

癌細胞膜アビジン発現とスカベンジャー受容体内在化による特異的普遍的内照射法の開発

著者	絹谷 清剛
著者別表示	Kinuya Seigo
雑誌名	平成18(2006)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2004-2006
ページ	8p.
発行年	2007-04
URL	http://doi.org/10.24517/00051067



癌細胞膜アビジン発現とスカベンジャー受容体内在化に
よる特異的普遍的内照射法の開発

1 6 5 9 1 1 9 4

平成16年度～平成18年度科学研究補助金
(基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

平成19年4月

研究代表者：絹谷清剛

(金沢大学大学院医学系研究科教授)

金沢大学附属図書館



0800-04427-4

はしがき

(1) 近年、発癌の背景にある遺伝子異常・分子機構の解明から、遺伝子治療、分子標的治療の開発等多岐にわたり研究が強力に進められている。その結果、近い将来癌治療が現在行われている化学療法のような画一化された非特異的治療から、高度の特異性を有する治療に移行すると予測される。癌組織に特異的な放射線治療法の一つとして、抗体、ペプチド、アンチセンスなどの標的分子を放射性核種で標識した放射性医薬品を用いた内照射療法（内用療法）が挙げられる。標的分子としてモノクローナル抗体を用いた放射免疫療法の効果はB細胞リンパ腫において広く認知され、米国ではすでに保健診療薬として使用されている。一方、固形癌に対する内照射療法の効果は十分とは言えないのが現状であり、種々の効果増感法が検討されている。生体に関する反応の中で最も強固な特異的結合（解離定数 10^{-15} M⁻¹）を有するアビジン・ビオチンシステムを利用する、いわゆるpre-targeting放射免疫療法（例えば、放射能未標識のアビジン結合抗体を先行投与し、腫瘍集積を待った後に放射能標識ビオチンを投与し腫瘍を照射する）はその一つであり治療効果改善が示されている。しかし抗体を用いた内照射療法では、抗体の交差反応等の理由で標識抗体が正常組織にも高率に分布してしまい副作用につながる恐れがあることに加え、各々の癌の種類に対し個々の抗体の作成・精製が必須であり煩雑さは否めない。また、抗体は主にマウス由来であることからアレルギー反応出現の恐れもある。そこでアビジンを腫瘍細胞に発現させることが可能であれば、抗体利用に伴う種々の欠点を解消可能である。この目的のために、アビジン・スカベンジャー受容体複合体タンパク（スカビジンと命名）遺伝子を癌細胞に導入することを考えた。それにより、細胞膜上に発現したアビジンに対して標識ビオチンを特異的かつ高い親和性でターゲティングした後に、スカベンジャー受容体を介したエンドサイトーシスに基づく結合標識ビオチンの細胞内内在化により細胞内に放射性核種を移行させて、DNA障害を高度に発現させることで効果的に癌細胞死をもたらすことが可能となる。さらには、例えばビオチンと¹²⁵I IUDRのような核酸類似体・オージェ電子放出核種との複合体やα線核種との標識体をターゲティングに用いることで高LET (linear energy transfer)線により効果的にDNA照射可能である。この方法により、癌ごとに抗体あるいは他の種類のリガンドを精製する必要がなくなるため、従来の内照射療法と異なり、単一の放射性薬剤を準備さえすれば特異性を保持したまま癌一般に普遍的に応用可能な画期的な内照射療法が実現する。またこの方法では、小分子量物質であるビオチンの特性故に、アビジンに結合しない画分は速やかに対外排泄されるため、副作用の面でも通常の放射免疫療法と比べ有利である。一方、治療に際し薬剤が標的に効果的に集積していることを正確に診断することなしに手探りで行うことは、治療可否・効果判定の面で不備と言わざるをえない。こ

の目的には、生体内からの微小なシグナルを体外計測する技術が必須であるが、高い感度を有するシングルホトンCTやポジトロンCT等の核医学画像により達成可能である。

内照射療法の最大の利点は、通常の外照射療法が局所治療であるのに対して全身療法であり、多発性転移に対処可能な点にある。現在行われている内照射療法は、認可薬あるいは研究過程にある薬剤に関わらず、悪性リンパ種、肺癌、乳癌等々の単一の癌種に対する標識リガンドを開発することにより達成しようとするものが大多数である。しかし、多岐の種類にわたる癌を対象として、個々に高度の特異的と親和性を併せ持った標識リガンドを各々開発することは容易ではない。本研究のめざすところは、癌一般に対する普遍的治療法の開発であり、普遍性と特異性の一見相反する重要な2特性を併せ持った放射線内照射治療となりうる点において、非常にユニークかつ有用性の高いものであると考える。

本研究で検討予定の内照射療法に関する研究は、雑誌論文報告・学会報告ともに国内・国外で現時点まで皆無である。アビジン・スカベンジャー受容体複合体遺伝子の導入に関する報告はあるが、これを基にした治療効果の論文発表は非放射性物質によるものを含めまだ見られず、研究の極々端緒にある領域と考えて間違いない。また、非放射性物質によるアプローチと異なり、放射性医薬品によるアプローチでは薬剤の病巣集積を画像で確認可能であり、診療上大きなメリットとなる点においても優位である。

