

機関番号：84203

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20790926

研究課題名（和文）上皮成長因子（EGF）受容体阻害に基づく癌分子標的放射性診断薬の開発

研究課題名（英文）PET Imaging for Assessment of Efficacy of EGFR Kinase Inhibitors

研究代表者

加川 信也（KAGAWA SHINYA）

滋賀県立成人病センター研究所・主任研究員

研究者番号：10393191

研究成果の概要（和文）：

本研究では、腫瘍において発現亢進する上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼに着目した新規のポジトロン画像診断（PET）用薬剤 I-mIPQA の開発研究を行った。癌分子標的薬剤として注目されている gefitinib（イレッサ[®]）に代表される抗がん剤の治療効果予測や治療効果判定等を定量評価しうる分子イメージング法を確立することで、その阻害剤適応癌患者の層別化を可能にする画像診断を目指すものである。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to assess the efficacy of I-mIPQA PET imaging for prediction of responsiveness to therapy with EGFR kinase inhibitor gefitinib with orthotopic non-small cell lung carcinoma xenograft in mice. Human lung carcinoma cells PC14GL, H441GL, H3255GL, and H1975GL, expressing different EGFR mutants and various levels of TGF α . In vitro uptake study of I-mIPQA with these lung cancer cell lines, biodistribution study of I-mIPQA in tumor bearing mice with or without inhibitor were performed. I-mIPQA PET imaging: 3 and 24 hours imaging post intravenous injection of radiotracer using microPET were also conducted followed by autoradiography (ARG) study of I-mIPQA after PET imaging with or without treatment with Gefitinib (Iressa), for three days after PET imaging. PET with I-mIPQA would be a promising molecular imaging of different EGFR kinase mutant NSCL carcinomas for prediction of responsiveness to EGFR Kinase inhibitors in patients.

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	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
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・放射線科学

キーワード：上皮成長因子、PET 画像診断、癌、分子標的

1. 研究開始当初の背景

リン酸化酵素であるチロシンキナーゼ（TK）をはじめとする細胞内シグナル伝達経路を標的とする分子標的阻害剤が抗癌剤と

して開発されている。中でも細胞増殖等と密接に関係する上皮成長因子受容体（EGFR）は、ほとんどの上皮系癌（咽頭癌、食道癌、胃癌、大腸癌、膀胱癌、卵巣癌、甲状腺癌、

脳腫瘍等)で多量に発現し、活性上昇することが確認されている。また、EGFR-TK 活性の上昇は細胞における発癌の初期過程で起こりうることから、EGFR-TK 活性の把握が癌の発生のメカニズム解明の一端になりうるとも考えられている。とりわけ肺癌におけるEGFR-TK 阻害剤治療は、gefitinib を初めとして広く臨床応用されている。しかしその劇的な抗腫瘍効果の一方で、EGF 受容体発現や活性度が亢進していない癌での無効例や副作用発生の問題から、患者の層別化や治療効果予測・効果判定の必要性が叫ばれている。

分子イメージングの代表的な PET 画像診断は、全身を短時間かつ非侵襲的に繰り返し撮像できる特徴を有し、分子標的薬剤治療法と密接な関わりを持つ医療画像情報である。特定の分子構造・代謝やそれに作用する薬剤(分子標的薬剤)をターゲットとした放射性薬剤を使用することで、分子標的薬剤治療の治療前効果予測や治療後効果判定を定量評価可能な分子イメージングとして注目されている。

