

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670642

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫に対する、蛍光・PET dual tracerの開発

研究課題名(英文) The development of fluorescent-PET dual tracer for malignant gliomas

研究代表者

高野 浩司 (Takano, Koji)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：90649203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は5-ALAを用いた術中蛍光診断と、MRIや従来のPET(FDG, 11C-Methionine等)による術前画像診断との相関関係を明らかにし、これらを同期させる新たなPETトレーサーの開発を目的とした。その候補として、新たに開発されたPET用トレーサーであるMALA(5-ALAの誘導体)の動態を解析した。その結果、MALAは悪性腫瘍細胞株に蓄積することが確認され、5-ALAを用いた術中蛍光診断のトレーサーとなるPPIXの蓄積量と有意に相関することがin vitro、及び、in vivoで確認された。MALAは目的に合致したPETトレーサーとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research aimed at developing a new PET tracer, which clarifies the correlation between intraoperative fluorescence diagnosis using 5-ALA and preoperative image diagnosis using MRI or PET (FDG, 11C-Methionine, etc.). As the candidate, a newly developed PET tracer, MALA (derivative of 5-ALA) was analyzed in vitro and in vivo. As a result, it was confirmed that MALA accumulates in a malignant tumor cell line, and that MALA accumulation significantly correlates with the accumulation of PPIX, a tracer for intraoperative fluorescence diagnosis using 5-ALA. MALA could be the PET tracer consistent with the purpose.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：ALA PET 脳腫瘍 術中蛍光診断 術前画像診断 chemical imaging molecular imaging ナビゲーション

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍(特に神経膠腫)に対する外科手術ではMRIやPETなど種々の画像情報を元に、術中ナビゲーションシステムや術中MRIといった手術支援装置を用いて、可及的な腫瘍切除をおこないつつ、正常脳機能を温存することが必要である。また、2013年より、これまでは臨床研究として頻用されていた5-ALA( $\delta$ -アミノレブリン酸)による悪性神経膠腫の術中蛍光誘導下手術(Chemical navigation surgery)が保険収載され、画像誘導下手術(Image guided surgery: IGS)に加えて、Chemical navigation surgeryも広く一般的に行われるようになった。その一方で、申請者等はこれまで $^{11}\text{C}$ -methionine PETといったmolecular imagingと5-ALAによるchemical imagingの相関性について詳細な検討を行ってきた。その結果、 $^{11}\text{C}$ -methionine PETと5-ALAによるchemical imagingには明確な相関関係は認められなかった。これは5-ALAと $^{11}\text{C}$ -methionineがそれぞれ異なる動態を示すトレーサーであるためと考えられる。そこでmolecular imagingとchemical imagingが同期するような新たなトレーサーの開発が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は5-ALAを用いた術中蛍光診断と、MRIや従来のPET(FDG,  $^{11}\text{C}$ -methionine等)による術前画像診断との相関関係を明らかにし、これらを同期させる新たなPETトレーサーの開発を目的としている。その候補として、新たに開発されたPET用トレーサーである5-Amino-4-Oxo-[6- $^{11}\text{C}$ ] Hexanoic Acid (MALA: 5-ALAの誘導体)のin vitro及びin vivoでの動態を解析し、5-ALAによる術中蛍光診断でトレーサーとなるProtoporphyrin IX(PPIX)の細胞内蓄積量との相関性を検討する。MALAはその生体内での挙動が5-ALAと極めて似通っている事が予想され、かつ、PETでその動態を画像化できるものであり、現状では独立しているmolecular imagingとchemical imagingを結びつける可能性を秘めていると考える。

3. 研究の方法

(1)in vitro細胞株におけるMALAと5-ALAの取り込み解析: 各種悪性腫瘍細胞株(AsPC-1, Sk-Br-3, U-87 MG, BxPC-3, MIA PaCa-2)を用いてin vitroでの細胞内のMALA、PPIX蓄積量を測定した。MALA蓄積量は $^{11}\text{C}$ -MALAと共に10分間細胞を培養し、その放射能を用いて測定した。PPIXは1mMの5-ALAと共に4時間細胞を培養し、蛍光量を用いて測定した。また、5-ALAの最初の代謝酵素であるALA dehydratase(ALAD)をWestern Blottingで測定した。さらに別の悪性腫瘍細胞株(A549, Caki-1, DLD-1, T24, U937)でも同様の測定を行った。

