

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08090

研究課題名(和文)放射性銅(Cu-67)の活用による効果的・効率的がん治療の実現

研究課題名(英文)Use of radioactive copper (67Cu) makes effective and efficient cancer treatment possible

研究代表者

飯田 靖彦(Iida, Yasuhiko)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60252425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は治療用放射性核種としての ^{67}Cu に着目し、がん治療における有効性を調べるとともに、 ^{67}Cu による内用放射線療法の臨床的有用性を基礎的に評価した。すなわち神経内分泌腫瘍(NET)に発現するsomatostatin受容体を標的とするペプチド化合物を設計・合成し、 ^{67}Cu で標識し、ラット膵臓外分泌腺癌(AR42J)細胞を移入したヌードマウスでのインビボ分布動態、代謝状態などを調べた後、腫瘍抑制効果を評価した。さらに腫瘍サイズがその腫瘍抑制効果にどの程度影響するかについて検証する目的で、様々な腫瘍サイズの担がんモデルマウスを作成し、比較検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内で内用放射線療法に用いられている4核種以外にも治療での有効性が期待されるRIは多数存在する。この中で ^{67}Cu は β^- 線のエネルギーが低く、十分な治療効果が得られるか不明である一方、大量投与が可能で、がん組織の状態によっては効果的・効率的な治療を実現することが期待できる。様々な腫瘍に対し ^{67}Cu 標識薬剤の治療効果を検証することで低エネルギー β^- 線の有効性が明らかになれば、様々なエネルギー、半減期を有する治療用RIの研究開発へとつながると考えられる。さらにこれらの成果は、患者の病態に合わせた効果的・効率的な治療、個別化医療に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Copper-67 is an attractive radionuclide for nuclear medicine therapy, which has an emitted β^- -particle energy suitable for applying to small tumors (0.392 MeV) and a physical half-life of 61.8 hours long enough to damage them.

In this study, we prepared a novel somatostatin derivative, ToDBTTATE, labeled with ^{67}Cu , and evaluated its potential for cancer therapy in mice bearing AR42J rat pancreatic tumor cells. ^{67}Cu -ToDBTTATE showed high accumulation in the tumor and substantial tumor size reduction was observed in all mice treated with ^{67}Cu -ToDBTTATE. Furthermore, mice with tumors of various sizes were prepared and the differences in the therapeutic effect of ^{67}Cu -ToDBTTATE on the tumor size were examined to clarify the relationship between tumor size and the therapeutic effects of ^{67}Cu -ToDBTTATE. As a result, a tumor growth constricting effect was observed in all mice compared with the control, but some tumor growth was observed in the group with a tumor size of more than 800 mm³.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード： ^{67}Cu 核医学治療 がん マウス 神経内分泌腫瘍 somatostatin 放射性薬剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射性薬剤を体内に投与して治療を行う内用放射線療法は、全身に広がったがん細胞を標的にできる有効な治療法であるとともに、患者への負担の少ない効果的な治療法として注目されている。この治療法には、細胞、組織に対する障害作用の大きい α 線、 β 線、オーグ電子などを放出するRIが用いられ、現在、国内で利用できるのは β 線放出核種である ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu と、 α 線放出核種である ^{223}Ra の4核種のみである。この内 Na^{131}I と $^{223}\text{RaCl}_2$ は生理的集積に基づいて治療効果を示すのに対し、リガンドと結合し、免疫作用、受容体結合などを利用して標的組織に集積させる薬剤は、応用性が高い。

^{90}Y は β 線のエネルギーが2.28MeVと非常に強く、高い治療効果を示すが、他臓器への被ばくにより投与量が制限される。これに対し低エネルギー β 線放出核種を利用すれば副作用を低減でき、大量投与が可能となるが、どの程度治療効果が得られるかは定かでない。しかしながら実際、 ^{90}Y よりエネルギーの低い ^{131}I や ^{177}Lu などは治療効果が得られており、よりエネルギーの低い β 線放出核種の利用が有効となる可能性はある。低エネルギー β 線放出核種の治療効果を調べるとともに、こういった性状のがん組織に有効かを明らかにすることは、患者の病態に合わせた効果的・効率的な治療、個別化医療に貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

