

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861136

研究課題名(和文) アミノレブリン酸治療効果を予測する新規高感度画像診断プローブの開発

研究課題名(英文) Development of an imaging probe to estimate protoporphyrin IX accumulation induced by aminolevulinic acid

研究代表者

鈴木 千恵 (Suzuki, Chie)

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アミノレブリン酸(ALA)投与時の腫瘍におけるプロトポルフィリンIX(PpIX)蓄積量を定量評価する目的で、C-11標識ALA誘導体([C-11]MALA)を開発した。[C-11]MALAは照射終了から35分と短時間に4.4%の収率で得られ、[C-11]MALAの腫瘍細胞株およびマウス腫瘍への集積量は、それぞれの腫瘍に蓄積するPpIX量と相関し、[C-11]MALAを用いたPETにより、ALA投与時のPpIX蓄積量を予測できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：C-11 labeled aminolevulinic acid derivative ([C-11]MALA) was developed as an imaging probe to estimate tumor protoporphyrin IX (PpIX) accumulation induced by exogenous aminolevulinic acid (ALA). Tumor accumulation of [C-11]MALA was correlated with that of PpIX induced by ALA, suggesting that [C-11]MALA-PET has the potential to estimate ALA-induced PpIX accumulation.

研究分野：放射線医薬品化学

キーワード：核医学 PET アミノレブリン酸 C-11

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因第1位であり、その患者数や死亡者数は年々増加している。また、既存の治療法では治療困難な場合も多く、新たな治療法が開発され続けている。個々の患者に適切な治療を施すために、治療法の選択や効果的な治療の実現に有用な情報を与える診断法の開発が重要性を増している。

5-アミノレブリン酸 (ALA) は、ポルフィリン合成の前駆体であり、生体内に投与するとがん細胞に取り込まれた後に代謝されプロトポルフィリン IX (PpIX) が蓄積することから、PpIX のもつ蛍光を利用したがんの蛍光ガイド下摘出術 (FGR) や、光や超音波に対する増感作用を利用した光線力学療法 (PDT)・音響力学療法 (SDT) が試みられている。ALA 自体は蛍光や光/超音波増感作用を持たず、腫瘍において PpIX が合成されることで蛍光や増感作用を生じるため、腫瘍特異的ながんの診断・治療が期待される。一方で、ALA を投与した際に蓄積する PpIX の量は腫瘍により異なることが知られ、偽陰性や治療効果の個人差につながる。ALA を投与した際に腫瘍に蓄積する PpIX 量や腫瘍内分布を予測することができれば、FGR におけるさらなる腫瘍摘出率の向上や PDT/SDT に適した患者の選択に有用な情報を与えると期待される。

ALA 投与時の PpIX 蓄積量は、PpIX の蛍光測定により直接的に評価可能であるが、蛍光診断は、光の組織透過性が低いことから、体深部に存在する腫瘍の非侵襲的評価は困難である。一方、がんの画像診断に汎用される X 線-コンピュータ断層法 (CT) や核磁気共鳴画像法 (MRI)、および陽電子断層撮像法 (PET) や単一光子断層撮像法 (SPECT) などの核医学検査は、組織透過性の高い放射線やラジオ波を利用した画像化法で、腫瘍の位置に関わらず評価が可能である。これまでにガドリニウム造影 MRI (Gd-MRI) 診断や、L-[methyl-¹¹C]-methionine ([¹¹C]MET) や O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine ([¹⁸F]FET) を用いた PET 診断により ALA 投与時の PpIX 蓄積部位の予測が試みられているが、いずれの画像診断法も PpIX の分布を完全には反映しなかった。これは、Gd-MRI および、[¹¹C]MET や [¹⁸F]FET を用いた PET が PpIX 蓄積機序ではなく、それぞれ、脳腫瘍における血液脳関門の破綻やアミノ酸代謝を評価していることに起因すると考えられる。そこで、ALA の腫瘍への取り込みや腫瘍における代謝といった PpIX 蓄積機序に着目した新たな診断法の開発が求められる。

ALA 投与時の PpIX 蓄積量を決定する主要因として、ALA のトランスポーターを介した腫瘍細胞内への取り込みと、細胞内における代謝の最初の段階を触媒するアミノレブリン酸デヒドラターゼ (ALAD) の発現量が報告されている。そこで、ALA の細胞取り込みと ALAD による代謝を標的とした核医学

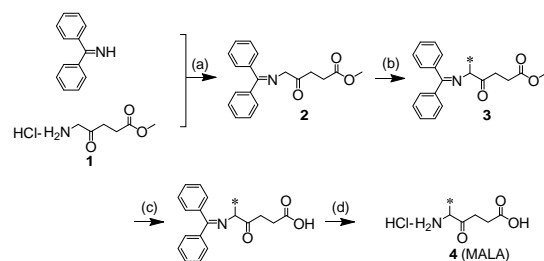
検査により ALA 投与時の PpIX 蓄積量を予測できると考えた。ALA の 5 位にメチル基を導入した 5-amino-4-oxohexanoic acid (MALA) は、ALA と類似した構造をもつことから、ALA と類似した機序により細胞内に取り込まれると期待される。さらに MALA は、ALAD の活性部位に結合することで ALAD を阻害することが知られており、細胞内に取り込まれた MALA は、ALAD の発現量に応じて ALAD と結合し、細胞内に滞留すると考えられる。こうした動態から、MALA は、ALA の腫瘍細胞への取り込みと ALAD による ALA 代謝を反映し、PpIX 蓄積量を予測できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ALA 投与時の PpIX 蓄積量を体外から非侵襲的に予測する手法を開発するため、MALA の放射標識体の標識合成法の確立と、その有用性を培養細胞および腫瘍モデル動物を用いて基礎的に評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MALA の放射標識体の標識合成法の開発
Scheme 1 に示す通り合成を行った。



Scheme 1. [¹¹C]MALA の標識合成

(a) ジクロロメタン, (b) [¹¹C]ヨウ化メチル, TBAF, DMSO, (c) 水酸化ナトリウム水溶液, (d) 塩酸水溶液。*は ¹¹C 標識位置を示す。

市販の methyl 5-aminolevulinate hydrochloride (**1**) を benzophenone imine と反応させることで、Schiff 塩基型の標識前駆体 (**2**)を得た。**2** は精製後安定に存在しなかったため、標識直前に用時調製した。始めに小スケールの反応で、反応条件の検討を行った。**2** と [¹¹C]ヨウ化メチルを tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) の存在下で反応させた。TBAF を加える時期や量を変化させ、¹¹C メチル化の放射化学的変換率 (RCC) を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いて算出した。

次いで、脱保護に用いる水酸化ナトリウム水溶液の濃度および反応温度を変化させ、脱保護の RCC を HPLC を用いて算出した。

小スケールにおける検討から最適化した反応条件で、[¹¹C]MALA の自動遠隔合成を行った。反応後の溶液を HPLC を用いて精製した。得られた [¹¹C]MALA の放射化学的純度および溶液中安定性を評価した。

(2) 培養細胞および腫瘍モデル動物を用いた ^{11}C]MALA の PET プローブとしての有用性評価

In vitro 実験には 5 種のヒト腫瘍由来細胞株 AsPC-1, Sk-Br-3, U-87 MG, BxPC-3 および MIA PaCa-2 を使用した。各細胞株を ^{11}C]MALA もしくは ^3H]ALA と 37°C で 10 分間インキュベートし、細胞内に取り込まれた放射活性をオートウェルガンマカウンタもしくは液体シンチレーションカウンタを用いて測定した。 ^{11}C]MALA の細胞取り込み機序を推定するため、過剰の非放射性 ALA やトランスポーターの阻害剤 (グリシルサルコシン; Gly-Sr, γ -アミノ酪酸; GABA) を用いて競合阻害実験を行った。

各細胞株の ALAD タンパクの発現量をウェスタンブロットング法で評価した。また、各細胞株に ALA を添加し 4 時間インキュベートした後に、細胞内に蓄積した PpIX 量を蛍光測定により定量し、上述の ^{11}C]MALA や ^3H]ALA の取り込み量および ALAD の発現量と比較した。

In vivo における評価には、正常マウスおよび、AsPC-1, U-87 MG, BxPC-3 もしくは MIA PaCa-2 をマウス上腕部皮下に移植し作製した腫瘍モデルマウスを使用した。 ^{11}C]MALA および ^3H]ALA を、正常マウスおよび各腫瘍モデルマウスに尾静脈より同時に投与し、一定時間後に臓器を摘出し、重量と放射活性を測定した。また、各腫瘍モデルマウスに ^{11}C]MALA を尾静脈より投与し、投与直後から 90 分間 dynamic PET 撮像を行った。AsPC-1 移植マウスに過剰の ALA を ^{11}C]MALA と同時投与し、解剖法により血液中放射活性を、dynamic PET 撮像により腫瘍集積を評価した。

各腫瘍モデルマウスに ALA を投与した 4 時間後に腫瘍を摘出・ホモジナイズし、抽出液の蛍光を測定することで腫瘍ごとの PpIX の蓄積量を評価した。AsPC-1 移植マウスに ALA と ^{11}C]MALA を投与し、一定時間後に腫瘍を摘出・凍結切片を作製し、オートラジオグラフィ (ARG)、蛍光顕微鏡観察、蛍光免疫染色により、 ^{11}C]MALA の放射活性と PpIX 蓄積、ALAD タンパク発現の腫瘍内分布を評価した。

4. 研究成果

(1) MALA の放射標識体の標識合成法の開発

化合物 **1** と benzophenone imine を 2:1 で混合することで、1 時間以内に benzophenone imine が完全に消失し、**2** を得た。 ^{11}C -メチル化の RCC は、**2** に ^{11}C]methyl iodide 溶液を加える 10 分前に TBAF 溶液を加えた場合 (Method A) と比較して、 ^{11}C]methyl iodide 溶液を加えた直後に TBAF 溶液を加えた場合 (Method B) に高く、1.0 μmol の TBAF を加えたとき、75.6 \pm 6.4 % と最も高い RCC で ^{11}C -メチル化が進行した (表 1)。

表 1. ^{11}C -メチル化収率

Entry	TBAF (μmol)	Method	RCC ^a (%)
1	1.0	A	2.8
2	10	A	5.1
3	0.5	B	40.8 \pm 18.4
4	1.0	B	75.6 \pm 6.4
5	1.5	B	75.6
6	10	B	40.2

^a RCC は、減衰補正後のラジオクロマトグラムから算出した。

高濃度の水酸化ナトリウム水溶液の使用や高温での脱保護反応では、 ^{11}C]MALA より脂溶性の高い副生成物を生じた。0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加え室温で 90 秒間反応させ、次いで 0.4 M 塩酸溶液を加え室温で 90 秒間反応させることで、 ^{11}C]MALA を 51.9 \pm 8.2% の RCC で得た。

自動遠隔合成では、11.8~29.6 GBq の ^{11}C]CO₂ を用いて、照射終了から 35 分程度と短時間に、放射化学的収率 4.4 \pm 1.7%、放射化学的純度 97.5 \pm 1.9% で ^{11}C]MALA を得た。得られた ^{11}C]MALA の生理食塩水溶液 (206.0 MBq/mL) は、室温で 60 分後まで安定に存在した。

(2) 培養細胞および腫瘍モデル動物を用いた ^{11}C]MALA の PET プローブとしての有用性評価

In vitro 細胞取り込み試験において、 ^{11}C]MALA は、AsPC-1 細胞に最も多く取り込まれ、次いで Sk-Br-3、U-87 MG の順に多く取り込まれ、BxPC-3 と MIA PaCa-2 への取り込みは極わずかであった。 ^3H]ALA の取り込み量は、5 種の細胞株間で大きな差は認められず、5 種の細胞株間における ^{11}C]MALA と ^3H]ALA の取り込み量に相関関係は認められなかった。 ^{11}C]MALA の取り込みは、非標識 ALA により濃度依存的に阻害された。また、ALA の細胞取り込みにはペプチドトランスポーターやベータトランスポーターの関与が知られるため、これらのトランスポーターの阻害剤を用いて競合阻害試験を行ったところ、 ^{11}C]MALA の取り込みは、ペプチドトランスポーターの阻害剤 (Gly-Sar) およびベータトランスポーターの阻害剤 (GABA) によっても濃度依存的に阻害され、ALA と共通した機序により細胞内に取り込まれることが示された (図 1)。これらの結果は、 ^{11}C]MALA は ALA と共通した機序により細胞に取り込まれるものの、両者の取り込み量は相関関係にないことを示し、両者は、細胞内における代謝や排出といった挙動が異なることを示唆する。

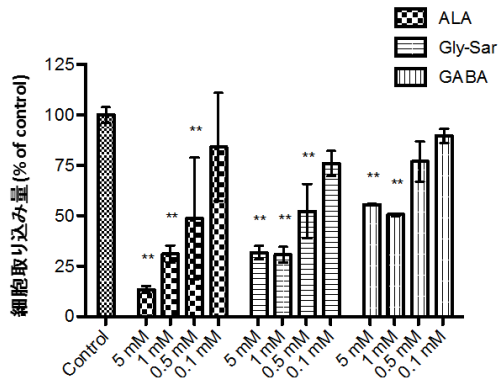


図 1. $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ 細胞取り込みの競合阻害
Gly-Sar: ペプチドトランスポーターの阻害剤, GABA: ベータトランスポーターの阻害剤, ** $P < 0.01$ vs control.

ウェスタンブロッティング法により評価した ALAD の発現量は、AsPC-1、Sk-Br-3、U-87 MG の順に高く、BxPC-3 と MIA PaCa-2 では低値であった。*In vitro* において ALA とインキュベートした際に細胞内に蓄積した PpIX 量は AsPC-1 で最も高く、Sk-Br-3 では AsPC-1 の 40%程度、残る 3 種では 30%未満であった。 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の細胞取り込み量は、ALAD 発現量および PpIX 蓄積量と相関した。これらの結果は、細胞内に取り込まれた $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ が ALAD と結合することで細胞内に滞留し、ALAD 発現量や PpIX 蓄積量を反映することを示唆する。

$[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ をマウス尾静脈より投与したところ、 $[^3\text{H}]\text{ALA}$ と同様に投与後速やかに血液から消失し、尿中へと排泄された。腫瘍放射活性は、投与後速やかに上昇し、投与 1 分後における $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ と $[^3\text{H}]\text{ALA}$ の腫瘍と筋肉における集積量の比は、正の相関を示した。 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍からの消失は、ALAD の発現量が高い AsPC-1 で最も遅く、残る 3 種の腫瘍からは速やかに消失した (図 2)。

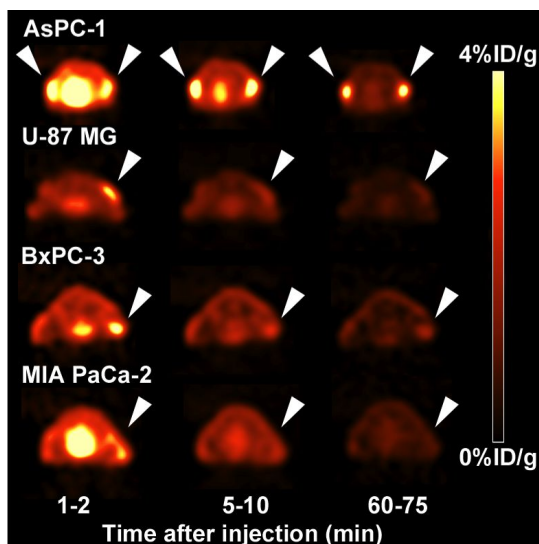


図 2. 腫瘍モデルマウスにおける $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ 体軸横断面 PET 画像。矢印は腫瘍の位置を示す。

過剰の非放射性 ALA を用いた *in vivo* 競合阻害実験において、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の血液クリアランスは変化しなかった一方、ALA の投与量依存的に腫瘍への初期取り込みの低下と腫瘍からの消失速度の増加が認められ、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍取り込みと滞留の双方が ALA により阻害されることが示された。これらの結果から、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ が ALA と類似した機序により細胞に取り込まれた後に ALAD と結合して細胞内に滞留することで、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の初期取り込み量が ALA の細胞取り込みを、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍からの消失速度が ALAD の発現量を反映したと考えられる。

In vivo において ALA を投与した際に腫瘍に蓄積した PpIX の量は、AsPC-1 で最も高く、残る 3 種の腫瘍では低値であった。各腫瘍における PpIX 蓄積量と $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の投与 60 分後における腫瘍集積量は相関した (図 3)。また、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍内分布は、同一切片における PpIX の高蓄積部位および ALAD の高発現部位と類似した傾向を示し、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ -PET を用いて PpIX の腫瘍内分布を予測できる可能性を認めた。

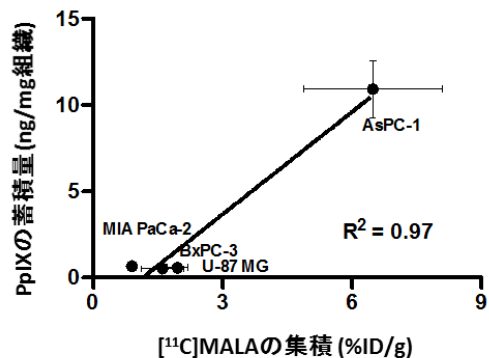


図 3. *In vivo* における $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の投与 60 分後における腫瘍集積量と ALA 投与 4 時間後の PpIX 蓄積量の関係

以上の結果より $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ -PET は、ALA の細胞取り込みと ALAD による細胞内における代謝を反映することで、ALA 投与時の PpIX 蓄積量を非侵襲的に評価できると期待される。

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)

Chie Suzuki, Atsushi B. Tsuji, Koichi Kato, Tatsuya Kikuchi, Hitomi Sudo, Maki Okada, Aya Sugyo, Ming-Rong Zhang, Yasushi Arano, Tsuneo Sga, Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo-[6- ^{11}C]Hexanoic Acid as

an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid, Journal of Nuclear Medicine, 査読あり, Vol. 55, 2014, pp. 1671-1677

DOI: 10.2967/jnumed.114.145086

Chie Suzuki, Koichi Kato, Atsushi B. Tsuji, Tatsuya Kikuchi, Ming-Rong Zhang, Yasushi Arano, and Tsuneo Saga, Synthesis and in vitro cellular uptake of ¹¹C-labeled 5-aminolevulinic acid derivative to estimate the induced cellular accumulation of protoporphyrin IX, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 査読あり, Vol. 23, 2013, pp. 4657-4570

DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.06.025. Epub 2013 Jun 20.

〔学会発表〕(計3件)

Chie Suzuki 他、Development of 5-amino-4-oxo-[6-¹¹C]hexanoic acid for estimation of tumor protoporphyrin IX accumulation induced by exogenous aminolevulinic acid, 9th Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, 2015年11月8日~9日, 放射線医学総合研究所(千葉)

Chie Suzuki 他、Radiosynthesis and preclinical characterization of a ¹¹C-labeled aminolevulinic acid derivative as an imaging probe to estimate tumor protoporphyrin IX accumulation induced by exogenous aminolevulinic acid, 2014年8月27日~31日, カンクン(メキシコ)

鈴木千恵 他、5-アミノレブリン酸を使用した光線力学療法の治療効果を予測するPETプローブの開発, 第13回放射性医薬品・画像診断薬研究会, 2013年12月14日, 京都 ガーデンパレス中宴会場「鞍馬」(京都)

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木千恵 (SUZUKI, Chie)

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