(2)免疫不全マウスにおける脳腫瘍モデルの

作成: 免疫不全マウスを麻酔導入後、頭皮を1cm切開しbregmaの2mm右外側、2mm背側の点に穿頭を行い、定位的脳手術機を用いて脳表から3mmの深さに各種悪性腫瘍細胞株(AsPC-1, DLD-1, T24, U87MG, U251)を $3 \times 10^5$ 個移植した。免疫不全マウスとしてはNOD/Shi-scid-IL2R<sup>null</sup>マウス(NOGマウス)もしくはSCIDマウスを用いた。

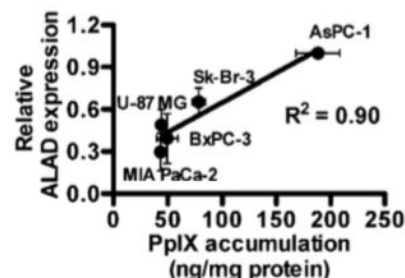
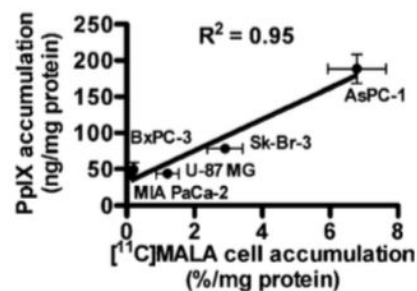
(3)マウスでのMALAの生体内動態解析: マウスに経静脈的に $^{11}\text{C}$ -MALAと $^3\text{H}$ -ALAの混合物を投与した。その後マウスの各臓器における $^{11}\text{C}$ と $^3\text{H}$ の放射能を測定した。

(4)マウス脳腫瘍モデルでのMALA PET imaging: U87MGを用いて(2)の方法でマウス脳腫瘍モデルを作成した。さらに腫瘍細胞移植4週間後に $^{11}\text{C}$ -MALA PETを施行した。 $^{11}\text{C}$ -MALAを静注し、80-90分後の放射能を画像化した。

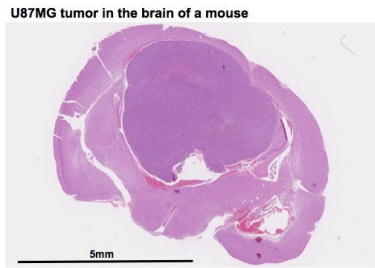
(5)in vivoでのMALAと5-ALAによるPPIXの相関性の検討: 各種悪性腫瘍細胞株(AsPC-1, DLD-1, T24, U87MG)を用いてマウス腫瘍モデルを作成した。腫瘍細胞移植4週間後に腫瘍内のMALA及びPPIX蓄積量を測定した。MALAについては(4)の方法で $^{11}\text{C}$ -MALA PETで測定した。PPIXについては尾静脈より5-ALA 6mgを静注し、投与4時間後に腫瘍を摘出し、蛍光量で測定した。

4. 研究成果

(1)in vitro細胞株におけるMALAと5-ALAの取り込み解析: in vitroにおいて各種悪性腫瘍細胞株におけるMALAとPPIXの蓄積量には強い相関が確認できた( $R^2=0.95$ )。さらに、PPIX蓄積量とALADの間にも強い相関が確認できた( $R^2=0.90$ )。この相関関係は別の細胞株を用いても確認することができた( $R^2=0.88$ )。以上の結果から、細胞内のPPIX蓄積量を $^{11}\text{C}$ -MALA PETで評価できる可能性が示唆された。さらにMALA、PPIXの蓄積量は共にALADの影響を受けている可能性が考えられた。

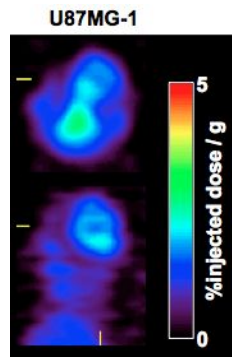


(2)免疫不全マウスにおける脳腫瘍モデルの作成：DLD-1, T24, U87MG では脳内に腫瘍が形成された。AsPC-1 では大半が髄膜癌腫となり、脳内に腫瘍を形成するものは一部のみにであった。U251 は脳内に腫瘍を形成しなかった。

