

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2012
 課題番号：23659576
 研究課題名（和文）陽電子放出同位体⁶²Zn-ポルフィリンを用いたがんPET診断法に関する研究
 研究課題名（英文）A new tracer development for positron emission tomographic imaging with an isotope ⁶²Zn containing porphyrins.
 研究代表者
 松井 裕史（MATSUI HIROFUMI）
 筑波大学・医学医療系・講師
 研究者番号：70272200

研究成果の概要（和文）：本研究では⁶²Znと新規合成したポルフィリン骨格を有する化合物を作成し、PETトレーサーとしての有用性を検討した。マウスを用いたPET撮影の結果、合成したサンプルによるPET造影が可能であった。合成したサンプルは現在使用されているPET造影剤¹⁸FDGとは異なる機序によりがんに取り込まれるため、これまで見えなかったがんの性質側面を捉えるトレーサーとしての可能性が本研究により示唆された。

研究成果の概要（英文）：To develop a new tracer for positron emission tomography imaging (PET), we newly synthesized ⁶²Zn containing porphyrin derivatives which have been reported to be accumulated in neoplastic cells. We investigated the efficacy of our Zn-porphyrins for tumor-area diagnosis with cancer cell-transplanted mice. These tracers were accumulated in the tumor tissue, as well as the liver and the spleen: both organs play important role for heme metabolisms. According to these results, ⁶²Zn-porphyrin is suggested to be one of candidates for a tumor tracer in PET imaging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：内科学（消化器病学）

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線化学

キーワード：放射線腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) FDG-PET はがん検診には有効ではない。従って有効な PET トレーサーが必要である

悪性新生物が本邦の死因第一の座を占めて久しい。この命題解決に向かって、多くの研究者が多年挙国一致体制で研究開発を行ってきた。特に胃がん、乳がん、婦人科系のがん、前立腺がん、大腸がんなどをはじめとして早期がん検診体制が構築され、ことに胃がんではその死亡者数の激減を見るに至っている。しかし、その胃がんですらがん死者は男 55 人/10 万人、女 28 人/10 万人と以前多数を占めており、より有効な早期診断報

の開発が望まれている状況にある。

有効ながん検診とは、1) 早期発見、2) 早期治療、3) 結果としての生存率の延長を可能にするものである。検査そのものが安全であることは言うまでもないが、より侵襲が少なく、かつ対費用効果も検診法として重要な条件である。¹⁸FDG-PETは陽電子放出型のフッ素¹⁸Fをデオキシグルコース(DG)と結合させた化合物である。DGは糖の主要な担体(e.g. GLUT-1)で細胞内に取り込まれるが、解糖系では利用できない基質である。そのため投与された¹⁸FDGは取り込まれた細胞内に一定時間存在し、γ線を放出する。がん細胞の有酸素呼吸が正常細胞と比較して阻害さ

れており、嫌気性の代謝に依存していることは 1930 年台からすでに Warburg 効果として知られていた。18FDG-PET ではがん細胞の糖取り込み量に依存しているため検診用ツールとしては以下の欠点がある：①低糖消費量・糖排泄型のがんは検出できない。②脳腫瘍、膀胱がん、前立腺がん、胃がん等、生理的高糖集積臓器近傍のがんでは正常組織の高糖取り込みとがん組織の取り込みが重なり、偽陰性となる。③炎症も糖の集積性があり、がん検診では偽陽性を呈する。すなわち未だ解決していない問題を抱えたトレーサーである。

一方、前述したように我が国の死亡原因として悪性新生物は国民病と理解されており、転移がんも含めて担がん状態を診断できると喧伝されたこともあって、現在全国 100 カ所以上で PET 検診施設が稼働している。従って真にがん診断に有効なトレーサーが開発できれば、その均霑化は比較的容易となるようなインフラ整備は整っている状況にある。

悪性新生物の克服のため、糖利用とは異なる機序でがん細胞に取り込まれるトレーサーの開発を本課題の目的とした。

(2) ポルフィリンをがん特異的に運ぶタンパクを見出した→これを利用して新しいがんトレーサーをつくる

光化学療法はがん特異的に集積したポルフィリンにレーザーを照射し、アポトーシスを誘導する治療法である。本課題応募者らはがん特異的ポルフィリン集積現象を長年研究対象とし、ヘム輸送タンパクである Heme carrier protein-1 (HCP-1) が、がん特異的に発現し、ヘム・ポルフィリンを細胞内輸送することを見出した。この結果からポルフィリンをリガンドとしたがん診断法の可能性が示唆された。ポルフィリンの骨格であるポルフィン環は鉄など二価の金属によって錯体形成される。本課題では代謝経路や安全性が担保されており、ポルフィン環との錯体形成が容易な亜鉛陽電子同位体 ^{62}Zn を作成し、tetrafluoro-protoporphyrin(ethylene-glycol) 3 = [^{62}Zn -TFPP-(EG) $_3$] との錯体を作成し、PET 用トレーサーとしての有用性を検討する。

2. 研究の目的

本課題の目的はポルフィリンのがん親和性に基づいた PET 用がんトレーサーを作成し、その有用性をがん細胞並びに担がん小動物を用いて明らかにすることである。現在がん検診に施行されている ^{18}F FDG はがん細胞の糖消費量が正常細胞と比較して多いことを利用したトレーサーであるため、この性質を示さないがんや、糖が生理的に集まる脳、胃の腫瘍、排泄経路にある腎泌尿器周辺の腫瘍

には有効でない。本課題応募者らは長年光化学療法の機序解明を試み、ヘム移送タンパク HCP-1 のがん特異的発現がポルフィリン集積現象を誘導することを見出した。本課題ではポルフィリンのがん集積性に基づき、亜鉛が容易にポルフィリンと錯体形成する性質を利用して ^{62}Zn -TFPP-(EG) $_3$ を作成し、PET トレーサーとしての有用性を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) ^{62}Zn -TFPP-(EG) $_3$ の作成とその *in vitro* での取り込みと HCP-1 との関係を検証する。

^{62}Zn -TFPP-(EG) $_3$ の作成

① ^{62}Zn の合成は大阪大学核物理研究センターにて行った。真空中のタングステンボート中ニッケル粉を 1800°C で加温溶解して蒸発させ、アルミ箔に蒸着する。このニッケル蒸着アルミ箔をターゲットとして、ニッケル蒸着面を後方に設置し、加速した ^3He を入射する。現在までの検討で、最適な加速エネルギーは 597KeV であった。ニッケルと ^3He 間の核反応によって、 ^{62}Zn が形成される。この ^{62}Zn は反跳エネルギーによって後方へ放出されるので、ニッケル蒸着アルミ箔後方に KCl を置き、 ^{62}Zn を捕捉する。この ^{62}Zn 含有 KCl を水溶液とし、イオン交換樹脂カラム TOYO PEARL CM-650 とイオン交換水を用いて精製 ^{62}Zn 水を得る。

② ヘム前駆体、プロトポルフィリンの水和物 tetrafluoro-protoporphyrin(ethylene-glycol) $_3$ メタノール溶液と ^{62}Zn 水を 3 : 1 で混和し、70°C 10 分処理することで ^{62}Zn -TFPP-(EG) $_3$ が得られる。この TFPP-(EG) $_3$ については奈良先端技術大学院大学廣原志保助教によって合成され、その好意により、十分量入手済みである。反応後、溶液のメタノールを加温で分溜し、ゲルクロマトグラフィー (LC20) で精製することで目的の ^{62}Zn -TFPP-(EG) $_3$ 水溶液とする。405nm の吸収を測定し、標品の値と比較して濃度決定する。

(2) 合成サンプルのがん特異的集積に対する *In vitro* 検討

がん特異的集積を求めるために正常ラット胃粘膜由来 RGM 細胞と、RGM のがん様変異細胞の 2 種類に対して細胞取り込み評価を実施した。(1) の要領で作成したサンプルを用いて評価した。このとき、放射性 Zn 由来のガンマ線量をサンプルの細胞内移行に対する指標とし、24 時間まで経時的な細胞内取り込み量を評価した。

(3) PET 撮影

6 週齢ヌードマウスの大腿に RGK 細胞を皮

下移植して担癌モデルマウスを作成して用いた。サンプルは尾静脈より投与し、サンプル投与後 1、6、24 時間後に PET 撮影を行った。

4. 研究成果

(1) Zn-TFPP-(EG)₃の作成とその in vitro での取り込みと HCP-1 との関係を検証する。

⁶²Zn-TFPP-(EG)₃の作成

⁶²Zn を PET 造影核種として用いる場合には、その半減期を考慮して迅速な合成が必要となる。TFPP-(EG)₃ と ⁶²Zn との合成過程を検討した結果、製造された ⁶²Zn を 30 分以内に TFPP-(EG)₃ に結合させて PET トレーサーとする方法を確立した。極めて迅速な本方法は、半減期が 9 時間と短い ⁶²Zn を PET 造影剤として用いるのに十分な方法である。

(2) 合成サンプルのがん特異的集積に対する In vitro 検討

がん診断に用いる PET 造影剤にはがん特異的集積性が不可欠である。そこで、RGM 細胞、RGK 細胞を用いてそれぞれのサンプル取り込み量を評価した。その結果、図 1 のように、サンプル曝露後 24 時間で RGK 細胞特異的に合成サンプルが取り込まれることを確認した。

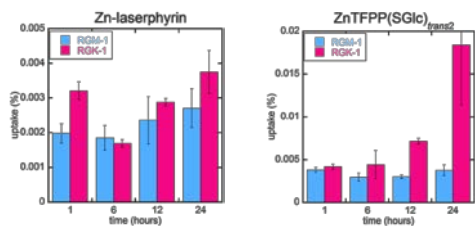


図1 がん特異的集積評価
(左) Zn-Laserphyrin (右) ZnTFPP(SGlc)_{trans2}

(3) PET 撮影

(2) の結果がん特異性が見られた ZnTFPP(SGlc)_{trans2} を用いて PET 撮影を行った。図 2 にその結果を記す。⁶²Zn 結合サンプルによる PET 撮影は可能であった。また、使用した Laserphyrin, TFPP(SGlc)_{trans2} のどちらのサンプルにおいても肝臓への集積が高く見られた。サンプル投与後 24 時間後の画像では Laserphyrin が脳に多く集積しているのに対して TFPP(SGlc)_{trans2} ではほとんど脳に集積が無いことも明らかとなった。腫瘍への集積も見られた。現在の状況では肝臓へのトラップ量が多く、がん細胞集積量が正確に定量出来ない。そのため、サンプル投与後に組織を摘出、組織から検出されるガンマ量を指標として体内動態を精査する必要がある。今後の課題は体内動態の精査に加えて、ポル

フィリンの取り込みが高い腫瘍細胞と低い腫瘍細胞があるため、様々な種類のがんに対して今回開発した PET 造影剤の有用性を確認する。これら課題を明瞭とすることで、本研究の PET 造影剤と FDG との組み合わせによる PET 診断の幅を広げることが可能になることが予想される。

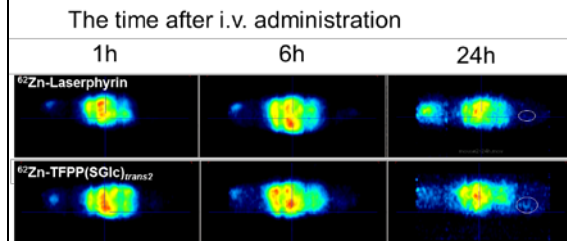


図2 PET 造影画像
(上) Zn-Laserphyrin (下) ZnTFPP(SGlc)_{trans2}

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件) すべて査読有り

- (1) Kazuhiro Hiyama, Hirofumi Matsui, Masato Tamura, Osamu Shimokawa, Mariko Hiyama, Tsuyoshi Kaneko, Yumiko Nagano, Ichinosuke Hyodo, Junko Tanaka, Yoshihiro Miwa, Tetsuo Ogawa, Takeo Nakanishi and Ikumi Tamai. Cancer cells uptake porphyrins via heme carrier protein 1, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2012; 16: 1-8
- (2) Suemasu S, Yamakawa N, Ishihara T, Asano T, Tahara K, Tanaka K, Matsui H, Okamoto Y, Otsuka M, Takeuchi K, Suzuki H, Mizushima T. Identification of a unique nsaid, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochem Pharmacol.* 2012 84(11):1470-81.
- (3) Nakamizo H, Suzuki H, Miura S, Mogami S, Kishikawa H, Yoshida H, Matsui H, Hibi T. Transmural pressure loading enhances gastric mucosal cell proliferation. *Dig Dis Sci.* 2012; 57(10): 2545-54.
- (4) Indo HP, Inanami O, Koumura T, Suenaga S, Hsiu-Chuan Yen, Kakinuma S, Matsumoto K, Nakanishi I, St Clair W, St Clair DK, Matsui H, Cornette R, Gusev O, Okuda T, Nakagawa Y, Ozawa T and Majima HJ. Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE, *Free radical research*, 2012, 46(8), 1029-1043
- (5) Vong LB, Tomita T, Yoshitomi T, Matsui H, Nagasaki Y. An Orally Administered Redox Nanoparticle that Accumulates in

the Colonic Mucosa and Reduces Colitis in Mice, Gastroenterology, 2012; 143(4); 1027-1036

- (6) Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, Tamura M, Rai K, Nakamura Y, Kaneko T, Indo HP, Majima HJ, Hyodo I. Rebamipide attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)-induced lipid peroxidation by the MnSOD overexpression in gastrointestinal epithelial cells. J Physiol Pharmacol. 2012 April; 63(2):137-42
- (7) Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, Nakamura Y, Tamura M, Rai K, Kaneko T, Hyodo I. Bisphosphonate-induced gastrointestinal mucosal injury is mediated by mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation. J Clin Biochem Nutr. 2012; 51(3):196-203.
- (8) Kim BJ, Kim SY, Lee S, Jeon JH, Matsui H, Kwon YK, Kim SJ, So I. The role of transient receptor potential channel blockers in human gastric cancer cell viability. Can J Physiol Pharmacol. 2012 Feb; 90(2):175-86. Epub 2012 Feb 6.
- (9) Nagano Y, Matsui H, Tamura M, Shimokawa O, Nakamura Y, Kaneko T, Hyodo I. NSAIDs and acidic environment induce gastric mucosal cellular mitochondrial dysfunction. Digestion. 2012; 85(2):131-5.

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 田村磨聖、松井裕史、馬嶋秀行、兵頭一之介:がん浸潤に対するミトコンドリア由来活性酸素の関与 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012/9/19
- (2) Matsui H. Gastric cancer specific porphyrin accumulation. The 4th Symposium of the Asian Photodynamic Association, Beijing (China), 2012/9/18.
- (3) Matsui H, Tamura M, Nagano Y, Kaneko T and Hyodo I. Salt as an oxidative stress in gastric mucosal cells. 7th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection, 0-20, Honolulu(USA), 2012/9/10.
- (4) Tamura M, Matsui H, Tomita T, Sadakata H, Majima H, Indo H and Hyodo I, ROS Elimination by MnSOD or antioxidants suppressed tumor invasion. 7th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection, P-4,

Honolulu(USA), 2012/9/10.

- (5) Nagano Y, Matsui H, Shimokawa O, Hirayama A, Nakamura Y, Tamura M, Kaneko T and Hyodo I. Bisphosphonate-induced gastrointestinal mucosal injury is mediated by mitochondrial superoxide production and lipid peroxidation. 7th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection, P-7, Honolulu(USA), 2012/9/10.
- (6) Matsui H Gastric cancer specific porphyrin accumulation. 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP) Jeju (Korea), 2012/7/8.
- (7) 長野由美子、松井裕史、下川治、田村磨聖、中村幸夫、頼冠甫、金子剛、兵頭一之介:ミトコンドリア障害による消化管酸化ストレスとしての NSAIDs 投与と酸環境曝露 第 65 回酸化ストレス学会、Y-3, 徳島、2012/6/8.
- (8) 田村磨聖、松井裕史、長野由美子、富田勉、貞方久人、犬童寛子、馬嶋秀行、兵頭一之介:ミトコンドリア由来活性酸素はがん浸潤を促進する 第 65 回酸化ストレス学会、0-31、徳島、2012/6/7.
- (9) Matsui H, Kaneko T, Hyodo I. Plenary Lecture Heme carrier protein 1 involves a cancer specific porphyrin accumulation. 221st ECS Meeting, Seattle(USA), 2012/5/8.
- (10) Kaneko T, Matsui H, Suzuki H, Narasaka T, Mizokami M and Hyodo I. An Optical Diagnosis for Gastric Cancer with Fluorescence Observation. 5th International Gastrointestinal Consensus Symposium. Sendai, 2012/2/11
- (11) 松井裕史「がん集積ポルフィリンの放射線イメージング」:つくば学際ワークショップ「バイオイメージングの展開」つくば、2012/1/21.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

1. 名称:【正常細胞と癌細胞との共培養系】
- 発明者:松井裕史、三輪佳宏、田村磨聖、中村由美子
- 権利者:国立大学法人筑波大学
- 種類:特許出願
- 番号:2012-272223
- 出願年月日:2012/12/13
- 国内外の別:国内、現在 PCT 出願準備中

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/matsui-GI/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 裕史 (MATSUI HIROFUMI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70272200

(2) 研究分担者

金子 剛 (KANEKO TSUYOSHI)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90510181