

放射標識を用いた診断用薬の開発と臨床への応用

Simplified Synthesis and Clinical Application of Novel Diagnostic Radiopharmaceuticals

平成 28 年度 論文博士申請者 加納 大輔 (Kano, Daisuke)

指導教員 加賀谷 肇

放射性同位元素 (RI) から放出される γ 線を遠隔よりイメージングすることが可能な方法として単一光子放射断層撮影 (SPECT) や陽電子放射断層撮影 (PET) が知られている。これらは、放射性同位元素を用いて合成された薬を体内に投与し、生体臓器の活動、生化学過程の解明、および治療状況の把握を目的とした機能診断技術である。新規の合成開発段階における放射性同位元素標識化合物は厚生労働省の承認を受けてわが国で発売されている放射性医薬品とは異なり、院内製剤として扱われるため、薬剤師の役割が特に重要視されている。分子イメージングの分野では、新規試験化合物の腫瘍への集積とそのイメージング能の有益性が確認されても、衛生的かつ安定な化合物の獲得が困難であるため、臨床応用まで至らない場合が多い。そこで本研究では、新規製剤としての RI 標識低分子二本鎖 RNA (siRNA) の開発とイメージングの基礎的検討を行なった。さらに、細胞膜代謝を反映する [^{11}C]-Choline の臨床応用を目指し、その合成法を改良するとともに組織分布と診断能に関する臨床研究を行った。

1. 放射性同位体標識 siRNA による遺伝子発現イメージングの検討

RNAi は、siRNA が媒介する配列特異的な転写後遺伝子サイレンシング法である。最近、siRNA 医薬品の局所適用剤が臨床試験に入り、また、全身注入用 siRNA 送達システムが次世代 siRNA 医薬品のために広範に研究されている。siRNA 分子に関する分布データは、siRNA 医薬品の開発を

加速させるために特に重要であると考えられる。本研究では、生体内でのlacZ発現の検出のために、lacZを標的とする^{99m}Tc放射標識siRNAの合成法を開発しその有用性を評価するために、二官能性キレート剤であるDTPAを用いてlacZ標的siRNAを^{99m}Tcで放射性標識し（図1）、標識効率と特異的活性を決定した。肝臓でlacZ遺伝子を過剰発現するマウスでSPECT画像撮影を行った。標的とする細菌のlacZ遺伝子はβ-ガラクトシダーゼ酵素に翻訳される。siRNAをDTPA結合ATPでキレート化して標識用配位基を作り、その後、siRNAを^{99m}Tcで標識した。siRNAの3'末端に数個のアデニンを付加するため、Poly(A) Tailing Kitを使用した。本研究では、293T細胞

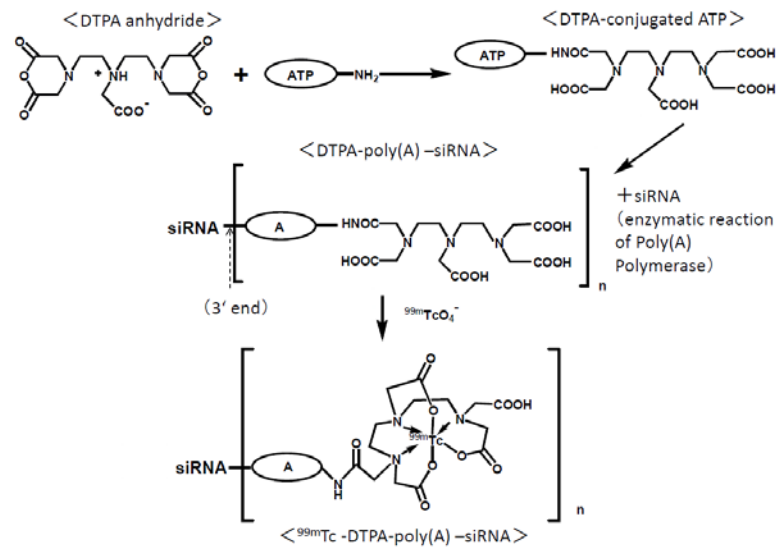


図1: siRNA 標識プロセス

を、pSV-β-ガラクトシダーゼコントロールベクターとlacZ mRNA標的siRNAか陰性コントロールsiRNAのいずれかを用いて共トランスフェクトした。その後、β-gal染色キットを用いて、それらのβ-ガラクトシダーゼの発現レベルを可視化した。結果から、^{99m}Tc-DTPA-ポリ(A)-lacZ mRNA標的siRNAで阻害効果が認められ、DTPAの結合と^{99m}Tcによる放射性標識はsiRNAの生物学的活性に影響しないことが示唆された。^{99m}Tc標識siRNAの21~200 bp画分を用いた場合、^{99m}Tc標識siRNAのノックダウン効率は、非標識siRNAのそれとほぼ変わらなかった。しかし、200 bpより大きな画分を用いた場合にはノックダウン効率は著しく低下した。

200bp未満の^{99m}Tc-DTPA-ポリ(A)-lacZ mRNA標的siRNAを肝臓でlacZを過剰発現したマウスに注射してから30分後のSPECT画像撮影(図2)によって、プローブが主要器官からは急速に排泄されるが、肝臓からは排泄されないことが示された。一方、正常マウスの肝臓には取り込まれなかった。このことは、^{99m}Tc-DTPA-ポリ(A)-siRNAプローブがlacZ mRNAに対して特異的にハイブリダイゼーションすることと、lacZ遺伝子過剰発現細胞に放射性標識siRNA

が特異的に蓄積することを示唆する

1)。以上の結果から、RI標識siRNA

を用いたイメージング検査は、目的遺伝子の過剰発現を特異的に検出することが可能であり、siRNAの開発のみならず悪性腫瘍の診断にも有用で

あると考えられた。

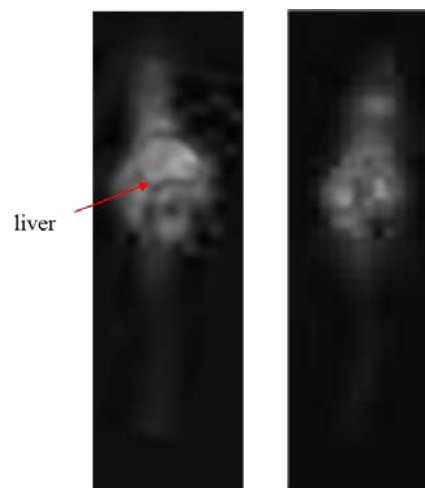


図2: 標識 siRNA 投与 SPECT 画像
左: 肝臓に LacZ 遺伝子を強制発現させたマウス
右: 正常マウス

2. [¹¹C]-Cholineの製剤学的検討

[¹¹C]-Cholineは、脳腫瘍や前立腺がんの診断を目的として開発された

2)。活発な細胞分裂を繰り返すがん細胞では、コリンキナーゼ活性の

亢進によりcholineの細胞内濃度が上昇するため、[¹¹C]-Cholineはがん細胞の細胞膜に特異的に取り込まれる。このような、コリン代謝の

亢進は、脳腫瘍、前立腺がん、乳がんなどで報告されている³⁾。しかし、

[¹¹C]の物理的半減期は20.4分と短く連続合成が難しいため、研究目的での症例報告例はあるものの、臨床的有用性には乏しいとされてきた。そこで申請者は、①[¹¹C]-Cholineの合成法を見直しした最適

条件による新たな合成モジュールの作成、②患者に投与された[¹¹C]-Cholineの体内動態とがんを検出する最適条件の解明、③結腸がん、子宮がんに対する¹⁸FDG-PETと[¹¹C]-Choline-PETの感度と集積率

の比較による臨床への適用の検討を目的として研究を行った。

[¹¹C]標識化は、医療用小型サイクロトロン (Cyclone10/5) により得られた [¹¹C]標識CO₂をヨウ化メチルに変換し、メチル化反応により達成した。

[¹¹C]標識CO₂はN₂・O₂混合ガス(99.2%)にproton (10 μA・h)を照射して得た。Protonの照射時間を検討することにより、最大の

[¹¹C]-CO₂量を与える最適な照射時間を特定した。合成システムは、Choline合成モジュールと精製モジュールから構成した(図3)

[¹¹C]-Choline合成は(図4)に示す手順で無菌的に行った。つぎに、組織分布の検討は、平成17年4月から平成18年10月まで国立がんセンターにおいて事前に文書による同意を得た患者20名を対象に、合成 [¹¹C]-Choline (444MBq)を上腕静脈内に単回急速投与後、経時的に正常各臓器に集積した [¹¹C]-Cholineを測定した。集積の評価にあたっては経時的に得られた画像上にregion of interest (ROI)を取り、吸収線量-時間曲線を作成し最適条件を求めた。データ収集はPET/CT(東芝製Aquiduo、東京)を用い、データ解析はAZE・Workstationで行った。

病変における集積の

代表値は

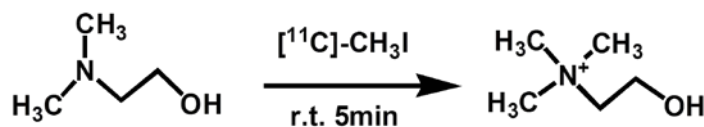


図4: [¹¹C]-Cholineの合成

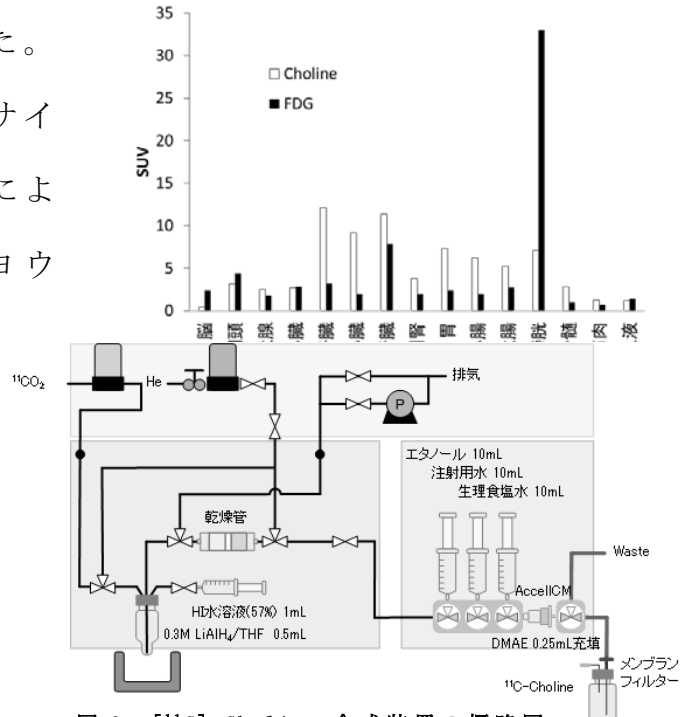


図3: [¹¹C]-Choline合成装置の概略図

Standardized uptake value (SUV)から算出した。組織分布の正確性を期すため、 $[^{11}\text{C}]$ -Choline-PET画像にCT画像を融合してPET/CT画像を作成し、臨床上のゴールドスタンダードである $[^{18}\text{F}]$ -fluorodeoxyglucose (FDG)の分布と比較した。その結果、FDGと異なり、 $[^{11}\text{C}]$ -Cholineは下腹部で集積が少なく(図5)、この領域の悪性腫瘍検出に威力を発揮する可能性が示唆された。

2. 臨床への応用(子宮がん、結 図5: 正常器官におけるCholine・FDG集積の比較

導き出された条件下において、申請者らは、安定な $[^{11}\text{C}]$ -Choline合成システムおよび機能診断画像を用いた臨床研究を開始した。まず、 $[^{11}\text{C}]$ -Choline PETによる進行結腸癌の検出を行った。 $[^{11}\text{C}]$ -Choline PET画像は腹部中央の異常で明瞭な集積を示した(図6)。この集積の最大SUVは6.97であった。集積は内視鏡で確認されたS字結腸癌に対応していることが疑われた。この集積近傍には、もう一つの強い蓄積があり、CT画像により、この蓄積がS字結腸壁の肥大と対応していることなどを明確に示すことができた。PET/CT融合機により、検出能を高める可能性を示唆した⁴⁾。さらに、 $[^{11}\text{C}]$ -Choline-PET/CT融合画像と骨盤のMRIを行った22名の子宮がん患者に関して後ろ向きに評価した。画像は何ら臨床に関する情報を与えていない診断医が主観的に検討し、その結果を用いてPET/CTの病期診断精度を評価した。参照標準は病理検査(n=17)とフォローアップの通常のCT(n=5)とした。子宮頸癌の5名の患者について、シスプラチン点滴とこれに続く放射線治療の前後における $[^{11}\text{C}]$ -Choline PET/CTを実施した ^{11}C 集積値(SUV)を、治療前後に行った磁気共鳴画像(MRI)についての容積測定値と比較した。その結果、PET/CTの解釈に基づき、診断医は8患者についてTステージ(47%)、21患者についてNステージ(96%)、20患者についてMステージ(91%)、15患者についてTNMステージ(88%)が正しくステージ分類された。腫瘍サ

イズ、容積、SUVは、子宮頸癌の5患者で治療後減少した。ピアソン相関検定により、SUVの減少率とMRIによる腫瘍容積の減少率間に有意な相関が見出された⁵⁾。臨床成績より、FDG-PETで診断に問題があった疾患や病状に対して、 $[^{11}\text{C}]$ -Choline PETはより精度の高い機能画像診断が可能であり、がん治療の適正化や化学療法後の正しい治療評価と治療方針の決定にも有用である。

総括

本研究において、siRNA標識化を確立し、siRNAの生体内分布について評価した。さらに、 $[^{11}\text{C}]$ -Cholineの短時間かつ簡便な合成法を確立し、細胞膜代謝を診断する技術として臨床的意義を導くことができた。これらは、今後の医薬品開発における機能診断の発展に寄与する。

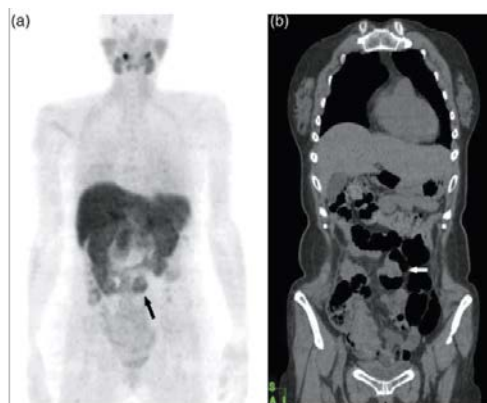


図6：直腸癌患者画像（左：Choline-PET、右：CT）

- 1) Kano D., Nakagami Y., Kurihara H., Hosokawa S., Zenda S., Kusumoto M., Fujii H., Kaneta T., Saito S., Uesawa Y., Kagaya H., *J Drug Target.*, Sep1,1-7(2016).
- 2) Hara T., Kosaka N., Shinoura., *J Nucl Med.*, **38**:842-847(1997).
- 3) Hara T., Inagaki K., Kosaka N., Morita T., *J Nucl Med.*, 41:1507-13(2000).
- 4) Terauchi T., Tateishi U., Maeda T., Kano D., Daisaki H., Moriya Y., Moriyama N., Kakizoe T., *Jpn J Clin Oncol.*, **37**,797-800(2007).
- 5) Sofue K., Tateishi U., Sawada M., Maeda T., Terauchi T., Kano D., Arai Y., Inoue T., Sugimura K., *Ann Nucl Med.*, **23**,235-43(2009).