

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：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591593

研究課題名（和文）新規PET用銅-64標識抗体製剤の開発

研究課題名（英文）Development of novel copper-64 labeled antibodies.

研究代表者

富永 英之（TOMINAGA HIDEYUKI）

群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座教員

研究者番号：00393348

研究成果の概要（和文）：群馬大学において、陽電子放出核種である銅-64を医療用サイクロトロンにより生産することを可能になった。またSarAr錯体(Sarcophagine, 3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]-eicosane-1,8-diamine)の安定合成ができるようになり、様々な抗体に標識することにより、新しい診断方法への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：In Gunma University, I was enabled in producing copper -64 which was a positron emitter by medical cyclotron. We stably synthesized SarAr cheleter, Sarcophagine, 3,6,10,13,16,19-hexaazabicyclo[6.6.6]-eicosane-1,8-diamine, as novel chelator for copper-64 labeling. We hope that the application by various labeling antibodies comes to be a new diagnosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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： (1)銅-64 (2)PET (3)抗体医薬
(4)新規キレート (5)サイクロトロン (6)放射性医薬品
(7)診断薬 (8)院内製剤

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬（抗体による治療薬剤）は標的組織（腫瘍）に特異性があり、患部以外の副作用が極めて少なく、患者の負担が少ないため、極めて有効な治療法として注目されている。また、それに伴い、抗体の治療効果に反映した抗体によるイメージング（診断）も、重要性を増してきている。

抗体医薬の特徴

1. 抗体は病変標的性が強く、腫瘍治療においては標的以外には作用しないので、副作用を低減させるとともに、放射性物質を組み合わせることにより、高い治療効果が期待される。
2. 標的物質の多様性があり、対腫瘍以外の可能性を有する。

3. 近年の遺伝子工学の発展により、工業的に生産することが可能である。

実際には、マウス-ヒトキメラ型抗CD20抗体に放射性物質イットリウム-90を標識したゼバリン (Oriuchi N, Endo Kら, Ann. Nucl. Med., 19, 355-365, 2005) は2008年に国内承認および薬価収載された。標識抗体はこれまでの化学療法に抵抗性の腫瘍でも治療効果が期待される。よって標識抗体の体内分布は治療の確実性を語る上で最も重要な問題となり、また治療費用も高価で医療経済的にも問題となっているため、安全かつ効果的な診断が望まれている。

画像診断の方法が発達により、生体内で起こる様々な生命現象を外部から分子レベルで捉えて画像化することができるようになり、様々な画像装置が開発されてきた。現在ではMRI、SPECT、PETなど様々な機器が臨床で活用されている。

2. 研究の目的

画像診断には様々な機器があるが、特にPET (陽電子断層撮像装置) は一原子より垂直二方向に消滅放射線を発生させ、座標性の高く、かつ感度の高い画像診断法として知られており、フッ素-18 (^{18}F) を標識したブドウ糖誘導体 [^{18}F]FDG (フルオロデオキシグルコース) は、保険診療が可能となったため、多くの病院で利用されるようになった。

しかしながら、抗体を含む高分子化合物は標的部位に対しての到達時間が遅いため、フッ素-18では抗体の体内分布を見るにおいては寿命が短すぎることより、半減期のより長いPET核種が必要である。銅の放射性同位体の一つである銅-64 ($t_{1/2}=12.7$ 時間) は半減期が適当であり、銅-64を利用して検討を行うこととした。半減期約2時間 ($t_{1/2}=109.7$ 分) の

しかしながら、抗体を含む高分子化合物は標的部位に対しての到達時間が遅いため、PETにて汎用されているフッ素-18で半減期約2時間 ($t_{1/2}=109.7$ 分) では難しいとされていた。半減期のより長いPET核種が必要となり、銅の放射性同位体の一つである銅-64 ($t_{1/2}=12.7$ 時間) が半減期が適当であることを見出し、また、サイクロトロンで使用エネルギーについても現有の医療用サイクロトロンで生成が可能であると考えられるため、銅-64を利用して検討を行うこととした。

銅-64で抗体を標識するためにはキレート剤を抗体に結合させることが必要となる。銅-64用キレート剤としては1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid (DOTA)、1, 4, 8, 11-tetraazacyclotetradecane- N, N', N'', N'''-tetraacetic

acid (TETA)が汎用されているが、肝臓内銅酵素の影響を受けるために肝臓内に銅-64が蓄積してしまう。そのような銅酵素の影響を受けにくいキレート剤を開発する。

3. 研究の方法

(1) 既存の群馬大学医療用サイクロトロンを用いて銅-64を生産することを試みる。通常、このサイクロトロンは炭素-11やフッ素-18は生産するものであり、新規の標的システムを増設した。PETに使用する核種は極めて微量でイメージングができるという長所をもっているのだが、それは品質分析においては高感度の測定装置が必要となる。しかしながら高感度機器を導入するのも限界がある。そこで汎用HPLCによる純度分析も同時による品質管理の方法の検討も行う。

(2) 現在、使用されているガラスバイアルではガラスから溶出する物質およびガラスに吸着する性質に問題があった。特に銅-64などの放射性薬剤に使用される金属は存在量が極めて少なく、これらのようなガラスバイアルは収量などに大きく影響するものである。非ガラス系のバイアルを検索する。

(3) ^{64}Cu 標識抗体を標的組織 (腫瘍組織) に特異的に滞留させるためのキレート剤 SarAr (1-N-(4-aminobenzyl)- 3, 6, 10, 13, 16, 19-hexaazabicyclo[6.6.6]-eicosane-1, 8-diamine) を基本骨格とし、合成する。

4. 研究成果

(1) 当大学医療用サイクロトロンにより安定的に銅-64を生産することが可能となった。PETに使用する核種は極めて微量でイメージングができるという長所をもっているのだが、それは品質分析においては高感度の測定装置が必要となる。しかしながら高感度機器を導入するのも限界がある。そこで汎用HPLCによる純度分析も可能とした。

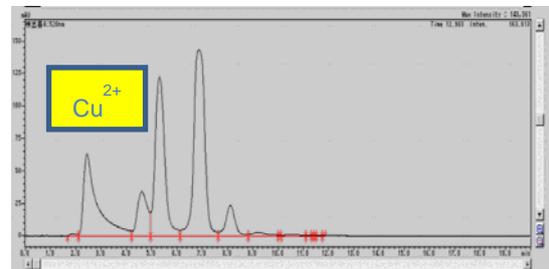


図1 HPLCによる遷移金属分析 第一ピークに銅(II)が出現し、亜鉛(II)、ニッケル(II)、コバルト(II)などの分析が可能。

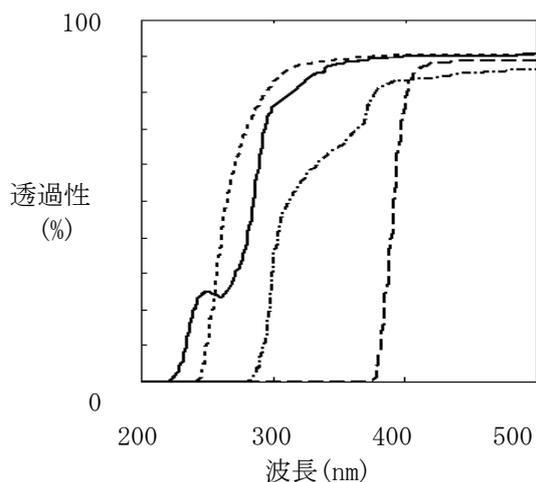


図2 CZバイアルによる透過性試験

左よりポリメタクリル酸メチル、CZ樹脂(実線)ポリスチレン、ポリカーボネート
CZバイアルはコンタクトレンズ素材として使用されているポリメタクリル酸メチルとほぼ同等の透過性を有する。

(2) 非ガラス製バイアルを検索し、金属吸着及び金属溶出試験を実行した結果、大協精工社製の CZ バイアルにて低遷移金属吸着及び低溶出を確認した。また当該バイアルは、日本薬局方は勿論のこと、USP (アメリカ合衆国薬局方)、EP (ヨーロッパ薬局方にも適合しており基本品質的にも申し分なかった。また性状を見る上で重要な透過性 (図2) についてもポリメタクリル酸メチルとほぼ同等、ポリスチレンとポリカーボネートと比較して、紫外部において優れた透過性をもつことがわかった。CZバイアルは微量金属含有の放射性医薬品に適したバイアルであることを確認した。

(3) 錯体合成については最終的な直接標識のできるような誘導体化までは進むことはできなかったが、当計画していたSarAr錯体 (図3 Sarcophagine, 3, 6, 10, 13, 16, 19-hexaazabicyclo[6.6.6]-eicosane-1, 8-diamine) の安定合成を可能とした。本来ならば、さらに誘導体化を進め、反応活性型の官能基(コハク酸イミド、マレイミド等)を修飾させることにより、抗体等のタンパク質のアミノ基(-NH₂)、カルボニル基(-COOH)、チオール基(-SH)などと直接反応させることにより標識タンパク質を作成することが可能であった。その点においては不完全に終わった。しかしながら、この状態でも架橋剤を用いる間接法であれば、十分利用可能であり、従来のものよりも肝臓への集積の少ない診断画像が期待された。

実際に医薬品として用いられている抗VEGF (血管内皮細胞増殖因子)抗体であるアバスタチン (bevacizumab) や抗EGFR (上皮成長因子受容体) 抗体であるCetuximab (Erbix®) を銅-64で標識をすることに成功し、腫瘍移植のマウスでPET画像を取得できた (図4)。

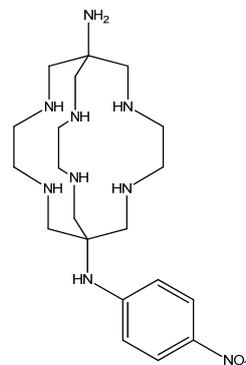


図3 SarAr 錯体
(Sarcophagine, 3, 6, 10, 13, 16, 19-hexaaza-bicyclo[6.6.6]-eicosane-1, 8-diamine)

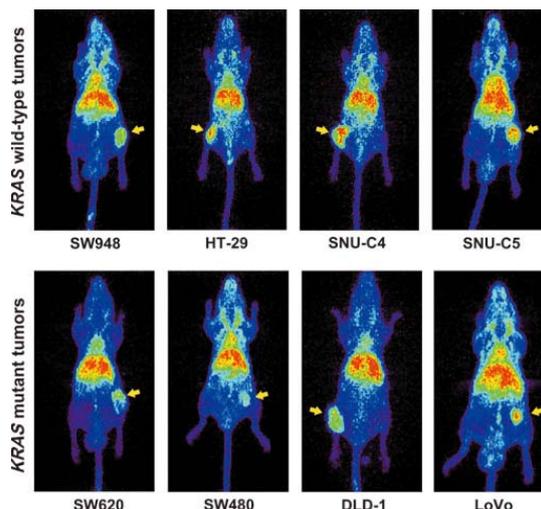


図4 ⁶⁴Cu-DOTA-cetuximabのマウス画像
矢印部分が腫瘍移植部位である。
Achmad A, et al., Cancer Sci., 103(3), 600-605 (2012).

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 14 件)

- ① Yoshioka H, Tominaga H, Endo K et al., In vivo therapeutic effect of CDH3/P-cadherin-targeting radioimmunotherapy, Cancer Immunol. Immunother., 査読有、2012 in press

- ② Achmad A, Tominaga H, Endo K et al., Predicting cetuximab accumulation in KRAS wild-type and KRAS mutant colorectal cancer using ⁶⁴Cu-labeled cetuximab positron emission tomography. *Cancer Sci.*、査読有、Vol. 103、No. 3、2012、pp. 600-605
- ③ Ohshima Y, Tominaga H, Endo K et al., Preparation and biological evaluation of 3-[(76)Br]bromo- α -methyl-L-tyrosine, a novel tyrosine analog for positron emission tomography imaging of tumors. *Nucl. Med. Biol.*、査読有、Vol. 38、No. 6、2011、pp. 857-865.
- ④ Paudyal B, Tominaga H, Endo K et al., Positron emission tomography imaging and biodistribution of vascular endothelial growth factor with ⁶⁴Cu-labeled bevacizumab in colorectal cancer xenografts. *Cancer Sci.*、査読有、Vol. 102、No. 1、2011、pp. 117-121
- ⑤ Imai H, Tominaga H et al., Inhibition of L-type amino acid transporter 1 has antitumor activity in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.*、査読有、Vol. 30、No. 12、2010、pp. 4819-4828
- ⑥ Kaira K, Tominaga H et al., Comparison of L-type amino acid transporter 1 expression and L-[¹⁸F]- α -methyl tyrosine uptake in outcome of non-small cell lung cancer. *Nucl. Med. Biol.*、査読有、Vol. 37、No. 8、2010、pp. 911-916
- ⑦ Miyashita G, Tominaga H, Endo K et al., ¹⁸F-FAMT uptake correlates with tumor proliferative activity in oral squamous cell carcinoma: comparative study with ¹⁸F-FDG PET and immunohistochemistry. *Ann. Nucl. Med.*、査読有、Vol. 24、No. 8、2010、pp. 579-584
- ⑧ Kaira K, Tominaga H et al., Biologic correlation of 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D- glucose uptake on positron emission tomography in thymic epithelial tumors. *J. Clin. Oncol.*、査読有、Vol. 28、No. 23、2010、pp. 3746-3753
- ⑨ Paudyal P, Tominaga H, Endo K et al., Imaging and biodistribution of Her2/neu expression in non-small cell lung cancer xenografts with Cu-labeled trastuzumab PET. *Cancer Sci.*、査読有、Vol. 101、No. 4、2010、pp. 1045-1050
- ⑩ Paudyal B, Paudyal P, Oriuchi N, Hanaoka H, Tominaga H, Endo K et al., Dual functional molecular imaging probe targeting CD20 with PET and optical imaging. *Oncol. Rep.*、査読有、Vol. 22、No. 1、2010、pp. 115-119
- ⑪ Kaira K, Tominaga H, Endo K, ¹⁸F-FMT uptake seen within primary cancer on PET helps predict outcome of non-small cell lung cancer. *J. Nucl. Med.*、査読有、Vol. 50、No. 11、2009、pp. 1770-1776
- ⑫ Hanaoka H, Tominaga H, Endo K et al., Evaluation of (⁶⁴Cu)-labeled DOTA-D-Phe(1)-Tyr (3)-octreotide ((⁶⁴Cu)-DOTA-TOC) for imaging somatostatin receptor-expressing tumors. *Ann. Nucl. Med.*、査読有、Vol. 23、No. 6、2009、pp. 559-567
- ⑬ Senda M, Tominaga H et al., Cerebral histamine H1 receptor binding potential measured with PET under a test dose of olopatadine, an antihistamine, is reduced after repeated administration of olopatadine. *J. Nucl. Med.* 査読有、Vol. 50、No. 6、2009、pp. 887-892
- [学会発表] (計 6 件)
- ① 富永英之、放射性薬剤フルオロメチルチロシンの光学活性分析、日本分析化学会第60年会、2011. 9. 16、名古屋大学東山キャンパス (愛知県)
- ② 富永英之、放射性遷移金属(銅-64)含有製剤の品質管理のための遷移金属分析、第

50回日本核医学会学術総会、2010. 11. 11、
大宮ソニックシティ（埼玉県）

- ③ 富永英之、放射性遷移金属(銅-64)含有製剤に適したバイアルの開発、日本分析化学会第59年会、2010. 9. 16、東北大学川内北キャンパス（宮城県）
- ④ 富永英之、放射性薬剤に適したバイアルの評価、日本薬学会第130年会、2010. 3. 29、岡山コンベンションセンター・岡山大学津島キャンパス他（岡山県）
- ⑤ 小井沼怜、富永英之、抗体標識を目的としたポリアミンSar誘導体の合成研究、第24回日本高分子学会 群馬・栃木地区講演会、2010. 3. 9（群馬県）
- ⑥ 花岡宏史、富永英之、(64)Cu-DOTA-octreotideの有用性、第49回日本核医学会学術総会 2009. 10. 2、旭川市民文化会館・旭川グランドホテル（北海道）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 英之 (TOMINAGA HIDEYUKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座
教員
研究者番号：00393348

(2) 研究分担者

遠藤 啓吾 (ENDO KEIGO)
京都医療科学大学・医療科学部・学長
研究者番号：10115800