

令和元年9月21日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10335

研究課題名(和文)チミジンホスホリラーゼ画像化によるがんの治療効果予測：前臨床動物実験による実証

研究課題名(英文) Prediction of response to anticancer therapy by thymidine phosphorylase imaging: pre-clinical proof of concept

研究代表者

趙松吉(Zhao, Songji)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：80374239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、多くのがんが高く発現するチミジンホスホリラーゼ(TP)の発現量を画像化する新しい核医学診断薬(125/123I-IIMU)を開発した。TPは抗がん剤のPaclitaxelの治療や放射線照射により誘導されるため、TPの発現量の定量的画像化により、5-FUやそのプロドラッグの治療の効果が予測可能であると考えられる。本研究では、Paclitaxelの治療により腫瘍組織におけるTP発現量と125I-IIMU集積量が増加し、TP発現と125I-IIMU集積の間強い相関を示した。従って、TP画像化により、5-FUやそのプロドラッグのがん治療の効果予測が可能であることを前臨床動物実験で実証できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が開発した123I-IIMUを用いたTP画像化法は、核医学の特徴である非侵襲性、かつ腫瘍組織のTP発現量を感度よく定量的に評価できるため、世界で初めての5-FUやそのプロドラッグの治療効果を予測可能にすることが本研究の学術的意義がある。本研究において、IIMUを用いたTP画像化によって、5-FUやそのプロドラッグによる治療効果予測が可能なが示されれば、速やかに臨床応用を開始できるため、効果のない無駄な治療を避け、速やかに他の治療方針を決定することで、患者ごとに最適な個別化医療が実現できるとともに、医療経済効果、医療の質の向上にも貢献ができるし、医療戦略の革新となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Thymidine phosphorylase (TP) is a key enzyme in the pyrimidine nucleoside salvage pathway, and its expression is upregulated in a wide variety of solid tumors. TP expression correlates well with tumor malignancy and is essential for the bioactivation of 5-fluorouracil and its prodrugs including capecitabine in tumors. Capecitabine-based chemotherapies have been reported to be effective in tumors expressing high TP levels. Radio- and chemotherapies including paclitaxel may induce the expression of TP in tumors. We have developed a radio-iodinated uracil derivative with TP inhibitory potency (125/123I-IIMU). In this study, we evaluated whether TP imaging could predict the response to an anticancer therapy by estimating TP expression levels in tumor tissues. In vivo studies showed that paclitaxel increased TP expression levels and 125I-IIMU uptake in tumor tissues. Therefore, TP imaging could be used for predicting the response to an anticancer therapy.

研究分野：放射線医学

キーワード：チミジンホスホリラーゼ(TP) ヨウ素標識IIMU 核医学診断薬 SPECTイメージング 5-フルオロウ
ラシル(5-FU) プロドラッグ 抗がん剤Paclitaxel 担癌モデル動物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤による治療はがんの3大治療法の一つであるが、副作用が強いなどの課題もあることから、より選択的で効果の高い治療戦略が求められている。我々は、副作用が少なく効果の高い治療法を選択するための診断情報を提供しうる画像診断法の開発を目指して、新たな核医学診断薬の研究開発を進めてきた。そこで我々は核医学診断薬の標的分子として、がんを高発現する酵素であるチミジンホスホリラーゼ（TP）に着目した。TPは、チミジンとチミンおよび2-デオキシリボース-1-リン酸への可逆的反応を触媒する酵素で、血管新生作用を有する血小板由来血管内皮細胞増殖因子（PD-ECGF）と同一蛋白であり、腫瘍血管新生や、腫瘍の増殖、浸潤、転移等と関連があることが知られている[1]。5-フルオロウラシル（5-FU）やそのプロドラッグ（Capecitabine, Doxifluridine等）は、腫瘍組織中のTPにより代謝され、抗腫瘍効果を発揮することが明らかになっている[2]。また、TPは抗がん剤のPaclitaxel, Docetaxel, Mitomycin Cの治療、放射線照射により誘導されるため、これらの抗がん剤や放射線療法との併用により5-FUやそのプロドラッグの効果が増強されることも知られている[3]。これらのことから、TPの発現量やその酵素活性の定量的画像化により、5-FUやそのプロドラッグ、または他の抗がん剤や放射線療法との併用を用いるがん治療の効果が予測可能になると考えられる。

