

要旨：インテグリンは細胞表面に存在する接着レセプター蛋白質であり、血管内皮細胞やある種の癌細胞に発現している。本検討では、腫瘍組織内で強く発現し、血管新生や癌の浸潤、転移における細胞接着において重要であることが知られている $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを標的とし、 $\alpha_v\beta_3$ 特異的結合配列を有するDOTA-c(RGDfK)による腫瘍イメージングと内用照射治療の可能性について検討した。

^{111}In 及び ^{90}Y のDOTA-c(RGDfK)への標識率は非常に高く、HPLC精製により高純度の標識体を得た。 ^{111}In -DOTA-c(RGDfK)及び ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)の担癌マウスにおける体内分布を行った結果、腫瘍への高集積が観察された。DOTA-c(RGDfK)による阻害実験の結果から、この集積は $\alpha_v\beta_3$ に特異的な集積であることが分かった。また、正常組織のクリアランスが腫瘍に比べて早く、腫瘍イメージング剤として有用であることが示された。 ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)による治療実験を行った結果、control群に比べ治療群では腫瘍増殖抑制効果がはっきりと観察された。以上のことから、 $\alpha_v\beta_3$ を標的にした ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)に内用照射治療薬剤としての可能性が見出された。加えて、 ^{111}In -DOTA-c(RGDfK)により $\alpha_v\beta_3$ を対象にした治療に対する鑑別診断が可能であり、さらに、腫瘍の転移能診断薬としての応用が期待される。

I. はじめに

インテグリンは α 鎖と β 鎖の2種類のサブユニットから成るヘテロダイマー蛋白質であり、細胞接着に大きく関与している¹⁾。なかでも、 $\alpha_v\beta_3$ は、腫瘍内の血管内皮細胞で発現が亢進していることから、腫瘍血管新生に重要なインテグリン分子と考えられている。また、 $\alpha_v\beta_3$ は転移性黒色腫細胞などの悪性腫瘍にも発現しており、癌の浸潤、転移における細胞接着においても重要な役割を果たしている²⁾。 $\alpha_v\beta_3$ はアルギニン-グリシン-アスパラギン酸配列(Arg-Gly-Asp配列(RGD配列))を認識し、ビトロネクチン、フェブロンクチンなどの細胞外基質と特異的に結合する³⁾。現在、RDG配列を基本骨格とした抗がん剤などの薬剤開発研究が進められている。本研究では $\alpha_v\beta_3$ に特異的に結合する環状アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-フェニルアラニン-リジン[c(RGDfK)]に着目し⁴⁾、 ^{111}In や ^{90}Y での標識に適したキレート剤であるDOTAを配位したDOTA-c(RGDfK)を合成し、腫瘍イメージングと内用照射治療の可能性に関する検討を行った。

II. ^{111}In -DOTA-c(RGDfK)を利用した体内分布及びイメージング

(1)実験方法

a). ^{111}In -DOTA-c(RGDfK)及び ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)の標識及び精製方法

$^{111}\text{InCl}_3$ (200 μl ,日本メジフィジックス)または $^{90}\text{YCl}_3$ (200 μl ,千代田テクノル)の入ったチューブに3M酢酸緩衝液を40 μl 加えた後、室温で5分間放置した。その後、RI溶液をDOTA-c(RGDfK)(100 μg)に加え、100 $^\circ\text{C}$ で15分間反応した。標識後、HPLCにより精製を行う。HPLCカラムには、Cosmosil 5C18-AR300(4.6 \times 150mm,ナカライテスク)を用い、溶出溶媒には H_2O (1%TEA) : Acetonitile(1%TEA)=9 : 1の混合液を使用し、流速は1 ml/minで行った。

b).担癌マウスの体内分布

移植癌にはヒト卵巣腺癌(SK-OV-3)を用い、マウス(BALB/c nu/nu, ♀, 5週齢)の背部に皮下移植し、7~10日後に実験を行った。 ^{111}In -DOTA-c(RGDfK)又は ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)を投与し、10分、1時間、4時間、24時間、48時間後に心臓採血、各臓器摘出を行い、血

液と摘出した各臓器の湿重量と放射能を測定し、組織集積率及び、重量集積率を算出した。

c). ^{111}In -DOTA-c(RGDfK)によるイメージング

高分解能コリメータを使用して、エネルギーウインドウ、収集時間 10 分、収集マトリクス 32×32 の条件でイメージングを行った。

(2)結果と考察

a). ^{111}In -DOTA-c(RGDfK) 及び ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK) の標識及び精製結果

短時間且つ容易に標識が可能であり、HPLC により高純度の標識体を得た。各標識体の放射化学的収率は 75%以上で放射化学的純度は 99%以上であった。

b). 担癌マウスの体内分布の結果

Fig.1 及び Fig.2 にそれぞれ ^{111}In -DOTA-c(RGDfK)、 ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)による体内分布の結果を示す。 ^{111}In 体では投与後 10 分から 1 時間後をピークに腫瘍で高集積が観察され、その後、緩やかなクリアランスを示した。 ^{90}Y 体では投与後 10 分をピークに緩やかなクリアランスが観察された。遊離の Y は骨に効率的に蓄積することが知られている⁵⁾。今回は実験結果より、骨への集積はそれほど高くなかったので ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)は生体内において安定であると考えられた。

次に、阻害効果を確認するために非標識体の DOTA-c(RGDfK) 100 μg を同時投与した結果を Fig.3、Fig.4 に示す。Control に比べて腫瘍組織における集積が大きく阻害されていることから、腫瘍への高集積は $\alpha_v\beta_3$ に特異的な集積と考えられる。正常組織においても阻害効果は見られたが、これは $\alpha_v\beta_3$ が正常組織内の血管内皮細胞にもある程度発現していることから阻害されたと考えられる。また、血管の存在しない骨にも阻害効果を示したが、破骨細胞に $\alpha_v\beta_3$ が発現しているためである²⁾。一方、DOTA-c(RGDfK)は腎臓の糸球体などから排泄されるため、腎臓の阻害効果が少なくなったと考えられる。

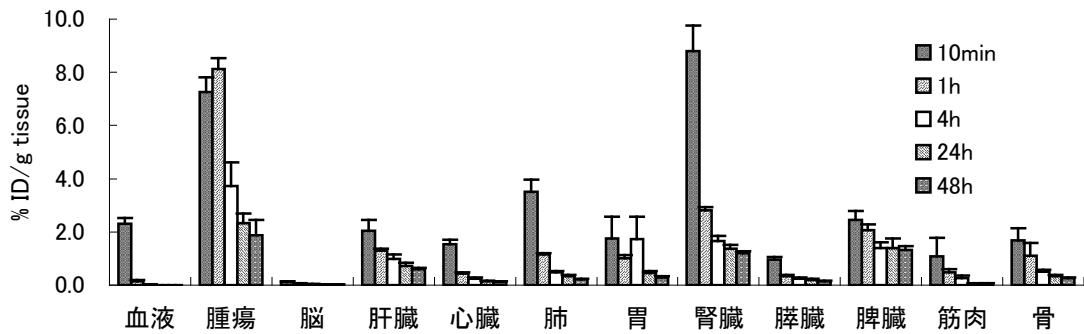


Fig.1 ^{111}In -DOTA-c(RGDfK)の体内分布

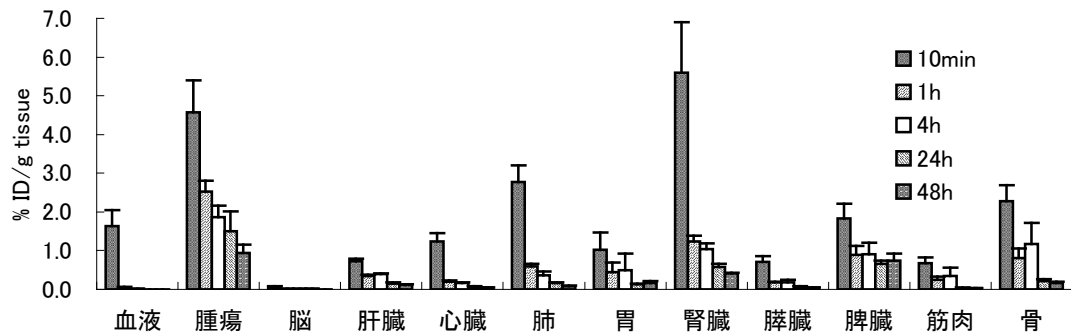


Fig.2 ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)の体内分布

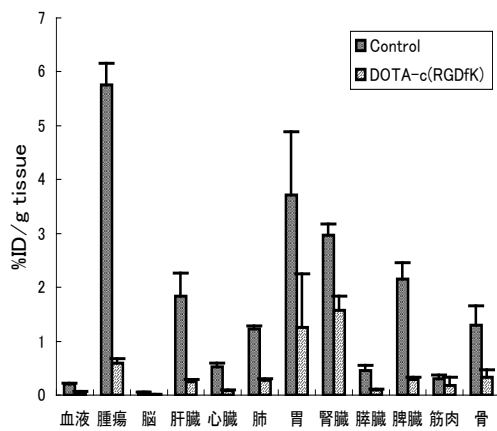


Fig.3 ¹¹¹In 対集積に対する DOTA-c(RGDfK) 同時投与による阻害効果

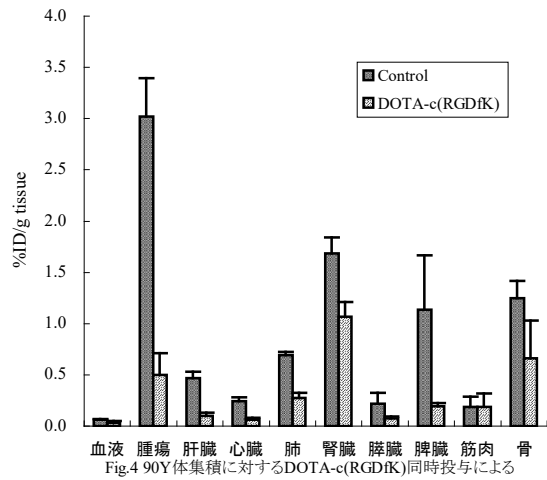


Fig.4 ⁹⁰Y 体集積に対する DOTA-c(RGDfK) 同時投与による阻害効果

体内分布から腫瘍対血液比及び筋肉比を求めた結果、Fig.5、Fig.6 を見てわかるように、それぞれ非常に高い腫瘍対血液比及び筋肉比を示した。これらの特徴から ¹¹¹In-DOTA-c(RGDfK) は、バックグラウンドの消失が早い投与後早期でのイメージングが可能であり、⁹⁰Y-DOTA-c(RGDfK) では、腫瘍への集積が非常に高く、腫瘍対正常組織比が良好であるため、治療への可能性が期待された。

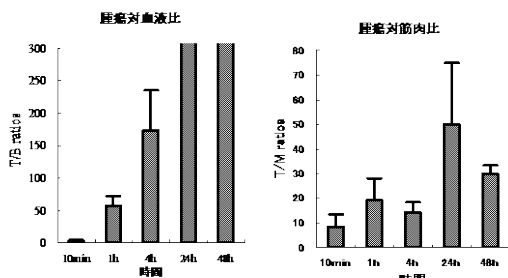


Fig.5 ¹¹¹In-DOTA-c(RGDfK) の腫瘍対正常組織比

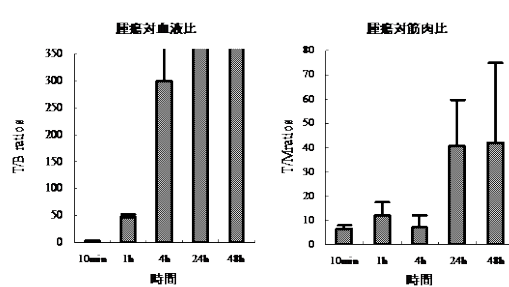
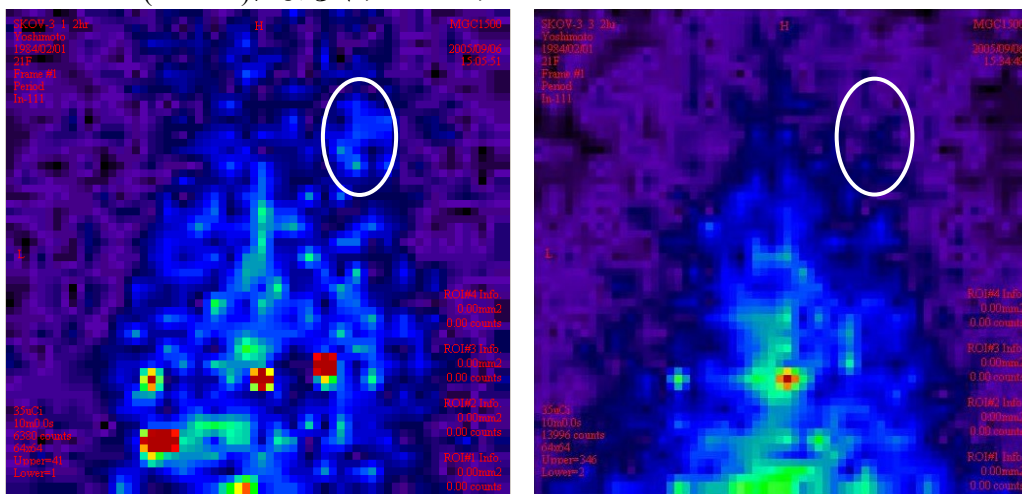


Fig.7 ⁹⁰Y-DOTA-c(RGDfK) の腫瘍対正常組織比

c). ¹¹¹In-DOTA-c(RGDfK) によるイメージング



左の図は阻害剤が投与されていない状態、右の図は阻害剤として DOTA-c(RGDfK) を同時投

与し、投与2時間後に撮影した結果である。左右を比較してわかるように、DOTA-c(RGDfK)が $\alpha_v\beta_3$ インテグリンに対して特異的に集積していることがイメージング上でも確認された。

III. ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)を利用した内用照射治療

(1)実験方法

SK-OV-3を背部皮下移植した担癌マウスを作成し、移植後14日後から治療実験を開始した。Control群として生理食塩水を投与したマウス(5匹)と治療群として6.7MBqの ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)を投与したマウス(5匹)に分け、それぞれ2~3日おきに腫瘍体積と体重の測定を行った。

(2)結果

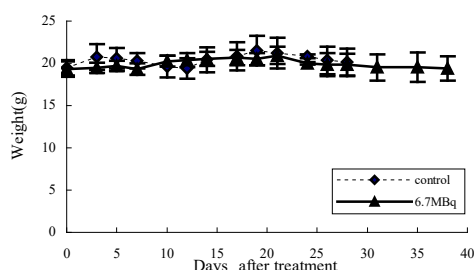


Fig.9 体重の変化

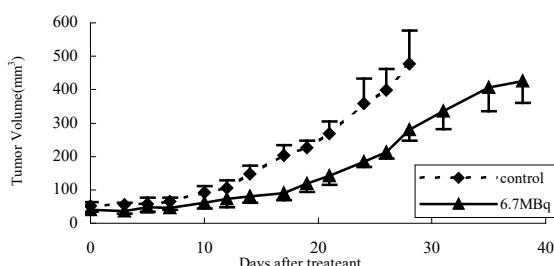


Fig.10 腫瘍体積の変化

治療による大きな体重変化は見られなかった。腫瘍体積の変化では、Control群では7日あたりから大幅な体積増加が観察されたが、治療群では17日あたりから体積増加が観察され、 ^{90}Y -DOTA-c(RGDfK)による腫瘍増殖抑制効果をはっきりと観察された。

IV. 結語

以上のことから、 ^{90}Y -DOYA-c(RGDfK)に内用照射治療薬剤としての可能性が見出された。また、 ^{111}In -DOTA-c(RGDfK)により、 $\alpha_v\beta_3$ を対象にした治療に対する鑑別診断が可能であり、さらに、腫瘍の転移能診断薬としての応用が期待される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、吉本光喜助手、学際科学研究センター小川数馬先生、ご協力くださいました本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

V. 参考文献

- 1) Hynes, R. O. : Integrins : versatility, modulation, signaling in cell adhesion. Cell 69 : 11-25, 1992.
- 2) 室田誠逸 佐藤靖史 : 血管新生研究の新展開. 医薬ジャーナル社, 2000
- 3) 井上実 : インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 受容体を標的とした腫瘍イメージング. (株)第一ラジオアイソトープ研究所
- 4) Marcel L. Janssen, Wim J. Oyen, Ingrid Dijkgraaf, Leon F. Massuger, Cathelijne Frielink, D. Scott Edwards, Milind Rajopadhye, Henk Boonstra, Frans H. Corstens, and Otto C. Boerman. Tumor Targeting with Radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ Intgrin Binding Peptides in a Nude Mouse Model. Cancer Res. 2002, 62, 6146-6151.
- 5) Hyun-soon Chong, Kayhan Garmestani, Dangshe Ma, Diane E. Milenic, Terrish Overstreet, and Martin W. Brechbiel. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Macrocyclic Ligands with

Pendent Donor Groups as Potential Yttrium Chelators for Radioimmunotherapy with Improved Complex Formation Kinetics. *J. Med. Chem.* 2002, 45, 3458-3464.