

令和元年6月7日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19834

研究課題名(和文)PETプローブを用いたがんの代謝の解明と測定法の開発

研究課題名(英文)Analysis and imaging of abnormal metabolism in tumor using PET probes

研究代表者

岡田 真希 (Okada, Maki)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 標識薬剤開発部・研究員(任常)

研究者番号：00415407

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)：In vitro実験でがん細胞における[1-11C]酢酸は取り込み後早期では主に水溶性物質へと代謝されるが、その後時間の経過と共に水溶性代謝物の割合が減少し、脂溶性代謝物の割合が増加した。[1-11C]酢酸の細胞内への取り込みおよび脂溶性物質への代謝の増加にグルタミンの存在が関与していることが示唆された。新規に合成を行った[カルボニル-11C]メチルピペリジル-4-アセテート(MP4A)が、既知の[1-11C]酢酸の前駆プローブと同様に脳内に素早く取り込まれた後[1-11C]酢酸へと変換されると示唆されたことから、[1-11C]酢酸の前駆プローブとしての有用であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではがん細胞内の代謝リプログラミングの測定と新規測定法の確立を目的とした。がん細胞内における酢酸の代謝を測定し、グルタミンがエネルギー代謝のみならず腫瘍細胞内での脂質合成に関与していることが示唆された。また今後、[1-11C]-ケトグルタル酸等のPETプローブの開発がさらに進むことによってイソクエン酸脱水素酵素(IDH)の突然変異によって生じる2-ヒドロキシグルタル酸(2-D-HG)の生成・蓄積をイメージング化することが可能となり、IDH変異の有無による予後や治療計画に大きな影響を与えることは言うまでもない。

研究成果の概要(英文)：In vitro tumor cell study, intracellular radioactivity derived from[1-11C]acetate mainly presented as aqueous metabolites like organic acid and amino acids in the earlier phase and then decreased accompanied with increasing ratio of lipophilic metabolites like phospholipid. [1-11C]acetate uptake and lipophilic metabolites production in tumor cell were seemed to be depended on glutamine presence. [Carbonyl-11C]N-methyl-4- piperidyl acetate (MP4A) was successfully radiosynthesized and was well taken up into rat brain followed by represented similar kinetics with the other [1-11C]acetate pro-probe, which indicates [carbonyl-11C]MP4A was seemed to have a potential as cell permeable pro-probe of [1-11C]acetate.

研究分野：放射線医学

キーワード：酢酸 IDH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞では Warburg 効果のような細胞内代謝変化だけでなく、核酸、タンパク質、脂質の合成促進など様々な代謝変化が生じている。また近年注目されているようにイソクエン酸脱水素酵素 (IDH) の突然変異によって生じる 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-D-HG) の生成・蓄積がグリオーマや白血病、軟骨腫等のがん化に関与している。一方で IDH 変異を有するがんの方が IDH 変異を有しないがんよりも予後が良いことが報告されている。IDH 変異や 2-D-HG の影響には不明な点が多いが、IDH 変異の有無が予後や治療計画に大きな影響を与えることは言うまでもない。正常細胞内で生体内に広く存在する酢酸はアセチル-CoA を経てクエン酸回路 (TCA 回路) の基質となり一部はグルタミン・グルタミン酸等のアミノ酸へ、大部分は最終的に二酸化炭素へと代謝される。一方多くのがん細胞で生体内酢酸は主に TCA 回路の中間生成物であるクエン酸を細胞質内で再びアセチル-CoA とし、脂肪酸・脂質の生成に利用していると言われているが、TCA 回路代謝産物 (グルタミン等のアミノ酸) の生成に関する報告は少ない。また一部のがん細胞においては細胞内に豊富に存在するグルタミンを α -ケトグルタル酸にまで変換することで TCA 回路の基質として使用できるようにエネルギー源の補充をしているグルタミノリシスという代謝リプログラミングが行われていることやグルタミン酸を経てグルタチオンを生成し、がん細胞生存に寄与していると報告されている。このような代謝リプログラミングは、がんの種類や酸素濃度等の生存環境下により大きく異なっており、TCA 回路代謝産物や脂肪酸・脂質はそのがんの代謝特性や微小環境を反映していると想定されるため、がん細胞における代謝を理解することは診断や治療計画、創薬分野に大きく貢献すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではがん細胞およびがん細胞移植モデル動物を用い、 ^{11}C 酢酸および ^{13}N アンモニアなどの PET プローブを用いて TCA 回路関連代謝産物の測定から、がん細胞における代謝変化のさらなる解明を目指すとともに、イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) の突然変異によって生じる 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-D-HG) のイメージングを目的とした新規 PET プローブの開発やマイクロダイアリシスなど手法を組み合わせた新たながん細胞の高感度 *in vivo* 代謝物動態測定法の確立を目指す。

3. 研究の方法

【1】*in vitro* 培養細胞系を用いた ^{11}C 酢酸の代謝物測定

ヒトグリオーマ細胞 LN-18 を用いて *in vitro* 放射能取り込み実験と、取り込んだ放射能の化学形の分析を行った。細胞培養条件として、通常の培地、増殖に必要な栄養素であるグルコース、グルタミンを除去した培地を用いて比較検討した。細胞に ^{11}C 酢酸を添加し、10 分、30 分培養後に細胞と細胞外液を回収し、それぞれの放射能をオートガンマカウンタで測定した。また Bligh & Dyer 法によって脂質抽出を行い、有機層 (脂質) と水層 (水溶性代謝物) の放射能比を測定した。また水層に含まれる ^{11}C の化学形を液体クロマトグラフィで分析した。

【2】2-ヒドロキシグルタル酸をターゲットとした新規プローブの開発

イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) 変異によって生じるオンコメタボリットである 2-ヒドロキシグルタル酸のイメージングを目的とし、新規プローブの開発を試みた。1 位炭素の ^{11}C 標識 α -ケトグルタル酸 ($[1-^{11}\text{C}]\alpha\text{-KG}$) は IDH 変異があれば 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-D-HG) として細胞内にとどまるが、IDH に変異がなければ二酸化炭素として排出されると想定される。 $[1-^{11}\text{C}]\alpha\text{-KG}$ より細胞内移行性の高い前駆プローブとして $\alpha\text{-KG}$ のオクチルエステル ($[1-^{11}\text{C}]\alpha\text{-KG}$ オクチル) の合成を検討した。既報の $\alpha\text{-KG}$ オクチルの非標識合成法を基に自動合成装置を用いて ^{11}C ホスゲン反応中間体として *n*-オクタノールを反応させた後 $\alpha\text{-KG}$ を加える one-pot 合成法によって $[1-^{11}\text{C}]\alpha\text{-KG}$ オクチルの合成条件の検討を行った。

【3】 ^{11}C シアンを反応中間体とした $[1-^{11}\text{C}]\text{ピルビン酸}$ の合成

これまで、 ^{11}C シアンを反応中間体とした $[1-^{11}\text{C}]\text{ピルビン酸}$ の合成は酵素法で報告があるのみで ^{11}C シアンから直接合成したものはない。そこで、 ^{11}C シアンを反応中間体として $[1-^{11}\text{C}]\text{ピルビン酸}$ および $[1-^{11}\text{C}]\alpha\text{-KG}$ を直接合成する手法を検討した。まず $\alpha\text{-KG}$ よりも単純な α -ケト酸であるピルビン酸の ^{11}C 標識体 ($[1-^{11}\text{C}]\text{ピルビン酸}$) の合成検討を行った。 $[^{11}\text{C}]\text{シアン}$ とアセチルクロライドの反応条件 (温度、塩基、反応時間等) を変更し、第 1 産物である $[^{11}\text{C}]\text{ピルボニトリル}$ を収率よく得る合成条件の検討を行った。

【4】 $[1-^{11}\text{C}]\text{酢酸}$ の前駆プローブとしての $[\text{カルボニル-}^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の合成

酢酸の細胞内への取り込みはモノカルボン酸トランスポータ (MCT) を介して行われるが、MCT の発現量を加味しない正味の酢酸の細胞内代謝を測定するために細胞内移行性の高い $[1-^{11}\text{C}]\text{酢酸}$ の前駆プローブの開発を行った。細胞内移行性が高い既知プローブである $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ (N- $[^{11}\text{C}]\text{メチル-4-ピペリジルアセテート}$) は体内でアセチルコリンエステラーゼ

によって ^{11}C 非標識の酢酸を生じる。一方カルボニル基の炭素を ^{11}C 標識した MP4A ([カルボニル- ^{11}C]MP4A) はアセチルコリンエステラーゼによって [1- ^{11}C]酢酸を生じるため、[カルボニル- ^{11}C]MP4A を [1- ^{11}C]酢酸の前駆プロープ候補薬物としてその合成検討を行った。グリニャール反応によって得られた [カルボニル- ^{11}C]塩化アセチルを反応中間体とし、4-ヒドロキシ-1-メチルピペリジンと反応させ [カルボニル- ^{11}C]MP4A の合成を行った。

4. 研究成果

【1】in vitro 培養細胞系を用いた ^{11}C 酢酸の代謝物測定

グルタミン非存在下培養時間が 0 時間 (^{11}C 酢酸添加と同時に) に比べて非存在下培養時間が 2 時間の場合は、 ^{11}C 酢酸の取り込みは増加したが、24 時間の場合は ^{11}C 酢酸の取り込みは減少する傾向にあった。

^{11}C 酢酸添加 10 分後ではグルタミン非存在下培養時間に関係なく全放射能の 80%前後が水溶性代謝物であったが、30 分後には水溶性代謝物は 40%前後まで減少し、脂溶性代謝物が増加していた。また ^{11}C 酢酸添加 30 分後における水溶性代謝物の減少の割合はグルタミンの添加群で多くなる傾向にあった。しかし、グルタミン非存在下培養時間が長くなると、 ^{11}C 酢酸添加 30 分後でも水溶性代謝物は 80%程度存在したが、グルコースの有無による差は見られなかった。このことから、グルタミンの存在が脂溶性代謝物 (脂質など) の生成に関与していることが示唆された。また水溶性代謝物の化学形を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、添加した ^{11}C 酢酸以外の代謝物が複数種類検出されたが、代謝物の同定には至らなかった。