このようなEGFR-TK 活性を計測・定量し可視化することが可能なポジトロン診断薬剤の開発は、癌の早期画像診断に繋がるだけでなく、さらに、標識する核種を変えることにより放射線の内部照射による癌治療薬の創薬への展開も期待される。そこで、EGFR-TK を標的とし、診断と治療の双方が可能な放射性薬剤の開発をし、gefitinib に代表とされるEGFR-TK 阻害剤の治療効果判定における癌診断放射性薬剤としての有用性を検討し、さらに癌治療用放射性薬剤としての可能性についての基礎的評価を行う。今回開発するEGFR-TK をターゲットにした新規薬剤は、癌のトランスレーショナルリサーチの一翼を強力に推進することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞内シグナル伝達系で重要なリン酸化酵素 TK に着目し、特にEGF 受容体のリン酸化酵素活性をターゲットにした新規分子イメージング薬剤の開発と画像解析法の確立を目標としたトランスレーショナルリサーチを行う。Gefitinib に代表されるEGFR-TK 阻害薬による肺癌治療戦略に大きく寄与しうる画像診断の開発を目指し、放射性ヨード標識 IPQA; (E)-But-2-enedioic acid [4-(3-iodoanilino)-quinazolin-6-yl]-amide-(3-morpholin-4-yl-propyl)-amide をはじめとする新規薬剤を合成し、EGF 受容体の分布やEGFR-TK 活性を定量化しうる生体イメージング診断法に向けた基礎研究を行う。

3. 研究の方法

① EGFR-TK 選択的阻害剤の合成

高いEGFR-TK 阻害活性を有するには、gefitinib を代表とするキナゾリン骨格を有する種々の誘導体を *In Silico Modeling* にてドラッグデザインする。具体的には、キナゾリンの6位にアクリルアミドの構造を導入した新規薬剤の4-[(3-ヨードフェニル)アミノ]-キナゾリン誘導体であるIPQA 及びその誘導体の合成を行う。本研究で開発された薬剤の構造確認は、¹H-NMR や高分解能マスペクトルにて確認する。

② 放射性ヨウ素標識体の合成

放射性ヨウ素標識体の合成にあたり、まずその反応前駆体を合成する。得られた前駆体は、塩酸酸性下、過酸化水素を酸化剤として用い、放射性ヨウ化ナトリウムを室温で10分間反応させた後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分離精製し目的標識物を得る。将来の臨床応用を目指す上では、無担体、高標識率で高比放射能の放射性薬剤合成法開発が必要で、そのためには反応溶液や触媒、温度等の種々の反応条件や分離溶媒選択さらには至適分離・精製方法に関する詳細な検討を繰り返し行い、簡便で安全かつ効率の良い放射性標識合成法の確立を目指す。

③ I-mIPQA のEGFR-TK に対する親和性評価と細胞内性及び集積機序検討

癌細胞による取り込み実験において使用する細胞は、PC14 (wild type EGFR 非発現性: gefitinib 感受性なし)、H441 (wild type EGFR 発現性: gefitinib 感受性++)、H3255 (L858R mutant EGFR 発現性: gefitinib 感受性+++)、H1975 (L858R and T790M double mutant EGFR 発現性: gefitinib 耐性)といった実際の臨床で遭遇する肺癌パターンを想定した4種類のヒト由来肺癌細胞を用いる。単層培養した肺癌細胞にI-mIPQA を添加・暴露させ、一定時間後に細胞及び培養液を採取・分離し秤量した後、放射エネルギーをガンマカウンターで測定し、細胞成分と培養液中の単位重量あたりの放射能の比率を求めることにより、I-mIPQA の肺癌細胞内への特異的取り込みを経時的に評価する。また、EGFR-TK 阻害剤としてgefitinib を用いた、I-mIPQA の腫瘍細胞における集積阻害検討も行う。

④ 担癌モデル動物を用いた gefitinib 治療効果予測の検討

i) 担癌動物を用いたI-mIPQA の肺癌集積検討

上述の肺癌細胞を移植した担癌動物モデルを作成し、腫瘍径が約1cm のものをPET 画像検査に供する。実験時の動物はイソフルレン吸入麻酔或いはネンブタール腹腔麻酔

管理の下に行う。I-mIPQA を含む生理食塩水溶液を尾静脈より注射し、動物用 PET 装置にてダイナミックイメージングを行う。PET データ収集後は専用のソフトウェアを用い画像再構成し至適 PET 画像作成を模索する。対称として gefitinib 負荷時の I-mIPQA-PET 画像検査を行い集積阻害効果も検討する。

ii) I-mIPQA オートラジオグラフィ

PET 検査終了後のモデル動物は、速やかに深麻酔下にて屠殺し、腫瘍及び関心臓器を摘出後凍結固定しマイクロトームにて組織を切片化する。そして専用のイメージングプレートによりオートラジオグラムを作成し、トレーサの腫瘍組織中の局在分布を検討し、トレーサの腫瘍内集積機序の解明も行う。

iii) 担癌動物 gefitinib 治療と I-mIPQA -PET による治療効果予測能及び治療モニタリング検討

また EGFR-TK 阻害剤による肺癌治療に即した検討として、担癌モデル動物の EGFR-TK 阻害剤による治療前後の I-mIPQA-PET の腫瘍集積性変化と抗腫瘍効果を比較検討する。

4. 研究成果

①EGFR-TK 選択的阻害化合物の選択：高い EGFR-TK 阻害活性を有するにはキナゾリン骨格が重要であることに着目し、キナゾリン骨格を有する種々の誘導体を In Silico Modeling にてドラッグデザインした結果、4-[(3-ヨードフェニル)アミノ]-キナゾリン誘導体である IPQA; (E)-But-2-enedioic acid [4-(3-iodoanilino)-quinazolin-6-yl]-amide-(3-morpholin-4-yl-propyl)-amide を画像診断候補化合物として選択した。

②放射性ヨウ素標識体 I-mIPQA の合成：放射性ヨード標識 ImPQA; (E)-But-2-enedioic acid [4-(3-iodoanilino)-quinazolin-6-yl]-amide-(3-morpholin-4-yl-propyl)-amide の簡便で安全かつ効率の良い放射性標識合成法の確立にあたり（基礎実験には ^{125}I を使用）、ヨウ素-スズ置換反応にてヨウ素標識部位にトリブチルスズ基の導入し前駆化合物を合成した。得られた前駆化合物と放射性ヨウ化ナトリウムを室温で 10 分間反応させた後、高速液体クロマトグラフィーで分離精製し目的標識化合物である I-mIPQA を得ることに成功した。（図 1）

③I-mIPQA の EGFR 発現程度の異なる 4 種類のヒト由来肺癌細胞（図 2）への取込実験や担癌動物モデルマウス用いた腫瘍集積性検討を行った。I-mIPQA の肺癌細胞取り込み実験では、EGFR 発現の高い癌細胞では速やかな細胞内集積と滞留が確認された。またイレッサを用いた検討では集積阻害効果が認められた。（図 3、4）

④担癌動物モデルマウスを用いた PET イメージングおよびオートラジオグラフィ検討では EGFR 陽性腫瘍への集積を認め、イレッサ前処置にて I-mIPQA の腫瘍集積阻害も認められた。また EGFR の陰性モデルおよびイレッサ耐性モデルでは腫瘍への集積を認めなかった。またイレッサを用いた検討では集積阻害効果が認められた。担癌動物モデルマウスを用いた PET イメージングおよびオートラジオグラフィ検討では EGFR 陽性腫瘍への集積を認め、イレッサ前処置にて I-mIPQA の腫瘍集積阻害も認められた。また EGFR の陰性モデルおよびイレッサ耐性モデルでは腫瘍への集積を認めなかった。（図 5-8）

しかし一方では、放射性薬剤の肝臓集積が非常に強く、薬剤の胆汁排泄による腹部集積亢進が認められ、I-mIPQA の脂溶性が PET 画像化の妨げになることが予想された。

この結果をふまえ、I-mIPQA の薬剤設計を見直し、MD アンダーソン癌センターの研究グループと共同で I-PEG6-IPQA を新規合成した。基礎検討の結果 I-PEG6-IPQA は I-mIPQA に比し EGF 受容体発現癌細胞の特異的集積性はさらに上昇することが明らかになった。I-PEG6-IPQA PET 画像検討では、I-mIPQA に比し水溶性が向上した分、肝臓集積は減少し、より臨床応用性に期待が高まった。

以上の研究により、I-mIPQA を用いた EGFR-TK を発現腫瘍のイメージングおよび EGFR-TK 阻害剤の治療効果予測や治療効果判定応用への可能性が示唆された。

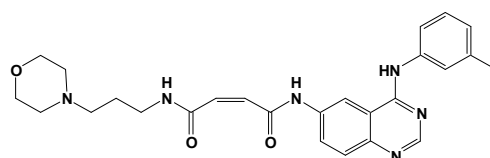


図 1 IPQA の構造

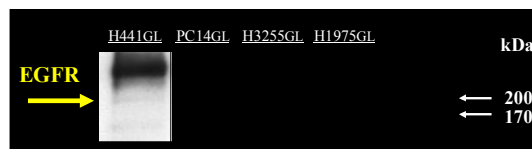


図 2 肺癌細胞の EGF 受容体発現解析結果

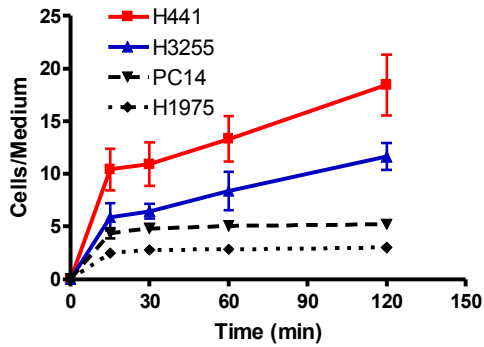


図3 I-IPQA の肺癌細胞への集積実験結果

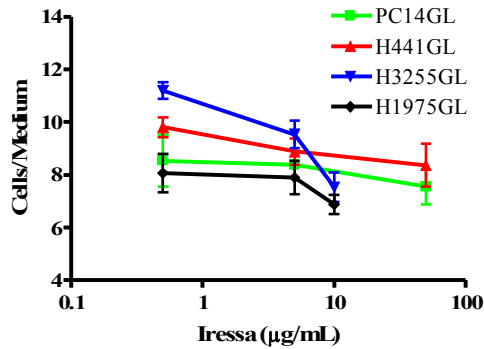


図4 I-IPQA の肺癌細胞への集積実験結果 (イレッサによる集積阻害)

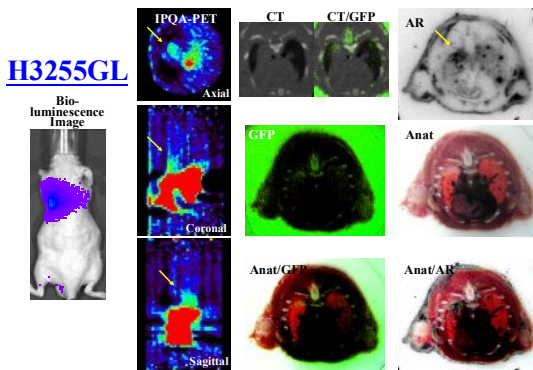


図5 I-IPQA の胆癌動物イメージング (H3255GL 細胞: EGFR 発現亢進細胞)

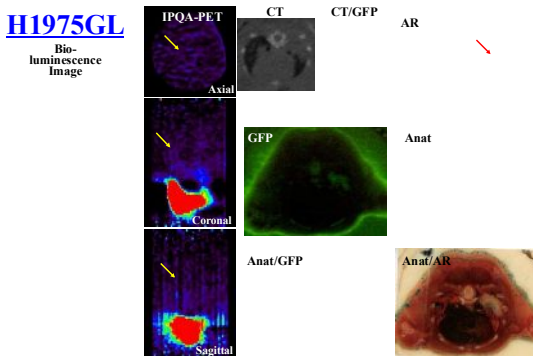
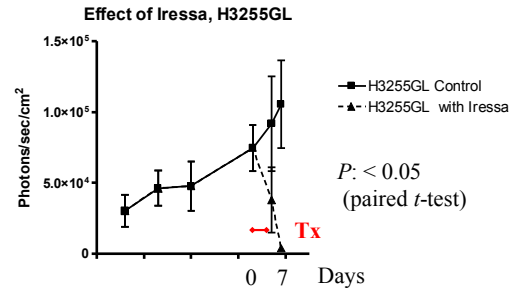
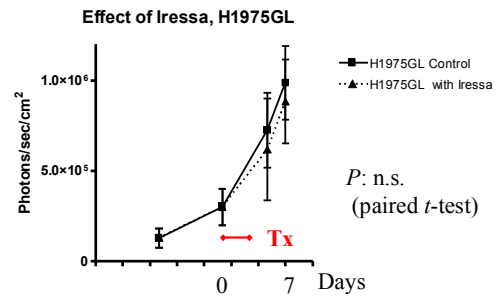


図6 I-IPQA の胆癌動物イメージング (H1975GL 細胞: EGFR 発現陰性細胞)



IPQA-PET analysis	ID%/g	Tumor / Lung ratio
H3255GL		
3hr	6.62±1.25	3.73±0.31
24hr	3.09±1.12	6.99±2.05
with Iressa (IP, 100mg/kg, 1hr before IPQA)		
3hr	1.33	1.25
24hr	1.68	1.88

図7 胆癌動物のイレッサ治療有無による I-IPQA の集積検討 (H3255GL 細胞: EGFR 発現亢進細胞)



IPQA-PET analysis	ID%/g	Tumor / Lung ratio
H1975GL		
3hr	0.77±0.11	1.17±0.25
24hr	0.20±0.05	0.80±0.20

図8 胆癌動物のイレッサ治療有無による I-IPQA の集積検討 (H1975GL 細胞: EGFR 発現陰性細胞)

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9件)

① Ono M, Cheng Y, Kimura H, Cui M, Kagawa S, Nishii R, Saji H. Novel ¹⁸F-labeled benzofuran derivatives with improved properties for positron emission tomography (PET) imaging of β-amyloid plaques in Alzheimer's brains. J Med Chem. 54(8): 2971-9, 2011.

②Hirata M, Kanai Y, Naka S, Matsumuro K, Kagawa S, Yoshimoto M, Ohmomo Y. Evaluation of radioiodinatedquinazoline derivative as a new ligand for EGF receptor tyrosine kinase activity using SPECT. *Ann Nucl Med.* 25(2) : 117-24, 2011

③ Yamauchi H, Nishii R, Higashi T, Kagawa S, Fukuyama H. Silent cortical neuronal damage in atherosclerotic disease of the major cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(3) : 953-61, 2011

④ Yamauchi H, Nishii R, Higashi T, Kagawa S, Fukuyama H. Selective neuronal damage and Wisconsin Card Sorting Test performance in atherosclerotic occlusive disease of the major cerebral artery. *J NeurolNeurosurg Psychiatry.* 82(2) : 150-6, 2011

⑤Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, Kawashima H, Saji H. Fluorinated Benzofuran Derivatives for PET Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Brains. *ACS Med. Chem. Lett.* 1(7) : 321-5, 2010

⑥Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, Saji H. A novel ^{18}F -labeled pyridylbenzofuran derivative for imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorg Med ChemLett.* 20(20) : 6141-4, 2010

⑦ Yamauchi H, Nishii R, Higashi T, Kagawa S, Fukuyama H. Hemodynamic compromise as a cause of internal border-zone infarction and cortical neuronal damage in atherosclerotic middle cerebral artery disease. *Stroke.* 40(12) : 3730-5, 2009

