

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670528

研究課題名(和文) PETプローブのチェレンコフ光を利用した光イメージングと光治療法への技術展開

研究課題名(英文) Cerenkov luminescence imaging using PET probes

## 研究代表者

小川 美香子 (OGAWA, Mikako)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20344351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：PETでは、シグナル部位としてポジトロン放出核種を用いる。PETでは低分子量のプローブの作成が可能であるため、脳の分子イメージングが容易である。一方、光イメージングは簡便であるが、蛍光分子の分子量が大きいため脳機能イメージングは難しい。そこで、PETイメージングプローブが放出するチェレンコフ光を利用することで、これまで不可能と考えられていた脳機能の光イメージングが可能になると考え検討を行った。この結果、チェレンコフ光イメージングによる $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ を用いた脳糖代謝測定、 $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{b-CFT}$ を用いた脳受容体・トランスポータイメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：Optical imaging has advantages in its easy-to-use feature. But, in general, optical imaging probes have large molecular weight and it is difficult to do brain imaging. On the other hands, PET imaging is superior in quantitative analysis, and many brain imaging probes are available. It is now of great interest performing cerenkov luminescence imaging (CLI) by PET probes. In this study, we evaluated the feasibility of CLI for the analysis of brain function. In  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  studies, there was a good relationship between the radioactivity and CLI signal in brains.  $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$  and  $[^{11}\text{C}]\text{b-CFT}$  imaging was also successful, and luminescence in the striatum was decreased by haloperidol (D2 receptor ligand) treatment until 30 min post injection of  $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ .  $[^{11}\text{C}]\text{b-CFT}$  produced more clearer images than  $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ . Although the quantitativity is inferior to PET imaging, it is revealed that CLI can be applied for brain function analysis in mice.

研究分野：分子イメージング

キーワード：チェレンコフ光 PETプローブ

### 1. 研究開始当初の背景

分子イメージングは、病態時などに変化する生体内分子の様子を画像化する技術である。分子イメージングでは、標的分子を認識する部位（標的指向性分子）とイメージング法に適した信号を放出する部位（シグナル部位）からなる分子イメージングプローブを用いる。最近、イメージングに用いる「信号」として、放射性物質が出すチェレンコフ光を利用する試みが欧米で始まっている。

核医学イメージング法である PET では、シグナル部位として  $^{11}\text{C}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$  などのポジトロン放出核種を用いる。これらは原子量が小さく、低分子量のプローブの作成が可能であることから、PET では、血液脳関門(BBB)により大きな分子の透過が制限されている脳の分子イメージングが容易である。しかし、動物用 PET 装置の普及率は低く、PET はどの施設でも基礎研究に利用できる方法とは言えない。

これに対し光イメージングは簡便で、装置の普及率も高く、国内でも 100 台を超える装置が使用されている。しかし、シグナル部位として蛍光分子を用いる光イメージングでは、蛍光分子自体の分子量が大きいため低分子量のイメージングプローブの作成は容易ではなく、脳機能イメージングは難しい。そこで、PET イメージングプローブが放出するチェレンコフ光を利用することで、これまで不可能と考えられていた脳機能の光イメージングが可能になると考えた。

また申請者らは、これまでに PIT (photo-immuno therapy)による癌の光線力学療法の研究を行ってきた。これは、標的指向性分子と光応答性治療部位を組み合わせた分子プローブを投与後、特定の波長の光を照射することで細胞を殺傷するものである。本研究により、副作用が極めて低い癌の治療法の開発に成功したが、光の生体透過性の問題から照射光が深部組織まで届かず、深部癌の治療が問題となっている。そこで、癌に集積した PET プローブのチェレンコフ光を利用し、深部組織の光照射を行うことで、深部癌の治療、さらには発見が困難である微小癌の治療が可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、以下について検証し、チェレンコフ光の医学研究への応用性について評価した。

#### (1) $^{18}\text{F}$ FDG による脳糖代謝測定

感度、波長、透過性などチェレンコフ光を脳機能イメージングに用いる上での条件検討、および、 $^{18}\text{F}$ FDG による脳糖代謝測定について、定量性に着目し評価を行うことを目的とした。

#### (2) $^{15}\text{O}$ O<sub>2</sub>, $^{15}\text{O}$ CO<sub>2</sub> ガスによる脳酸素代謝測定

チェレンコフ光は空気中では理論上発生

しない。この原理を利用して、これまでマウス PET では不可能であった  $^{15}\text{O}$ O<sub>2</sub>,  $^{15}\text{O}$ CO<sub>2</sub> ガスによるイメージングの可能性を探る。

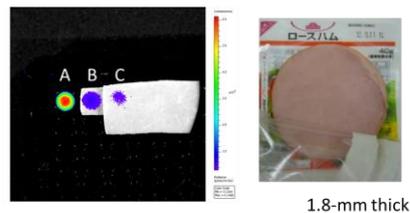
#### (3) PIT と $^{18}\text{F}$ FDG による癌の超特異的治療

チェレンコフ光を用いた治療へと展開する。癌へ集積した  $^{18}\text{F}$ FDG から放出されるチェレンコフ光により、光応答性分子プローブの光励起を行う。これにより、さらなる特異性の向上と深部癌の治療を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) チェレンコフ光の感度、波長、透過性に関する検討

まず、チェレンコフ光を分子イメージングに用いる上で、その感度、波長、透過性などの特性を把握する必要があることから、ファントムを用いた検討を行った。すなわち、段階的に希釈した  $^{18}\text{F}$ FDG を含む生理食塩水を用意し、様々な波長の蛍光フィルターを用いて光イメージングを行った。さらにこの際、遮蔽体（生体組織を模したハムなど）を用いることで、透過性に関する検討も行った。



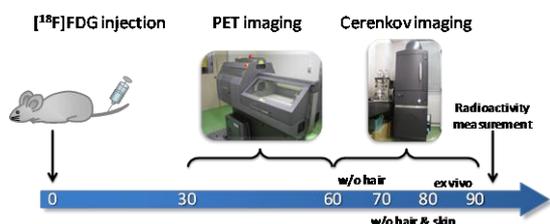
#### (2) チェレンコフ光による脳糖代謝イメージング ( $^{18}\text{F}$ FDG)

ddY マウス (8 週齢, ♂) の尾静脈から  $^{18}\text{F}$ FDG を 80  $\mu\text{Ci}$  投与し、イソフルレン麻酔下、投与 30 分後から 30 分間 PET 撮像を行った (FX System, Gamma-Medica-Ideas Inc., USA)。

なお、脳への  $^{18}\text{F}$ FDG の取り込み量を変化させるため、絶食時間を 0 時間から 16 時間の間で変化させた。

PET 撮像の後、光イメージング装置 (IVIS Spectrum, Caliper, USA)にて 10 分間撮像した。なおこの際、頭部を剃毛した状態および、頭皮を切開し頭蓋骨を露出させた状態にて撮像し、毛と頭皮による光の減衰の影響を検討した。

さらに、マウスを屠殺後、脳を摘出して光イメージング装置にて撮像し、また、 $\gamma$  カウンタにて放射能を測定した。



(3) チェレンコフ光による脳酸素代謝イメージング ( $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$ ,  $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$ )

$[^{15}\text{O}]\text{O}_2$ ,  $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$  ガスによる脳酸素代謝測定について検討を行った。光イメージング装置の麻酔ラインに  $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$ ,  $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$  ガスを導入し、放射性ガス吸入システムを構築した。

次に、マウスにマスクを装着し、麻酔ガスとともに  $[^{15}\text{O}]\text{O}_2$  または  $[^{15}\text{O}]\text{CO}_2$  ガスを吸入させた。

(4) チェレンコフ光による脳受容体・トランスポートイメージング ( $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ ,  $[^{11}\text{C}]\text{beta-CFT}$ )

脳の受容体機能を光イメージングにて評価できるかについて検討をした。すなわち、ドパミン D2 受容体のイメージング剤である  $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$  およびドパミントランスポーターイメージング剤である  $[^{11}\text{C}]\text{beta-CFT}$  を用いたチェレンコフ光イメージングを試みた。

これまでの検討より、マウスの頭髪を剃毛する必要性が示唆されていたため、頭髪を剃毛したマウスを用いて検討を行った。非侵襲性を確保するため頭皮はそのままにした。 $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$  7.4 MBq をマウス尾静脈から投与後、8分毎2分間隔にて光イメージング装置にて撮像した。さらに受容体への特異的結合を観察するため、ハロペリドールの負荷試験も行った。 $[^{11}\text{C}]\text{beta-CFT}$  については、1.85 MBq を投与後同様に撮像した。

(5)  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  による癌治療

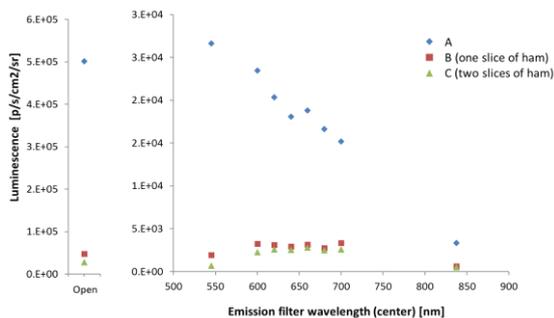
まず、各種濃度の光感受性化合物 IR700 と  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  溶液を用意し、これらを混合することにより 18F からのチェレンコフ光ではなく、チェレンコフ光により励起された IR700 の波長の蛍光を捉えることができるか検討を行った。

次に、チェレンコフ光を利用してがん細胞を殺傷できるか検討を行った。培養細胞に IR700 標識抗体を結合させた後  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  を取り込ませ、LIVE/DEAD 染色を行った。

#### 4. 研究成果

(1) チェレンコフ光の感度、波長、透過性に関する検討

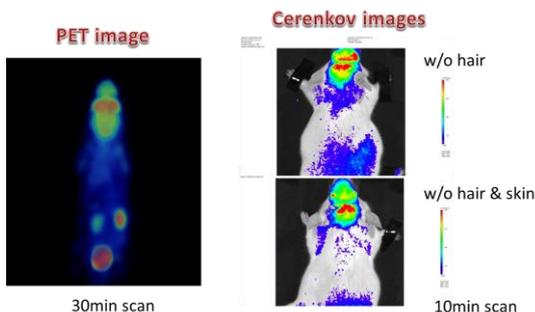
ファントムを用いた検討の結果、チェレンコフ光の成分は波長の短い光が主であり、この光は厚さ 1.8mm のハムにより遮蔽された。しかしながら波長の長い光も含んでおり、ハムを置いた状態であっても光の検出は可能であることが判った。



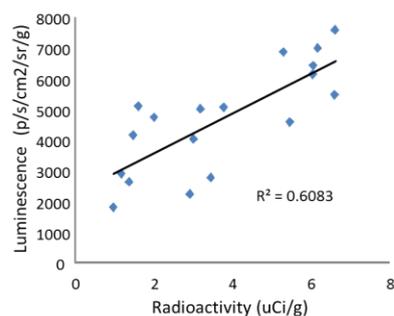
(2) チェレンコフ光による脳糖代謝イメージング ( $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ )

摘出した脳の光信号強度と、脳へ取り込まれた放射能との間には極めて良い相関が認められた ( $R=0.93$ )。頭蓋骨を露出させたものに関しても、光信号強度と放射能との間に良い相関を認めた ( $R=0.92$ )。

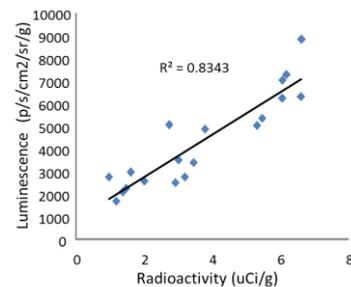
頭部の剃毛処理のみおこなったものに関しては、 $R=0.74$  とやや相関は低くなったが、光イメージングにて  $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$  の脳への取り込み量を測定するにあたり、大きく定量性を損なうものではなかった。



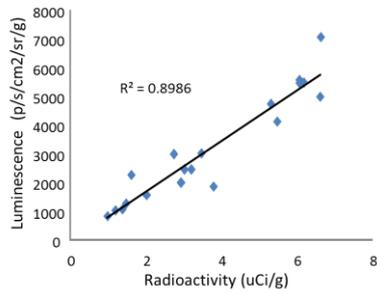
#### w/o Hair



#### w/o Hair & Skin

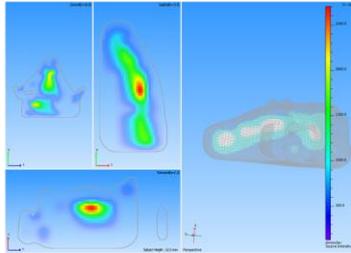


## Ex vivo



## 3D imaging

[<sup>18</sup>F]FDG (37 MBq) was injected from the mice tail vein. The images were obtained at 1hr after the injection. (IVIS200, 660, 640, 620nm filters were used)



<sup>18</sup>F は通常 PET イメージングに用いられる放射能にて、光イメージング装置で撮像可能であることがわかった。チェレンコフ光は、500 nm 付近の波長の光を最も多く含むため、皮膚および毛により光が減衰してしまう可能性があるが、剃毛するだけでもある程度の定量性を保つことができたことから、汎用性の高い光イメージング装置にて、低侵襲な方法で脳機能イメージングが可能であることが示された。

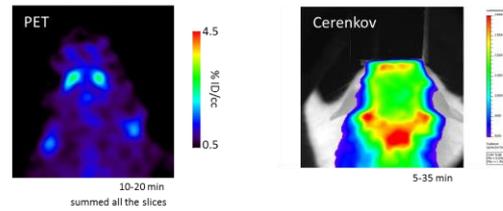
(3) チェレンコフ光による脳酸素代謝イメージング ([<sup>15</sup>O]O<sub>2</sub>, [<sup>15</sup>O]CO<sub>2</sub>)

脳への取り込みを画像化することに成功した。しかしながら、ガスラインからの放射能が高く、この放射線が CCD カメラに直接影響を及ぼし雑音が高くなること、また、カメラ破損の頻度が高くなることが判った。従って本検討については、遮蔽などが今後の検討課題となることが判った。

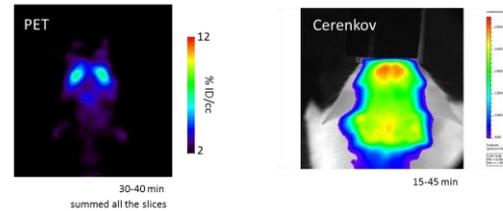
(4) チェレンコフ光による脳受容体・トランスポートイメージング ([<sup>11</sup>C]raclopride, [<sup>11</sup>C]beta-CFT)

[<sup>11</sup>C]raclopride において、D2 受容体が多く存在する線条体での特異結合を見ることができた。 [<sup>11</sup>C]beta-CFT については脳への取り込み率が [<sup>11</sup>C]raclopride より高いため、より明確な画像を得ることができた。

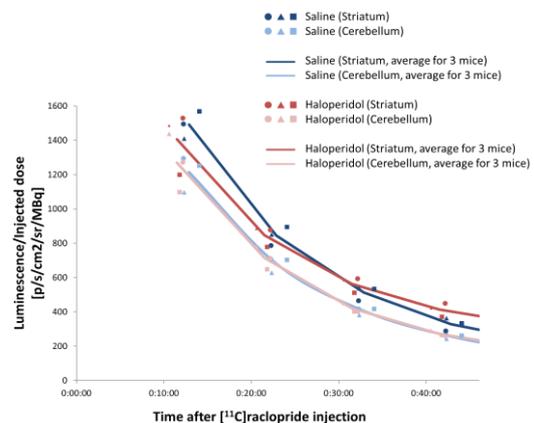
## [<sup>11</sup>C]Raclopride (Dopamine D2 receptor)



## [<sup>11</sup>C]β-CFT (Dopamine transporter)



PET images were obtained by GENISYS G4 scanner (Sofie Biosciences). (Courtesy of Summit Pharmaceutical International Corporation)



## (5) [<sup>18</sup>F]FDG による癌治療

IR700 の吸収帯が無い領域 (545 nm) では [<sup>18</sup>F]FDG から放出されるチェレンコフ光は IR700 の添加により減光することは無かった。一方、IR700 の吸収帯はあるが IR700 の蛍光波長 (700 nm) からは外れる領域 (612 nm) にて観察すると、IR700 添加によるチェレンコフ光の減光が観察された。さらに、チェレンコフ光の波長からは外れるが IR700 の蛍光がみられる領域 (732 nm) にて観察すると、IR700 を添加することで光が増強した。これはすなわち、 [<sup>18</sup>F]FDG によるチェレンコフ光が IR700 に吸収され IR700 が励起し蛍光を發したことを示すものである。

この結果、IR700 と [<sup>18</sup>F]FDG を両方作用させることで、死細胞の数がやや増えていることを確認した。しかしながら、この細胞数の差は有意ではなく、また、長時間多くの放射能の [<sup>18</sup>F]FDG を作用させる必要があった。さらに、Annexin V, PI 染色を施した細胞をフローサイトメトリーにより解析したが、非処理群と有意な差を認めることはできなかった。

別の検討により、IR700 による細胞死は細胞膜傷害によるものである可能性が示され

てきたことから、細胞質内に取り込まれる [ $^{18}\text{F}$ ]FDG ではなく、膜へ結合する PET 薬剤の必要性が考えられ、今後、さらに検討を進める予定である。

北海道大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号： 20344351

## 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

1. M Ogawa, M Kosugi, Y Magata, Cerenkov luminescence imaging with PET probes for brain function analysis., International Society of Radiopharmaceutical Sciences, 2015 年 5 月 26-31 日、コロンビア (米国)
2. M Ogawa, T Sunami, M Sakaida, Y Matsumoto, Y Magata, Evaluation of brain functions by Cerenkov luminescence imaging., European Association of Nuclear Medicine Annual Meeting, 2014 年 10 月 18-23 日、Goteborg (スウェーデン)
3. 小川美香子、Light-mediated regulation of body functions、第 10 回 AMO 討論会(招待講演)、2013 年 6 月 14 日、電気通信大学 (東京都調布市)
4. 小川美香子、放射線と光によるマルチモダル分子イメージング、第 8 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (招待講演)、2013 年 5 月 30-31 日、横浜赤レンガ倉庫 1 号館 (神奈川県横浜市)

[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]

該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 美香子 (OGAWA, Mikako)