

学位論文要旨

Abstract

In this study, two novel radiolabeled compounds, which could be useful for personalized medicine, were prepared and evaluated. One is an "imaging agent" used to evaluate the response of cancer therapy by detecting cell death. The other is an "anti-cancer agent" for use in targeted radioisotope therapy (TRT).

Phosphatidylserine (PS) externalization is a hallmark of apoptosis and other non-apoptotic modes of cell death. Bis(zinc-dipicolylamine) (Zn-DPA) complexes have been reported to exhibit affinity for PS. A radiolabeled Zn-DPA derivative, [^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA was developed for cell death imaging. [^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA accumulated in cancer cells after treatment with an anticancer drug both *in vitro* and *in vivo*, and its accumulation was correlated with the number of TUNEL-positive cells. [^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA could be useful for the early detection of treatment effects after chemotherapy.

TRT is a type of radiotherapy targeting cancer cells, in which drugs are conjugated with radionuclides and carriers. Bombesin (BBN) was selected as a carrier for transport to prostate cancer cells and it was conjugated with α -emitting radionuclide, astatine-211 (²¹¹At). The biodistribution of ²¹¹At-labeled BBN derivative, [²¹¹At]AB-3, was evaluated in PC-3 tumor-bearing mice. [²¹¹At]AB-3 specifically accumulated in tumor tissue (4.05 ± 0.73 %ID/g), it was suggested that [²¹¹At]AB-3 may inhibit tumor growth.

「個別化医療」は患者の遺伝的背景や個々のがん種に特徴的な生物学的・病理学的特性などに基づいて行う医療である。核医学においては、分子イメージング技術を用いた Positron Emission Tomography (PET) や Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) といった画像診断によって治療適格・不適格性の判定、治療効果予測、モニタリングの客観的指標を提供可能であり、個別化医療に貢献できる。また、標的アイソトープ治療は画像診断に使用した核種を β 線や α 線を放出する治療用核種に置き換えることで、近年医学分野で広がっている“theranostics” (治療 (therapy) と診断 (diagnosis) を組み合わせた造語) の概念に沿った治療を提供できる。本研究では、個別化医療の観点から、細胞死イメージング剤と標的アイソトープ治療用薬剤を例に挙げ、がんの診断・治療を目的とした放射性核種標識化合物の開発を行うことを目的とした。

1. 治療効果判定を目的とした新規細胞死イメージング剤の検討

がん治療を成功のためには、治療法、用量、タイミングの選択が重要であり、その評価のために効果判定が行われる。固形がんの治療効果判定には「固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン (通称、RECIST ガイドライン)」に従って、主に CT の形態画像から腫瘍の縮小度を判断することで行われているが、CT で腫瘍の縮小を判断するには月単位の間隔が必要である。一方で、薬物療法や放射線療法が行われた場合、治療早期から細胞死が誘導される。そのため、PET や SPECT によって細胞死を画像化できれば、治療早期から非侵襲的に治療応答の情報を提供でき、「個別化医療」につながると期待される。そこで本研究では、抗がん剤による治療後の腫瘍を対象とした細胞死 SPECT イメージングのための放射性

核種標識化合物（放射性プローブ）を開発することを目的とした。

細胞膜は非対称に分布したリン脂質の二重層であり、通常はカチオン性リン脂質が外膜に、アニオン性リン脂質が内膜に分布している。細胞死の際に、細胞膜の非対称性が破綻し、通常は内膜に存在するホスファチジルセリン（PS）が細胞外に露出する。したがって、PSは細胞死検出の標的分子となる。本研究では、細胞死検出のためにPSに親和性を示すZinc-dipicolylamine（Zn-DPA）を使用した新規放射性プローブを設計・作成した。母体化合物DPA-NH₂を合成後、*N*-succinimidyl 3-[¹²⁵I]iodobenzoate（[¹²⁵I]SIB）と結合させることで、[¹²⁵I]IB-DPAを放射化学的収率42%、放射化学的純度95%以上で得た。一方、DPA-NH₂にTr-MAG3を結合させることで、Tr-MAG3-DPAを合成した。Tr-MAG3-DPAのトリチル基を脱保護後、^{99m}TcO⁴⁺をSn²⁺で還元することによって[^{99m}Tc]TcO³⁺を生成し、MAG3に配位させた。HPLCで精製することで、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPAを放射化学的収率71%、放射化学的純度95%以上で得た。[¹²⁵I]IB-DPAおよび[^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPAは硝酸亜鉛水溶液と混合することでZn²⁺を配位させ、[¹²⁵I]IB-ZnDPAおよび[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA（図1）を得た。

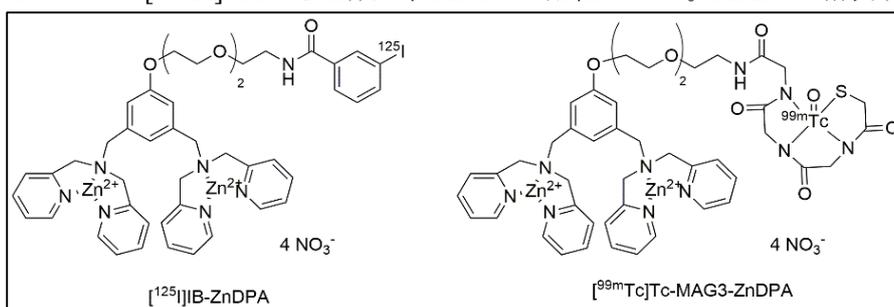
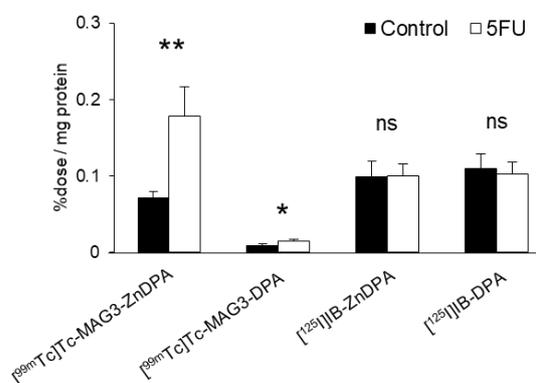


図1：新規細胞死イメージング剤の構造

通常の培地または、細胞死を誘導するため抗がん剤5-FUを含む培地で前処理したがん細胞に、[¹²⁵I]IB-ZnDPAおよび[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPAを曝露させ、5-FU処理による放射性プローブの細胞結合量を比較した。5-FU処理の有無に関わらず、[¹²⁵I]IB-ZnDPAの細胞結合量に有意な差はなかった。[¹²⁵I]IB-ZnDPAは高い脂溶性（log P値：1.19±0.03）により非特異的に細胞に取り込まれ、細胞死を検出できなかったと考えられる。一方、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPAは5-FU処理群で有意に細胞取り込みが増加した（図2）。

ついで、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPAを担がんモデルマウスに投与し、投与2時間後の各組織の放射能分布を表1に示す。前日に5-FU（150 mg/kg）の投与を行った5-FU投与群では、未治療と比較して腫瘍への放射能集積が有意に増加した。さらに放射性プローブの集積が細胞死によるものか確認するため、TUNEL（Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling）染色により腫瘍組織切片の死細胞を計数した。腫瘍への放射能集積を横軸に、TUNEL染色陽性細胞数を縦軸にとり、グラフを作成したところ、有意な正の相関を示し（図3、 $r = 0.658$ 、 $P < 0.05$ ）、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPAは細胞死に依存した集積をすることが示唆された。一方、腫瘍以外の他の組織への取り込みは、5-FU投与群と未治療群の間で有意差はなかったが、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPAは大部分が小腸に分布し、肝臓、大腸でも高い集積を示した。このため、特に腹部の腫瘍においては細胞死検出の妨げになることが予想される。



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$, ns: no significant

図2：放射性プローブの細胞結合量の比較

表 1：放射性プローブの放射能分布 (%ID/g)

組織	未治療群	5-FU 治療群
血液	0.33 ± 0.04	0.29 ± 0.06
肝臓	11.21 ± 5.49	9.02 ± 3.33
腎臓	2.83 ± 0.71	3.76 ± 0.66
小腸	104.73 ± 11.44	104.59 ± 17.15
大腸	2.56 ± 2.70	2.63 ± 1.35
胃†	0.42 ± 0.09	0.56 ± 0.23
筋肉	0.23 ± 0.04	0.25 ± 0.10
腫瘍	0.19 ± 0.02	0.34 ± 0.03

* $p < 0.05$, vs. control

† Data are expressed as % injected dose (%ID).

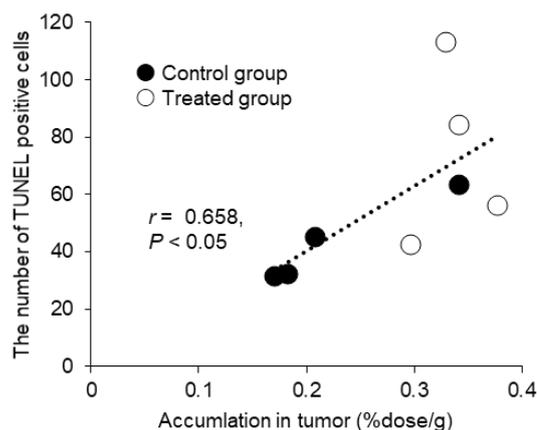


図 3：腫瘍への放射性プローブの集積と TUNEL 染色陽性細胞数の比較

以上、抗がん剤を投与した担がんマウスを用いた検討において、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ が細胞死に特異的に集積し、細胞死検出が可能であること示唆された。一方で、シグナル強度の低さや肝臓や腸管における高集積などイメージング剤として使用する際の弱点が明らかになった。これらの結果から、本研究は抗がん剤の治療効果判定を目的とした放射性プローブを開発する際の足掛かりになると考えられる。

2. 標的 α 線治療を目的とした Bombesin 誘導体の基礎的検討

PET や SPECT は“撮像技術”であったが、同様に RI が医療利用されるものとして、標的アイソトープ治療がある。これは体内に RI そのものや RI で標識された薬剤を投与して行う“放射線治療”である。薬剤がその特性に従って分布し、体内から放射線を照射するため全身に作用し、転移がんの治療に有効である。従来は β 線放出核種が利用されてきたが、近年 α 線放出核種を用いた標的アイソトープ治療、すなわち「標的 α 線治療 (Targeted Alpha Therapy [TAT])」に注目が集まっている。 α 線は β 線よりも約 400-500 倍線エネルギー付与 (LET) が高く、DNA をより強力に切断するため高い治療効果が期待できること、また、 α 線の飛程が 100 μm 以下と細胞数個分程度しかないため周辺の正常組織への照射を最小限にし、副作用の軽減が期待できる。TAT への利用が期待されている核種が数種類あるが、そのうちアスタチン-211 (以下、 ^{211}At) は、標識操作や薬剤が標的組織に到達する時間を確保できる程よい半減期 (7.2 時間) を有すること、安価な ^{209}Bi を原料としてサイクロトロン等の加速器で製造可能であることから魅力であり、既に国内でも ^{211}At 標識化合物の医療応用に向けた取り組みが進められている。

アスタチン自体はヨウ素と類似した化学的性質を有し、甲状腺や胃などに集積する性質を持つため、TAT に利用するには標的組織に ^{211}At を輸送するドラッグデリバリーの手法が不可欠である。ガストリン放出ペプチド受容体 (以下、GRPR) は、前立腺癌細胞の膜には高密度に分布する一方で、通常の前立腺や前立腺肥大症の組織においてはほとんど発現していない。また、前立腺癌患者のリンパ節や骨標本でも発現が確認されている。したがって、GRPR リガンドは前立腺癌細胞に放射性核種を運搬するキャリア分子として適切である。Bombesin (以下、BBN) はヨーロッパスズガエル (*Bombina orientalis*) の皮膚から単離された 14 残基のペプチドで、GRPR リガンドの一つである。GRPR を標的として、BBN 誘導体を使用した放射性核種標識化合物の報告は多数あるが、 ^{211}At をはじめ α 線放出核種標識 BBN 誘導体の報

告はない。本研究では、前立腺癌の TAT を目指して、 ^{211}At を BBN に結合させた ^{211}At 標識 BBN 誘導体の作製および評価を目的とした。

アスタチンには安定同位体がないため、 ^{211}At 標識を行う BBN 誘導体の構造決定のために、アスタチンの代わりに同族元素のヨウ素を使用した BBN 誘導体 (IB-BBN) を用いた (図 4)。リンカー部分が異なる 6 種類の IB-BBN を合成し、GRPR 結合親和性を測定したところ、IB-3 が天然 BBN と同程度の親和性を示した。そこで、IB-3 のヨウ素を ^{211}At で置換した構造を有する ^{211}At AB-3 (図 5) を合成するため、末端にアミノ基を有する BBN 誘導体に、別途調製した *N*-succinimidyl 3- ^{211}At astatobenzoate (^{211}At SAB) を反応させた。HPLC で精製することにより、 ^{211}At AB-3 を放射化学的収率 28.2%、放射化学的純度 90%以上で得た。

^{211}At AB-3 をヒト前立腺癌細胞 PC-3 に曝露させたところ、 ^{211}At AB-3 は時間経過に従って細胞に結合し、結合は 60 分で飽和した (図 6)。また、非特異的な結合を測定するため、 ^{211}At AB-3 と共に 1 μM の BBN を添加した群 (図 6 の nonspecific に相当) では、 ^{211}At AB-3 の細胞への結合が有意に低下し、 ^{211}At AB-3 の細胞への結合は GRPR 特異的であることが示唆された。 ^{211}At AB-3 はマウスの血漿中で経時的に分解されることが明らかとなったが、曝露後 2 分の時点ではほとんど分解していない ($79.4\% \pm 5.2\%$)。また、*in vivo* のマウス血漿中においても、投与後 2 分で ^{211}At AB-3 はほとんど分解しておらず ($82.9\% \pm 4.7\%$)、 ^{211}At AB-3 は分解される前に生体内の腫瘍に集積すると考えられた。

担がんマウスにおける ^{211}At AB-3 の体内放射能分布を表 2 に示す。 ^{211}At AB-3 は投与後 1 時間で腫瘍に集積し ($4.05 \pm 0.73\% \text{ID/g}$)、天然 BBN を同時投与すると (表中の BBN 添加群)、GRPR 発現が高い腫瘍および脾臓での放射能集積が大幅に減少した。このことから、 ^{211}At AB-3 は GRPR 特異的に集積することが示唆された。一方で、他の臓器にも放射能が分布しており、これは ^{211}At AB-3 から遊離した ^{211}At (脱アスタチン) によるものと考えられた。

^{211}At AB-3 は初めて α 線放出核種で標識された BBN 誘導体である。前立腺癌移植マウス

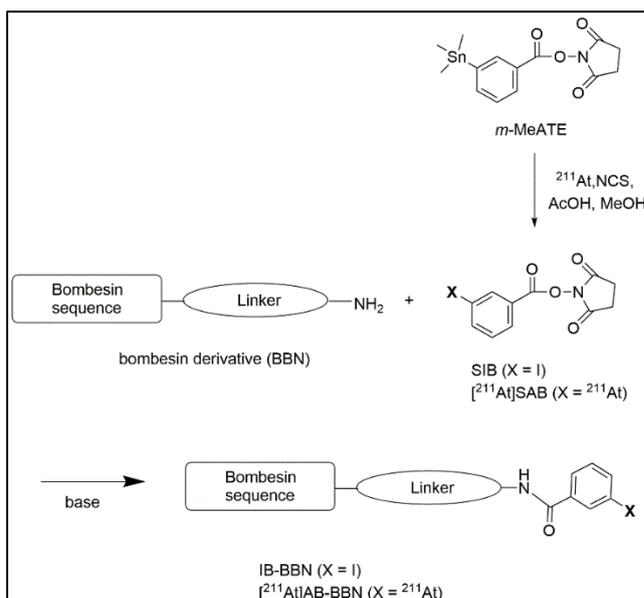


図 4 : IB-BBN および ^{211}At 標識 BBN 誘導体の合成スキーム

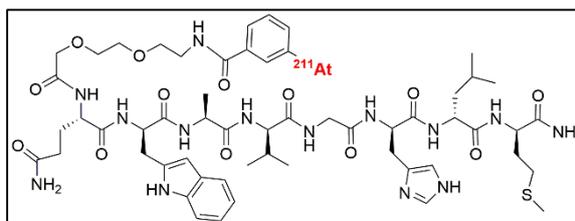


図 5 : ^{211}At AB-3 の構造式

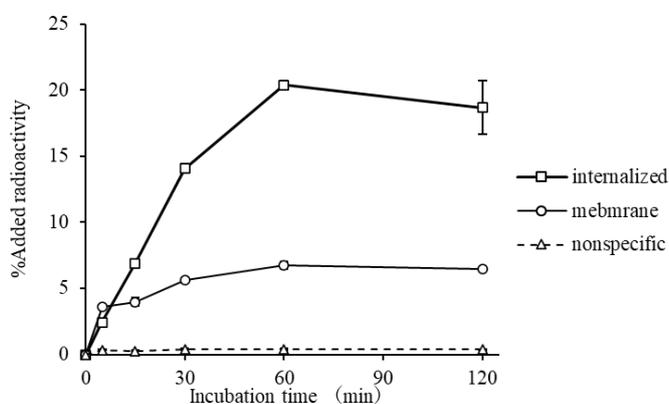


図 6 : ^{211}At AB-3 の前立腺癌細胞への取り込み

を用いた検討において、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は腫瘍に特異的に集積し、腫瘍増殖抑制効果を示す可能性が示唆された。一方で、薬剤の血漿中の不安定性や脱アスタチンの可能性などの課題が明らかになった。これらの結果から、本研究は前立腺の標的アイソトープ治療を目的とした放射性薬剤を開発する際に有益な情報を提供するものと考えられる。

表 2 : $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の体内放射能分布 (%ID/g)

組織	対照群	BBN 添加群
血液	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.2
肺	7.3 ± 1.0	138 ± 12.1*
脾臓	4.0 ± 0.4	2.5 ± 0.5*
胃†	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.3
小腸	27.0 ± 6.2	22.8 ± 2.4
大腸	2.3 ± 0.2	1.8 ± 0.5
腎臓	3.7 ± 0.8	3.8 ± 0.2
肝臓	5.3 ± 0.8	11.2 ± 1.6*
唾液腺	18.9 ± 4.2	14.6 ± 1.3
甲状腺†	0.7 ± 0.1	0.3 ± 0.1*
筋肉	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.0
腫瘍	4.1 ± 0.7	2.6 ± 0.2*

* $p < 0.05$, vs. control

† Data are expressed as % injected dose (%ID).

審査結果の要旨

核医学診断は、イメージングにより生体の機能情報を提供し、個別化医療に貢献できる。また、核医学治療は、治療用核種標識部位をがんへの輸送担体に結合させ、体内に投与することで転移を含めたがん治療が可能である。本研究では、個別化医療の観点から、がんの診断・治療を目的とした放射標識化合物の開発を行うことを目的として、まず、細胞死の際に細胞表面に露出する phosphatidylserine に親和性を示す Zinc-dipicolylamine (Zn-DPA) を使用した細胞死イメージング用の薬剤、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ を合成し、評価した。その結果、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ は、抗がん剤の治療によってがんへの集積が増加し、細胞死を検出できることが示唆された。次に、前立がん細胞膜に高発現するガストリン放出ペプチド受容体 (GRPR) に高親和性を有する Bombesin (BBN) を輸送担体とした核医学治療薬剤として、 α 線放出核種 ^{211}At で標識した BBN 誘導体を合成し、評価した。その結果、 ^{211}At 標識 BBN 誘導体は *in vitro*、*in vivo* において GRPR 特異的に前立腺がん細胞に結合し、取り込まれることが確認された。これら研究は、個別化医療に貢献する核医学診断・治療用プローブ開発に有用な知見を与えるため、本論文が博士 (薬学) に値すると判断した。