

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293262

研究課題名(和文) 治療応答に伴うミトコンドリア機能変化に反応する新規がんイメージング薬剤の開発

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

研究代表者

間賀田 泰寛 (Magata, Yasuhiro)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：20209399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療後のミトコンドリア機能変化を画像化し得る新規イメージングプローブ開発を行った。これまでに開発した放射性ヨウ素標識脂溶性カチオン誘導体であるI-125-DPPはミトコンドリア膜電位に依存して細胞に集積するものの、P-gpにより細胞外へ排泄されたため、P-gpの阻害剤であるスチルベンをその構造に導入したI-125-DESPを開発した。腫瘍細胞を用いた取込実験では、I-125-DDPに比べて6.7倍高い取込を示すとともに、P-gpに一定の阻害効果を示して細胞内に蓄積し、本薬剤デザインのPOCが得られた。インビボ試験の結果、肝臓に高く集積し、残念ながら腫瘍への取り込みは低値を示した。

研究成果の概要(英文)：For the purpose prediction of therapeutic effect and early judgment of the therapy, we developed a novel imaging probe to estimate mitochondria function which relates "apoptosis", or "oxygen". We have already obtained the radioiodinated labeled compound I-125-DPP which accumulates to cells depending on their mitochondrial membrane potential. Unfortunately, this compound was excreted from the cells by P-glycoprotein (P-gp) just after uptake in the cells. In order to improve this problem, we designed and synthesized a new drug I-125-DESP including a stilbene group which is an inhibitor against P-gp. I-125-DESP was uptake 6.7 times higher into cancer cells compared with I-125-DPP. Moreover, almost I-125-DESP was not excreted from the cancer cells. These results indicate POC of the drug design of this compound. Then, we performed in vivo imaging studies with an animal SPECT machine. Unfortunately, high uptake of radioactivity in the liver was observed and tumor could not visualized.

研究分野：分子イメージング・病態機能分析学

キーワード：放射性医薬品 がん PET SPECT ミトコンドリア 膜電位 多剤耐性輸送タンパク

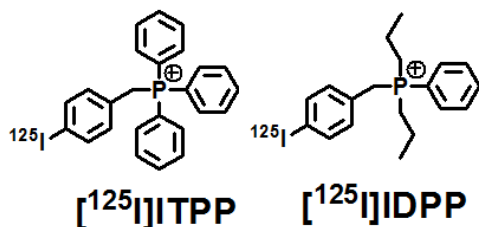
1. 研究開始当初の背景

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、あるいは分子標的薬等化学療法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には困難な面もある。

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、重要な示唆を与えうる。

申請者らはこれまでに光線力学療法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治療効果指標である MTT アッセイ結果と比較検討した。その結果、FDG では治療効果を過大評価するものの、MIBI の取込変化はよく相関していた。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。申請者らはこれまでに、以上のような背景から MIBI と同様に脂溶性カチオンであり、また、MIBI と異なりジェネレーター供給に依存しない放射性ヨウ素標識薬剤として、構造改変の柔軟性の高いホスホニウムカチオン誘導体を開発してきた (図 1、ITPP や IDPP)。その結果、本薬剤は正常動物ではミトコンドリア膜電位が高い心筋に高い集積性を示すとともに (図 2)、インビトロ実験系では腫瘍細胞のミトコンドリア膜電位に依存して集積することを示した (図 3)。残念ながら

図 1



本薬剤は MIBI 同様に多剤排出系により輸送され細胞外に汲み出されることが判明し、インビボでは腫瘍の画像化ができない。したがって、当該多剤排出系により汲み出されないような誘導体化をすることにより、インビボにおいてもインビトロと同様にミトコンドリア膜電位に依存した集積を示すイメージングプローブとして有効となると確信した。

図 2

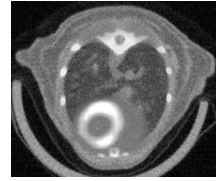
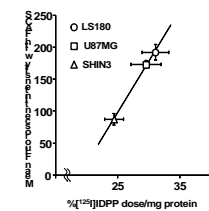


図 3

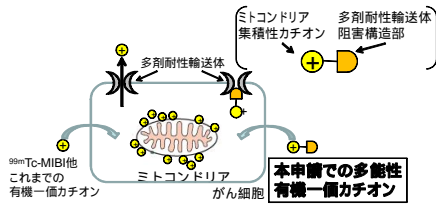


2. 研究の目的

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、利用の汎性の高い手法により評価可能なインビボ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すものである。

また、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、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より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多くの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。このような観点から申請者らはこれまで、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-tetraphenylphosphonium (H-3-TPP) の誘導体である放射性ヨウ素標識体 ITPP や IDPP を開発してきた (図 1)。本化合物は所期の通り、インビトロではミトコンドリア膜電位に依存した集積を示すことが示されたが、残念ながらインビボでは多剤排出機構により排出されることが示された。そこで、本構造に多剤排出機構のインヒビター構造を付加することで、ミトコンドリア膜電位に依存して集積し、そのまま腫瘍細胞内に留まる薬剤設計を考案した (図 4)。ITPP 誘導体は、これまでの検討からホスホニウムカチオンであれば、他の構造の柔軟性は高い。そこで、これまでに多剤排出機構のインヒビターとして知られている化合物を導入した薬剤設計を行うことにより、多剤排出機構により排

図 4



出されないミトコンドリア膜電位依存性集積を示す新規イメージング薬剤の開発を行うことを目的とする (図 4)。

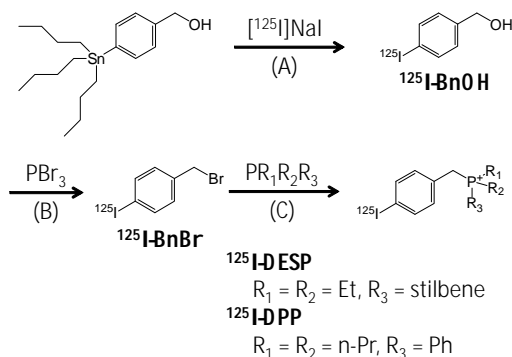
### 3. 研究の方法

以下の研究において動物を用いる実験についてはあらかじめ浜松医科大学動物実験倫理委員会による審査・承認を受けて実施した。

#### ヨウ素標識リンスチルベン誘導体の合成

スチルベンは多剤排出機構に対し阻害効果を有することが知られており、生体内動態に大きな影響を及ぼしやすい官能基を有していない。そこで、スチルベン導入ホスホニウムカチオンを合成することとした (図 5)。すなわち、(A) Sn-BnOH 0.01 mg、過酸化水素水 10 μL、0.1 N HCl を混和し、室温にて 30 分間撹拌した。次いで <sup>125</sup>I-BnOH を逆相 Sep Pak にて精製し、メタノール溶液として抽出後、飛ばしきらないようにメタノールを減圧留去した。残渣から標識体をエーテル抽出しエーテル層を生食で洗浄することで目的物を得た。(B) 次いで PBr<sub>3</sub> 50 μL を添加し、40 °C で 60 分間放置することで水酸基を臭素化した。ここに水を加えることにより PBr<sub>3</sub> クエンチし、エーテル抽出して目的物を得た。(C) 次いで、PR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>3</sub> を 25 μmol 添加し、40 °C で数日間撹拌した。<sup>125</sup>I-DESP の場合、RP-HPLC で精製し、目的物分画を回収し、溶媒を完全に減圧留去後、5%脱酸素エタノール/脱酸素生食に溶解して目的物を得た。

図 5



#### 標識体の安定性に関する検討

上記の反応を行い、最終生成物を得た際、時間の経過に伴い分解することが認められたので、PBS 溶液中および血漿中での安定性について検討し、安定化法を探索することとし

た。すなわち、標識体溶液を PBS 中あるいはマウス血漿中に混和し、一定時間経過後に TLC および HPLC で分析することにより安定性の評価を行った。またこの際、アスコルビン酸を添加することによる安定性の変化について同様に検討した。

#### 標識体の脂溶性の比較

これまでに得られていた他のヨウ素標識リン誘導体と、上記により得られたヨウ素標識リンスチルベン誘導体である <sup>125</sup>I-DESP の pH7.4 における脂溶性について常法に従って検討した。

#### 標識体の腫瘍細胞への取り込みおよび腫瘍細胞からの洗出しに関する検討

K562 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞) および K562/Vin (K562 細胞から樹立されたピンクリスチン耐性株、P-gp 発現細胞) を用いて取込実験及び洗出し実験を行った。すなわち、K562 あるいは K562/Vin を  $1 \times 10^6$  個/500 μL RPMI (10% アスコルビン酸入) でディッシュ内に播種し、ここに <sup>125</sup>I-DESP あるいは <sup>125</sup>I-DPP を 0.2 μCi 添加し、37 °C で 0、5、30 分間 インキュベートした。一定時間経過後に一部細胞懸濁液を取り出し、培地を洗浄後、細胞内への取りこまれた放射エネルギーを測定した。また、タンパク量をローリー法により測定し、タンパク量当たりの取込量を求めた。また、同様の細胞にあらかじめ P-gp 阻害薬であるシクロスポリンを取り込ませ、一旦洗浄後に上記と同様の取り込み実験を施行した。

また、上記同様に K562 および K562/Vin に <sup>125</sup>I-DESP あるいは <sup>125</sup>I-DPP 0.2 μCi を 37 °C で 30 分間インキュベートすることにより取り込ませた後、懸濁液を廃棄して新しい培地に懸濁し、37 °C で 0、5、30 分間引き続きインキュベートした。一定時間経過後に一部細胞懸濁液を取り出し、培地を洗浄後、細胞内への取りこまれた放射エネルギーを測定した。

#### 標識体の体内動態の比較

得られた標識体の体内動態を比較するため、<sup>125</sup>I-DESP あるいは <sup>125</sup>I-DPP 0.2 μCi を 6 週齢のオス ddY に投与し、一定時間経過後に各臓器を摘出し、重量測定後に取り込み放射エネルギーをカウンタを用いて測定した。結果は %dose/g で評価した。

### 4. 研究成果

#### ヨウ素標識リンスチルベン誘導体の合成

第一ステップの <sup>125</sup>I-BnOH の合成では、HPLC 分析により確認した反応効率 100%、収率  $87.2 \pm 6.0\%$  であった。第二ステップの <sup>125</sup>I-BnBr の合成では、HPLC にて確認した反応効率はほぼ 100% であり、収率  $89.3 \pm 3.4\%$  であった。第三ステップによる <sup>125</sup>I-DESP の合成では、HPLC による反応効率は 50-100% とばらついた。収率は  $45.6 \pm 16.5\%$  であった。



また、溶解直後の純度は 95%であったが、24 時間後には 90%前後に低下した。目的物であるヨウ素標識リンステルベン誘導体を高収率で所期の通り得ることが出来た。しかしながら第三ステップの反応効率にばらつきが認められ更なる反応条件の工夫が必要であると考えられた。また、同時に水溶液中での不安定性が認められた。

#### 標識体の安定性に関する検討

PBS 溶液中および血漿中での安定性について TLC および HPLC で分析したところ、PBS 溶液中では混和 1 時間後に約 40%が分解することが認められた。また、マウス血液より得た血漿中に混和し 37 °C で放置しエタノールによる除タンパク後に分析したところ、タンパク結合率は混和 6 時間後まで 5%以下と低く、また、混和 3 時間後までは 90%以上の安定性を維持していることが認められた。水溶液中での安定性を維持する必要が認められたので、アスコルビン酸を添加し、安定性に与える影響について評価したところ、アスコルビン酸添加により 3 時間後まで 90%以上が母体標識体として存在することが示され、アスコルビン酸添加により安定性が改善されることを見出された。ただし、アスコルビン酸添加においても 6 時間後には分解が進むことが示され、調製後はすみやかに使用する必要があることが示された。

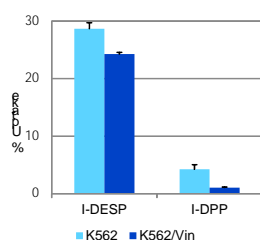
#### 標識体の脂溶性の比較

これまでに得られていた <sup>125</sup>I-DPP と、上記により新たに得られたスチルベン誘導体である <sup>125</sup>I-DESP の pH7.4 における脂溶性について常法に従って検討したところ、<sup>125</sup>I-DPP の logD<sub>7.4</sub> が 0.61 であり、<sup>125</sup>I-DESP では 0.80 であった。したがって、スチルベンが構造中に導入されたことによりわずかながら脂溶性が増加することが示された。このことは一価のイオン性化合物が細胞膜を透過する場合、優位に働くものと期待された。

#### 標識体の腫瘍細胞への取り込みおよび腫瘍細胞からの洗出しに関する検討

K562 (ヒト慢性骨髄性白血病細胞) および K562/Vin (K562 細胞から樹立されたビンクリスチン耐性株、P-gp 発現細胞) を用いて取込実験を行ったところ、<sup>125</sup>I-DPP に比べて <sup>125</sup>I-DESP は約 6.7 倍の高い取込が認められた。また、<sup>125</sup>I-DPP では P-gp が発現している K562/Vin には K562 に比較して約 25%しか取