一方、我々は、TP阻害活性をもつ標識ウラシル誘導体を母体骨格に有する5-^[123/125]Iiodo-6-[(2-iminoimidazolidinyl)methyl]uracil (IIMU)を開発すると共に、IIMUはTP発現量に対応して、がんの特異的に集積することを明らかにし、腫瘍イメージング剤としての有用性を確認した[4-7]。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発したIIMUを用いるTP画像化法によって、5-フルオロウラシルやそのプロドラッグによるがん治療の効果予測が可能なることを前臨床動物実験で実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TP発現量の異なる多種の担癌モデル動物におけるTP発現量の評価

TP発現量の異なる多種の担癌モデル動物において、病理組織学的免疫染色を用いて、TP発現量の評価を行った。すなわち、ヒト皮膚がん細胞（A431）、ヒト子宮頸がん細胞（HeLa）、ヒト胃癌細胞（AZ521）、ヒト頭頸部癌細胞（FaDu）、ヒト大腸がん細胞（HCT116, WiDr, DLD-1）、ヒト乳癌細胞（MDA-MB231）及びヒトメラノーマ細胞（MDA-MB435S）を免疫不全マウス（BALB/c nu-nu）の右背側肩の皮下に移植し、担癌マウスモデルを作成した。腫瘍の大きさが200-400 mm³になって時点で、イソフルラン麻酔下で心臓からの全採血により sacrifice し、腫瘍組織を摘出した。その後、腫瘍組織におけるTP発現量を、免疫染色で定性評価を行った。

(2) in vitro 実験：TP発現レベルに及ぼす抗ガン剤 Paclitaxel の影響の評価

6 well プレートにA431細胞、AZ521細胞、HCT116細胞を播種（2.0x10⁵/well）後、24時間インキュベートを行った。その後、各wellにPaclitaxel（10⁻⁹M）を添加し、48時間インキュベートを行い、タンパクを抽出した。最終的にはウエスタンブロッティングによりがん細胞におけるTP発現量を定量測定した。

(3) in vivo 実験：

A:TP発現レベルに及ぼす抗ガン剤 Paclitaxel の影響の評価

B:¹²⁵I-IIMUを用いたTP発現レベル増加の実証

1) 担癌モデルマウスの作成：

ヒト大腸がん細胞（WiDr、5x10⁶/0.1ml）をBALB/cヌードマウスの右背側肩の皮下に移植して、担癌モデルマウスを作成した。

2) 群分け：

腫瘍容積が400 mm³程度に達した時点で、対照群とPaclitaxel治療群2群に分けた。

3) Paclitaxel 治療：

治療群の担癌モデルマウスには、投与量28 mg/kgのPaclitaxelを1日1回で腹腔内に4回投与した。対照群には、生理食塩水を4回腹腔内に投与した。

4) 腫瘍組織における¹²⁵I-IIMUの集積とTP発現量レベル：

Paclitaxel投与5日目に¹²⁵I-IIMUを尾静脈より投与した。¹²⁵I-IIMU投与1時間後、イソフルラン麻酔下で心臓からの全採血によりマウスを sacrifice し、腫瘍組織および正常臓器を摘出し、その放射能(%ID/g)を測定した。また免疫染色を用いて腫瘍組織におけるTP発現量を定量評価した。

4. 研究成果

(1) TP発現量の異なる多種の担癌モデル動物におけるTP発現量の評価

TP発現量の異なる多種の担癌モデル動物におけるTP発現量について、定性評価を行った。その結果、A431腫瘍組織におけるTP発現レベルが最も高く、つぎはHeLa、HCT116及びAZ521における発現レベルが高かった。MDA-MB-231、MDA-MB-435S及びWiDrにおけるTP発現が低く、DLD-1では最も低かった（Fig.1）。

