

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790890
 研究課題名 (和文) 代謝的多様性に基づくがんの質的核医学診断のための
 多角的分子イメージング法の開発
 研究課題名 (英文) Nuclear medical imaging for cancer diagnosis based on the variations
 of oxygen metabolism in tumors
 研究代表者
 天満 敬 (TEMMA TAKASHI)
 京都大学・薬学研究科・助教
 研究者番号：90378787

研究成果の概要 (和文)：がんの低酸素領域は放射線治療等のがん治療に際して障害となるのみならず、低酸素状態であることそのものががんの悪性度進展に重要であることから、がんの低酸素領域の多様性を明らかにすることが切望されている。そこで、がんの酸素代謝率の PET による定量測定法の開発を目的として、ラットに安定的に $^{15}\text{O}-\text{O}_2$ ガスを供給するシステムを構築し、がん血流量が重量に依存することを示すとともに、ブタを用いて $^{15}\text{O}-\text{O}_2$ ガス吸入法による酸素代謝率測定を可能とした。また、がんの生物学的低酸素領域の PET イメージングのために HIF-1 の酸素依存的分解ドメインを母体とする分子プローブを開発し、プレターゲティング法による腫瘍のインビボ画像化に成功した。

研究成果の概要 (英文)：Tumor hypoxia is critically important in tumor physiology and cancer treatment, and it appears to be strongly associated with malignant progression and therapy resistance. Thus, it has been desired to investigate variations in tumor hypoxia. Here, to develop a method to estimate oxygen metabolism in tumors by PET, we constituted $^{15}\text{O}-\text{O}_2$ gas supplying system for rats, clarified that tumor blood flow depended on their weights, and performed the estimation of myocardial oxygen metabolism in pigs by $^{15}\text{O}-\text{O}_2$ gas inhalation method. In addition, to visualize biological hypoxia regions in tumors, we developed a molecular probe composed mainly of oxygen dependent degradation domain of HIF-1 and radiolabeling moiety, and succeeded in *in vivo* tumor imaging with pre-targeting method by PET.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：がんの多様性、酸素代謝、低酸素、分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

がんの低酸素領域は放射線治療等のがん治療に際して障害となるのみならず、低酸素状態であることそのものが血管新生や細胞増殖など、がんの悪性度進展に関するシグナル伝達の端緒となるため、低酸素は臨床診断においても極めて重要な標的となる。事実、これまでに、がんの低酸素環境を標的とした治療法・治療薬剤の開発が積極的に進められてきているが、有効なものは未だ報告されていない。一方、近年のがん研究の進展に伴い、がんの低酸素領域は、酸素濃度の場所的・時間的不均一性、遺伝子変異の不均一性、細胞周期の不均一性などといった高度な多様性を内包していることが明らかとなり、単なる“低酸素”の括りをもって治療・創薬の標的とすることの限界が指摘されつつある。実際、低酸素領域のがん細胞は一部脱分化しており幹細胞様の性質を示すという知見が報告されていることから、低酸素領域におけるエネルギー活動の多様性は必然であると考えられる。従って、がんの低酸素領域に存在する多様性を詳細に明らかにすることが、より有効な治療法・治療薬剤の開発のための急務となっている（図1）。

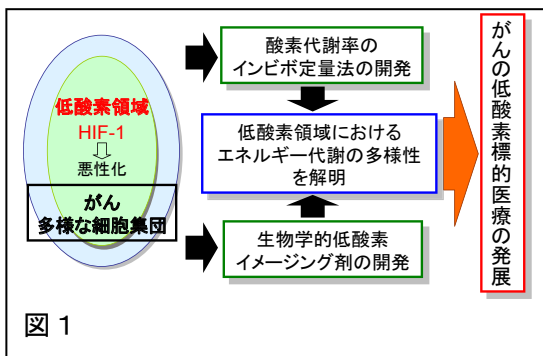


図1

研究代表者らは、これまでに PET を用いて従来不可能であった小動物での脳酸素代謝率を定量的に得られる方法論を開発するとともに、正常ラット・脳循環障害ラットを用いてその有用性を示してきた（J Cereb Blood Flow Metab 2003, J Cereb Blood Flow Metab 2006）。そこで、この成果を基盤とし、低酸素領域においても酸素は重要なエネルギー基質であること、エネルギー代謝は全ての細胞活動の根幹であることに着目して、がんの低酸素領域における酸素代謝率の PET によるインビボ定量測定法を開発するという着想に至った。本研究により、がんの低酸素領域におけるエネルギー活動の多様性が明らかとなれば、新たな創薬標的の探索、低酸素領域内での差異に基づく精密な薬剤設計・診断法の開発、低酸素領域に効果的な治療法の開発が可能となり、がんにおける低酸素標的医療の発展に大きく寄与するこ

