

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390232

研究課題名（和文） ミトコンドリア機能変化に着目したがん治療応答の新規画像法開発

研究課題名（英文） development of a novel imaging method for cancer therapy based on alteration of mitochondria function

研究代表者

間賀田 泰寛 (MAGATA YASUHIRO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授

研究者番号：20209399

研究成果の概要（和文）：がん治療法選択・効果予測、治療効果の早期判定を目的として、「アポトーシス」、「酸素」といったキーワードと関連の深いミトコンドリア機能変化を非侵襲的にかつ、利用の広汎性の高い手法により評価可能なイメージング法の開発を目的として検討を行った。その結果、利用の広汎性の高い放射性ヨウ素標識 IDPP がミトコンドリア膜電位に依存して細胞に集積することが示された。また、光線力学的療法における治療応答性について FDG および MIBI の取り込み率をマーカーとして用いて検討を行ったところ、治療前の FDG の取り込みの高い細胞系ほど高い PDT 治療効果が期待され、また、PDT 後は MIBI の取り込み低下が PDT 治療効果に相関することが認められた。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of selection of cancer therapy, prediction of therapeutic effect and early judgment of the therapy, we explored development of a novel method to estimate mitochondria function which relates "apoptosis", or "oxygen". We obtained a radioiodinated labeled compound IDPP which accumulates to a cell depending on mitochondrial membrane potential. On the other hand, the relationship between photodynamic therapy and alteration of cell function after PDT was estimated using uptake value of FDG and MIBI as a marker. High PDT therapeutic effect is expected in case of high FDG uptake in tumor cells. And it was indicated that the decreasing ratio of MIBI uptake linearly related to PDT effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	9,500,000	2,850,000	12,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射性医薬品、腫瘍、PET、SPECT、ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

QOL の高い治療法への社会的要請が高まっている現代、がん治療における放射線の外照射や内照射、あるいは PDT の重要性はさらに増してきている。これらの治療効果にはがん自体の大きさ、進展度や血管新生、酸素

分圧をはじめ多くの因子と各治療法の治療効果作用点の違いが深く関連する。これらの各因子は複合的であり、これまでも多くの研究が行われ、臨床的にもがんの由来や分化度等により、その寄与の大小はある程度知られている。しかしながら、個体によるばらつ

きも大きく臨床的分類のみで一般化するの  
は困難な面もある。

また、ディッシュ内に細胞を一様に増殖さ  
せて行うインビトロ治療実験において、多く  
の細胞は所期の通り死滅するが、一定時間  
を経てサバイバルする細胞があることはよく  
経験される。また、臨床的にはレジメン数  
が増えるに従い、形質転換によるのかその原因  
は不明だが治療抵抗性が増すことはよく  
経験される。このような生存能に差が生じる  
ことは腫瘍生化学的にも非常に興味深く、何  
らかの細胞内での機能差が表現されている  
ものと考えられる。このことは治療法の選  
択あるいは効果予測を行うにあたり、重要  
な示唆を与える。

申請者はこれまでに PDT によるがん  
細胞の治療応答性について、エネルギー代  
謝指標である F-18-FDG (以下、FDG) の  
取込みとミトコンドリア膜電位指標と言  
われる Tc-99m-MIBI (以下、MIBI) の  
取込みをインビトロで比較検討した。その  
結果、ある条件下で施行した PDT の 6  
時間後では約 40% の細胞が生存してお  
り、FDG の生存細胞数当りの取込み量は  
PDT 後から変化はなかったが、MIBI  
は早期より時間と共に減少した。24 時  
間後には MIBI の取込みは処理前の約  
70% まで回復し、その後、細胞数が増  
加した。この結果をインビボに置き換  
えて考えると、PDT 後のインビボイメ  
ージングにおける放射能集積量の低下は  
FDG では細胞数減少によるものであり、  
MIBI では加えて細胞機能変化を観察  
していると考えられる。特にミトコン  
ドリア機能は細胞のエネルギー代謝に  
深く関連しており、またアポトーシス  
がミトコンドリア障害から始まること  
が近年知られてきていることからその  
意義は大変興味深い。また、藤林ら  
は Cu-62-ATSM が FDG の集積とは異  
なり、腫瘍の低酸素部位に特異的に  
集積し、その集積はミトコンドリア  
電子伝達系異常によるものであると  
推論している。

