

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 年度 ～ 2009 年度
 課題番号：20790921
 研究課題名 (和文) EGFR 新規プローブの開発と PET への有効利用評価
 研究課題名 (英文) Development and evaluation of a novel PET probe for EGFR
 研究代表者 齋藤 有里子
 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

研究成果の概要 (和文)：がんの個別化医療の充実には、新たな診断薬剤や治療薬剤の開発が鍵を握っている。本研究では、がんの発症や悪性化に深く関与している生体内分子である活性化型 EGFR に対する新規分子標的薬剤を開発した。薬剤の細胞内滞留性と EGFR の活性とが強く相関し、担がんマウスを用いた体内動態でも EGFR の発現量 (活性量) と薬剤の集積様式の間に関係が認められた。また治療実験では、薬剤の連続投与により腫瘍成長抑制の効果が観られた。本研究で得られた成果は、がんの質的診断や治療の充実化に基礎的知見を与え得ると言える。

研究成果の概要 (英文)：It is of key importance to create novel diagnostic and treatment products for tailor-made medicine. In this study, we developed novel molecular probes targeting activated-EGFR which is known to be involved in carcinogenesis and tumor malignancy. Probe retention in cells was correlated with EGFR activation, and the uptake pattern into tissues was dependent on EGFR amount/activation. In addition, tumor growth was dramatically suppressed with consecutive probe injection. This study could help the development of cancer diagnosis and cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・7216 放射線科学

キーワード：画像診断・放射性医薬品・分子イメージング・腫瘍イメージング

1. 研究開始当初の背景

がんは日本の死亡原因第一位であり、早期診断や治療の充実化が求められている。特に、精密ながんの質的診断や治療には陽電子放射断層撮影装置 (positron emission

tomography, PET) や単一光子放射断層撮影装置 (single photon emission computed tomography, SPECT) などの非侵襲的画像化法が用いられている。中でも、PET は高感度・高分解能で定量性の高い画像が得られる。そ

のため、がん細胞特異的に発現または機能亢進している分子を標的として、新規 PET 薬剤の開発研究が積極的に進められている。このような目的のための標的分子として、表皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) が挙げられる。

EGFR は多くのがんで過剰発現や機能亢進が確認されている。EGFR を標的とした PET 薬剤として、リガンドや特異的阻害薬や特異的抗体を陽電子放出核種で標識したものが既に多く報告されている。しかしながら、リガンド結合部位の欠損変異や阻害剤が結合できない突然変異など、様々な EGFR の変異も報告されている。これらの変異は、既存 PET 薬剤による EGFR の認識を困難にし、がんの見落としを引き起こす可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、EGFR の構造変化に影響されずに、生体内で EGFR の発現異常を引き起こしている部位を画像化可能な汎用性の高い PET 薬剤の開発を目指した。EGFR の発現異常が観られる細胞では、必然的に EGFR の活性化を発端とした細胞内シグナル経路が活性化している。従って、EGFR から発するシグナルの上流を画像化できる薬剤は、EGFR の活性自身を画像化していることにもなる。そこで本研究では、活性型 EGFR に結合する分子標的薬剤を開発し、この薬剤の特性を *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。

3. 研究の方法

薬剤の候補として、活性型 EGFR に結合して細胞内シグナル伝達を促進する最初の鍵分子の一つである growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) に注目した。特筆すべきことに、EGFR の Grb2 結合領域 (Src homology domain 2, SH2 domain) には変異の報告がない。そこで本研究では、Grb2 の SH2 domain を主構成分子とした薬剤を設計した。

(1) 薬剤設計・合成と ^{125}I 標識

① Grb2 の SH2 domain を細胞内に導入するために、TAT を SH2 domain に融合させた。また、*in vitro* で解析するためのタグとして Flag、*in vivo* で体内動態を検討するための ^{125}I 標識用のチロシン残基を融合させることを考案し、これを以下 TSF と表記する (Fig. 1)。なお、本研究では、陽電子放出核種である ^{124}I に容易に置換できる ^{125}I を用いて、初期検討を行うこととした。TSF は遺伝子工学的手法により、以下の通りに作製した。Grb2 遺伝子から polymerase chain reaction 法により目的 DNA 配列を合成し、GST 融合ベクターに組み込んだ。そして、大腸

菌内でタンパク質合成を行い、特定のタンパク質分解酵素によって GST タグを除去し、目的薬剤を取得した。ネガティブコントロールとして、TAT 無しのもの (以下 SF と表記) も作製した。また、分子量の増加による細胞内導入効率の変化や、SH2 domain の増加による標的分子との親和性の変化を検討するため、SH2 domain を二つ並列に融合した TSSF (Fig. 1) と SSF (TAT 無しのもの) も作製した。Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 及び CBB 染色で、薬剤の合成を確認した。



Fig. 1 TSF及びTSSFの構造

- ② 薬剤の ^{125}I 標識はクロラミン T 法による直接法で行った。クロラミン T 存在下で薬剤と $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ とを室温で 5 分間反応させた後、平衡化した PD10 カラムで溶出した。
- (2) 画像診断薬剤としての有用性検討
A431 細胞 (正常型過剰発現)、H3255 細胞 (変異型 (L875R) 過剰発現)、MDA-MB435 細胞 (低発現) の異なる EGFR 発現様式を示す三種類の細胞株を用いた。
薬剤を溶解した無血清培地中で、細胞を一定時間培養した。その後、培養液を除去し、0.2 M の glycine-HCl (pH 2.0) のバッファーで細胞膜に付着している薬剤を洗浄した。
- ① 細胞内への導入を、抗 Flag 抗体を用いた western blot (WB) で確認した。また、取り込み率は ^{125}I 標識体を用いた放射化学活性値から算出した。
- ② 薬剤の細胞内滞留性を WB で検討した。薬剤を含む培地で培養及び洗浄した細胞を、薬剤を含まない培地で一定時間培養した後、回収した。また、培地置換時に EGF 刺激して EGFR を活性化させた場合、及び薬剤とチロシンキナーゼ阻害剤を同時処理して EGFR を不活性化させた場合の二つの場合の薬剤の細胞内滞留性についても検討した。
- ③ 無血清培地下の A431 細胞を薬剤を含む培地で培養後、EGF 処理して EGFR を活性化させた。この時の活性型 EGFR (リン酸化型 EGFR) と薬剤の結合を免疫沈降法で検討した。
- ④ 細胞内での薬剤の局在は、抗 Flag 抗体を用いた蛍光免疫染色による顕微鏡観察で確認した。

- ⑤ 薬剤の血中安定性は、¹²⁵I 標識体とマウス血しょうとの混合により検討した。両者を 37°C で一定時間混合した後、カラム精製またはセルロースアセテート電気泳動を行った。
- ⑥ A431 及び MDA-MB435 細胞を移植したマウスに ¹²⁵I 標識体 (37 kBq) を投与して、一定時間後に腫瘍を含む関心組織を摘出した。各組織の放射化学活性値を γ カウンターで測定して、組織への薬剤の取り込み率を算出した。

(3) 治療薬としての有用性検討

- ① 薬剤処理時の細胞内シグナルへの影響を WB で検討した。無血清培地で培養した細胞を薬剤で処理した後、EGF で刺激し、一定時間後に細胞を回収した。また、24 時間薬剤処理した時の生細胞数及び死細胞数を計数して、SF 処理群 (コントロール) と比較し、細胞増殖能を検討した。
- ② A431 細胞を移植したマウスに、溶媒のみ、SF (0.8 mg/kg)、TSF (0.8 mg/kg)、TSSF (1.5 mg/kg) を 1 回/日、5 日/週、2 週間に渡って連続投与し、腫瘍体積を測定した。開始直前の腫瘍の大きさを 1 として相対的な腫瘍成長率を算出した。

4. 研究成果

(1) 薬剤の合成と ¹²⁵I 標識

- ① 合成：大腸菌を用いた大量合成と、GST タグを利用したカラム精製及び GST タグ除去後のカラム精製により、一度に高純度で大量のタンパク質を獲得することができた。
- ② ¹²⁵I 標識：TSF (¹²⁵I-TSF) は標識収率が 77%、TSSF (¹²⁵I-TSSF) は 37% であった。両薬剤とも 1 分子あたり約 0.8 分子の ¹²⁵I が導入され、カラムによる抽出後の放射化学的純度は 95% 以上であった。従って、¹²⁵I 標識体は in vivo 実験にも使用可能であると判断した。

(2) 画像診断薬剤としての有用性検討

- ① 細胞内導入：WB の結果、TAT を融合した TSF または TSSF で処理した細胞でのみ目的分子量の位置にタンパク質を検出した。つまり、本研究で設計・合成した TAT は、Grb2 の SH2 domain を細胞内へ輸送可能であることが確認できた。
- ② TSF と TSSF の特性比較：¹²⁵I-TSF と ¹²⁵I-TSSF を用いて、細胞内への導入効率を比較したところ、EGFR の発現量に関わらず、TSF の方が TSSF のそれよりも多かった (A431 細胞では TSF:25%、TSSF:16%)。細胞内滞留性をタンパク質の半減期 (薬

剤処理直後の細胞内量を 1 として、半数になる時間) で比較すると、TSF と TSSF はほぼ同じであった (TSF:40 分、TSSF:33 分)。以上の結果より、画像診断薬剤として、TSF の方がより適していると判断し、TSF の特性を明らかにするために検討を進めた。

- ③ TSF と EGFR の結合：EGF 処理により TSF と活性型 EGFR の結合数が約 2 倍に増加した。これは、細胞内導入後も Grb2 の SH2 domain の機能が維持されていることを示しており、EGFR の活性を検出可能であると判断した。
- ④ EGFR 発現量と TSF の細胞内局在：A431 細胞内では大部分の TSF は細胞膜に存在し、EGFR との共免疫染色により両者は共局在していることが明らかとなった。一方、MDA-MB435 細胞では、TSF は細胞質内に斑点状に分布していた。TAT 融合タンパク質は細胞内に取り込まれた後に、endosome へ輸送されるという報告があること、細胞内のタンパク質の多くは lysosome で分解されることから、次いで TSF と lysosome の局在を免疫染色で観察した。A431 細胞内では、一部の TSF と lysosome との共局在が観られたが、ほとんどの TSF は lysosome の局在場所とは一致しなかった。一方、MDA-MB435 細胞内では lysosome と TSF とは同じ位置で斑点状に局在していた。以上の結果より、TSF は EGFR と結合しない場合は、速やかに lysosome で分解を受けると推測された。
- ⑤ EGFR の活性量と TSF の細胞内滞留性：画像診断薬剤として有効であるためには、細胞内滞留性が良いことが必要である。そこで、細胞内での TSF の滞留性と EGFR の活性との関係を知るために、TSF 処理後に EGF で EGFR を活性化させた細胞と、EGF で処理せずに EGFR が不活性化のままの細胞とで、経時的な TSF 量の変化を調べた。その結果、EGFR の活性化により TSF の細胞内滞留性が向上し、タンパク質の半減期も延長した (Fig. 2, EGF 処理細胞:42 分、未処理細胞:7.2 分)。また、細胞を EGFR 選択的チロシンキナーゼ阻害剤で処理すると、細胞内への TSF の取り込み自体は影響を受けなかったが、TSF の細胞内滞留性は有意に低下した。培地置換 10 分後の TSF 量は、コントロール細胞では置換前の 7 割であったのに対し、阻害剤処理した細胞では 4 割であった (Fig. 3)。これらの結果からも、細胞内での TSF の滞留性には EGFR の活性が強く関連しており、TSF は活性型 EGFR を検出するための画像診断薬剤として有用であることが考えられた。

- ⑥ EGFR の活性化と TSF の細胞内局在：EGF 処理した細胞では、TSF は細胞膜周辺に局在していた。また、EGFR との共免疫染色を行うと両者の共局在が観察された。一方、EGFR 不活性化細胞では TSF の分布は細胞質内で斑点状を示した。従って、TSF の局在は EGFR の活性により制御されていることが考えられた。

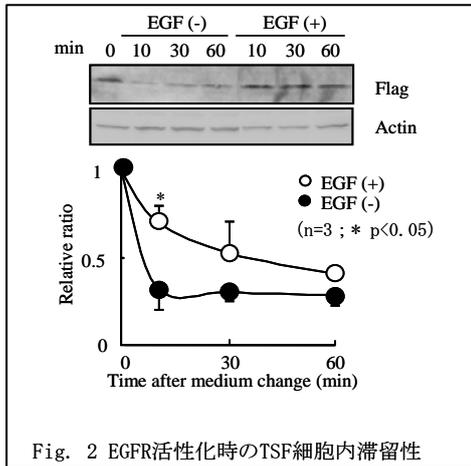


Fig. 2 EGFR活性化時のTSF細胞内滞留性

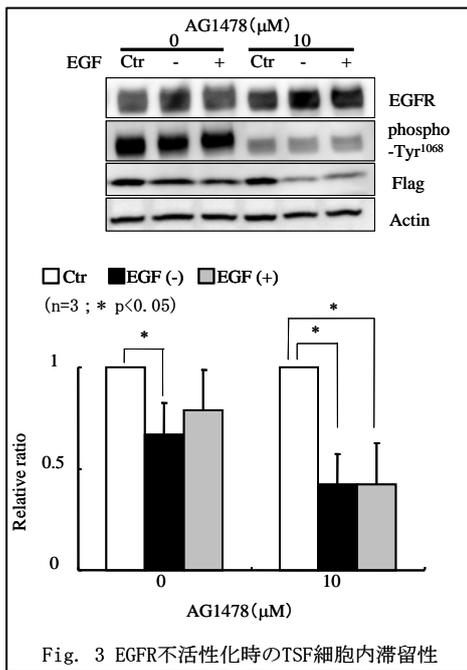


Fig. 3 EGFR不活性化時のTSF細胞内滞留性

- ⑦ TSF のマウス体内動態：画像診断薬剤の開発研究では、薬剤の生体内での動態を検討することは必須である。初めに、マウス血しょう中での ^{125}I -TSF の安定性を経時的に調べた。その結果、混合 48 時間後でも約 90% が安定に存在することが分かった。そこで次に、担がんマウスを用いて ^{125}I -TSF の体内動態を検討した。その結果、薬剤投与後、A431 細胞由来腫瘍での放射化学活性値は経時的に増加

し、1 時間で 4.2%ID/g と最高値を示した。一方、MDA-MB435 細胞由来腫瘍や他の正常組織の放射化学活性値は経時的に減少した。A431 腫瘍対他組織の比は投与 1 時間後で最高値を示した (Fig. 4)。 ^{125}I -SF は腫瘍への取り込みが認められなかったことから、腫瘍への Grb2 の SH2 domain 導入には TAT が必要であることを in vivo でも確認できた。

本研究から、Grb2 の SH2 domain を有した TSF は、EGFR 活性依存的に、標的との結合の増加や細胞内滞留性の向上が起こることが明らかとなった。また、in vivo においても、TSF は EGFR の発現量 (活性量) の違いにより、異なる集積性を示した。以上のことから、TSF は活性型 EGFR を標的とするがんの画像化に利用可能であると結論付けられる。