^{67}Cu は β 線のエネルギーが低く、十分な治療効果が得られるか不明である一方、大量投与が可能で、がん組織の状態によっては効果的・効率的な治療を実現することが期待できる。実際、内用放射線療法の治療効果は、標的となるがん組織の性状、大きさと放射線の線質、エネルギーなどに左右され、個々の標的に対して最も効率的なエネルギーが存在する可能性が示唆されている。すなわちエネルギーが低いことで効果を及ぼす範囲は狭くなるが、ある程度小さな腫瘍であれば低エネルギー β 線でも十分な治療効果が得られると考えられる。本研究では、 ^{67}Cu 標識薬剤を設計・合成し、担がんモデルマウスを用いて分布動態、抗腫瘍効果を評価するとともに、腫瘍サイズと ^{67}Cu 標識薬剤の治療効果の関係を明らかにすることを目的とする。得られた結果から ^{67}Cu の臨床的有用性、さらには ^{67}Cu を用いた個別化治療の可能性を評価する。

3. 研究の方法

(1) somatostatin 誘導体 ToDBTTATE について ^{67}Cu 標識反応の条件検討を行った。7 濃度 (0.004 ~ 4,000 $\mu\text{mol/L}$) のリガンド存在下で ^{67}Cu 0.1 MBq を加え 50 $^{\circ}\text{C}$ にて 1 時間反応した。さらに、治療実験を想定して ^{67}Cu 19 MBq に対し 3.8、38、380 $\mu\text{mol/L}$ のリガンドを加え同様に反応した。反応溶液の一部を TLC 展開後、TLC を 9 つに分画した。TLC 各分画の放射能を測定し、 ^{67}Cu 標識体を含む分画の放射能を TLC 全放射能で除して ^{67}Cu 標識率を算出した。

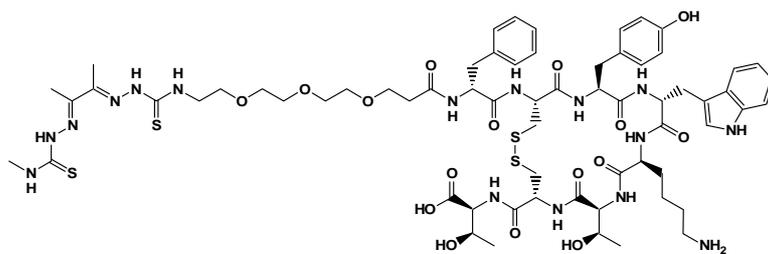


図1 ToDBTTATE の構造

(2) AR42J 細胞 2.5×10^6 個を BALB/c-nu/nu 雄ヌードマウスの右腹側部に皮下移入した。2 ~ 3 週間腫瘍の成長を待って担がんマウスを作製した。 ^{67}Cu -ToDBTTATE をマウスの尾静脈から投与し、投与 1、24、48 時間後に臓器を摘出、臓器重量と臓器中放射能を測定して、経時的な体内分布を評価した。次に ^{67}Cu -ToDBTTATE による腫瘍抑制効果を評価するため、担がんマウスを未処置群 (n=4)、ToDBTTATE 投与群 (n=6)、 ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与群 (n=6) に分け、比較検討を行った。 ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与群には、18 ~ 25 MBq の ^{67}Cu -ToDBTTATE を投与した。ToDBTTATE 投与群には、 ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与群と同等のペプチド量の非放射性 ToDBTTATE を投与した。各群の処置日を 0 日として、処置 1、2、6、9、12、14 日後に腫瘍サイズおよび体重を測定した。腫瘍サイズは、腫瘍の短径 a と長径 b を測定後、[腫瘍サイズ = $a^2 \times b / 2$] に代入して算出した。各測定日で得られた腫瘍サイズおよび体重から、0 日に対する相対腫瘍サイズと体重比を求め、 ^{67}Cu -ToDBTTATE の腫瘍抑制効果を評価した。

