

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591488

研究課題名（和文）Zn-63の物理的・生物学的特性を利用する腫瘍PET診断薬剤の開発研究

研究課題名（英文）Basic studies for the development of a PET cancer imaging agent utilizing physical and biological properties of Zn-63

研究代表者

古川 高子 (FURUKAWA TAKAKO)

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・チームリーダー

研究者番号：00221557

研究成果の概要（和文）：

Zn-63は半減期38分のポジトロン核種で、天然存在比が最も高いCu-63から医療用小型サイクロトロンで製造可能と、臨床使用に有利な条件を備えている。Znは発がんや腫瘍増殖にも深く関わると考えられることから、Zn-63を用いる腫瘍のPETイメージングの可能性について検討し、がん細胞のZn取り込みが生理的なZn要求性に依存すること、腫瘍集積には比較的弱いキレート剤であるEDDAの利用が有利なこと、投与量の調節によりZnの腫瘍集積性を高め得ること等を明らかにした。また研究機関内でZn-63を製造、マウス腫瘍のPET撮像にも成功した。

研究成果の概要（英文）：

Zinc-63 is a positron emitter with 38 min half life and can be produced with a small clinical cyclotron targeting Cu-63, the most abundant Cu isotope, which makes Zn-63 attractive for clinical use. Zn is necessary for cell proliferation and supposed to be involved in cancer development. In this study, we explored the possibility to use Zn-63 for cancer imaging. We found that the uptake of Zn by cancer cells was found to be correlated with Zn content, suggesting that the uptake reflects the physiological needs of the cells, and that EDDA, a relatively weak chelator of Zn, worked favorably for cancer imaging. We also found that adjusting the dose, higher accumulation of Zn into tumor mass was achievable. The small animal PET imaging of tumor in mouse model was successful with Zn-63 produced in our institute.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子イメージング

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, PET, Zn-63,

1. 研究開始当初の背景

日本国内の PET 施設は 170 を超え、うち 120 以上では PET 用放射性薬剤を製造している。これだけ多数の施設が PET 用放射性薬剤の製造能力を持つにも関わらず、そのほとんどが [F-18]fluoro-deoxy-glucose (FDG) のみを使用しているのが現状である。FDG は優れた腫瘍診断薬であるが、がんの性質の一面を捉えているにすぎず、多様な PET 用放射性薬剤が実用化され、がんの性質の様々な面が捉えられるようになることが、癌の有効な治療を実現するために望ましいと考えられる。これまでも FDG とは異なるメカニズムに基づいたがん診断用 PET 薬剤が開発・報告されてきているが、期待されるほど普及が進んでいない。一因として、高度な合成・標識技術を要することや、原材料のコストの高さも挙げられるであろう。今後予想される世界的な悪性腫瘍の増加に対応するためにも、PET 診断薬の開発においては、製造の容易さやコストへの配慮も必要と考えられる。

亜鉛 (Zn) の放射性同位元素には、長半減期で基礎実験に適した Zn-65 や PET に使用できるポジトロン放出核種の Zn-62, Zn-63 など物理的性質の異なるものが存在する。Zn-63 はこれまであまり注目されてこなかったが、半減期が 40 分、天然存在比が最も高い Cu-63 をターゲットにして医療用小型サイクロトロンでエネルギーでも製造可能である。このように Zn-63 は臨床において十分使用可能な条件を備えており、今後利用が広がることが期待される。

Zn は必須微量元素であり、様々な酵素や転写因子の活性中心として、多様な生体反応に関与している。“微量”元素のなかでは比較的細胞内の濃度が高く、特にすい臓では Zn 含有外分泌消化酵素の生合成、分泌に必要とされるため、取り込み・消費がさかんである。この特徴に注目して連携研究者である藤林により開発されたのがすい臓機能診断薬 Zn-ethylenediamine diacetic acid (Zn-EDDA) である。EDDA は血中で Zn をタンパク結合などから保護し、かつ Zn の生理活性を保持している、すなわち Zn を必要とする組織では Zn を細胞に供給できる適度な強度のキレートとして働いている。Zn-62 標識 Zn-EDDA は PET を用いるすい臓機能の診断薬として、動物実験ですぐれた結果を収めている。この開発段階において、Zn-EDDA がエールリッヒ担がんマウスモデルの腫瘍においても高い腫瘍/血液比で集積したという preliminary な結果が得られている。

