

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461871

研究課題名(和文) ミトコンドリア機能測定による癌治療の感受性および効果判定

研究課題名(英文) Monitoring Mitochondrial Complex-I Activity Using Novel PET Probe 18F-BCPP-EF Allows Early Detection of Radiotherapy Effect in Murine Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

村山 千恵子 (MURAYAMA, Chieko)

東海大学・医学部・客員講師

研究者番号：50307295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射が癌細胞のミトコンドリアを活性化することで癌の増殖を阻害する点に着目し18F-BCPP-EF(ミトコンドリアの活性化に比例して取込みが増加する薬剤)を用いたPET検査が放射線治療の早期効果判定に有用であることを明らかにした。マウス癌組織に照射した後、18F-BCPP-EFを用いたPETで経時的にミトコンドリアの活性度を測定した。非照射癌では18F-BCPP-EFの取込みは陰性であった。照射癌では線量に比例した18F-BCPP-EFの取込み増加が照射後2日目という早期(癌組織の大きさの変化がまだ表れない)から陽性像で検出され、それは2週間後の癌細胞の増殖抑制(治療効果)を反映した。

研究成果の概要(英文)： Since ionizing radiation is reported to switch aerobic glycolysis to mitochondrial oxidative phosphorylation, radiotherapeutic efficacy was monitored by the activity of mitochondrial complex I (MC-I), using a new PET probe 18F-BCPP-EF, compare with tumor growth suppression in murine squamous cell carcinoma.

In non-irradiated control mice, there was little uptake of 18F-BCPP-EF. In contrast, Tumor uptake of 18F-BCPP-EF increased significantly early (2, 3 or 4 days) after irradiation with effective doses of irradiation, when tumor volume showed no difference irrespective of radiation dose. The results suggest that 18F-BCPP-EF is a promising "positive" MC-I imaging PET probe for early detection of efficacy of tumor radiotherapy.

研究分野：放射線腫瘍生物学、臨床薬理学

キーワード：ミトコンドリアコンプレックス MC-I 放射線治療 癌治療効果予測 ワールブルグ効果 PET [18F]FDG [18F]BCPP-EF

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の診断および治療感受性を判断するための非侵襲的ツールとして  $^{18}\text{F}$ -FDG をプローブとして用いる PET 検査 ( $^{18}\text{F}$ -FDG-PET) が多用されている。 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET は細胞内のグルコース消費能を反映するものであり、細胞の生理活性を知ることができる。癌細胞は好气的状態であってもミトコンドリアでの酸化的リン酸化ではなく解糖系から非効率的にエネルギーを得ている。その結果、癌細胞ではグルコースの摂取量が膨大となるため  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET で検出できるのである。また  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET は癌の診断のみならず治療の感受性または予後予知のツールとしても用いられる。治療に感受性がある場合には、癌細胞の  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET 集積量が減少する。このように癌治療の診断・治療判定ツールとして繁用されている  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET であるが、炎症部位への高集積という false positive エラーを伴う。 $^{18}\text{F}$ -FDG-PET の false positive エラーは、担当医の経験で判定処理されているのが現状であり科学的根拠に基づいたものではない。

(2) 炎症細胞には集積せず癌組織のみに高集積して癌の診断および治療感受性を判断することができる Post FDG-PET プローブを目指して核酸あるいはアミノ酸誘導体プローブが開発されている [1]。しかし  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET およびこれらのプローブは、いずれも癌を陽性像で検出し治療効果は陽性像→陰性像への変化で判定する。この場合治療が著効であれば治療早期に陰性像を得ることが可能であるが、治療効果が中等度以下である場合には、PET プローブの集積量は治療効果を反映して徐々に減少はするが、完全な陰性像が得られるのは CT や MRI による診断と変わらない時期になってしまい早期の治療効果判定には適していない。

## 2. 研究の目的

(1) そこで本研究では、発想を転換して治療感受性があった場合にのみ集積して陽性像を示す PET プローブを用いて、治療感受性判定を治療開始早期に陽性像として検出することを試みた。

(2) 放射線照射が癌細胞のミトコンドリアを活性化することでアポトーシスを誘導し、癌細胞の増殖を抑制する点に着目し、ミトコンドリアの活性化に比例して取り込みが増加する新規開発 PET 薬剤 ( $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF) を用いた PET 検査が、放射線治療の早期効果判定に有用であるかを検討することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍モデル

本研究のすべての実験は東海大学ならびに浜松ホトニクス動物実験委員会の承認のもとに実施し、実験動物は東海大学ならびに浜松ホトニクス動物実験指針に沿って動物愛護の観点から適正に扱った。8 週令雌 C3H/HeN マウス (日本クレア、東京) の右大腿部皮下にマウス扁平上皮癌 SCCVII 細胞を移植した ( $1.0 \times 10^5$  cells/ 0.05 mL saline)。マウスは経時的に腫瘍サイズを計測し、1 週間後に照射実験に供した。

### (2) 放射線照射

150-kV X 線照射装置 (MBR-1520R-3、日立パワーソリューションズ、日立) を用いて腫瘍局所に対して 6, 15, 30 Gy の 1 回照射を実施した。フィルタ - は 0.5 mm Al と 0.2 mm Cu を、線量率は 2.0 Gy/min を用いた。マウスはアクリル容器に入れ腫瘍部位以外は鉛で遮蔽した。

### (3) PET 計測

ミトコンドリア機能計測用プローブとして、新規に開発された  $^{18}\text{F}$ -2-tert-butyl-4-chloro-5-{6-[2-(2-fluoro-ethoxy)-ethoxy]-pyridine-3-ylmethoxy}-2H-pyridazin-3-one ( $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF) [2-4] を用いた。マウスは前夜より絶食処置を施し、1.5-2.0% イソフルラン麻酔下で  $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF または  $^{18}\text{F}$ -fluoro-2-deoxy-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) を尾静脈から投与後、高精度小動物用 PET 計測装置 (Clairvivo-PET、島津製作所、京都) にて 60 分間計測した。腫瘍内への PET プローブの取り込み量は、standard uptake value (SUV) を求めて評価した。具体的には、各々のプローブの取り込みが安定する期間 ( $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF では、投与後 10~30 分、 $^{18}\text{F}$ -FDG では、40~60 分) の SUV 平均値を算出した。

### (4) 実験デザイン

マウスを以下の 3 実験群にランダムに振り分けた。

腫瘍体積計測群：X 線照射後 14 日間経時的に腫瘍径を計測し腫瘍体積を求めた

$^{18}\text{F}$ -BCPP-EF-PET 計測群：X 線照射から 2, 3, 4, 5, 7 日後に  $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF-PET 計測および腫瘍内のアポトーシス出現頻度を検出した (図 1)

$^{18}\text{F}$ -FDG-PET 計測群：X 線照射から 2, 7, 10, 14 日後に  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET 計測を実施した (図 1)

### (5) アポトーシス出現頻度の検出

PET 計測終了後、腫瘍内のアポトーシスの出現頻度を検討した。イソフルラン麻酔下頸椎脱臼による安楽死処置を施したマウスから腫瘍組織を摘出した。ホルマリン固定パラフ

イン包埋ブロックを薄切し、ApopTag キット (Oncor, Gaithersburg, MD, USA)を用いた TUNEL 法によりアポトーシスを検出した。アポトーシス出現頻度は、(TUNEL 陽性細胞数/カウント細胞 5000 個)×100 で評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1)腫瘍増殖抑制効果

X 線照射後の腫瘍体積変化を図 1 に示した。照射線量に依存した腫瘍増殖の抑制が得られた。照射 3 日目までは、いずれの線量でも非照射群と比較して腫瘍体積縮小効果は見られなかった。

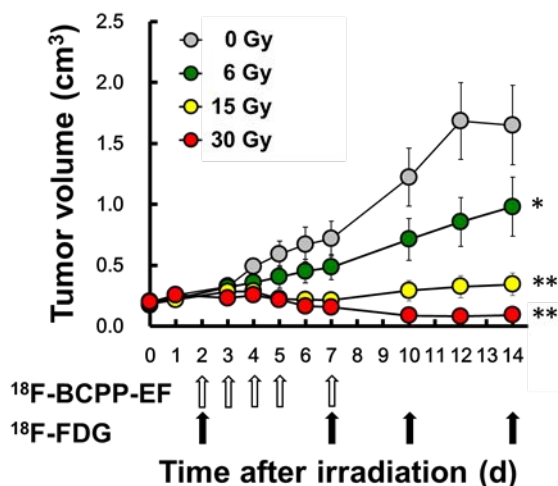


図 1. X 線照射後の腫瘍増殖曲線

非照射マウスにおいては腫瘍への  $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF の取り込みはなく陰性画像であった。しかし照射マウスでは、6, 15, 30 Gy すべての照射線量において、腫瘍体積では照射効果が判定できない照射 2 日後から  $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF の腫瘍への取り込みが陽性像として検出された。その程度は線量の増加または時間経過とともに増大した。

$^{18}\text{F}$ -FDG では、照射 7 日後までは、すべての照射線量で取り込み量の減少は検出できなかった。照射 10 日後の 30 Gy 照射群、14 日後の 15 Gy および 30 Gy 照射群でようやく取り込み減少が検出された。照射 10 日後および 14 日後には、照射効果は腫瘍体積の減少から容易に判断できる。

##### (3) $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF、 $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込み量ならびにアポトーシス出現頻度の経時変化

$^{18}\text{F}$ -BCPP-EF では、照射直後の 2 日後から腫瘍内への取り込み量の増加がすべての照射線量で確認された。

$^{18}\text{F}$ -FDG 投与群では、照射 2 日後には、照射による細胞致死効果を反映した取り込み量の減少ではなく、逆に照射線量に比例した炎症を反映した腫瘍への取り込み量の増加が確認された。7 日後でもその取り込み量において照射・非照射の差はなかった。照射線量に依存した  $^{18}\text{F}$ -FDG の取り込み量減少が出現したのは照射 10 日後以降であった。

アポトーシス出現頻度は、すべての照射線量群において非照射群よりも有意な増加があったが線量間で差はなかった。アポトーシス出現頻度は、照射からの時間経過にしたが

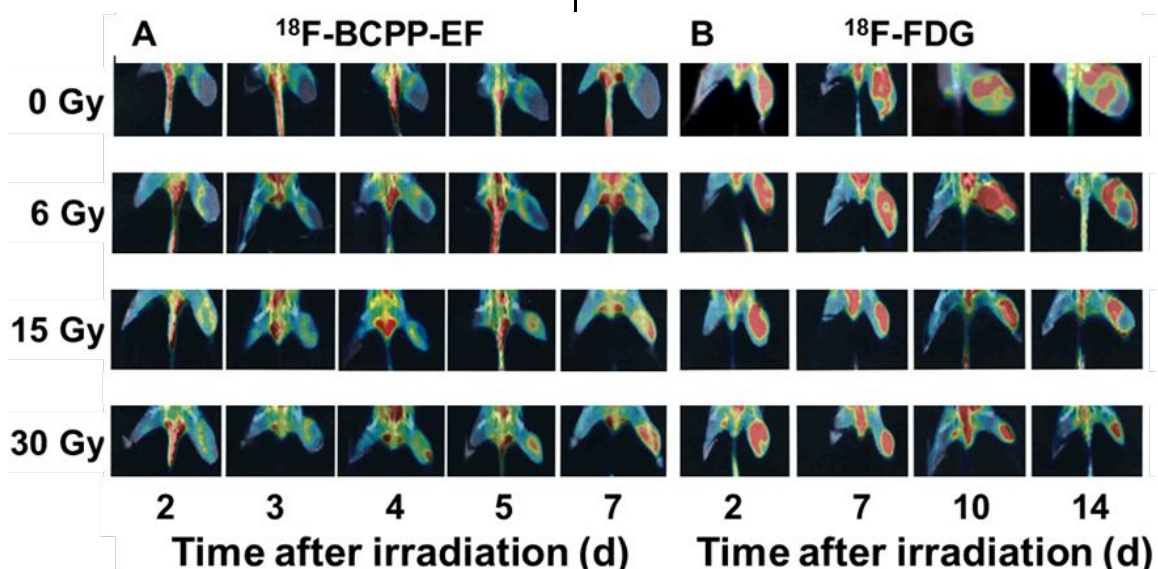


図 2.  $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF (A) または、 $^{18}\text{F}$ -FDG (B) 投与後の PET 画像

##### (2)PET 画像

X 線照射後経時的に  $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF または  $^{18}\text{F}$ -FDG を投与して得た PET 画像を図 2 に示した。 $^{18}\text{F}$ -BCPP-EF-PET (図 2A) 群では、

って徐々に減少した。使用した SCCVII 腫瘍細胞の照射後のアポトーシス出現頻度は照射約 6 時間後に最大になり、その後は徐々に減少することが報告されている[5]。

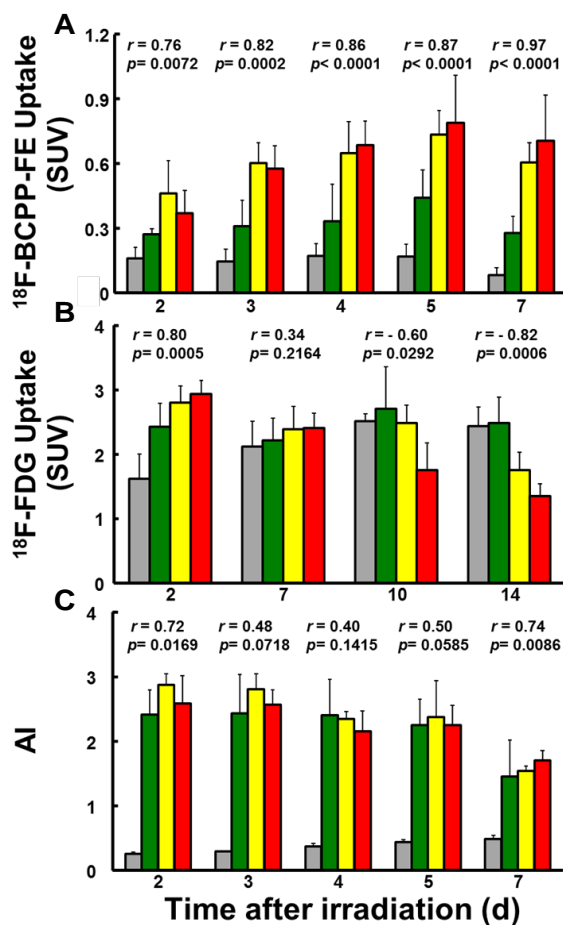


図3.  $^{18}\text{F-BCPP-EF}$ (A)、 $^{18}\text{F-FDG}$ (B)の腫瘍内取り込み量または腫瘍内アポトーシス出現頻度(C)の照射後経日変化

以上、本研究では放射線照射が癌細胞のミトコンドリアを活性化することでアポトーシスを誘導し、癌細胞の増殖を抑制する点に着目し、 $^{18}\text{F-BCPP-EF}$ (ミトコンドリアの活性化に比例して取込みが増加するPET薬剤)を用いたPET検査が、放射線治療の早期効果判定に有用であるかを確認するため、マウスを用いた動物実験を行った。癌組織にさまざまな線量の放射線を照射した後、 $^{18}\text{F-BCPP-EF-PET}$ で経時的にミトコンドリアの活性度測定およびPET画像を描出した。また、並行して癌組織の大きさをノギスを用いて計測し、ミトコンドリアの活性度と放射線治療による癌細胞の増殖抑制との関連性を検討した。

その結果、照射線量に比例したミトコンドリアの活性度の増加が、癌細胞の増殖抑制(治療効果)を反映していることを確認した。また、 $^{18}\text{F-BCPP-EF}$ の取込みが、癌組織の大きさに変化が現れない(ノギス計測・ $^{18}\text{F-FDG-PET}$ 画像)照射後2日目の早期から増加していることを確認した。

放射線治療効果の早期予測能を評価するために、**治療効果(放射線治療2週間後の腫瘍体積)**とPET製剤の腫瘍集積の相関を経

時的に検討した結果(図4)、 $^{18}\text{F-BCPP-EF}$ では照射2日後より一貫した相関関係が得られたが、 $^{18}\text{F-FDG}$ で相関が確認されたのは、照射10日後以降であった。

この結果は、癌組織の大きさの変化として放射線治療の効果が現れる前の段階から、癌の治療効果が測定できることを示した。本研究成果により、早期効果判定手法の確立が期待でき、治療開始早期での効果判定により、従来のEBM(科学的な根拠に基づく医療)で推奨されてきた癌の種類ごとに決められている標準的な放射線照射量からさらに発展した、個々の癌に対して適切な照射量を調節する個別化医療の実現が期待される。

#### <引用文献>

Murayama C, Harada N, Kakiuchi T, Fukumoto D, Kamiyo A, Kawaguchi AT, Tsukada H. Evaluation of D- $^{18}\text{F-FMT}$ ,  $^{18}\text{F-FDG}$ , L- $^{11}\text{C-MET}$ , and  $^{18}\text{F-FLT}$  for monitoring the response of tumors to radiotherapy in mice. *J Nucl Med*. Vol. 50, No. 2, 2009, 290-295.

Harada N, Nishiyama S, Kanazawa M, Tsukada H. Development of novel PET probes, [ $^{18}\text{F}$ ]BCPP-EF, [ $^{18}\text{F}$ ]BCPP-BF, and [ $^{11}\text{C}$ ]BCPP-EM for mitochondrial complex 1 imaging. *J Label Compd Radiopharm*. Vol. 56, No. 11, 2013, 553-561.

Tsukada H, Ohba H, Kanazawa M, Kakiuchi T, Harada N. Evaluation of  $^{18}\text{F-BCPP-EF}$  for mitochondrial complex I imaging in the brain of conscious monkeys using PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Vol. 41, No. 4, 2014, 755-763.

Tsukada H, Nishiyama S, Ohba H, Kanazawa M, Kakiuchi T, Harada N. Comparing amyloid- $\beta$  deposition, neuroinflammation, glucose metabolism, and mitochondrial complex I activity in brain: a PET study in aged monkeys. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Vol. 41, No. 4, 2014, 755-763.

Masunaga SI, Ono K, Suzuki M, Kinashi Y, Takagaki M. Radiobiologic significance of apoptosis and micronucleation in quiescent cells within solid tumors following  $\gamma$ -ray irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Vol. 49, No. 5, 2001, 1361-1368.

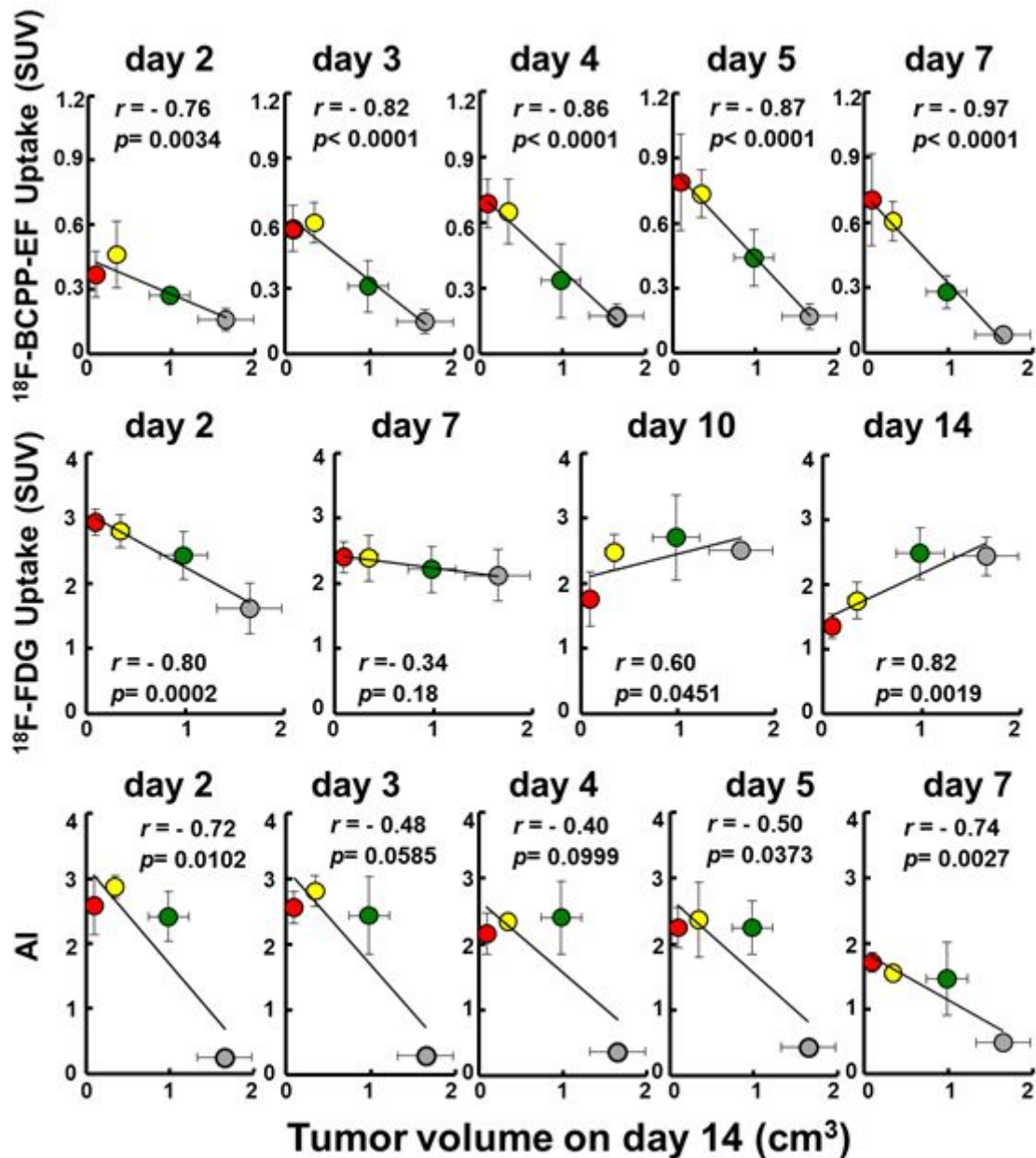


図4. <sup>18</sup>F-BCPP-EF、<sup>18</sup>F-FDGの腫瘍内取り込み量または腫瘍内アポトーシス出現頻度から放射線治療2週間後の腫瘍体積を予測できるか

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Murayama Chieko, Kawaguchi Akira, Kamijo Akemi, Naito Katsuko, Kanazawa Masakatsu, Tsukada Hideo. Monitoring mitochondrial complex-I activity using novel PET probe <sup>18</sup>F-BCPP-EF allows early detection of radiotherapy effect in murine squamous cell carcinoma. PLOS One. 査読有, Vol.12, No.1, 2017, e0170911, doi: 10.1371/journal.pone.0170911

〔学会発表〕(計6件)

Chieko Murayama 他, Monitoring mitochondrial complex-I using novel PET probe allows early detection of radiosensitivity. 35th Congress of European Society for Radiotherapy & Oncology, 2016.5.2, 「Torino (Italy)」

Chieko Murayama 他, Early positive detection of tumor radiotherapy effect by mitochondrial complex I activity using a novel PET probe [<sup>18</sup>F]BCPP-EF, EACR(European Association for Cancer Research)-AACR(American Association for Cancer Research)-SIC (Italian Cancer Society) Special Conference, 2015.6.22, 「Firenze (Italy)」

Chieko Murayama 他, Early positive detection of tumor radiotherapy effect by mitochondrial complex I activity using a novel PET probe  $^{18}\text{F}$ -BCPP- $\text{EF}$ , 15th International Congress of Radiation Research, 2015.5.26, 京都国際会館 (京都府・京都市)

村山千恵子他、新規 PET プローブ  $^{18}\text{F}$ -BCPP- $\text{EF}$  を用いたミトコンドリア機能計測による放射線治療効果の早期予測法、第 17 回癌治療増感研究シンポジウム、2015.2.7、奈良県文化会館 (奈良県・奈良市)

村山千恵子他、ミトコンドリア機能計測による放射線治療の早期治療効果予測の可能性、日本放射線腫瘍学会第 27 回学術大会、2014.12.12、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

村山千恵子他、ミトコンドリア機能計測による癌治療の感受性および効果判定の可能性、日本放射線腫瘍学会第 43 回放射線による制癌シンポジウム、2014.7.11 メルパルク京都 (京都府・京都市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

村山 千恵子 (MURAYAMA, Chieko)  
東海大学・医学部・客員講師  
研究者番号：50307295

### (2)研究分担者

川口 章 (KAWAGUCHI, Akira)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：30195952