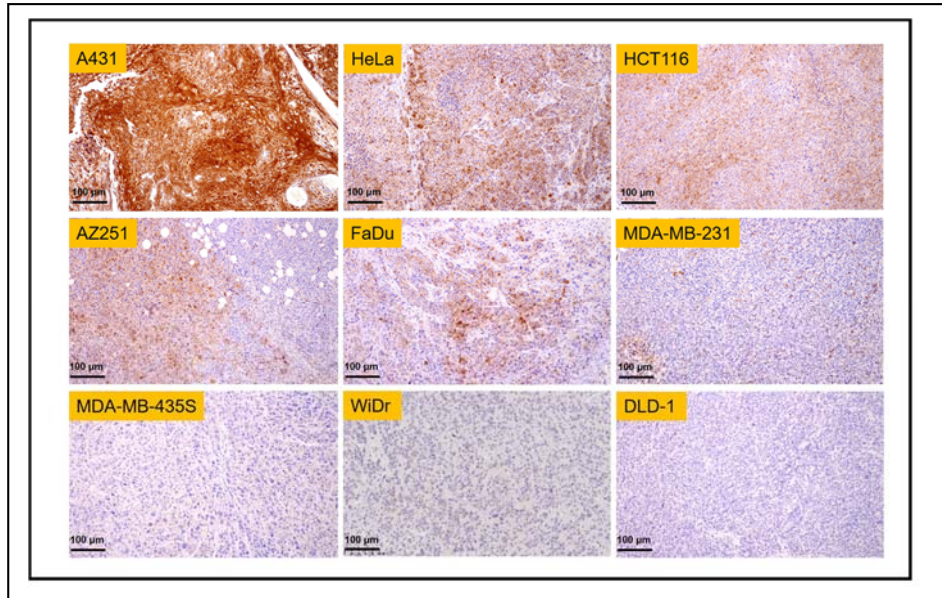


Fig. 1 多種腫瘍組織における TP 発現レベル

(2) in vitro : TP 発現レベルに及ぼす抗ガン剤 Paclitaxel の影響の評価

TP 発現レベルに及ぼす抗ガン剤 Paclitaxel の影響を in vitro 実験で評価した結果、A431 細胞における Paclitaxel の処置による TP 発現レベルには、顕著な上昇が認められなかったものの、AZ251 と HCT116 細胞においては、Paclitaxel の処置により TP 発現レベルが上昇する傾向が見られた。

(3) in vivo 実験 :

A: TP 発現レベルに及ぼす抗ガン剤 Paclitaxel の影響の評価

B: $^{123/125}\text{I}$ -IIMU を用いた TP 発現レベル増加の実証

① 担癌モデルマウスの体重変化 :

Paclitaxel の治療により、担癌モデルマウスの体重の減少が見られた (Fig. 2)。

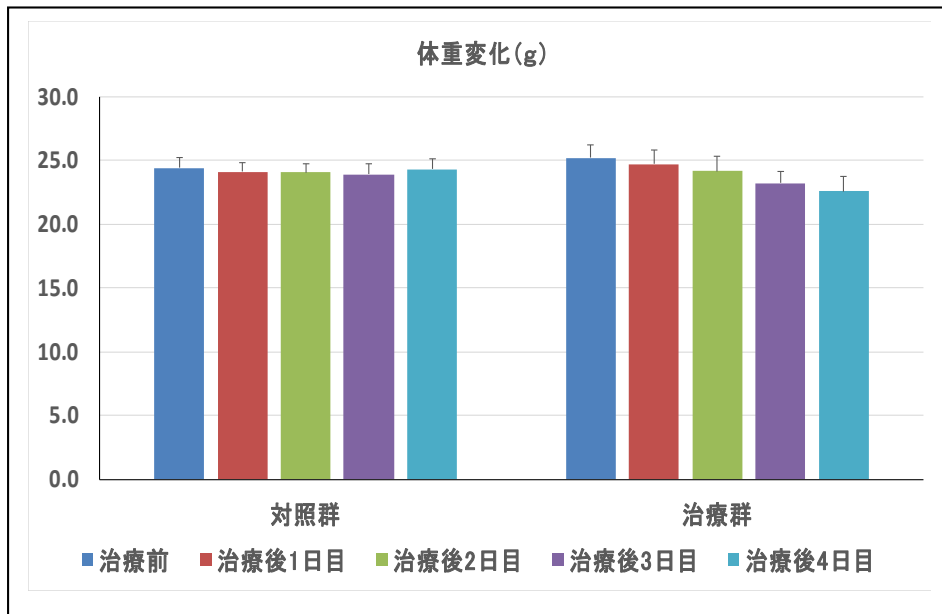


Fig. 2 体重の変化

② 腫瘍容積の変化 :

Paclitaxel の治療により、腫瘍容積の減少が見られなかった (Fig. 3)

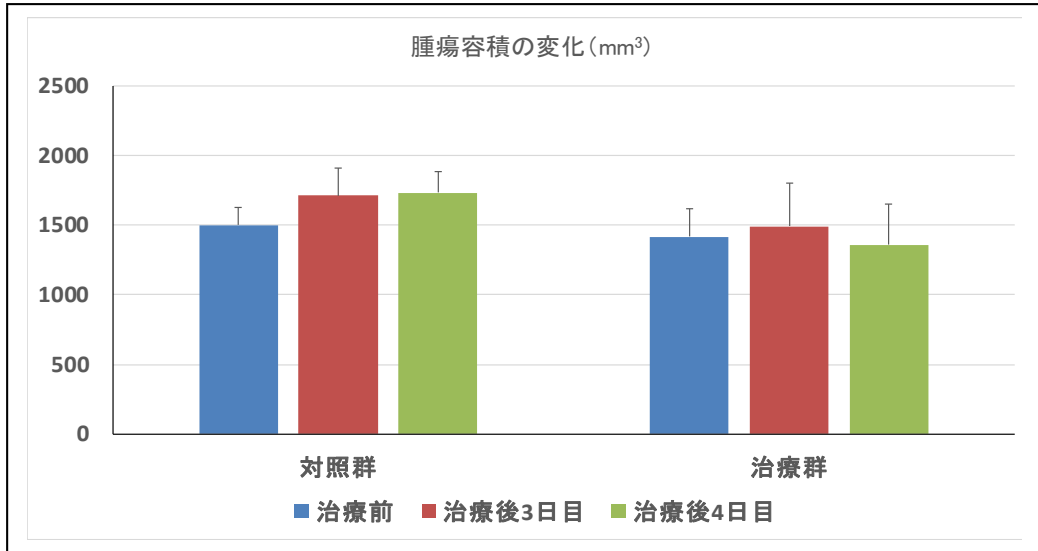


Fig. 3 腫瘍容積の変

③Paclitaxel 治療による腫瘍組織における TP 発現の変化：

Paclitaxel 治療により腫瘍組織における TP 発現が高くなった (Fig. 4a)

Paclitaxel 治療により腫瘍組織における TP 発現量が上昇した (Fig. 4b)。

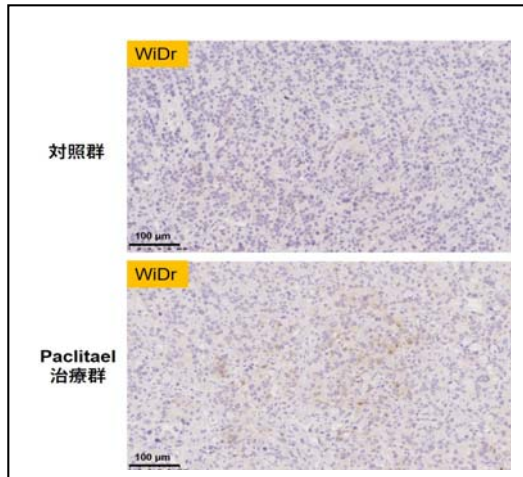


Fig. 4a TP 発現レベル

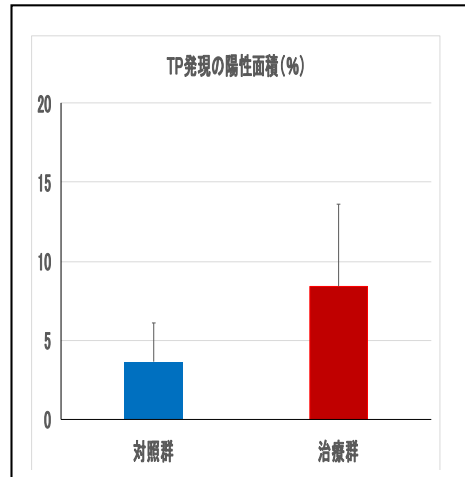


Fig. 4b TP 発現量

④腫瘍組織への ¹²⁵I-IIMU 集積量：

Paclitaxel 治療により腫瘍と筋肉の ¹²⁵I-IIMU 集積比が増加した (Fig. 5)。

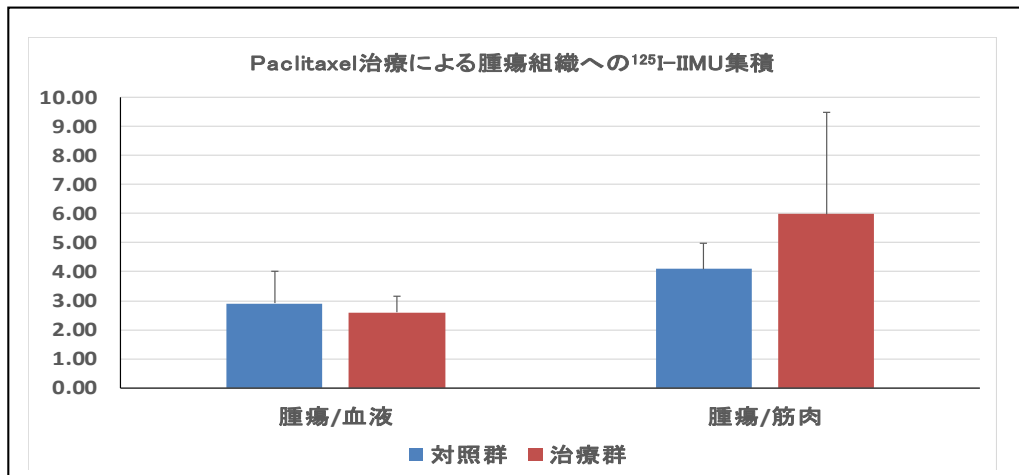


Fig. 5 腫瘍と血液、腫瘍と筋肉の ¹²⁵I-IIMU 集積比

⑤腫瘍組織における TP 発現と ¹²⁵I-IIMU 集積量の相関：

腫瘍組織における TP 発現と ¹²⁵I-IIMU 集積量の間には強い相関関係が認められた (Fig. 6)。

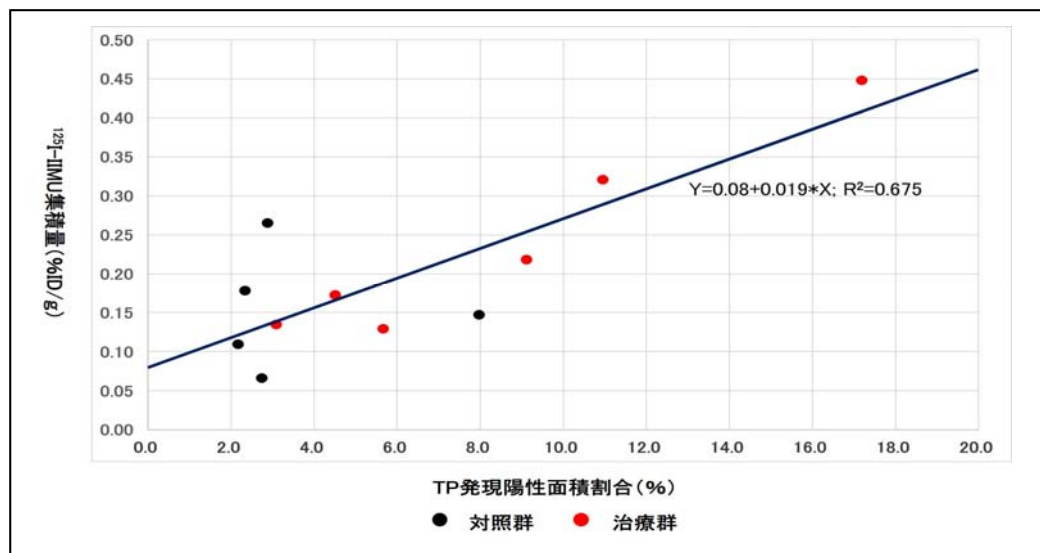


Fig. 6 TP発現と¹²⁵I-IIMU集積量の相関

以上の結果によって、IIMUを用いたTP発現量の画像化により、5-FUやそのプロドラッグのがん治療の効果予測の可能性が示唆され、さらなる研究が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

- ① [Zhao S](#), Yu W, Ukon N, Tan C, Nishijima K, [Shimizu Y](#), [Higashikawa K](#), [Shiga T](#), Yamashita H, Tamaki N, [Kuge Y](#). Elimination of tumor hypoxia by eribulin demonstrated by ¹⁸F-FMISO hypoxia imaging in human tumor xenograft models. *EJNMMI Research*. 査読あり, 9:51, 2019.
doi: 10.1186/s13550-019-0521-x
- ② [Shimizu Y](#), [Zhao S](#), Yasui H, Nishijima K, Matsumoto H, Siga T, Tamaki N, Ogawa M, [Kuge Y](#). A novel PET probe [¹⁸F]DiFA accumulates in hypoxic region via glutathione conjugation following reductive metabolism. *Mol Imaging Biol*. 査読あり, 21(1):122-129, 2019.
doi: 10.1007/s11307-018-1214-y

〔学会発表〕(計 8件)

国際発表

- ① [Higashikawa K](#), Horiguchi S, Ebita Y, Tarisawa M, Komatsu Y, Ohkura K, Yasui H, Takeda H, [Kuge Y](#). Feasibility and potentials of thymidine phosphorylase (TP) as an imaging biomarker and its nuclear medicine imaging for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis. Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2018 Annual Meeting, US, June 23-26, 2018
