

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590050  
 研究課題名（和文） 癌のレドックス関連マルチ情報取得を目的とした画像解析システム開発のための基礎研究  
 研究課題名（英文） Basic study for development of multi imaging system of redox-related information in tumors  
 研究代表者  
 竹下 啓蔵 (TAKESHITA KEIZO)  
 崇城大学・薬学部・教授  
 研究者番号：70175438

## 研究成果の概要：

がんの放射線療法において、酸素分圧とグルタチオン濃度は治療効果を左右する。両者を同一個体で評価する方法を、電子スピン共鳴（ESR）画像解析法を用いて開発した。グルタチオン濃度に関係したレドックスは、ニトロキシラジカルをプローブとして評価した。3次元 ESR 画像化法を用いてレドックスプローブと酸素分圧プローブの分布を同一マウスで得る方法を開発した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物物理化学

## 1. 研究開始当初の背景

がんの放射線療法は外科手術のできない部位での固形がんの治療に適用されている。放射線療法では大きな施設を除いて光子線（X線あるいはガンマ線）が用いられている。これら光子線による治療効果は活性酸素の生成を介した間接作用によるものが大きく、がん組織内の酸化還元（レドックス）状態に左右される。すなわち、酸素分圧が低くグルタチオン濃度が高いほど治療効果が減少する。その場合には、直接作用を主体とする粒子線治療を選択すべきである。従って、がんの放射線療法による治癒率を上げるために

は、早い時期でどちらの治療を行うべきかを気極めることが大切である。そのためには、がん組織内の酸素分圧とグルタチオン濃度を知ることが必要である。酸素分圧とグルタチオン濃度測定に関する国内外の状況は次の通りである。

組織内の酸素分圧測定法についての状況：動物実験では組織に酸素電極を突き刺して測定する方法が従来から行われた。1980年代末になって常磁性物質の電子スピン共鳴（ESR）スペクトルのシグナルが酸素分圧に依存して幅広化することからこれを酸素分圧プローブとし、ほぼ同時期に開発された生

体計測用 ESR (*in vivo* ESR) で実験動物体内の酸素分圧を測定する試みがなされるようになった。リチウムフタロシアニン粉末 (Liu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5438-5442) などの不溶性プローブを組織に埋め込む方法が採られている。

グルタチオン濃度測定法についての状況：組織内のグルタチオン濃度を非侵襲的に測定する方法は現在のところ全く存在しない。

グルタチオンはアスコルビン酸や還元金属のリサイクルを通して (Eriksson et al. *Drug Metab. Dispos.* 15:155-160, 1987)、あるいは生体内還元酵素の電子供与体となって (Takeshita et al. *Free Radic. Bio. Med.* 26:951-960, 1999)、ニトロキシラジカルの還元を起こす。また、腫瘍内のグルタチオン濃度の低下はニトロキシラジカルの消失速度を低下させることが報告されている (Kuppusamy et al. *Cancer Res.* 62:307-312, 2002)。これらのことから、*in vivo* ESR で測定したニトロキシラジカルのシグナルの消長を指標に、組織内グルタチオンレベルを間接的ではあるが非侵襲的に知ることができると考えられる。

## 2. 研究の目的

がん組織内の酸素分圧とグルタチオン依存的レドックスを、同一動物で同時に非侵襲画像解析できるシステムを、*in vivo* ESR を用いて構築し、将来、診断法へ展開するための要素技術とする。具体的には、次の2点を行う。

- (1) がん組織に滞留性の酸素分圧プローブとレドックスプローブを各々開発する。
- (2) それぞれのプローブの組織内分布を同一動物で同時に得る断層画像化法を開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 試薬の合成

① ニトロキシルプローブの合成 3-Hydroxymethyl-PROXYL (3-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl) は、3-carboxy-PROXYL を水素化リチウムアルミニウムで還元して得た。3-Methoxycarbonyl-PROXYL は、3-carboxy-PROXYL のジアゾメタンによるメチル化で得た。他のニトロキシルプローブは、市販品を用いた。

② リチウムフタロシアニンの合成 リチウムフタロシアニンは、フタロシアニンニリチウム塩をアセトニトリル中でテトラエチルアンモニウムパークロリド存在下電気分解して得た。

### (2) 腫瘍モデルマウスの作成

培養したマウス腫瘍細胞 (RIF-1) を等張

リン酸緩衝液 pH 7.4 (PBS) に懸濁し、 $2.5 \times 10^5$  cell をマウス (C3H) 大腿部に皮下投与した。温度と湿度の制御された飼育室で飼育し、腫瘍の直径が 5-12 mm になったものを実験に使用した。

### (3) 酸素分圧の測定

マウス腫瘍部にリチウムフタロシアニン粉末を 0.5 mg 注射針で埋込み、1-2 日後、腫瘍部の ESR を自作表面コイル型共振器を装着した L-band ESR 装置 (1.1 GHz, 日本電子) により測定した。ESR シグナルの線幅より、標準ガスで作成した検量線を用いて酸素分圧を求めた。

### (4) ニトロキシルプローブの投与

3-Hydroxymethyl-PROXYL を精製水に 280 mM の濃度に溶解し、 $50 \mu\text{L}$  静脈内投与した。

### (5) ESR 画像解析

マウスはイソフルランで吸入麻酔した。ESR-CT 装置 (1.1 GHz, 日本電子) のループ・ギャップ型共振器内にマウスの腫瘍部を含む下半身を置き、磁場勾配下で ESR を測定した。Filtered back projection 法により 3 次元画像を得た。

## 4. 研究成果

### (1) 3 次元画像による腫瘍のレドックス測定

プローブの n-オクタノール-PBS 分配係数は、3-methoxycarbonyl-PROXYL (7.8)、3-hydroxymethyl-PROXYL (1.2)、3-carbamoyl-PROXYL (0.5)、および 3-carboxy-PROXYL (0.0030) であった。細胞質内に留めるために分配係数が 1 に近い 3-hydroxymethyl-PROXYL を以降の実験に

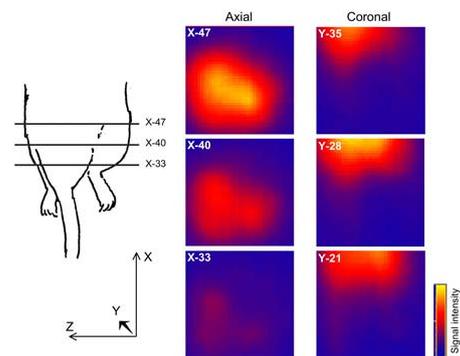


図 1 ニトロキシルプローブを投与した腫瘍モデルマウスの 3 次元 ESR 画像

3-Hydroxymethyl-PROXYL を投与後、3 次元画像を得、X 軸方向あるいは Y 軸方向へのスライス画像を得た。

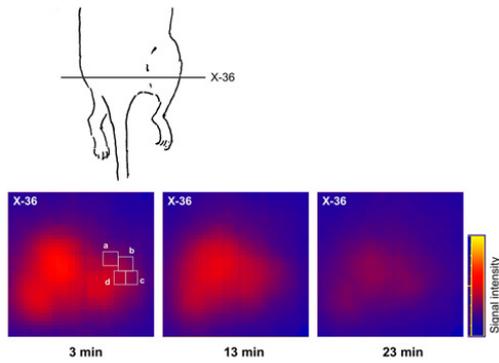


図 2 レドックスプローブを投与した腫瘍マウスの腫瘍部位における時系列画像

3-Hydroxymethyl-PROXYLを投与後径時的に3次元画像を得、腫瘍を含むスライス画像を示した。白枠で示した領域におけるシグナル減衰速度を比較した。

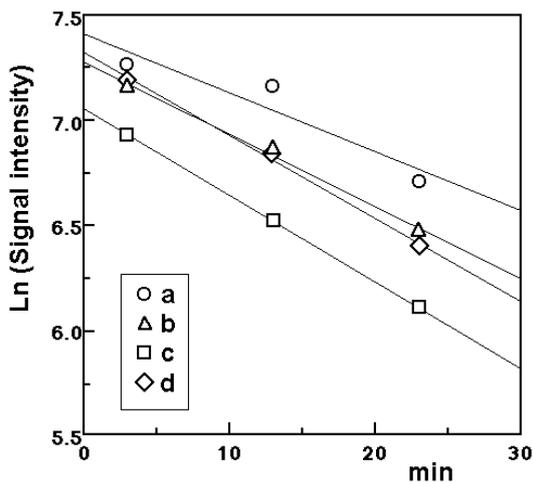


図 3 腫瘍内各部位のシグナル消失

図 2 の a, b, c 及び d の部分におけるシグナルの消失

用いた。腫瘍モデルマウスに3-hydroxymethyl-PROXYLを投与して3次元画像を撮った。図1に示すとおり、プローブは腫瘍部にほぼ均等に分布した。

3-hydroxymethyl-PROXYLを投与3分後、13分後、および23分後に続けて3次元画像を取得したところ、シグナル強度は時間と共に減少した(図2)。腫瘍部分を含む断面の画像を用いて腫瘍の4箇所を指定し、各部位でのシグナルの減衰を調べたところ一次反応

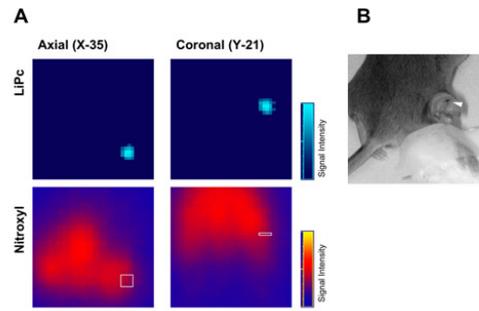


図 4 同一マウスにおけるリチウムフタロシアンと 3-hydroxymethyl-PROXYL の分布画像

A. 上段：腫瘍にリチウムフタロシアンを埋め込んだマウスの3次元画像からリチウムフタロシアンを含むスライス画像を得た。下段：3-Hydroxymethyl-PROXYLを投与後、3次元画像をから、上と同じ位置のスライス画像を得た。白枠はリチウムフタロシアン存在部位を示す

B. 測定後、腫瘍部位を切開した写真 白矢印はリチウムフタロシアン存在位置を示す。

に従うことがわかった(図3)。

12匹のマウスについて同様に腫瘍内の各部位における減衰速度定数を求めて比較したところ、i) 腫瘍によりその減衰速度が異なること、ii) 部位により差のあるものと無いものがあること、iii) 部位により差がある場合の腫瘍の中心部と辺縁部の違いには一定の傾向がないことがわかった。このことから、腫瘍により内部の還元状態が大きく異なることが示された。

## (2) 酸素分圧プローブとレドックスプローブの同一マウスでの画像化

3-hydroxymethyl-PROXYL(レドックスプローブ)は3本線のESRスペクトルを与え、リチウムフタロシアン(酸素分圧プローブ)は3-hydroxymethyl-PROXYLのトリプレットシグナルの中心に1本線のESRスペクトルを与える。あらかじめ埋め込まれたリチウムフタロシアニンのESR画像を得た後、3-hydroxymethyl-PROXYLを投与してリチウムフタロシアニンのシグナルが被らない低磁場側シグナルを用いて画像化すれば、リチウムフタロシアンと

3-hydroxymethyl-PROXYL の分布を同一マウスで得ることができる。この方法で得たりチウムフタロシアニンと3-hydroxymethyl-PROXYL の分布画像を図4Aに示す。2種のプローブを完全に分別して3次元画像を得ることができた。図4Bは測定後腫瘍を切開したものであるが、3-hydroxymethyl-PROXYL の分布画像の中でのリチウムフタロシアニンの位置と同じ部分にリチウムフタロシアニンが確認できる。

### (3) まとめ

本研究において、がん組織に滞留性の酸素分圧プローブの開発には至らなかったが、酸素プローブとレドックスプローブの同一マウスにおける画像化に成功した。この方法により腫瘍内の酸素分圧とレドックス環境の相関性を調べることができ、放射線治療における治癒効果の予測に重要な情報を提供できるものと考えられる。今回<sup>14</sup>Nのニトロキシルプローブ(トリプレットシグナル)を用いたため、酸素分圧プローブに関する情報(酸素分圧、分布)を得てからレドックスプローブを投与して画像化する手順となったが、<sup>15</sup>Nのニトロキシルプローブ(ダブルットシグナル)を用いることにより、レドックス評価のための時系列画像を取りながら酸素分圧を測定することも可能となる。

### 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 4件)

- ① Velavan Kathirvelu, Christopher Smith, Christopher Parks, Md. Abdul Mannan, Yozo Miura, Keizo Takeshita, Sandra S. Eaton, and Gareth R. Eaton, Relaxation Rates for Spirocyclohexyl Nitroxyl Radicals are Suitable for Interspin Distance Measurements at Temperatures up to about 125 K. *Chemical Communications*, (4), 454-456 (2009) 査読有り
- ② Shoko Okazaki, Md. Abdul Mannan, Keiji Sawai, Toshiki Masumizu, Yozo Miura, and Keizo Takeshita, Enzymatic reduction-resistant nitroxyl spin probes with spirocyclohexyl rings. *Free Radic. Res.*, 41(10), 1069-1077 (2007). 査読有り
- ③ Arun K. Iyer, Khaled Greish, Takahiro Seki, Shoko Okazaki, Jun Fang, Keizo Takeshita, Hiroshi Maeda, Polymeric

micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation. *J. Drug Target.*, 15(7-8), 496-506 (2007). 査読有り

- ④ Ikuo Nakanishi, Kumiko Kawaguchi, Kei Ohkubo, Tomobori Kawashima, Sushma Manda, Hideko Kanazawa, Keizo Takeshita, Kazunori Anzai, Toshihiko Ozawa, Shunichi Fukuzumi, and Nobuo Ikota, Scandium ion-accelerated scavenging reaction of cumylperoxyl radical by a cyclic nitroxyl radical via electron transfer. *Chem. Lett.*, 36(3), 378-379 (2007). 査読有り

[学会発表] (計 7件)

- ① 岡崎祥子、立花葉子、古賀由香里、竹下啓蔵 高血圧モデルマウスにおいてアシル保護ヒドロキシルアミンプローブACPを用いたin vivo ESR法で観測された生体レドックスの変化 日本薬学会第129年会(京都) 2009年3月26日-28日
- ② 岡崎祥子、立花葉子、久保初美、竹下啓蔵 アシル保護プローブを用いたin vivo ESRによる病態モデルマウスのレドックス評価 第25回日本薬学会九州支部大会(延岡) 2008年12月6-7日
- ③ Shoko Okazaki, Yoko Tachibana, Yukari Koga, Keizo Takeshita, Evaluation of Redox status of Disease Model Mice by *in vivo* EPR Spectroscopy with Acyl-Protected Hydroxylamine Probes. Biomedical redox navigation: EPR2008, Fukuoka, September 27-30, 2008.
- ④ Shoko Okazaki, Yukari Koga, Toshiki Masumizu and Keizo Takeshita, Radical reduction by polyphenols irradiated with ultraviolet light. A Joint Conference of the International Symposium on Electron Spin Science and the 46th Annual Meeting of the Society of Electron Spin Sciences and Technology, Shizuoka, November 6-9, 2007.
- ⑤ Shoko Okazaki, Yukari Koga, Toshiki Masumizu and Keizo Takeshita, Radical reduction by phenolic compounds irradiated with ultraviolet light. 4th JSPS Core-to-Core Seminar: International In Vivo Redox Symposium, Shizuoka, November 4-5, 2007

⑥ 岡崎祥子、Md Abdul Mannan、増水章季、三浦洋三、竹下啓蔵 新規ニトロキシルスピンプローブの酵素的還元回避能と活性酸素との反応性の検討 第29回日本フリーラジカル学会/日本過酸化脂質・フリーラジカル学会第31回大会 合同学会(名古屋) 2007年6月8-10日

⑦ Keizo Takeshita, Shoko Okazaki, Md. Abdul Mannan, Toshiki Masumizu, Yoza Miura. Piperidine spinprobes with spirocyclohexyl rings: resistance to enzymatic reduction and reactivity with oxygen radicals. A Joint Conference of the 12th In Vivo EPR Spectroscopy & Imaging and the 9th International EPR Spin Trapping/Spin Labeling, Chicago, IL, U.S.A., April 29-May 3, 2007.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹下 啓蔵 (TAKESHITA KEIZO)  
崇城大学・薬学部・教授  
研究者番号：70175438

### (2) 研究分担者

増水 章季 (MASUMIZU TOSHIKI) (平成19年度)  
崇城大学・薬学部・准教授  
研究者番号：30412737  
岡崎 祥子 (OKAZAKI SHOKO) (平成19年度)  
崇城大学・薬学部・助教  
研究者番号：40435152  
安西 和紀 (ANZAI KAZUNORI) (平成19年度)  
放射線医学総合研究所・研究員  
研究者番号：70128643

### (3) 連携研究者

増水 章季 (MASUMIZU TOSHIKI) (平成20年度)  
崇城大学・薬学部・准教授  
研究者番号：30412737  
岡崎 祥子 (OKAZAKI SHOKO) (平成20年度)  
崇城大学・薬学部・助教  
研究者番号：40435152  
安西 和紀 (ANZAI KAZUNORI) (平成20年度)  
放射線医学総合研究所・研究員  
研究者番号：70128643