とが期待される。

一方、研究代表者らは、低酸素誘導性因子-1 (HIF-1) が低酸素下で安定化されるメカニズムに着目し、HIF-1 の酸素依存的分解ドメイン (Oxygen-dependent degradation domain: ODD) を母体とし、膜透過配列 (PTD)、RI 標識化合物結合部位 (SAv) を組み合わせた分子設計を行うことで、生物学的低酸素を PET により非侵襲的にイメージングすることのできる薬剤 (PCOS) の開発を進めており（図2）、インビトロにおいて一定の成果を挙げている。本薬剤は、低酸素シグナル応答のキー転写因子である HIF-1 の安定化機構を巧みに利用することで生物学的低酸素を選択的にイメージングすることを目的としたものであり、従来の酸化還元電位の変化（物理学的低酸素）を標的としたものと比べ、細胞にとってより“病的な”低酸素をイメージングできることが期待される。研究代表者は、本研究において、本薬剤をさらにインビボへと発展させ、体内動態・DDS の観点から最適化を行うことで、生物学的低酸素を PET によりインビボ画像化できる手法を確立することを目指す。

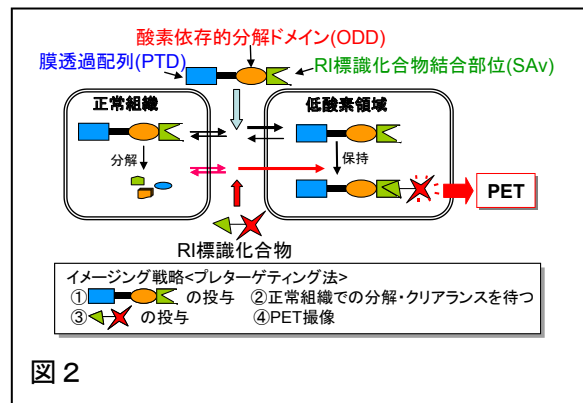


図2

2. 研究の目的

本研究では、がんの酸素代謝率の PET によるインビボ定量測定法を開発するとともに、HIF-1 標的生物学的低酸素イメージング剤を実現することにより、がんの低酸素領域におけるエネルギー活動の多様性を明らかにし、それらの手法を腫瘍の質的診断法として応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 酸素代謝率の定量に関する基礎検討

麻酔下でラットに気管挿管を行い、ラット用小型呼吸器を接続した。血圧・心拍モニタリングを行いながら空気供給を行い、ガス供給流速を決定した。 $^{15}\text{O}-\text{O}_2$ ガス (99%以上 N_2 ガス) と非放射性 O_2 ガス、 N_2 ガスを任意の割

合で混合し、ラット呼吸器に供給できるガスクロマトグラフ用サンプリングバッグを利用した実験システムを作製した。ラットをPETに設置し、供給放射能の制御についてPETガントリ内カウントと比較し検討した。血圧・心拍モニタリング、血液ガス測定を適宜行い、生体環境への影響を調べた。様々なエネルギー代謝率を有するがん種について検討を行うため、数種の性質の異なるがん細胞 (C6 glioma, MRMT-1, Walker-256, HeLa) を培養し、皮下移植担がん動物を作製した。Balb/c slc-nu/nu マウスの肩部・腹部・脚部の皮下に HeLa 細胞を移植し、モデル放射性プローブの血流依存性移行について調べた。モデル放射性プローブには脳血流量測定に汎用される *N*-isopropyl-*p*-[¹²⁵I]iodoamphetamine (IMP) を選択した。¹²⁵I-IMP を腫瘍マウスに投与し、血流を反映すると考えられる投与5分後に腫瘍を摘出し、単位重量辺りの放射能を調べた。動物における ¹⁵O-O₂ ガス吸入法の定量性評価を目的に、研究代表者が以前に開発した静脈内投与型 ¹⁵O-O₂ 剤との比較検討をブタを用いて行った。

(2) 生物学的低酸素イメージングに関する検討

放射性ビオチン誘導体 (¹²⁵I-IBB)、PCOS を PBS 中遮光下 37°C で 30 分間インキュベートし、サイズ排除法による精製を経て ¹²⁵I-IBB-PCOS を得た。¹²⁵I-IBB-PCOS の担がんマウス体内動態を臓器摘出法により調べた。担がんマウスに PCOS を投与した 24 時間後に ¹²⁵I-IBB を投与するインビボプレタージェティング法を行い、臓器摘出法により有効性を調べた。¹⁸F 標識ビオチン誘導体 (¹⁸F-FBB) を用いたプレタージェティング法による PET 撮像を実施した。

4. 研究成果

(1) 酸素代謝率の定量に関する基礎検討

放射性ガスをラットに安定的に吸入させるには、放射性ガスの供給制御、ラットの吸入制御、の両面を同時に満足する必要がある。そこで、ラットに確実に吸入させるため、麻酔下で気管挿管を行い、血圧・心拍等をコントロールした状態で安定的に ¹⁵O-O₂ ガスを供給できるシステムを構築した。非放射性 O₂ ガス、N₂ ガスとの混合供給に用いるガスクロマトグラフ用サンプリングバッグは 4 端子付き容量 5L のものが最適であった。

性質の異なる複数のがん細胞 (C6 glioma, MRMT-1, Walker-256) を用いた皮下移植担がんラットの作製に成功した。がんにおける酸

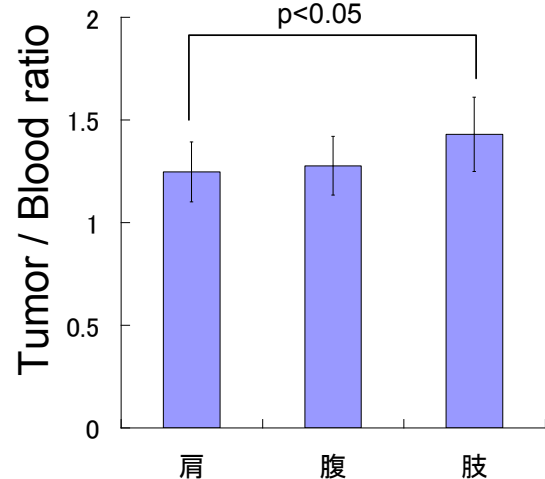


図3 腫瘍血液放射能比

素代謝を正確に評価するためには、がんにおける血流を正確に評価することが重要である。そこで、担がん動物のがん移植部位における血流量の差異を調べることを目的に、同一マウスの肩部・腹部・脚部の皮下に腫瘍を移植し、¹²⁵I-IMP の血流依存性移行について調べた。その結果、肢部腫瘍において高い放射能集積が認められた (図3) が、部位による影響よりもむしろ、放射能集積と腫瘍の重量との逆相関関係に依るものと考えられた (図4)。

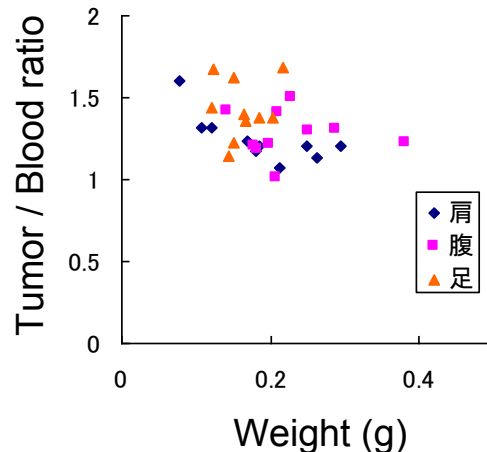


図4 重量-放射能集積の関係

動物における ¹⁵O-O₂ ガス吸入法の定量性評価を目的に、研究代表者が以前に開発した静脈内投与型 ¹⁵O-O₂ 剤との比較検討をブタを用いて行った (図5)。その結果、両手法において定量的な心筋酸素代謝測定が可能であることを示した (表1)。

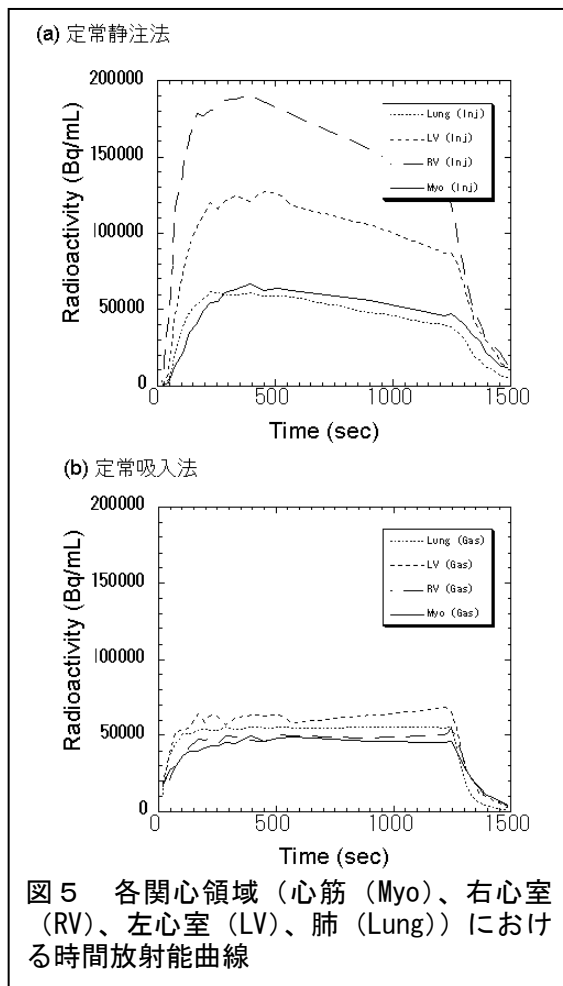


図5 各関心領域（心筋（Myo）、右心室（RV）、左心室（LV）、肺（Lung））における時間放射能曲線

表1 心筋酸素摂取率（OEF）

	OEF	
	Injection	Infusion
Pig. 1	0.70	0.72
Pig. 2	0.67	0.72
Pig. 3	0.71	0.74
Pig. 4	0.76	0.69
Average	0.71	0.72
SD	0.036	0.020

(2) 生物学的低酸素イメージングに関する検討

調製した ^{125}I -IBB-PCOS の担がんマウスにおける体内動態を臓器摘出法により調べたところ、腫瘍への高い放射能集積を認め、投与24時間後では腫瘍血液比1.6を示した。

肢皮下移植担がんマウスに PCOS を投与した24時間後に ^{18}F -FBB を投与するインビボプレタゲティング法によるPET撮像実験を行った。その結果、 ^{18}F -FBB 投与3時間後にPETによる腫瘍の明瞭なイメージングに成功した。この結果はポスト投与に ^{123}I -IBB を用いた場合でも同様であり、腫瘍および反対側の肢に関心領域を設定して放射能の集積量を測定したところ、両化合物とも、反対側の肢に比べて腫瘍に2倍以上高い集積を認めた。

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 天満 敬. PETと静脈内投与型O-15標識O₂剤による脳酸素代謝率の測定. 分子脳血管病. 2010;9(1):51-7. 査読無
- ② Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, Watabe H, Saji H, Magata Y. Quantification of regional myocardial oxygen metabolism in normal pigs using positron emission tomography with injectable ^{15}O -O₂. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010 Feb;37(2):377-85. 査読有
- ③ Temma T, Kuge Y, Sano K, Kamihashi J, Obokata N, Kawashima H, Magata Y, Saji H. PET O-15 cerebral blood flow and metabolism after acute stroke in spontaneously hypertensive rats. Brain research. 2008 May 30;1212:18-24. 査読有
- ④ Temma T. In-vivo positron emission tomography (PET) measurement of cerebral oxygen metabolism in small animals. Yakugaku Zasshi. 2008 Sep;128(9):1267-73. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① Achievement of MT1-MMP imaging shortly after radioligand administration by pretargeting strategy with SPECT, T. Temma, K. Sano, Y. Kuge, T. Kudo, J. Kamihashi, H. Saji, 2009.6.16 (Society of Nuclear Medicine 56th Annual Meeting, Toronto CANADA)
- ② PET イメージング法によるインビボ局所脳酸素代謝率測定法の開発—静脈内投与型 ^{15}O -O₂ ガス剤の開発とそれを用いた組織酸素代謝率のインビボ定量化—、天満敬, 間賀田泰寛, 飯田秀博, 渡部浩司, 河嶋秀和, 久下裕司, 佐治英郎, 2008年10月25日 (第58回日本薬学会近畿支部総会・大会、神戸薬科大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天満 敬 (TEMMA TAKASHI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：90378787

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし