

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670571

研究課題名(和文)新規低酸素病態イメージング核種を用いたがん幹細胞診断PETの開発に関する研究

研究課題名(英文) Study on development of the cancer stem cell diagnosis PET using the new hypoxia condition imaging nuclide

研究代表者

中神 佳宏 (Nakagami, Yoshihiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医長

研究者番号：80347301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞と低酸素状態との関連の報告がなされ、低酸素病態イメージングの重要性が増しているものの、有効なイメージング技術が確立されていないのが現状である。我々は、低酸素状態のがん細胞が行うとされるフマル酸呼吸を画像化することを目的とし、¹¹C標識フマル酸の自動合成法を検討したところ低酸素病態イメージングを可能とする新規核種の開発に成功した。本法により作られた¹¹C-フマル酸は、担がんマウスを用いた実験で、動物用PET装置による画像化、ならびに解剖による体内分布の測定で、腫瘍への高い集積が認められた。今後ヒトでの有用性が認められれば、腫瘍PET検査のイメージング剤として広く利用される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The report of the association between cancer stem cell and hypoxia is accomplished, and it is the present conditions that an effective imaging technology is not established although importance of the hypoxia condition of a patient imaging increases. We were intended to image fumarate breathing said to that a cancer cell of the hypoxia was carried out and were successful for the development of the new nuclide after examining automatic incorporation of the ¹¹C-fumaric acid, to enable hypoxia condition of a patient imaging. The ¹¹C-fumaric acid made by our method was an experiment using the mice with tumors, and the high accumulation to a tumor was found in the measurement of the biodistribution by the imaging with the PET camera for the animal and the dissection.

研究分野：放射線医学

キーワード：フマル酸呼吸 低酸素イメージング PET

1. 研究開始当初の背景

近年、がん幹細胞と低酸素状態との関連に関する報告がなされ (Mohyeldin A. et al., Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell, 2010 Aug 6;7(2):150-61.)、低酸素病態イメージングの重要性が増す中、低酸素状態の代謝に関する詳細な分子生物学的メカニズムの解明は未だなされていない。

がん細胞が、比較的酸素濃度が高い条件下においても、主に酸素を使わない解糖系によってエネルギー産生を行う現象はワーバーグ効果と呼ばれ、これまでに様々ながん種において観察されている。また、がん細胞は活発な増殖のために多量のグルコースを必要とし、近年の¹⁸F-FDGによるPET診断はまさにこの特性を利用した診断技術である。しかし、一部のがん種やがん幹細胞においては血流が乏しいために、慢性的な低酸素や極度の栄養不足状態にありながら生存・増殖していることが知られている。つまり、このようながん細胞やがん幹細胞におけるエネルギー産生は大量のグルコースを必要とする解糖系の亢進だけで説明することは難しく、血流量が多い栄養的に恵まれた環境下で増殖するがん種とは異なったエネルギー代謝を行っている可能性が高い。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(平山研究員らのグループ)との共同研究において、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)を用いたメタボローム測定により、大腸がんおよび胃がん患者から採取したがん組織および正常組織の代謝物質を一斉分析し、がん組織のエネルギー産生のメカニズムにつき解析した(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.)

その結果、妙なことにがん組織ではクエン酸回路の後半部分の代謝物(コハク酸, フマル酸, リンゴ酸)が有意に増加していた。嫌気性微生物や回虫などの寄生虫や二枚貝の一部では、嫌気的条件下でフマル酸呼吸と呼ばれる代謝によってATP産生が行われることが知られている。がん組織ではコハク酸が蓄積しており、嫌気性条件下での回虫の代謝パターンと酷似していた。

よって、がん細胞ではフマル酸代謝が亢進していることが分かるが、今までの核医学イメージング法においてフマル酸代謝に着目したものはない。よって、フマル酸代謝を画像化すれば従来とは違った機序に基づく低酸素病態イメージングが可能となると期待される。当施設では陽電子放出核種である¹¹Cによるフマル酸の標識法の開発に成功したのである。

2. 研究の目的

幹細胞能力とがん形成能をあわせ持つ少数の幹細胞様のがん細胞(がん幹細胞)が発見され、これが遠隔転移やがん治療後の再発に関与していることが明らかとなり、がん幹細胞の性状、動態の把握、およびがん幹細胞をターゲットとした診断治療技術の開発は、がん克服のための重要課題となっている。また、がん幹細胞と低酸素状態との関連も報告がなされ、従来から核医学領域で注目されている低酸素病態イメージングの重要性が増しているものの、有効なイメージング技術が確立されていないのが現状である。我々は、低酸素病態イメージングを可能とする新規核種の開発に成功した。よって、これを用いて、従来の技術より優れた低酸素病態及びがん幹細胞イメージング技術を開発すること

を本研究の目的とする。

現在までに、様々な腫瘍イメージング法の開発がなされたが、いずれもがんだけに特異的なイメージング法ではなく、診断に苦慮することもしばしばである。フマル酸代謝は哺乳類の正常細胞では行われない一方、がん細胞（特にがん幹細胞）はフマル酸代謝をすることから、 ^{11}C -フマル酸による PET は、従来にはないがん特異的なイメージング法となることが期待される。

3 . 研究の方法

^{11}C -フマル酸を通常のヌ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、 ^{11}C -フマル酸の体内分布を決定しておく。一方、ヌードマウスにがんを移植し担癌動物を作成する。それら担癌ヌードマウスに ^{11}C -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、 ^{11}C -フマル酸の体内及びがん組織への分布を決定しておく（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ヌードマウス、担癌ヌードマウスにつき、動物用 PET 装置にて撮像し、がん細胞に特異的に ^{11}C -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。

尚、フマル酸呼吸の代謝経路において、フマル酸の前駆物質であるリンゴ酸の標識にも当施設では成功している（特許出願準備中）。リンゴ酸がキレート剤としての性質を持つことを利用し、金属元素である $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 及び ^{64}Cu で標識したのであるが、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -リンゴ酸は SPECT 製剤として利用出来るため SPECT 検査薬としての可能性が期待され、また、 ^{64}Cu は

陽電子放出核種であると同時に 線放出核種でもあるから、 ^{64}Cu -リンゴ酸は、がんの治療薬、特にがん幹細胞を標的とする治療薬として応用出来る可能性を秘めている（内用療法）。よって、これらリンゴ酸標識体についても同様の実験を施行したい。

4 . 研究成果

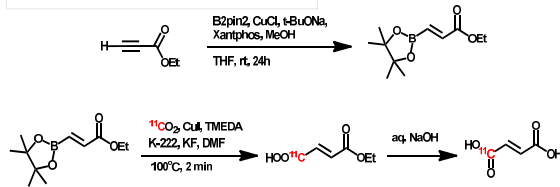
当施設ではフマル酸を ^{11}C で標識することに世界で初めて成功した。

標識フマル酸の合成法については、定同位体である ^{13}C ならびに長半減期の ^{14}C 標識体の合成が報告されている。しかしながらこれらの方法を ^{11}C 標識合成に応用することは、同位元素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。

我々は当初、グリニャール反応による ^{11}C の導入を試みたが、いずれの方法においても目的とする臭化マグネシウム化合物は得られなかった。そこで、Rissらが報告している銅触媒による Boronic acid ester のカルボキシル化 反応による合成を検討したところ、 ^{11}C -フマル酸を自動合成装置を用いた遠隔操作で迅速に合成する方法を開発することに成功した。以下にその概略を示す。

プロピオール酸エチルを原料として 3 - (4,4,5,5 - テトラメチル - 1,3,2 - ジオキサポラン - 2 - イル) アクリル酸エチルを合成し、サイクロトロンにより製造した ^{11}C -二酸化炭素によるカルボニル化を行うことで ^{11}C -フマル酸を合成する方法を開発した。本法は PET 薬剤用の自動合成装置を用いた迅速合成に応用可能であり、HPLC により精製することで、目的とする ^{11}C -フマル酸を生体に投与できる水溶液として得る事ができる（特許出願準備中）（図1）。

< 図 1 > ^{11}C -フマル酸合
成法の概略



従来、 ^{18}F -FDGなどががん診断に利用されてきたが、これらは必ずしもがん細胞だけに特異的なイメージング法ではなく、炎症性集積や生理的集積もあり診断に苦慮することも多い。

フマル酸呼吸は哺乳類の正常細胞では行われないため、 ^{11}C -フマル酸の正常細胞への取り込みは少なく、その一方、がん細胞はフマル酸代謝が亢進しているため細胞内への ^{11}C -フマル酸の取り込みは顕著である。よって、 ^{11}C -フマル酸による PET は、炎症性集積や生理的集積の少ないがん特異的なイメージング法となり、がんの画像診断法に画期的な革命をもたらす。

実際、本法により作られた ^{11}C -フマル酸を担がんマウスの尾静脈より投与し、動物用 PET 装置による画像化を試みたところ腫瘍への高い集積が認められた。よって、今後ヒトでの有用性が認められれば、腫瘍 PET 検査のイメージング剤として広く利用される可能性がある。

尚、当初がん幹細胞をマウスに移植し同様の実験を行うこと、及び $^{99\text{m}}\text{Tc}$ もしくは ^{64}Cu 標識リンゴ酸を用いて同様の実験を行うことを予定していたが、研究費が思ったよりかさんだためこれらについては遂行することが出来なかった。これらは、今後の研究課題としたい。

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)

Zenda S, Nakagami Y, Toshima M, Arahira S, Kawashima M, Matsumoto Y, Kinoshita H, Satake M, Akimoto T.

Strontium-89(Sr-89)chloride in the treatment of various cancer patients with multiple bone metastases. Int J Clin Oncol. 査読有 2014 Aug;19(4):739-43.

DOI 10.1007/s10147-013-0597-7

[学会発表] (計 1 件)

中神佳宏、加納大輔、楠本昌彦、小島良紀、新規低酸素イメージング PET の開発 フマル酸呼吸を応用して、日本核医学会 PET 核医学分科会 PET サマーセミナー2016in 熊本、平成 28 年 8 月 28 日、ANA クラウンプラザホテル 熊本ニュースカイ(熊本県熊本市)

[その他]

ホームページ

http://www.ncc.go.jp/jp/nccce/clinic/diagnostic_radiology.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中神 佳宏 (NAKAGAMI, Yoshihiro)

独立行政法人 国立がん研究センター

・東病院・医長

研究者番号：80347301

(2) 研究分担者

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・外来研究員

研究者番号：20167357

井上 登美夫 (INOUE, Tomio)

横浜市立大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号：80134295