- ② [Higashikawa K](#), Horiguchi S, Uehara R, Makoto Tarisawa, Yuki Shibata, Kitaura H, Yasui H, Takeda H, [Kuge Y](#). Potentials of a thymidine phosphorylase imaging agent in the diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. The Tenth China-Japan-Korea Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, Xiamen, China, November 3, 2018
- ③ [Zhao S](#). Preclinical and Translational Research on a Novel Thymidine Phosphorylase (TP) Imaging Probe, ¹²⁵I-IIMU Using SPECT. BIT's 11th World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell 2017 in Singapore, November 14-16, 2017
- ④ [Zhao S](#), Yu W, Ukon N, Nishijima K, Shimizu Y, [Higashikawa K](#), Yamashita H, Tamaki N, [Kuge Y](#). Effect of eribulin on remodeling of tumor vasculature confirmed by FMISO PET imaging-Small-animal PET study in human breast cancer cell xenograft-. A paper (Oral) presentation at the 64th Society of Nuclear Medicine Annual Meeting in Denver, June 10-14, 2017; *J Nucl Med*. 2017; 58 (Supplement 1)
- ⑤ [Shimizu Y](#), [Zhao S](#), Kishi R, Yasui H, Nishijima K, Matsumoto H, Tamaki N, Ogawa M, [Kuge Y](#). Accumulation mechanism of novel PET imaging probe "[¹⁸F]DiFA" in hypoxic cells revealed by imaging mass spectrometry. A paper (Oral) presentation at the 64th Society of Nuclear Medicine Annual Meeting in Denver, June 10-14, 2017; *J Nucl Med*. 2017; 58 (Supplement 1)
- ⑥ Yasui H, [Zhao S](#), Higashikawa K, Ukon N, [Shimizu Y](#), Matsumoto H, Tamaki N, [Kuge Y](#). Preclinical evaluation of [¹⁸F]DiFA, a novel PET probe for tumor hypoxia, in comparison with [¹⁸F]MISO. A paper (Poster) presentation at the 64th Society of Nuclear Medicine Annual Meeting in Denver, June 10-14, 2017; *J Nucl Med*. 2017; 58 (Supplement 1)

国内発表

- ⑦ 東川 桂、堀口 紗和子、足澤 誠、小松由紀子、大倉一枝、安井 博宣、武田 宏司、久下 裕司。チミジンホスホリラーゼイメージングプローブによる非アルコール性脂肪肝炎の診断法の開発研究第13回日本分子イメージング学会。2018年5月31日 東京
- ⑧ 東川 桂、堀口 紗和子、海老 田曜子、足澤 誠、小松 由紀子、大倉 一枝、安井 博宣、武田 宏司、久下 裕司。放射性ヨウ素標識チミジンホスホリラーゼイメージング剤の非アルコール性脂肪肝炎診断用プローブとしての可能性の検討。第1回日本核医学会分科会 放射性薬品科学研究会/第17回放射性医薬品・画像診断薬研究会。2017年9月9日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

趙 松吉 (ZHAO SONGJI) 福島県立医科大学・先端臨床研究センター・教授

研究者番号：80374239

(2) 研究分担者

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

(3) 研究分担者

東川 桂 (HIGASHIKAWA KEI) 北海道大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：10756878

(4) 研究分担者

志水 陽一 (SHIMIZU YOICHI) 京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90634212

(5) 研究分担者

志賀 哲 (SHIGA TOHRU) 北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：80374495

(6) 研究分担者

北川 善政 (KITAGAWA YOSHIMASA) 北海道大学・歯学研究科・教授

研究者番号：00224957

(7) 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

(8) 研究分担者

秋澤 宏行 (AKIZAWA HIROMICHI) 昭和薬学大学・薬学部・教授

研究者番号：90311795

References

1. Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, Haraguchi M, Akiyama S, Fukui K, Ishizawa M, Yamada Y. Angiogenic factor. *Nature*. 1992;356(6371):668.
2. Twelves C, Glynne-Jones R, Cassidy J, Schüller J, Goggin T, Roos B, Banken L, Utoh M, Weidekamm E, Reigner B. Effect of hepatic dysfunction due to liver metastases on the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites. *Clin Cancer Res*. 1999;5(7):1696-1702.
3. Liekens S, Bronckaers A, Pérez-Pérez MJ, Balzarini J. Targeting platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase for cancer therapy. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(11):1555-1567.
4. Zhao S, Li H, Nishijima K, Zhao Y, Akizawa H, Shimizu Y, Ohkura K, Tamaki N, Kuge Y. Relationship between biodistribution of a novel thymidine phosphorylase (TP) imaging probe and TP expression levels in normal mice. *Ann Nucl Med*. 2015;29(7):582-587.
5. Li H, Zhao S, Jin Y, Nishijima K, Akizawa H, Ohkura K, Tamaki N, Kuge Y. Radiolabeled uracil derivative as a novel SPECT probe for thymidine phosphorylase: suppressed accumulation into tumor cells by target gene knockdown. *Nucl Med Commun*. 2011;32(12):1211-1215.
6. Akizawa H, Zhao S, Takahashi M, Nishijima K, Kuge Y, Tamaki N, Seki K, Ohkura K. In vitro and in vivo evaluations of a radioiodinated thymidine phosphorylase inhibitor as a tumor diagnostic agent for angiogenic enzyme imaging. *Nucl Med Biol*. 2010;37(4):427-432.
7. Takahashi M, Seki K, Nishijima K, Zhao S, Kuge Y, Tamaki N, Ohkura K. Synthesis of a radioiodinated thymidine phosphorylase inhibitor and its preliminary evaluation as a potential SPECT tracer for angiogenic enzyme expression. *J Labeled Compd Rad*. 2008;51:384-387.