

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32624
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2022
課題番号：19K08105
研究課題名（和文）個別化医療を志向したがんを選択的なチミジンホスホリラーゼイメージング技術の開発

研究課題名（英文）Development of thymidine phosphorylase imaging techniques precisely targeted to the tumor for personalized medicine

研究代表者
秋澤 宏行（Akizawa, Hiromichi）

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90311795
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：私達は、核医学診断による5-FU系抗がん剤の治療効果予測のために、チミジンホスホリラーゼ（TP）標的イメージング剤IIMUを開発したが、IIMUは正常肝臓へ高い集積を示す。そこで私達は、がん選択的なTPイメージング技術の開発を目的として、本研究を計画し、実施した。その結果、有機カチオントランスポーター（OCT）の選択的阻害剤やOCTに認識されないイメージング剤の開発により、肝臓への集積を低減したTPイメージング技術を開発できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、私達が以前開発した核医学診断用イメージング剤を基にして、がんに発現するチミジンホスホリラーゼをより選択的にイメージングする技術を開発する上で有用な知見を与えるものである。この技術が開発されれば、個別化医療に強く貢献できるため、本研究の成果の社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：We previously developed IIMU as an imaging probe targeted to thymidine phosphorylase (TP) for prediction of therapeutic effect of 5-fluorouracil and its derivatives. But IIMU showed high accumulation of the radioactivity in the normal liver. The purpose of this study is the development of TP imaging techniques precisely targeted to the tumor for personalized medicine. The results of our studies demonstrated that our purposed imaging techniques could be provided by the development of selective inhibitors to organic cation transporter (OCT) and/or TP-targeted probes which are not recognized by OCT.

研究分野：放射性医薬品化学

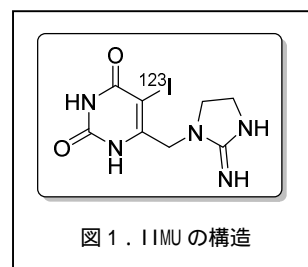
キーワード：核医学診断 がん治療効果予測 5-フルオロウラシル イメージング剤 チミジンホスホリラーゼ
有機カチオントランスポーター 個別化医療

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

5-フルオロウラシル(5-FU)系抗がん剤の効果の発現には、がん細胞内でのチミジンホスホリラーゼ(TP)による代謝が関与していることから、がんでのTP発現レベルを確認することで、5-FU系抗がん剤の治療効果を予測できると考えられる。そこで私達は、核医学診断による5-FU系抗がん剤の治療効果予測のために、TP標的イメージング剤IIMU(図1)を開発した[1]。これまでに、IIMUはTPを高発現する組織に高集積し、5-FU系抗がん剤であるカペシタピンの治療効果を予測できることを確認している[2]。また、IIMUは放射性ヨウ素¹²³Iで標識したイメージング剤であることから、IIMUががんを集積することを確認した後に、¹²³Iの代わりに治療に適した核種(同じヨウ素の¹³¹Iや同じハロゲンの²¹¹At)で標識した放射性医薬品を投与すれば、核医学診断・治療によるtheranosticsを実践できる。



しかし、IIMUは正常な肝臓に高い集積を示すことから、肝臓の近傍のがんについてはTP発現の評価が困難となる。また、¹³¹I標識IIMUなどによる核医学治療を行った場合、肝障害を招く危険性が高く、theranosticsの実施が困難である。したがって、IIMUをがんを選択的に集積させる方法やがんを選択的に集積するTPイメージング剤の開発が求められる。

2. 研究の目的

問題となるIIMUの正常肝臓への集積は、肝細胞内で高発現しているTPに特異的なものだと考えられている。したがって、がんのTPに選択的なイメージングは、肝細胞とがん細胞との間でTPイメージング剤の取り込みや排出のメカニズムに違いがあれば実現可能と考えられる。そこで本研究では、(1)生物学的手法と(2)化学的手法により、がん選択的にTPをイメージングできる技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 生物学的手法では、IIMUの細胞での取り込みと排出に関わるトランスポーターを調べ、その阻害剤を用いることによって、がんへの集積の向上や肝集積の低減が可能かについて検討した。

トランスポーター高発現細胞を用いたin vitro条件下での評価

肝臓に発現するSolute Carrier (SLC) トランスポーターを中心に有機カチオントランスポーター(OCT)1-3を含む8種類のトランスポーターのIIMUの取り込みへの関与について、各々のトランスポーターを高発現する細胞を用いてin vitro条件下での評価を行った。

トランスポーターの阻害剤がIIMUの体内分布へ及ぼす影響の評価

トランスポーター高発現細胞を用いた評価の結果、IIMUの取り込みに関与することが明らかとなったOCTとMATEの基質として知られる薬剤がIIMUの体内分布へ及ぼす影響についてマウスを用いた解剖法により評価した。

(2) 化学的手法では、IIMUとは異なるトランスポーターに認識されるために、肝臓に集まりにくく、がんにより選択的に集積するTPイメージング剤の開発を目指した。

TPイメージング剤の設計と合成

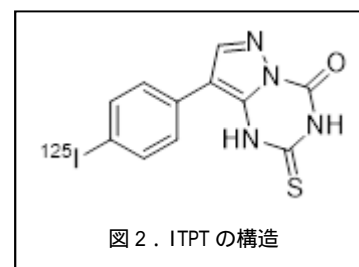
IIMUの塩基性に寄与するグアニジノ基を持たないTP阻害剤[3]を母体とするITPT(図2)を設計し、合成した。

in vitroでの細胞取り込み評価

TP高発現細胞としてA431細胞、低発現細胞としてAZ521細胞を用い、ITPTのTP特異的な集積を評価した。さらにSLCトランスポーター高発現細胞を用いて取り込みに関与するトランスポーターについて検討した。

担癌マウスにおける体内分布の評価

A431細胞移植マウスを用い、ITPT投与後の生体内分布を評価した。



4. 研究成果

(1) 生物学的手法

トランスポーター高発現細胞を用いたin vitro条件下での評価

OATP1B1、OCT1、OCT2、NTCP、MATE1、MATE2Kそれぞれの一過性高発現細胞における¹²⁵I IIMU添加10分後の細胞取り込み率は、コントロール細胞であるMock細胞と比べて有意に高かった(Fig. 3)。特に、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2Kの高発現細胞で顕著な増加が示されたことから、

IIMUの取り込みには、これらのトランスポーターが関与することが示唆された。さらに、OCTとMATEの基質となることが知られているPyrimethamineとVerapamilが、各トランスポーター高発現細胞へのIIMU取り込みに及ぼす影響について検討した。その結果、PyrimethamineとVerapamilはそれぞれ、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2Kの高発現細胞で用量依存的に有意なIIMU取り込みの抑制を示した(Figs. 4, 5)。OCTよりもMATEに高い阻害活性を示すPyrimethamine [4]は、MATE1、MATE2高発現細胞において低濃度でも高い抑制効果を示し、MATEよりもOCTに高い阻害活性を示すVerapamil [4]は、OCT1、OCT2高発現細胞において高い抑制効果を示したことから、IIMUの取り込みに及ぼす各トランスポーターの影響が明らかとなった。

トランスポーターの阻害剤がIIMUの体内分布へ及ぼす影響の評価(Figs. 6, 7)

OCTとMATEの基質であるPyrimethamineとVerapamilがIIMUのマウス体内分布に及ぼす影響について検討した結果、PyrimethamineとVerapamilはともにIIMU投与3時間後における腸への集積を有意に低下させるものの、肝臓への集積は上昇傾向にあることがわかった。肝臓と腎臓において、OCTは取り込み過程に、MATEは排出過程にそれぞれ関与することから、今回の実験条件ではPyrimethamineとVerapamilがそれぞれOCTとMATEをともに阻害したことにより、肝臓と腎臓への集積の上昇傾向が示されたと考えられる。一方、MATEが発現しない腸においては、PyrimethamineとVerapamilによるOCT阻害の効果により集積率の低下が確認されたと推測される。以上の結果から、肝臓や腎臓等の正常臓器へのIIMU取り込みを制御するためには、取り込み過程に関与するOCTのみを阻害することが必要であることが明らかとなった。

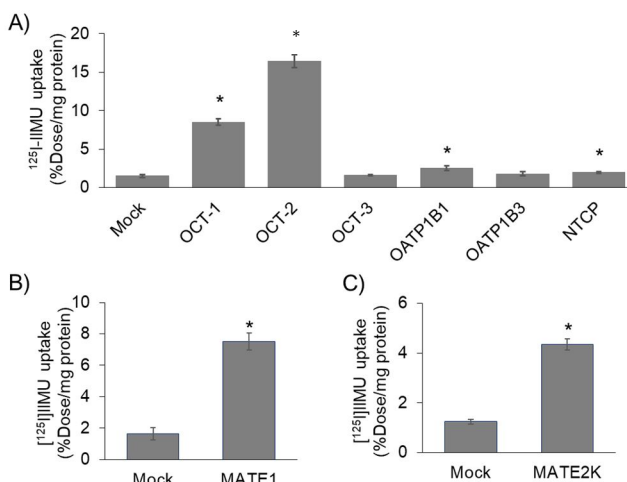


Fig. 3. トランスポーター高発現細胞における $[^{125}\text{I}]$ IIMUの取り込み率
 $[^{125}\text{I}]$ IIMU添加後、pH 7.4 (A), pH 8.0 (B), pH 8.4 (C)のインキュベーション条件下で10分間のインキュベーションを行った際の取り込み率。Average \pm SE (n=6), * p < 0.001 v.s. Mock (T.TEST)

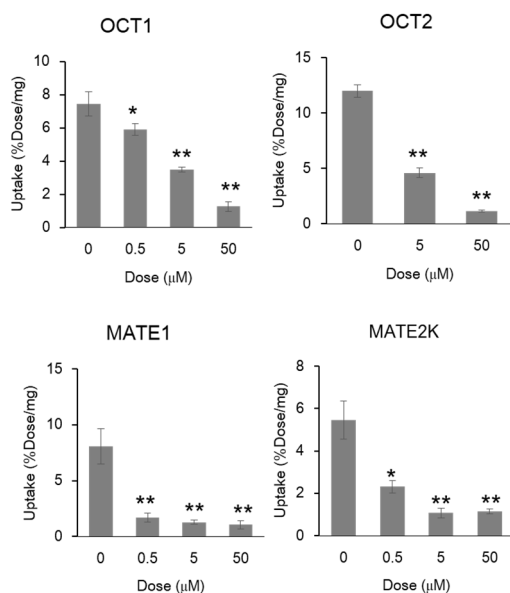


Fig. 4. トランスポーター高発現細胞における $[^{125}\text{I}]$ IIMU取り込みに及ぼすPyrimethamineの影響
 Pyrimethamineを $[^{125}\text{I}]$ IIMUと同時に添加10分後の取り込み率。Average \pm SE (n=3-4), * p < 0.01, ** p < 0.001, v.s. Control (T.TEST)

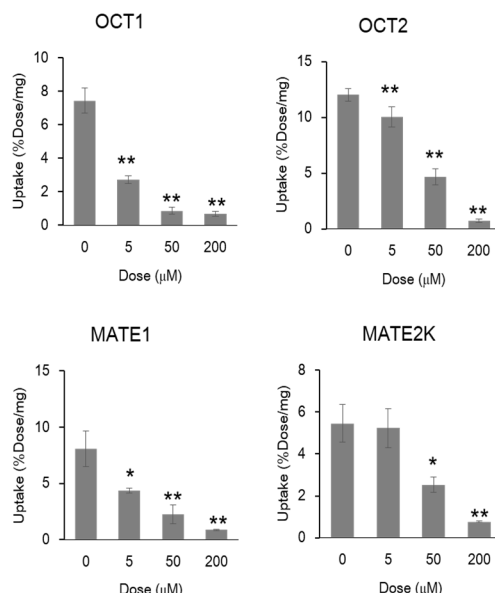


Fig. 5. トランスポーター高発現細胞における $[^{125}\text{I}]$ IIMU取り込みに及ぼすVerapamilの影響
 Verapamilを $[^{125}\text{I}]$ IIMUと同時に添加10分後の取り込み率。Average \pm SE (n=3-4), * p < 0.01, ** p < 0.001, v.s. Control (T.TEST)

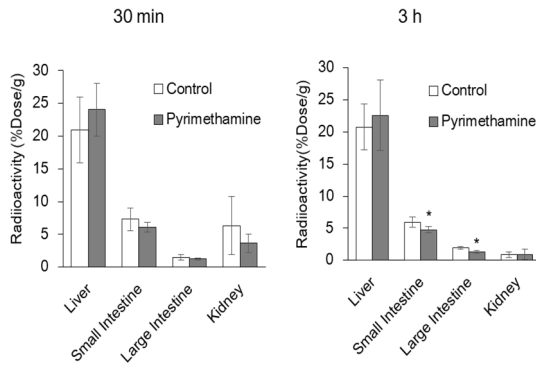


Fig. 6. マウス臓器への $[^{125}\text{I}]$ IIMU 集積に及ぼす Pyrimethamine の影響
 Pyrimethamine (5 mg/kg)を静脈内投与 5分後に $[^{125}\text{I}]$ IIMU を投与し、30分、3時間後におけるマウス臓器への集積率。Average \pm SE (n=4-5), * p < 0.05, ** p < 0.01, v.s. Control (T.TEST)

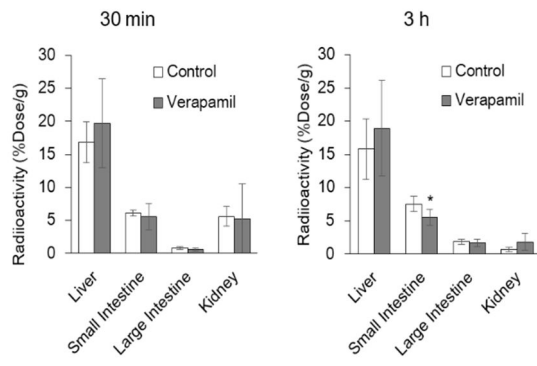


Fig. 7. マウス臓器への $[^{125}\text{I}]$ IIMU 集積に及ぼす Verapamil の影響
 Verapamil (5 mg/kg)を静脈内投与直後に $[^{125}\text{I}]$ IIMU を投与し、30分、3時間後におけるマウス臓器への集積率。Average \pm SE (n=4-5), * p < 0.05, ** p < 0.01, v.s. Control (T.TEST)

(2) 化学的手法

TP イメージング剤の設計と合成

非放射性の ITPT は 5 段階で合成し、総収率 2.1% で得られた。また、 $[^{125}\text{I}]$ ITPT は、標識前駆体を合成した後、スズ - ヨウ素交換反応により、放射化学的収率 13%、放射化学的純度 99% 以上で得られた。

in vitro での細胞取り込み評価

TP 発現の高い A431 細胞と TP 発現の低い AZ521 細胞を用いて、 $[^{125}\text{I}]$ ITPT 添加 2 時間後の細胞取り込み量を評価した結果、AZ521 細胞よりも A431 細胞の方が 1.9 倍高い取り込みを示した (Fig. 8)。また、その取り込み量は、TP 阻害剤である非標識 IIMU または非標識 ITPT の存在下でインキュベーションすることにより約 30% 以上減少することが示されたことから (Figs. 9、10)、A431 細胞への $[^{125}\text{I}]$ ITPT の細胞内取り込みの TP 特異性が確認できたと考えられる。

$[^{125}\text{I}]$ ITPT の取り込み過程に関与するトランスポーターを明らかにするために、SLC トランスポーター高発現細胞を用いた検討を行った。その結果、OCT2 高発現細胞、OCT3 高発現細胞において、コントロール細胞である Mock 細胞と比べて高い $[^{125}\text{I}]$ ITPT の取り込み量が示された (Fig. 11)。 $[^{125}\text{I}]$ IIMU の取り込みには OCT1 と OCT2 が関与する可能性を確認しているが、今回行った $[^{125}\text{I}]$ ITPT の検討では、OCT1 高発現細胞と Mock 細胞との間で取り込み量に差が認められず、 $[^{125}\text{I}]$ ITPT は OCT1 の基質とならない可能性が高いと考えられた。

担癌マウスにおける体内分布の評価

Fig. 12 は、A431 細胞移植マウスにおける $[^{125}\text{I}]$ ITPT 投与 0.5 および 3 時間後における生体内分布の結果である。肝臓への $[^{125}\text{I}]$ ITPT の集積値は、投与 0.5 時間後から投与 3 時間後に

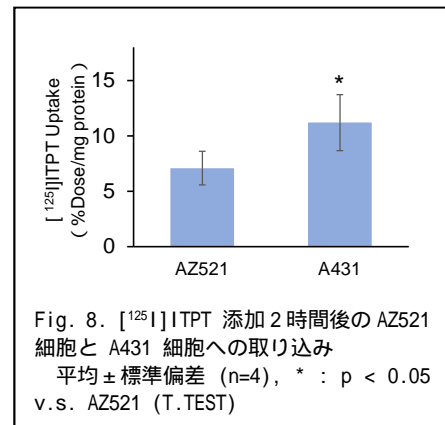


Fig. 8. $[^{125}\text{I}]$ ITPT 添加 2 時間後の AZ521 細胞と A431 細胞への取り込み
 平均 \pm 標準偏差 (n=4), * : p < 0.05 v.s. AZ521 (T.TEST)

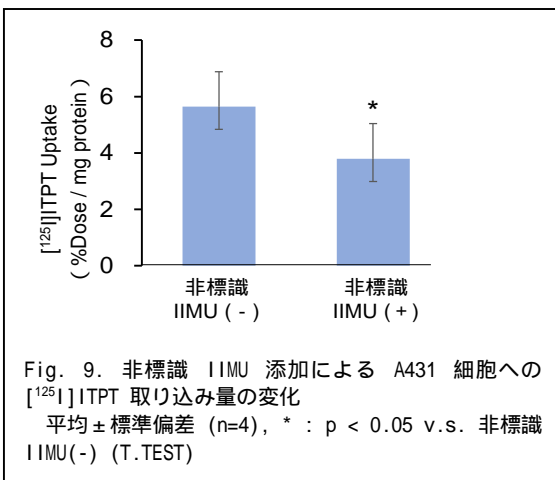


Fig. 9. 非標識 IIMU 添加による A431 細胞への $[^{125}\text{I}]$ ITPT 取り込み量の変化
 平均 \pm 標準偏差 (n=4), * : p < 0.05 v.s. 非標識 IIMU(-) (T.TEST)

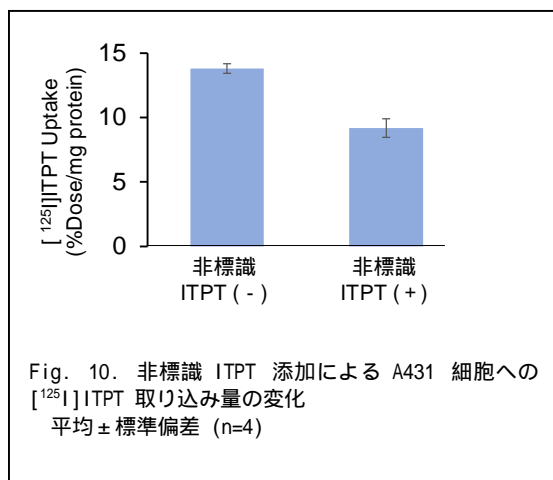


Fig. 10. 非標識 ITPT 添加による A431 細胞への $[^{125}\text{I}]$ ITPT 取り込み量の変化
 平均 \pm 標準偏差 (n=4)

かけて顕著に減少するという結果が得られた。 $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$ の文献値[1]と比較すると、 $[^{125}\text{I}]\text{ITPT}$ 投与 0.5 時間後の肝臓への集積値は、 $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$ より僅かに低い程度であったが、 $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$ が投与 3 時間後も高い集積を維持するのに対し、 $[^{125}\text{I}]\text{ITPT}$ は顕著に減少するという点で異なる動態を示すことが明らかとなった。一方で、 $[^{125}\text{I}]\text{ITPT}$ のがん組織への集積値は、 $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$ の文献値[1]より劣るものの、集積量は投与後 3 時間後においても維持されることが確認できた。

以上より、 $[^{125}\text{I}]\text{ITPT}$ は、TP 特異的な細胞内取り込みを示し、かつ OCT1 の基質にならないことにより、肝臓への集積を低減した可能性が示された。

(3) 結語

OCT を選択的に阻害する阻害剤の開発や OCT に認識されないイメージング剤を開発することにより、肝臓への集積を低減した TP イメージング技術を開発できる可能性が示された。

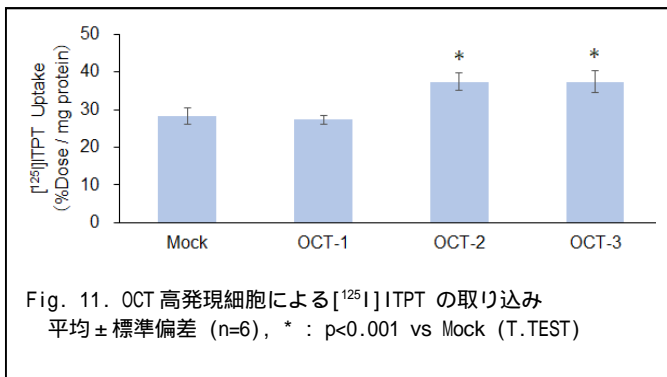


Fig. 11. OCT 高発現細胞による $[^{125}\text{I}]\text{ITPT}$ の取り込み
平均±標準偏差 (n=6), * : p<0.001 vs Mock (T.TEST)

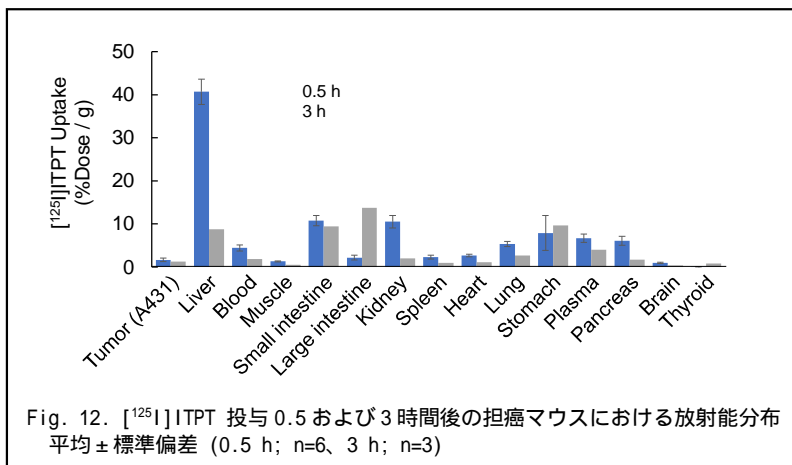


Fig. 12. $[^{125}\text{I}]\text{ITPT}$ 投与 0.5 および 3 時間後の担癌マウスにおける放射能分布
平均±標準偏差 (0.5 h; n=6, 3 h; n=3)

<引用文献>

- [1] H. Akizawa, et al., *Nucl. Med. Biol.*, **37**, 427-432, 2010.
- [2] N. Kobashi, et al., *J. Nucl. Med.*, **57**, 1276-1281, 2016.
- [3] L. Sun, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **65**, 1-11, 2013.
- [4] H. Koepsell, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **17**, 635-653, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川 舞衣, 宿里充穂, 尾江悟, 水野雄貴, 久下裕司, 秋澤宏行
2. 発表標題 トランスポーター高発現細胞を用いたチミジンホスホリラーゼ標的放射性プローブ[123I] IIMUの取り込み機構に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宿里 充穂 (Shukuri Miho) (20525571)	昭和薬科大学・薬学部・講師 (32624)	
研究分担者	久下 裕司 (Kuge Yuji) (70321958)	北海道大学・アイソトープ総合センター・教授 (10101)	
研究分担者	趙 松吉 (Zhao Songji) (80374239)	福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授 (21601)	
研究分担者	尾江 悟 (Onoe Satoru) (90756107)	昭和薬科大学・薬学部・助教 (32624)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水野 雄貴 (Mizuno Yuki) (90805194)	北海道大学・アイソトープ総合センター・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関