融合タンパク質を構築するためには、それぞれの遺伝子をクローニングしてくる必要がある。まず、ヒトスカベンジャー受容体(hSR-A-II)のクローニングを行った。THP-1細胞(ヒト単球性白血病細胞)に12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acet ateを負荷し、マクロファージ様に分化させた後に、市販のキットを用い、トータルRNAの抽出を行った。次に、hSR-A-IIを認識するプライマーを用いてPCRによりhSR-A-II cDNAを増幅した。PCR産物のアガロース電気泳動を行い、予想されるバンドを切り出し、精製キットを用いてPCR産物の精製を行った。このPCR産物を用い、StrataClone PCR cloning Kitを使って、hSR-A-II cDNAのクローニングを行った。いくつかのシングルコロニーを選択し、制限酵素処理を行った後にPCR産物の導入の確認を行った。導入が確認されたコロニーに対し、シーケンス反応を行い、hSR-A-II cDNAであることを確認した。アビジンのクローニングは、ニワトリの卵管からトータルRNAを抽出した後、hSR-A-IIのクローニングと同様の方法で行い、シーケンスにより確認を行い、アビジンcDNAを得た。アビジンcDNAをhSR-A-II cDNAと融合させる部位については、hSR-A-IIのエンドサイトーシス機能を保持するために、hSR-A-IIのコラーゲン様ドメインとN結合糖鎖領域の間にアビジンcDNAを導入することを計画した。そのためには、hSR-A-II cDNAの813番目の塩基をチミンからシトシンに変換する必要がある。この点変異によりこの部分のアミン酸が変化することはなく、hSR-A-IIの機能を保持できると考えている。

(2) 内照射療法の効果は、そのターゲティングメカニズムの組織選択性・特異性が優れたものであったとしても、用いる放射性核種に大きく影響される。アビジン・スカビジンを利用した特異的内用療法においても核種選択の重要性に変わりはない。そこで、我々の研究室で従来から検討している放射性核種標識抗大腸癌モノクローナル抗体とヒト大腸癌担癌モデルを用いて、核種選択に関わる検討を行った。

現在最も頻用されているβ線核種は¹³¹Iである。¹³¹Iは製造コストが低く、標識操作も簡便である。しかし、物理学的半減期が必要以上に長く(8日)、高エネルギーのγ線(364 keV)を放出するため、投与を受けた患者に腫瘍線量にほとんど寄与しない無用の被曝を与えてしまうこと、放射線防御が困難であり放射線管理上やっかいであること等の欠点を有している。一方、金属性核種である¹⁸⁶Reは、物理学的半減期が3.7日と腫瘍への放射性担体分布に好都合である長さである。また、γカメラによる撮像に適したエネルギーのγ線(137 KeV)を放出する。以上の背景から、実験的転移モデルにおいて¹⁸⁶Re標識抗体による放射免疫療法と¹³¹I標識交代のそれを比較した。また、α線放出核種を用いた骨転移治療の検討をあわせ行った。

(3) 癌治療における治療前効果予測は、近い将来可能となるであろういわゆるテーラーメイド医療に深く関わっている問題である。内照射療法の施行前効果予測もその例に漏れない。腫瘍核医学の領域で癌の画像診断に用いられている^{99m}Tc-sestamibi、^{99m}Tc-tetrofosmin、²⁰¹Tl等の放射性医薬品の集積状態が、治療に対する腫瘍の反応を反映するものであることが報告されている。本研究では、^{99m}Tc-sestamibiなどによるシンチグラフィ効果予測に関わる因子を検討した。

研究組織：

研究代表者： 絹谷清剛（金沢大学大学院医学系研究科教授）

研究分担者： 川井恵一（金沢大学大学院医学系研究科教授）

鷺山幸信（金沢大学大学院医学系研究科助手）

吉本光喜（金沢大学大学院医学系研究科助手）

越田 潔（金沢大学大学院医学系研究科元助教授、平成16年度分担）ⁱ

研究協力者： 横山邦彦（金沢大学医学部付属病院元講師）

道岸隆敏（金沢大学大学院医学系研究科助教授）

利波紀久（金沢大学大学院医学系研究科前教授）

渡辺直人（富山医科薬科大学付属病院助教授）

秀毛範至（旭川医科大学医学部助教授）

白 景明（金沢大学大学院医学系研究科院生）

森 厚文（金沢大学学際科学実験センター教授）

柴 和弘（金沢大学学際科学実験センター助教授）

交付決定額

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	1300	0	1300
平成17年度	1200	0	1200
平成18年度	1100	0	1100
総計	3600	0	3600

研究発表

(1) 学会誌等

1. Bai J, Yokoyama K, Kinuya S, Shiba K, Matsushita R, Nomura M, Michigishi T, Tonami N. In vitro detection of *mdr1* mRNA in murine leukemia cells with ^{111}In -labeled oligonucleotide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004 Nov;31(11):1523-9.
2. Washiyama K, Amano R, Sasaki J, Kinuya S, Tonami N, Shiokawa Y, Mitsugashira T. ^{227}Th -EDTMP: a potential therapeutic agent for bone metastasis. *Nucl Med Biol*. 2004 Oct;31(7):901-8.
3. Kinuya S, Yokoyama K, Izumo M, Sorita T, Obata T, Mori H, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Michigishi T, Tonami N. Locoregional radioimmunotherapy with ^{186}Re -labeled monoclonal antibody in treating small peritoneal carcinomatosis of colon cancer in mice in comparison with ^{131}I -counterpart. *Cancer Lett*. 2005 Feb 28;219(1):41-8.
4. Kinuya S, Yokoyama K, Fukuoka M, Mori H, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Michigishi T, Tonami N. Anti-angiogenic therapy and chemotherapy affect $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HL91 accumulation differently in tumour xenografts. *Nucl Med Commun*. 2005 Dec;26(12):1067-73.
5. Bai J, Kinuya S, Shiba K, Michigishi T, Tonami N. Binding with serum components favorably affects cellular uptake of ^{111}In -oligonucleotide in a leukemia cell line. *Cancer Biother Radiopharm*. 2006 Feb;21(1):34-40.
6. Kinuya S, Bai J, Shiba K, Yokoyama K, Mori H, Fukuoka M, Watanabe N, Shuke N, Michigishi T, Tonami N. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi to monitor treatment with antisense oligodeoxynucleotide complementary to MRP mRNA in human breast cancer cells. *Ann Nucl Med*. 2006 Jan;20(1):29-34.
7. Kinuya S, Bai J, Yokoyama K, Shiba K, Mori H, Fukuoka M, Watanabe N, Shuke N, Michigishi T, Tonami N. Changes of Tc-99m sestamibi uptake in P-glycoprotein expressing leukemia cells treated in vivo with antisense oligodeoxynucleotide complementary to *mdr1* mRNA. *World J Nucl Med*. 2006 April;5(2):115-118.
8. Kinuya S, Izumo M, Sorita T, Obata T, Hiramatsu T, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Michigishi N, Tonami N. Eradication of colon cancer cells before tumour formation in the peritoneal cavity of mice treated with intraperitoneal Re-186 radioimmunotherapy. *World J Nucl Med*. July;5(3):196-200.
9. Yoshimoto M, Kinuya S, Kawashima A, Nishii R, Yokoyama K, Kawai K. Radioiodinated VEGF to image tumor angiogenesis in a LS180 tumor xenograft model. *Nucl Med Biol*. 2006 Nov;33(8):963-9.

10. Kinuya S, Yokoyama K, Fukuoka M, Hiramatsu T, Mori H, Shiba K, Watanabe N, Shuke N, Michigishi T, Tonami N. Intraperitoneal radioimmunotherapy to treat the early phase of peritoneal dissemination of human colon cancer cells in a murine model. Nucl Med Commun. 2007 Feb;28(2):129-33.
11. Ogawa K, Mukai T, Asano D, Kawashima H, Kinuya S, Shiba K, Hashimoto K, Mori H, Saji H. Therapeutic effects of a ^{186}Re -complex-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain in an animal model. J Nucl Med. 2007 Jan;48(1):122-7.

(2) 口頭発表

1. Kinuya S, Yokoyama K, Bai J, Michigishi T, Tonami N. Changes of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HL91 accumulation in tumor xenografts during antiangiogenic therapy. The Second Japan-Korea-China Conference on Nuclear Medicine. 2004.5.13.
2. Kinuya S, Yokoyama K, Michigishi T, Tonami N. Locoregional radioimmunotherapy in a peritoneal carcinomatosis model of colon cancer: comparison between ^{186}Re -antibody and ^{131}I -antibody at maximum tolerated doses. 51th annual meeting of the Society of Nuclear Medicine. 2004.6.21.
3. Kinuya S, Yokoyama K, Bai J, Michigishi T, Tonami N, Izumo M, Sorita T, Obata T. Locoregional radioimmunotherapy with ^{186}Re -labeled monoclonal antibody in treating peritoneal carcinomatosis of colon cancer in mice in comparison with ^{131}I -counterpart. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2004.9.4.
4. Kinuya S, Yokoyama K, Bai J, Michigishi T, Tonami N. Influence of antiangiogenic therapy on accumulation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HL91 in tumor xenografts. Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine. 2004.9.4.
5. Kinuya S, Yokoyama K, Michigishi T, Tonami N. Radioimmunotherapy to treat small metastatic lesions: experimental results in a liver metastasis model and a peritoneal dissemination model of colon cancer in mice. Pacificchem 2005.12.15
6. Kinuya S, Bai J, Yokoyama K, Michigishi T, Tonami N. Intraperitoneal administration of ^{186}Re -A7 colorectal monoclonal antibody to treat liver metastases; comparison with intravenous administration. 52nd annual

meeting of the Society of Nuclear Medicine. 2005.6.21.

7. Kinuya S, Yokoyama K, Michigishi T, Tonami N. Radioimmunotherapy as an adjuvant treatment in high risk of peritoneal dissemination of colon cancer: experimental results in an animal model. 53rd annual meeting of the Society of Nuclear Medicine. 2006.6.16.