

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2007～2008

課題番号：19890090

研究課題名(和文) 多剤耐性腫瘍の検出を目的とした放射性イメージング剤の開発

研究課題名(英文) Development of radioactive imaging medicine to detect multidrug-resistant tumor

研究代表者

山口 博司(YAMAGUCHI HIROSHI)

浜松医科大学・分子イメージング先端研究センター・特任助教

研究者番号：00450841

研究成果の概要：

多剤耐性腫瘍の検出を目的とした新規イメージング剤の開発を試みた。GST 誘導型の SPECT 核種イメージング剤を合成し、腫瘍を移植したヌードマウスに投与、腫瘍に集積させることに成功した。多剤耐性腫瘍に対する効果を見るためには、継続して検討をする予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

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：腫瘍、多剤耐性、トランスポーター、核医学、分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

医学の発展により、様々な疾病の治療法が確立されてきたが、常に疾病死亡原因の上位にあるのが悪性腫瘍である。これまで、腫瘍に対しては、摘出・切除といった外科的治療、放射線療法や化学療法といった内科的治療法が確立されてきた。治療前に腫瘍の種類や性質を見極め、適した治療法を見つけることは、患者各個人に合わせたテーラーメイド医療とも言え、患者の負担の軽減や早期治療につながる。一方、悪性腫瘍治療の現場では、外科的治療、放射線治療とともに、抗がん剤やホ

ルモン剤などを用いた化学療法が多く併用されている。しかしながら中には腫瘍細胞が薬剤耐性を獲得し、化学療法が必ずしも期待通りの効果を上げないことがある。この原因の一つに、腫瘍細胞自身の薬剤の取り込み機構の抑制および排出機構の亢進があげられ、このような性質を持った腫瘍は多剤耐性腫瘍と呼ばれている。薬剤の排出機構には単純拡散のようなものばかりではなく、膜タンパクなどが関与した能動的な輸送形態があることがこれまでに明らかにされてきた。このようなシステムにより腫瘍細胞外に排出されない

新規治療薬開発へつながり得る多剤耐性腫瘍イメージングは、多くの医療現場、患者に待ち望まれているものである。

これまで、分子イメージング学的手法を用い、多剤耐性腫瘍を鑑別しようとする試みも行われているが、直接多剤耐性腫瘍を描出させるような有効な方法論の確立には至っていない。例えば、心筋血流のイメージング製剤として開発された

Tc-99m-Methoxyisobutylisonitrile (MIBI) は1992年に乳癌にも集積することが明らかとなり、腫瘍細胞に対する有効なイメージング剤として期待されると共に、腫瘍細胞における薬剤排出ポンプの一つである

P-Glycoprotein (PGP)から排出されることが明らかとなり、薬剤排出ポンプのインビボ機能評価法として期待されたが、腫瘍への放射能集積が低い場合、得られた情報の解釈を逆に困難にしており、多剤耐性腫瘍の画像化には用いにくい。

このような背景の元、申請者らは直接薬剤排出ポンプに結合する新しい概念に基づく薬剤開発を着想するに至った。(図1)

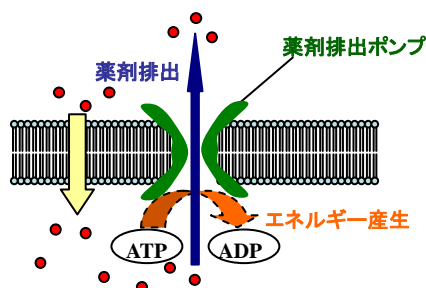


図1 新規薬剤結合の概念図

## 2. 研究の目的

患者個々人の社会的・病態学的環境等を考慮した腫瘍治療におけるテーラーメイド医療は今後ますますその必要性を増すものと考えられる。そのためにも非侵襲的に腫瘍の性質を鑑別出来る方法論を確立することが重要であると考えられ、申請者は核医学的手法を用いて検討することを計画した。腫瘍の性質を分類するためには多くのアプローチがありうるが、本申請研究では腫瘍の化学療法時に問題となる多剤耐性腫瘍をターゲットにした核医学イメージング剤の開発について検討することとした。すなわち、多剤耐

性腫瘍では薬剤排出ポンプの働きにより投与薬剤が細胞外に排出されるが、この薬剤排出ポンプ機能を核医学的手法により体外より画像化して定量化することを目的とし、そのために、新しい結合様式タイプのイメージング薬剤開発とその有用性評価を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 多剤耐性腫瘍を標的としたイメージング剤の開発

特定の細胞をターゲットとしたイメージング剤のドラッグデザインにあたり、その細胞に特異的に発現するタンパクへ結合する薬剤に置換基誘導などの改変を加える手法は有効的な手段の一つである。本研究において、ターゲットとするのは多剤耐性能を持った腫瘍細胞である。多剤耐性腫瘍の特徴は、細胞内に取り込まれた抗癌剤やイメージング剤などの薬剤を、生体内解毒機構〔すなわち、グルタチオン-S-トランスフェラーゼの働きによりグルタチオン (GSH) 抱合体形成〕により、細胞外に排出される。この時、薬剤排出機構に大きく関与するABCトランスポーターとGSHとの関係に着目し、研究を進めた。

(1) ABCトランスポーターに結合する薬剤の合成とスクリーニング多剤耐性腫瘍において、薬剤はGSH抱合体を形成し、ABCトランスポーターを通して細胞外に排出される。ここで着目したいのがTLK199である。TLK199は、ABCトランスポーターに結合し、多剤耐性腫瘍の薬剤排出能を抑制することが知られるインヒビターである。

TLK199は図2に示したようなグルタチオン骨格をもつトリペプチドであり、置換基導入や改変が可能である。そこで、このTLK199の構造や性質を元に誘導をかけ、ABCトランスポーターに結合するイメージング剤への誘導化を行った。

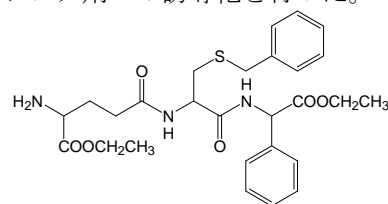


図2 TLK199の構造

(2) 合成した新規化合物についての親和性測定によるスクリーニングと標識合成薬剤合成において、重要なのがその薬剤の生体内作用機序部位との親和性である。今回の目的作用機序部位は、ABC トランスポーターである。そこで、先に合成した化合物について、ABC トランスポーターとの親和性を測定し、親和性の高い新規化合物に関して、標識合成に必要な標識前駆体の合成を行った。この際、精製した標識化合物（イメージング剤候補化合物）と標識前駆体が容易に分離できるような HPLC の条件を検討した。次に、 $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$  を用い、標識前駆体分子内に置換基導入を試み、高収率、高比放射能にてイメージング剤候補化合物を合成できる条件検討を試みた。

標識合成した ABC トランスポーター結合性イメージング剤候補化合物を用いて、動物実験を行った。生体内分布の評価、生体内における腫瘍細胞、特に多剤耐性腫瘍について具体的にどのようなイメージング画像が得られるのかを評価した。

インビボでの評価として、正常マウスに上述の標識合成化合物を尾静脈注射し、生体内分布を測定した。薬剤の生体内分布、臓器ごとの特異結合の有無を評価した。また、ラットを用いた実験で、尾静脈注射したのち、動脈採血により標識化合物の代謝安定性を調べ、イメージング剤としての有用性を検討した。

#### 腫瘍モデル動物を用いたイメージング撮像と多剤耐性腫瘍における ABC トランスポーターの定量

腫瘍細胞を培養後、マウスに移植し、イメージング撮像を行った。最終目的が、多剤耐性腫瘍に関してのイメージング薬剤であったが、これに関しては継続評価中である。

#### 4. 研究成果

文献などから抽出したペプチド骨格を有する標識前駆体（化合物 3）をペプチド固相合成法により合成し、数段階の反応を経て、 $[^{125}\text{I}]\text{I}$  標識体（化合物 4）[以下、GSH 誘導型イメージング剤]を合成した。（図 3）

