

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461889

研究課題名(和文)チミジンホスホリラーゼのイメージングによるがん治療効果予測の実証

研究課題名(英文) Prediction of efficacy of anticancer agents by in vivo imaging of thymidine phosphorylase

研究代表者

秋澤 宏行 (AKIZAWA, Hiromichi)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90311795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤である5-フルオロウラシルやそのプロドラッグは、チミジンホスホリラーゼ(TP)という酵素による代謝を受けて、抗がん効果を発揮する構造にかわる。そこで、がんにおけるTPの発現量を、私たちが開発したイメージング技術によって調べることににより、これらの抗がん剤の治療効果を予測することが可能か検討した。その結果、TP発現量が多いがんほど高い治療効果が得られる可能性が示されたが、その他の要因によっても治療効果が影響を受ける可能性が示された。したがって、私たちが開発したイメージング技術は抗がん剤の治療効果予測に利用できるが、その予測の際には注意を払う必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Anticancer agents, 5-fluorouracil and its prodrugs, are activated by the action of an enzyme, thymidine phosphorylase (TP). In this study, we evaluated whether the efficacy of the anticancer agents could be predicted by the estimation of TP levels in cancer tissues by our in vivo imaging technique. In vitro studies showed that the higher efficacy of the anticancer agents could be obtained in the cancer cells with the higher level of TP and that factors rather than TP could also affect the efficacy. Therefore, our in vivo imaging technique for estimation of TP levels could be used for predicting the efficacy of the anticancer agents although attention would be required in diagnosis.

研究分野：放射薬品化学

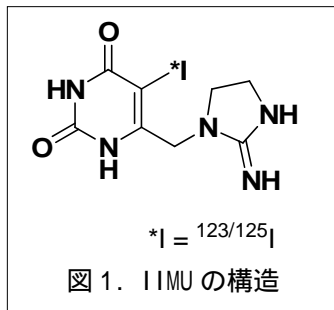
キーワード：核医学 イメージング 抗がん剤 治療効果予測 チミジンホスホリラーゼ 5-フルオロウラシル カベシタピン ドキシフルリジン

1. 研究開始当初の背景

がんの診断には、がんの所在を突き止めるだけでなく、がんの性質を明らかにすることによって、治療方針の決定により強く貢献することが求められる。核医学イメージングは機能診断を得意とすることから、私達は、がんの性質を評価するための核医学イメージング薬剤の開発に取り組んでいる。

がん核医学イメージングの標的として私達が着目したのは、チミジンホスホリラーゼ (TP) である。本酵素は核酸代謝に関与する酵素であり、抗がん剤の 5-フルオロウラシル類の活性化に関与することが知られている。すなわち、5-フルオロウラシル (5-FU) が細胞毒性を発現するには、TP による代謝を受ける必要があり、また、カペシタピンやドキシフルリジン (5'-DFUR) といった一部の 5-FU のプロドラッグは、5-FU に変換されるために TP による代謝を受けなければならない。このことは、TP の発現レベルや活性のイメージングにより、5-FU 類を用いるがん治療の効果が予測可能なことを示す。

私達は研究費申請前に既に、TP 阻害剤を基に放射性イメージング剤、5-[^{123/125}I]iodo-6-[(2-iminoimidazolidinyl)methyl]uracil (IIMU; 図 1) を設計、合成し、IIMU が TP 発現レベルに対応してがんに集積することを確認していた。研究開始時は、IIMU の前臨床試験を進めているところであり、IIMU の臨床の有用性に関するデータを収集すべく、研究活動を行っていた。



2. 研究の目的

本研究は、5-FU 類 (5-FU、カペシタピン、5'-DFUR) によるがん治療の効果予測が、私達が開発した IIMU を用いる TP イメージングによって実現できることを実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TP 発現レベルの高い A431 細胞と低い AZ521 細胞を、様々な濃度の 5-FU の存在下または非存在下で培養した後、MTT 法の変法である WST-1 法に基づいて細胞ミトコンドリア脱水素酵素活性を測定することにより、細胞の viability を評価し、細胞の増殖率を求めた。

(2) TP 発現レベルの高い A431 細胞または低

い AZ521 細胞をマウスに移植した。移植 11 日後に 5-FU を含む、または、含まない溶液の投与を開始し、その後も 3 または 4 日おきに投与を継続した。初回投与日から 24 日後まで腫瘍サイズを計測した。

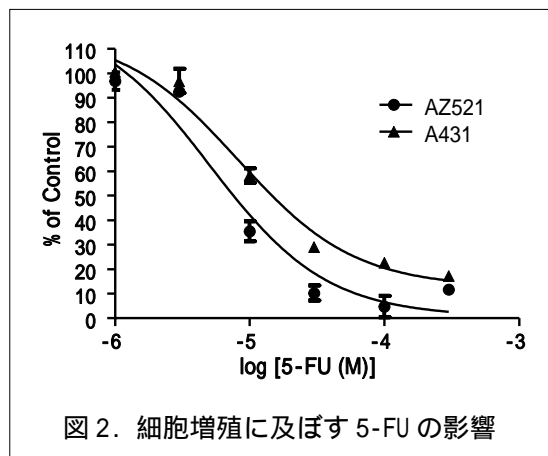
(3) 5-FU または 5'-DFUR の存在下または非存在下で A431 細胞を培養した後、ウェスタンブロッティングにより TP 発現量を確認した。また、WST-1 法に基づいて細胞の viability を評価した。また併せて、5-FU 類存在下、非存在下での IIMU の取り込みについても検討した。

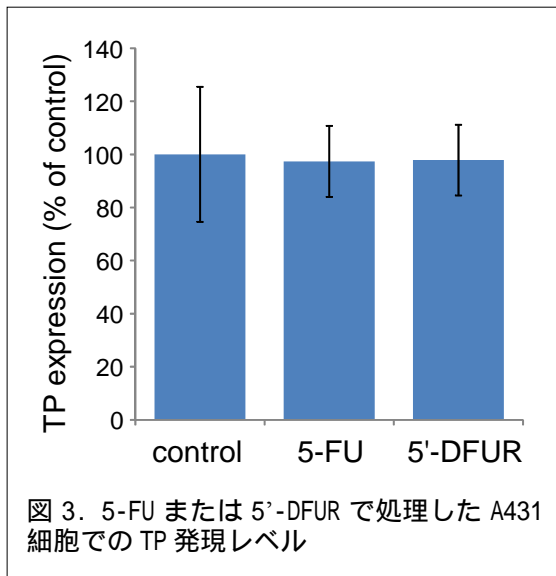
(4) TP siRNA を用いて、もともとは高発現している TP をノックダウンした A431 細胞を作成した。得られた細胞を 5-FU の存在下または非存在下で培養し、WST-1 法で細胞の増殖率を求めた。なお、コントロールには、ランダムな配列の siRNA で処理した A431 細胞 (ネガティブコントロール; NC) を用い、細胞での TP 発現レベルはウェスタンブロッティングにより確認した。

4. 研究成果

(1) がん細胞での TP 発現レベルが高いほど 5-FU への感受性が高くなるかを調べるため、まず、TP 発現レベルの高い A431 細胞と低い AZ521 細胞について、5-FU が細胞増殖を阻害する効果を評価し、比較した。図 2 の縦軸は、5-FU 非存在下での増殖率を 100% としたときの値を示す。当初の予想に反して、TP 発現レベルの低い AZ521 細胞の方が 50% 阻害濃度が低く、5-FU に対する感受性が高いという結果が得られた。

(2) 上記 (1) の検討と同じ目的で、TP 発現レベルの高い A431 細胞または低い AZ521 細胞を移植したマウスに 5-FU を含むあるいは含まない溶液を投与し、がん組織の体積を経時的に計測することにより、5-FU ががんの増殖を抑制する効果を評価した。A431 細胞を移植したマウスでは、5-FU 投与群の 24 日後における腫瘍サイズの平均値は、5-FU を含まない溶液を投与したコントロール群の約 66% であ

