

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461845

研究課題名(和文) ターゲット癌細胞への<sup>64</sup>Cu標識蛍光抗体光線療法の研究研究課題名(英文) <sup>64</sup>Cu labeled photoimmunotherapy to targeting cancer cell

研究代表者

中島 崇仁 (Nakajima, Takahito)

群馬大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：70375559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近赤外線光免疫療法では、抗体とIRDye700という蛍光増感剤を結合させた薬剤を静脈内に投与した後、病変部に近赤外線を照射し、周囲の組織を傷害することなく病変部のみを壊死させる。近赤外線は3-5cm程度の深さまで到達できるので、表在の癌を対象として研究が進められている。

本研究では近い将来体内の深部の癌に対して光免疫療法を応用する際の前段階として、PET装置を使って薬剤の分布を評価した。用いる薬剤にポジトロン核種であるCu-64を標識して、担癌マウスのイメージングを行い、病変部がPET画像で認識可能であることを確認した。本法は将来の薬剤分布評価方法として光免疫療法の発展に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Photoimmunotherapy is a novel treatment method for cancers. The conjugates of antibody and IRDye700 are administrated and then near infrared light is irradiated to the tumor. Since near infrared light is not harmful to normal tissue, photoimmunotherapy can damage only to cancer cells. Near infrared light will reach only the shallow area and this therapy will be applied for head and neck cancers. However, in the near future, photoimmunotherapy can be applied for cancers in deep areas of body with the support of Interventional technique.

In this study, we employed Cu-64, a positron emission tracer, to label the conjugate. And we acquired images of tumor bearing mice by a PET scanner. Cu-64 accumulation was seen in a tumor. Our method would be promising for the evaluation of the conjugate distribution before photoimmunotherapy.

研究分野：放射線診断学

キーワード：光免疫療法 近赤外線 抗体 IRDye700 癌治療

### 1. 研究開始当初の背景

抗体を用いた癌細胞の治療については実際の臨床現場で使われるようになっており、いわゆる **armed antibody** というラジオアイソトープなどの治療用物質で標識された抗体も利用されている。しかし、抗体を用いた治療の問題点は抗体自体の大きさが **150kDa** 程度と比較的大きく、対外から投与した薬剤としては分子量が大きく、血中半減期が長いという特徴がある。例えば、イットリウム ( $^{90}\text{Y}$ ) 標識抗体について考えた場合、1) 血中クリアランスが長い事による体内のバックグラウンドが高い・2) **enhanced permeability and retention (EPR) effect** などによる抗体の非特異的集積などにより、イットリウムから放出される  $\beta$  線は目的とする腫瘍以外に照射されてしまう事が問題となる。そのため、臨床で用いられるイットリウム標識 **CD20** 抗体では事前にインジウムで骨髄への集積を確認して、骨髄への影響があると考えられる場合は治療ができない。

一方、近赤外線光免疫療法 (**PIT: Photo-immunotherapy**) は近年米国国立衛生研究所 (NIH) にて開発された新しい治療方法であり、抗体がターゲット抗原を発現する細胞に結合することにより、目的の細胞膜を傷害すると考えられている。このため、周囲の正常組織を障害することなく、超選択的に目的の癌細胞だけを治療することができる。治療のためには近赤外線を病変部に照射す

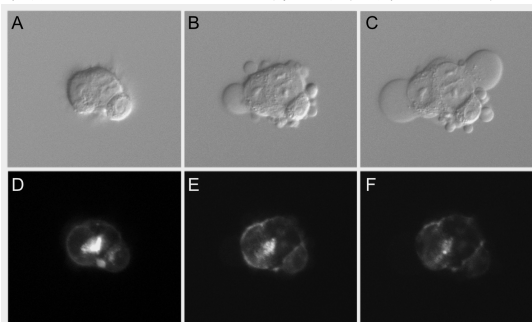


図1：細胞に対する PIT (上段：位相画像・下段：蛍光画像)

るが、近赤外線自体は正常組織にダメージを与えない。また、蛍光増感剤として利用する物質自体が蛍光色素としての特徴も有するため、病変への集積をイメージング (蛍光イメージ) しながら同時に治療も行うことができる。これについては **theranostic** という新しい言葉も生まれている。ただし、蛍光イメージングで病変を検出するには病変が表面に近い領域に存在する必要がある。近赤外線自体は **3-5cm** 程度の深度まで到達することができるため、治療については深部に病変が存在しても十分治療を行うことができる。本研究ではポジトロン核種である  $^{64}\text{Cu}$  で蛍光増感剤標識抗体を標識 (ダブルラベリング) することにより、PET カメラで標的腫瘍のイメージングを行う事で病変を画像評価することができる。

### 2. 研究の目的

本研究では、体内深部に存在する腫瘍に対して PIT を行う際に、目的とする腫瘍に薬剤が分布する様子や程度を可視化することを目的とした。将来的に、体内の深部腫瘍についても、インターベンショナルラジオロジーの技術を用いて、カテーテルや穿刺用針を用いて、光ファイバを病変近くまで到達させ、近赤外線を照射することで、腫瘍を壊死させるようになることを考えており、現段階で深部病変への薬剤の分布を確認することは非常に重要である。表在の病変については、PIT で用いる蛍光増感剤がもともと蛍光物質として開発されていることから、蛍光カメラで確認が可能であった。深部病変については光や近赤外線が届かないため、何らかの工夫が必要である。本研究では、ポジトロン核種である  $^{64}\text{Cu}$  を蛍光増感剤標識抗体に標識して、PET イメージングで定性的・定量的に薬剤の分布を確認することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ポジトロン核種 $^{64}\text{Cu}$ の生成

附属病院内に設置されている住友重工製サイクロトロン装置にて Ni メッキからポジトロン核種である  $^{64}\text{Cu}$  (半減期 13 時間) を生成した。

#### (2) 蛍光増感剤標識抗体の合成・ $^{64}\text{Cu}$ の標識

① 今回のターゲットとする癌細胞には EGFR 抗原を発現している H226 を用いたため、Panitumumab 抗体を使用する。

② 蛍光増感剤である IRDye700 (IR700) には NHS-ester が接合部として存在しており、抗体 (Panitumumab) と混和させた後、30 分室温暗所にて保存した後、PD-10 カラムにて抗体と IR700 とが共有結合した溶液のみを収集する。この際に回収率と一つの抗体についている IR700 の数を吸光度計にて測定する。

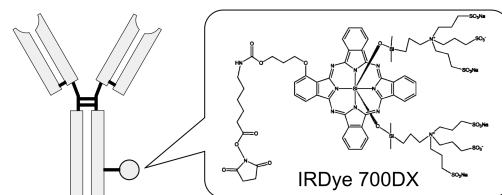


図2：蛍光増感剤標識抗体

③ サイクロトロンで合成された  $^{64}\text{Cu}$  を DOTA 錯体にて配位した後、上記の抗体-IR700 複合体に結合させる (蛍光増感剤標識抗体)。

④ HPLC にて合成された蛍光増感剤標識抗体の回収率を測定する。

#### (3) 安定性試験

蛍光増感剤標識抗体の安定性について **in vitro** の状態で確認を行う。

① PBS に溶解した後、一定時間放置。

② マウス血清に溶解した後、一定時間放置。

この状態での安定性を HPLC で合成直後の結果と比較する。

(4) 蛍光増感剤標識抗体の細胞への結合能の評価

蛍光増感剤標識抗体を H226 細胞培養中の培地内に添加して、細胞への集積率について検討を行う。

①キレートのみ ( $^{64}\text{Cu}$  なし) 結合蛍光増感剤標識抗体を用いて、1 時間・6 時間共培養の後、蛍光顕微鏡で蛍光増感剤標識抗体の分布を確認する。

