

令和元年6月7日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19815

研究課題名（和文）アミノレブリン酸を用いたがん治療の個別化を可能にするPET画像法の開発研究

研究課題名（英文）Development of novel PET probe to estimate protoporphyrin IX accumulation induced by 5-aminolevulinic acid

研究代表者

鈴木 千恵 (SUZUKI, Chie)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：20637285

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）：アミノレブリン酸（ALA）投与時の腫瘍におけるプロトポルフィリンIX（PpIX）蓄積量を評価する画像診断法の開発を目的に、新規フッ素-18標識PETプローブの開発研究を行った。新規PETプローブ候補化合物は、臨床応用の容易な標識合成法で高収率かつ高純度に得られ、ALAとは異なる機序により腫瘍細胞に取り込まれるものの、in vivoではALA投与時にPpIXを高蓄積する腫瘍に高く取り込まれ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

本研究の研究成果は、アミノレブリン酸（ALA）投与時の腫瘍におけるプロトポルフィリンIX（PpIX）蓄積量を評価する臨床応用可能な画像診断法の可能性を示しており、本画像診断法が実現すれば、蛍光ガイド下摘出術の可否やPDTの治療効果といったがんの治療方針決定に有用な情報を与え、個々の患者に適した治療法を早期に選択することを可能とし、効率の良い治療へとつながり、年々増え続けるがん患者の予後改善に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel 18F-labeled PET probe to estimate protoporphyrin IX accumulation induced by 5-aminolevulinic acid. Although the transport mechanism of the PET probe would be different from that of ALA, the PET probe could highly accumulate in a tumor, which show high accumulation of protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid.

研究分野：放射線医薬品科学

キーワード：PET アミノレブリン酸

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

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因第1位であり、がんの患者数やがんによる死亡者数は年々増加している。既存のがん治療法では治療困難な場合も多く、新たな治療法が開発され続けており、個々のがん患者に適切な治療を施すために、適切な治療法の選択や効果的な治療の実現に有用な情報を与える診断法の開発が重要性を増している。

5-Aminolevulinic acid (ALA) は、ポルフィリン合成の前駆体であり、生体に投与するとがん細胞内に取り込まれた後にポルフィリンの一種である protoporphyrin IX (PpIX) へと代謝され蛍光や光増感作用を生じる (図 1)。このような性質から ALA は、がんの蛍光ガイド下摘出術や光線力学療法 (PDT) に用いられており、本邦でも 2013 年に悪性神経膠腫の腫瘍摘出術中における腫瘍組織の可視化に対して保険承認され、腫瘍摘出率の向上に寄与している。ALA 自体は蛍光や光増感作用を持たず、腫瘍において PpIX が合成されて初めて蛍光や光増感作用を生じるため腫瘍特異性が高く、光線過敏症などの副作用が問題となりにくい、より高精度で安全ながん診断・治療法として期待される。一方で、ALA を投与した際に腫瘍に蓄積する PpIX 量が腫瘍により異なることが知られ、蛍光ガイド下摘出術における偽陰性や、PDT 治療効果の個人差の原因となる。このような背景のもと研究代表者らは、治療前に PpIX 蓄積を予測することで、より効果的ながん治療が可能になると考え、ALA 投与時の PpIX 蓄積量や腫瘍内分布を非侵襲的に評価する体外画像診断法の開発を行ってきた。

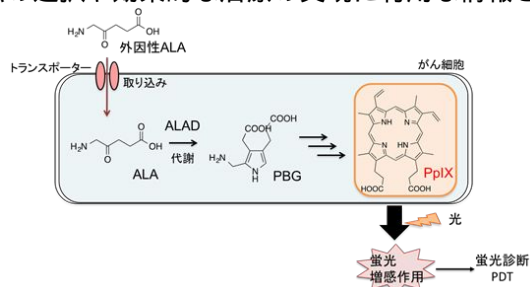


図 1. ALA を用いたがん診断・治療機序

ALA 投与時の腫瘍特異的な PpIX 蓄積機序および PpIX 蓄積量を決定する主な要因は未だ完全には明らかになっていないが、ALA の oligopeptide transporter1/2 (PEPT1/2) などの輸送体を介した腫瘍細胞への取り込みと、細胞内で ALA を PpIX に変換する代謝の最初の段階を触媒する ALA デヒドラターゼ (ALAD) の発現量の関与が報告されている。また、ALA の 5 位にメチル基を導入した MALA は、ALAD の活性部位に結合することで、ALAD を阻害することが知られる。そこで研究代表者らは、ALA の取り込みおよび細胞内 ALAD 発現量を標的とした

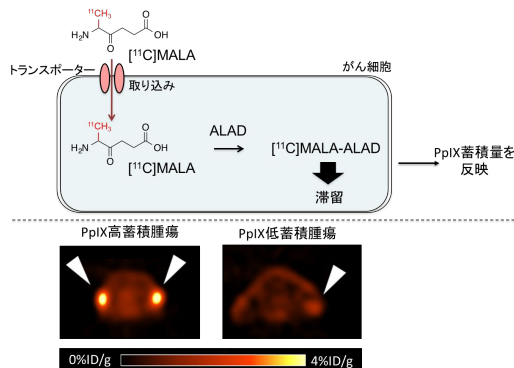


図 2. PpIX 蓄積量を予測する PET 診断 (上段) $[^{11}\text{C}]$ MALA の薬剤デザイン (下段) $[^{11}\text{C}]$ MALA 投与 60~75 分後のがんマウス PET 画像

陽電子断層法 (PET) プローブとして、MALA の 5 位を ^{11}C -メチル基に置換した $[^{11}\text{C}]$ MALA の標識合成法を開発し、培養細胞および腫瘍モデルマウスを用いて、PpIX 蓄積量を予測する画像診断薬剤としての可能性を評価した (図 2, Suzuki C. et al., Bioorg Med Chem Lett, 2013, Suzuki C. et al., J Nucl Med, 2014)。これらの検討において、 $[^{11}\text{C}]$ MALA は生体内で安定に存在し、ALA と類似した機序により細胞内に取り込まれた後に ALAD の発現量に応じて細胞内に滞留することが示され、 $[^{11}\text{C}]$ MALA の投与 60 分後における腫瘍集積量は、ALA 投与時の PpIX 蓄積量と相関した。これらの結果は、本薬剤設計により ALA 投与時の PpIX 蓄積量を治療前に非侵襲的に評価できる可能性を示すが、 ^{11}C の半減期が約 20 分と短く、診断を行う施設内にサイクロトロンを有する必要がある点と、 $[^{11}\text{C}]$ MALA の標識合成に化学的に不安定な標識前駆体を用いる点から、PET 薬剤供給の煩雑さが臨床応用上の問題となった。

2. 研究の目的

本研究では、 $[^{11}\text{C}]$ MALA 開発により得られた知見をもとに、臨床使用可能な新規 PET プローブを開発することを目的とした。現在臨床 PET 診断において最も使用されているポジトロン放出核種 ^{18}F は、低分子化合物の標識に適した比較的小さい原子半径と、約 110 分と他施設への運搬が可能な半減期を有することから、本研究の目的に最適な放射性核種であると判断し、 $[^{11}\text{C}]$ MALA と同様に ALA と類似した機序によりがん細胞に取り込まれ、ALA の代謝能に応じて細胞内に蓄積する ^{18}F 標識 PET プローブ候補化合物を設計する。設計した候補化合物の臨床応用可能な ^{18}F 標識合成法を確立し、培養細胞および腫瘍モデルマウスを用いて、本プローブの腫瘍集積機序および ALA 投与時の PpIX 蓄積量を評価する PET プローブとしての可能性の証明をめざす。本研究の成果により、ALA 投与時の PpIX の蓄積量を治療前に非侵襲的に評価可能となれば、蛍光ガイド下摘出術の可否や PDT の治療効果といったがんの治療方針決定に有用な情報を与える。さらに、本法は、蛍光物質 (PpIX) の体内における三次元的分布を、X 線 CT (コンピュータ断層像) や MRI (核磁気共鳴画像法)、他のプローブを用いた PET など他の画像と組み合わせ可能な断層像として得ることから、他のモダリティとの組み合わせにより PpIX の