(3) 7 週齢の雄ヌードマウスの右腹側部に 2.5×10^6 個のラット膵臓がん AR42J 細胞を移入し、担がんマウスを作製した。2 ~ 3 週間腫瘍の成長を待って腫瘍サイズにより、 $< 200 \text{ mm}^3$ 、 $200 \sim 500 \text{ mm}^3$ 、 $500 \sim 800 \text{ mm}^3$ 、 $> 800 \text{ mm}^3$ の 4 グループに分類した。さらに各グループを未処置、

生理食塩水あるいは ToDBTTATE (ligand) を投与した control 群と ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与群の 2 群に分け、投与日を 0 日として、0、1、2、6、9、12、14 日時点における腫瘍の長径 a と短径 b をノギスで測り、[腫瘍サイズ(mm^3) = $a \times b^2 / 2$] に代入して腫瘍サイズを求めた。また同時点での体重も測定した。得られた結果から、各グループについて control 群と ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与群の 2 群間の腫瘍サイズを比較検討した。

(4) 8 週齢の雄ヌードマウス(BALB/c-nu/nu) 15 匹の腹側部に、結腸がん LS180 細胞 5×10^6 cells / 100 μL PBS を皮下移入した。腫瘍の成長を待ってランダムに 3 群に分け、74.7 kBq / 100 μL saline / mouse の $^{67}\text{CuCl}_2$ を尾静脈から投与した。投与 1、24、48 時間後、血液、各臓器、および腫瘍を摘出した。臓器等の湿重量および臓器中放射能を測定し、臓器単位重量あたりの放射能を算出した。次いで同様に作製した 10 匹の担がんマウスを 2 群に分け、一方を Saline 投与群 (n=6)、もう片方を $^{67}\text{CuCl}_2$ 投与群 (n=4) とした。Saline 投与群には saline 100 μL を、 $^{67}\text{CuCl}_2$ 投与群には 19.8 ~ 23.2 MBq / 100 μL saline を尾静脈から投与した。投与 0 日目、および 1、2、6、9、12、14 日目にマウスの体重、およびノギス計測により腫瘍体積を求めた。すべて評価が終了した 14 日目に、麻酔下安楽死後、腫瘍を摘出しその重量を測定した。

4. 研究成果

(1) ^{67}Cu 0.1 MBq を用いた標識反応条件検討において、ToDBTTATE は 40 $\mu\text{mol/L}$ 以上のリガンド濃度において 85% 以上の標識率が得られた。さらに ^{67}Cu 19 MBq を用いた検討では、38 $\mu\text{mol/L}$ の ToDBTTATE 濃度において 85% 程度の標識率が得られた。これは ^{67}Cu 標識反応がリガンド濃度依存的に進行していることを示唆しており、microwave 反応装置を用いることより、更なる標識率向上が期待できる結果となった。

^{67}Cu activity (MBq)	0.1							19		
ligand conc. ($\times 10^{-6}$, M)	0.004	0.04	0.4	4	40	400	4,000	3.8*	38*	380*
ligand (nmol)	0.001	0.01	0.1	1	10	100	1,000	1.9	19	190
specific activity** (MBq/nmol ligand)	100	10	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10	1	10^{-1}