②レートのみ ( $^{64}\text{Cu}$  なし) 結合蛍光増感剤標識抗体を用いて、1 時間共培養の後、フローサイトメーターにて細胞の蛍光強度を観察する。非標識抗体 (Panitumumab) を蛍光増感剤標識抗体投与前に 1 時間共培養してから、蛍光増感剤標識抗体を投与して細胞への結合の特異性についても検討する。

(5) 担癌マウスの作成

細胞培養した H226 細胞 ( $1 \times 10^6 / 100 \mu\text{L}$ ) を 5 週令のヌードマウスの殿部皮下に移植する。腫瘍が 6-8mm 程度に育つまで飼育する。

(6) PET イメージング

$^{64}\text{Cu}$  標識蛍光増感剤標識抗体を担癌マウスの尾静脈より静脈注射する。投与後、24 時間、48 時間で吸入麻酔下に担癌マウスの PET 画像を撮像する。

(7) 薬剤の生体内分布

$^{64}\text{Cu}$  の代わりに  $^{111}\text{In}$  を標識した蛍光増感剤標識抗体を作成し、担癌マウスの尾静脈から静脈注射を行う。48 時間後に担癌マウスを安楽死させ、各種臓器 (脳・肺・心臓・胃・消化管・肝臓・膵臓・脾臓・骨・筋肉・血液) を採取する。それぞれの重量を計測した上で、ガンマカウンターにて、それぞれの臓器の放射能をカウントし、重量あたりの放射能を導くことで、錯体結合蛍光増感剤標識抗体の体内分布を観察する。

#### 4. 研究成果

(1)  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体合成分子量により分けられるカラムを用いた

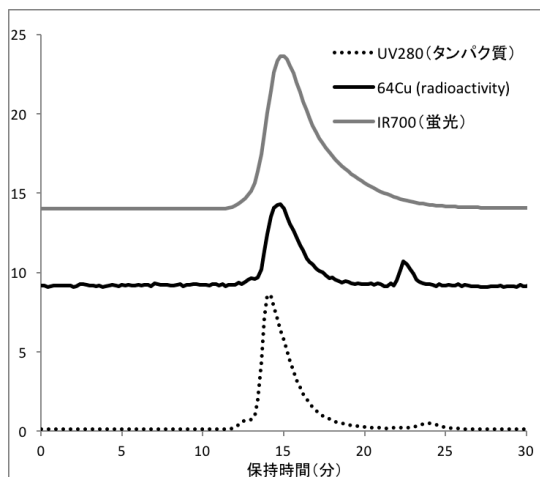


図 2 :  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体合成後の高速クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC で測定すると、 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体の単一ピークが認められた。また、蛍光のピークとタンパク質のピークの一致が認められており、蛍光増感剤と抗体とが分離してしまうことはなかった。非常に高い回収率で  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体の合成を行うことができた。わずかに free の  $^{64}\text{Cu}$  が認められたが、ピークが大きく離れていることから、 $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体との分離が容易であった。

(2) H226 細胞への DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体の集積

培養液中に DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体を添加した H226 細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。蛍光画像では細胞膜に一致した蛍光が認められており、細胞膜に結合した DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体の分布と考えられた。

フローサイトメーターを用いた測定では、DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体を添加した培養液中で培養された H226 細胞に蛍光が認められており、DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体の添加されていない培地で培養したコントロール細胞と異なるピークが見られた。また、DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体天下の 1 時間前に抗体 (Panitumumab) を投与した細胞群では、ピークのシフトが認められず、抗原抗体反応に特異的な結合であることが示唆された。

これらのことから、錯体 (DOTA) の結合が抗原抗体反応に影響を及ぼさないことが分かった。

(3) PET イメージング

$^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体を作成した後、担癌マウスの尾静脈に投与した。24 時間・48 時間後に小動物用 PET 装置にて PET 画像を取得した。

