



Title	2-nitroimidazole系低酸素イメージング剤の腫瘍内低酸素領域への集積メカニズムに関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	正木, 悠紀子
Description	配架番号 : 1695
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第7036号
Issue Date	2017-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68368
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yukiko_Masaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 正木 悠紀子

学 位 論 文 題 名

2-nitroimidazole 系低酸素イメージング剤の腫瘍内低酸素領域への集積メカニズムに関する研究

(Studies on the accumulation mechanism of 2-nitroimidazole-based hypoxia imaging probes)

【背景と目的】

固形腫瘍内には、がん細胞の増殖亢進による血管形成の遅延に伴い酸素供給の低下した領域、すなわち低酸素領域が存在する。低酸素領域は、腫瘍の悪性化、薬物および放射線治療に対する抵抗性に関与することから、低酸素領域の同定は、腫瘍の悪性度鑑別および放射線治療部位の決定・効果予測等の指標として有効であると考えられる。

これまで、特定の分子の分布状態を非侵襲的に体外から可視化する分子イメージング技術を用いて低酸素領域を描出することを目的として、低酸素を特異的に認識するさまざまなイメージング剤の開発が行われており、その大半が低酸素状態の細胞内に滞留する性質を有する 2-nitroimidazole を母体骨格に有する。 ^{18}F -Fluoromisonidazole (FMISO) は 2-nitroimidazole 骨格を有し、低酸素の陽電子放射断層撮像法 (Positron Emission Tomography, PET) 診断に用いられる最も代表的なイメージング剤として臨床研究が進められている。PET は、放射性同位元素標識したイメージング剤を投与して体外から放射能集積を画像化する手法であり、感度・定量性に優れるという特徴を有する。FMISO 等の 2-nitroimidazole 骨格を有する薬剤は、低酸素環境下において特異的に還元された後生体内高分子と共有結合することで細胞内に滞留し、低酸素領域を描出すると考えられてきた。しかし PET 等の *in vivo* イメージング法や、基礎研究において組織内における放射能分布を評価するために用いられるオートラジオグラフィー (Autoradiography, ARG) 等の従来の核医学イメージング法は、放射能の空間的分布を評価する手法であることから、画像化された化合物の化学形態を区別することが困難であり、腫瘍内低酸素領域に集積した FMISO の化学形態は未だ不明である。近年、新たな分子イメージング手法として質量分析イメージング法 (Imaging Mass Spectrometry, IMS) が開発された。IMS は組織切片内における分子の分布を質量分析技術を用いて直接可視化する手法であり、薬物および薬物代謝物の分布をそれぞれ区別して画像化することが可能である。そこで本研究では、IMS 技術と核医学イメージング法とを融合することにより、腫瘍内低酸素領域における 2-nitroimidazole 系化合物の化学形態および分布を検討し、低酸素領域への集積メカニズムの解明を試みた。

【材料と方法】

FaDu ヒト頭頸部癌細胞を右側腹に移植した Balb/c ノードマウス (雄性) (FaDu 腫瘍マウス) に ^{18}F -FMISO (10 MBq, 550 mg/kg) を尾静脈より投与し、投与 4 時間後に腫瘍を摘出した。腫瘍ホモジネートを調製後、溶媒抽出により高分子結合画分と低分子画分に分離し、各割合を算出した。また低分子画分について、ラジオ高速液体クロマトグラフィー (radio-HPLC) により化学形態を評価した。さらに、腫瘍組織切片を作製し、ARG および IMS 測定、ならびに pimonidazole (低酸素マーカー) の免疫組織染色を行った。IMS 測定には、超高質量分解能を有する Bruker Daltonics 社製 7T Bruker solarix XR を用いた。

また、FaDu 腫瘍マウスに pimonidazole (100 mg/kg) を尾静脈より投与し、投与 0.5, 2, 4 時間後に腫瘍を摘出した。腫瘍組織切片を作製し、IMS 測定および pimonidazole 免疫組織染色を行った。

次に、FaDu, LOVO ヒト結腸癌細胞および T24 ヒト膀胱癌細胞に ^{18}F -FMISO (2.5 MBq, 250 nM) を添加し、通常酸素環境下および低酸素環境 (1% O_2) 下、4 時間培養した。各細胞を

溶媒抽出し、LC/MS により腫瘍内の FMISO 由来分子を分析した。また、低酸素環境下における各細胞のグルタチオン抱合酵素 (glutathione S-transferase, GST) 活性、グルタチオン (GSH) 量を評価した。さらに定量的 PCR 法により、グルタチオン抱合体排出トランスポーターである多剤耐性関連タンパク質 (multidrug resistance-associated protein 1, MRP-1) の発現量を測定した。

【結果と考察】

溶媒抽出により評価した FMISO の腫瘍内における生体内高分子への共有結合割合は $32.2 \pm 4.0\%$ ($n = 4$) となり、腫瘍内 ^{18}F -FMISO の多くは、これまでの想定とは異なり、高分子に共有結合せず低分子として存在することが明らかとなった。また腫瘍ホモジネート中低分子画分の radio-HPLC 分析において、未知の化学形態を有する画分を高い割合で検出したことから、 ^{18}F -FMISO 投与により得られる腫瘍内の画像は本未知画分の分布が強く反映されている可能性が示唆された。次に、IMS を用いた低分子代謝物の腫瘍内化学形態および分布評価では、生成が想定された代謝物はいずれも腫瘍内に均一な分布を示し、ARG および低酸素マーカーの局在とは一致しなかった。そこで IMS により FMISO 投与による変動分子を検索したところ、ARG や低酸素マーカーと分布が一致する FMISO 低分子代謝物を見出し、超高質量分解能を利用した組成解析によりその変動分子が FMISO 還元体のグルタチオン抱合体であることを同定した。

FMISO がグルタチオン抱合体を形成し低酸素領域に集積することを見出したことから、次に本機構の普遍性を検証するために、FMISO と同様に 2-nitroimidazole 骨格を有し、最も一般的な低酸素の免疫組織染色用薬剤である pimonidazole について評価した。IMS を用いた腫瘍内化学形態および分布評価の結果、pimonidazole も FMISO と同様に腫瘍内低酸素領域においてグルタチオン抱合体を形成することを見出し、グルタチオン抱合体の低酸素領域への集積は 2-nitroimidazole 系薬剤に普遍的な現象であることを明らかとした。

さらに、*in vitro* 低酸素培養細胞に集積した FMISO 代謝物中におけるグルタチオン抱合体の割合を LC-MS を用いて評価したところ、低酸素状態において FaDu 細胞 (FMISO 高集積細胞) に取り込まれた FMISO の多くがグルタチオン抱合体として存在することを見出した。さらに、FMISO 集積量の異なる 3 種類の細胞腫のグルタチオン抱合体生成量は、FMISO が高集積を示す FaDu 細胞において最も高く、次いで LOVO 細胞が続く、FMISO 集積量の低い T24 細胞において最も低値を示すことを見出した (total uptake: 0.851 ± 0.009 (FaDu; FMISO 高集積細胞), 0.617 ± 0.021 (LOVO; FMISO 中集積細胞), 0.167 ± 0.011 (T24; FMISO 低集積細胞) %dose/mg protein; glutathione conjugate: 0.502 ± 0.035 (FaDu) 0.158 ± 0.006 (LOVO), 0.007 ± 0.001 (T24) %dose/mg protein)。一方、FaDu 細胞における GSH 量は 3 細胞腫の中で最も高値を示し、LOVO 細胞および T24 細胞の GSH 量は同程度であった (FaDu; 650.5 ± 39.3 , LOVO; 147.7 ± 7.9 , T24; 214.7 ± 32.7 nmol/mg protein)。加えて、FaDu 細胞における GST 活性は LOVO 細胞と同程度であり、T24 細胞と比較して高値を示した (FaDu; 10.56 ± 0.87 , LOVO; 11.82 ± 0.83 , T24; 5.13 ± 1.04 $\Delta\text{OD}_{340}/\text{min}/\text{mg protein}$)。また MRP-1 の発現量は、FMISO 集積量と逆の順番を示した (T24>LOVO>FaDu)。これらの結果から、グルタチオン抱合体の生成亢進および排出低下が、低酸素状態とともに、FMISO の細胞内への集積に重要な役割を果たすと考えられる。以上、FMISO の低酸素細胞内への集積メカニズムが還元代謝を受けた後のグルタチオン抱合であることを明らかとし、FMISO の集積は酸素濃度のみではなくグルタチオン抱合体形成能と相関する可能性を示した。

【結論】

FMISO および pimonidazole 等の 2-nitroimidazole 系イメージング剤は、低酸素環境下においてグルタチオン抱合体を形成することで腫瘍細胞に集積することを明らかとした。また FMISO の集積は酸素濃度に加えてグルタチオン抱合体形成能を反映する可能性を見出した。本研究は FMISO を使用した PET による低酸素診断の際には考慮すべき有益な情報であり、2-nitroimidazole 系イメージング剤の低酸素領域への集積メカニズム解明および低酸素イメージング剤の今後の研究開発に繋がる重要な新知見であると考えられる。