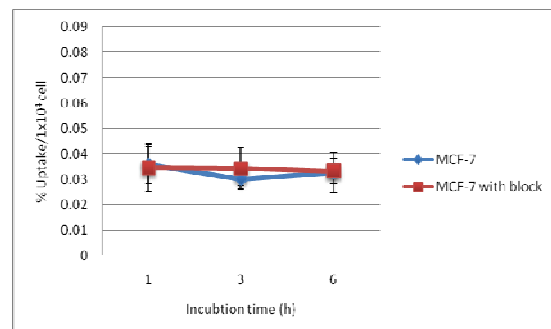
Unpaired t-test; $p=0.005$ (6h)

②LNCaPにおいて ^{125}I -RM2は経時的に腫瘍細胞に高集積を示した。この集積は、あらかじめ未標識のRM2を培地に投与しておくことで抑制された。



Unpaired t-test; $p=0.009$ (6h)

③MCF-7においては、 ^{125}I -RM2の経時的な腫瘍細胞への集積をみとめなかった。また、あらかじめ未標識のRM2を培地に投与しても、この反応に変化はなかった。

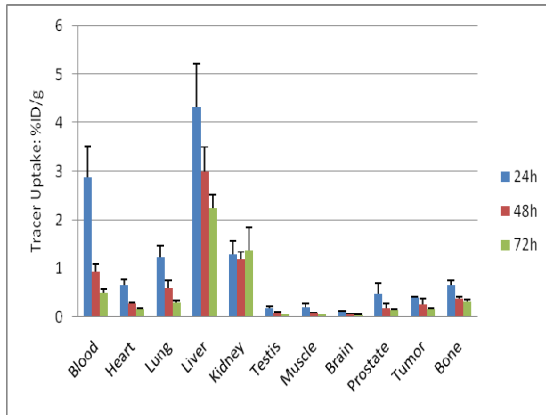


Unpaired t-test; N. S.

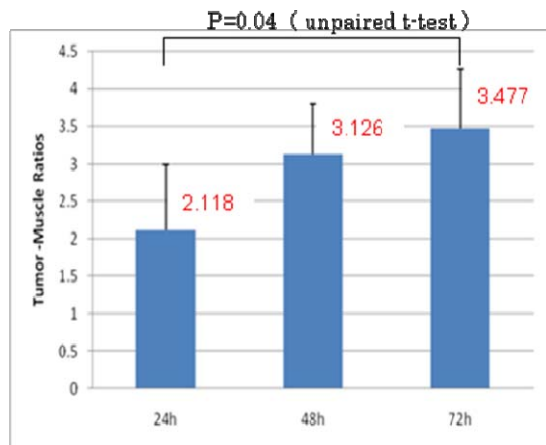
これらの結果より、 ^{125}I -RM2は前立腺癌細胞に集積し、その集積は未標識RM2による前処置により抑制されることから、 ^{125}I -RM2の集積は、前立腺癌細胞のRM2抗原に特異的に結合することによると推測された。

2) マウス移植腫瘍細胞を用いたトレーサー組織分布実験

¹²⁵I-RM2投与後、24時間、48時間、72時間後のトレーサー集積を臓器ごとに比較すると、血中、心臓、肺、筋肉、前立腺においては、経時的にトレーサー集積は速やかに減少した。それに対し、肝臓、腎臓、腫瘍においては、¹²⁵I-RM2の集積は遷延した。



また、腫瘍組織と筋肉の集積比 (T/N 比) を比較すると、24 時間では 2.118、48 時間では 3.126、72 時間では 3.477 と、経時的に T/N 比が上昇することが確認された。



以上の結果より、モノクローナル抗体 RM2 を用いた核医学画像診断法が、前立腺癌の画像診断に有用となる可能性が、これらの基礎的実験により示された。これらの結果をもとに、今後は動物モデルを用いて SPET や PET による腫瘍組織の画像化に取り組む予定である。

[学会発表] (計 2 件)

①Hasegawa Y, Oyama N, Nagase K, Akino H, Miwa Y, Fujibayashi Y, Furukawa T, Arai Y, Saito S, Yokoyama O. Monoclonal antibody RM2 as a new tracer of nuclear imaging for prostate cancer. 2009 Annual Meeting of American Urological Association. 4.16.09 Chicago, USA

②森永陽子、大山伸幸、長瀬桂子、藤林康久、古川高子、斉藤誠一、荒井陽一、横山修 RM2 を用いた前立腺癌画像診断法開発のための基礎的研究—第一報 第 60 回泌尿器科学会西部総会 11.8.08 北九州市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 伸幸 (OYAMA NOBUYUKI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20223977

(2) 研究分担者

横山 修 (YOKOYAMA OSAMU)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：90242552
伊藤 秀明 (ITO HIDEAKI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：00345620
楠川 直也 (KUSUKAWA NAOYA)
福井大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：80372499
藤林 康久 (FUJIBAYASHI YASUHISA)
福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授
研究者番号：50165411