【2】2-ヒドロキシグルタル酸をターゲットとした新規プロープの開発

^{11}C ホスゲンを n-オクタノール (溶媒: 200 倍量の THF もしくは DMF) に -15 もしくは 0 で加え、30-80 で数分反応後、 α -KG を加え 30 で反応させた場合および ^{11}C ホスゲンを 0 で加えすぐに α -KG を加えた場合ともに [1- ^{11}C] α -KG オクチルを得ることはできなかった。 ^{11}C ホスゲンと n-オクタノールの反応によって得られる [1- ^{11}C]クロロギ酸オクチルの生成反応が進んでいない可能性が考えられた。

[1- ^{11}C]クロロギ酸オクチルの生成を確認するため、 ^{11}C ホスゲンを n-オクタノール (溶媒: 20-200 倍量の THF もしくはトルエン) に 0 で加えた後すぐに、アニリンを加え、30 で反応させたが目的物である N-フェニル[カルボニル- ^{11}C]カルバミン酸オクチルは得られなかった。これまで、 ^{11}C ホスゲンと脂肪族アルコールの反応は炭素数が 2 のエタノールまでしか報告例はなく、炭素数 8 のオクタノールと ^{11}C ホスゲンの反応によって得られる [1- ^{11}C]クロロギ酸オクチルの生成がうまくいっていない可能性が考えられた。そのため、 ^{11}C ホスゲンとアルコールの反応条件を調べた。 ^{11}C ホスゲンをメタノール (溶媒非使用) に -15 で加えた後すぐにアニリンを加え、30 で反応させたところ、目的物である N-フェニル[カルボニル- ^{11}C]カルバミン酸メチルを 20%前後の収率で合成することが可能であった。また、 ^{11}C ホスゲンとメタノールの反応時間を長くすると、副生成物である [カルボニル- ^{11}C]炭酸ジメチルの生成量が増加し、N-フェニル[カルボニル- ^{11}C]カルバミン酸メチルの収率は減少した。

同様の条件で ^{11}C ホスゲンを n-オクタノール (溶媒非使用) に 0 で加えすぐにアニリンと反応させたところ、20%の収率で目的物である N-フェニル[カルボニル- ^{11}C]カルバミン酸オクチルが得られた。このことから ^{11}C ホスゲンと n-オクタノールの反応で [1- ^{11}C]クロロギ酸オクチルの生成が確認された。しかし同様の条件で [1- ^{11}C]クロロギ酸オクチルを生成後、 α -KG を溶媒、温度、塩基等を変化させ反応させたが、[1- ^{11}C] α -KG オクチルを合成することは不可能であった。結果的に、[1- ^{11}C]クロロギ酸オクチルと α -KG の反応時に ^{11}C が脱炭酸し、 ^{11}C 非標識の α -KG オクチルが生成されていると考えられた。

【3】 ^{11}C シアンを反応中間体とした [1- ^{11}C]ピルビン酸の合成

アンモニア存在下で回収した ^{11}C シアンと塩化アセチルを反応させた場合は、反応が進まなかった。一方、氷冷下の塩化アセチルにアンモニア非存在下で回収した ^{11}C シアンを加えた後、室温で反応させたところ収率 20%程度で第 1 の目的物である [1- ^{11}C]ピルボニトリルが得られた。この条件下では、塩化アセチルの量は [1- ^{11}C]ピルボニトリルの収率にほとんど影響を与えなかった。一方氷冷下の塩化アセチルに ^{11}C シアンを加えた後、氷冷下及び 80 で反応させた場合は、[1- ^{11}C]ピルボニトリルを得ることは困難であった。[1- ^{11}C]ピルボニトリルのさらなる収率向上のため、反応温度、塩基等を変更し合成条件の検討を続けたが、収率の向上を達成することは不可能であった。

【4】[1- ^{11}C]酢酸の前駆プロープとしての [カルボニル- ^{11}C]MP4A の合成

-10-5 に冷やした 4-ヒドロキシ-1-メチルピペリジンにグリニャール反応によって得られた [カルボニル- ^{11}C]塩化アセチルを吹き込み 70 で反応させたところ収率 1-9%、放射化学純度 >97% で [カルボニル- ^{11}C]MP4A が得られた。収率はグリニャール反応による [カルボニル- ^{11}C]塩化アセチルの収率に大きく依存した。ラット脳 PET イメージングを行ったところ、[カルボニル- ^{11}C]MP4A は脳へ取り込まれた後、徐々に排出された。また、酢酸はアストロサイトの TCA 回路の選択的基質となることが知られているため、アストロサイト TCA 阻害剤を用いた

PET イメージングを行ったところ、阻害側は対照側に比べて取り込みが有意に減少した。これらは細胞内移行性の高い[1-¹¹C]酢酸の既知の前駆プローブである[1-¹¹C]酢酸ベンジル PET イメージングの結果と同様であり、[カルボニル-¹¹C]MP4A が[1-¹¹C]酢酸へと代謝変換される前駆プローブとなりうることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。