

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08102

研究課題名(和文)放射性金属を用いた包括的な腫瘍診断・治療薬剤の開発研究

研究課題名(英文) Research and development of comprehensive tumor diagnostic and therapeutic agents using radioactive metals

研究代表者

北村 陽二 (Kitamura, Yoji)

金沢大学・疾患モデル総合研究センター・准教授

研究者番号：10368483

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、新規「放射性金属-八臭素化ポルフィリン錯体」を開発し、腫瘍診断・治療薬剤への応用の可能性を明らかにすることを目的として検討を行った。八臭素化ポルフィリン誘導体として、負電荷を持つOBTCPPを選択し、 ^{111}In で標識した ^{111}In -OBTCPPに関して、肺癌を移植した担癌マウスに投与24時間後にSPECT-CT撮像を行った所、骨への放射能集積はほとんど認められなかったが、腫瘍への集積もほぼ認められなかった。 ^{111}In -OBTCPPは、マウス体内へ投与後も、脱金属を起こさないことが確認されたが、腫瘍への集積に関しては、腫瘍が十分に成長した担癌マウスを用いて再度の検討が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的に新規な点は、ポルフィリンの中でも、特に、他のポルフィリン類に比べ、金属との結合の速い、八臭素化ポルフィリン誘導体に着目している点である。八臭素化ポルフィリン誘導体であるOBTCPPが短時間での ^{111}In 標識が可能であり、小動物SPECT-CTで担癌マウスの撮像を行えた点は、今後のポルフィリン誘導体を利用した腫瘍診断・治療薬剤の開発における基礎的知見となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a new "radiometal-obrominated porphyrin complex" and to clarify its potential application as a tumor diagnostic and therapeutic agent. ^{111}In -OBTCPP, which was labeled with ^{111}In , was injected to tumor-bearing mice implanted with lung cancer. SPECT-CT imaging was conducted 24 hours after administration. As a result, no accumulation of radioactivity in bone was observed, but there was almost no accumulation in the tumors. Although it was confirmed that ^{111}In -OBTCPP does not occur demetalization after administration into mice, the accumulation of radioactivity in tumors should be investigated again using tumor-bearing mice with well-grown tumors.

研究分野：放射性医薬品

キーワード：放射性医薬品 ポルフィリン 金属 錯体 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

ポルフィリンは4個のピロールからなる環状構造を基本構造としており、その環の中心に様々な金属元素が結合し、錯体を形成することができる。近年、このポルフィリンの腫瘍集積性と、レーザー光照射により蛍光や活性酸素を発生することを利用した、腫瘍の蛍光診断や、治療を目的とした光線力学療法が開発され、普及しつつある。さらに、ポルフィリンを中心構造とし、光音響イメージング (Photoacoustic Imaging ; PAI) や、光温熱療法 (Photo-thermal therapy ; PTT) に用いる化合物が開発されつつある。しかし、このような可視光を用いた診断、治療法では、光の生体組織透過性が劣ることから、表層癌に適用が限定されるという欠点がある。そこで、ポルフィリンを放射性同位元素で標識できれば、光照射は不要となり、深部の腫瘍の診断や治療にも適用可能となる。放射性同位元素の中には、金属元素も存在し、 ^{111}In や $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は SPECT 診断に、 ^{52}Fe 、 ^{62}Zn や ^{68}Ga などは PET 診断に、 ^{64}Cu や ^{177}Lu などは内用放射線治療に用いることができる。そこで、報告者は、ポルフィリンに放射性金属を結合させた錯体を開発すれば、腫瘍を標的とする放射性医薬品としての新たな可能性を開拓できると考え、研究を行ってきた。

また、臨床における放射性医薬品の使用に際しては、放射性同位元素による標識から精製までを短時間で行うことが要求される。特に、PET 診断においては、半減期の非常に短いポジトロン放出核種を用いるため、標識と精製に要する時間の短縮は非常に重要である。報告者は、ポルフィリン誘導体の開発、及び、その分析学、核医学への応用に関する研究を行ってきた。その研究成果から、八臭素化ポルフィリン誘導体は、これまでのポルフィリンのように長時間の加熱撹拌を必要とせず、多くの金属と速やかに結合することを見出し、この性質は放射性医薬品としての臨床応用に非常に有用であると考えた。実際、報告者はこれまでに八臭素化ポルフィリン誘導体を ^{65}Zn で標識することに成功してきた。本研究では、他の放射性金属との錯体のさらなる開発を進めた。