腫瘍部位を PET 画像で確認することができた。しかし、肝臓への集積が非常に強く、48 時間後でも肝臓への高集積が認められた。

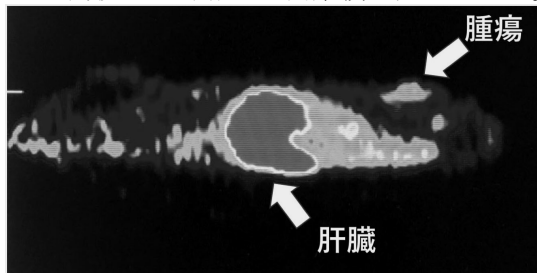


図 3 : 担癌マウスの PET 画像

(4)  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体の生体内分布

$^{111}\text{In}$ -DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体を作成した後、担癌マウスの尾静脈に投与した。24 時間後に担癌マウスを安楽死させ、臓器を取り出し、ガンマカウンターで計測した。

コントロールとして皮下移植した EGFR 陰性細胞である H520 細胞よりも、EGFR 陽性の H226 細胞へ高い集積が認められた。また、PET 画像で明らかになっていたように肝臓への集積が非常に高いことと、脾臓への集積も強

くなっていた。

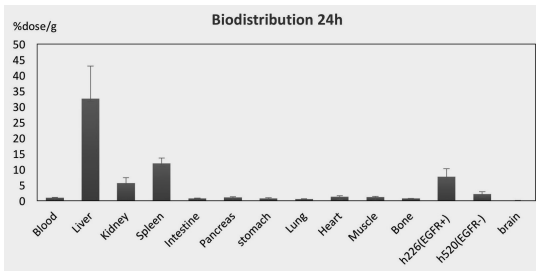


図4：投与後24時間後の生体内分布

肝臓や脾臓といった網内系への集積が強いことから、生体内で<sup>111</sup>In-DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体が凝集するなどして、多くの<sup>111</sup>In-DOTA 標識蛍光増感剤標識抗体で形態変化が生じているのではないかと推測された。

#### (5) まとめ

体内の深部病変への近赤外線光免疫療法の応用に先駆けて、治療薬である蛍光増感剤標識抗体の分布をポジトロン核種である<sup>64</sup>Cuで標識することで、PET 画像として可視化することに成功した。生体内での安定性については今後も検討が必要であるが、PET 画像が近赤外線光免疫療法の将来展望に役立つことが示せた。

#### 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)

1. Kodaira S, Nakajima T, Arisaka Y, Tokue A, Higuchi T, Tsushima Y. Advantages of L-3-[(18)F] fluoro-alpha-methyl tyrosine over 2-[(18)F]-fluoro-2-deoxyglucose in detecting liver metastasis during positron emission tomography scan. Springerplus. 5:618. 2016、査読有り doi: 10.1186/s40064-016-2212-7

2. Sato K, Watanabe R, Hanaoka H, Nakajima T, Choyke PL, Kobayashi H. Comparative effectiveness of light emitting diodes (LEDs) and Lasers in near infrared photoimmunotherapy. Oncotarget. 7(12):14324-35. 2016、査読有り doi: 10.18632/oncotarget.7365

##### [学会発表] (計2件)

1. Nakajima T, Otake H, Binh DD, Higuchi T, Tsushima Y. A novel parameter to evaluate thyroid function with dual-energy CT in patients with hyperthyroidism, European congress of radiology, 2017

2. Zhang X, Kim M, Nakajima T, Yamaguchi A, Houg NT, Gu WC, Yusri DH, Tsushima Y.

Detection of EGFR Positive Lung Squamous Cell Carcinoma by Activatable Fluorescence Imaging. Progress in Radiology 2016: 11th Symposium of the Scandinavian Japanese Radiological Society & 14th Nordic Japan PACS Symposium. September, 2016

[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：  
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

中島 崇仁 (Nakajima, Takahito)  
群馬大学大学院医学系研究科・特任准教授  
研究者番号：70375559