Zn は細胞増殖に必要な酵素の活性中心であり、数多くの転写因子に存在する Zn-finger や matrix metalloprotease (MMP) の構成成分であるなど、細胞増殖や、遺伝子

発現、細胞環境のコントロールに深く関与しており、当然、発がんや腫瘍の増殖にも強く影響を与えていると考えられる。Zn は多種類の動物腫瘍モデルで腫瘍の増殖に重要であると報告されているほか、ヒトの乳がんでは正常組織に比べ Zn の濃度が高いとの報告もある。一方、前立腺がんでは Zn が発癌に対して抑制的に働くとの報告があり、腫瘍の種類によって Zn の果たす役割が異なる可能性もある。Zn-EDDA を介する Zn の細胞への取り込みには Zn の transporter が関与していると考えられる。Zn の transporter については最近研究が進み、数多くの transporter の存在が報告されている。Zn の transporter は配列の類似性から大きく 2 つのグループ、細胞内の Zn 濃度を減少させる側に働く ZnT のグループと上昇させる側に働く Zip のグループに分類されている。これらの transporter のうち ZnT-1 の発現が前立腺がんでは tumor suppressor として作用しているとの報告がある。また、Zip-10 や Zip に属する LIV-1 などは乳がんの転移や浸潤に関与するという報告があるなど、腫瘍細胞におけるこれらの transporter の役割も次第に明らかになりつつある。

上記のように、Zn と癌の関係については十分解明されていない部分が残されているが、腫瘍の形成、増殖など腫瘍の性質に深く関与する Zn をもちいることより、腫瘍の性状について重要な情報が得られる腫瘍イメージングが可能になると期待される。

2. 研究の目的

本研究では Zn の腫瘍への集積について、EDDA 以外のキレーターの使用によって Zn の生理活性を保持しながら腫瘍細胞への Zn の移行性を高めることができるか、どのような腫瘍に Zn は高い集積を示すのか (腫瘍の種類や増殖速度、内在性の Zn 濃度、亜鉛タンパク質の発現量と Zn の取り込みの関係)、どのような transporter を介して集積するのか (Zip-10 や LIV-1 など介して転移や浸潤などと関係している可能性があるか)、などを検討することにより、Zn を用いる PET イメージングによって腫瘍のどのような性質を知りうるのかを明らかにする。また、Zn-63 標識 Zn-EDDA の製造については、医療用小型サイクロトロンで Zn-63 が製造可能であることを確認し、製造した Zn-63 を用いてマウスの移植腫瘍モデルにおいて腫瘍の PET イメージングが可能であることを実証する。

3. 研究の方法

[インビトロ培養がん細胞による検討]

がん細胞への Zn 集積機序についての検討

16 種類のヒトがん細胞株を使用し、培養液中

に加えた[Zn-65]Zn-EDDAの細胞への取り込み量と、細胞の増殖速度、ICP-MSにより測定した細胞内のZn濃度、real time PCRにより測定したZn-transporter (ZIP4, ZIP8, LIV-1 (ZIP-6), ZIP-10, ZIP14, ZNT1, ZNT4)の発現の関係について検討した。取り込みの時間は1時間、非標識のZn-EDDAを加えてZnとしての培地中濃度を1 mg/lとした。

Zn細胞取り込みに与えるキレート剤の影響
培養液中からのZn-65の取り込みが、キレート剤の種類によりどのように変化するかを、EDDA, EDTA, Glycineをキレート剤に用い、上記の細胞を用い、それぞれキャリアを加えてZnとしての培地中濃度を1 mg/lとして比較した。

[インビボ移植腫瘍による検討]
体内分布の検討

培養細胞における検討で用いたがん細胞株のうちヌードマウスの皮下に移植して腫瘍を形成したものをを用いて、担がんマウスにZn-65で標識したZn-EDDA (Znとして1mg/kg), を投与し、癌への集積性、他の組織への分布を検討した。また、このときの腫瘍への集積を、移植した細胞の培養液中からのZn取り込み量と比較した。

さらに、投与後の時間を30分と1時間で比較、さらに、Znとしての投与量を1, 0.25, 0.1mg/kgに変化させて体内分布の変化を観察し、放射性Znによる腫瘍イメージングに向けての最適化をはかった。

Zn-63による担がんマウスのPET

上記検討により腫瘍イメージングに最も有利と考えられた条件 (Zn-EDDA, 0.25 mg/kg) を用いて、小動物用PET装置 (Inveon, Siemens社製) によるU87MG担がんマウスのPETイメージングを行った。

4. 研究成果

がん細胞へのZn集積機序についての検討

培養溶液からのZn-65標識Zn-EDDAの取り込みには細胞株の種類により添加後1時間において0.9-5.6 %D/10⁶ cellsの違いが見られた。この取り込み量とそれぞれの細胞株のZn-含量を比較したところ、これらの間には正の相関が認められ (図1)、腫瘍細胞のZn取り込みが、細胞の生理的なZn要求度によって規定されていることが示唆された。なお、増殖速度や今回調べたいいずれのtransporter (ZIP4, ZIP8, LIV-1, ZIP-10, ZIP14, ZNT1, ZNT4)の発現との間にも有意な相関は認められなかった。

Zn細胞取り込みに与えるキレート剤の影響

培養細胞のZn-65取り込みにあたって、Znの

キレート剤をEDDA EDTA, Glyにかえた場合、よりキレートの安定性が高いEDTAでは取り込み量が減少し、キレートの安定性が低いGlyでは増加した。しかし、各種細胞間でのZn取り込みの高低はキレート間で同じ傾向を示し、細胞への取り込み機序は共通するものであることが示された。

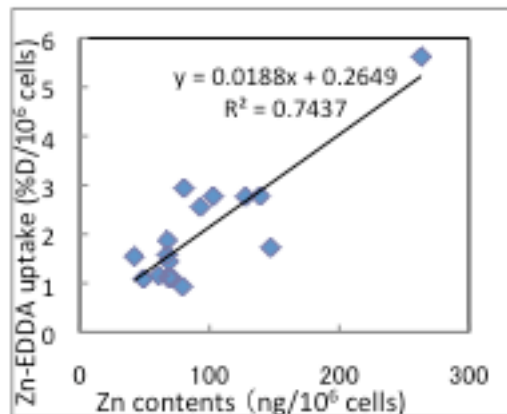


図1. 腫瘍細胞のZn-EDDA取り込みとZn含量との関係

体内分布の検討

表1に担がんヌードマウスにZn-65標識Zn-EDDAを投与した (Znとしての投与量1mg/kg, 投与後1時間) ときの正常組織および移植腫瘍へのZn-EDDAの取り込み量をしめした。腫瘍への集積は2.3-4.2 %D/gとPET等のイメージングに十分な集積があることが認められた。脾臓、肝臓、腎臓、上部腸管、骨への集積は腫瘍への集積より高かったが、血液中の放射活性は低く、これらの臓器をのぞけばイメージングは十分可能と考えられた。

表1-1. 正常組織への分布

Tissue	Distribution (%D/g)		
	mean	s. d	n
Brain	0.2	0.03	8
Heart	1.25	0.32	5
Lung	3.75	0.59	13
Bone	6.76	0.78	5
Stomach	2.82	0.88	5
Upper intestine	5.52	0.55	5
Lower intestine	2.2	0.96	5
Liver	6.63	2.15	18
Kidney	5.63	0.8	18
Spleen	3.37	0.43	18
Pancreas	18.23	2.82	18