現在、放射性医薬品による腫瘍診断は、保険適用されている FDG-PET が普及しつつあるが、腫瘍の種類によっては検出が困難な場合や、下腹部への集積が多く、下腹部臓器の腫瘍は検出不能であるなど、問題点も多く残されている。それに対し、ポルフィリン誘導体の重要な性質として、様々な種類の腫瘍に対して親和性を有することが挙げられる。また、放射性金属を用いる利点として、同じキレーター化合物に、診断用核種 (^{111}In 、 ^{68}Ga 等)、治療用核種 (^{90}Y 、 ^{177}Lu 等) を使い分けることができる点が挙げられる。すなわち、腫瘍の画像診断から内用放射線治療まで応用可能な、包括的な診断治療薬剤の開発へつなげることが可能であると考えた。本研究では、放射性金属 - 八臭素化ポルフィリン誘導体を新規に合成し、基礎的評価を行い、さらに動物用 PET-CT や SPECT-CT 装置を用いた *in vivo* イメージングによって、腫瘍集積性、体内動態などの画像定量解析を行い、臨床応用に有用な腫瘍診断・治療薬剤を開発することを試みた。

2. 研究の目的

本研究では、金属との結合が非常に速い八臭素化ポルフィリン誘導体に着目し、診断から治療まで応用可能な、包括的な腫瘍診断・治療薬剤を開発することを目的とした。ポルフィリンは腫瘍集積性および金属結合能を有する。一方、放射性医薬品の臨床使用には短時間での標識が要求されるため、八臭素化ポルフィリン誘導体の速やかな錯形成能は非常に有用である。そこで、様々な放射性金属との錯体の合成を行い、合成した錯体の安定性、比放射能、及び腫瘍への集積性、体内動態などを検討し、腫瘍診断・治療薬剤としての臨床応用への可能性を評価した。

3. 研究の方法

(1) H_2 -OBTCPP の合成

(1) - Cu-Tetrakis (4-carboxyphenyl) porphine (Cu-TCPP) の合成

TCPP (ALDRICH 社) 50 mg を 0.2 M 酢酸ナトリウム水溶液に溶かし、1 時間還流した後、酢酸銅 20 mg を加えてさらに 30 分間還流した。放冷後、反応液に濃塩酸を加え、生じた沈殿物を PTFE 製のメンブランフィルター (孔径 ; 0.45 μm) を用いてろ取し、結晶を酸化リン (V) 上で減圧乾燥させ、Cu-TCPP を得た。

(1) - Cu-octabromotetrakis(4-carboxy phenyl)porphine (Cu-OBTCPP) の合成

Cu-TCPP 40 mg を DMF 30 mL に溶解し、臭化コハク酸イミド (NBC) を 144 mg 加え、70 °C で 1 時間加熱撹拌した。放冷後、反応液に水を加え、生じた沈殿物をろ取し、結晶を酸化リン (V) 上で減圧乾燥させて、Cu-OBTCPP を得た。

(1) - Octabromotetrakis(4-carboxy phenyl)porphine (H_2 -OBTCPP) の合成

Cu-OBTCPP 40 mg を氷酢酸 20 mL に溶解し、濃硫酸 5 mL を添加して一晩撹拌した。撹拌後、砕いた氷を加え、沈殿物を生成させた。沈殿物をろ取し、水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、さらにろ過した。得られたろ液に少量の濃塩酸を加え、生じた沈殿物をろ取した。結晶を酸化リン (V) 上で減圧乾燥させて H_2 -OBTCPP を得た。

(2) 放射性金属を用いた標識反応の検討

$1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-3}$ M の H_2 -OBTCPP の 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液 0.3 mL に、 $^{111}InCl_3$ 、 $^{67}GaCl_3$ を添加し、マイクロ波合成装置を用い 100~170 で 5 分間加熱した。反応後の各化合物の標識率を薄層クロマトグラフィーにより分析した。アルミシートシリカゲル 60(メルク社製)を用い、展開溶媒はメタノール : 0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液 = 3 : 1 を用いた。

(3) 放射性金属 - 八臭素化ポルフィリン錯体の脂溶性、安定性評価

放射性金属 - 八臭素化ポルフィリン錯体の脂溶性を評価するため、オクタノール-リン酸緩衝液分配比 (logP 値) を求めた。また、リン酸緩衝液中での安定性を検討した。

(4) 正常マウスにおける放射性金属 - 八臭素化ポルフィリン錯体の体内分布の検討

正常マウスに、尾静脈から放射性金属 - 八臭素化ポルフィリン錯体または $^{111}InCl_3$ を投与し、設定時間後にマウスを屠殺し、血液及び関心臓器を採取し、重量と放射能を測定した。

(5) マウス体内投与後の代謝物の検討

放射性金属 - 八臭素化ポルフィリン錯体を正常マウス尾静脈より投与し、主要臓器を採取した。採取した主要臓器をホモジナイズし、アセトニトリルを添加し、遠心分離することで除蛋白を行い、HPLC による代謝物分析を試みた。

(6) 担癌マウスの作製

10% FBS 含有 RPMI 培地で培養した KLN205 細胞 (マウス肺由来扁平細胞腫) を、BALB/c マウス (雄性、5 週齢) の大腿部、または肩に、それぞれ 5×10^6 個移植した。

(7) In vivo イメージングによる放射性金属 - 八臭素化ポルフィリン錯体の評価

小動物用 SPECT-CT 装置を用いて、担癌動物における放射性金属 - 八臭素化ポルフィリン錯体の *in vivo* イメージングを行った。得られた画像から、腫瘍集積性の評価を行い、腫瘍イメージング剤としての有用性に関して検討した。

4. 研究成果

OBTCPP はマイクロ波合成装置を用いることで、高い標識率で ^{111}In 標識体を得ることができたが、 ^{67}Ga での標識率は低かった。OBTCPP 15 nmol、160 、5 分間の加熱で、標識率 97% で ^{111}In 標識体 (^{111}In -OBTCPP) を得ることに成功した。

^{111}In -OBTCPP の脂溶性を評価するため、オクタノール-リン酸緩衝液分配比 (logP 値) を調べた所、logP 値は 0.38 となり、脂溶性は高くないことが示された。また、リン酸緩衝液中での安定性を検討した結果、 ^{111}In -OBTCPP はリン酸緩衝液中で 24 時間後も 98% が未変化体として存在しており、リン酸緩衝液中での安定性が示された。

次に、 ^{111}In -OBTCPP のマウス体内での安定性を検討するため、 ^{111}In -OBTCPP と $^{111}InCl_3$ のマウス体内分布を比較検討した。その結果、 $^{111}InCl_3$ は、投与後、骨への放射能集積が多く認められたが、 ^{111}In -OBTCPP は、骨への放射能集積はほとんど認められなかった。この結果は、 ^{111}In -OBTCPP は、マウス体内へ投与後も、脱金属を起こさず、標識体のまま体内に存在していることを示唆している。さらに、 ^{111}In -OBTCPP のマウス体内での代謝物を検討するため、 ^{111}In -OBTCPP をマウス尾静脈より投与し、主要臓器を採取した。採取した主要臓器をホモジナイズし、アセトニトリルを添加し、遠心分離することで除蛋白を行い、HPLC による代謝物分析を試みようとした。しかし、遠心上清と沈殿物の放射能をガンマカウンタを用いて測定した所、遠心上清には、ほとんど放射能が無く、沈殿物に大部分の放射能が検出されたため、遠心上清の HPLC による代謝物分析を行うことができなかった。この結果は、 ^{111}In -OBTCPP は、マウス体内投与後、臓器内で蛋白に強固に吸着していることを示唆している。

担癌マウスとして、KLN205 細胞(マウス肺由来扁平細胞腫)を移植した BALB/c マウスを用い、 ^{111}In -OBTCPP を尾静脈から投与し、投与 24 時間後に SPECT (単一光子放射断層撮影) -CT (コンピューター断層撮影法) の撮像を行った。 ^{111}In -OBTCPP の担癌マウスでの画像を検討した結果、 ^{111}In -OBTCPP は、骨への放射能集積はほとんど認められなかったが、肝臓や脾臓、腎臓に高い集積を示し、腫瘍への集積はほぼ認められなかった。この結果は、 ^{111}In -OBTCPP は、マウス体内へ投与後も、脱金属を起こさず、標識体のまま体内に存在していることを示唆している。また、腫瘍への集積がほぼ認められなかった原因としては、腫瘍の成長が不十分な担癌マウスを用いたことが考えられ、再度の検討が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ramzi Nur Izni, Mishiro Kenji, Munekane Masayuki, Fuchigami Takeshi, Hu Xiaojun, Jastrz?b Renata, Kitamura Yoji, Kinuya Seigo, Ogawa Kazuma	4. 巻 13
2. 論文標題 Synthesis and evaluation of radiolabeled porphyrin derivatives for cancer diagnoses and their nonradioactive counterparts for photodynamic therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1565 ~ 1574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2MD00234E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Echigo Hiroaki, Mishiro Kenji, Munekane Masayuki, Fuchigami Takeshi, Kitamura Yoji, Kinuya Seigo, Ogawa Kazuma	4. 巻 70
2. 論文標題 Development and evaluation of a theranostic probe with RGD peptide introduced platinum complex to enable tumor-specific accumulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116919 ~ 116919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wakabayashi Hiroshi, Mori Hiroshi, Hiromasa Tomo, Akatani Norihito, Inaki Anri, Kozaka Takashi, Kitamura Yoji, Ogawa Kazuma, Kinuya Seigo, Taki Junichi	4. 巻 30
2. 論文標題 125I-labeled 2-[4-(2-iodophenyl)piperidino]cyclopentanol (125I-015V) imaging visualized augmented sigma-1 receptor expression according to the severity of myocardial ischemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Nuclear Cardiology	6. 最初と最後の頁 653 ~ 661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12350-022-03064-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Kazuma, Echigo Hiroaki, Mishiro Kenji, Hirata Saki, Washiyama Kohshin, Kitamura Yoji, Takahashi Kazuhiro, Shiba Kazuhiro, Kinuya Seigo	4. 巻 18
2. 論文標題 ⁶⁸Ga- and ²¹¹At-Labeled RGD Peptides for Radiotheranostics with Multiradionuclides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 3553 ~ 3562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00460	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shigeno Taiki, Kozaka Takashi, Kitamura Yoji, Ogawa Kazuma, Taki Junichi, Kinuya Seigo, Shiba Kazuhiro	4. 巻 35
2. 論文標題 In vitro and in vivo evaluation of [125/123I]-2-[4-(2-iodophenyl)piperidino]cyclopentanol([125/123I]-015V) as a potential sigma-1 receptor ligand for	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 167 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-020-01552-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ho Tuyen Thuy Bich, Nasti Alessandro, Seki Akihiro, Komura Takuya, Inui Hiroyuki, Kozaka Takashi, Kitamura Yoji, Shiba Kazuhiro, Yamashita Taro, Yamashita Tatsuya, Mizukoshi Eishiro, Kawaguchi Kazunori, Wada Takashi, Honda Masao, Kaneko Shuichi, Sakai Yoshio	4. 巻 8
2. 論文標題 Combination of gemcitabine and anti-PD-1 antibody enhances the anticancer effect of M1 macrophages and the Th1 response in a murine model of pancreatic cancer liver metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e001367 ~ e001367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2020-001367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miwa Daisuke, Kitamura Yoji, Kozaka Takashi, Shigeno Taiki, Ogawa Kazuma, Taki Junichi, Kinuya Seigo, Shiba Kazuhiro	4. 巻 74
2. 論文標題 (-) <i>trans</i> -[¹¹ C]methyl decalinvesamicol ((-)-[¹¹ C]OMDV) as a PET ligand for the vesicular acetylcholine transporter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Synapse	6. 最初と最後の頁 e22176 ~ e22176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/syn.22176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 畑 友佳子、竹田 剣斗、越島 裕暉、岩井 思央梨、倉島 由紀子、北村 陽二、鍛冶 聡
2. 発表標題 ヒト乳がん細胞株MCF-7における低線量の 線、 線による放射線照射の影響
3. 学会等名 薬学会143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 (1)Wakabayashi, H.; Taki, J.; Mori, H.; Hiromasa, T. ; Akatani, N.; Inaki, A.; Kozaka, T.; Kitamura, Y.; Ogawa, K.; Kinuya
2. 発表標題 The Process of Radiation Exposure Lymphocyte Damage Assessed by H2AX Expression Level using Flow Cytometry
3. 学会等名 第13回世界核医学会（国際学会）
4. 発表年 2022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
研究分担者	小川 数馬 (Ogawa Kazuma) (30347471)	金沢大学・新学術創成研究機構・教授 (13301)	

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
---------	---------