腫瘍内分布をも知ることができ、ALA を用いた蛍光診断や PDT の精度向上やさらなる技術進歩の一助となる。また、PET 診断では全身を一度に検査することが可能なため、がん転移の診断・治療方針の決定にも有用である。このように本研究により期待される成果は、がんの適切な治療法を早期に選択することを可能とし、効率の良い治療へとつながり、年々増え続けるがん患者の予後改善に大きく貢献するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) ^{18}F 標識 PET プローブ候補化合物の非放射性標品および放射標識前駆体の合成

放射標識前駆体の合成

市販のレブリン酸をメタノールに溶解し、 30°C の油浴中、1 当量の臭素をゆっくりと滴下した。滴下終了後、1 時間 70°C で還流した。反応溶液を炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、ジエチルエーテルで抽出した。ジエチルエーテル層を硫酸ナトリウムで乾燥し、酢酸エチルとヘキサンを移動相に用いたカラムクロマトグラフィにより精製することで、プロモ体を得た。

プロモ体を 85% エタノール水溶液に溶解し、ギ酸ナトリウムを加え、 80°C で一晚還流した。反応溶液を減圧濃縮し、水に溶解し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで乾燥し、酢酸エチルとヘキサンを移動相に用いたカラムクロマトグラフィにより精製することで、ヒドロキシ体を得た。

ヒドロキシ体をジクロロメタンに溶解し、 0°C で塩化メタンスルホン酸とトリエチルアミンを加えた。室温で 2 時間反応後、1 N 塩酸で洗浄し、ジクロロメタン層を硫酸ナトリウムで乾燥し、酢酸エチルとヘキサンを移動相に用いたカラムクロマトグラフィにより精製することで、メシル体の合成を試みた。

ヒドロキシ体をジクロロメタンに溶解し、 0°C で塩化 p-トルエンスルホン酸とトリエチルアミンを加えた。室温で一晚反応後、減圧濃縮し、酢酸エチルとヘキサンを移動相に用いたカラムクロマトグラフィにより精製し、トシル体を得た。

非放射性標品の合成

プロモ体をアセトニトリル中でクリプトフィックス 2,2,2 (K222) 存在下、フッ化カリウムと 80°C で一晚反応させた。反応溶液を減圧濃縮し、酢酸エチルに再溶解し、飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄した。酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで乾燥し、酢酸エチルとヘキサンを移動相に用いたカラムクロマトグラフィにより精製することで、フルオロ体を得た。

フルオロ体をメタノールに溶解し、2 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、室温で一晚反応した。反応溶液に 2 N 塩酸を加え pH を 2 前後に調整し、酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を硫酸ナトリウムで乾燥し、クロロホルムとメタノールを移動相に用いたカラムクロマトグラフィにより精製することで、非放射性標品を得た。

(2) PET プローブ候補化合物の ^{18}F 放射標識法検討

小スケールでの標識条件検討

サイクロトロンを用いた ^{18}O (p, α) ^{18}F 反応により得た [^{18}F] フッ化物イオンの ^{18}O 濃縮水溶液をあらかじめ炭酸イオン型に変換した陰イオン交換樹脂に導入し、 [^{18}F] フッ化物イオンを吸着させ、炭酸カリウムと K222 を含む溶液で反応容器に溶出させ、加熱乾燥させた。1 mL のアセトニトリルを加え、再度加熱乾燥させることで、反応容器中の水を完全に除き、1~2 mL のアセトニトリルに再溶解し、 [^{18}F] KF-K222 のアセトニトリル溶液を得、小スケールでの合成実験に用いた。

プロモ体もしくはトシル体 5 mg をアセトニトリル 150 μL に溶解し、上記の [^{18}F] KF-K222 のアセトニトリル溶液 150 μL と混合し、 80°C で 10 分間反応させた。反応溶液を HPLC で分析し、フッ化反応の放射化学的変換率を算出した。

フッ化反応の進行が確認された反応溶液に、0.1~2 N 水酸化ナトリウム水溶液もしくは 2 N 塩酸 300 μL を添加し、室温もしくは 120°C で 5 分間反応させた。反応溶液を HPLC で分析し、メチルエステル加水分解の放射化学的変換率を算出した。

自動合成装置を用いた標識合成法確立

サイクロトロンを用いた ^{18}O (p, α) ^{18}F 反応により得た [^{18}F] フッ化物イオンの ^{18}O 濃縮水溶液をあらかじめ炭酸イオン型に変換した陰イオン交換樹脂に導入し、 [^{18}F] フッ化物イオンを吸着させ、炭酸カリウムと K222 を含む溶液で反応容器に溶出させ、加熱乾燥させた。1 mL のアセトニトリルを加え、再度加熱乾燥させることで、反応容器中の水を完全に除き、プロモ体 5 mg をアセトニトリル 700 μL に溶解した溶液を加え、 80°C で 5 分間反応させた。次いで 2 N 塩酸 700 μL を加え、 120°C で 5 分間反応させた。炭酸水素ナトリウム水溶液を加え中和した後、HPLC 精製、減圧乾燥させ、生理食塩水に再溶解させることで、PET プローブ候補化合物を得た。

(3) 培養細胞を用いた PET プローブ候補化合物の腫瘍細胞取り込み機序の評価

ヒト膵がん由来細胞株 AsPC-1 を 24 well プレートに 5×10^5 /well 播種し、18 時間培養した。PBS で洗浄後、約 0.5 MBq/0.5 mL の PET プローブ候補化合物溶液を添加し、 37°C で 20 分培養し、細胞に取り込まれた放射能を定量した。20 mM 非放射性 ALA を添加した状態で PET プローブ候補化合物と培養し、同様に細胞に取り込まれた放射能を定量した。

(4)担がんモデルマウスを用いた PET プローブ候補化合物の腫瘍集積性評価

雄性 BALB/c-nu/nu マウスの左下肢に AsPC-1 を、右下肢にヒト膵がん由来細胞株 BxPC-3 を皮下移植し、腫瘍径が 5~8 mm 程度になった時点で実験に用いた。以前の検討より、AsPC-1 は BxPC-3 と比較して ALA を投与した際 PpIX を高濃度に蓄積することを確認している。抱水クロラール麻酔下、上記担がんモデルマウスの尾静脈より PET プローブ候補化合物 (18 MBq) を静脈内投与し、投与直後から 60 分間 PET 撮像を行い、腫瘍および腫瘍臓器への PET プローブ候補化合物の集積を評価した。

4. 研究成果

(1) ^{18}F 標識 PET プローブ候補化合物の非放射性標品および放射標識前駆体の合成

プロモ体は当初減圧蒸留による精製を試みたが、加熱により分解し、純度よく精製することは困難であった。精製法をカラムクロマトグラフィに変更することで、純度よくプロモ体を得た。塩化メタンスルホン酸との反応では、上記条件では目的とするメシル体は得られず、ヒドロキシ体 2 分子が縮合した副生成物が認められた。

すべての非放射性化合物の構造および純度は、 $^1\text{H-NMR}$ および質量分析により確認した。

(2) PET プローブ候補化合物の ^{18}F 放射標識法検討

小スケールでの標識条件検討

プロモ体もしくはトシル体を ^{18}F KF-K222 と反応させ、HPLC で分析したところ、非放射性標品と同じ保持時間に放射活性が認められたことから、目的とする ^{18}F フッ化反応の進行を確認した (図 3)。プロモ体をおよびトシル体を標識前駆体に用いた場合の放射化学的変換率は、それぞれ 100% および 6% であり、プロモ体を標識前駆体に用いた臭素-フッ素交換反応により高収率に反応が進行することが示された。