表 1-2. 移植腫瘍への分布

cell line		distribution	
		%D/g	T/B
U87MG	glioblastoma	3.73	7.32
H441	lung adenocarcinoma	2.33	3.50
211H	mesothelioma	3.82	8.17
H226	mesothelioma	3.76	6.24
AsPC	pancreas, adenocarcinoma	2.93	5.79
PC3	prostate, adenocarcinoma	2.67	4.43
LNCap	prostate, carcinoma	2.96	3.83
MES-SA	uterine sarcoma	3.78	7.13
MES-SA/Dx5	uterine sarcoma	4.15	7.96

さらに腫瘍と他臓器との集積比を改善すべく、U87MG および H226 移植腫瘍モデルを用いて、Zn-EDDA, Zn-EDTA, Zn-Gly の投与形で、投与量を 1, 0.25, 0.1 mg/kg 投与後の時間を 0.5 および 1 時間に変化させて比較したところ、Zn-EDDA の投与量 0.25 mg/kg で最も好ましい腫瘍／組織比がえられた。

Zn-63 による担がんマウスのPET

上記体内分布実験で得られた最適条件をもちいて U87MG 移植腫瘍モデルを用いて Zn-63 標識 Zn-EDDA による PET イメージングを行った。腫瘍への集積は投与後徐々に上昇し、腫瘍が明瞭に描出された。Zn-63 の半減期を考慮し、画像取得時間は投与後 50-60 分とした。その画像を図 2 に示す。

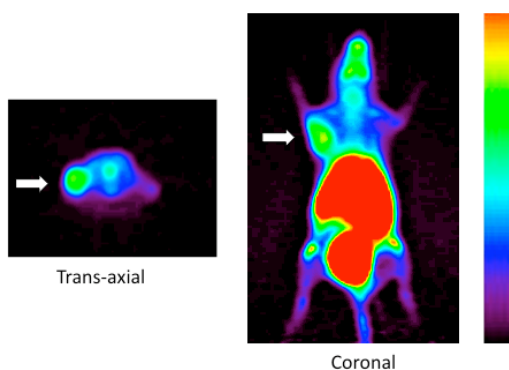


図 2. U87MG 担がんマウスの [Zn-63]Zn-EDDA PET 画像。矢印：腫瘍結節の位置

以上の検討結果から、Zn-63 標識 Zn-EDDA をイメージングプローブとすることで、腫瘍の Zn 要求性を反映する PET イメージングが可能

であることを示すことができた。Zn-63 による PET イメージングが可能であることを示すことができたことが、この核種の有用性の認知につながり、今後広く利用されていくことを期待する。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① Takako Furukawa, Yuriko Saito, Sumitaka Hasegawa, Tsuneo Saga, Yasuhisa Fujibayashi: Basic Evaluation of Zn-EDDA for Cancer Imaging, World Molecular Imaging Congress, モントリオール, 2009.09

② 古川高子, 長谷川純崇, 越川道子, 須堯綾, 齋藤有里子, 曾川千鶴, 佐賀恒夫, 藤林靖久: Zn-EDDA の PET 腫瘍診断薬としての可能性を探る、第 3 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、さいたま市、2008.05

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川高子 (FURUKAWA TAKAKO)

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・
チームリーダー

研究者番号：00221557

(3) 連携研究者

齋藤由里子 (SAITO YURIKO) (2008-2009 年)

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・
准技術員

研究者番号：20446537

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・
主任研究員

研究者番号：60415437

福村利光 (FUKUMURA TOSHIMITSU)

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・
チームリーダー

研究者番号：90199266

藤林康久 (FUJIBAYASHI YASUHISA)

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・
センター長

研究者番号：50165411