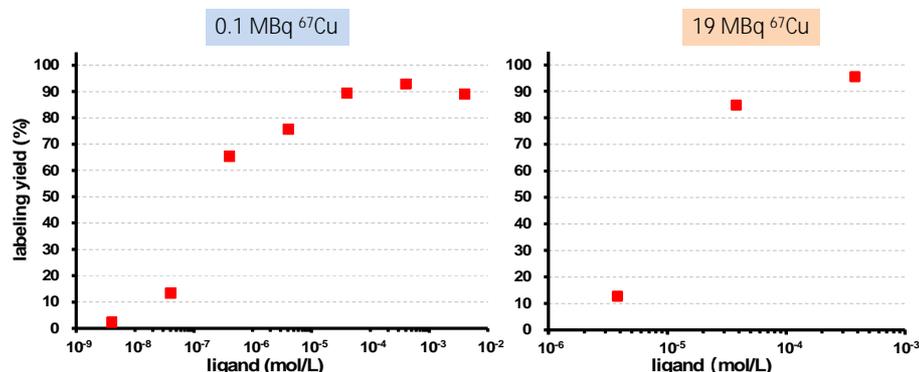


図2 各 ligand 濃度条件下における ^{67}Cu 標識率(%)の検討

(2) 担がんマウスにおける体内分布実験の結果、 ^{67}Cu -ToDBTTATE は腫瘍に長時間集積することが分かった。また腫瘍以外にも肝、腸、腎などにおいて滞留することが分かり、 ^{64}Cu 標識 ToDBTTATE の体内分布と類似した結果となった。次に腫瘍抑制効果を評価した結果、未処置群、ToDBTTATE 投与群における処置 14 日後の相対腫瘍サイズは、それぞれ 8.41 ± 2.65 , 6.04 ± 1.86 であったが、 ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与群では 2.41 ± 1.20 を示し、有意に腫瘍の成長を抑制した。また、体重比は未処置群および ToDBTTATE 投与群で、約 5% 前後の体重変化であった。一方で ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与群は 9 日後に約 10% 程度まで体重減少がみられたが、それ以降の体重減少は観察されなかった。体重減少を生じた原因は明らかでないが、腫瘍以外の臓器に対する ^{67}Cu

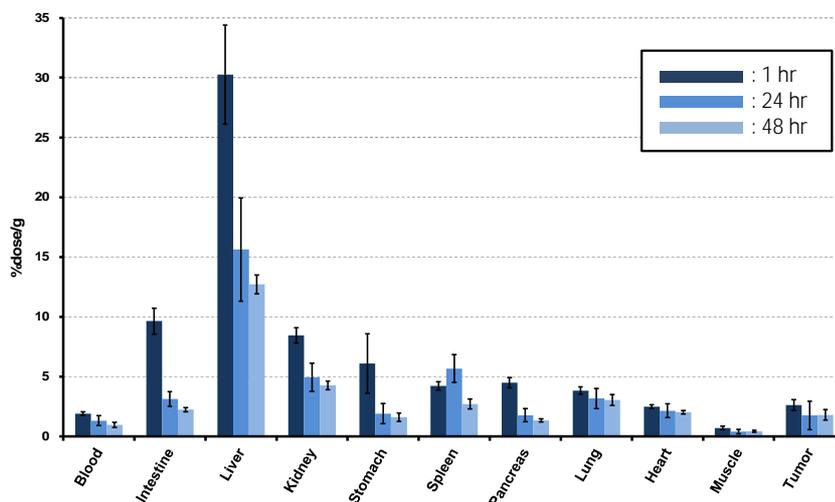


図3 ^{67}Cu -ToDBTTATE の体内分布評価

の滞留により何らかのダメージを受け、体重減少が生じた可能性が推察された。本実験の結果から ^{67}Cu -ToDBTTATE が腫瘍抑制効果を示すことが明らかとなった。