⑧Kudo T, Hata T, Kagawa S, Kishibe Y, Iwasaki J, Okazawa H. Differences in early-phase tracer distribution in lung between ^{11}C -acetate and ^{13}N -ammonia. *Nucl Med Commun.* 30(5) : 343-9, 2009

⑨Kudo T, Hata T, Kagawa S, Kishibe Y, Iwasaki J, Nakano A, Okazawa H. Simple quantification of myocardial perfusion by pixel-by-pixel graphical analysis using carbon-11 acetate: comparison of the K-complexes of carbon-11 acetate and nitrogen-13 ammonia. *Nucl Med Commun,* 29(8) : 679-85, 2008

[学会発表] (計 8 件)

① ヒト腫瘍細胞における ^{14}C MeAIB と ^3H MET の集積量とアミノ酸トランスポーターの発現量との比較

加川信也、西井龍一、東達也、岸辺喜彦、高橋昌、大江和代、高橋典也、奥平宏之、小林正和、上原知也、荒野泰、川井恵一
第 50 回日本核医学会学術総会 2010.11.11-13 大宮

② Compared with gene expression levels of amino acid transporter and accumulation of ^{14}C MeAIB and ^3H MET in human carcinomas
Shinya Kagawa, Ryuichi Nishii, Tatsuya Higashi, Fumiya Takahashi, Kazuyo Ohe, Hiroyuki Okudaira, Masato Kobayashi, Tomoya Uehara, Yasushi Arano, Keiichi Kawai
World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2010 2010.9.10 Kyoto

③ システム A アミノ酸輸送 PET イメージング ^{11}C MeAIB-PET の評価—神経膠芽腫における ^{11}C MET と ^{18}F FDG との比較—

加川信也、西井龍一、東達也、岸辺喜彦、高橋昌、大江和代、高橋典也、小林正和、川井恵一、齋木雅章
第五回日本分子イメージング学会 2010.5.14 大津

④ Characterisation of system A amino acid transport and system L: uptake mechanism of ^{14}C MeAIB and ^3H Methionine in human carcinomas

Shinya Kagawa, Ryuichi Nishii, Tatsuya Higashi, Hiroyo Araki, Hiroyuki Okudaira, Tomoya Uehara, Masato Kobayashi, Mitsuyoshi Yoshimoto, Yasushi Arano, Keiichi Kawai
European Association of Nuclear Medicine (EANM) Congress 2009 2009.10.11 Barcelona

⑤ アミノ酸輸送系システム A とシステム L の比較—ヒト腫瘍細胞における ^{14}C MeAIB と ^3H MET の集積機序—

加川信也、西井龍一、東達也、荒木宏予、奥平宏之、上原知也、小林正和、吉本光喜、荒野泰、川井恵一
第 49 回日本核医学会学術総会 2009.10.1 旭川

⑥ アミノ酸輸送系システム A 特異的基質 ^{14}C MeAIB のヒト腫瘍細胞における集積機序— ^3H Met との比較—

加川信也、西井龍一、東達也、荒木宏予、奥平宏之、上原知也、小林正和、吉本光喜、荒野泰、川井恵一
第四回日本分子イメージング学会

2009.5.15 東京

⑦アミノ酸輸送システム A を標的とした
[N-methyl-¹¹C]MeAIB 合成の基礎的検討
加川信也、西井龍一、東達也、上原知也、岸
辺喜彦、岩崎甚衛、川井恵一、荒野泰 第 48
回日本核医学会 2008.10.25 千葉

⑧EGFR-TK 阻害剤の治療効果予測を目的と
した I-mIPQA-PET 診断薬の基礎検討
加川信也、西井龍一、清野泰、小川数馬、東
達也、岸辺喜彦、岩崎甚衛、吉本光喜、川井
恵一、Juri Gelovani
第三回日本分子イメージング学会
2008.5.22 大宮

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加川 信也 (KAGAWA SHINYA)

滋賀県立成人病センター研究所

研究者番号：10393139

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし