

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18919

研究課題名（和文）RIプローブと蛍光プローブの差異を明らかにするための薬剤挙動に関する動態解析

研究課題名（英文）Study on drug dynamics in comparison with RI probes and fluorescent probes

研究代表者

高橋 浩之（TAKAHASHI, HIROYUKI）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：70216753

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：薬剤に蛍光物質を結合させた蛍光標識プローブは、取り扱いが簡便であるため広く用いられているが、蛍光物質である蛍光分子はサイズが大きく、また、極性を有していたりするので、生体内部での動態を変化させる可能性がある。特に生体内で、薬剤や対象分子が細胞に取り込まれたりする際の挙動が大きく異なると、その利用は限定的になると考えられる。本研究ではPETで描出可能なグルコース誘導体プローブである¹⁸F-FDGと他の蛍光標識プローブとの挙動を異なる腫瘍細胞を対象として、系統的、定量的に行ったところ、RI標識プローブと蛍光標識プローブの間で細胞内取り込みについて定量的に大きな差異が生じていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、現在、生物学・医学・薬学において広く用いられている、蛍光イメージングの根底にある信頼性、すなわち、忠実度がどれだけあり、どこまで得られた結果が信用できるものなのかについて再度問いかけなおす、という試みを行うものであるとともに、RIイメージングの可能性を再度提示するものである。

研究成果の概要（英文）：Fluorescent-labeled probes, which are produced by binding fluorescent substances to drugs, are widely used because they are easy to handle, but fluorescent molecules are usually large in size and have polarity as well. Therefore, it may change the dynamics inside the living body. In particular, if the behavior of drugs or molecules of interest is significantly different when taken up by cells in vivo, it is thought that their use will be limited. In this study, we systematically and quantitatively investigated the behavior of ¹⁸F-FDG, a glucose derivative probe that can be visualized by PET, and other fluorescently labeled probes in different tumor cells. It became clear that there was a quantitatively large difference in intracellular uptake.

研究分野：放射線計測

キーワード：PET FDG RI 蛍光体 イメージング

1. 研究開始当初の背景

最近、研究機関における RI 利用件数は減少の一途を辿り、右肩下がりの状況が続いているが、これは、RI のトレーサ利用が縮小していることが主な原因である。トレーサ利用の縮小は、RI を用いなくても、蛍光物質を利用することで、実験室で簡便に、対象物質の局在を知ることができ、また、その動態も評価できると考えられているからである。確かに、蛍光物質は光学顕微鏡の分解能で対象物質の局在を観察することができ、また、その詳細な動態に関する情報も与えるように見える。しかし、蛍光物質は一般に分子量が大きく、また、その分子には極性が存在していたりするほか、消光などの問題もあり、対象物質の動態を正しく表すものとは言えないはずである。一方、RI は例えば炭素の同位体として C-11 や酸素の同位体 O-15 などを用いれば、分子の枠組みそのものを変えずに、トレーサができるため、このような問題は生じず、正しく対象物質の情報を示すものと考えられる。この問題は蛍光物質をトレーサとして用いているユーザーは多かれ少なかれ意識していることであるが、現状では、この問題に深入りすることは、研究の自由度を束縛することでもあり、見過ごされてきた点である。今、2つの手法を比較するために、腫瘍の可視化の違いを見ることが考えられる。腫瘍は正常細胞よりも糖代謝が活発なため、グルコース（ブドウ糖）を多く取り込む。その性質を利用して、グルコースを RI で標識したプローブを腫瘍に集積させ放射線シグナルを検出する方法が RI イメージングのポジトロン断層法 (PET)、グルコースを蛍光分子で標識したプローブを腫瘍に集積させ蛍光シグナルを検出する方法が蛍光イメージングである。近年では、放射線への懸念の高まりや蛍光物質の扱い易さから、蛍光イメージングが汎用されている。しかし、蛍光イメージングではプローブ分子のうち標識分子自体が大きな分子量を持ち、本来のグルコースと挙動が異なると示唆される。プローブの特性は *in vivo* イメージングにとって重要なパラメータとなり、標識部分である RI と蛍光分子の違いは *in vivo* イメージングにおける集積性に大きく影響すると示唆される。

2. 研究の目的

本研究においては、グルコースなどに代表される分子を対象として、蛍光物質を用いた場合と RI を用いたトレーサについてどの程度の動態の差異が生じるかを定量的に観察し、その違いを示すこととした。

3. 研究の方法

PET では、主にグルコースを 18F で標識した 18F-フルオロデオキシグルコース (FDG) が用いられる。18F-FDG はグルコースと非常に類似した構造を持ち、グルコースと同様にグルコーストランスポートを介して細胞内に取り込まれる。対して、蛍光イメージングでは、標識部分の蛍光分子が大きな分子量を持ち、18F-FDG と異なる挙動を示すと示唆される。本研究では、3種類の癌細胞を用いて、*in vitro* で生体内の腫瘍と同様の形態（接着状態）を再現し、各細胞の RI 標識及び蛍光標識プローブの取込みや局在を定量的に分析する。また、*in vitro* における定量的な分析と *in vivo* イメージングにおける集積性を関連付け、RI イメージングと蛍光イメージングの違いを明らかにすることとした。RI 標識プローブとして PET 薬剤の 18F-FDG を、蛍光標識プローブとして 2-デオキシニトロベンゾオキサジアゾールイルアミノグルコース (2-NBDG) と 2-デオキシグルコース-750 (2-DG-750) を用いる。18F-FDG はグルコースの 2 位の水酸基を 18F で置換した化合物である。2-NBDG はグルコサミン（グルコースの 2 位の水酸基がアミン基に置換されたもの）のアミン基が 7-ニトロベンゾフラザンに置換された化合物であり、励起波長は 488nm、蛍光波長は 530~590nm である。2-DG-750 は 1 蛍光分子あたり 4 分子の DG が含まれるよう設計された 1000 以上の分子量を持つ化合物であり、励起波長は 750nm、蛍光波長は 780nm である。各プローブの構造を図 1~図 3 に示す。

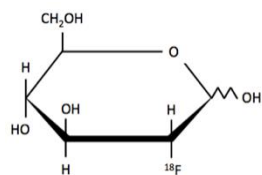


図 1 FDG の構造

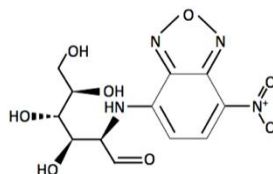


図 2 2-NBDG の構造

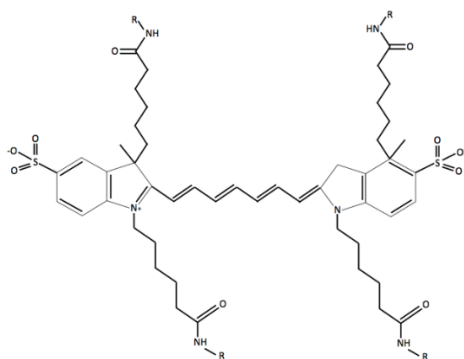


図3 2-DG-750 の構造

4. 研究成果

まず、グルコース類プローブである 2-DG-750, 2-NBDG, 18F-FDG の 3 者を対象として、in-vitro にて種々の培養腫瘍細胞への取り込みの比較を行った。この際の処理法としては、次のようにした。グルコースを欠如させた接着状態の SK-OV-3 細胞（卵巣がん細胞）、MKN45 細胞（胃がん細胞）を約 0.01MBq の 18F-FDG、約 2nmol の 2-NBDG、約 200pmol の 2-DG-750 と共にインキュベート後、トリプシン処理によって回収し、18F-FDG サンプルについてはガンマカウンター（COBRA Quantum 5003）、2-NBDG サンプルについてはプレートリーダー（Multimode Plate Reader ARVO X3）、2-DG-750 サンプルについてはプレートリーダー（TECAN Spark 20M）を用いてシグナルを測定した。インキュベート、トリプシン処理の後にはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）による洗浄を行った。図4にこれらのプロセスを示す。

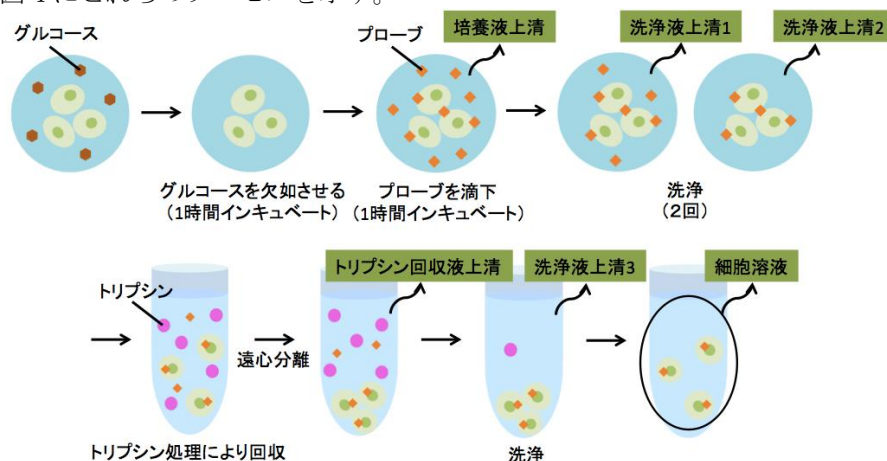


図4 サンプル回収プロセス

この結果得られた、各プローブの各細胞への取り込み量を表1～表6に示す。

サンプル	培養液上清	洗浄液1	洗浄液2	TRY回収液	洗浄液3	細胞溶液	計
割合 [%]	93.98	2.88	0.49	1.03	0.13	1.50	100
相互作用したもののうち割合 [%]		47.84	8.14	17.11	2.16	24.92	100

表1 FDG の SK-OV-3 への取り込み量

サンプル	培養液上清	洗浄液1	洗浄液2	TRY回収液	洗浄液3	細胞溶液	計
割合 [%]	85.45	3.40	0.36	10.28	0.36	0.15	100
相互作用したもののうち割合 [%]		23.37	2.47	70.65	2.47	1.03	100

表2 2-NBDG の SK-OV-3 への取り込み量

サンプル	培養液上清	洗浄液1	洗浄液2	TRY回収液	洗浄液3	細胞溶液	計
割合 [%]	52.31	44.48	2.55	0.054	0.28	0.33	100
相互作用したもののうち割合 [%]		93.27	5.35	0.11	0.59	0.69	100

表3 2-DG-750 の SK-OV-3 への取り込み量

サンプル	培養液上清	洗浄液1	洗浄液2	TRY回収液	洗浄液3	細胞溶液	計
割合 [%]	80.71	2.76	0.53	3.68	0.50	11.82	100
相互作用したもののうちの割合 [%]		14.31	2.75	19.08	2.59	61.28	100

表 4 FDG の MKN45 への取り込み量

サンプル	培養液上清	洗浄液1	洗浄液2	TRY回収液	洗浄液3	細胞溶液	計
割合 [%]	86.63	2.91	0.40	9.47	0.43	0.16	100
相互作用したもののうちの割合 [%]		21.77	2.99	70.83	3.22	1.20	100

表 5 2-NBDG の MKN45 への取り込み量

サンプル	培養液上清	洗浄液1	洗浄液2	TRY回収液	洗浄液3	細胞溶液	計
割合 [%]	50.36	46.47	2.53	0.14	0	0.48	100
相互作用したもののうちの割合 [%]		93.61	5.07	0.28	0	0.97	100

表 6 2-DG-750 の MKN45 への取り込み量

表 1～6 に示されるように、細胞への取り込み量は各プローブ毎に異なった結果が得られたが、その中でも、FDG は最も大きな取り込み量を示した。

次に、PET イメージングと 2-DG-750 の蛍光イメージングの比較を行った。卵巢がん細胞の腫瘍を持つマウスを用いて、標識部分の違いが *in vivo* イメージングの質にどのように影響を及ぼすのかを検討した。イメージング実験は、1 日目に RI イメージング、2 日目に蛍光イメージングを行った。マウスに約 10MBq の 18F-FDG または約 100 μ M の 2-DG-750 を尾静脈から投与し、30 分後、180 分後、300 分後にイメージングを行った。この結果を図 5 および図 6 に示す。

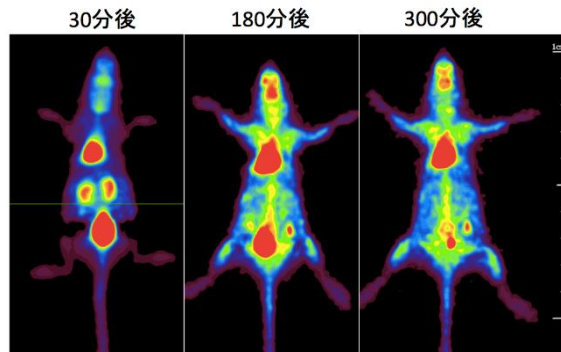


図 5 PET イメージングの結果

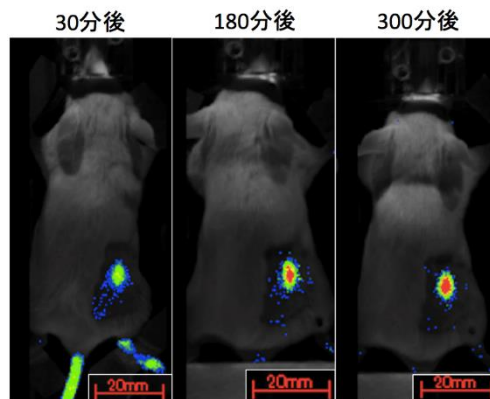


図 6 蛍光イメージングの結果

これらの結果より、蛍光標識プローブは RI 標識プローブよりも早くから腫瘍への集積が観察された。また、RI イメージングでは 180 分後と 300 分後で集積面積が安定していたが、蛍光イメ

ージングでは時間の経過と共に集積面積が増加した。この結果より、蛍光標識プローブは非特異的な疎水性作用による吸着や相互作用点の多さによって早くから腫瘍と相互作用し集積し、さらに時間の経過と共にプローブ同士の吸着によって集積面積が増加したものと考えられる。

このように、細胞内への取り込みはRI プローブと蛍光プローブで大きな差異が生じていることが明らかになった。一方、生体内での動態を追跡するには、F-18 では半減期が短いため、プローブとしての有用性が限られる。そこで、長時間の動態を計測可能な半減期の長い In-111 を用いて、動態の比較を行うことを考えた。ソマトスタチン受容体 SSTR2 に対する抗体に蛍光体としてジアグノグリーンを結合させ、腫瘍を生成させた図7のようなマウスに投与して、図8に示す蛍光による集積を観察した。また、別の個体であるが、図9に示すような腫瘍をもつマウスに対して、図10に示すような In-111 の画像を測定した。今後これらを組み合わせることで、RI と蛍光の定量比較を実施する予定である。



図7 蛍光撮像に用いたマウス



図8 ソマトスタチン蛍光画像



図9 In-111 撮像に用いたマウス

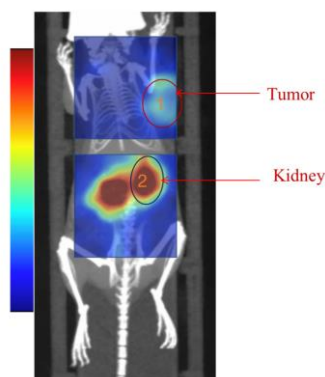


図10 In-111 RI 画像

5. まとめ

本研究では、取り扱いが複雑であるが、原理的に単一の原子を置換のみで、対象分子をトレーサとすることが可能であり、生体深部の情報や動態の情報を忠実に与えてくれる可能性のある、RI トレーサの利用の活性化を念頭におき、RI トレーサと蛍光トレーサの系統的な比較を実施した。この結果、グルコース誘導体として、FDG が細胞中に取り込まれやすい特性を示し、より安定した撮像結果を与えることが示された。また、半減期が 2.8 日と長く、長時間の動態観察に適する RI である In-111 を用いることを考え、ソマトスタチン受容体に対する抗体についても同様に蛍光体撮像と RI 撮像を実施した。今後これらを同時に実施することで、長時間の動態比較実験を行うことを考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yan Linlin, Uenomachi Mizuki, Ueki Taisei, Kim Donghwan, Shimazoe Kenji, Takahashi Hiroyuki, Kamada Kei, Shigekawa Yudai, Nambu Akihiro, Yin Xiaojie, Wang Yang, Haba Hiromitsu	4. 巻 1053
2. 論文標題 Simultaneous multi-nuclide imaging via reconstruction-free double-photon emission coincidence imaging method with parallel hole collimator and slat collimator	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment	6. 最初と最後の頁 168305 ~ 168305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nima.2023.168305	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 Hongchang Lin
2. 発表標題 A Comparative Study of Radioisotope Imaging Tracers and Fluorescent Imaging Tracers Used in Biological and Medical Studies
3. 学会等名 応用物理学会 第82回春季学術講演会
4. 発表年 2021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	柳衛 宏宣 (YANAGIE HIRONOBU) (30212278)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・客員研究員 (12601)	

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
---------	---------