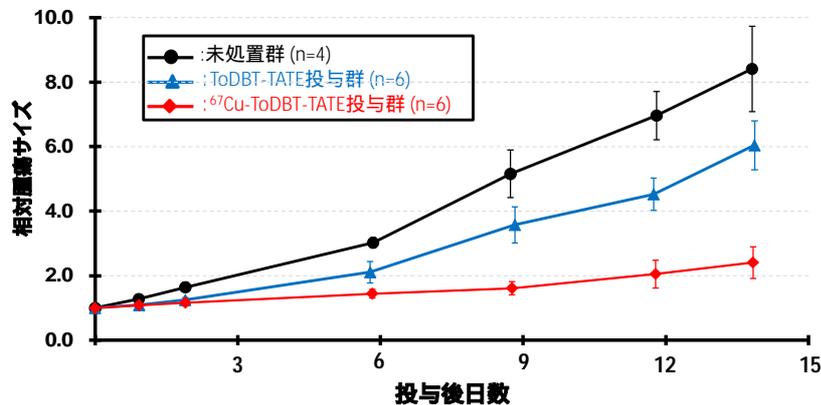


図4 ^{67}Cu -ToDBTTATE の腫瘍抑制効果の評価

(3) 解析の結果、control 群の 14 日時点における腫瘍サイズに対し、 ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与群は $< 200 \text{ mm}^3$ で 70%、 $200 \sim 500 \text{ mm}^3$ で 26%、 $500 \sim 800 \text{ mm}^3$ で 24%、 $> 800 \text{ mm}^3$ では 48% 程度に抑制した。4 グループともに 12 日および 14 日時点において、control 群と ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与群の 2 群間の腫瘍サイズに差を認める一方、腫瘍サイズが 800 mm^3 を超えるグループでは ^{67}Cu -ToDBTTATE 投与による腫瘍抑制効果が減弱する傾向を認めた。また、腫瘍サイズが 200 mm^3 未満のグループでは、十分な腫瘍抑制効果が得られないことも明らかとなった。

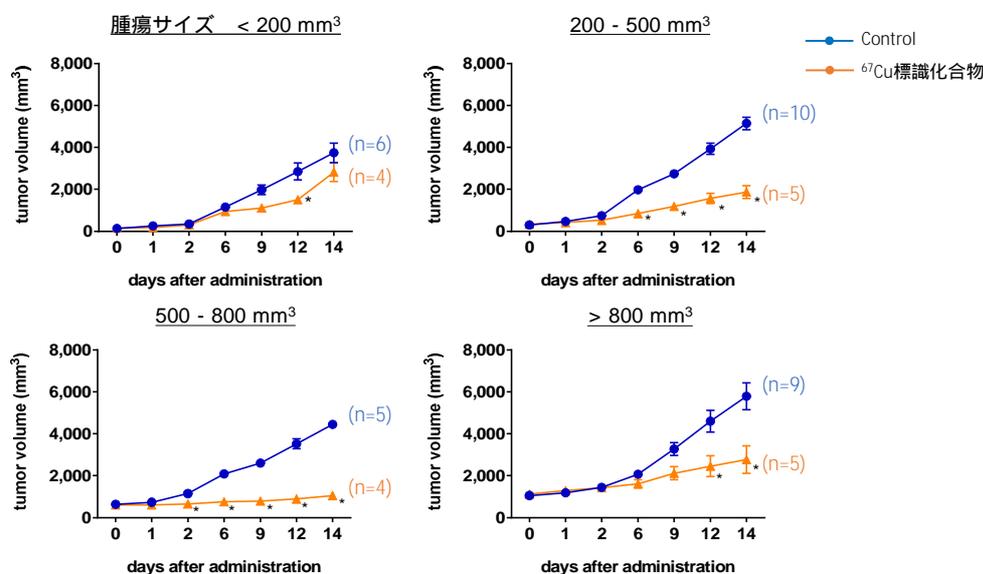


図5 ^{67}Cu -ToDBTTATE の腫瘍抑制効果に与えるサイズの影響

(4) 体内分布実験の結果、 $^{67}\text{CuCl}_2$ は投与 1, 24, 48 時間後の腫瘍に対し、 4.68 ± 2.99 、 6.58 ± 1.82 、 $5.75 \pm 1.26 \text{ \%dose/g}$ の集積を示し、 $^{67}\text{CuCl}_2$ が腫瘍に長時間滞留することが示された。一方、肝臓、腎臓、膵臓などにも多くの $^{67}\text{CuCl}_2$ が集積したが、時間とともに減少した。これらの臓器への集積は Cu の代謝や排泄を反映したものと考えられる。LS180 腫瘍は、Saline 投与群では時間経過とともに増大し 14 日時点では平均 3422 mm^3 (2.12 g、対 0 日比は 4.99) であった。一方、 $^{67}\text{CuCl}_2$ 投与群も腫瘍増大は認められるものの 14 日時点では平均 1753 mm^3 (0.92 g、対 0 日比は 2.24) であり、腫瘍抑制効果が確認された。若干の腫瘍増大が認められた原因として、今回作成したモデルマウスの腫瘍サイズが約 800 mm^3 であったこと

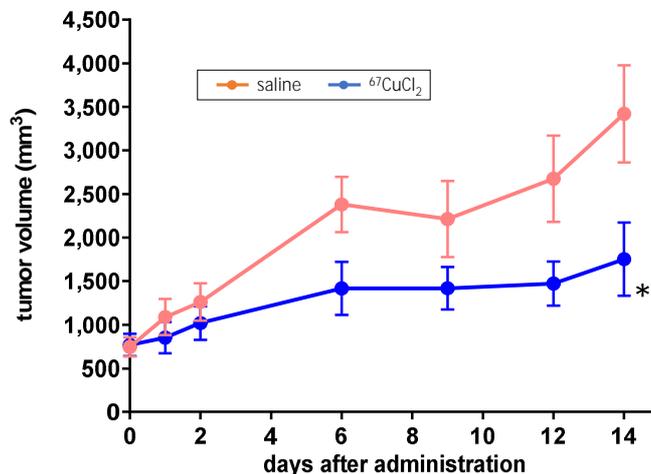


図6 $^{67}\text{CuCl}_2$ の腫瘍抑制効果の評価

から、 ^{67}Cu は 800 mm^3 超の腫瘍サイズではその腫瘍抑制効果が減弱することが確認された。また、0 日目に対する 14 日目の体重比は、Saline 投与群で 0.94 と大きな体重減少が見られないのに対し、 $^{67}\text{CuCl}_2$ 投与群では 0.83 と 20% 近くの体重減少が観測された。

本研究の結果は、 ^{67}Cu が十分な治療効果を有すること、ある程度のサイズの腫瘍であれば大量投与による効果的な治療が実現できる可能性が高いことを示している。さらに 800 mm^3 未満の腫瘍に対し、 ^{90}Y などの高エネルギー β 線放出核種を最大量まで投与した際の治療効果と比較することで、効率的な治療、個別化医療に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Y. Fujisawa, H. Haba, A. Nambu, Y. Shigekawa, Y. Wang, X. Yin, Y. Magata, Y. Iida	4. 巻 55
2. 論文標題 Effect of tumor size on the therapeutic effect of 67Cu-labeled compounds targeting the somatostatin receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RIKEN Accelerator Progress Report	6. 最初と最後の頁 141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Y. Fujisawa, H. Haba, Y. Magata, Y. Iida	4. 巻 53
2. 論文標題 Usability of 67Cu as a therapeutic radioisotope for peptide receptor radionuclide therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RIKEN Accelerator Progress Report	6. 最初と最後の頁 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Y. Fujisawa, Y. Sugiura, H. Haba, A. Nambu, Y. Shigekawa, X. Yin, Y. Magata, Y. Iida	4. 巻 56
2. 論文標題 Efficacy of nuclear medicine therapy with 67CuCl2 in mice bearing LS180 colon cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RIKEN Accelerator Progress Report	6. 最初と最後の頁 156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯田靖彦、藤澤豊
2. 発表標題 新規アミノ酸ATSMaaのLAT1標的薬剤としての可能性
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯田靖彦
2. 発表標題 67Cuを用いた効果的・効率的ながん治療の可能性
3. 学会等名 核医学診断・治療のためのRI利用推進シンポジウム 64Cu・67Cu：核種製造と治療薬創製の展望
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤澤豊、飯田靖彦
2. 発表標題 Cu-67標識新規ソマトスタチン誘導体を用いた神経内分泌腫瘍に対する腫瘍抑制効果の評価
3. 学会等名 第60回日本核医学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------