

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15468

研究課題名(和文) 個別化医療に貢献する新規分子設計に基づく汎用性の高い低酸素可視化プローブの創成

研究課題名(英文) Development of novel hypoxia imaging probes with a novel retention mechanism and high versatility

研究代表者

梅田 泉 (Umeda, Izumi, O.)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：40160791

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)：本研究では従来とは異なる新しい低酸素集積機序の概念を提起し、かつ汎用性の高い核種Tc-99mを用いて、新規低酸素イメージング剤の開発を目指した。新規概念に基づいてプローブの分子設計を行い、12種類の化合物を合成し、その中から低酸素環境特異的な集積を示す候補化合物を得た。それらは担がん動物モデルにおいて、低酸素環境に依存した優れた集積を示した。In vivo SPECT/CTイメージングにおいても腫瘍を明瞭に描画できた。得られた成績は、従来開発のPET低酸素イメージングプローブと同等もしくは凌いでおり、本Tc-99m標識プローブは新しい低酸素イメージングプローブとして有用と期待される。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia is a characteristic feature of most solid tumors and closely related to tumor malignancy and treatment-resistance; therefore, in vivo visualization of tumor hypoxia promises to greatly contribute for optimization of cancer therapy. We herein developed new SPECT probes with a unique retention mechanism, differing from conventional nitroimidazole derivatives. In cell-based assay, our Tc-99m-labeled probes demonstrated significantly higher uptake in hypoxic cells than in normoxic cells, indicating the validity of our strategy. Animal studies revealed that their tissue distribution pattern including tumor accumulation were greatly different depending on the structure of ligand components. By modifying them, they successfully accumulated in the hypoxic region in the tumor. In vivo SPECT/CT images clearly depicted their uptake in tumors. Tc-99m is the most common nuclide for nuclear medicine probes, therefore they are quite promising as general clinical probes for hypoxia imaging.

研究分野：分子イメージング、放射性薬品化学、腫瘍核医学

キーワード：低酸素 イメージング がん SPECT Tc-99m

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍内には必ずと言ってよいほど低酸素領域が存在し、放射線治療や化学療法に対する抵抗性と密接な関係にある。従って、低酸素領域の可視化はがん診療最適化の重要な課題である。核医学領域ではこれまでいくつかの低酸素領域イメージングプローブが開発されてきた。しかし、それらはほぼ PET プローブであり、また主にニトロイミダゾール誘導体が主体である。PET プローブは設備の整った一部の施設でしか製造・使用ができないために汎用性に乏しい。また、ニトロイミダゾール誘導体の低酸素領域への集積は未だ機序が明らかにされていない。現時点では一般診療に用いることのできる低酸素イメージングプローブは未だなく、早急な開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、多くの施設で使用が可能な SPECT 核種を用い、かつニトロイミダゾール誘導体などの従来の低酸素イメージングプローブとは全く異なる機序で低酸素領域を可視化するプローブ開発を目指した。具体的には核種として ^{99m}Tc を用い、以下に示す分子設計の下、新規プローブの合成、評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 分子設計

構造内に ^{99m}Tc 結合部位とニトロベンジル基等の脱離基をもつコンパクトな分子を分子設計の土台とした。 ^{99m}Tc 結合リガンドとしては N3S あるいは N2S2 を基本骨格とし、それらを 4-nitrobenzyl ester あるいは 4-nitrobenzyl sulfide とした。

これらの化合物は、低酸素細胞に取り込まれた場合、低酸素下の過還元状態において、4-nitrobenzyl 基が還元・脱離し、その結果、水溶性でかつ負電荷をもつ ^{99m}Tc 標識化合物に変化すると予想される。生成物は細胞膜を透過できず、従って低酸素細胞に蓄積することが期待される。

(2) 候補化合物の合成と ^{99m}Tc 標識

上述の分子設計に基づき、12 種の化合物を合成した。得られた化合物は $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ および質量分析によって構造を決定した。収率は 24-95%であった。これらの化合物の ^{99m}Tc 標識では、まず塩化スズ存在下で $^{99m}\text{TcO}_4^-$ とグルコヘプトン酸ナトリウムを反応させて、 ^{99m}Tc - グルコヘプトン酸を合成した。候補化合物の 50%アセトニトリル水溶液に 7 vol%の炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、 ^{99m}Tc - グルコヘプトン酸を加え、加熱しながら反応させた。反応溶液を HPLC で分離し、標識化合物を分取し、減圧下濃縮により試料を得た。

(3) 分子設計の妥当性の検証

マウス乳がん FM-3A 細胞あるいは EMT6 細胞を用い、細胞取込実験、担がん動物作成を行った。担がん動物モデルは、がん細胞 5×10^5 cells をマウス大腿部皮下に移植して作成した。プローブの腫瘍集積性および体内動態は組織摘出、および *in vivo* SPECT/CT イメージングにより検討した。組織化学的検討では、予め動物に低酸素マーカーであるピモニダゾールを投与しておいた上で、候補化合物を投与し、腫瘍を摘出し、直ちに凍結切片を作成した。連続の切片でオートラジオグラフィ (ARG) と免疫組織化学染色を実施した。

4. 研究成果

(1) 血清中での安定性

合成した 12 種類の化合物の ^{99m}Tc 標識体を 37 °C で血清とインキュベートした結果、そのうちの 10 種は少なくとも 1 時間は安定であった。

(2) 培養細胞への取込

^{99m}Tc 標識体の培養細胞への取込を、常酸素条件下と低酸素条件下で比較した結果、低酸素条件下の細胞への取込は正常状態の細胞より有意に高いことが明らかとなった。細胞ホモジネートを試料として HPLC-MS の解析より想定した還元代謝による代謝物生成が確認され、分子設計の妥当性が検証できた。

(3) 担がん動物に投与後の腫瘍集積および体内分布

候補化合物の ^{99m}Tc 標識体を、担がん動物に投与し、腫瘍集積および組織分布を観察した。最初の候補化合物は、培養細胞では低酸素下で高い集積を示したが、担がん動物に投与すると、投与後速やかに排泄され、腫瘍内低酸素領域に集積するに至らなかった。これらのプローブを担がん動物に投与した場合、腫瘍への集積率はプローブの血中安定性に依存し、安定性を高める分子設計が必要と考えられた。そこでプローブ構造設計で ^{99m}Tc に対する配位原子、構造内のカルボニル基の位置や数、脱離基の構造等を変化させ、プローブの物理的性質を調整して体内動態の最適化を図り、腫瘍内低酸素領域への集積の改善を図った。

担がん動物に投与した場合の腫瘍集積性と腫瘍/血液比を指標として、プローブの構造に改変を加えた結果、投与 1 時間後で、腫瘍集積率が投与量の約 1-2%/g、腫/血液比 2-3、腫瘍/筋肉比 15-20 程度の良好な成績を示すプローブを得ることが出来た。

最も良好な成績を示した候補化合物は、血中からの消失は速やかであるが、しかし早すぎず、腫瘍では投与後 3 時間にわたって比較的高い集積(>1%投与量/g)を保った。正常組織では、腎臓および肝臓で投与直後に比較的高い集積を認めたが、経時的に速やかに消失した。小腸への集積は経時的に増加した。糞尿中のへの排泄を観察した結果、投与 3 時間後で投与量の約 60%が尿中に排泄されていた。この時点では糞中への排泄は認められなかった。

(4) *in vivo* SPECT/CT イメージング

第(3)項で最も良好な成績を示した候補化合物の ^{99m}Tc 標識体 20-25MBq / mouse を担がん動物に投与し、投与 1 時間後の *in vivo* SPECT/CT イメージを撮像した。明瞭な腫瘍集積が描画できた。

(5) 組織化学的検討

上項で認められた候補化合物の腫瘍集積

が、低酸素環境に依存するものであることを検証するため、組織化学的検討を行った。腫瘍を摘出し、直ちに凍結切片を作成し、連続する切片で ARG とピモニダゾール免疫染色を実施した。腫瘍の中央部には壊死部分が認められ、それを取り囲むようにピモニダゾール免疫染色ポジティブ領域が観察された。ARG では候補化合物の不均一な腫瘍内分布が明瞭に示された。両者の比較から、候補化合物の集積の高い領域は、ピモニダゾール陽性領域とよく相関することが明らかとなった。すなわち、本化合物は低酸素領域に集積していると考えられた。

(6) まとめと今後の展望

本研究において、我々はこれまでとは異なる新しい低酸素集積機序の概念を提起し、それに基づいたプローブの分子設計を行った。12 種類の化合物を合成し、その中から低酸素環境特異的な集積を示す候補化合物を得た。それらは担がん動物モデルにおいて、低酸素環境に依存した優れた集積を示した。得られた腫瘍集積率、腫瘍/血液比、腫瘍/筋肉比などは、従来開発されてきた PET 低酸素イメージングプローブに比べて同等もしくは優れており、新しい腫瘍低酸素プローブとしておおいに期待できる。

本プローブの大きな特長のひとつは、SPECT 核種 ^{99m}Tc を用いていることである。PET プローブはサイクロトロンなど大がかりな設備を所有する施設でしか使用が出来ないが、 ^{99m}Tc は多くの施設で使用が可能である。ジェネレータシステムなどで容易に入手でき、価格も廉価であるなど、汎用性の点で PET 製剤を大きく凌いでいる。 ^{99m}Tc を用いた SPECT プローブによって、多くの施設で低酸素イメージングが可能になると考えられ、その意義は大きい。

低酸素イメージングは、がんの悪性度の評価や、放射線治療抵抗性、抗がん剤治療抵抗性の予測などに有効と考えられる。また、近年はがんの低酸素領域を標的とした治療薬も開発されており、それらのバイオマーカーとしての役割も期待される。 ^{99m}Tc 標識 SPECT 製剤によって、低酸素イメージング

が多くの施設で実施できるようになれば、がん診断、がん治療に大きく貢献出来ると期待される。

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2件)

Ito K, Hamamichi S, Abe T, Akagi T, Shirota H, Kawano S, Asano M, Asano O, Yokoi A, Matsui J, Umeda IO, Fujii H. Antitumor effects of eribulin depend on modulation of the tumor microenvironment by vascular remodeling in mouse models, *Cancer Science*, 2017, 108(11): 2273-2280. DOI: 10.1111/cas.12841

Kimura S, Kakishima Y, Kuchimaru T, Kondoh S, Yoshimoto M, Fujii H and Umeda IO. Application of HaloTag® technology to in vivo molecular imaging using protein probes labeled by metallic radionuclides. *Radioisotopes*. 65, 247-255 (2016).

〔学会発表〕(計3件)

梅田 泉、木村 禎亮、藤井 博史、新規分子設計に基づく汎用性の高い核医学低酸素可視化プローブの開発、第15回がんとハイポキシア研究会、ポスター、2017/11/10、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

Izumi O. Umeda, Sadaaki Kimura, Hirofumi Fujii, Newly Developed ^{99m}Tc-labeled Compact Probes Specifically Accumulated in the Tumor Hypoxia Region with Unique Retention Mechanism Differing from Conventional Nitroimidazole Derivatives, World Molecular Imaging Congress 2016, poster, 2016/9/9, New York (USA).

Izumi O. Umeda, Sadaaki Kimura, Hirofumi Fujii, Novel SPECT Hypoxia imaging probes with unique retention mechanism, Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2016, poster, 2016/10/16, Barcelona (Spain).

〔その他〕

ホームページ等:

<https://www.ncc.go.jp/jp/epoc/index.htm>
|

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅田 泉 (UMEDA, Izumi O.)

国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野・ユニット長

研究者番号: 40160791

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

高橋 秀依 (TAKAHASHI, Hideyo)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号: 10266348

中村 武志 (NAKAMURA, Takeshi)

国立がん研究センター・先端医療開発センター・機能診断開発分野・特任研究員

研究者番号: 10624611