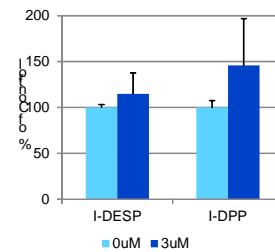
図 6



込が無かったのに対し、<sup>125</sup>I-DESP では約 85%の取り込みが認められた(図 6)。また P-gp 阻害剤であるシクロスポリン 3

μM を添加した場合、<sup>125</sup>I-DPP では 46%の取り込み増加が観られたのに対し、<sup>125</sup>I-DESP では 15%の取り込み増加だった(図 7)。これらの結果から、

図 7



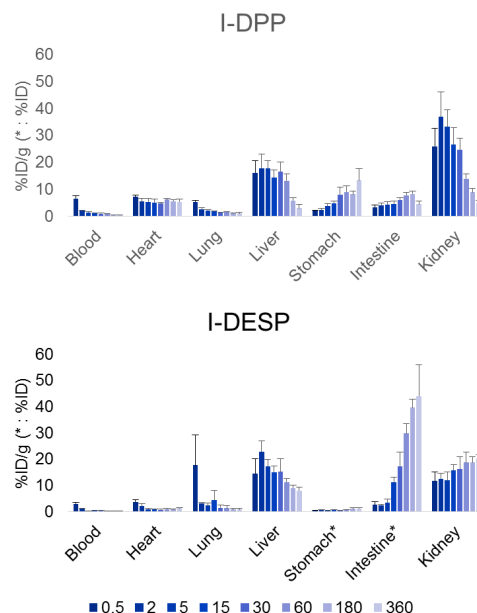
<sup>125</sup>I-DESP も <sup>125</sup>I-DPP と同様に P-gp の基質となるものの、取り込み量に対する P-gp による排出の寄与は <sup>125</sup>I-DPP と比較して低いことが示され、本化合物デザインの POC を得ることが出来たと考えられた。

次いで、一旦細胞に取り込まれた <sup>125</sup>I-DESP あるいは <sup>125</sup>I-DPP の細胞からの洗出しについて検討したところ、K562/Vin では <sup>125</sup>I-DPP はシクロスポリン存在下で洗出しが大きく減少したものの、<sup>125</sup>I-DESP では若干の減少を認めるのみであった。このことから、スチルベン残基を導入することにより P-gp による排出を抑制させるというドラッグデザインが機能していることが示された。

#### 標識体の体内動態の比較

図 8 に生体内分布の結果を示す。<sup>125</sup>I-DESP は <sup>125</sup>I-DPP に比べて投与後早期から血液クリアランスが早いことが示された。それに対し、肺および肝臓に高い取込が観られた。<sup>125</sup>I-DPP で認められた心臓への放射能の貯留が大きく無く、そのため <sup>125</sup>I-DPP と同様の心筋/血液比が得られるまでに投与後 6 時間を要した。また時間と共に腸管への取り込みが高くなることが認められ、肝臓内へ取り込まれた放射能が代謝され胆嚢から腸管内へ排出され

図 8



ているものと予想された。また、脱ヨウ素化の指標となる胃への集積は  $^{125}\text{I}$ -DPP に比べて低く、経時的な増加も認められなかったことから、生体内での脱ヨウ素化は受けていないことが示唆された。

#### 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 2 件)

1. Liu J, Ogawa M, Sakai T, Takashima M, Okazaki S, Magata Y. Differentiation of tumor sensitivity to photodynamic therapy and early evaluation of treatment effect by nuclear medicine techniques. Ann Nucl Med. 27(7):669-675 2013.

2. Sakai T, Saito Y, Takashima M, Ogawa M, Magata Y. Development of Radioiodinated Lipophilic Cationic Compounds for Myocardial Imaging. Nucl Med Biol. 42(5):482-487 2015.

[学会発表](計 0 件)

[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 (YASUHIRO MAGATA)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：20209399

##### (2)研究分担者

阪原 晴海 (HARUMI SAKAHARA)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：10187031

鈴木 千恵 (CHIE SUZUKI)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：20637285

小川 美香子 (MIKAKO OGAWA)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：20344351

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：