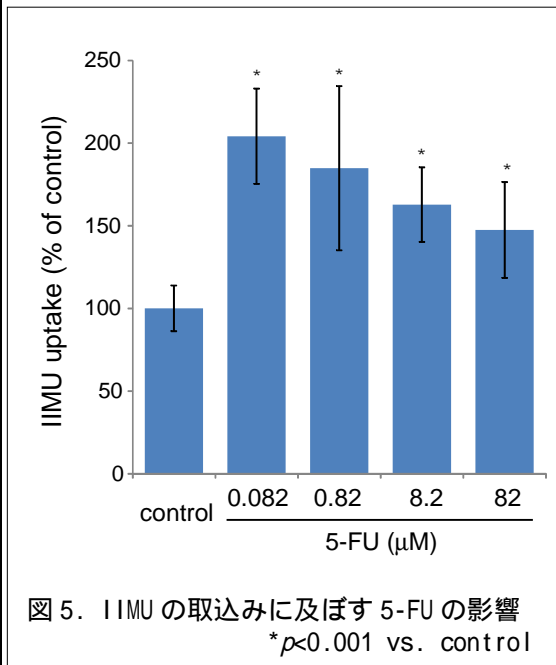
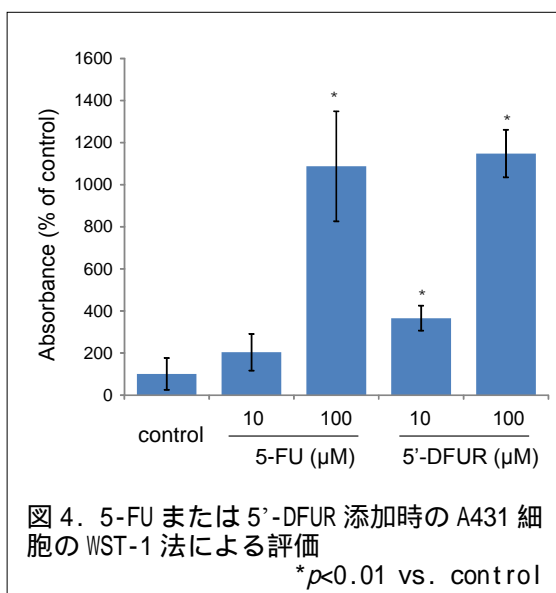




ったのに対し、AZ521 細胞を移植したマウスでは、5-FU 投与群の腫瘍サイズはコントロール群の約 79%であり、TP 発現レベルの高い A431 でより強く増殖が抑制される傾向が認められた。しかし、ばらつきが非常に大きく、有意差は認められなかった。

(3) 前述までの検討から、がんでの TP 発現と IIMU 集積は対応するものの、予想に反し、TP 発現と 5-FU 系抗がん剤の治療効果は必ずしも対応しない可能性が示された。5-FU 類による処理自体が細胞の TP 発現レベルを変化させたり、抗がん剤の取り込みに影響を与えたために、予想に反した結果が得られた可能性もあると考え、5-FU または 5'-DFUR を含む培地で培養後の A431 細胞、あるいは、抗がん剤存在下の A431 細胞について、いくつかの評価を行った。

ウェスタンブロットングによる検討から、5-FU または 5'-DFUR 存在下で培養した細胞での TP 発現レベルは、薬剤の非存在下で培養したコントロール細胞と同程度である



ことが示された (図 3)。したがって、5-FU 類の処理によって TP 発現レベルが変化することが、予想に反する結果が得られた原因となった可能性は否定された。

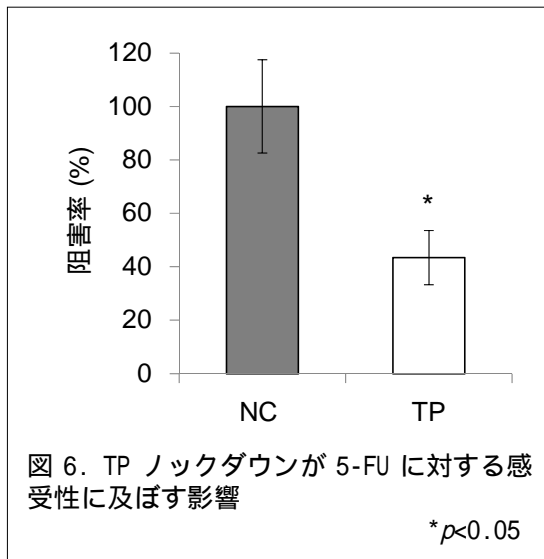
図 4 は、5-FU または 5'-DFUR を含む培地で培養後の A431 細胞を WST-1 法で評価した結果を示す。縦軸は、抗がん剤非存在下で培養したコントロール群の細胞が示した吸光度を 100%としたときの値を示す。コントロール群と比べ、5-FU 類で処理した群では吸光度が高く、ミトコンドリア酵素による反応を促進させる何らかの変化が細胞で起こっていることが確認された。ミトコンドリア酵素の活性化、膜透過性の上昇など種々の原因が考えられるが、その特定のための検討は実施できていない。

一方で、5-FU 存在下、非存在下での IIMU の取り込みを検討した。その結果、図 5 に示すように、抗がん剤が IIMU の取り込み量に影響を及ぼす可能性が示された。

以上の結果は、仮に 5-FU 等による治療を開始した後に IIMU を用いる TP イメージングで治療効果予測を行うことがあった場合には、注意が必要であることを示す。

(4) (2)までの検討から、がんでの TP 発現と IIMU 集積は対応するものの、予想に反し、TP 発現と 5-FU 系抗がん剤の治療効果は必ずしも対応しない可能性が示された。予想に反する結果が得られた原因の一つとして、抗がん剤の取り込みに関与する輸送体などの TP 以外の発現も、実験に用いた 2 種類の細胞 (A431 細胞と AZ521 細胞) の間で大きく異なっていたことが考えられた。そこで、TP を高発現する A431 細胞と TP をノックダウンした A431 細胞を用いて、5-FU 系抗がん剤の治療効果と TP 発現レベルとの対応を検討した。

ウェスタンブロットングでの検討から、



siRNA 処理 24-72 時間後の細胞では、TP の発現レベルが低減していることが確認された。そこで、siRNA 処理 24-72 時間の細胞について、5-FU に対する感受性を検討した。その結果を図 6 に示す。ここで阻害率は、ランダムな siRNA で処理した A431 細胞（ネガティブコントロール細胞；NC）における 5-FU による増殖阻害率を 100%としたときの値を示す。5-FU による細胞の増殖の阻害率は、TP をノックダウンした A431 細胞（TP）の方がネガティブコントロール細胞（NC）と比べて低かったことから、TP 発現レベルは 5-FU 系抗がん剤に対する感受性に影響を及ぼし、その発現レベルが高いほど 5-FU 系抗がん剤により高い治療効果が得られる可能性があると考えられる。したがって、IIMU を用いる TP イメージングは 5-FU 系抗がん剤の治療効果予測に寄与しうると考えられる。

(5) 以上をまとめると、私達が開発した IIMU を用いる TP イメージングは、5-FU 系抗がん剤の治療効果予測に貢献できる可能性があると考えられる。ただし、予測をする際には、TP 以外の要素が治療効果に影響を与える可能性について留意する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋澤宏行 (AKIZAWA, Hiromichi)
昭和薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：90311795

(2) 研究分担者

大倉一枝 (OHKURA, Kazue)
北海道医療大学・薬学部・教授
研究者番号：60094827

久下裕司 (KUGE, Yuji)
北海道大学・アイソトープ総合センター・教授
研究者番号：70321958

趙松吉 (ZHAO, Songji)
北海道大学・医学研究科・特任教授
研究者番号：80374239