

# 私立大学研究ブランディング事業 成果報告書

学校法人番号	261006	学校法人名	京都薬科大学		
大学名	京都薬科大学				
事業名	受容体特異的画像化技術を基盤とするがん放射線内用療法 (radio-theranostics) 研究拠点の形成				
申請タイプ	タイプB	支援期間	3年	収容定員	2160人
参画組織	薬学部・放射性同位元素研究センター・創薬科学フロンティア研究センター・共同利用機器センター				
事業概要	<p>本事業の目的は、京都薬科大学が持つ優れた研究基盤をもとに放射線内用療法に基づく radio-theranostics [therapeutics (治療) + diagnostics (診断)] 研究拠点を構築・機能させ、本学の次世代がん研究のブランドとすることである。本事業成果を突破口として、「先端的な研究に支えられた薬学のプロフェッショナルの育成を追究する大学」としての国内“京薬ブランド”を世界に発信する。</p>				
事業目的	<p>本事業の目的は、アカデミアとしての京都薬科大学が持つ研究基盤を活用することで放射線内用療法に基づく radio-theranostics [theranostics=therapeutics (治療) + diagnostics (診断)] 研究拠点を構築し、京都薬科大学の次世代がん研究のブランドとする事である。本事業を基盤とする先端的な研究で得られる成果を世界に向けて発信し、次世代型放射線内用療法を提案する。これにより、「先端的な研究に支えられた薬学のプロフェッショナルの育成を追究する大学」として認知されている国内“京薬ブランド”を世界に発信し国際的連携研究体制を構築する。</p>				

# 私立大学研究ブランディング事業 成果報告書

学校法人番号	261006	学校法人名	京都薬科大学
大学名	京都薬科大学		
事業名	受容体特異的画像化技術を基盤とするがん放射線内用療法 (radio-theranostics) 研究拠点の形成		
	<p>本事業では、受容体特異的画像化研究進展に必須の先端的研究基盤整備と個別標的受容体に関する研究を並行して実施した。以下にまず先端的研究推進に必要な共通研究基盤形成について述べ、ついで個別受容体研究の進展について述べる。</p> <p>1. セラノスティクス研究の推進に向けた先端的イメージング技術の基盤形成</p> <p>生命活動に関わる様々な分子の動態や相互作用を同時に可視化・追跡できる技術は、生体から抽出できる情報量を飛躍的に増大させる。このような画像化手法として現在主に利用されているのは、光学的手法と放射線を用いる手法である。このうち、放射線を利用した画像化手法は感度や特異性、治療への直接的応用などの様々な点で大きな利点を有している。しかし、放射線化学を専門としない研究者がストレスなく利用できる施設や研究手法の提供が十分とは言えず、放射線利用を基盤とする診断と治療の融合 (radio-theranostics) 研究が十分に普及しているとはいえないのが現状である。このような観点から本事業では、臨床施設を持たない大学での利用が容易な先端的画像化装置であるSPECT/CT装置 (ベルギーMolecubes社製<math>\gamma</math>-CUBE, X-CUBE) を導入し、その活用によるradio-theranostics研究の多様な展開を図ることを目的とした。あわせて、国際共同研究 (ドイツ、ベルギーなど) に基づく新規プローブの開発、撮像条件の最適化、<math>\gamma</math>-cube専用の高エネルギー用コリメータの開発や、国内共同研究による次世代高感度ガンマ線3Dカメラ (Electron-tracking compton gamma-ray camera; ETCC) の開発を進めている。</p> <p>基盤的手法確立の最初の試みとして、本事業推進のために導入した小動物用SPECT装置による多核種同時撮像を行った。マウス (同一個体) に骨イメージング剤のヒドロキシメチレンホスホン酸テクネチウム (<math>^{99m}\text{Tc}</math>) (<math>^{99m}\text{Tc}</math>-HMDP) と心筋血流イメージング剤の塩化タリウム (<math>^{201}\text{Tl}</math>) (<math>^{201}\text{Tl}</math> TlCl) を静脈内投与し、Tc-99mとTl-201に該当するエネルギーピークを個別に認識するよう設定した上で画像再構成を行った。その結果、Tc-99mのエネルギー領域では骨に、Tl-201のエネルギー領域では心臓に特徴的な放射能分布を認め、動物を用いた検討において2核種同時撮像が可能であることが実証された。また、別の個体では甲状腺機能診断薬の過テクネチウム酸ナトリウム (<math>^{99m}\text{Tc}</math>) (<math>^{99m}\text{Tc}</math> NaTcO<sub>4</sub>) と <math>^{201}\text{Tl}</math> TlCl によるSPECT同時撮像を実施し、同様の操作にて画像再構成を行ったところ、Tc-99mのエネルギー領域では甲状腺への、Tl-201のエネルギー領域では心臓への放射能分布を認めた。</p> <p>一方、radio-theranosticsでしばしば用いられる放射性ヨウ素 (I-123, I-131) の同位体であるI-125は、低分子化合物やペプチド・高分子にも比較的容易に導入可能で半減期が60日と長いためプローブとしての経時的追跡に優れている。そこで、<math>\gamma</math>線のエネルギーが低いという難点を解消しつつ小動物用SPECT装置で精密な画像を取得できるかどうかについて検討した。まず、マウスにヨウ化ナトリウム (<math>^{125}\text{I}</math>) (<math>^{125}\text{I}</math> NaI) を静脈内投与後にSPECT撮像したところ、甲状腺を明瞭に描出することができた。ついで、生物活性物質である低比重リポタンパク質 (LDL) およびその酸化物 (oxLDL) をI-125標識し、覚醒下静脈内投与後のマウス体内動態を調べた。投与後10分の時点で灌流固定し、長時間SPECT撮像したところ、<math>^{125}\text{I}</math>-oxLDLにおいてのみ褐色脂肪と考えられる組織が描出され (図1)、組織摘出法による結果と一致した。本研究により、小動物SPECT装置で少なくとも定性的なI-125体内分布評価が可能であることを示した。</p> <p>2. がんセラノスティクスを目指した化合物創製とイメージング研究</p> <p>これまで京都薬科大学では前立腺がん、乳がん、肺がん、膵がんなどを対象として、実用的なradio-theranostics probeの開発を進めてきた。例えば、EGFR遺伝子変異の検出を可能とする分子イメージングプローブとして <math>^{18}\text{F}</math> RT-19を見出し、2次変異体EGFR (L858R/T790M) を描出することに成功している (図2)。これまでの成果を本事業で開発を目指している受容体選択的画像診断法に適用することで、治療前にEGFR-TKI適応患者を選別し gefitinib による重篤な副作用を回避することや、的確な治療戦略決定に寄与することができる。また、神経膠腫 (グリオーマ) や乳がんなどの一部のがんにおいて高発現し、過剰な増殖に関与していることが報告されている Erythropoietin-producing hepatocellular (Eph) A2 受容体を標的とした分子イメージングプローブとして、<math>^{123}\text{I}</math> ETBを開発した。担がんモデルマウスを用いた体内分布実験およびSPECT撮像において、<math>^{123}\text{I}</math> ETBの腫瘍への集積を確認し、治療用放射線核種を導入した核医学治療用の薬剤開発を進めている。</p> <p>一方、新たなプローブ合成技術として、新規フッ素化法、マイクロ波反応装置、マイクロリアクターを用いた合成装置、Electro Wetting On Dielectric (EWOD) 技術を利用した標識合成技術、などの開発を進めている。</p>		

3. Notch受容体を標的とする内用療法に基づく難治性腫瘍治療法の開拓

上記のradio-theranostics研究手法を基盤とする受容体選択的画像化研究として、Notch受容体を標的とする挑戦的研究を実施した。本受容体は難治性の小細胞肺がんの発症と悪化に深く関わっていることが知られているが、本受容体を標的とする画像化手法はこれまで全く報告されていない。そこでまず、Notch受容体とその内在性リガンドであるDLL4の共結晶構造解析をもとに、リガンド候補薬剤を設計した。合成した各種候補化合物のNotch受容体との結合能を評価した結果、核医学治療薬剤のシーズとなりえるリガンド誘導体を見出すことに成功した。またその過程で、Notch受容体結合薬剤探索に利用できる結合親和性の新規評価法開発にも成功した。得られたリガンド誘導体の結合親和性は、まだ3 μM程度と低いが、本化合物をもとに構造活性相関研究を進め親和性の向上を進めている。また得られたリガンド薬剤を用いて、細胞レベルでの作用を評価する系を構築した。Notch受容体ではリガンドが結合すると、下流のシグナル分子 (NICDおよびHES1) の発現が増加する。そこで、小細胞肺がん細胞株であるH69ARからがん幹細胞が濃縮されていると予想される球状細胞集塊(スフェア)を形成させ、Notch受容体活性化によって生じるNICDを蛍光ウェスタンブロット法で定量する方法を構築した。現在、本評価法を用いるリガンド薬剤による活性化抑制能の評価を進めている。

一方、リガンド結合後に生じるNotchシグナリングは外部刺激に依存して変化するとされている。たとえば、Notch受容体リガンドのうちDll1とDll4は、受容体の活性化をそれぞれパルスのあるいは持続的に生じさせる。その結果、Dll1によるシグナリングは筋形成を示すが、Dll4によるものは筋形成を阻害する。そこで本研究では、このようなシグナリング様式の差異を生み出す分子機構解明をあわせて進めることとした。Notch受容体のパルスのまたは持続的な活性化は膜上における受容体の会合様式に起因すると考えられている。膜タンパク質の挙動はその脂質環境に大きく依存することが知られているので、予備的検討として分子動力学計算に基づいてNotchシグナリングの脂質依存性を解析した。その結果、上記したリガンドDll1、Dll4に関してはガングリオシドとの相互作用が寄与していることが示唆された。さらに、Notchリガンドの受容体への結合が周辺脂質との相互作用によって制御される可能性を示唆する結果が得られた。

4. 生体イメージング技術とiPS細胞技術の融合によるパーキンソン病の病態解明と新規診断・治療法の開発

パーキンソン病は脳幹上端にある中脳の神経細胞(ドーパミン作動性ニューロン)が減少していく疾患で、神経細胞死領域にレヴィ小体と呼ばれるタンパク質凝集体が出現する。レヴィ小体は構造異常を生じたαシヌクレイン(SNCA)のアミロイド凝集体で、神経毒性と構造伝播性を凝集過程で獲得する。本研究では、アミロイド凝集の進行とパーキンソン病発症との関連を明らかにすることを目的として、若年性パーキンソン病の原因となるA53T変異やC末領域の欠損が、SNCAのアミロイド凝集性に与える影響について、in vitroでの物理化学的解析を最初に行った。生理的条件において、A53T変異とC末欠損はいずれも線維形成反応を加速するとともに、線維形成量を顕著に増加させた。この分子機構を速度論・熱力学的に解析したところ、A53T変異は凝集・線維化の初期段階であるモノマーから凝集核への構造転移を促進する一方で、C末領域の欠損はアミロイド線維の自己触媒的な増殖活性を向上させることが示唆された。特に、自己触媒活性の高いC末領域欠損体は線維の形成・伝播を顕著に促進しうることから、パーキンソン病の診断・治療における有望な標的分子と考えられた。

次に、SNCAタンパク質のSPECTを用いたイメージングを行うため、SNCAのpreformed fibril (PFF) をマウスの線条体に注入し、時間経過に伴う組織学的な解析を行った。その結果、注入したSNCA-PFFは、注入部位から離れた部位である黒質や大脳皮質まで拡散していることが明らかになった。また中脳ドーパミン神経においては、SNCAがリン酸化されていることも確認でき、SNCA-PFF投与により病理を反映したパーキンソン病モデルマウスの作製に成功した。あわせて、病態解明に向けてin vitroでのヒト脳モデルの作製を進めた。すなわち、iPS細胞から線条体と黒質のニューロスフェアを誘導しお互いを融合させる条件を最適化したin vitro脳モデルを作製し、SNCAの伝播・凝集および毒性発現過程を画像解析できる研究基盤整備を行った。

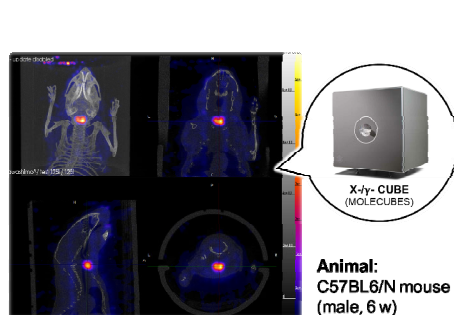


図1  $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$ -SPECTによるマウス甲状腺画像

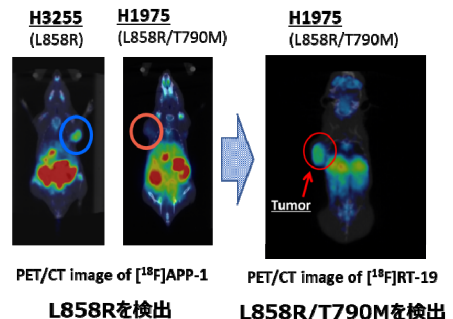


図2  $[^{18}\text{F}]\text{RT-19}$ によるEGFR(L858R/T790M)の検出



<p>今後の事業成果の活用・展開</p>	<p>1. セラノスティクス研究の推進に向けたイメージング技術の基盤形成  上記したこれまでの研究により、小動物用SPECTで複数核種の同時撮像が可能であることを明らかにした。本法は核種固有のγ線や特性X線のエネルギーピークが異なる多様な核種の組み合わせに適用できる。したがって、Ga-67やIn-111、I-123等、代表的なSPECT核種で標識した化合物を用意することで、疾患モデル動物の多面的な評価が可能となり、セラノスティクス研究を大きく前進させることができる。さらに、創薬や分子生物学の領域で汎用されてきた低エネルギーγ線放出核種であるI-125が画像化できたことは極めて重要である。画像上カラースケールに基づいた検量線作成を通じた定量的解析へと展開させることで、従来にはない研究領域を創製できると考えている。</p> <p>2. がんセラノスティクスを目指した化合物創製とイメージング研究  上記で開発したradio-theranostics probeのいくつかについては、他機関と協力して臨床研究を前提とした評価段階に入っている。特に、EphA2を標的とした核医学治療用の薬剤開発が先行しているため、最適ながん種との組み合わせを検討し臨床研究に進む計画である。また、EWODを基盤とした微量液滴操作技術に関しては特許出願も終了しているため、企業との協力による製品化を目指した研究開発を展開したい。これまで構築した国際共同拠点とのradio-theranostics研究を深化させて行くとともに、学部学生や大学院生が「セラノスティクス創薬研究」に加わることで、新しい診断・治療法に対する深い理解と実践能力を身に付けた薬剤師や研究者の育成にも努めていきたい。</p> <p>3. Notch受容体を標的とする内用療法に基づく難治性腫瘍治療法の開拓  上記研究で見出したNotch受容体結合リガンドをシースとして薬剤設計を行い、リコンビナント受容体での結合能評価系と細胞を用いた活性化抑制能評価系を駆使して最適薬剤を見出す研究を展開する。同時に、Dll1とDll4の生体膜脂質との相互作用がこれらリガンドと受容体との相互作用に影響を与える可能性が、分子動力学的計算によって示された。そこで、これらリガンドを分子生物学的に調製し、生体膜成分との相互作用を分光学的に解析することで計算結果の評価を行うとともに計算精度向上へのフィードバックを行う。</p> <p>4. 生体イメージング技術とiPS細胞技術の融合によるパーキンソン病の病態解明と新規診断・治療法の開発  上記したこれまでの成果から、SNCAを標的としたパーキンソン病の早期診断に向けた研究基盤を整えることができた。SNCA-PFFを注入したマウスモデルはパーキンソン病の早期診断や治療に向けたin vivoイメージング研究を展開するために極めて有用なモデル動物であり、従来にはない新たなradio-theranostics研究領域の創製につながる。さらに、iPS細胞技術を応用した黒質-線条体モデルは、ヒト細胞を用いたin vitro脳モデルとして、パーキンソン病の病態解析に応用できる。特に、SNCAタンパク質自身の構造に着目したアミロイド凝集を制御する分子機構やSNCAのC末領域の重要性の解析など、パーキンソン病に対する診断・治療分子の設計基盤の構築する研究において極めて有用なツールとなると考えている。</p>
<p>自己点検・評価、外部評価の状況</p>	<p>(自己点検・評価)  参画組織の研究者が原則月1回、一堂に会して、進捗報告や課題共有を目的とする会議を開催し、これを研究ブランディング事業推進連絡会議として本プロジェクトを推進した。特に、本事業には若手・中堅の教員が多数参画しており、若手の人材育成にも努めた。その他、外部資金獲得のための支援、全学的な研究推進体制の構築にも取り組んだ。研究成果については、研究ブランディングシンポジウムを年1回開催し、国内外の研究者に研究の進捗状況を公表した。ウェブを活用したシンポジウムも開催し、COVID-19禍においても国際連携の強化に務めた。研究業績として、英文原著論文75報、総説12編、著書2冊、特許出願2件、国際学会発表13件、国内学会発表136件、外部講演等41件があり、本事業の3年間で学術的に大きな成果を挙げた。本事業により、radio-theranosticsの先端的な研究基盤を整備することができたので、今後は更なる研究の発展のために共同研究を推し進める。  ブランディング活動として、本学の企画・広報課と連携し、本学のHPに専用のページを設けシンポジウムの案内、研究の進捗報告、専門機関向けと一般向けにNews Letterの公開などを行った。報道機関向けにメディアセミナーやNews Releaseも行い、研究の紹介などが業事日報紙に掲載され、外部への情報発信も効果的に行われた。</p> <p>(外部評価の状況)  外部評価者: 京都大学名誉教授、学術研究支援室長 佐治英郎  「京都薬科大学が持つ優れた研究基盤をもとに、核医学診断と放射線内用療法(核医学治療)を融合して診断と治療を一体的に行う、個別化精密医療を実現できる新しい医療技術として期待されているradio-theranosticsの研究拠点を構築・機能させ、京都薬科大学の次世代がん研究のブランドの確立に全学的に取り組んでいることは高く評価できる。また、優れた研究成果も多く出ており、有効ながんradio-theranostics用化合物の新規創製、開発したradio-theranostics用化合物の臨床研究展開に向けた評価、企業との協力による製品化を目指した合成基盤技術の開発、海外の企業との高エネルギー用コリメータの開発など、基礎研究から応用研究まで幅広く、独創性・新規性が高く、また実用性が期待できる研究が進んでおり、本事業に期待された成果を十分にあげ、今後も継続的な研究の発展と優れた成果の創出が十分に期待できる。事業終了後も、大学として、貴学の高い研究力を基盤に、本事業で構築・整備された研究拠点を有効活用して、研究をさらに発展させ、国際共同研究拠点としてtheranostics研究を先導して推進し、発展させていかれることを強く期待する。併せて、本拠点の活動を通して、次世代のライフサイエンス研究、theranostics医療を担う若手人材の育成にも努められることを期待する。」</p>