

氏名 (生年月日) ふるかわ たけのり
古川 武典 (1994年6月19日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬 第227号

学位授与の日付 2023年3月18日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 がんの質的診断を目指した Erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2 標的単光子放射型コンピュータ断層撮影用分子イメージングプローブの開発研究

論文審査委員 (主査) 教授 安井 裕之

(副査) 教授 山本 昌

(副査) 教授 武上 茂彦

論文内容の要旨

序章

がん細胞において、糖やアミノ酸の代謝が亢進し、さらに特定の酵素や受容体が過剰に発現していることが知られている。これらの特性を利用した診断用の放射性医薬品の代表例が ^{18}F -フルオロデオキシグルコースであるが、炎症部位や排泄経路などでの非特異的な集積が問題となっており、がんの特異性の高い新たなイメージングプローブの開発が求められている。そこで著者は、様々な標的分子があるなかで、がん細胞に高発現しており、がんの進展と共にその発現量も増えることが報告されている Erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2 (EphA2) に着目した研究を行うこととした。EphA2 は多くの固形がんで発現しており、その発現量とがんの悪性度との関連性が多数報告されている。さらに、治療薬の標的分子としても注目されており、低分子化合物や抗体などの臨床治験が進められている。一方で、イメージングの領域においてはペプチドや抗体を母体としたイメージングプローブが数例報告されているが、十分な性能を満たしておらず改善の余地が指摘されている。そこで、著者はがん細胞に発現している EphA2 を標的とした、新たなイメージングプローブの開発を目的に研究を行った。なお、本研究においては臨床的な汎用性を考慮し、単光子放射型コンピュータ断層撮影 (SPECT) 用のイメージングプローブの開発を実施した。

第1章 EphA2 の発現量を反映した抗 EphA2 抗体 SPECT イメージングプローブの開発

EphA2 の発現量の変化を捉えることが可能なイメージングプローブを開発するにあたって、SPECT 核種である In-111 で標識した既報の DS-8895a (^{111}In -CHX-A"-DTPA-DS-8895a) の体内分布実験の結果を精査したところ、抗体を用いた EphA2 イメージングの可能性は十分あると判断した。しかしながら、 ^{111}In -CHX-A"-DTPA-DS-8895a は血液からのクリアランスが低く、明瞭な画像が得られるまでに投与より7日間の時間を要するなど改善点も見られた。そこで、著者は共同研究者が保有する抗 EphA2 抗体のライブラリーからスクリーニングを実施し、イメージングに適した抗体である EphA2-230-1 を見出した。In-111 で標識した EphA2-230-1 (^{111}In]In-BnDTPA-EphA2-230-1) を用いて、がん細胞の EphA2 の

発現量とがん細胞への標識抗体の集積量の比較、および EphA2 が発現しているがん細胞移植モデルマウスを用いた体内分布評価を行うこととした。まず、悪性度の異なる種々のがん細胞に EphA2 が発現していることを実験的に確認した。次に、これらの細胞の中から EphA2 の発現量の異なる 2 種類の細胞(U87MG、HT1080) を用いて標識抗体の結合能を評価した結果、EphA2 発現量を反映して標識抗体が細胞に結合することを確認した。さらに、比較的 EphA2 の発現量が少ない細胞である U87MG 細胞移植モデルマウスを用いた体内分布実験においても腫瘍に標識抗体が高く集積し (投与 3 日後で 14.6 ± 3.2 Percent Injection Dose (%ID)/g tumor)、SPECT を用いた撮像においても投与 3 日後で腫瘍の明瞭な可視化を達成した。また、体内分布実験の結果から腫瘍対血液比を算出し、 $^{111}\text{In-CHX-A}^{\text{TM}}\text{-DTPA-DS-8895a}$ の報告と比較したところ、 $^{111}\text{In}[\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}]$ の方が優れている結果となった。すなわち、 $^{111}\text{In-CHX-A}^{\text{TM}}\text{-DTPA-DS-8895a}$ は投与 7 日後での比が 0.94 であるのに対して $^{111}\text{In}[\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}]$ は投与 3 日後での比が 1.7 を達成した。これらの結果は、 $^{111}\text{In}[\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}]$ の EphA2 発現量を反映した新たなイメージングプローブとしての有用性を示唆している。

第 2 章 EphA2 の ATP 結合部位を標的とした低分子 SPECT イメージングプローブの開発

次に、細胞内にある EphA2 のキナーゼ部位に存在する ATP 結合部位を標的としたイメージングプローブの開発を行った。化合物の設計にあたり、標的が分子内であることから細胞膜透過性を考慮し、低分子化合物を母体を選択した。母体となる化合物のスクリーニングを行い、EphA2 への阻害活性が報告されている ALW-II-41-27 (Fig.1A) を選択した。まず、ドッキングシミュレーションを行い、ALW-II-41-27 と EphA2 との相互作用部位を特定した。計算結果に基づいて EphA2 との相互作用に影響の少ない化学修飾を ALW-II-41-27 の構造に施し、放射性ヨウ素が導入可能な新規化合物を複数設計した。そこで再度、設計した化合物群の精密なドッキングシミュレーションを行い、最終的に、*N*-(5-(((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)methyl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)-5-iodonicotinamide (ETB, Fig.1B) を見出した。次に ETB を合成し、EphA2 のキナーゼ活性を評価したところ、ETB が ALW-II-41-27 と同等の阻害活性 (IC_{50} 値は ALW-II-41-27 : 67.2 ± 18.9 nM、ETB : 90.2 ± 18.9 nM) を有することを明らかにした。さらに、I-125 および SPECT 核種である I-123 を用いて放射性標識を行った結果、高純度で目的物を得ることに成功した。 $^{125}\text{I}[\text{ETB}]$ は U87MG 細胞に取り込まれ、U87MG 細胞移植モデルマウスを用いた体内分布実験で腫瘍に集積することを確認し (投与 4 時間後で 2.2 ± 0.3 %ID/g tumor)、腫瘍対血液比も良好であった (投与 4 時間後で 11.7)。最後に、 $^{123}\text{I}[\text{ETB}]$ を用いた SPECT 撮像を行ったところ、腫瘍の明瞭な可視化に成功した。以上より、 $^{123}\text{I}[\text{ETB}]$ が EphA2 のイメージングプローブとして基礎的性質を有することを明らかとした。

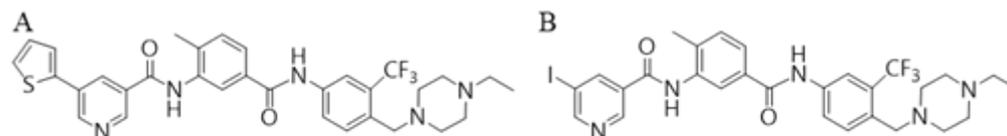


Figure 1 Chemical structures of ALW-II-41-27 (A) and ETB (B)

総括

抗体を用いた研究では、 $^{111}\text{In}[\text{In-BnDTPA-EphA2-230-1}]$ が EphA2 発現量を反映したイメージングプローブになり得ることを明らかとした。続く低分子化合物の研究では、 $^{123}\text{I}[\text{ETB}]$ がこれまで実現されていない EphA2 の ATP 結合部位を標的としたイメージングプローブになり得ることを明らかとした。以上の結果は、EphA2 ががんの質的診断に応用可能である知見も示唆している。また、本研究成果は

イメージングプローブの開発を含めた創薬研究にも貴重な知見を与えるものと期待している。

審査の結果の要旨

緒言

がん細胞においては糖やアミノ酸の代謝が亢進し、特定の酵素や受容体が過剰に発現している。これらの特性を利用した診断用放射性医薬品が¹⁸F-フルオロデオキシグルコースである。しかし、炎症部位や排泄経路への非特異的な集積が問題であり、がんにより特異性の高いイメージングプローブの開発が求められている。古川氏は、様々な標的分子の中で、がん細胞に高発現しており、がんの進展と共にその発現量も増えることが報告されている Erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2 (EphA2) に着目した研究を行った。EphA2 は多くの固形がんで発現しており、その発現量とがんの悪性度との関連性が多数報告されている。しかし、ペプチドや抗体を母体とした既存のイメージングプローブの報告例はあるが、十分な性能を満たしていない。そこで、古川氏は、EphA2 を標的とした、新たなイメージングプローブの開発を目的に研究を行った。

審査結果の要旨

第1章 EphA2 の発現量を反映した抗 EphA2 抗体イメージングプローブの開発

抗 EphA2 抗体である EphA2-230-1 を用いたイメージングプローブの開発を行った。EphA2-230-1 に DTPA を導入し、その後に In-111 を用いて標識を行った。^{[111In]In-BnDTPA-EphA2-230-1} は、がん細胞へ EphA2 特異的に取り込まれ、プローブの集積量と EphA2 の発現量は相関していた。U87MG 細胞移植モデルマウスを用いた実験では腫瘍に^{[111In]In-BnDTPA-EphA2-230-1} が集積し、かつ腫瘍対血液比が、既報の抗 EphA2 抗体イメージングプローブである^{111In-CHX-A''-DTPA-DS-8895a} よりも優れている結果が得られた。また、SPECT/CT 撮像の結果では腫瘍の明瞭な可視化を達成できた。以上の結果から、^{[111In]In-BnDTPA-EphA2-230-1} は EphA2 の発現量を反映したイメージングプローブとしての有用性が示唆された。

第2章 EphA2 の ATP 結合部位を標的とした低分子イメージングプローブの開発

EphA2 のキナーゼドメインに存在する ATP 結合部位を標的とする低分子イメージングプローブの開発を行った。EphA2 とリード化合物である ALW-II-41-27 のドッキングシミュレーションから、EphA2 との相互作用部位を推定し、その結果を基にして低分子化合物を設計して新規化合物である ETB を見出した。EphA2 のキナーゼ阻害活性評価から、ETB は ALW-II-41-27 と同等の阻害活性を持ち、ドッキングシミュレーションの結果とキナーゼ阻害活性評価の結果に高い相関性が見られたことから、今回のドッキングシミュレーションのテンプレートは今後のプローブ合成にも応用できる可能性が示唆された。

続いて ETB の高純度の放射性ヨウ素標識を行い、^{[123I]IETB} は血液中で安定であり、^{[125I]IETB} は U87MG 細胞に取り込まれ、かつ阻害剤である ALW-II-41-27 により有意に取り込み量が減少したことから、^{[125I]IETB} は U87MG 細胞において EphA2 のキナーゼドメインに存在する ATP 結合部位を認識している可能性が示唆された。U87MG 細胞移植モデルマウスを用いた実験では、^{[125I]IETB} が腫瘍に集積し、腫瘍対血液比及び腫瘍対筋肉比は良好であった。また、^{[123I]IETB} を用いた SPECT/CT 撮像の結果では、腫瘍の明瞭な可視化に成功した。以上の結果から、^{[123I]IETB} は EphA2 の ATP 結合部位を

標的とするイメージングプローブとして基礎的な性質を有していることが示唆された。

審査の結論

古川氏の行った研究内容と成果は、EphA2 はがん細胞の性状を表す指標として、今後、がんの質的診断に応用可能であることを定量的に示した。加えて、プローブとして用いた抗体のヒト化に向けた検討や、ETB の EphA2 への結合選択性に関する検討は必要であるものの、本研究における実験結果は今後のプローブの開発を含めた創薬研究に応用できるものと判断される。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。