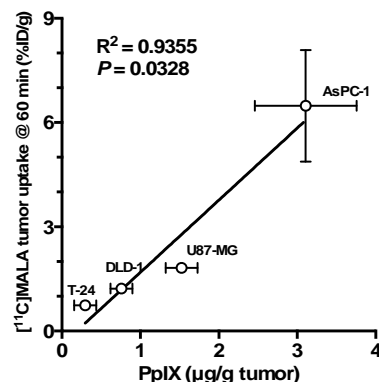


(3)マウスでの MALA の生体内動態解析：血中の  $^{11}\text{C}$  放射能は投与 1 分後に  $10.54 \pm 0.93\% \text{ID/g}$ 、10 分後に  $3.94 \pm 1.80\% \text{ID/g}$  と急速に減少した。10 分後の時点では、各臓器の中で腎臓において最も高い  $^{11}\text{C}$  放射能が確認された ( $91.30 \pm 6.53\% \text{ID/g}$ )。腎臓における放射能はその後急速に低下しており、腎臓が MALA の主な排泄経路と考えられた。

(4)マウス脳腫瘍モデルでの MALA PET imaging：右図の通りマウス脳腫瘍モデルでの MALA PET imaging に成功した。腫瘍内での  $^{11}\text{C}$ -MALA の高い集積が確認された。



(5)in vivo での MALA と 5-ALA による PPIX の相関性の検討：PPIX の蓄積量は AsPC-1, U87MG, DLD-1, T24 の順で多かった。この結果は in vitro での結果とは異なっていた。腫瘍における細胞密度や壊死、血流量などの影響を受けるためと考えられた。一方、MALA の蓄積量も AsPC-1, U87MG, DLD-1, T24 の順で多かった。MALA と PPIX の蓄積量には強い相関が認められた ( $R^2=0.94$ )。これは MALA の蓄積にも PPIX の蓄積と同様に腫瘍における細胞密度や壊死、血流量などの影響を受けるためと考えられた。以上の結果より、MALA は  $^{11}\text{C}$ -methionine PET といった従来の molecular imaging と 5-ALA による chemical imaging を同期させる新たなトレーサーになり得ることが示唆された。



## 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 27 件)

1. Achiha T, Takagaki M, Oe H, Sakai M, Matsui H, Nakanishi K, Ozaki T, Fujimoto Y, Yoshimine T, Nakanishi K, Kinoshita M. Voxel-Based Lesion Mapping of Cryptogenic Stroke in Patients with Advanced Cancer: A Detailed Magnetic Resonance Imaging Analysis of Distribution Pattern. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2017 Mar 28. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.02.038. 査読有
2. Sugyo A, Tsuji AB, Sudo H, Nomura F, Satoh H, Koizumi M, Kurosawa G, Kurosawa Y, Saga T. Uptake of  $^{111}\text{In}$ -labeled fully human monoclonal antibody TSP-A18 reflects transferrin receptor expression in normal organs and tissues of mice. Oncol Rep. 2017 Mar;37(3):1529-1536. doi: 10.3892/or.2017.5412. 査読有
3. Kinoshita M, Arita H, Okita Y, Kagawa N, Kishima H, Hashimoto N, Tanaka H, Watanabe Y, Shimosegawa E, Hatazawa J, Fujimoto Y, Yoshimine T. Comparison of diffusion tensor imaging and  $^{11}\text{C}$ -methionine positron emission tomography for reliable prediction of tumor cell density in gliomas. J Neurosurg. 2016 Nov;125(5):1136-1142. 査読有
4. Kinoshita M, Sakai M, Arita H, Shofuda T, Chiba Y, Kagawa N, Watanabe Y, Hashimoto N, Fujimoto Y, Yoshimine T, Nakanishi K, Kanemura Y. Introduction of High Throughput Magnetic Resonance T2-Weighted Image Texture Analysis for WHO Grade 2 and 3 Gliomas. PLoS One. 2016 Oct 7;11(10):e0164268. doi: 10.1371/journal.pone.0164268. 査読有
5. Takano K, Kinoshita M, Takagaki M, Sakai M, Tateishi S, Achiha T, Hirayama R, Nishino K, Uchida J, Kumagai T, Okami J, Kawaguchi A, Hashimoto N, Nakanishi K, Imamura F, Higashiyama M, Yoshimine T. Different spatial distributions of brain metastases from lung cancer by histological subtype and mutation status of epidermal growth factor receptor. Neuro Oncol. 2016 May;18(5):716-24. doi: 10.1093/neuonc/nov266. 査読有
6. Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, Takuwa H, Masamoto K, Tomita Y, Suzuki N, Imamura T, Koizumi M, Saga T. Establishment and

- evaluation of a new highly metastatic tumor cell line 5a-D-Luc-ZsGreen expressing both luciferase and green fluorescent protein. *Int J Oncol*. 2016 Feb;48(2):525-32. doi: 10.3892/ijo.2015.3300. 査読有
7. Aung W, Tsuiji AB, Sudo H, Sugyo A, Ukai Y, Kouda K, Kurosawa Y, Furukawa T, Saga T. Radioimmunotherapy of pancreatic cancer xenografts in nude mice using 90Y-labeled anti-  $\alpha_6\beta_4$  integrin antibody. *Oncotarget*. 2016 Jun 21;7(25):38835-38844. doi: 10.18632/oncotarget.9631. 査読有
  8. Aung W, Tsuiji AB, Sudo H, Sugyo A, Furukawa T, Ukai Y, Kurosawa Y, Saga T. Immunotargeting of Integrin  $\alpha_6\beta_4$  for Single-Photon Emission Computed Tomography and Near-Infrared Fluorescence Imaging in a Pancreatic Cancer Model. *Mol Imaging*. 2016 Jan 29;15. pii: 1536012115624917. doi: 10.1177/1536012115624917. 査読有
  9. Takano K, Kinoshita M, Arita H, Okita Y, Chiba Y, Kagawa N, Fujimoto Y, Kishima H, Kanemura Y, Nonaka M, Nakajima S, Shimosegawa E, Hatazawa J, Hashimoto N, Yoshimine T. Diagnostic and Prognostic Value of  $^{11}\text{C}$ -Methionine PET for Nonenhancing Gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2016 Jan;37(1):44-50. doi: 10.3174/ajnr.A4460. 査読有
  10. Suzuki C, Tsuiji AB, Kato K, Sudo H, Zhang MR, Saga T. Preclinical evaluation of 2-amino-2-[ $^{11}\text{C}$ ]methyl-butanoic acid as a potential tumor-imaging agent in a mouse model. *Nucl Med Commun*. 2015 Nov;36(11):1107-12. doi: 10.1097/MNM.0000000000000364. 査読有
  11. Kinoshita M, Taniguchi M, Takagaki M, Seike N, Hashimoto N, Yoshimine T. Development of a non-tissue adherent neurosurgical patty and an ex vivo testing system to evaluate adherent characteristics. *J Neurosurg*. 2015 May;122(5):1180-4. doi: 10.3171/2014.9.JNS14347. 査読有
  12. Kinoshita M, Tanaka H, Arita H, Goto Y, Oshino S, Watanabe Y, Yoshimine T, Saitoh Y. Pituitary-Targeted Dynamic Contrast-Enhanced Multisection CT for Detecting MR Imaging-Occluded Functional Pituitary Microadenoma. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015 May;36(5):904-8. doi: 10.3174/ajnr.A4220. 査読有
  13. Tsuiji AB, Sugyo A, Sudo H, Suzuki C, Wakizaka H, Zhang MR, Kato K, Saga T. Preclinical assessment of early tumor response after irradiation by positron emission tomography with 2-amino-[3- $^{11}\text{C}$ ]isobutyric acid. *Oncol Rep*. 2015 May;33(5):2361-7. doi: 10.3892/or.2015.3868. 査読有
  14. Sugyo A, Tsuiji AB, Sudo H, Okada M, Koizumi M, Satoh H, Kurosawa G, Kurosawa Y, Saga T. Evaluation of Efficacy of Radioimmunotherapy with 90Y-Labeled Fully Human Anti-Transferrin Receptor Monoclonal Antibody in Pancreatic Cancer Mouse Models. *PLoS One*. 2015 Apr 20;10(4):e0123761. doi: 10.1371/journal.pone.0123761. 査読有
  15. Suzuki C, Kato K, Tsuiji AB, Zhang MR, Arano Y, Saga T. Inhibition of radical reactions for an improved potassium tert-butoxide-promoted (11)C-methylation strategy for the synthesis of  $^{11}\text{C}$ -methyl amino acids. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2015 Mar;58(3):127-32. doi: 10.1002/jlcr.3259. 査読有
  16. Sugyo A, Tsuiji AB, Sudo H, Nagatsu K, Koizumi M, Ukai Y, Kurosawa G, Zhang MR, Kurosawa Y, Saga T. Preclinical evaluation of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled human antitransferrin receptor monoclonal antibody as a PET probe using a pancreatic cancer mouse model. *Nucl Med Commun*. 2015 Mar;36(3):286-94. doi: 10.1097/MNM.0000000000000245. 査読有
  17. Suzuki C, Tsuiji AB, Kato K, Kikuchi T, Sudo H, Okada M, Sugyo A, Zhang MR, Arano Y, Saga T. Preclinical characterization of 5-amino-4-oxo-[6- $^{11}\text{C}$ ]hexanoic acid as an imaging probe to estimate protoporphyrin IX accumulation induced by exogenous aminolevulinic acid. *J Nucl Med*. 2014 Oct;55(10):1671-7. doi: 10.2967/jnumed.114.145086. 査読有
  18. Takano K, Kinoshita M, Hashimoto N, Tanigami H, Yoshimine T. A reminder about the trigeminocardiac reflex in surgeries at the posterior third of the falx cerebri. *Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management*. 2014 Sep;1(3):47-49. doi: 10.1016/j.inat.2014.06.001. 査読有
  19. Kinoshita M, Sasayama T, Narita Y, Yamashita F, Kawaguchi A, Chiba Y, Kagawa N, Tanaka K, Kohmura E, Arita H, Okita Y, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Hashimoto N, Yoshimine T. Different spatial distribution between germinal