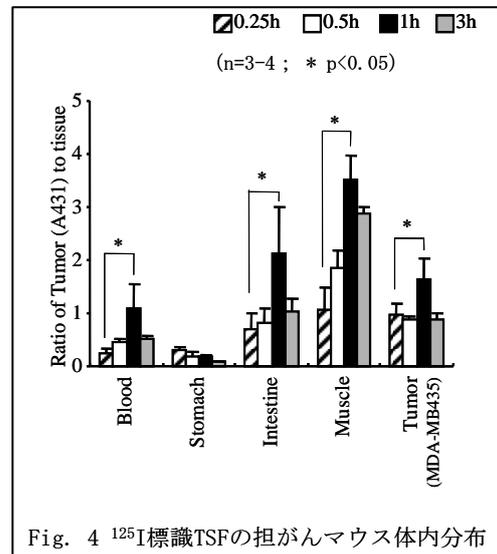


Fig. 4 ^{125}I 標識TSFの担がんマウス体内分布

(3) 治療薬剤としての有用性検討

- ① 細胞増殖への影響：薬剤を 24 時間処理した時の細胞数と生存率を測定した。TSF または TSSF で処理した細胞の生存率は約 70% であり、コントロールと変わらなかった。しかしながら、生細胞数はコントロールよりも有意に少なかった。このことから、TSF と TSSF は細胞増殖を抑制することが考えられた。
- ② 細胞内シグナル伝達への影響：EGFR-Grb2 シグナルの一助を担う ERK の活性化を、そのリン酸化を指標に WB で調べた。TSSF 処理細胞では、EGF 刺激前の p42-ERK のリン酸化はコントロールよりも有意に減少していた。EGF 処理後は正常にリン酸化された。一方、TSF 処理細胞では、EGF 処理前後ともコントロールと同程度のリン酸化量を示した。このことから、少なくとも TSSF は細胞内シグナルの阻害機能を有していることが

推側された。

- ③ 治療実験：担がんマウスへの連続投与の結果、TSSF 投与群でのみ有意な腫瘍成長抑制効果が得られた。実験終了後の腫瘍の大きさは、SF 処理群では開始直後の4倍であったのに対し、TSF 処理群は3.5倍、TSSF 処理群は2倍であった。しかしながら、TSSF 処理群でも腫瘍の縮小は観察されず、薬剤を投与していない期間は腫瘍の成長が観察された。

本研究から、TSSFの方がTSFよりもSH2 domainの数が多いので、細胞増殖や腫瘍成長において、より強い阻害効果を示したと推察される。従って、EGFR過剰発現腫瘍の治療薬としては、TSSFの方が適していると結論付けられる。薬剤投与期間中は細胞増殖抑制や腫瘍成長抑制は観られるものの、アポトーシス誘導や腫瘍縮小を引き起こすほどではないことから、TSSFは他の治療薬の治療補助剤として併用することで、がん治療の進展に寄与できると考える。

(2)と(3)で得られた研究結果から、本研究で合成したTSF及びTSSFは、がんの診断や治療を充実させ、個別化医療の発展の一助となり得ることが期待できる。

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)

[雑誌論文] (計2件)

- (1) Yuriko Saito, Takako Furukawa, Yasushi Arano, Yasuhisa Fujibayashi, Tsuneo Saga; Basic study on SH2 domain of Grb2 as a molecular probe for detection of RTK activation. Int J Oncol, 査読有, 2010, in press
- (2) 齋藤 有里子, 千葉大学大学院, 博士論文, PET薬剤を用いたがんの質的診断に関する基礎的研究, 査読有, 2010年, 100頁

[学会発表] (計5件)

- (1) 齋藤 有里子, 古川 高子, 荒野泰, 藤林 泰久, 佐賀 恒夫; アダプター分子を利用したEGFR標的イメージング剤の有用性検討, 放射性医薬品・画像診断薬研究会, 2009-11-14~2009-11-14, 日本: 京都市
- (2) 齋藤 有里子, 古川 高子, 荒野泰, 藤林 泰久, 佐賀 恒夫; 活性化型EGFRを画像化するためのGrb2のSH2 domainを利用したプローブの

作製と有効性の検討, 日本核医学会, 2009-10-01~2009-10-03, 日本: 旭川市

- (3) Yuriko Saito, Takako Furukawa, Yasushi Arano, Yasuhisa Fujibayashi, Tsuneo Saga; The Src-homology 2 (SH2) domain of growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) has a potential for in vivo imaging, targeting activated epidermal growth factor receptor (EGFR), The Society for Molecular Imaging, November 23-26, 2009, Canada: Montreal
- (4) 齋藤 有里子, 古川 高子, 荒野泰, 藤林 泰久, 佐賀 恒夫; 活性化型EGFRイメージングに向けた基礎研究, 分子イメージング研究シンポジウム2008 飛躍を迎えた創薬・疾患診断研究, 2008-12-14~2008-12-15, 日本: 神戸市
- (5) Yuriko Saito, Takako Furukawa, Yasushi Arano, Yasuhisa Fujibayashi, Tsuneo Saga; Basic studies for imaging activated form of EGFR, The Society for Molecular Imaging, November 10-13, 2008, France: Nice

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 齋藤 有里子
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
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし