

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 5 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461802

研究課題名(和文)腫瘍発現酵素標的イメージング 腫瘍の質的評価と治療における有用性の確立

研究課題名(英文)Usefulness of imaging tumor-specific enzyme expression by radiopharmaceuticals with thymidine phosphorylase inhibitory potency

研究代表者

大倉 一枝 (Ohkua, Kazue)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：60094827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍に特異的に発現するチミジンホスホリラーゼ(TP)の発現レベルを画像化する新しいがん診断薬剤として、TP阻害活性をもつ放射性ヨウ素標識ウラシル誘導体を設計・合成し、TP発現に対応した腫瘍集積性を示すことを見出してきた。本研究により薬剤の腫瘍細胞取り込み機構が明らかになったことは、臨床応用上、本イメージング技術の信頼度をより高め、適用範囲を拡大するための重要な知見を与えた。

研究成果の概要(英文)：Thymidine phosphorylase (TP) is an angiogenic growth factor; it catalyzes the reversible phosphorylation of thymidine to thymine. TP is overexpressed in highly malignant cancers. To identify the cancer malignancy or predict therapeutic effects of anticancer drugs based on the thymidine analog in relation to TP expression levels in tumors, we developed a radio-iodinated uracil derivative with TP inhibitory potency. Here, we elucidated its uptake mechanism into tumor cells and normal tissues based on the organic cation transporter. Our results could help advance reliability and applicability in cancer theranostics.

研究分野：放射性医薬品化学

キーワード：核医学診断 腫瘍 チミジンホスホリラーゼ 放射線

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、核酸代謝酵素であるチミジンホスホリラーゼ (TP) が血管新生因子の一つであり、その発現が腫瘍の悪性度や増殖を大きく反映することに着目し、TP 発現に対応して集積するがんイメージング剤の開発が可能なることを明らかにした。すなわち、この過程でリード化合物として TP 阻害剤を用いることで、がんを集積する放射性化合物<sup>123</sup>I]IIMU を見出すことができた。TP がカペシタピンの代謝活性化に関与することから、このイメージング技術がカペシタピンによるがん治療の効果予測を可能にすることも期待された。

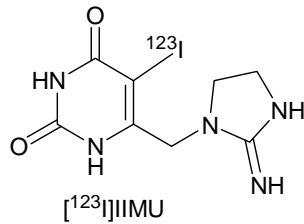


Fig.1 <sup>123</sup>I]IIMU の構造

### 2. 研究の目的

本研究では TP 阻害活性をもつ放射性標識ウラシル誘導体が、がんの増殖、悪性化の分子機構と密接に関わり、がんの質的評価、悪性度診断、治療方針の決定に必要な情報を与える画像診断薬剤として有用であることを明らかにすることを目的とした。TP 阻害活性の強い<sup>123</sup>I]IIMU (Fig. 1) は腫瘍組織に集まるとともに肝臓などの正常臓器への集積も認められた。これらの臓器への分布は生理的に発現している TP に起因することが示唆されているが、これは臨床応用において、がんの診断精度の低下の問題を引き起こし、がん化部位による本薬剤の適用範囲の縮小に繋がる。TP 発現レベルの正確な評価のためには<sup>123</sup>I]IIMU 集積メカニズムを明らかにすることが重要であると考え、本薬剤の取り込みにおけるトランスポーターの関与について検討した。また、より選択的ながん細胞 TP への集積が期待される新規ヨウ素標識 6 位置換ウラシル誘導体の合成も実施した。

### 3. 研究の方法

ヒト OCT-1 高発現細胞や TP 発現量の異なるがん細胞を使用した。培養細胞を 24 well プレートに播種して 48 時間後に取り込み実験を行った。ウエスタンブロッティングにより TP 発現量を測定した。

新規薬剤の <sup>125</sup>I 標識合成では臨床に用いる <sup>123</sup>I 標識合成を念頭に、反応溶媒、温度、時間、合成方法の検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) <sup>123</sup>I]IIMU の取り込み機構の解明  
<sup>123</sup>I]IIMU の取り込み機構に関するトランスポーターとしては、その構造から、ヌクレ

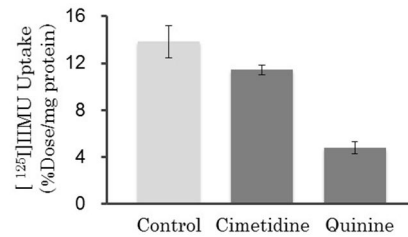


Fig. 2 OCT 阻害剤存在下の A431 細胞への <sup>123</sup>I]IIMU 取り込み率

オシドトランスポーターと有機カチオントランスポーター (OCT) が推定された。トランスポーター阻害剤を用いた<sup>125</sup>I]IIMU 取り込み実験の結果から、OCT が <sup>123</sup>I]IIMU 取り込みに関与することが示唆された。すなわち、Fig. 2 に示すように、<sup>125</sup>I]IIMU 取り込み率は OCT 阻害剤である Cimetidine の添加で 28%、Quinine の添加で 66% 減少した。

OCT ファミリーには、OCT1、OCT2、OCT3 の 3 種のサブタイプが薬物の体内動態に深く関与することが知られている。ヒトの肝臓では OCT1 と OCT3 が発現し、腎臓やがん細胞では OCT 全てのサブタイプが発現していると報告されている。Cimetidine は、OCT2 と OCT3 に対して阻害活性を示すのに対し、Quinine は全てのサブタイプに阻害活性を示すことが報告されている。Fig. 2 の結果より、OCT1 阻害活性の非常に低い Cimetidine よりも OCT1 阻害活性をもつ Quinine の方が <sup>125</sup>I]IIMU 取り込み率の抑制効果が高かったことから、特に OCT1 が <sup>123</sup>I]IIMU の細胞内取り込み過程に関与すると考えられた。

そこで OCT1 活性がコントロール細胞に対し 5 倍以上高いと報告されている OCT1 発現 CHO 細胞を用いて<sup>125</sup>I]IIMU 取り込み実

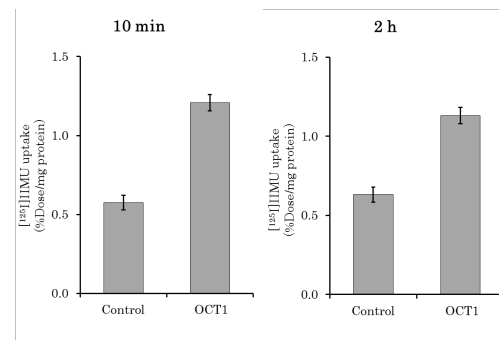


Fig.3 OCT1 発現 CHO 細胞への <sup>125</sup>I]IIMU 取り込み率の変化

験を行ったところ、その取り込み率は 10 分間インキュベーションの場合も 2 時間の場合もほぼ同じ値を示し、コントロール細胞に比べて約 2 倍高いことがわかった (Fig. 3)。OCT1 発現 CHO 細胞における TP 発現量はコントロール細胞と比べて同等であったことから、<sup>125</sup>I]IIMU の取り込みには OCT1 による細胞内への取り込み過程のみが寄与し、インキュベーション時間に伴う

$[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  の取り込み率の増加が生じなかったと考えられた。以上の結果より、 $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  の取り込み過程に OCT1 が関与することが明らかになった。

種々のがん細胞への  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み量を測定したところ、A431 細胞 > HCT116 細胞 > AZ521 細胞 > FaDu 細胞 > U251MG 細胞 > DLD-1 細胞の順に高い値を示した。6 種類のがん細胞での TP 発現は A431 細胞、HCT116 細胞、FaDu 細胞の 3 種類の細胞で確認され、A431 細胞が最も高く、次いで HCT116 細胞、FaDu 細胞の順で高かった (Fig. 4)。一方、AZ521 細胞、DLD-1 細胞、U251MG 細胞では、TP 発現を示すシグナルは検出されなかった

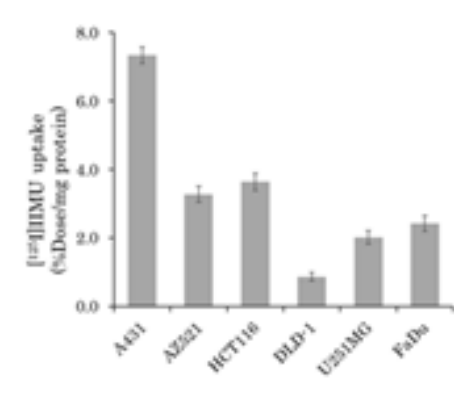


Fig.4 がん細胞における  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み量

6 種類のがん細胞における TP の発現量と  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  の取り込み率との関係性をグラフに示した (Fig. 5)。TP を発現する A431 細胞、HCT116 細胞、FaDu の中では、TP 発現量が最も高い A431 細胞が最も高い  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率を示し、TP 発現量が最も低い FaDu 細胞では  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率も最も低かったことから、TP 発現量と  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率には相関性があると考えられた。しかし、AZ521 細胞、DLD-1 細胞、U251MG 細胞等の TP 低発現細胞のうち AZ521 細胞が、TP 高発現細胞である FaDu 細胞よりも  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率が高いことが確認された。

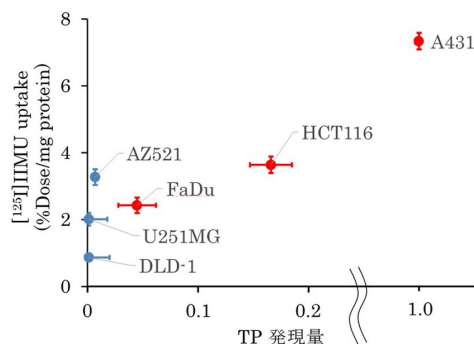


Fig. 5  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率と TP 発現量との関係

### OCT1

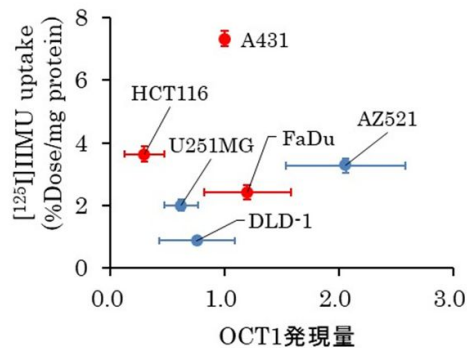


Fig. 6  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率と OCT1 発現量との関係

種々のがん細胞における OCT 発現量と  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率との関係では、OCT1 の発現は AZ521 細胞で最も高く、次いで FaDu 細胞、A431 細胞で高く、U251MG 細胞、DLD-1 細胞、HCT116 細胞では低かった。OCT2 では、AZ521 細胞、A431 細胞、FaDu 細胞の順で高い発現が認められ、OCT3 では OCT1 と同様に AZ521 細胞、FaDu 細胞、A431 細胞の順で高い発現が認められたが、それ以外の細胞では OCT2、OCT3 とともに発現が低かった

これらの結果を元に、6 種類のがん細胞における OCT の発現量と  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  の取り込み率の関係性をグラフに示した。OCT1 の発現量と  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  の取り込み率のグラフにおいて、赤色で示す TP 高発現細胞では OCT1 発現量と  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率に相関性は確認されなかった。また、TP 低発現

### OCT2

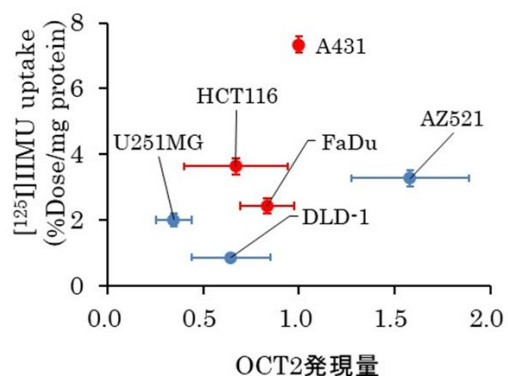


Fig. 7  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率と OCT2 発現量との関係

細胞のうち、OCT1 発現が最も高い AZ521 細胞が比較的高い  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み率を示すことがわかった (Fig. 6)。OCT2、OCT3 についても同様に、TP 高発現細胞では  $[^{125}\text{I}]\text{IIMU}$  取り込み量と OCT2、OCT3 発現量との間に明らかな相関性は確

認められなかった(Fig.7, 8)。

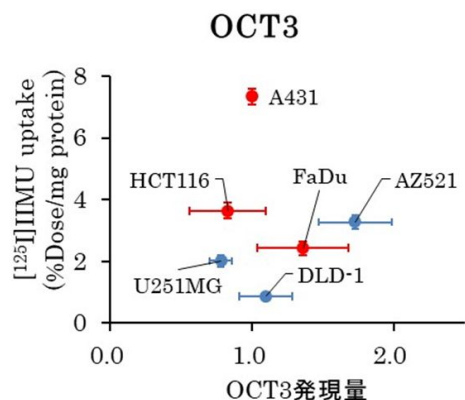


Fig. 8 [<sup>125</sup>I]IIMU 取り込み率と OCT3 発現量との関係

AZ521 細胞では OCT2、OCT3 とともに高い発現を示しており、このことが [<sup>125</sup>I]IIMU の取り込み率に関係していると考えられた。

ここでは [<sup>125</sup>I]IIMU を用いた核医学診断において問題となる肝臓等の正常組織への集積を低減し、がん細胞への選択的な [<sup>125</sup>I]IIMU の集積を可能にするために、 [<sup>125</sup>I]IIMU の取り込み過程に対する OCT の影響について検討してきたが、TP 発現がほとんど確認されなかった AZ521 細胞において、TP が高発現する FaDu 細胞よりも高い [<sup>125</sup>I]IIMU の取り込み率が示された。 [<sup>125</sup>I]IIMU 取り込み率と OCT 発現の関係性を見ると、TP 発現が高い細胞では、 [<sup>125</sup>I]IIMU の取り込み率は OCT サブタイプいずれの発現量とも明らかな関係性を示さなかった。一方で、TP 発現が低い AZ521 は OCT1 発現が最も高く、TP 発現が低いにも関わらず比較的高い [<sup>125</sup>I]IIMU 取り込み率を示した。このことから、AZ521 細胞における [<sup>125</sup>I]IIMU の比較的高い取り込み率は、OCT1 の発現量による影響が大きいと考えられた。

本実験では、 [<sup>125</sup>I]IIMU 細胞内取り込み過程に OCT1 が関与することが明らかとなった。特に TP 低発現のがん細胞ではその影響は大きく、一方で、TP 高発現のがん細胞では OCT 発現量よりも TP 発現量のほうが影響が大きいことがわかった。

肝臓や腎臓では TP が高く発現するといわれているが、肝臓がんの TP 発現量は正常な肝臓に比べ約 1.4 倍高いこと、腎臓がんでは TP の酵素活性が正常な腎臓の約 9 倍高いことが報告されている。本研究では TP の発現量が少ないがん細胞では、 [<sup>125</sup>I]IIMU の細胞内取り込み OCT の発現量が強く影響することが明らかとなった。がん比べると TP 発現量が少ない臓器では、OCT1 阻害剤と [<sup>125</sup>I]IIMU を同時投与することにより、正常細胞への [<sup>125</sup>I]IIMU の集積を低減し、TP 高発現がん細胞を特異的に検出することが可能であると期待される。

(2) 新規 [<sup>125</sup>I]5-iodo-6-substituted uracil 標識合成

放射性ヨウ素標識化および HPLC 分離精製、濃縮、安定化等の条件検討により、新規 [<sup>125</sup>I]標識体合成が達成された。

以上、 [<sup>125</sup>I]IIMU の取り込みに OCT が関与するものの、TP 高発現のがん細胞における取り込みは TP 発現量に依存し、OCT の影響は小さいこと等、臨床応用上、本イメージング技術の信頼度をより高め、また適用範囲を拡大するための重要な知見が得られた。今後さらに、がんの個性を診断し、治療効果の予測や治療方針の決定に寄与していくことが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Kobashi N., Matsumoto H., Zhao S., Meike S., Okumura Y., Abe T., Akizawa H., Ohkura K., Nishijima K., Tamaki N., Kuge Y., The Thymidine Phosphorylase Imaging Agent 123I-IIMU Predicts the Efficacy of Capecitabine, J. Nucl. Med., 57, 1276-1281 (2016). 査読有

(2) Zhao S., Li H., Nishijima K., Zhao Y., Akizawa H., Shimizu Y., Ohkura K., Tamaki N., Kuge Y., Relationship between biodistribution of a novel thymidine phosphorylase (TP) probe and TP expression levels in normal mice, Anal. Nucl. Med., 29, 582-587 (2015) 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

中山賢志、宿里充穂、東川桂、尾江悟、水野雄貴、大倉一枝、久下裕司、秋澤宏行、チミジンホスホリラーゼ標的放射性プローブ [<sup>125</sup>I]IIMU の取り込みに対する有機カチオントランスポーターの影響、日本薬学会第 138 年会 (金沢) 2018 年 3 月

Watanabe S., Hirata K., Shiga T., Toyonaga T., Okamoto S., Uchiyama Y., Munakata Y., Magota K., Shimizu Y., Nishijima K., Ohkura K., Kuge Y., Tamaki N., First-in-Human Study of a Novel Thymidine Phosphorylase Tracer [<sup>123</sup>I]IIMU in Healthy Volunteers - Preliminary Report. Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, San Diego, 2016年6月11-15日,

Zhao S., Nishijima K., Matsumoto H., Akizawa H., Ohkura K., Tamaki N. Kuge Y., Preclinical and translational researchs novel PET and SPECT tracers: <sup>18</sup>F-Difa and <sup>123</sup>I-IIMU for hypoxia and thymidine phosphorylase imaging, アジアオセアニア核医学・生物学会 (AOCNMB 2015) 韓国チェジュ 2015 年 10 月 31 日 ~ 11 月 4 日

Nishijima K., Zhao S., Feng F., Shimizu Y., Akizawa H., Ohkura K., Kobashi N., Abe T., Matsumoto H., Tamaki N., Kuge Y., Preclinical evaluation of thymidine phosphorylase imaging

probe,<sup>123</sup>I-IIMU for the First-in-Human clinical trials., The 12th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, Perspectives of Molecular and Target Therapy, Sapporo, 2014年9月4~5日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大倉 一枝 (OHKURA KAZUE)  
北海道医療大学・薬学部・教授  
研究者番号：60094827

### (2) 研究分担者

久下 裕司 (KUGE YUJI)  
北海道大学・アイソトープ総合センター・教授  
研究者番号：70321958

秋澤 宏行 (AKIZAWA HIROMICHI)  
昭和薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：90311795

河嶋 秀和 (KAWASHIMA HIDEKAZU)  
京都薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：70359438

超 松吉 (ZHAO SONGJI)  
福島県立医科大学・福島国際医療科学センター・教授  
研究者番号：80374239