

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 10日現在

機関番号：82606
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011年度～2012年度
 課題番号：23659602
 研究課題名（和文） フマル酸代謝を利用した腫瘍イメージング法の開発に関する研究
 研究課題名（英文） Study of development of the tumor imaging method using fumarate metabolism
 研究代表者
 松元 祐司（MATSUMOTO YUJI）
 独立行政法人国立がん研究センター・東病院・がん専門修練医
 研究者番号：00600579

研究成果の概要（和文）：

核医学において、腫瘍イメージングは主要な研究領域の1つであり、FDG PET等が既に臨床現場で利用されている。しかしながら、これらはいずれも悪性腫瘍に特異的に集積するわけではなく、新たな腫瘍イメージング製剤の開発が望まれている。

がん細胞は哺乳類の正常細胞では通常行われないフマル酸代謝を行っているといわれている。よって、フマル酸代謝を画像化できる核種を開発すれば、従来とは違った機序に基づく腫瘍イメージングが可能となる。本研究では、フマル酸代謝のイメージングを可能とする放射性核種を開発を試みたので報告する。

研究成果の概要（英文）：

The tumor imaging is one of the main study domains in nuclear medicine, and FDG PET has been already used in the clinical site. However, these do not specifically accumulate in a malignant tumor, and development of new tumor imaging preparation is hoped for.

It is said that the cancer cell perform fumarate metabolism unlike the mammalian normal cell. Thus, tumor imaging based on mechanism unlike a conventional manner will be established if the radionuclide that can image fumarate metabolism is developed. We tried the development of a radionuclide enabling imaging of the fumarate metabolism in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：フマル酸代謝

1. 研究開始当初の背景

^{18}F -FDG PETは糖代謝をイメージングするものであるが、それ以外に今まで、アミノ酸代謝や核酸代謝などについても腫瘍イメージングとしての核種開発が試みられ、一部は臨床でも応用されている。このように、ポスト FDG としての核種開発が現在でも大き

な研究テーマとなっている。

近年、当施設の江角らは慶應義塾大学先端生命科学研究所との共同研究により、がん細胞は正常細胞では行わない「フマル酸代謝」を行っていることを報告した

（平山ら、Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer

Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Cancer Res.*, 69(11), 4918-4925.)。しかしながら、フマル酸代謝を画像化するような報告は今のところまだない。よって、本研究では、フマル酸代謝を画像化できる核種を開発し、従来とは違った機序に基づく腫瘍イメージング製剤の合成法の確立を目指した。

2. 研究の目的

核医学において、腫瘍イメージングは主要な研究領域の1つであり、ガリウムシンチグラフィや¹⁸F-FDG PET等が既に臨床現場で利用されている。しかしながら、いずれも、悪性腫瘍のみならず炎症巣へも集積し、また、生理的集積もあり、従来のモダリティーのみでは診断に難渋することしばしばである。

近年、がん細胞は哺乳類の正常細胞では行われぬ「フマル酸代謝」を行っているという報告がなされた。よって、フマル酸代謝を画像化できる核種を開発すれば、従来とは違った機序に基づく腫瘍イメージングが可能となるはずである。本研究は、フマル酸代謝を核医学的手法でイメージングし、がん細胞を特異的に同定できる画像診断ツールを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HeLa 細胞等のがん細胞群及び正常組織細胞群を液体培地上で培養後それぞれの細胞群の対数増殖期に、合成した放射性同位体標識フマル酸を等量ずつ培地中に加え一定時間 37°C、5%CO₂ 中でインキュベートする。時系列的 (インキュベート開始 10 分後、20 分後、30 分後、60 分後、90 分後・・・) にそれぞれの細胞群から培地を取り除き、PBS で 3 回 wash、適切な細胞溶解バッファーを用いて whole cell lysate を取り出し放射能カウントを測定する。またそれぞれの総タンパク濃度も BCA 法などにより測定し、単位タンパク量 (細胞数に比例) 当りのカウントに換算し、放射能を比較する。これにより、各細胞内に放射性同位体標識フマル酸がどのようなタイミングで取り込まれるのかを確認できる。

(2) Mitochondrial / Cytosol Fractionation Kit を用いて各細胞のミトコンドリア分画を抽出し、上記と同様に放射能カウントを測定し各細胞のミトコンドリア分画に放射性同位体標識フマル酸がどのようなタイミングで取り込まれるのかを確認する。

(3) 今までの実験等によると、低酸素、低栄養状態のがん細胞ほどフマル酸呼吸をする確率が高いことが分かっている。各細胞のインキュベート条件 (CO₂ 濃度→相対的に酸素濃度を反映、液体培地中の BSA 濃度→栄養状態を反映) を変化させて上記と同様の実験を行い、環境変化による放射性同位体標識フマル酸の細胞内集積の相違についても確かめる。これらの実験は、当施設の江角らが解明した、がん組織のエネルギー産生のメカニズムと本研究の結果について整合性のあることを確認するためのものでもある。

(4) 放射性同位体標識フマル酸の合成方法の改良・開発 (¹⁴C のみならず ¹⁸F-フマル酸の合成方法を検討、或いは SPECT 製剤の開発など) に努める。¹⁴C は半減期が 20 分と短く臨床応用する場合使いにくい、¹⁸F は半減期が 110 分と比較的長く、臨床上使い易いというメリットがあるため ¹⁸F-フマル酸を開発することは非常に有益であると思われる。更に、¹⁸F-フマル酸は ¹⁴C-フマル酸と異なる薬物動態を示すことも考えられ、その結果、¹⁸F-フマル酸は ¹⁴C-フマル酸よりイメージングに適するような挙動を示すようになることも期待される。

更に、^{99m}Tc-フマル酸のような SPECT 製剤が開発されれば、サイクロトロンのない施設でも検査が可能となり、フマル酸代謝イメージングの普及につながると考えられる。

(5) 放射性同位体標識フマル酸を通常のスードマウスに尾静脈より静注する。一定時間の後、そのマウスを解剖、各臓器別に放射能カウントと重量を測定し、放射性同位体標識フマル酸の体内分布を決定しておく。一方、スードマウスにがんを移植し担癌動物を作成する。その際、がんの種類による放射性同位体標識フマル酸の分布の違いを比較するため数種のがんを移植し比較することとする。それら担癌スードマウスに放射性同位体標識フマル酸を尾静脈より静注し、一定時間の後マウスを解剖、各臓器及び移植したがん組織に対する放射能カウントと重量を測定し、放射性同位体標識フマル酸の体内及びがん組織への分布を決定しておく。各がん種による相違点についても検討する (所謂、バイオディストリビューションの決定)。

更に、上記と同様の措置をした通常のスードマウス及び担癌スードマウスそれぞれにつき、動物用 PET 装置或いは動物用 SPECT 装置にて撮像し、がんの特異的に放射性同位体標識フマル酸が集積しているのか画像解析し、前記のバイオディストリビューションの結果と相違ないか確認する。

4. 研究成果

当初、予備実験で成功したフマル酸の ^{14}C 標識体の合成法はプロモ酢酸をカップリングする方法であるが、反応速度が遅いため合成に成功しても ^{14}C の半減期が短いため放射能が減衰し前記実験 (3. (1)~(3) 及び(5)) の実行には不向きであった。そこで、まず、放射性同位体標識フマル酸の合成法の改良・開発に着手した(前記実験 3. (4)に相当)。

安定同位元素 ^{13}C の標識体については tert-ブチルエステルの塩化銅を用いたカップリング反応による合成が報告されている。しかしながらこの方法を ^{14}C 標識に応用することは、導入後の工程が長いこと、厳密な無水条件が必要なことから PET 薬剤合成用の自動合成装置による標識反応には適さないと考えた。そこで、プロペニルマグネシウムブロミドが市販されていることに着目し、グリニャール反応により ^{14}C を導入した後、得られたクロトン酸を酸化することを検討した。現在、中間生成物の合成までは成功したものの、最終産物の合成には至らず、化学合成メーカーに合成を委託したところコールドのフマル酸合成法には成功し、近日中にホットによる合成法の確立が見込まれている。

そこで、 ^{14}C フマル酸の新合成法確立については今暫く時間がかかることが予想されるため、フマル酸代謝の前駆物質であるリンゴ酸における放射性物質による標識法の開発を試みた。

リンゴ酸がキレート剤としての性質を持つことに着目し、陽電子放出核種である ^{62}Cu によるリンゴ酸の標識を試みたが、標識率が思ったより悪いこと、及び、 ^{62}Cu の半減期が短いため実際の実験には不向きであった。

次に、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ による標識を試みた。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は陽電子放出核種ではないため PET 製剤としては不向きであるが、SPECT 製剤としての実績はある。リンゴ酸粉末に過テクネシウム酸ナトリウム溶液を加え 5 分間インキュベートしたところ、リンゴ酸テクネシウムの合成に成功した。そこで、これを用いて動物実験をしようとして計画したが、残念ながら、本施設にある動物用 SPECT-CT 装置が故障し、実験の中断を余儀なくされた。最近、当該 SPECT-CT 装置の修理が終了したため、近々、実験を再開する予定である。

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 1 件)

Kuno H, Onaya H, Iwata R, Kobayashi T, Fujii S, Hayashi R, Otani K, Ojiri H, Yamanaka T, Satake M: Evaluation of Cartilage Invasion by Laryngeal and Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma with Dual-Energy CT. *Radiology* 265(2):488-496, 2012. DOI:10.1148/radiol.12111719. 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

①木村禎亮, 栗山拓也, 小島良紀, 梅田泉, 藤井博史; 高いクリアランス能を有する新規低酸素 PET プローブの開発. 第 52 回日本核医学会学術総会(札幌) P2B7, 2012, 10 月 12 日.

② Sadaaki Kimura, Takuya Kuriyama, Yoshiki Kojima, Izumi O. Umeda, Noriyuki Moriyama, Hirofumi Fujii; A novel PET probe for tumor hypoxia imaging with excellent renal clearance. SNM 2012 Annual Meeting (Miami beach, Florida, USA) 2012, Jun. 9-13.

③木村禎亮, 栗山拓也, 小島良紀, 梅田泉, 藤井博史; 投与後早期のイメージングが可能な新規低酸素 PET プローブの開発. 第 7 回日本分子イメージング学会学術集会(浜松) P-039, 2012, 5 月 24 日.

④栗山拓也, 小島良紀, 木村禎亮, 梅田泉, 西谷潔, 小島周二, 藤井博史; 新規腫瘍選択性の向上を目指した新規低酸素 PET プローブの合成と評価. 日本薬学会第 132 年会(札幌) 29P2-pm113, 2012, 3 月 29 日.

⑤小林俊夫, 栗山拓也, 長野間千瑛, 小島良紀, 西谷潔; 酸素不足を指標とする PET 用診断薬の合成研究(3). 日本薬学会 第 131 年会(静岡) 31P-0380, 2011, 3 月 31 日.

[図書] (計 1 件)

小島良紀; PET 用放射性薬剤の製造および品質管理-合成と臨床使用へのてびき- 第 4 版. PET 化学ワークショップ編, 2011, (8 次元ミジン誘導体合成法 [18F]FLT 合成法 3) pp. 91-93.

[その他]

ホームページ等

<http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=286330&AC=11282>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松元 祐司 (MATSUMOTO YUJI)

独立行政法人国立がん研究センター・

東病院・がん専門修練医

研究者番号：00600579

(2) 研究分担者

佐竹 光夫 (SATAKE MITSUO)

独立行政法人国立がん研究センター・

東病院・科長

研究者番号：30501861

小島 良紀 (KOJIMA YOSHIKI)

独立行政法人国立がん研究センター・

東病院・薬剤師

研究者番号：20167357