次いで、種々の濃度の水酸化ナトリウム水溶液を用いてメチルエステルの加水分解を試みたところ、目的とする PET プローブ候補化合物より水溶性の高い副生成物を生じ、目的とする PET プローブ候補化合物の生成は確認されなかった。一方、2 N 塩酸を加え 120°C で 5 分間反応させることで、エステル加水分解反応がほぼ定量的に進行し、目的とする PET プローブ候補化合物の生成を確認した。

自動合成装置を用いた標識合成法確立

の小スケールでの条件検討より得られた知見を基に、自動遠隔合成を試みたところ、照射終了から 55 分で、放射化学的収率 14.4% (減衰補正なし) で、目的とする PET プローブ候補化合物を 95% 以上の放射化学的収率で得た。

(3) 培養細胞を用いた PET プローブ候補化合物の腫瘍細胞取り込み機序の評価

非放射性 ALA 添加および非添加条件における PET プローブ候補化合物の AsPC-1 細胞取り込みは、それぞれ 4.94 ± 1.40 , 5.96 ± 1.03 %/mg protein であり、ALA 添加による PET プローブ候補化合物の取り込み阻害は認められなかった。この結果は、PET プローブ候補化合物が ALA とは異なる機序により腫瘍細胞に取り込まれる可能性を示す。

(4) 担がんモデルマウスを用いた PET プローブ候補化合物の腫瘍集積性評価

PET プローブ候補化合物投与 50~60 分後における AsPC-1 および BxPC-3 腫瘍への集積は、 4.05% ID/g, 2.39% ID/g であった ($n=1$, 図 4)。今後個体数を増やして詳細な検討が必要である。

以上の結果より、本研究で開発した PET プローブ候補化合物は、臨床応用の容易な標識合成法で高収率かつ高純度で得られ、ALA とは異なる機序により腫瘍細胞に取り込まれるものの、*in vivo* では ALA 投与時に PpIX を高蓄積する腫瘍に高く取り込まれる可能性が示された。今後、動物数を増やした詳細な検討に加え、本 PET プローブ候補化合物の腫瘍への取り込みおよび腫瘍細胞内滞留などの集積機序の解明を行い、ALA 投与時の PpIX 蓄積量を予測する臨床応用

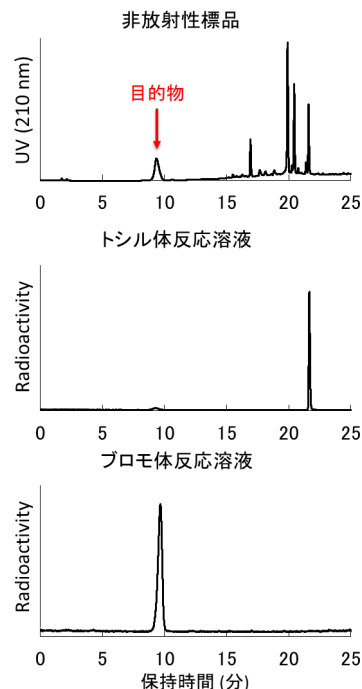


図 3. フッ化反応の HPLC 分析 (保持時間 9.4 分が目的とするフルオロ体)

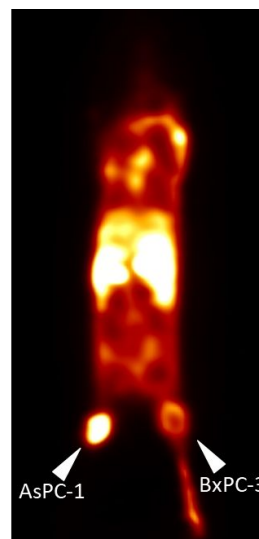


図 4. PET プローブ候補化合物の投与 50~60 分後における PET 画像

可能な PET プローブとしての可能性を評価する。さらに、本 PET プローブ候補化合物は、ALA とは異なる細胞取り込み機序を有すると考えられることから、ALA と同様の機序で腫瘍細胞に取り込まれると予想される構造への変換によるより高精度な PpIX 蓄積量予測の達成を試みる予定である。

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)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

※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。