なお、構造は、非放射性 I にて標識したコールド体を合成し、NMR にて確認、HPLC および TLC によって、同化合物の生成を確認した。

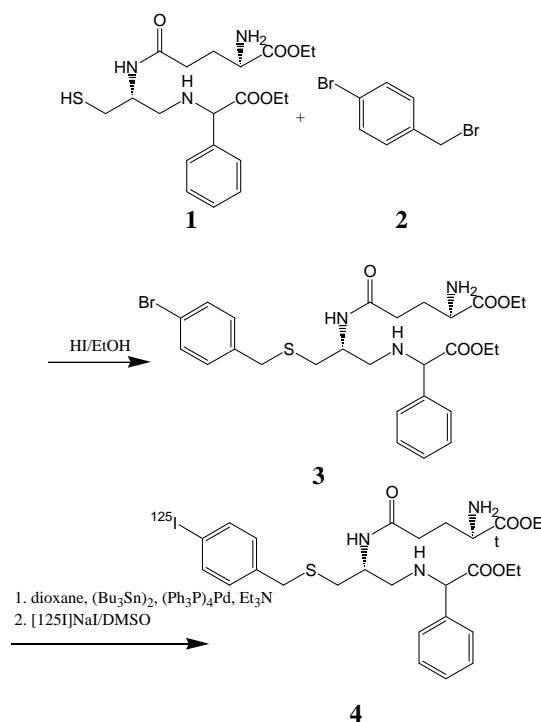


図 3 合成スキーム

GSH 誘導型イメージング剤を、正常マウスに投与し、1 時間後における生体内分布を測定した。（図 4）

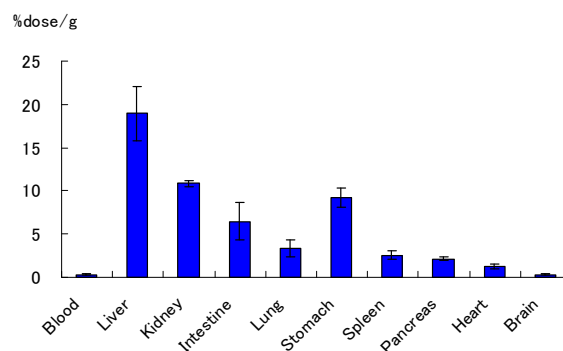


図 4 正常マウスにおける生体内分布

投与後 1 時間において血中放射能量は低下しており、組織および臓器への移行性が非常に高いと考えられる。この結果を踏まえ、腫瘍移植マウスに対し、同化合物をインジェクションし、1 時間、3 時間、6 時間、24 時間それぞれの時間での SPECT 画像を撮像した。（図 5）また、比較のために、同一個体に対し、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  を投与し、30 分後の PET 画像を撮像した。（図 6）

画像測定に用いた動物には、HELA 腫瘍細胞を皮下に移植したヌードマウスを2週間飼育し、腫瘍が成熟した個体を用いた。

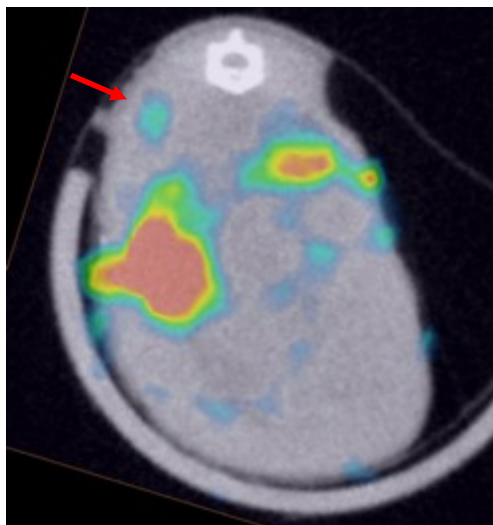


図5 標識化合物投与1時間後 SPECT 画像  
投与量 ; 300uCi  
撮像条件 ;  
64Projection, 30sec/Projection

GSH 誘導型イメージング剤投与後1時間で腫瘍への集積が確認できた。3時間、6時間でも、集積は見られたものの、画像上、徐々に腫瘍組織への集積は少なくなっていき、24時間後では、ほとんどが腫瘍から排出された様子が観察できた。(図5)

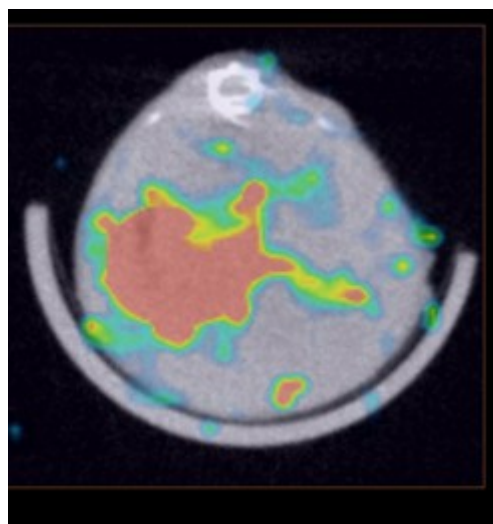


図6 標識化合物投与24時間後 SPECT 画像  
撮像条件 ;  
64Projection, 60sec/Projection

なお、PET 撮像結果では、臓器（腎臓）への FDG 集積が高すぎたため、画像上、腫瘍への集積を確認することができなかった。

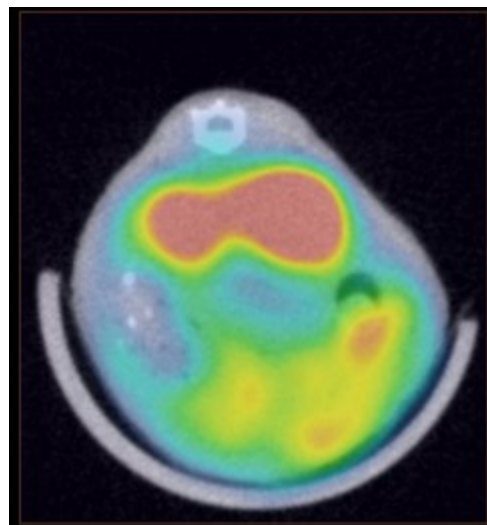


図6 [<sup>18</sup>F]FDG 投与の PET 画像  
投与量 ; 50uCi  
撮像条件 ;  
FDG 投与後 30 分後から 30 分間データ収集

画像はいずれも、CT との Fusion 画像である。なお、SPECT, PET および CT の測定は、いずれも FX, Gamma Medica-Ideas Inc. を用いた。

以上の結果から、ABC トランスポーターをターゲットにした GSH 誘導型イメージング剤を合成できた。しかしながら、腫瘍への滞留時間が短く、他の臓器への集積が高く残っていることから、多剤耐性腫瘍を標的としたイメージング剤になりうるかについては、さらなる検討が必要であると考えます。今回、用いた HELA 細胞には、多剤耐性株があることが機知である。今後、こうした細胞株を移植し、比較検討を試みる他、PET 核種である <sup>18</sup>F 標識の GSH 誘導型イメージング剤合成についても検討を行う。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

該当無し

[学会発表] (計 0 件)

該当無し

[図書] (計 0件)

該当無し

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

該当無し

○取得状況 (計 0件)

該当無し

[その他]

該当無し

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 博司 (YAMAGUCHI HIROSHI)

浜松医科大学・分子イメージング先端研究  
センター・特任助教

研究者番号：00450841

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し