

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390347

研究課題名（和文） サイクロトロンを必要としない PET 検査を目指した放射性ガリウム標識薬剤の開発

研究課題名（英文） Development of radiogallium-labeled agents for PET imaging without cyclotron.

研究代表者

向 高弘 (MUKAI TAKAHIRO)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30284706

研究成果の概要（和文）：Ga-DOTA 錯体において 2 つのカルボキシル基が錯体形成に関与していないことに着目して、このカルボキシル基に機能性分子を導入するという薬剤設計を考案した。そこで、腫瘍の低酸素領域および腫瘍に発現するケモカイン受容体 CXCR4 を標的分子とし、それぞれを認識するリガンドである metronidazole および Ac-TZ14011 をそれぞれ 2 分子導入した DOTA-MN2 および DOTA-TZ2 を合成し、その評価を行った。その結果、Ga 錯体の安定性と標的分子の認識性とが両立できることが明らかとなり、本薬剤設計の有用性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we designed DOTA-MN2 and DOTA-TZ2, employing metronidazole moiety as a recognition site of hypoxic tumors and Ac-TZ14011 peptide as a CXCR4 ligand, respectively. Radiogallium-DOTA-MN2 exhibited the high stability and significant accumulation in the hypoxic tumors. Ga-DOTA-TZ2 showed the high affinity to CXCR4 *in vitro*. These results provide useful information about the chemical design of radiogallium-labeled radiopharmaceuticals for PET studies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

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：放射性医薬品・造影剤

## 1. 研究開始当初の背景

PET は、ポジトロン放出核種 ( $^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{13}\text{N}$ 、 $^{15}\text{O}$ ) によって標識された生理活性物質や薬剤を投与することにより、臓器や組織の分子レベルでの機能画像を提供できるという点で、他の画像診断技術の追随を許しておらず、医療分野のみならず脳科学などの生命科学分野の発展にも大きく寄与してきた。しかし、ポジトロン放出核種は極めて短寿命であり、PET カメラの他にポジトロンを製造するサイクロトロンを設置した大型施設を必要とす

るために、臨床応用や基礎研究等への広範な利用が制約を受けてきたのも実情である。一方、ガリウムの放射性同位体である  $^{68}\text{Ga}$  は、 $^{68}\text{Ge}-^{68}\text{Ga}$  の放射平衡を利用したジェネレータより得られるため、サイクロトロンを必要とせず、汎用性が高く、今後の利用の拡大が期待される。

放射性ガリウム標識薬剤として現在使用されている診断薬剤は、 $\gamma$ シンチグラフィ薬剤の  $^{67}\text{Ga}$ -クエン酸のみで、その他の薬剤については検討があまり進んでいない。この理由

としては、金属元素であるガリウムを安定に結合させるには、分子内に配位原子を配置する必要があるため、通常の薬剤設計方針が利用できないという点が挙げられる。ガリウムと安定な錯体を結合する配位子のひとつに、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸 (DOTA) がある。DOTA は、Ga だけでなく、In や Y と安定な錯体を形成することが知られているが、In-DOTA や Y-DOTA では DOTA の4つの N 原子と4つの O 原子とが配位した8座配位をとるが、Ga-DOTA では DOTA の4つの N 原子と2つの O 原子とが配位した6座配位をとることが、X線構造解析により明らかとなった。即ち、Ga-DOTA 錯体では、DOTA の4つのカルボキシル基のうち2つは Ga との配位に関与せず、余っていることになる。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに申請者らが構築してきた分子設計法である、標的組織の認識部位と放射性金属核種結合部位とを一分子内に独立して有する二官能性キレートという分子設計概念の基に、安定な Ga-DOTA 錯体において2つのカルボキシル基が錯体形成に関与していないことに着目して、このカルボキシル基に、機能性分子を導入するという薬剤設計を確立することを目的とする。そこで、腫瘍の低酸素領域および腫瘍に発現するケモカイン受容体 CXCR4 を標的分子とし、それぞれを認識するリガンド (metronidazole: MN および Ac-TZ14011: TZ) をそれぞれ2分子導入した DOTA-MN2 (図1) および DOTA-TZ2 (図2) を設計・合成し、その評価を行った。

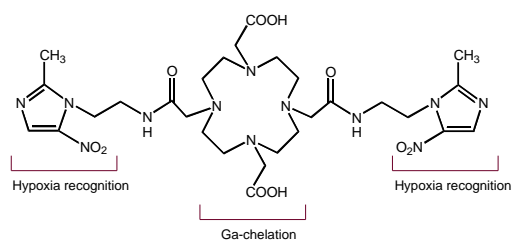


図1 DOTA-MN2 の構造

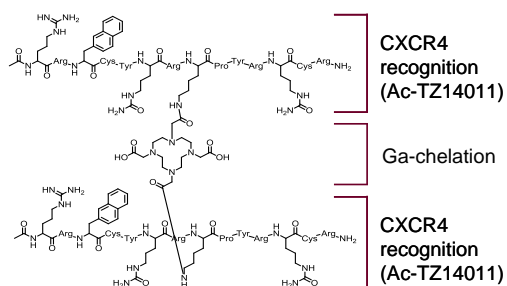


図2 DOTA-TZ2 の構造

## 3. 研究の方法

### (1) Ga-DOTA-MN2

①DOTA-MN2の合成：DOTA の1,7位のカルボキシル基を選択的に保護した誘導体と別途合成したアミノ基を有する MN 誘導体とを、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミドと1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを用いて縮合した後、トリフルオロ酢酸により tert-ブチル基を脱保護し、さらに HPLC にて精製することにより、DOTA-MN2 を得た。比較対照として、MN 誘導体を1分子のみ導入した DOTA-MN1 も併せて合成した。

②放射性ガリウム標識検討：半減期が長く、取り扱いの容易な  $^{67}\text{Ga}$  (EC 崩壊、半減期 3.2 日) を用いて標識検討を行った。DOTA-MN2 を 0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.8) に溶解し、 $^{67}\text{GaCl}_3$  を加え、油浴で加熱またはマイクロ波照射により、標識反応を行った。

### ③腫瘍移植マウスにおける検討：

$^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN2 および  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN1 をそれぞれ FM3A 腫瘍を移植したマウスに静脈内投与し、経時的に各臓器の放射能を測定した。また、 $^{67}\text{Ga}$  標識体とともに低酸素マーカーである pimonidazole を投与後、摘出した腫瘍組織について、オートラジオグラフィにより  $^{67}\text{Ga}$  標識体の腫瘍内分布を評価するとともに、抗 pimonidazole 抗体を用いて低酸素領域の免疫組織化学染色を行った。

### (2) Ga-DOTA-TZ2

①DOTA-TZ2の合成：DOTA の1,7位のカルボキシル基を選択的に保護した誘導体と Ac-TZ14011 とをジメチルホルムアミド中、室温で 24 時間反応させた後、保護基を脱保護し、さらに HPLC にて精製することにより、DOTA-TZ2 を得た。比較対照として、ペプチドを1分子のみ導入した DOTA-TZ1 も併せて合成した。

②非放射性ガリウム錯体の合成：DOTA-TZ2 および DOTA-TZ1 を、硝酸ガリウムと室温にて3日間反応させ、非放射性 Ga 錯体を合成した。

③CXCR4 への結合性評価：非放射性 Ga 錯体 (Ga-DOTA-TZ2 および Ga-DOTA-TZ1) について、 $^{125}\text{I}$ -stromal cell derived factor-1 $\alpha$  ( $^{125}\text{I}$ -SDF-1 $\alpha$ ) を用いた競合ラジオアッセイ法により CXCR4 に対する阻害活性を算出した。

④放射性ガリウム標識検討：標識前駆体 DOTA-TZ2 を 0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.6) に溶解し、 $^{67}\text{GaCl}_3$  と 95°C、60 分間反応させ、その後、逆相 HPLC により精製を行った。

⑤ *in vitro* 細胞結合性評価： CXCR4 発現細胞 (CXCR4-CHO) および CXCR4 非発現細胞 (CHO) を用い、それぞれの細胞への  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-TZ2 および  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-TZ1 の結合量を経時的に算出した。

⑥ 腫瘍移植マウスにおける検討： CXCR4-CHO および CHO 細胞を移植したマウスに  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-TZ2 を尾静注により投与し、経時的にその体内分布を調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Ga-DOTA-MN2

① 標識検討： 種々の反応条件で標識検討を行った結果、95°C では収率の向上に時間を要し、140°C では収率が低下したが、マイクロ波照射により標識収率は改善し、標識時間 4 分と短時間で 88% と高収率の  $^{67}\text{Ga}$  標識体を得ることに成功した (図 3)。

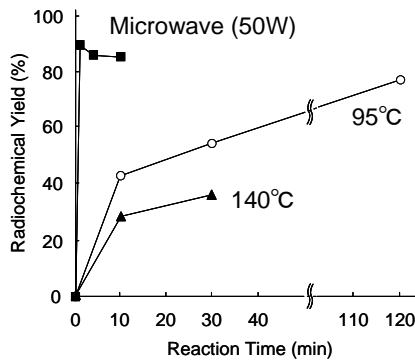


図 3 DOTA-MN2 の  $^{67}\text{Ga}$  標識収率

② 腫瘍移植マウスにおける検討： 2 分子の metronidazole を導入した化合物の有用性を検討するため、FM3A 移植マウスを用いた生体内分布評価を行った結果、 $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN2 の腫瘍への集積は  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN1 より高い傾向にあり、放射能の腫瘍/血液比を算出したところ、 $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN2 の値は  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN1 に比べて有意に高いものであった。また、 $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN2 の FM3A 移植腫瘍内分布は、pimonidazole の局在と一致した (図 4)。

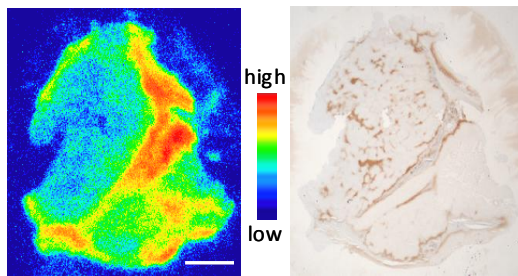


図 4  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN2 を投与後のオートラジオグラフィ (左) と抗 pimonidazole 抗体による免疫組織化学染色の結果 (右)

以上の結果、 $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN2 は、腫瘍低酸素領域へ集積し、その集積性は  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-MN1 と比較して高いことが示された。

##### (2) Ga-DOTA-TZ2

① CXCR4 への結合性評価： CXCR4 リガンドである  $^{125}\text{I}$ -SDF-1 $\alpha$  を用いた競合ラジオアッセイ法により CXCR4 に対する阻害活性を算出したところ、Ga-DOTA-TZ1 と比較して、Ga-DOTA-TZ2 は、20 倍以上高い阻害活性を有することが示され、マルチメリック効果に基づく親和性の向上が示された (図 5)。

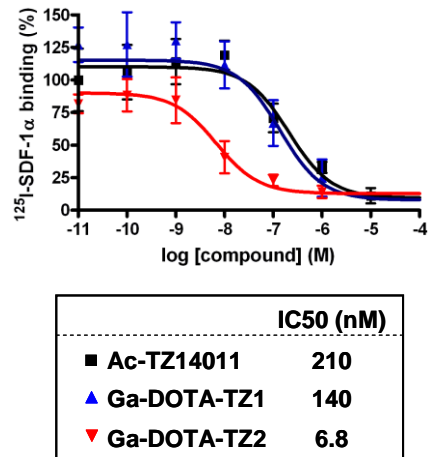


図 5  $^{125}\text{I}$ -SDF-1 $\alpha$  の CXCR4 への結合阻害

② *in vitro* 細胞結合性評価：  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-TZ2 および  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-TZ1 はともに CXCR4 を発現していない CHO 細胞へは結合しなかったが、CXCR4 をトランスフェクトした CXCR4-CHO 細胞への  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-TZ2 の集積は経時的に増加し、 $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-TZ1 と比較して、有意に高かった。また、母体ペプチドである Ac-TZ14011 の存在下で、各細胞への集積性を検討したところ、Ac-TZ14011 の濃度が高くなるにつれ、両標識体の細胞への集積量が減少し、高濃度では CHO 細胞と同等の結合量にまで抑えられた (図 6)。このことから、いずれの  $^{67}\text{Ga}$  標識

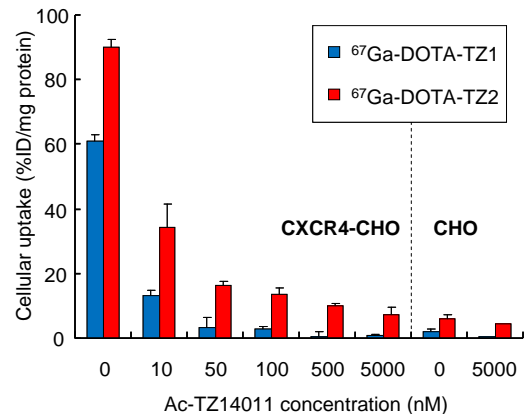


図 6  $^{67}\text{Ga}$  標識体の細胞取込阻害

体も CXCR4 特異的に細胞に集積したと考えられた。

③腫瘍移植マウスにおける検討：

CXCR4-CHO および CHO 細胞を移植したマウスにおける生体内分布を評価したところ、<sup>67</sup>Ga-DOTA-TZ2 は CXCR4-CHO 腫瘍へ高く集積したが、CHO 腫瘍にも同等に集積した。また、肺や肝臓へも非常に高く集積した。Ac-TZ14011 を用いた阻害実験の結果、肺への集積は 90%以上抑制されたのに対し、肝臓への集積は僅かに増加した。また、Ac-TZ14011 のアミノ酸を全て D 体に置換したペプチド (CXCR4 に対して親和性を示さない) を用いた阻害実験でも、Ac-TZ14011 による阻害実験と同様の結果を得た。これらの結果は、<sup>67</sup>Ga-DOTA-TZ2 の生体内分布が CXCR4 に依存しないことを示唆する。<sup>67</sup>Ga-DOTA-TZ2 は 1 分子に 10 個の第一級アミンを有し強いカチオン性を示すことから、凝集、高分子化し、肺や肝臓へ取り込まれた可能性がある。今後、カチオン性を低減させることで体内動態の改善を図り、*in vivo* におけるマルチメリック効果を検証する必要がある。

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 1 件)

① Takahiro Mukai, Jun Suwada, Kohei Sano, Mayumi Okada, Fumihiko Yamamoto, and Minoru Maeda: Design of Ga-DOTA-based bifunctional radiopharmaceuticals: Two functional moieties can be conjugated to radiogallium-DOTA without reducing the complex stability, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有. Vol.17, No. 13, pp4285-4289 (2009)  
DOI:10.1016/j.bmc.2009.05.041

[学会発表] (計 5 件)

① Takahiro Mukai, Jun Suwada, Fumihiko Yamamoto, and Minoru Maeda: A radiogallium-labeled bifunctional chelate for hypoxic tumor imaging. *18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences*, Edmonton (2009.7.14)

② 岡田真由美、諏訪田純、向高弘、佐野紘平、前田稔：がん低酸素領域の核医学イメージングを目的とした放射性ガリウム標識二官能性キレートの開発、第 9 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、京都 (2009.11.14)

③ 佐野紘平、岡田真由美、前田稔、向高弘：放射性ガリウム標識二官能性キレート、

Ga-DOTA-MN2 のがん低酸素領域イメージング剤としての評価、第 5 回日本分子イメージング学会学術集会、大津 (2010.5.23)

④ Takahiro Mukai, Kohei Sano, Mayumi Okada, Minoru Maeda: Evaluation of a radiogallium-labeled bifunctional chelate, Ga-DOTA-MN2, for hypoxic tumor imaging. *The 23rd Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine*, Vienna (2010.10.10)

⑤ Kohei Sano, Ryo Masuda, Shinya Oishi, Hayato Hisada, Kenta Shimokawa, Nobutaka Fujii, Hideo Saji, Takahiro Mukai: A radiogallium-DOTA-based bivalent peptidic ligand targeting a chemokine receptor, CXCR4, for imaging tumors, *The Society of Nuclear Medicine 58th Annual Meeting*. San Antonio (2011.6.6)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向 高弘 (MUKAI TAKAHIRO)  
神戸薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：30284706

(2) 研究分担者

間賀田 泰寛 (MAGATA YASUHIRO)  
研究者番号：20209399  
(H21→H22：連携研究者)