

令和元年6月3日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19799

研究課題名(和文) イメージング質量分析法による低酸素診断用PET製剤の描出機序解明・創薬への展開

研究課題名(英文) Development of nuclear imaging probes for detection of tumor associated macrophages

研究代表者

志水 陽一 (SHIMIZU, YOICHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90634212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍低酸素PET診断用薬剤である<sup>18</sup>F-FMISOの低酸素環境下細胞への集積機序を解明するため、質量イメージング法(IMS)を用いてFMISOの化学形態および分布を評価した。IMS検討にて、FMISO還元体のグルタチオン抱合体(Amino-FMISO-GS)のみARG、Pimonidazole染色と一致した。低酸素環境下のin vitro検討にて、FaDu(高GSH含有)細胞はT24(低GSH含有)細胞と比べて高い放射能集積、Amino-FMISO-GS生成量を示した。以上より、FMISOは低酸素状態に加え細胞のグルタチオン抱合体形成能依存的に細胞内に集積することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究にて得られた知見は2-nitroimidazole系イメージング剤の低酸素領域への集積メカニズム解明に大きく寄与するものであり、今後の新規低酸素イメージング剤の研究開発において新たな指標となりうることが期待される。また、GSTやMRP1を競合阻害する治療薬も報告されており、amino-FMISO-GSの生成および細胞外排泄において競合阻害する可能性があることから、これらの薬剤を併用時におけるFMISO-PET診断において、偽陽性・偽陰性診断を引き起こす可能性を示唆しており、今後のFMISO-PET診断に影響を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：<sup>18</sup>F-FMISO has been used for hypoxia imaging of PET. However, its accumulation mechanism is still unclear because of its difficulty in distinguishing the metabolic states of FMISO in tumor by conventional radio isotope analysis methods. To reveal it, we performed in vitro and ex vivo studies in combination with imaging mass spectrometry (IMS). In the IMS study, the amino-FMISO conjugated with glutathione (amino-FMISO-GS) showed a closely similar distribution pattern to autoradiography. In the cellular uptake study of FMISO, FaDu cells (high glutathione level) showed a higher radioactivity level compared with T24 cells (low glutathione level), and the levels of the amino-FMISO-GS in FaDu cells were higher than those in T24 cells in hypoxic condition. Our study suggests that FMISO is accumulated in hypoxic cells by the process of glutathione conjugation following reductive metabolism. Its accumulation might depend on glutathione levels in the cells as well as hypoxic condition.

研究分野：分子イメージング

キーワード：核医学 低酸素 質量イメージング

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍内において、がん細胞増殖の亢進による血管形成の遅延に伴い酸素供給の低下した領域である低酸素領域の形成が認められる。本領域では腫瘍の悪性度化、薬物・放射線治療に対する高い抵抗性が生じるため、腫瘍組織内の低酸素領域を高精度に同定することは腫瘍の悪性度鑑別、放射線治療の部位の決定・効果予測等において有効であると考えられている(*Nat Rev Clin Oncol.*、2012)。ポジトロン断層撮像装置 (Positron Emission Tomography; PET) を用いる核医学イメージング法は、用いるポジトロン標識薬剤が標的とする生体内機能分子の非侵襲的インビボ画像化を可能とするため、腫瘍組織内に形成した低酸素領域の非侵襲的評価への応用が期待され、様々な試みが行われている。低酸素領域の PET 診断用薬剤として、2-nitroimidazole を母体骨格としたポジトロン標識薬剤 ( $^{18}\text{F}$ -2NID) が開発・検討されてきた。 $^{18}\text{F}$ -2NID は低酸素環境下の細胞内において、2-nitroimidazole のニトロ基がアミノ基に代謝還元される、あるいは還元反応中に近傍に存在する生体内高分子 (タンパク質など) と共有結合することにより細胞内に蓄積し、PET 診断等ではこれら代謝物の蓄積を描出していると考えられてきた。しかしながら、核医学イメージング法では得られた画像が投与した放射標識薬剤のどのような化学形態 (代謝物) に起因するものかについて評価することは極めて困難であることから、低酸素環境下細胞内において  $^{18}\text{F}$ -2NID がどのような代謝形態で存在しているのかについて詳細に評価した報告例はこれまでなかった。

近年新たな分子イメージング技術として、質量分析を二次元平面上において位置情報を保持しながら行うイメージング質量分析法 (IMS) が開発された。研究代表者らは  $^{18}\text{F}$ -2NID の一つである  $^{18}\text{F}$ -Fluoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ -FMISO) について、IMS を用いて担がんモデルマウスの腫瘍組織内における化学形態を評価し、従来の想定とは異なり FMISO 代謝物 (アミノ基還元型) のグルタチオン抱合体が腫瘍低酸素領域にて形成されることを見出した (*Sci Rep.*、2015)。ところで、グルタチオン抱合体の形成には細胞内のグルタチオン抱合酵素 (Glutathione-S-transferase、GST) の酵素活性により細胞内のグルタチオンと反応することにより生じる。また細胞内のグルタチオン抱合体は多剤耐性関連タンパク質 1 (MRP-1) などのトランスポーターにより細胞外に排泄される。しかし、がん細胞の低酸素状態とグルタチオン抱合体形成能、細胞外排泄能等との間にどのような関係があるのかについては不明であった。

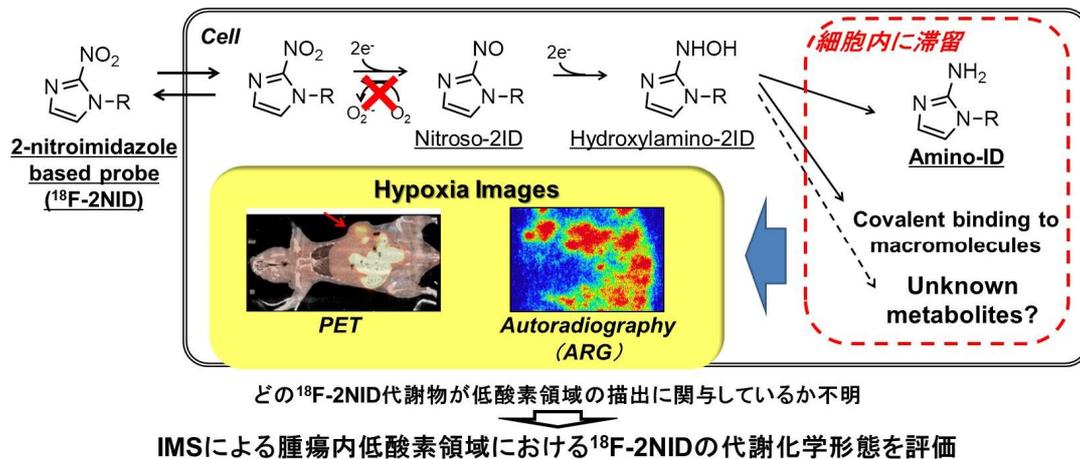


図 1. 本研究の概念図

2. 研究の目的

本研究では、 $^{18}\text{F}$ -FMISO のがん細胞取り込み量とがん細胞におけるグルタチオン関連生体分子の発現・活性との関連性を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

培養細胞への  $^{18}\text{F}$ -FMISO の取り込みの検討

6 well plate に FaDu ヒト頭頸部癌細胞、LOVO ヒト結腸癌細胞および T24 ヒト膀胱癌細胞をそれぞれ  $1 \times 10^6$  細胞/well になるように播種し、通常酸素条件下および低酸素条件下で 18 時間培養した。その後、 $^{18}\text{F}$ -FMISO (2.5 MBq、250 nmol/well) を添加してそれぞれ同様の条件下でさらに培養し、4 時間後に細胞を PBS で 3 回洗浄した。メタノールにより抽出し、上清および沈殿中放射能を測定し、それぞれ低分子画分および高分子への共有結合画分とした。BCA 法で沈殿中のタンパク定量を行い補正した。

GSH/GSSG-Glo アッセイ

FaDu、LOVO および T24 細胞における還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオ

ン (GSSG) 量を、GSH/GSSG-Glo Assay kit (Promega) を用いて行った。各細胞を PBS に懸濁し、総グルタチオン量測定用および GSSG 量測定用サンプルの 2 つに分けた。GSSG 量測定用サンプルは Luciferin-NT および N-ethylmaleimide 含有 passive lysis buffer と、総グルタチオン量測定用サンプルは Luciferin-NT 含有 passive lysis buffer と混合した。ライセートに Luciferin Generation Reagent を添加して室温で 30 分静置し、Luciferin Detection Reagent を添加した。ルシフェラーゼ反応による発光シグナルを Tecan 社製 Infinite 200 PRO microplate reader で測定した。サンプルは BCA 法でタンパク定量を行い、得られた GSH および GSSG 量を総タンパク質濃度で補正した。

#### GST 活性評価

FaDu、LOVO および T24 細胞を 2 mM EDTA 含有 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させ、1,000 ×g、4 °C で 15 分間遠心分離した後、上清を 200 mM GSH および 100 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 含有 PBS と混合した。反応産物である CDNB のグルタチオン抱合体由来の 340 nm の吸光度を Infinite 200 PRO microplate reader を用いて測定した。吸光度の増加速度はサンプル中 GST 活性を直接反映している。サンプルの総タンパク質量を BCA 法により測定し補正した。

#### GST、MRP 発現量評価

FaDu、LOVO、T24 細胞を低酸素チャンバー (InvivoO<sub>2</sub> 300) にて 1% O<sub>2</sub> 環境下内にて 18 時間培養した。培養後、Qiagen 社製 RNeasy Mini kit を用いて総 mRNA を抽出した。逆転写は東洋紡株式会社製 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix とタカラバイオ株式会社製 PCR Thermal Cycler Dice を用いて製造業者のプロトコルに従って行った。リアルタイム PCR はタカラバイオ株式会社製 SYBR Green Realtime PCR Master Mix と Life Technologies 社製 7500 Real-time PCR system を用いて製造業者のプロトコルに従って実施した。各 mRNA の発現量は β-actin の発現量で補正した。本研究でリアルタイム PCR に用いたプライマーは以下の通りである。β-actin forward: GGAAGGAAGGCTGGAAGAG、β-actin reverse: GAAATCGTGCGTGACATTA、GSTP1: forward: ATGACTATGTGAAGGCACTG、GSTP1 reverse: AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG、MRP-1 forward: CCCTGCACTGTCCGTCAC、MRP-1 reverse: CTGAGTTCCTGCGTACCTAT。

### 4. 研究成果

#### 培養細胞への <sup>18</sup>F-FMISO の取り込みの検討

通常酸素条件下における放射能取込量は、いずれの細胞腫とも低く、同等であった (FaDu; 0.122 ± 0.009、LOVO; 0.223 ± 0.048、T24; 0.100 ± 0.005% dose/mg protein; 図 2)。対照的に低酸素条件下における放射能取込量は、FaDu 細胞において 0.851 ± 0.009% dose/mg protein に達し、続いて LOVO 細胞では 0.617 ± 0.021% dose/mg protein であったのに対して、T24 細胞では 0.167 ± 0.011% dose/mg protein にとどまった。FMISO の生体内高分子への共有結合割合をメタノール抽出により算出したところ、FaDu 細胞においては 29.77 ± 0.47%、LOVO 細胞においては 36.71 ± 1.28%、T24 細胞においては 47.20 ± 1.84% であった。また LC/MS を用いて FaDu、LOVO および T24 いずれの細胞腫においても、細胞内で amino-FMISO-GS が生成していることを確認した。各細胞腫における生成量は放射能取込量と同じ順番を示し、FaDu 細胞 (FMISO 高集積細胞) では 0.502 ± 0.035、LOVO 細胞 (FMISO 中集積細胞) では、0.158 ± 0.006、T24 細胞 (FMISO 低集積細胞) では 0.007 ± 0.001% dose/mg protein であった。

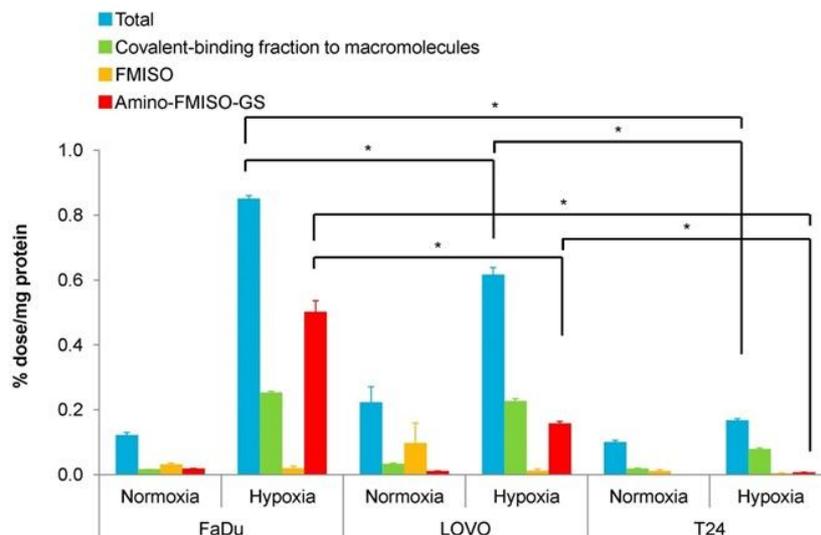


図 2. 通常酸素下あるいは低酸素環境下 (1% O<sub>2</sub>) にて各細胞に <sup>18</sup>F-FMISO を添加した際の、添加 4 時間後における細胞内放射能集積量および各代謝物集積量 (\*p<0.01)

### 細胞内グルタチオン量および GST 酵素活性評価

FaDu、LOVO および T24 細胞において、細胞内グルタチオンの大半は、低分子化合物と結合して極性を高める能力を有する GSH として存在した (図 3)。また、FaDu 細胞における GSH 量は 3 細胞腫の中で最も高値を示し、LOVO 細胞および T24 細胞の GSH 量は同程度であった (FaDu;  $650.5 \pm 39.3$ 、LOVO;  $147.7 \pm 7.9$ 、T24;  $214.7 \pm 32.7$  nmol/mg protein)。加えて、FaDu 細胞における GST 活性は LOVO 細胞と同程度であり、T24 細胞と比較して高値を示した (FaDu;  $10.56 \pm 0.87$ 、LOVO;  $11.82 \pm 0.83$ 、T24;  $5.13 \pm 1.04$   $\Delta$ OD<sub>340</sub>/min/mg protein) (図 4)。

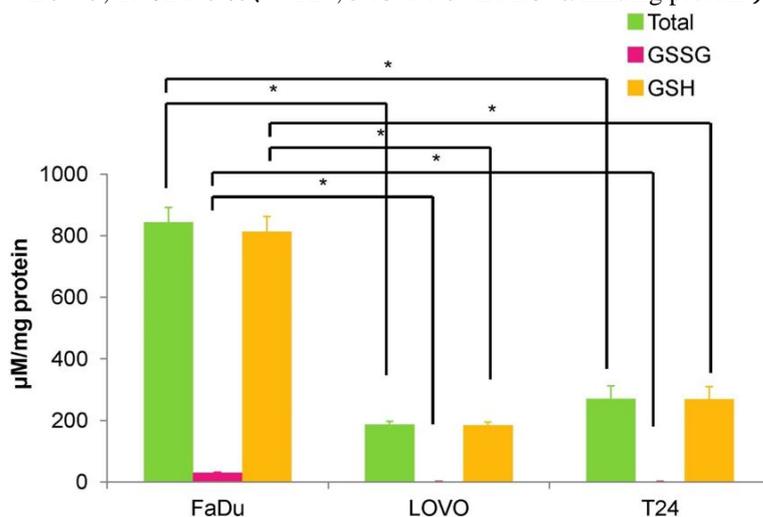


図 3. 低酸素環境下 (1% O<sub>2</sub>) における各細胞中のグルタチオン含有量 (\*p<0.01)

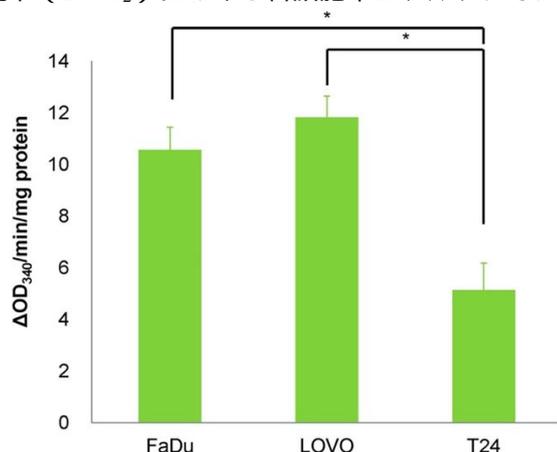


図 4. 低酸素環境下 (1% O<sub>2</sub>) における各細胞中の GST 酵素活性 (\*p<0.01)

### グルタチオン抱合関連遺伝子の発現

GST-P1 および多剤耐性関連タンパク質 1 (MRP-1) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により評価した (図 5)。各サンプルの mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin の発現量で補正した。FaDu 細胞において、LOVO 細胞および T24 細胞と比較して有意な GST-P1 の発現上昇が認められた。また MRP-1 の発現量は、放射能取込量と逆の順番を示した (T24>LOVO>FaDu)。

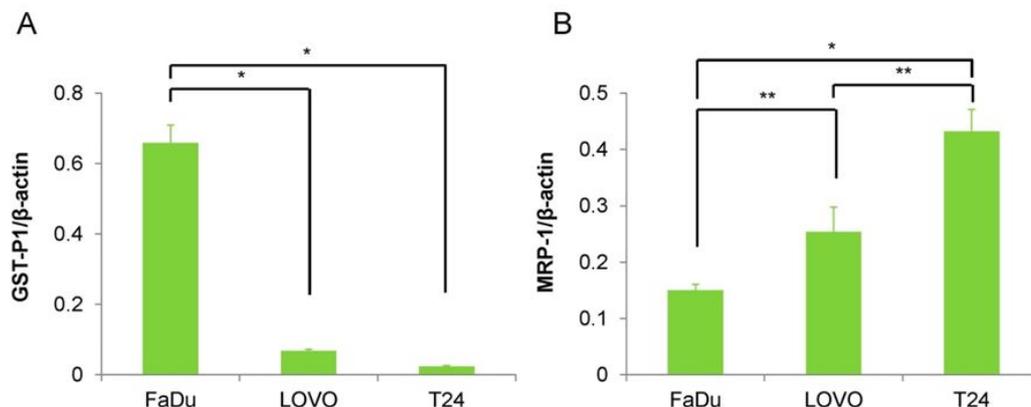


図 5. 低酸素環境下 (1% O<sub>2</sub>) における各細胞中の GST-P1 (A) および MRP-1 (B) の mRNA 発現量 (\*p<0.01、\*\*p<0.05)

以上の結果より、 $^{18}\text{F}$ -FMISO の細胞内集積には低酸素状態に加えて amino-FMISO-GS の生成亢進、排出低下の度合いが重要であることが示された(図6)このことから、 $^{18}\text{F}$ -FMISO を用いた PET 診断により得られる画像は低酸素領域のみならず、グルタチオン抱合関連因子の発現・活性度を反映している可能性が示唆された。また、シスプラチンなどの抗がん剤治療を受けている患者では腫瘍内 GSH 枯渇が報告されていること等を考慮すると、グルタチオン抱合を受ける薬物を投与された患者では同様に細胞内 GSH を消費する  $^{18}\text{F}$ -FMISO は腫瘍組織内において競合阻害を受ける可能性が想定され、 $^{18}\text{F}$ -FMISO を用いた核医学診断において、腫瘍の種類や治療歴等の患者状態が診断精度に影響を与える可能性を示しているものと考えられる。

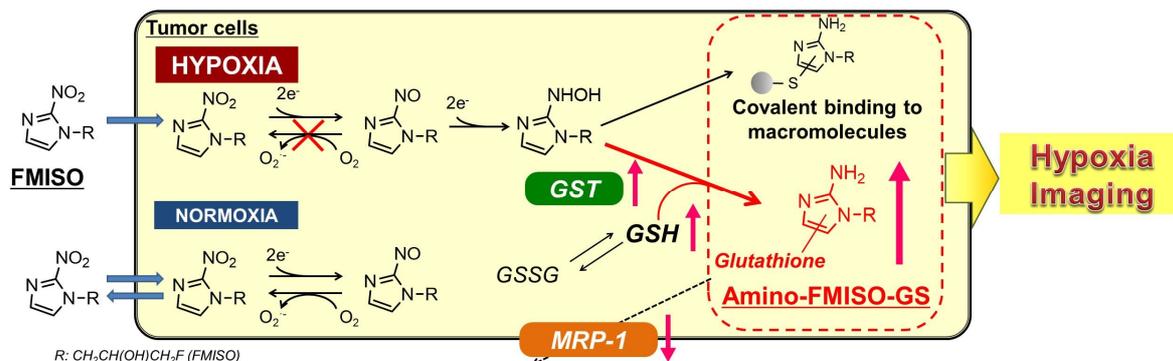


図6 . 本研究より推定された  $^{18}\text{F}$ -FMISO の低酸素環境下細胞への集積機序

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

\*Shimizu Y, Motomura A, Takakura H, Tamaki N, Kuge Y, Ogawa M. Accumulation of hypoxia imaging probe “ $^{18}\text{F}$ -FMISO” in macrophages depends on macrophage polarization in addition to hypoxic state. *Ann Nucl Med.*, 33(5):362-367 (2019). (査読あり)

DOI: 10.1007/s12149-019-01332-1

\*Shimizu Y. Accumulation Mechanism of 2-Nitroimidazole-based Hypoxia Imaging Probes Revealed by Imaging Mass Spectrometry. *Yakugaku Zasshi.* 138(11):1345-1352 (2018). (査読あり)

DOI: 10.1248/yakushi.18-00146

Masaki Y, Shimizu Y, Yoshioka T, Nishijima KI, Zhao S, Higashino K, Numata Y, Tamaki N, Kuge Y. FMISO accumulation in tumor is dependent on glutathione conjugation capacity in addition to hypoxic state. *Ann Nucl Med.*, 31(8): 596-604 (2017). (査読あり)

DOI: 10.1007/s12149-017-1189-9

Masaki Y, Shimizu Y, Yoshioka T, Feng F, Zhao S, Higashino K, Numata Y, Kuge Y. Imaging Mass Spectrometry Revealed the Accumulation Characteristics of the 2-nitroimidazole-based Agent “Pimonidazole” in Hypoxia. *PLoS One* 11(8):e0161639 (2016). (査読あり)

DOI: 10.1371/journal.pone.0161639

### 〔学会発表〕(計8件)

志水陽一：質量イメージングによる低酸素領域集積性ニトロイミダゾール薬剤の集積機序の解明 —薬物療法時における $^{18}\text{F}$ FMISO を用いた低酸素 PET 診断への影響評価— . 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会、姫路、2018年10月13日、招待講演

本村 新、志水陽一、高倉栄男、安井博宣、東川 桂、玉木長良、久下裕司、小川美香子：マクロファージの極性化が  $^{18}\text{F}$ -FMISO と  $^{125}\text{I}$ -BMIPP の集積に及ぼす影響 . 第17回放射線医薬品画像診断薬研究会/第1回日本核医学会分科会 放射線薬品科学研究会、京都、2017年9月9日、口頭発表

志水陽一：イメージング質量分析法と核医学診断法の融合研究：核医学診断剤創薬への応用の可能性 . プルカーMS フォーラム、東京、大阪、2017年8月3-4日、招待講演

志水陽一、久下裕司：イメージング質量分析による PET 診断用低酸素イメージング剤“FMISO”の腫瘍内集積機序の解明 . 第65回質量分析総合討論会、つくば、2017年5月19日、口頭・ポスター発表

志水陽一、正木悠紀子、吉岡健、東野賢一、沼田義人、西嶋剣一、趙 松吉、玉木長良、小川美香子、久下裕司：低酸素イメージング剤“FMISO”の腫瘍集積におけるグルタチオン

関連因子の影響。第 56 回日本核医学会学術総会、名古屋、2016 年 11 月 5 日、口頭発表  
本村 新、志水陽一、高倉栄男、玉木長良、久下裕司、小川美香子：マクロファージの極  
性化  $^{18}\text{F}$ -FMISO の細胞内集積に与える影響。第 56 回日本核医学会学術総会、名古屋、2016  
年 11 月 3 日、口頭発表

志水陽一：イメージング質量分析法による PET 診断用低酸素イメージング剤の腫瘍内集積  
メカニズムの解明。第 32 回緑陰セミナー、旭川、2016 年 7 月 2 日、招待講演

志水陽一、正木悠紀子、吉岡健、東野賢一、沼田義人、趙 松吉、小川美香子、久下裕司：  
イメージング質量分析(IMS)による低酸素診断剤“Pimonidazole”の腫瘍内集積機序の解明。  
第 11 回日本分子イメージング学会総会・学術総会、神戸、2016 年 5 月 28-29 日、口頭・  
ポスター発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/qC31G>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。