

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591783

研究課題名(和文)ペプチド製剤による中和型血管新生阻害剤の薬効評価

研究課題名(英文)Response assessment of anti-angiogenetic therapy by peptide imaging agents

研究代表者

立石 宇貴秀(Tateishi, Ukihide)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：20415524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：中和抗体型血管新生阻害剤のサロゲートマーカーとして新規合成したインテグリン分子イメージング用RGD(Arg-Gly-Asp)ペプチド製剤による薬効評価法を確立し動物モデルの薬効判定およびヒトでの遺伝子プロファイリングによる評価をもとに、より適切な適応疾患の探索を検討し、インテグリン分子イメージング用RGD(Arg-Gly-Asp)ペプチド製剤の有用性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Integrin specific peptide-type RGD(Arg-Gly-Asp) ligands were synthesized in order to visualize therapeutic effect of antiangiogenic agents in rat model. Integrin specific peptide-type RGD ligands was considered to be promising tool for monitoring therapeutic effect of antiangiogenic agents.

研究分野：放射線医学

キーワード：血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

中和抗体型血管新生阻害剤は癌細胞で発現が亢進している血管新生因子 (VEGF) を特異的に中和し、血管透過性、間質圧の変化、微小血管濃度の正常化をもたらす、結果として腫瘍の増殖を阻害する。2011年6月15日FDAに承認されたベバシズマブ:

Bevacizumab (以下BVと略す)は唯一の中和抗体型血管新生阻害剤でヒト化IgG1モノクローナル抗体である。これまでBVと抗癌剤の併用による臨床試験で多数の固形癌にてその有効性が証明され、現在、大腸癌、肺癌、腎臓癌、膠芽腫、HER2陰性転移性乳癌の治療に対し適応承認されている。一方、近年の動物モデルによる追試では、BVは投与初期に奏効するが、その後はより侵襲的な癌増殖を促進し転移発生率が高まるという逆説的データもある (Cancer Cell;220-31,2009)。つまり、血管新生が充足した腫瘍では栄養分の供給に満足した状態であり、より侵襲的な腫瘍となる原動力はないが、BVにより腫瘍への血液供給が断たれることによって酸素や栄養分を求めて腫瘍はより悪性度を増し、転移を引き起こす (Nat Rev Cancer;592-603,2008)。この現象を反映した臨床試験として転移性乳癌 (N Engl J Med;1454-5,2011) や膠芽腫

(Oncologist;351-8,2011) に対するBV投与試験が指摘された。これらの問題点を踏まえ、BVによる治療をより適正にかつ効果的に実施するためには、以下を早急に検討する必要がある。

(1) 薬効評価法の確立: 腫瘍サイズ縮小より早期に始まるBVによる腫瘍環境における血行動態の正常化を確実に捉えられるよう新規合成したインテグリン分子イメージング用RGD PET製剤 (68Ga- or 64Cu-DOTA-RDG, 68Ga- or 64Cu-DOTA-PEG-RGD) による薬効評価方法論の作成 (立石宇貴秀、平成21~23年度、基盤研究(C)、課題番号21591753)。

(2) 個別化医療の実施: VEGF遺伝子には多型 (Cancer Epidemiol Biomarkers Prev14:571-5,2005) が知られているため、治療前の遺伝子プロファイリングにて適正な患者選択を行う。

(3) 副作用予測による患者選択: インテグリン分子イメージング用RGD PET製剤による薬効評価法を応用し、BVで頻度の高い重篤な副作用 (出血、好中球減少症、消化管穿孔、肺血栓塞栓症、脳血管障害) を予測しプロトコルの変更に役立てる。

(4) BVに対する腫瘍耐性のメカニズムを探索する: BVに対する腫瘍耐性が生じた場合に非VEGF的血管新生のカスケードも妨害できるようなスキームを想定しておく。

(5) 動物腫瘍モデルによる適応疾患の探索: 固形癌以外の癌腫においても幅広く適応疾患を拡大するため、インテグリン分子イメージング用RGD PET製剤による薬効評価法

による動物実験を行い、可能性のある疾患群を選定し次期臨床試験に備える。具体的には血管新生が豊富な造血器腫瘍で myeloma (Br J Haematol;154:533-5,2011) DLBCL (N Engl J Med;359:2313,2008) Aggressive non-Hodgkin lymphoma (Leukemia & Lymphoma;50:728-35,2009) Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (Ann Oncol;19:396-7,2008) が標的となり、すでに細胞の候補を絞っている。(6) 費用効果比の試算による妥当性の検討: 米国ではBVによる治療は年間10万ドルに達するが、癌治療においてBVの適切な使用は未だかなり不確実であるとされている (JAMA)。従って、上記 ~ の結果を踏まえ、薬効評価のイメージングの費用までを含めた治療費を患者個人のリスク・ベネフィット解析を基に試算し (Ann Nucl Med;24:261-7,2010) 臨床試験を具現化する。

## 2. 研究の目的

(1) 当研究では、中和抗体型血管新生阻害剤の担癌患者体内での標的阻害を的確に捉えるインテグリン分子イメージング用RGDペプチド製剤を動物腫瘍モデルをもとに確立し、治療効果、副作用の発現を予測できるバイオマーカーとなりうるかどうか検討することである。

(2) ヒト投与を目的として立案したインテグリン分子イメージング用RGDペプチド製剤の合成を実施し、安定した収率を得るための調整を図ることである。

## 3. 研究の方法

BV併用化学療法による治療効果判定、副作用予測を行うために様々な動物腫瘍モデルを用いてインテグリン分子イメージング用RGD PET製剤 (68Ga- or 64Cu-DOTA-RDG, 68Ga- or 64Cu-DOTA-PEG-RGD) による薬効評価方法をVEGF遺伝子プロファイル解析による前向き臨床試験の設定のもと確立する。

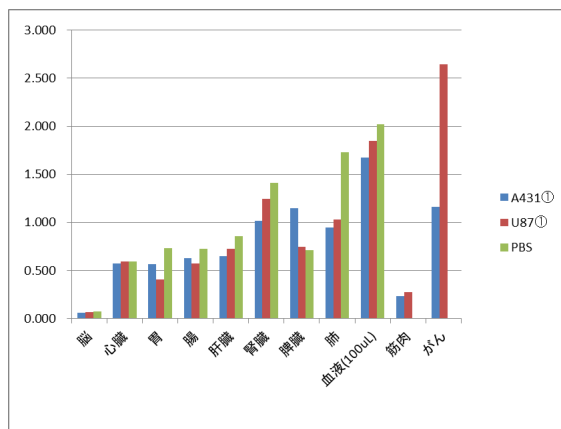
## 4. 研究成果

(1) 報告者らが過去に実施した基盤研究(C)、課題番号21591573 (平成21年度~平成23年度)の結果で合成に成功したインテグリン特異的標識ペプチドPET製剤である<sup>68</sup>Ga-DOTA-PEG-RGDfKの安定した合成方法を確立した。患者投与を前提にするため安定かつ再現性のある薬剤合成方法の確立に努めた。グリシンを出発物質とし、順次アミノ酸を縮合させた後、環化させ、環状ペプチドcyclo-RGDfKを得た。この合成は液相中で行い、量的な供給も可能となった。一方、選択的に保護されたDOTA、及びPEG鎖を合成し、それぞれを縮合させ、PEG-DOTA鎖を合成し、これを最後にcyclo-RGDfKと結合し、標識前駆体であるDOTA-PEG-RGDfKを得た。<sup>68</sup>Ge-<sup>68</sup>Gaジェネレータより抽出された<sup>68</sup>Ga<sup>3+</sup>溶液を加え、80℃で15分加熱した後、Sep-Pak®を

用いて短時間で精製した。これにより放射性化学純度の高い<sup>68</sup>Ga-DOTA-PEG-RGDfKを安定して効率よく得ることができた。合成した薬剤の<sup>68</sup>Gaが解離することが以前はしばしば経験されたが、十分改善され安定して得ることも成功した。

(2) 中和型血管新生阻害剤による治療効果判定、副作用予測を行うために様々な動物腫瘍モデルを用いてインテグリン分子イメージング用RGD PET製剤(<sup>68</sup>Ga- or <sup>64</sup>Cu-DOTA-RDG, <sup>68</sup>Ga- or <sup>64</sup>Cu-DOTA-PEG-RGD)による薬効評価方法を以下に述べる如く実施した。

In Vitro 研究：合成薬剤の放射線化学、<sup>3</sup> binding affinityの確認、U87MG細胞、A431細胞、HL-60細胞、Raji細胞による培養実験を実施した。In Vivo 研究：U87MG細胞、A431細胞、HL-60細胞、Raji細胞を移植したマウスを用い最大10臓器のbiodistribution(0, 10, 20, 60, 120 min、尿中・糞中の排泄(0-120 min)、Tumor uptake (%ID/g, 10, 20, 60, 120 min)、Tumor:Blood ratio (TBR, 10, 20, 60, 120 min)を調べた。以下に%ID/gのモニタリング結果を例として示す。



### %ID/gのモニタリング

(註)10臓器のbiodistribution(0, 10, 20, 60, 120 min、尿中・糞中の排泄(0-120 min)、Tumor uptake (%ID/g, 10, 20, 60, 120 min)、Tumor:Blood ratio (TBR, 10, 20, 60, 120 min)から、血液プール、腎臓、脾臓の順に生理的集積が認められる。一方、脳や筋肉では非常に低い集積を示している。腫瘍細胞での検討では、U87MG細胞におけるがん細胞への集積が顕著であることがわかる。A431細胞でも同様であり、筋肉をコントロールとすると集積は明らかに高い。

画像評価研究：PETのoptimal timingを決定し、PETの集積とVEGF-A発現の関連性をWestern blot法と免疫組織化学法(蛍光二次抗体染色)にて確認した。中和型治療薬の蛍光標識による動態画像化と投与群、プラセボ群での画像変化を検討した。については追試を2回実施した。中和型治療薬の蛍光標識による動態画像化と投与群、プラセボ群での比較を実施した。以下の図1、2および表1、2にA431細胞における%ID/gと治療効果の結果を示す。

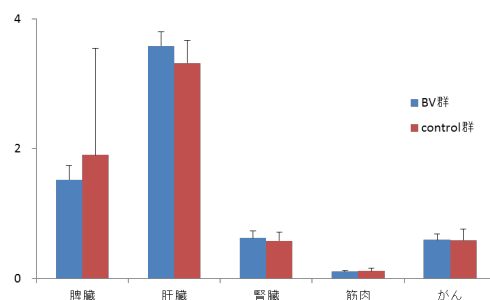


図1A：中和型治療薬の蛍光標識による投与群、プラセボ群での8d後までの%ID/g変化(臓器別)

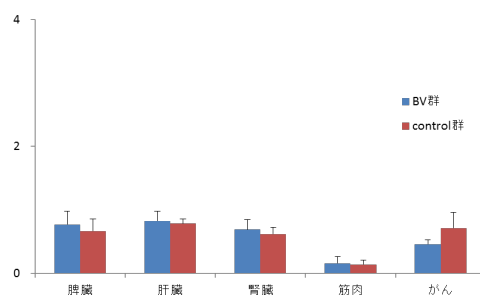


図1B：中和型治療薬の蛍光標識による投与群、プラセボ群での12dまでの%ID/g変化(臓器別)

### BV群まとめ

(%ID/g)

動物名	脾臓	肝臓	腎臓	筋肉	がん
BV1	1.72	3.41	0.63	0.12	0.56
BV2	1.64	3.91	0.77	0.09	0.70
BV3	1.22	3.50	0.49	0.09	0.48
BV4	1.49	3.51	0.60	0.12	0.62
平均	1.52	3.58	0.62	0.11	0.59
標準偏差	0.22	0.22	0.11	0.02	0.09

表1A：投与群の8dでの臓器別%ID/g (n=4)

BV 群まとめ (%ID/g)

動物名	脾臓	肝臓	腎臓	筋肉	がん
BV1	0.63	0.85	0.84	0.31	0.50
BV2	0.70	0.73	0.62	0.08	0.41
BV3	1.07	1.03	0.79	0.12	0.52
BV4	0.66	0.69	0.51	0.10	0.39
平均	0.77	0.82	0.69	0.15	0.46
標準偏差	0.21	0.15	0.15	0.11	0.07

表 1B : 投与群の 12d での臓器別%ID/g (n=4)

Control 群まとめ (%ID/g)

動物名	脾臓	肝臓	腎臓	筋肉	がん
C1	1.09	2.90	0.49	0.06	0.50
C2	0.97	3.18	0.44	0.10	0.43
C3	4.38	3.69	0.68	0.13	0.82
C4	1.16	3.50	0.71	0.17	0.60
平均	1.90	3.32	0.58	0.11	0.59
標準偏差	1.65	0.35	0.13	0.04	0.17

表 2A : プラセボ群の 8d での%ID/g (臓器別)

Control 群まとめ (%ID/g)

動物名	脾臓	肝臓	腎臓	筋肉	がん
C1	0.42	0.69	0.47	0.07	0.42
C2	0.65	0.78	0.62	0.15	0.72
C3	0.69	0.86	0.67	0.22	1.03
C4	0.89	0.81	0.70	0.11	0.68
平均	0.66	0.78	0.62	0.14	0.71
標準偏差	0.19	0.07	0.10	0.06	0.25

表 2B : プラセボ群の 12d での%ID/g(臓器別)

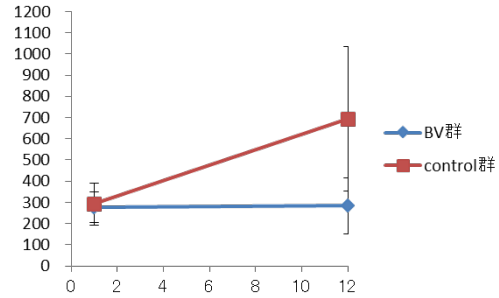


図 2 : 投与群とプラセボ群の経過対比 (8d までが上段と 12d までが下段に表示)

移植腫瘍径、SUVmax (g/ml), SULpeak (g/ml), MTV (ml), TLG (g), %ID/g, Ktrans (K1), Kep (K2), AUC-CSH をモニターした結果、U87MG 細胞、A431 細胞ではいずれの指標もパラレルに推移し、ベースラインから 20 週の治療薬投与後にて 2 群間に有意差を認めた。一方、HL-60 細胞、Raji 細胞においては、SUVmax (g/ml), SULpeak (g/ml), MTV (ml), TLG (g), %ID/g, においてパラレルな推移を示したが、AUC-CSH については治療効果と関連がなかった。これは、血液腫瘍細胞株では不均一性やエントロピーがもともと少なく、治療効果を正確に反映しないこと、中和型治療薬への反応が極めて良好であり、治療効果を見るタイミングが撮影プロトコルと合わなかったことが原因と考えられた。この点を踏まえ、インテグリン特異的標識ペプチド型 PET 製剤  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-RGDfK は治療の反応性を加味したプロトコルにおいて撮影に用いられることが望ましく、その上で正しく治療効果を表現できるツールと考えられた。ヒト投与を目的として立案したインテグリン特異的標識ペプチド型 PET 製剤の  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-(PEG)-RGDfKD ペプチドあるいは類似化合物も複数合成し、U87MG 細胞、A431 細胞における治療効果では同様の結果を得ている。

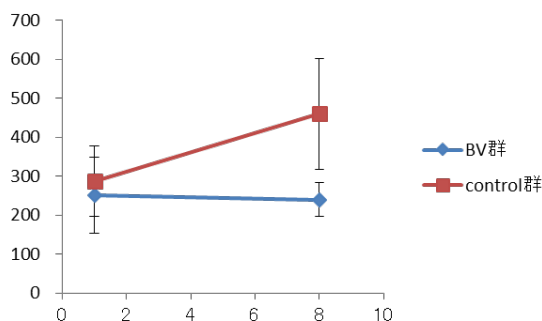
### 5 . 主な発表論文等

(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 2 件)

立石宇貴秀, Prognostic significance of metabolic tumor burden by positron emission tomography/computed tomography in patients with relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma. Cancer Sci., 査読有、106 巻、2015、186-193

日野彩子, 立石宇貴秀ほか, Tumor hypoxia and microscopic diffusion capacity in brain tumor: a comparison of (62)Cu-Duacethyl-Bis(N4-Methylthiosemicarbazone) PET/CT and diffusion-weighted MR imaging. Eur J Nucl Med Mol Imaging., 査読有、41 巻、2014、1419-1427



〔学会発表〕(計1件)

鳥井郁夫、立石宇貴秀ほか、Comparison of [Cu-62]-Duacethyl-Bis(N4-Methylthiosemi carbazone PET-CT and microscopic diffusion capacity in brain neoplasms. 北米放射線学会議、2014年11月30日~2014年12月5日、シカゴ(アメリカ)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立石宇貴秀 (TATEISHI UKIHIDE)

横浜市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 20415524

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者