## 2. 研究の目的

上記のように、がん治療法選択・効果  
予測、治療効果の早期判定を目的とし  
て、「アポトーシス」、「酸素」とい  
ったキーワードと関連の深いミトコン  
ドリア機能変化を非侵襲的にかつ、利  
用の広汎性の高い手法により評価可  
能なイメージング法の開発は非常に有  
用性が高いものと期待されたので、本  
研究により新規がん診断用放射性医薬  
品を開発し、臨床応用可能な治療  
応答判定システムの確立を目指した  
ものである。

考えられる研究項目は次のものである  
が、このうち、特に①および③につ  
いて本研究で

検討することとした。

①ミトコンドリア膜電位依存的集積を示  
す新規イメージング薬剤の開発。

②ミトコンドリア酸化還元電位依存的  
集積を示す新規イメージング薬剤の  
開発。

③インビトロ、インビボ実験系により、  
上記イメージング薬剤の最適化と、それ  
によるがん治療法の選択・効果予測、  
治療効果早期判定を可能とするシ  
ステムの確立と臨床適用。

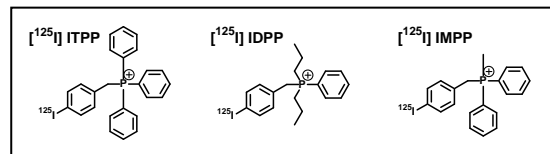
④治療抵抗性を示すがん幹細胞の腫  
瘍生化学的検討へのアプローチ。

上記のような目的から、従来、ミト  
コンドリア膜電位依存的に集積するイ  
メージング薬剤として、MIBI が知ら  
れており、心筋血流イメージングのみ  
ならず、一部の腫瘍イメージングにも  
用いられている。しかしながら、本  
剤は Tc-99m 標識製剤であり、今般  
のような Mo-99 の供給トラブルに  
よる Mo-99-Tc-99m ジェネレータ  
の利用が出来ない場合、製薬会社  
からの供給も困難となり、その臨床  
利用が制限される。また、本剤は  
多剤排出機構に本剤が速やかに細胞  
内から細胞外へ排出されることが知  
られている。このため多剤排出機構  
を発現している腫瘍系では本剤に  
よる腫瘍イメージングは不可能とな  
る。そこで、従来よりインビトロに  
おいてミトコンドリア膜電位の測定  
剤として使用されていた H-3-tetra  
phenylphosphonium (H-3-TPP) の誘  
導体化により排出機構により排出  
されず、利用の広汎性の高い放射  
性ヨウ素で標識された IBTPP+ の  
開発を行うこととした。また、PDT  
の治療効果予測および治療前の適  
応予測法の開発を目的として、現  
在臨床で汎用されている FDG およ  
び MIBI を用いて、各種細胞系に  
おける PDT 効果と FDG および  
MIBI の取込比較等を行うこと  
とした。

## 3. 研究の方法

### ミトコンドリア膜電位依存的集積を示す 新規イメージング薬剤の開発

図 1 に本検討で合成した化合物を示す。  
図 2 に示す通り、ヨウドベンジルアル  
コールを出発原料に用い、スズヨウ  
素置換反応によつ



て I-125 を導入した後、それぞれのホス  
ホニウムと結合させ、目的とする標  
識体を得た。

図 1 TPP 誘導体

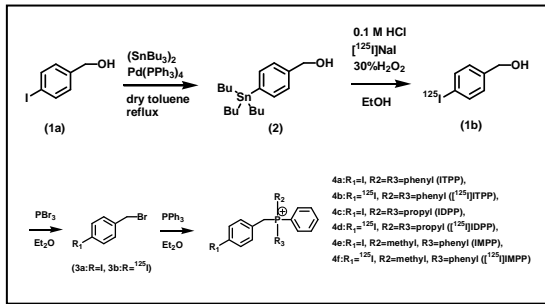


図2 各 TPP 誘導体の I-125 標識合成

得られた化合物について、in vitro 実験を行った。まず、I-125-IDPP を用いて、3 種の腫瘍細胞に対する取り込み率を評価した。また、ミトコンドリア膜電位の検出試薬である JC-1 を用い、その集積性を比較検討した。

また、膜電位差を喪失する脱分極モデルで同様に IDPP および JC-1 の取込変化について検討した。

次いで、正常マウスを用いた生体内分布に関する検討を行った。また、投与 24 時間後における心筋 SPECT 画像を撮像した。

#### PDT による効果予測、治療効果早期判定を可能とするシステムの確立

5 種類の腫瘍細胞株 (A431、DU145、H1650、LS180、SHIN3) を用いた。培養腫瘍細胞にフォトリン (Photofrin, PF) を各種濃度 (50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M) になるように添加して 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下で 24 時間培養した。PF 無添加の培地を対照として用いた。培養後、それぞれの腫瘍細胞をトリブシン-EDTA で処理し、冷却した PBS で 3 回洗浄した後、細胞濃度が  $5 \times 10^6$  個/ml となるよう調整した。

1.5 ml の腫瘍細胞懸濁液に、630 nm のレーザー光を 10 分間照射した。これに伴い発生する一重項酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) 発生量を、近赤外光電子増倍管により 1270 nm にて測定した。<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 発生量は、細胞のタンパク重量 (mg) 当たりの 10 分間の総カウント数で評価した。また、照射直後の細胞懸濁液について①FDG および MIBI の取込率評価、②MTT アッセイ、③TB アッセイ、④ローリー法によるタンパク質定量を行った。

#### 4. 研究成果

##### ミトコンドリア膜電位依存的集積を示す新規イメージング薬剤の開発

それぞれの標識体について、高い標識収率と放射化学的純度で得ることが出来た。

IDPP の腫瘍細胞への取り込み率を評価したところ、LS180、U87MG、SHIN3 の順で取り込み率が高いことが示され、これは JC-1 の取り込み率と正の相関を示した。

また、同様の検討を脱分極モデルにおいて

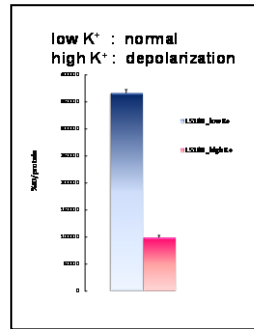


図3 ミトコンドリア膜電位依存的な IDPP の細胞集積

得られた標識体を用いて正常マウス生体内動態を検討したところ、いずれの薬剤もミトコンドリア膜電位差の大きな心筋に高い集積性を示した。また、IDPP および IMPP は ITPP に比べ、心筋以外の部位からのクリアランスが早く、IDPP あるいは IMPP が in vivo 用薬剤として優位であることが示された。

また、SPECT 撮像を行ったところ、3 時間後から 3 時間後に明瞭な心筋 SPECT 画像を得ることが出来た (図 4)。

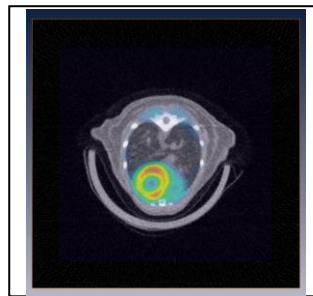


図4

I-125-IDPP の正常マウス投与 3 時間後における SPECT 画像

以上の検討から、IDPP がミトコンドリア膜電位依存的な組織イメージング剤として有用であることが示された。

#### PDT による効果予測、治療効果早期判定を可能とするシステムの確立

FDG 取込低下率と MIBI 取込低下率は、添加 PF 濃度に依存して大きくなることが確認された。さらに、FDG 低下率は MIBI 低下率より常に高い値を示した。同様に、MTT 低下率および TB 低下率も、PF 濃度に依存して高い値を示し、すべての PF 濃度において、MTT 低下率は TB 低下率より高い傾向にあった。

FDG 低下率は、MTT 低下率と指数関数的な相関を示し ( $R^2=0.650$ ,  $P<0.01$ )、MIBI 低下率と MTT 低下率の関係は直線的な相関性を示した ( $R^2=0.719$ ,  $P<0.01$ )。

1  $\mu$ M PF 濃度条件下では、PDT レーザー照射をしない群における FDG 取込率と PDT レーザー照射後の MTT 低下率の関係は直線的によく相関した ( $R^2=0.800$ ,  $P<0.05$ )。一方、この場合の MIBI 取込率および MTT 低下率には、相関性が認められなかった。PDT レーザー照射により発生した <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 量や腫瘍細胞への PF 取込量については、MTT 低下率との関連性は認

行ったところ、取り込み値が有意に低下しており、これらの検討から、本薬剤がミトコンドリア膜電位依存的に集積していることが強く示唆された (図 3)。

められなかった。

これらの結果から、PDT 後早期における MIBI 取込低下率の変化は、主として PDT 直後に惹起されるミトコンドリア機能変化に伴うミトコンドリア膜電位変化を示し、また、FDG 取込低下率の変化は主に細胞膜機能障害の結果と考えられる。本研究で検討したような PDT 後早期での FDG の取込率変化は、PDT 効果を過大評価する可能性があるものの、MTT 低下率と MIBI 取込低下率が直線的な相関関係を示したことより、MIBI の取込率変化が PDT 処理後早期において治療効果を反映することが示唆された (図 5)。

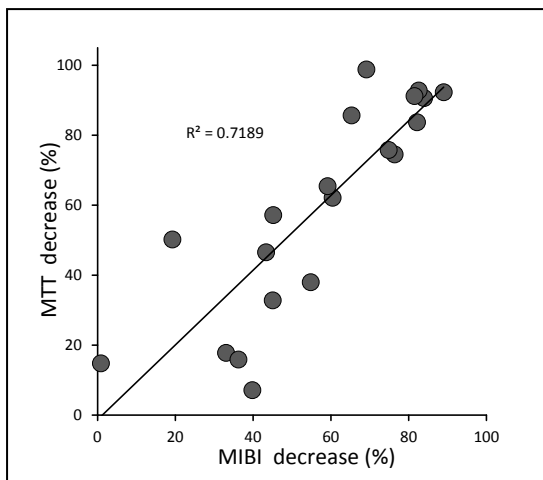


図 5 PDT 直後の MTT アッセイと MIBI 取込それぞれの低下率の比較

一方、PDT 前の腫瘍細胞への FDG 取込量が低いほど、PDT 効果が直線的に相関して高くなることから、PDT 前に FDG-PET 検査を施行することで PDT 効果を予測できる可能性が示された (図 6)。

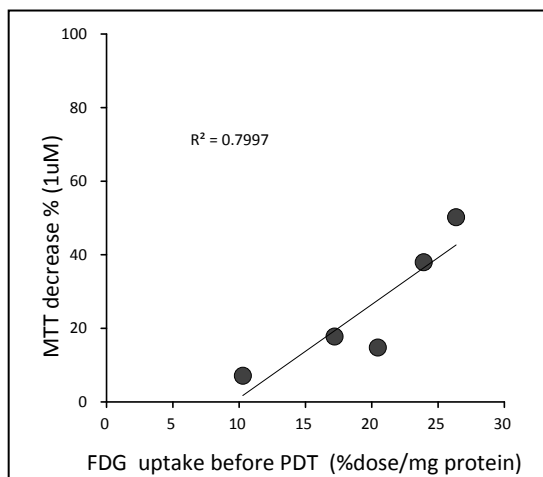


図 6 治療前の各腫瘍細胞における FDG 取込と PDT 効果の比較

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Jie Liu, Mikako Ogawa, Toshihiro Sakai, Misato Takashima, Shigetoshi Okazaki, Yasuhiro Magata. Differentiation of tumor sensitivity to photodynamic therapy and early evaluation of treatment effect by nuclear medicine techniques. Ann. Nucl. Med. 2013 in print.

〔学会発表〕 (計 5 件)

① 堀 俊博、齋藤有里子、小川美香子、間賀田泰寛 ミトコンドリア膜電位に依存した集積を示す薬剤の開発、第 50 回日本核医学学会、2011. 10. 27、筑波

② Jie Liu, Mikako Ogawa, Toshihiro Sakai, Mutsumi Kosugi, Yasuhiro Magata. Early Evaluation of Treatment Effect on Photo Dynamic Therapy by Nuclear Medicine Technique、第 7 回日本分子イメージング学会、2012. 5. 24、浜松

③ 堀 俊博、齋藤有里子、高島 好聖、小川美香子、間賀田泰寛 ミトコンドリア膜電位依存的に集積する脂溶性カチオンイメージング剤の開発、第 7 回日本分子イメージング学会、2012. 5. 24、浜松

④ 堀 俊博、小川美香子、齋藤有里子、高島好聖、間賀田泰寛 ミトコンドリア膜電位依存的に集積を示すイメージング薬剤の開発、第 51 回日本核医学学会、2012. 10. 11、札幌

⑤ Jie Liu, Mikako Ogawa, Toshihiro Sakai, Mutsumi Kosugi, Shigetoshi Okazaki and Yasuhiro Magata. Differentiation of Tumor Sensitivity to Photo Dynamic Therapy and Early Evaluation of Treatment Effect by Nuclear Medicine Technique、第 51 回日本核医学学会、2012. 10. 11、札幌

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
該当無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

間賀田 泰寛 (MAGATA YASUHIRO)  
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研  
究センター・教授  
研究者番号：20209399

### (2) 研究分担者

阪原 晴海 (SAKAHARA HARUMI)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10187031

松島 芳孝 (MATSUSHIMA YOSHITAKA)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20282816

小川 美香子 (OGAWA MIKAKO)  
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研  
究センター・准教授  
研究者番号：20344351

高島 好聖 (TAKASHIMA MISATO)  
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研  
究センター・助教  
研究者番号：70525592

### (3) 連携研究者

なし