center B and non-germinal center B primary central nervous system lymphoma revealed by magnetic resonance group analysis. Neuro Oncol. 2014 May;16(5):728-34. doi: 10.1093/neuonc/not319. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1. 高野浩司、WT1 ペプチドワクチン療法の治療効果判定：18F-DPA-714 PET の有用性、第34回日本脳腫瘍学会学術集会、2016年12月 山梨
2. 高野浩司、マウスグリオーマ脳腫瘍モデルを用いたWT1 ペプチドワクチン療法の検討、第33回日本脳腫瘍学会学術集会、2015年12月 京都
3. Koji Takano, Different spatial distribution of brain metastasis from lung cancer defined by EGFR mutation status. 20th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology. Nov 2015, San Antonio, Texas, USA
4. 高野浩司、PET、advanced MRI を用いた画像解析における最適な関心領域(ROI)の設定法、日本脳神経外科学会第74回学術総会、2015年10月 北海道
5. 高野浩司、FDG / Methionine PET の非造影神経膠腫に対するグレード診断能と予後予測能、第33回日本脳腫瘍学会学術集会、2014年12月 東京
6. 高野浩司、標準脳座標変換法を用いたEGFR 遺伝子変異による肺がん原発転移性脳腫瘍の脳内分布偏位解析、日本脳神経外科学会第73回学術総会、2014年10月 東京
7. 高野浩司、Spontaneous malignant transformation を来した成人 pilocytic astrocytoma の2例、第32回日本脳腫瘍病理学会、2014年5月 徳島

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高野 浩司 (TAKANO, Koji)  
大阪大学・医学系研究科・招聘教員  
研究者番号：90649203

### (2)研究分担者

木下 学 (KINOSHITA, Manabu)  
地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・脳神経外科副部長  
研究者番号：40448064

畑澤 順 (HATAZAWA, Jun)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：70198745

加藤 孝一 (KATO, Koichi)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・脳病態統合イメージングセンター・室長  
研究者番号：50382198

辻 厚至 (TSUJI, Atsushi)  
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 分子イメージング診断治療研究部・チームリーダー(定常)  
研究者番号：60303559

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )