



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7036
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68370
Type	doctoral thesis
File Information	Yukiko_Masaki.pdf



学 位 論 文

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)

2017 年 12 月
北海道大学
正木 悠紀子

学 位 論 文

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)

2017 年 12 月
北海道大学
正木 悠紀子

目次

発表論文目録および学会発表目録	1
緒言	3
略語表	6
第 1 章	8
緒言	9
実験方法	9
結果	13
考察	21
第 2 章	25
緒言	26
実験方法	26
結果	28
考察	32
第 3 章	34
緒言	35
実験方法	36
結果	38
考察	42
総括および結論	45
謝辞	47
引用文献	48

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の学術雑誌に発表した.

1. **Yukiko Masaki**, Yoichi Shimizu, Takeshi Yoshioka, Yukari Tanaka, Ken-ichi Nishijima, Songji Zhao, Kenichi Higashino, Shingo Sakamoto, Yoshito Numata, Yoshitaka Yamaguchi, Nagara Tamaki, Yuji Kuge. The accumulation mechanism of the hypoxia imaging probe “FMISO” by imaging mass spectrometry: possible involvement of low-molecular metabolites. *Sci Rep.* Nov 19;5:16802 (2015).
2. **Yukiko Masaki**, Yoichi Shimizu, Takeshi Yoshioka, Fei Feng, Songji Zhao, Kenichi Higashino, Yoshito Numata, Yuji Kuge. Imaging Mass Spectrometry Revealed the Accumulation Characteristics of the 2-nitroimidazole-based Agent “Pimonidazole” in Hypoxia. *PLoS ONE* **11(8)**, e0161639 (2016).
3. **Yukiko Masaki**, Yoichi Shimizu, Takeshi Yoshioka, Ken-ichi Nishijima, Songji Zhao, Kenichi Higashino, Yoshito Numata, Nagara Tamaki, Yuji Kuge. FMISO accumulation in tumor is dependent on glutathione conjugation capacity in addition to hypoxic state. *Ann Nucl Med.* **31(8)**, 596-604 (2017).

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. **正木 悠紀子**. イメージング質量分析 (IMS) による低酸素イメージング剤 “FMISO” の腫瘍内集積機序の検討: 低分子代謝物関与の可能性. 第 28 回 未来創薬・医療イノベーションセミナー, 2015 年 5 月 13 日, 札幌市
2. **正木 悠紀子**, 志水 陽一, 吉岡 健, 田中 由香里, 西嶋 剣一, 趙 松吉, 東野 賢一, 坂本 真吾, 沼田 義人, 山口 嘉隆, 玉木 長良, 久下 裕司. イメージング質量分析 (IMS) による低酸素イメージング剤 “FMISO” の腫瘍内集積機序の検討: 低分子代謝物関与の可能性. 日本分子イメージング学会第 10 回総会・学術集会, 2015 年 5 月 20 日-21 日, 東京都.
3. **Yukiko Masaki**, Yoichi Shimizu, Takeshi Yoshioka, Yukari Tanaka, Kenichi Higashino, Shingo Sakamoto, Yoshito Numata, Yoshitaka Yamaguchi, Ken-ichi Nishijima, Songji Zhao, Nagara Tamaki, Yuji Kuge. Reveal of accumulation

mechanism of hypoxia imaging probe “FMISO” in tumors by imaging mass spectrometry: A possible involvement of low-molecular metabolite. *2015 World Molecular Imaging Congress*, September 3, 2015, Honolulu, Hawaii.

4. 志水 陽一, 正木 悠紀子, 吉岡 健, 田中 由香里, 西嶋 剣一, 趙 松吉, 東野 賢一, 沼田 義人, 山口 嘉隆, 玉木 長良, 小川 美香子, 久下 裕司. イメージング質量分析法 (IMS) による 2-nitroimidazole を母体骨格に有する薬剤の腫瘍低酸素領域への集積機序の解明. 第15 回放射性医薬品・画像診断薬研究会, 2015 年 9 月 14 日, 京都市.
5. 志水 陽一, 正木 悠紀子, 吉岡 健, 田中 由香里, 西嶋 剣一, 趙 松吉, 東野 賢一, 沼田 義人, 山口 嘉隆, 玉木 長良, 小川 美香子, 久下 裕司. イメージング質量分析法 (IMS) による低酸素イメージング剤“FMISO”の腫瘍内代謝・集積機序の経時的評価. 第55 回日本核医学会学術総会, 2015 年 11 月 5 日, 東京都.
6. Yoichi Shimizu, Yukiko Masaki, Takeshi Yoshioka, Kenichi Higashino, Yoshito Numata, Ken-ichi Nishijima, Songji Zhao, Nagara Tamaki, Mikako Ogawa, Yuji Kuge. Does FMISO-PET really visualize only hypoxic states?; accumulation mechanism assessment of FMISO in hypoxic cells in combination with mass spectrometry. *The 63rd Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2016*, June 11, 2016 San Diego, USA.
7. 志水 陽一, 正木 悠紀子, 吉岡 健, 東野 賢一, 沼田 義人, 趙 松吉, 玉木 長良, 小川 美香子, 久下 裕司. 低酸素イメージング剤“FMISO”の腫瘍集積におけるグルタチオン関連因子の影響. 第 56 回日本核医学会学術総会. 2016 年 11 月 5 日. 名古屋市

緒言

固形腫瘍には、活発な細胞増殖に血管形成が追いつかず血管からの酸素供給が不足して酸素分圧が低下する低酸素領域が存在する。この低酸素領域は、薬物治療や放射線治療に対する抵抗性に関与することが知られている^{1,2}。そこで、特定の分子の分布状態を非侵襲的に体外から可視化出来る分子イメージング技術を用いて、腫瘍の低酸素領域を同定することができれば、腫瘍の治療法の選択や効果の評価などに有用な情報が得られると考えられる³。分子イメージング技術の中でも、陽電子放射断層撮像法 (Positron Emission Tomography, PET) は放射性同位元素を標識した薬剤を用いて *in vivo* 画像化する手法であり、他の分子イメージング技術と比べて感度・定量性が高いという特徴を有している⁴。これまでに低酸素領域を標的としたイメージング剤として、2-nitroimidazole を母体骨格に有する薬剤が開発されてきており⁵、中でも F-18 標識 2-nitroimidazole 誘導体である ¹⁸F-Fluoromisonidazole (FMISO) は最も臨床利用が進んでいる⁶。FMISO 等の 2-nitroimidazole 骨格を有する薬剤は、低酸素環境下において 2-nitroimidazole 環のニトロ基が還元された後、生体内高分子と共有結合し、細胞内に滞留することにより低酸素領域を描出すると考えられている (図 1)。しかし PET など *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のに用いられているオートラジオグラフィー (Autoradiography, ARG) 法など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ため、得られた画像から化合物の化学形態を区別することは極めて困難であり、実際にどのような FMISO 代謝物が低酸素領域の描出に関与しているかを評価できず、その詳細な集積メカニズムは未だ明らかとなっていない。

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⁷。IMS は、組織切片上における分子の分布を直接可視化できる技術であり、ペプチドや脂質、薬物、内因性代謝物の分布を評価するために広く用いられている⁸⁻¹⁰。IMS は質量分析技術を利用していることから、測定対象分子に特異的な分子プローブを必要とせず、1 度の測定で複数の分子の分布を評価することが可能である。そのため、IMS を用いることで薬物およびその代謝物の分布をそれぞれ選択的に可視化することが可能である¹¹。そこで本研究では、IMS 技術と核

医学イメージング法を融合することにより、腫瘍内低酸素領域における 2-nitroimidazole 系低酸素イメージング剤の化学形態および分布を検討し、本イメージング剤の低酸素領域への集積メカニズムの解明を試みた。

固形腫瘍低酸素領域に集積した FMISO の化学形態を評価するため、まず FMISO の腫瘍内における生体内高分子への共有結合割合を求めたところ、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。またラジオ高速液体クロマトグラフィー (radio-HPLC) を用いて腫瘍ホモジネート低分子画分に含まれる ^{18}F -FMISO 由来の代謝物を分析したところ、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放射能分布像は本未知画分の分布を強く反映している可能性が示唆された。次に、IMS を用いて想定される低分子代謝物の腫瘍内化学形態および分布を評価したところ、腫瘍内においていずれの化合物も均一な分布を示し ARG により得られた放射能分布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、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確認するために、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。

以上より 2-nitroimidazole 系薬剤は低酸素環境下の細胞内においてグルタチオン抱合体を形成し、集積することが明らかとなったことから、次に低酸素環境下の細胞への FMISO の集積におけるグルタチオン抱合体の寄与およびグルタチオン抱合関連因子の影響について評価した。まず、*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 を用いて測定し、FMISO 集積程度の異なる細胞腫間でのグルタチオン抱合関連因子の変動を評価した。その結果、低酸素状態において 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。加えて、FMISO 高集積細胞において細胞内

グルタチオン (GSH) 量およびグルタチオン抱合酵素 (glutathioneS -transferase, GST) 活性は高値を示したことから, FMISO の取り込みが GSH 量および GST 活性に依存する可能性が示唆された. また, 定量的 PCR 法により評価した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) の発現は FMISO 高集積細胞において有意に低かった. 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細胞における FMISO 集積量増加に寄与していることが示唆された. 以上より, FMISO 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 の集積は酸素濃度のみではなくグルタチオン抱合体形成能を反映する可能性を示した.

以上, 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. 以下において, これらの結果を詳述する.

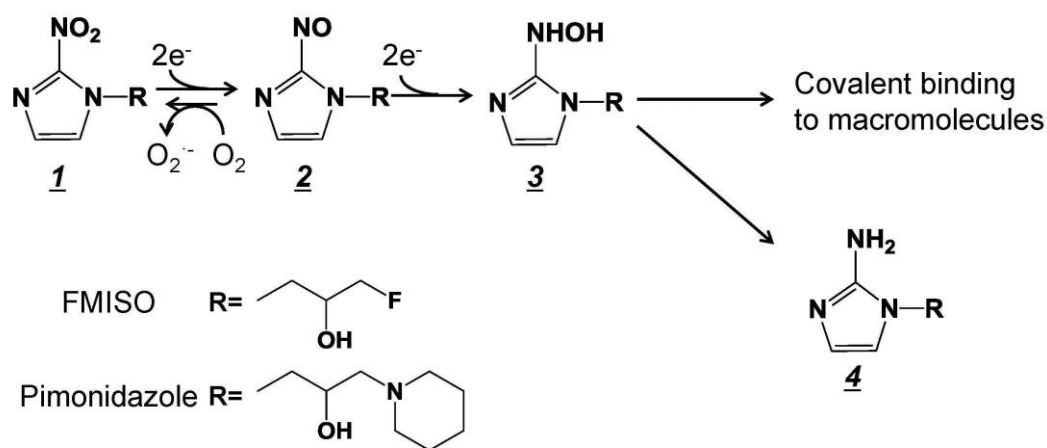


図 1.

従来想定されてきた 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.

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである.

ABC	ATP binding cassette
ARG	Autoradiography
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CID	collision-induced dissociation
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid
EMEM	Eagle's minimal essential medium
ESI	electrospray ionization
FMISO	Fluoromisonidazole
FTICR-MS	Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry
GSH	reduced form of glutathione
GSSG	oxidized form of glutathione
GST	glutathione-S-transferase
HRMS	high-resolution mass spectrometry
IMS	imaging mass spectrometry
ITO	indium tin oxide
LC/MS	liquid chromatography/mass spectrometry
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization
MRP	multidrug resistance-associated protein
MS/MS	tandem mass spectrometry
PBS	phosphate buffered saline
PET	positron emission tomography
radio-HPLC	radio-high performance liquid chromatography
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
T	tesla
TBS	tris buffered saline
TFA	trifluoroacetic acid

第 1 章

IMS による低酸素イメージング剤 “FMISO” の腫瘍
内集積機序の検討: 低分子代謝物関与の可能性

緒言

本章では、2-nitroimidazole 骨格を有する PET 用低酸素イメージング剤である ^{18}F -FMISO について、核医学イメージング法と IMS 技術とを融合させることにより、固形腫瘍内低酸素領域における化学形態および分布の解明を目指した。

まず、核医学的手法を用いて腫瘍内低酸素領域に集積した ^{18}F -FMISO 由来放射能の化学形態について検討した。さらに、質量分析技術を利用することで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 IMS を用いて、FMISO およびその代謝物の腫瘍内低酸素領域における分布評価を実施し、その分布を ARG による ^{18}F -FMISO 由来放射能分布と比較した。

実験方法

試薬

^{18}F 標識 FMISO は北海道大学病院核医学診療科サイクロترون室において既報に従い合成した¹²。 ^{19}F -FMISO は FutureChem 株式会社より購入した。高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) 用メタノールおよびアセトニトリルは、関東化学株式会社より購入した。トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid, TFA)、炭酸水素アンモニウムおよび塩酸は、和光純薬工業株式会社より購入した。2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) およびインジウム-スズ酸化物 (ITO) スライドガラスは、Bruker Daltonics 社から購入した。Complete protease inhibitor cocktail は、Roche Diagnostics 社から購入した。Pimonidazole (Hypoxypore-1) は、HPI Inc.社から購入した。

Amino-FMISO (4) の合成

Amino-FMISO は既報の手法によって合成した¹³。FMISO (25.2 mg) を 2.5 mL メタノールに溶解し、0.125 mL 濃塩酸を添加した。90 °C に昇温した後、500 mg 鉄

(100 mesh) を添加し 30 分間還流した。還元反応の進行はニンヒドリン反応により確認した。反応溶液を濾過し、島津社製 LC-20AD system による逆相 HPLC で精製することにより、amino-FMISO (9.4 mg, 44.5%) を得た。クロマトグラフィー用カラムには Waters 社製 Atlantis T3 column (250×10 mm i.d., 5 μm) を用いた。移動相には 5 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 (A 液) 及びアセトニトリル (B 液) を用いて、amino-FMISO は流速 4 mL/min, 20 分間 B 液濃度 1–95% のグラジエントで溶出させた。

^1H NMR (DMSO- D_6) δ 6.85 (s, 1H), 6.79 (s, 2H), 6.71 (s, 1H), 5.57 (d, 1H, $J=4.6$), 4.42–4.26 (m, 2H), 3.89–3.85 (m, 2H), 3.78–3.72 (m, 2H): HRMS (m/z) (ESI, pos): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}$ 160.08807; found, 160.08765.

担癌モデルマウス

動物実験は、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に則り実施した。日本エスエルシー株式会社より購入した 9 週齢の Balb/c *nu/nu* 雄性マウスを温度および湿度を一定に制御した飼育環境下、12 時間の照明周期で飼育した。餌と水は自由に摂取させた。Balb/c *nu/nu* 雄性マウスの右側腹部 (皮下) に、イソフルラン麻酔下、American Type Culture Collection (ATCC) 社から購入した FaDu ヒト頭頸部癌細胞を 5×10^6 移植した (FaDu 腫瘍マウス)。移植 2 週間後に実験に用いた。

動物実験

高分子への共有結合割合評価および radio-HPLC 評価群においては、 ^{18}F -FMISO (270–430 MBq) を FaDu 腫瘍マウス尾静脈より投与し、4 時間後に腫瘍を摘出した。

IMS および ARG 群においては、ジメチルアセトアミド/生理食塩水 (1:3) に溶解させた ^{18}F -FMISO (270–430 MBq) および ^{19}F -FMISO (550 mg/kg) を FaDu 腫瘍マウス尾静脈より投与し、2 時間後に pimonidazole (100 mg/kg) を尾静脈より投与した。FMISO 投与 4 時間後に腫瘍を摘出し、Leica Microsystems 社製 CM3050-Cryostat を用いて、腫瘍切片を厚さ 10 μm で作製した。体内分布実験群においては、FMISO 投与 2 および 4 時間後に、血液、心臓、肝臓、腎臓、筋肉および骨を摘出し、それぞれの重量を測定した後、ガンマカウンタ (PerkinElmer, Inc. 社製 Wizard 3[™] 1480 Automatic Gamma Counter) を用いて放射能を測定した。

FMISO の高分子への共有結合割合評価

摘出した腫瘍の重量を測定し、その 4 倍量の protease inhibitor cocktail 含有 PBS を加え、株式会社トミー精工社製 Micro Smash を用いてホモジナイズした。メタノールにより 2 回抽出し、上清および沈殿中放射能を測定し、それぞれ低分子画分および高分子への共有結合画分とした。

radio-HPLC

濃縮した腫瘍ホモジネート上清 10 μ L を HPLC システムに注入した。クロマトグラフィー用カラムには Waters 社製 XBridge C18 column (150 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m) および Waters 社製 Atlantis HILIC column (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μ m) を用いた。XBridge C18 column においては、移動相には 5 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 (A 液) およびアセトニトリル (B 液) を用いて、流速 1 mL/min, 20 分間 B 液濃度 1–95% のグラジエントで溶出させた。Atlantis HILIC column においては、5 mM ギ酸アンモニウム水溶液 (A 液) およびアセトニトリル/ギ酸アンモニウム水溶液 (95:5) (B 液) を用いて、流速 1 mL/min, 20 分間 B 液濃度 90–50% のグラジエントで溶出させた。溶出液を 0.5 分ごとに回収し、各フラクション中の放射能を測定した。

ARG

^{18}F 標識 FMISO の ARG 画像を得るために、Fuji Photo Film 社製 Fuji BAS-SR イメージングプレートに 12 時間露光させ、Fuji Photo Film 社製 FLA7000 Bio-Imaging Analyzer 及び Multi Gauge V3.2 ソフトウェアを用いて画像解析した¹⁴。FMISO 共有結合画分由来の放射能を評価するため、連続切片をエタノールおよび Tris Buffered Saline (TBS) によりそれぞれ 1 回および 3 回洗浄し、エタノールに 3 分間浸漬させることにより、低分子画分を除去した。切片を乾燥させた後、同様の方法で ARG 画像を取得した。

Pimonidazole 免疫組織染色

武藤化学株式会社製イムノコートスライドグラスに腫瘍組織切片を載せた。組織切片を 0.3% 過酸化水素水を用いて 10 分間ブロッキング処理した後、一次抗体 (HPI Inc. 社製 Hypoxyprobe-1 MAb1) と 37 $^{\circ}\text{C}$ にて 30 分間反応した。その後、二次抗体

(biotin-conjugated F(ab')₂) を添加して 37 °C , 15 分反応した後 , 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride を添加して pimonidazole 存在領域を発色させた.

IMS 測定用試料の調製

腫瘍組織切片を ITO コートスライドガラスに載せた後, 測定まで-20°C で保存した. 測定の前に, 切片を真空デシケータ内, 室温で 15 分間乾燥させ, セイコーエプソン株式会社製 GT-X820 を用いて光学画像を得た. MALDI 用マトリクス溶液として, DHB を 0.2% TFA 含水/メタノール (1:1) に 30 mg/mL もしくは 0.2% TFA 含水/メタノール (17:3) に 20 mg/mL で溶解させた. 調製したマトリクス溶液は, Bruker Daltonics 社製 ImagePrep™を用いて切片に塗布した.

IMS 測定

腫瘍組織切片の測定には, MALDI イオン源搭載フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FTICR) 型質量分析計である, Bruker Daltonics 社製 7T Bruker solariX XR を用いた. レーザーには SmartBeam II UV laser を用い, エネルギーは 40%, 照射間隔は 150 μm に設定した. イオン化はポジティブイオンモードによって行った. 得られた質量スペクトルデータは, Bruker Daltonics 社製 fleximaging ソフトウェアを用いて画像データに変換した. FMISO は [M+H]⁺イオン (*m/z* 190) のプロダクトイオンスキャンを行った. 衝突エネルギーは規定値の 10%に設定した. 組織切片から検出した *m/z* 174.0673 をプロダクトイオンとして選択し, FMISO 溶液からも同様に検出されることを確認した.

LC/MS/MS 測定

プロダクトイオンスペクトル取得のために, LC/MS システムには Thermo Fisher Scientific Inc.社製 UltiMate 3000 HPLC system と Thermo Fisher Scientific Inc.社製四重極オービトラップ型質量分析計 Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap を用いた. クロマトグラフィー用カラムには株式会社ワイエムシー製 YMC-Triart C18 column (50×2 mm i.d., 1.7 μm) を用いた. 移動相には 5 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 (A 液) およびアセトニトリル (B 液) を用いて, 流速 0.5 mL/min, 20 分間 B 1-95%のグラジエントで溶出させ, 質量分析計に導入した. 塩野義製薬から提供された

amino-FMISO-GS 溶液を標準物質として用いた。腫瘍ホモジネート中濃度測定のためには、Waters 社製 Acquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC) システムと AB Sciex 社製三連四重極型質量分析計 API 5000™ を使用した。クロマトグラフィー用カラムには YMC-Triart C18 column (50×2 mm i.d., 1.7 μm) を用いた。移動相には 15 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 (A 液) およびアセトニトリル (B 液) を用いて、流速 0.5 mL/min, 3 分間 B 1–95% のグラジエントで溶出させ、質量分析計に導入した。イオン化はエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) のポジティブイオンモードによって行った。

結果

体内分布

¹⁸F-FMISO の FaDu 腫瘍マウスにおける体内分布実験について、図 2 に結果を示した。腫瘍は血液および筋肉と比較して高い放射能集積を示した。腫瘍血液比は投与 2 時間後に 1.43 ± 0.50 , 4 時間後に 1.32 ± 0.12 であった。腫瘍筋肉比は投与 2 時間後に 1.31 ± 0.52 , 4 時間後には 1.12 ± 0.30 であった。

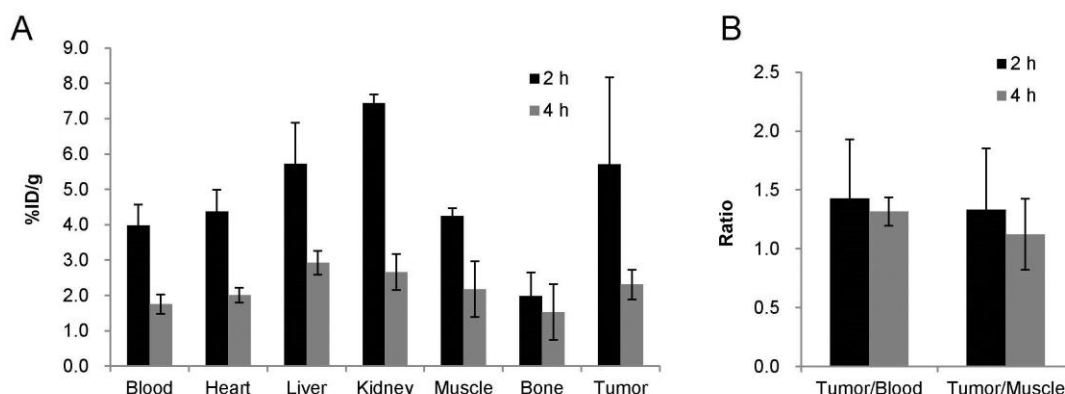


図 2.

投与 2 および 4 時間後の FaDu 腫瘍マウスにおける ^{18}F -FMISO の体内分布. 結果は平均値 $\pm$ 標準偏差 ($n=3-4$) で示す.

A: ^{18}F -FMISO 投与後組織における放射能集積量. 値は% injected dose (ID)/組織重量 (g) で示す.

B: ^{18}F -FMISO の腫瘍血液比および腫瘍筋肉比.

腫瘍内 FMISO の代謝物分析

生体内高分子に対する共有結合画分および低分子画分の割合はメタノール抽出により評価した (図 3A). 全放射能に対する遠心後沈殿および上清中放射能割合を高分子共有結合割合および低分子画分の割合としたところ, 腫瘍組織における高分子画分の放射能存在割合は $32.2 \pm 4.0\%$ であった. また radio-HPLC により低分子画分における ^{18}F -FMISO 由来成分を分析したところ, FMISO およびニトロ基が還元された amino-FMISO に加え, 未知の化学形態を有する画分を検出した (図 3B). 低分子画分に対する FMISO および amino-FMISO 割合は, それぞれ約 20%, 約 5%と低かったことから, ^{18}F -FMISO 投与マウス腫瘍組織の ARG にはこれら 2 分子の寄与は低いと考えられる. 一方, 未知の化学形態を有する画分は約 45%と高い割合で検出した.

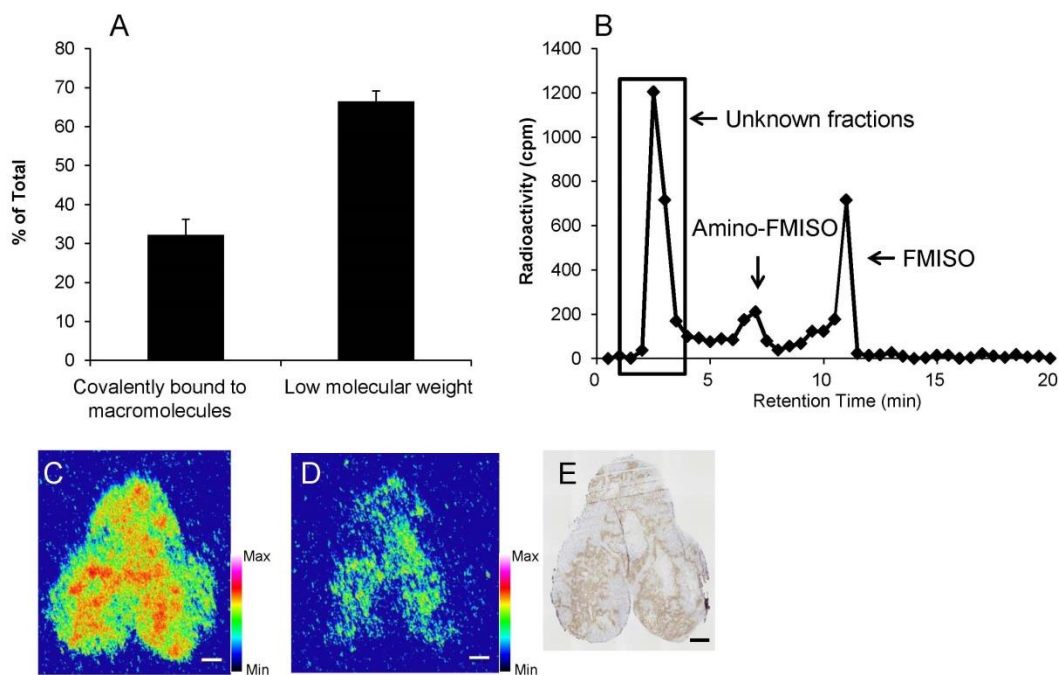


図 3.

^{18}F -FMISO 投与マウスの放射能分布.

A: ^{18}F -FMISO 由来放射能の生体内高分子への共有結合画分および低分子画分の割合. 結果は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示す.

B: FMISO 低分子画分の radio-HPLC クロマトグラム.

C, D: 腫瘍組織の ARG. C は溶媒洗浄なし, D は溶媒洗浄した腫瘍組織切片の画像. スケールバー = 1 mm.

E: Pimonidazole 免疫組織染色画像. スケールバー = 1 mm.

^{18}F -FMISO 投与マウス腫瘍組織における放射能分布

高分子共有結合画分の分布を評価するために, 溶媒洗浄後の ^{18}F -FMISO 投与マウス腫瘍組織の ARG を実施した (図 3C, D). 洗浄後の放射能分布は洗浄なしと同様の分布を示したものの, 強度は著しく低下した.

^{18}F -FMISO 投与マウス腫瘍組織における FMISO およびその代謝物の分布

FMISO および amino-FMISO の分布を評価するために, 超高質量分解能を有する FTICR-MS を使用した IMS 測定を実施した. FMISO (図 4A) および amino-FMISO

(図 4B) は腫瘍内に均一な分布を示し, ARG (図 4C) および pimonidazole 免疫組織染色 (図 4D) により得られた局在とは一致しなかった. また, FMISO の還元中間体と一致する m/z (nitroso-FMISO: 174.067 (図 5A), hydroxylamino-FMISO: 176.083 (図 5B)) のピークも併せて検出した (構造は図 1 参照). これらの代謝物は, FMISO から amino-FMISO に還元される過程の中間体である. FMISO (図 4A) および amino-FMISO (図 4B) と同様, これらの還元中間体 (図 5A, B) も腫瘍内に均一に分布し, ARG (図 4C) および pimonidazole 免疫組織染色 (図 4D) の局在とは一致しなかった. そこで FMISO 投与による腫瘍内低分子の変動分子を検索したところ, ARG (図 4C) および pimonidazole 免疫組織染色 (図 4D) と分布が一致する m/z 465.157 の分子を見出した (図 5C). 本未知分子の化学形態を推定するために, 超高質量分解能 FTICR-MS を利用した組成解析を実施した (図 6B). 精密質量および同位体パターンが標準物質と一致したことから, 本未知分子は amino-FMISO のグルタチオン抱合体 (amino-FMISO-GS) であると推定された. そこで, 腫瘍中における amino-FMISO-GS の生成を確認するために, LC/MS/MS 分析を実施した (図 6C). Amino-FMISO-GS の構造式とフラグメンテーションパターンを図 6A に示す. 標準物質と一致するプロダクトイオンを複数検出したことから, 腫瘍中に見出した未知分子は低分子代謝物である amino-FMISO-GS であると同定した¹⁵. 次に LC/MS/MS を用いて, 低分子画分中における FMISO および amino-FMISO の定量解析および amino-FMISO-GS の半定量解析を実施した (図 7). FMISO および amino-FMISO 存在量は, 低分子画分中放射能と同様, 投与 2 時間後から 4 時間後で低下したのに対して, amino-FMISO-GS のイオン強度は増加が認められた. 次に, radio-HPLC により低分子画分における FMISO および amino-FMISO-GS 割合を評価したところ, 低分子画分に対する FMISO の割合は約 20%と低かった. 一方, amino-FMISO-GS は約 50%と高い割合で検出され, ¹⁸F-FMISO 由来成分分析時に検出した, 未知の化学形態を有する画分との割合の一致が認められた (図 8).

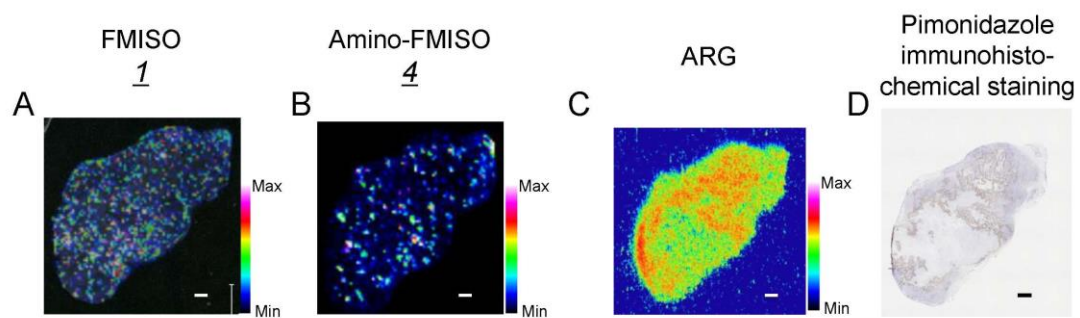


図 4.

^{18}F -FMISO 投与 4 時間後のマウスにおける FMISO および amino-FMISO の IMS 画像, ARG および pimonidazole 免疫組織染色画像. スケールバー = 1 mm.

A: m/z : 190 $\rightarrow$ m/z :174.0673 の IMS 画像 (FMISO (1)).

B: m/z : 160.088 の IMS 画像 (amino-FMISO (4)).

C: ARG (全放射能).

D: Pimonidazole 免疫組織染色画像.

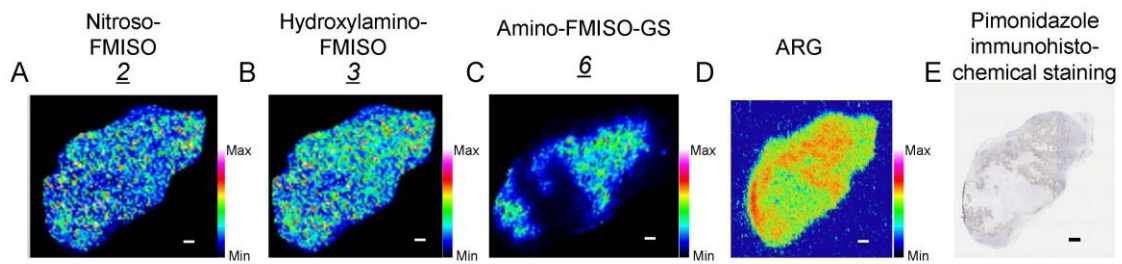


図 5.

^{18}F -FMISO 投与 4 時間後のマウスにおける FMISO 低分子代謝物の IMS 画像, ARG および pimonidazole 免疫組織染色画像. スケールバー = 1 mm.

A: m/z: 174.067 の IMS 画像 (nitroso-FMISO (2), FMISO の還元中間体 (図 1 参照)).

B: m/z: 176.083 の IMS 画像 (hydroxylamino-FMISO (3), FMISO の還元中間体 (図 1 参照)).

C: m/z: 465.157 の IMS 画像 (amino-FMISO-GS (6)).

D: ARG (全放射能).

E: Pimonidazole 免疫組織染色画像.

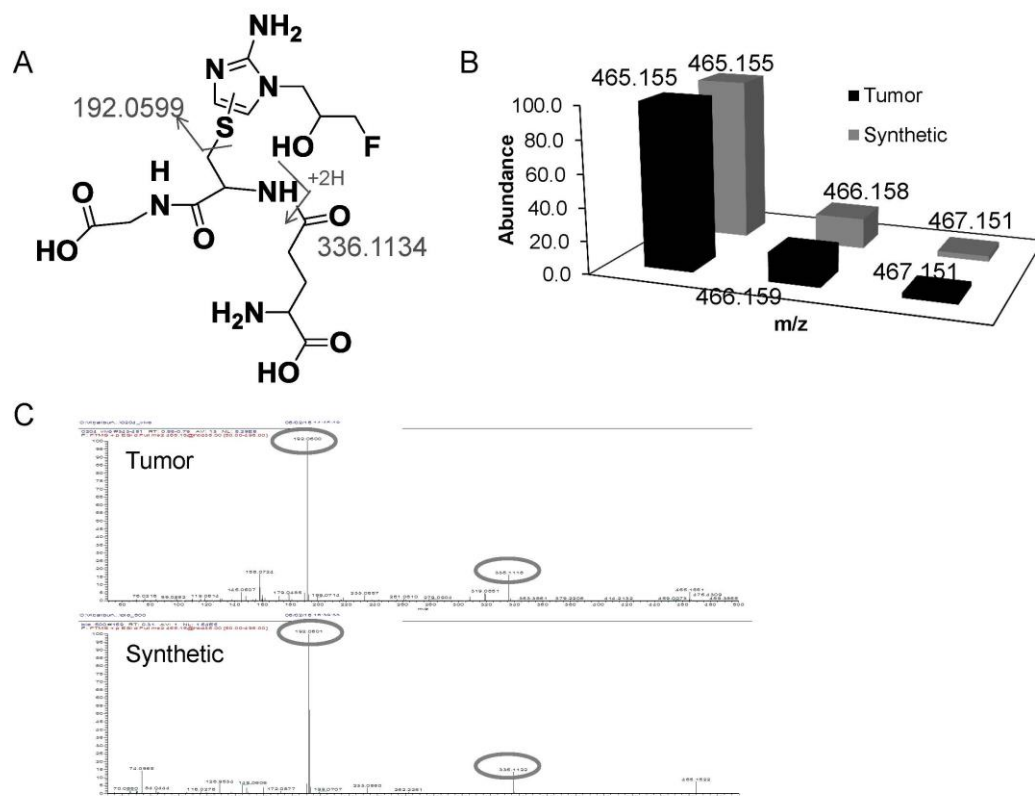


図 6.
組成解析および MS/MS 解析によるマウス腫瘍中における amino-FMISO-GS のバリデーション.

A: Amino-FMISO-GS の構造式と予測 MS/MS フラグメンテーションパターン.
B: 標準物質およびマウス腫瘍中から得られた amino-FMISO-GS の同位体パターン.
C: MS/MS 解析によるマウス腫瘍中における m/z: 465.157 のフラグメンテーションパターン.

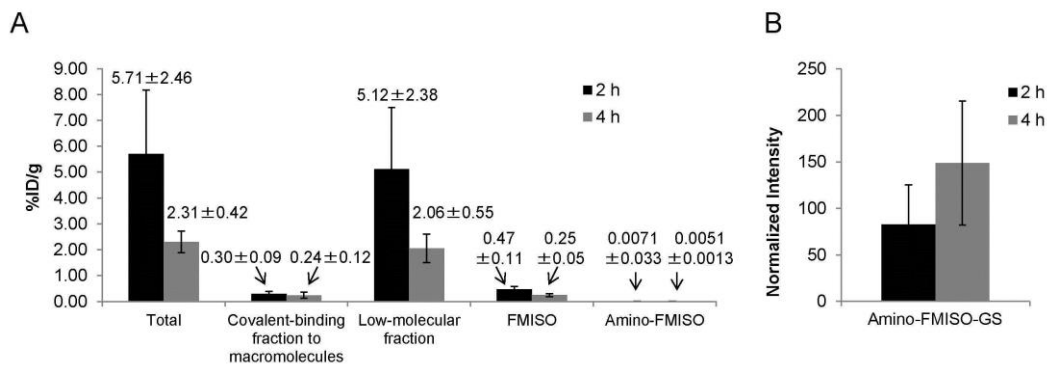


図 7.

¹⁸F-FMISO 投与 2 および 4 時間後の FaDu 腫瘍マウスにおける全放射能, FMISO および FMISO 代謝物の割合. 結果は平均値 ± 標準偏差 (n=3-4) で示す.

A: 腫瘍中における全放射能, FMISO および FMISO 代謝物の集積量. 値は% injected dose (ID)/腫瘍重量 (g) で示す.

B: 腫瘍中における amino-FMISO-GS の相対集積量. 値は信号強度を投与量で補正した相対強度として示す.

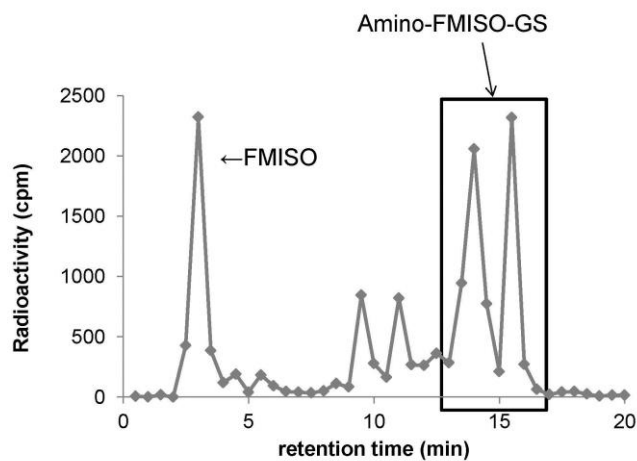


図 8.

FMISO 低分子画分の radio-HPLC クロマトグラム. FMISO 未変化体および amino-FMISO-GS の割合.

考察

本章では、腫瘍中 ^{18}F -FMISO 由来放射能の大半が低分子として存在し、その低分子の分布が ARG 法にて同定した腫瘍内放射能分布に大きく寄与することを見出した。また、IMS を用いて、低分子代謝物であるグルタチオン抱合体が FMISO の腫瘍内低酸素領域への集積に大きく関与することを明らかにした。

腫瘍中 ^{18}F -FMISO 由来化合物を評価するため、溶媒抽出および radio-HPLC 分析を実施したところ、 ^{18}F -FMISO 由来放射能の多くが低分子として存在することを見出した (図 3A)。しかし、FMISO 未変化体および従来想定されてきた代謝物である amino-FMISO (構造は図 1 参照) の存在量は少なく、腫瘍内に存在する放射能の大半は未知の化学形態で存在することを示した (図 3B)。さらに、FMISO 投与マウス腫瘍を親水性溶媒により洗浄した後、ARG を実施したところ、組織内の放射能集積量が低下した (図 3C, D)。これは、 ^{18}F -FMISO 由来低分子化合物は極性が高いため、PBS やエタノールのような溶媒により容易に除去され、洗浄後の ARG 画像は生体内高分子への共有結合画分の分布を示すと考えられる。洗浄後の ARG は、洗浄前の ARG および pimonidazole 免疫組織染色陽性領域 (図 3E) と局在の一致が認められたことから、これまでの通説通り、生体内高分子への共有結合が ^{18}F -FMISO 由来放射能の腫瘍内低酸素領域への分布に関与していることが示された。しかし、放射能の大半が洗浄操作により消失したことは、腫瘍中放射能分布には ^{18}F -FMISO 由来低分子化合物が大きく寄与することを示している。本結果は腫瘍中 ^{18}F -FMISO 由来放射能の多くが低分子として存在するという知見とも一致する。加えて、radio-HPLC 分析により、腫瘍中放射能の多くが化学形態未知の画分として検出されたことから、ARG により得られた画像はこの未知の低分子化合物の分布を反映していることが示唆された。

IMS を用いた FMISO 代謝物の分布評価において、FMISO, amino-FMISO および還元中間体 (構造は図 1 参照) は腫瘍内に均一に分布し、ARG および pimonidazole 免疫組織染色の分布パターンとは一致しないことを示した (図 4-5)。この結果は、FMISO および予測した代謝物は腫瘍内低酸素領域には分布せず、ARG により同定した ^{18}F -FMISO 由来放射能分布には寄与していないことを意味する。したがって、ARG で検出された分布パターンに寄与する分子が他に存在すると考え、その分子の化学形態を同定するために IMS を用いた FMISO 投与による変動分子の探索を実施した。FMISO 投与/非投与群の腫瘍組織切片のマススペクトルを比較した結果、

amino-FMISO のグルタチオン抱合体 (amino-FMISO-GS) が ARG の放射能分布とよく一致することを見出した (図 5).

グルタチオンは哺乳類に普遍的に存在するトリペプチドであり, 通常は還元型である GSH として存在するが, 酸化ストレス等の刺激により 2 量体である GSSG に酸化される. グルタチオンのうち, GSH は低分子化合物と結合してグルタチオン抱合体を形成し, 化合物の極性を上げる能力を有する.

Amino-FMISO-GS の腫瘍中における生成量は, FMISO, amino-FMISO および低分子画分とは対照的に, 経時的な増加が認められた (図 7). したがって, グルタチオンとの抱合により化合物の極性が高まって細胞膜透過性が低下したため低酸素細胞内に滞留しやすくなり, amino-FMISO-GS が経時的に腫瘍内低酸素領域に集積している可能性が示唆される (図 7). また LC/MS/MS 分析において, amino-FMISO 生成量はわずかであったことから, hydroxylamino-FMISO から amino-FMISO への変換速度は, 生体内高分子への共有結合および amino-FMISO-GS 生成速度と比較して低いことが示唆される¹⁶. 加えて, radio-HPLC 分析により, 腫瘍中放射能の多くが amino-FMISO-GS として検出されたことから, ARG により得られた画像は amino-FMISO-GS の分布を反映していることが示唆された.

2-nitroimidazole 系化合物の生体内高分子への共有結合のメカニズムは, 2-nitroimidazole 環のニトロ基が低酸素環境下で還元された後, 生体内高分子のチオール基に結合することであると想定されている (図 9)¹⁷. グルタチオン抱合体の構造も, GSH のチオール基と FMISO の 2-nitroimidazole 環が結合した構造であることを LC/MS を用いて確認した (図 6). したがって, FMISO とグルタチオンとの結合は, 2-nitroimidazole 系化合物と生体内高分子との共有結合と同様のメカニズムであることが示された.

また, 創薬研究においては, グルタチオン抱合体生成能と生体内高分子への共有結合能には関連があると考えられている¹⁸. 生体内高分子と共有結合することで毒性を発現するとされる反応性代謝物のスクリーニング法として, グルタチオントラッピング試験が慣例的に実施されている¹⁵. したがって, FMISO 等の 2-nitroimidazole 系化合物は, 腫瘍内低酸素領域において反応性の高い中間体を経て, 高分子結合体を形成するのに加えて, グルタチオン抱合体へと代謝されることが考えられる.

FMISO の腫瘍内低酸素領域への集積メカニズムについて, これまでさまざまな報告がなされてきたが^{3, 19-21}, 従来の核医学イメージング法では個々の化学形態ごとの

分布を評価することができないため、低酸素領域の可視化に寄与する FMISO 由来分子の同定には至っていない。そこで本研究では、この問題を解決するために、分子量に基づいてそれぞれの分子の分布を評価することが可能な IMS を利用した。しかし従来の IMS では、夾雑物の多い組織サンプルから特定分子の分布を抽出するためには予め対象分子の構造情報を必要としていたために、既知化合物のイメージングにのみ用いられてきた²²。一方本研究では、標準物質がない場合でもマスペクトルから分子式を得るためのミリマス測定が可能な超高質量分解能を有する FTICR-MS を用いることにより、amino-FMISO-GS を ¹⁸F-FMISO-ARG 画像に大きく寄与する代謝物として同定することができた^{23,24}。

低酸素を標的とした化合物の多くは 2-nitroimidazole 骨格を有する⁴。したがって、amino-FMISO-GS が腫瘍内低酸素領域に集積するという今回の新知見は、FMISO のみにとどまらずその他の 2-nitroimidazole 系イメージング剤の集積メカニズム解明に有用であると考えられ、低酸素を標的とする化合物の最適化や今後の研究開発に貢献する。

以上の結果より第 1 章において、PET 用低酸素イメージング剤である FMISO の腫瘍内低酸素領域への集積には、生体内高分子への共有結合に加えて、FMISO 低分子代謝物が大きく寄与することを初めて明らかにした。

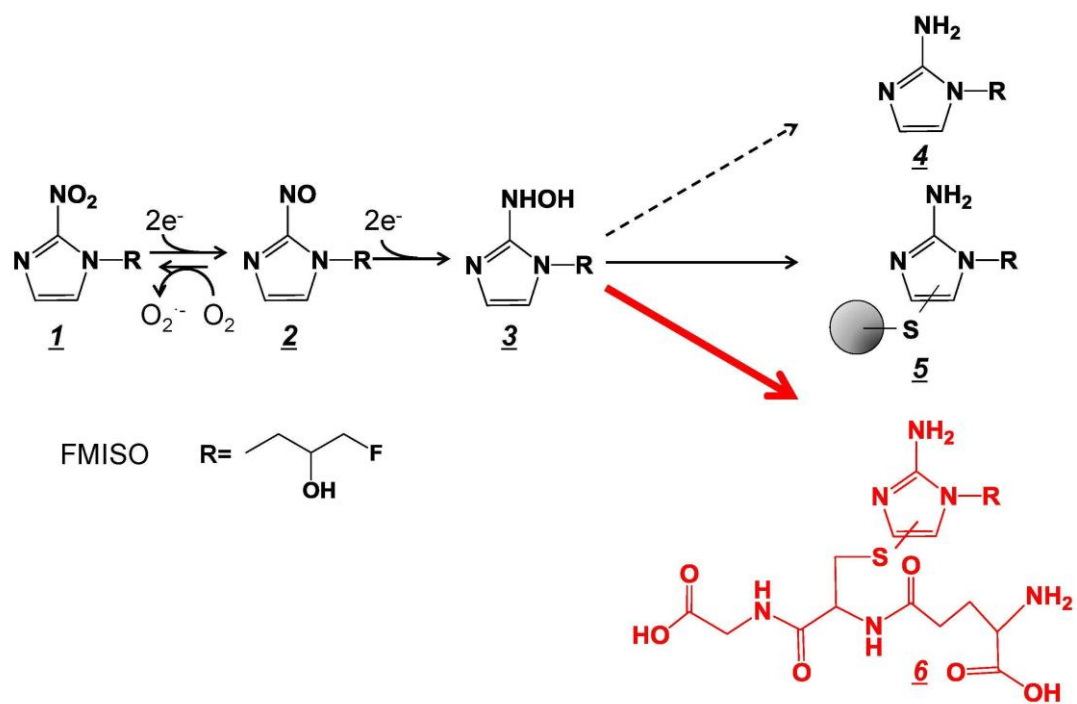


図 9.

本章で得られた知見から示唆された FMISO の腫瘍内低酸素領域における代謝および集積メカニズム。

第 2 章

IMS による低酸素イメージング剤“Pimonidazole”の 腫瘍内集積機序の解明

緒言

第 1 章では, FMISO がグルタチオン抱合体を形成し腫瘍内低酸素領域に集積することを見出した. 本機構の普遍性を検証するために, 第 2 章では, FMISO と同様 2-nitroimidazole 構造を有する pimonidazole を用いて評価を実施した. Pimonidazole は, 2-nitroimidazole 骨格を有する外因性低酸素マーカーであり, 病理学分野において免疫組織染色により低酸素領域を評価するために広く用いられている. 本章では, IMS を使用して pimonidazole およびその代謝物の腫瘍内低酸素領域における分布を可視化し, その分布を従来の評価法である pimonidazole 免疫組織染色画像と比較した. さらに, pimonidazole の代謝に関与する内因性分子の分布について IMS を用いて評価し, pimonidazole 代謝物の分布と比較した.

実験方法

試薬

GSH は, 和光純薬工業株式会社より購入した. GSSG は, ナカライテスク株式会社より購入した. その他の試薬, 機器は第 1 章と同様の試薬, 機器を使用した.

Glutathione conjugate of amino-pimonidazole (amino-pimo-GS) (6) の合成

Amino-pimo-GS は既報を参考にして合成した^{20, 25}. Pimonidazole (22 mg) を 200 mL 水に溶解し, 55 °C に昇温した後, 塩化アンモニウム (76 mg) および亜鉛 (48 mg) を添加し 2 時間還流した. 反応溶液を濾過した後, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した GSH (618.4 mg/200 mL) を添加し, 37°C で一晩加熱した. 濃縮した反応液を島津製作所製 LC-10AD system による逆相 HPLC で精製することにより, amino-pimo-GS (2.6 mg, 6.5%) を得た. クロマトグラフィー用カラムには Waters 社製 Atlantis T3 column (250×19 mm i.d., 5 µm) を用いた. 移動相には 0.05% TFA 含水/アセトニトリル (97:3) を用いて, 流速 17 mL/min で溶出した.

¹H NMR (D₂O) δ6.98 (s, 1H), 4.46 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 3.82 (d, 2H, J = 8.0), 3.76

(t, 1H, J = 6.0), 3.58 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 3.46 (dd, 1H, J = 14.5, 3.0), 3.32 (dd, 1H, J = 14.5, 7.0), 3.24 (m, 2H), 3.15 (m, 1H), 3.04 (m, 1H), 3.03 (m, 1H), 2.93 (m, 1H), 2.52 (m, 2H), 2.14 (m, 2H), 1.91 (m, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.48 (m, 1H), 1.26 (m, 1H): HRMS (m/z) (ESI, pos): [M+H]⁺ calcd. for C₂₁H₃₅N₇O₇S 530.23914; found, 530.24023.

担癌モデルマウス

第 1 章と同様の方法で FaDu 腫瘍マウスを作製した.

動物実験

Pimonidazole (200 mg/kg) を FaDu 腫瘍マウス尾静脈より投与し, 0.5, 2 および 4 時間後に腫瘍を摘出した. Leica Microsystems 社製 CM3050-Cryostat を用いて, 腫瘍切片を厚さ 10 μm で作製した.

Pimonidazole 免疫組織染色

第 1 章と同様の方法で pimonidazole 免疫組織染色を実施した.

IMS 測定用試料の調製

腫瘍組織切片を ITO コートスライドガラスに載せた後, 測定まで -80°C で保存した. 測定の前に, 切片を真空デシケータ内, 室温で 15 分間乾燥させ, 光学画像を得た. MALDI 用マトリクス溶液として, DHB を 0.2% TFA 含水/メタノール (1:1) に 30 mg/mL で溶解させ, ImagePrep™ を用いて切片に塗布した. Pimonidazole 免疫組織染色画像への低分子代謝物の寄与を評価するため, 連続切片を 50% エタノールおよび 100% エタノールによりそれぞれ 2 回および 1 回洗浄することにより, 低分子画分を除去した. 切片を乾燥させた後, 同様の方法でマトリクス溶液を塗布した.

IMS 測定

腫瘍組織切片の測定には, Bruker Daltonics 社製 7T Bruker solariX XR を用いた. エネルギーは 30-70%, 照射間隔は 125 μm に設定した.

LC/MS 測定

第 1 章と同様の方法で腫瘍ホモジネートの抽出上清を調製した.

LC/MS システムには、島津社製 LC-10AD system と Bruker Daltonics 社製 7T Bruker solarix XR を用いて、Bruker Daltonics 社製 Hystar 4.0 ソフトウェアによって制御した。クロマトグラフィー用カラムには YMC-Triart C18 column (150×4.6 mm i.d., 3 μm) を 40°C で用いた。移動相には 15 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液/アセトニトリル (91:9) を用いて、20 分間流速 1 mL/min で溶出させた。溶出液を 1:5 に分割し、0.2 mL/min を質量分析計に導入した。イオン化は ESI のポジティブイオンモードによって行った。

結果

Pimonidazole およびその代謝物の腫瘍内分布

Pimonidazole およびその代謝物の分布を評価するために IMS 測定を実施した。Pimonidazole および amino-pimonidazole-GS に加えて、amino-pimonidazole および pimonidazole 還元中間体と一致する m/z (amino-pimonidazole: 225.171, nitroso-pimonidazole: 239.150, hydroxylamino-pimonidazole: 241.166) にピークを検出した (構造は図 1 参照) (図 10B–D, H–J, N–P)。Nitroso- および hydroxylamino-pimonidazole は pimonidazole から amino-pimonidazole に還元される過程の中間体と考えられる。Pimonidazole (図 10A, G, M) と同様に、nitroso-, hydroxylamino- および amino-pimonidazole (図 10B–D, H–J, N–P) は腫瘍内に均一に分布し、免疫組織染色陽性領域 (図 10F, L, R) とは一致しなかった。対照的に amino-pimo-GS (図 10E, K, Q) の分布は、pimonidazole 投与 0.5 時間後から免疫組織染色陽性領域との一致が認められた。

Amino-pimo-GS の腫瘍内分布に対する溶媒洗浄の効果を検討するために、pimonidazole 投与マウス腫瘍組織切片の洗浄操作後の IMS 測定を実施したところ、amino-pimo-GS のイオン強度は、洗浄操作により著しく低下した (図 11)。

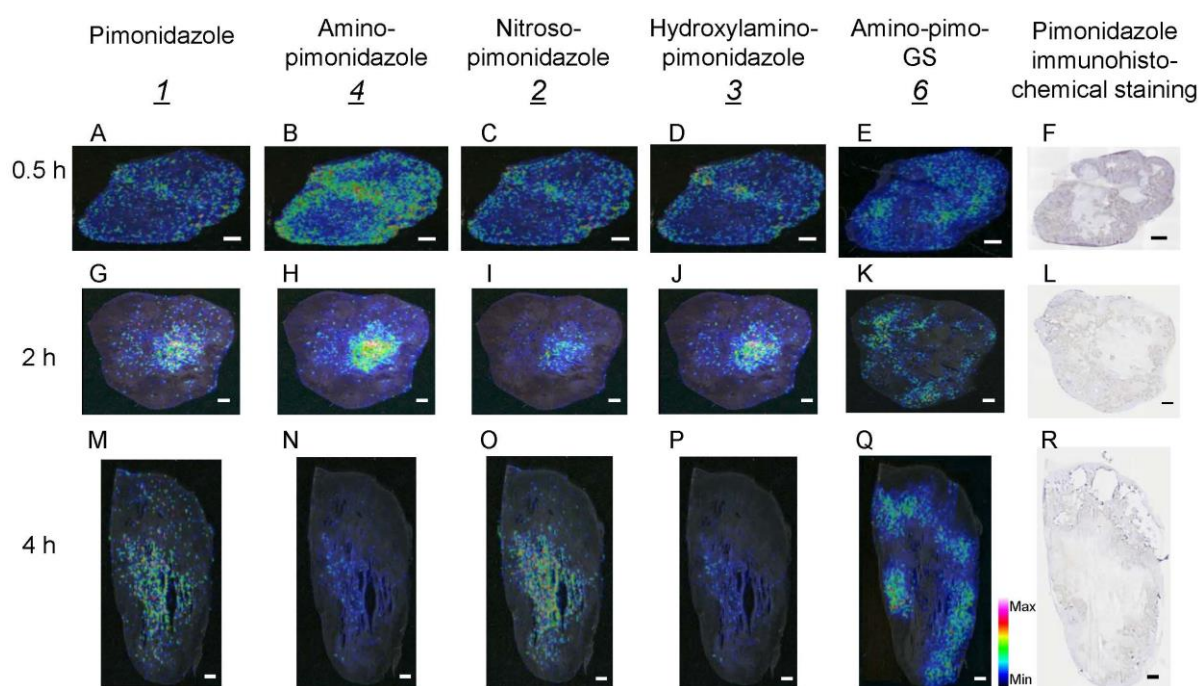


図 10.

Pimonidazole 投与 0.5, 2 および 4 時間後のマウスにおける pimonidazole および pimonidazole 低分子代謝物の IMS 画像および pimonidazole 免疫組織染色画像. スケールバー = 1 mm.

A-F: 投与 0.5 時間後における IMS 画像.

G-L: 投与 2 時間後における IMS 画像.

M-R: 投与 4 時間後における IMS 画像.

A, G, M: m/z : 255.145 の IMS 画像 (pimonidazole (1)).

B, H, N: m/z : 225.171 の IMS 画像 (amino-pimonidazole (4)).

C, I, O: m/z : 239.150 の IMS 画像 (nitroso-pimonidazole (2)).

D, J, P: m/z : 241.166 の IMS 画像 (hydroxylamino-pimonidazole (3)).

E, K, Q: m/z : 530.239 の IMS 画像 (amino-pimo-GS (6)).

H, L, R: Pimonidazole 免疫組織染色画像.

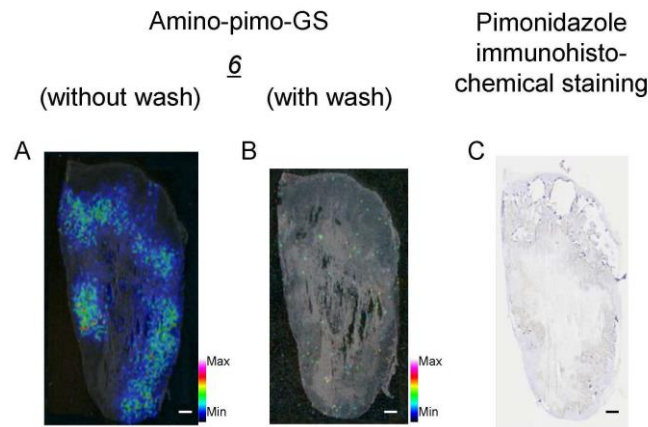


図 11.

マウス腫瘍中における amino-pimo-GS の IMS 画像 (溶媒洗浄あり/なし) および pimonidazole 免疫組織染色画像. 2 枚の IMS 画像は同じ強度のカラーバーで示す.

A, B: m/z: 530.239 の IMS 画像 (amino-pimo-GS (6)). A は溶媒洗浄なし, B は溶媒洗浄した腫瘍組織切片の画像.

C: Pimonidazole 免疫組織染色画像.

グルタチオンの腫瘍内分布

組織切片のマススペクトルから精密質量を利用して GSH および GSSG のピークを特定し, CID フラグメンテーションを利用した構造解析により, 標準物質と一致することを確認した (表 1). IMS を用いて分布を評価したところ, GSH (図 12B) および amino-pimo-GS (図 12A) の分布は投与後早期 (投与 0.5 時間後) では明確な相関は認められなかった一方で, 投与後後期 (投与 4 時間後) には GSH は amino-pimo-GS が分布する領域からは検出されなかった (図 12G, H).

表 1. MS/MS 解析による腫瘍中における GSH および GSSG の同定

	GSH		GSSG	
	m/z	Fragments in MS/MS	m/z	Fragments in MS/MS
Tumor	308.0912	130.0501, 162.0223, 179.0488	613.1583	355.0743, 484.1167
Standard	308.0922	130.0502, 162.0224, 179.0490	613.1591	355.0747, 484.1173

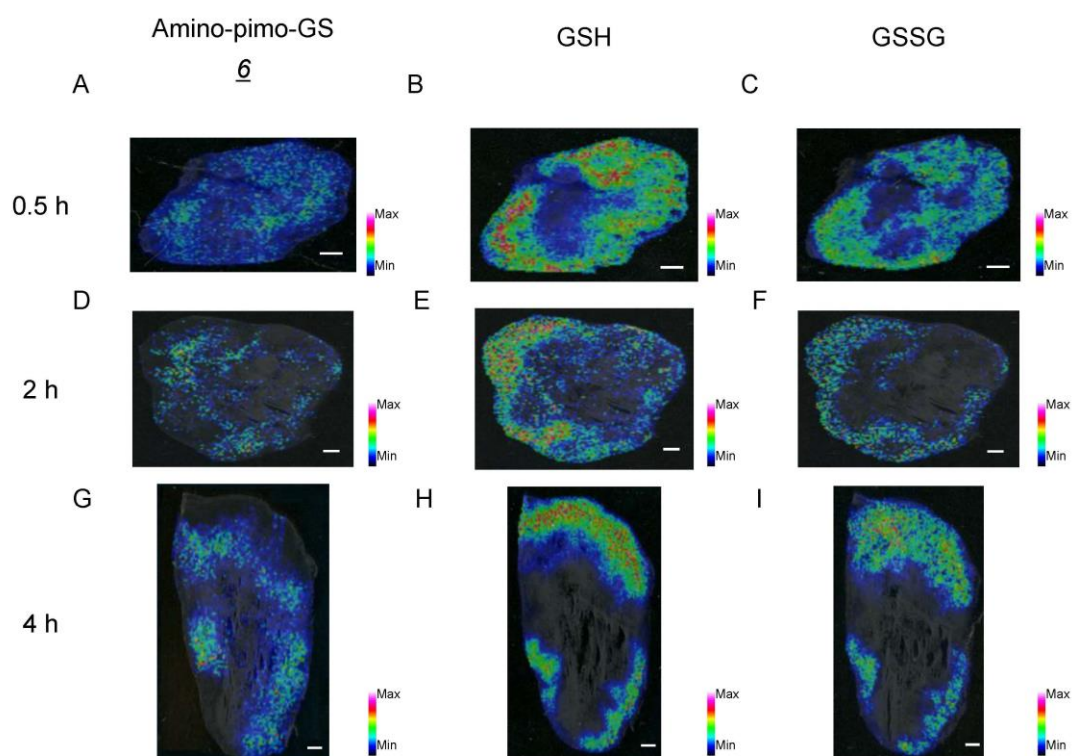


図 12.

マウス腫瘍中における amino-pimo-GS, GSH および GSSG の IMS 画像. スケールバー = 1 mm.

A–C: 投与 0.5 時間後における IMS 画像.

D–F: 投与 2 時間後における IMS 画像.

G–I: 投与 4 時間後における IMS 画像.

A, D, G: m/z : 530.239 の IMS 画像 (amino-pimo-GS (6)).

B, E, H: m/z : 308.091 の IMS 画像 (GSH).

C, F, I: m/z : 613.159 の IMS 画像 (GSSG).

腫瘍中における amino-pimo-GS の同定

LC/MS/MS 分析において, 標準物質と腫瘍ホモジネートサンプルの同位体パターンおよび MS/MS フラグメンテーションパターンの一致が認められたことから, 腫瘍中における amino-pimo -GS の生成が確認された (図 13).

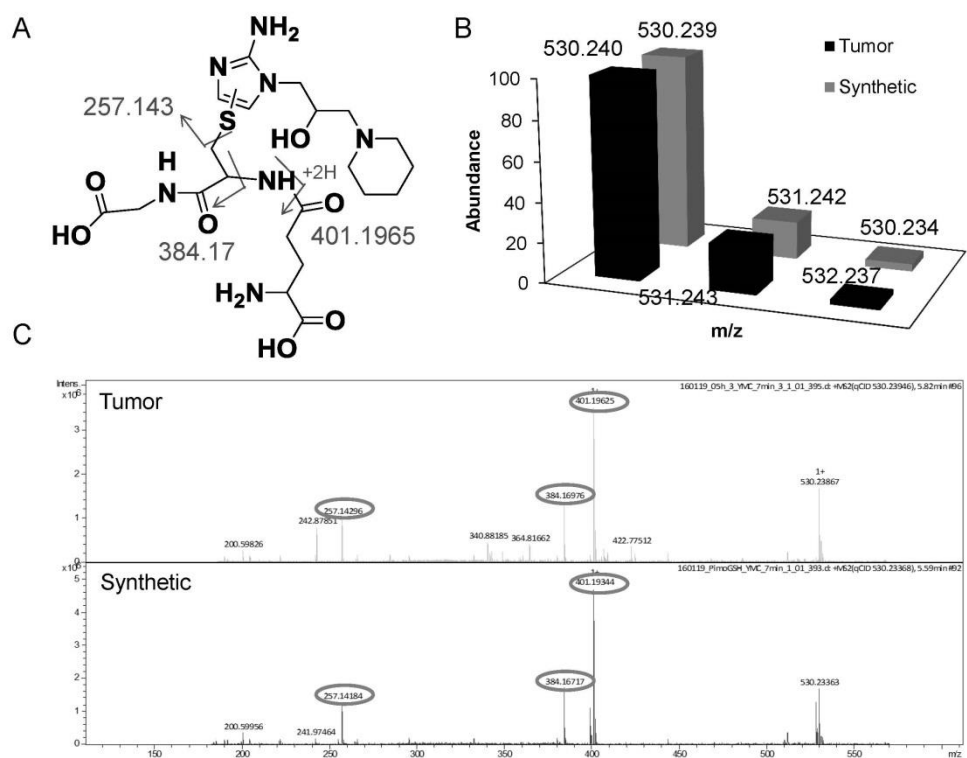


図 13.
組成解析および MS/MS 解析によるマウス腫瘍中における amino-pimo-GS のバリデーション。
A: Amino-pimo-GS の構造式と予測 MS/MS フラグメンテーションパターン。
B: 標準物質およびマウス腫瘍中から得られた amino-pimo-GS の同位体パターン。
C: MS/MS 解析によるマウス腫瘍中における m/z: 530.239 のフラグメンテーションパターン。

考察

Pimonidazole の腫瘍内低酸素領域への集積メカニズムを解析するために、pimonidazole 投与マウス腫瘍組織切片の IMS 分析を実施した結果、amino-pimo-GS (構造は図 13A 参照) の分布パターンは pimonidazole 免疫組織染色により同定した低酸素領域と一致することを見出した (図 10)。

IMS を用いた GSH および GSSG の分布評価において, amino-pimo-GS が分布する腫瘍内領域から GSH が経時的に消失する様子が描出されたことから (図 10), pimonidazole は腫瘍内に移行した後, 腫瘍内においてグルタチオン抱合体を形成していると考えられる. 2-nitroimidazole 系化合物を細胞に添加すると細胞内 GSH が減少するという現象が報告されており²⁶⁻²⁹, 今回の GSH の不均一な腫瘍内分布は amino-pimo-GS 生成領域を反映していると考えられる. さらに前章において, グルタチオン抱合体以外には pimonidazole 免疫組織染色陽性領域と同じ分布を示す代謝物がないことを見出した. 本章における知見と併せると, GSH との抱合反応は, 2-nitroimidazole 骨格を有する低酸素イメージング剤に普遍的に起こる現象であると考えられる.

次に, 免疫組織染色の過程では組織切片は極性溶媒により洗浄されていることを考慮し, pimonidazole 投与マウス腫瘍において, amino-pimo-GS と pimonidazole 共有結合体のどちらが免疫組織染色画像に寄与するかについて, 溶媒洗浄後の IMS 測定により評価した. 溶媒洗浄前後における IMS 画像を比較したところ, amino-pimo-GS のイオン強度は洗浄操作により著しく低下した (図 11). この結果は amino-pimo-GS は極性が高いため, 水やエタノールといった極性溶媒による洗浄で除去されたためであると考えられる. したがって pimonidazole 免疫組織染色陽性領域は, amino-pimo-GS を含む低分子代謝物ではなく, 生体内高分子との共有結合体を描出していることが示唆された. しかし, FMISO は PET を用いて *in vivo* 分布評価をされる化合物であり, 本測定法では洗浄過程が無いことから, 低分子代謝物が放射能分布に寄与する可能性がある. したがって FMISO の場合は, 低分子代謝物の集積が低酸素状態以外の要因を反映している可能性はないのか解析することは, FMISO の PET 画像を考察するために意義が大きいと言える.

また IMS には, 一度の測定で複数分子の分布を評価できる, 特異的な抗体が不要であるなど, 免疫組織染色と比較した場合にメリットが挙げられる. したがって, IMS を用いて amino-pimo-GS の分布を評価することは, pimonidazole を使用した腫瘍内低酸素評価系において魅力的な手法であると言える.

以上第 2 章において, IMS を用いて pimonidazole は還元体のグルタチオン抱合体 (amino-pimo-GS) として腫瘍内低酸素領域に集積することを見出した. 本知見から, 2-nitroimidazole 系化合物全般が腫瘍内低酸素領域において還元されてグルタチオン抱合を受けることを明らかとした.

第 3 章

低酸素イメージング剤 "FMISO" の集積と グルタチオン抱合との関連性評価

諸言

第1章, 第2章では, FMISO および pimonidazole を例に, 2-nitroimidazole 骨格を有する低酸素イメージング剤は, 腫瘍内でグルタチオン抱合体を形成することが低酸素領域への集積に関与することを明らかとした. 本知見は生体内高分子への共有結合により低酸素領域に取り込まれるとする従来の通説とは異なり, FMISO-PET 画像には低分子代謝物であるグルタチオン抱合体が大きく寄与する可能性を示唆している.

またグルタチオン抱合反応は, 反応を触媒する酵素の活性や細胞腫等に影響を受けることが知られている³⁰. 一方 FMISO の放射能集積は, 酸素濃度一定の条件下においても細胞腫により異なることがこれまで報告されている²¹. したがって, FMISO のグルタチオン抱合体形成能が FMISO の低酸素細胞への取り込みを規定している可能性を想定し, 本章では腫瘍細胞種と FMISO 集積量, グルタチオン抱合体生成量およびグルタチオン抱合体形成能との関連性について評価することにより, FMISO の低酸素領域への集積メカニズムについての考察を行った (図 14).

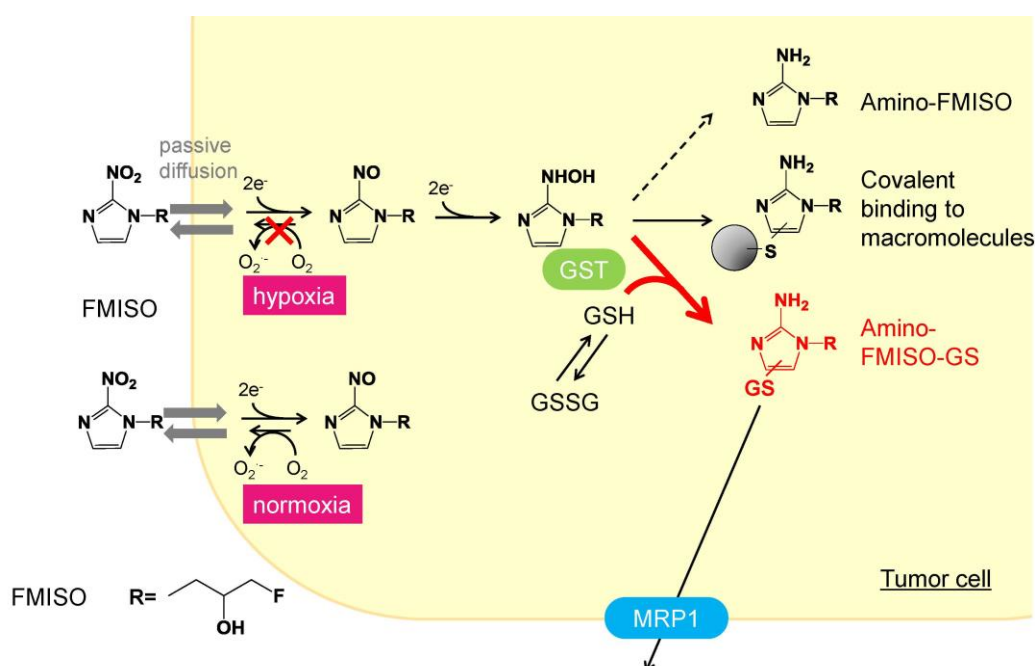


図 14.

本研究で示唆された FMISO の低酸素細胞における還元および集積メカニズム. 細胞中におけるグルタチオン抱合関連因子の発現・活性が FMISO の低酸素環境下細胞への集積に大きく寄与する.

実験方法

試薬

第 1 章および第 2 章と同様の試薬, 機器を使用した. Amino-FMISO-GS は塩野義製薬から提供された.

細胞培養

FaDu, LOVO ヒト結腸癌細胞および T24 ヒト膀胱癌細胞は ATCC 社から購入した. 培養には, FaDu については 10%FBS 含有 EMEM を, LOVO については 10%FBS 含有 Nutrient Mixture F-12 Ham Medium を, T24 については 10%FBS 含有 McCoy's 5A Medium を用いた. それぞれの培地にはペニシリン, ストレプトマイシンを混合し, 細胞は通常酸素条件群は 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 環境下で, 低酸素条件群は低酸素チャンバー (Baker Ruskinn, Ltd.社製 InvivO₂ 300) 内にて $1\%\text{O}_2$ 環境下で培養した.

培養細胞への ^{18}F -FMISO の取り込みの検討

6 well plate に FaDu, LOVO および T24 細胞をそれぞれ 1×10^6 細胞/well になるように播種し, 通常酸素条件下および低酸素条件下で 18 時間培養した. その後, ^{18}F -FMISO (2.5 MBq, 250 nmol/well) を添加してそれぞれ同様の条件下でさらに培養し, 4 時間後に細胞を PBS で 3 回洗浄した. メタノールにより抽出し, 上清および沈殿中放射能を測定し, それぞれ低分子画分および高分子への共有結合画分とした. BCA 法で沈殿中のタンパク定量を行い補正した.

GSH/GSSG-Glo アッセイ

FaDu, LOVO および T24 細胞における GSH および GSSG 量は, Promega 社製 GSH/GSSG-Glo Assay kit を用いて製造業者のプロトコルに従って行った. 細胞を PBS に懸濁させ, 総グルタチオン量測定用および GSSG 量測定用サンプルの 2 つに分けた. GSSG 量測定用サンプルは Luciferin-NT および N-ethylmaleimide 含有 passive lysis buffer と, 総グルタチオン量測定用サンプルは Luciferin-NT 含有 passive lysis buffer と混合した. ライセートに Luciferin Generation Reagent を添加して室温で 30 分放置し, Luciferin Detection Reagent を添加した. ルシフェラーゼ反応による発光シグナルを Tecan 社製 Infinite 200 PRO microplate reader で測定した. サンプルは BCA 法でタンパク定量を行い, 得られた GSH および GSSG 量を総タンパク質濃度で補正した.

GST 活性評価

FaDu, LOVO および T24 細胞における GST 活性は, Sigma-Aldrich 社製 Glutathione S-Transferase Assay Kit を用いて製造業者のプロトコルに従って行った. 細胞を 2 mM EDTA 含有 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させ, 1,000 $\times g$, 4 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間遠心分離した後, 上清を 200 mM GSH および 100 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 含有 PBS と混合した. 反応産物である CDNB のグルタチオン抱合体由来の 340 nm の吸光度を Infinite 200 PRO microplate reader を用いて測定した. 吸光度の増加速度はサンプル中 GST 活性を直接反映している. サンプルの総タンパク質量を BCA 法により測定し補正した.

RNA 抽出およびリアルタイム PCR

FaDu, LOVO, T24 細胞を低酸素チャンバー (InvivoO₂ 300) にて 1%O₂ 環境下で 18 時間培養した. 培養後, Qiagen 社製 RNeasy Mini kit を用いて総 mRNA を抽出した. 逆転写は東洋紡株式会社製 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix とタカラバイオ株式会社製 PCR Thermal Cycler Dice を用いて製造業者のプロトコルに従った. リアルタイム PCR はタカラバイオ株式会社製 SYBR Green Realtime PCR Master Mix と Life Technologies 社製 7500 Real-time PCR system を用いて製造業者のプロトコルに従い実施した. 各 mRNA の発現量は β -actin の発現量で補正した. 本研究でリアルタイム PCR に用いたプライマーを表 2 に示した.

表 2. リアルタイム PCR に用いたプライマー一覧.

Primers	Sequences 5'-3'	Reference
β -actin forward	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	31
β -actin reverse	GGAAATCGTGCGTGACATTA	31
GSTP1 forward	ATGACTATGTGAAGGCACTG	32
GSTP1 reverse	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	32
MRP-1 forward	CCCTGCACTGTCCGTCAC	33
MRP-1 reverse	CTGAGTTCCTGCGTACCTAT	33

統計解析

結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表示した. 統計学的解析は SAS Institute Inc.社製 JMP 11 software を用いて 2 要因の分散分析の後 Tukey-Kramer 検定により行い, $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判断した.

結果

培養細胞への ¹⁸F-FMISO の取り込みの検討

通常酸素条件下における放射能取込量は, いずれの細胞腫とも低く, 同等であった (FaDu; 0.122 ± 0.009 , LOVO; 0.223 ± 0.048 , T24; $0.100 \pm 0.005\%$ dose/mg protein;

図 15). 対照的に低酸素条件下における放射能取込量は, FaDu 細胞において $0.851 \pm 0.009\%$ dose/mg protein に達し, 続いて LOVO 細胞では $0.617 \pm 0.021\%$ dose/mg protein であったのに対して, T24 細胞では $0.167 \pm 0.011\%$ dose/mg protein にとどまった. FMISO の生体内高分子への共有結合割合をメタノール抽出により算出したところ, FaDu 細胞においては $29.77 \pm 0.47\%$, LOVO 細胞においては $36.71 \pm 1.28\%$, T24 細胞においては $47.20 \pm 1.84\%$ であった.

FaDu, LOVO および T24 いずれの細胞腫においても, 細胞内で amino-FMISO-GS が生成していることを, LC/MS を用いて確認した. 各細胞腫における生成量は放射能取込量と同じ順番を示し, FaDu 細胞 (FMISO 高集積細胞) では 0.502 ± 0.035 , LOVO 細胞 (FMISO 中集積細胞) では, 0.158 ± 0.006 , T24 細胞 (FMISO 低集積細胞) では $0.007 \pm 0.001\%$ dose/mg protein であった.

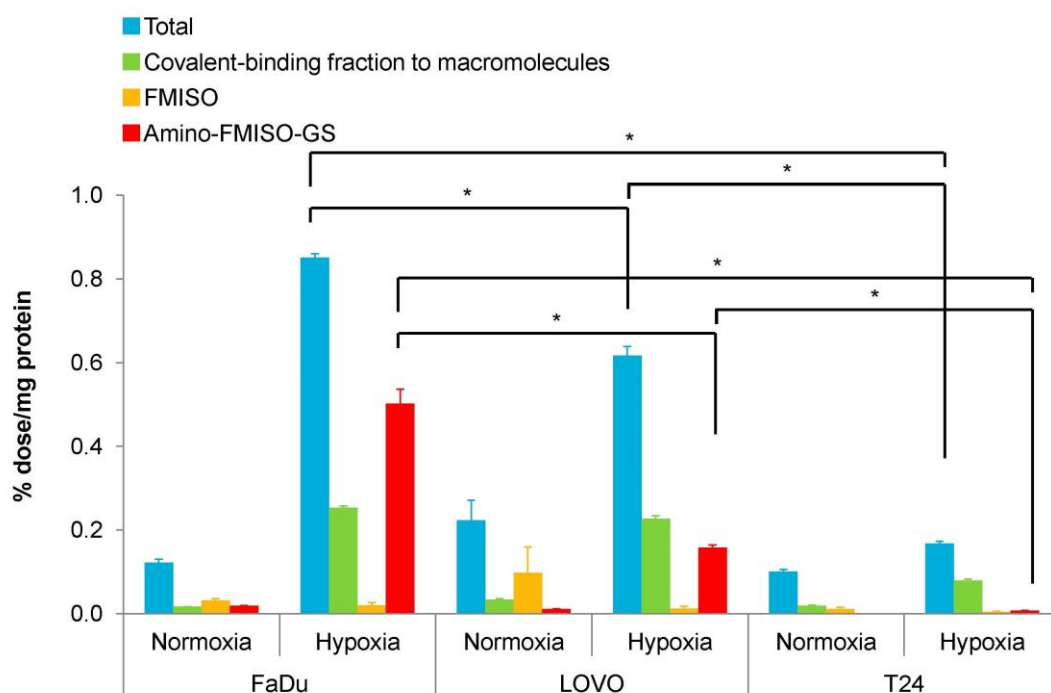


図 15. 通常酸素条件下および低酸素条件下 (1% O₂) にて培養 4 時間後における FMISO の *in vitro* 細胞内取込および代謝. **p*<0.01.

細胞内グルタチオン量および GST 酵素活性評価

FaDu, LOVO および T24 細胞における細胞内グルタチオン量および GST 酵素活性を図 16-17 に示す. いずれの細胞種ともに, 細胞内グルタチオンの大半は, 低分子化合物と結合して極性を高める能力を有する GSH として存在することが明らかとなった. 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 $\Delta\text{OD}_{340}/\text{min}/\text{mg protein}$).

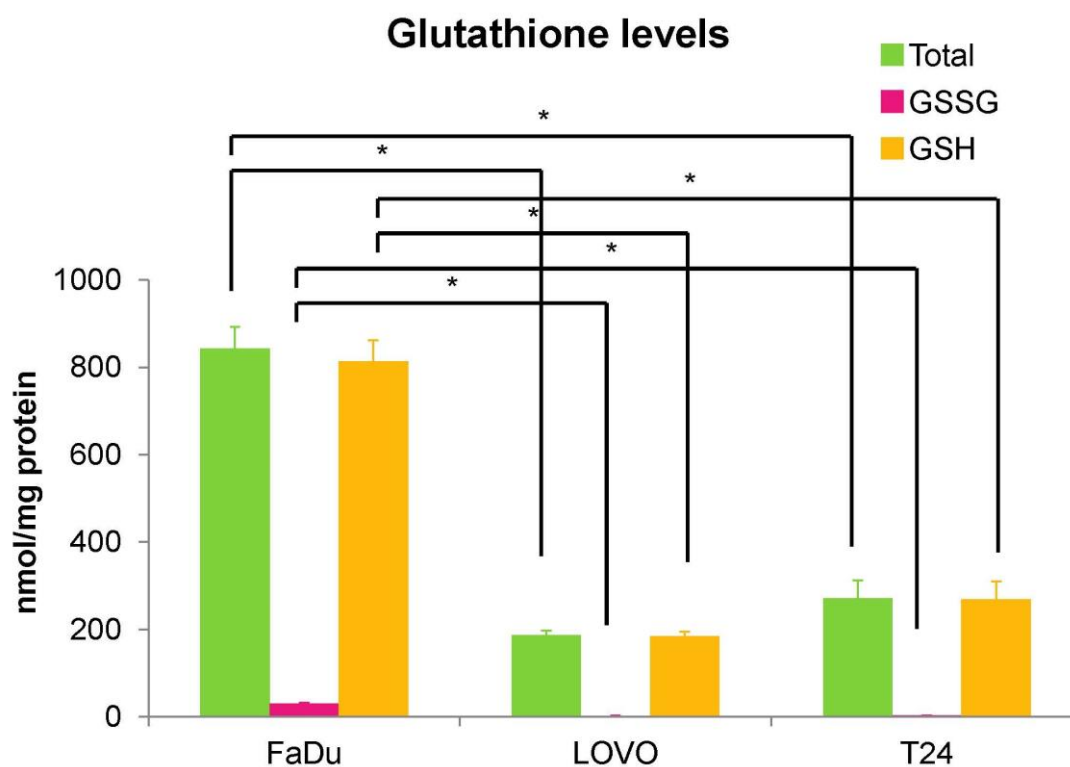


図 16. 低酸素条件下 (1% O_2) にて培養した各がん細胞中のグルタチオン量. * $p < 0.01$.

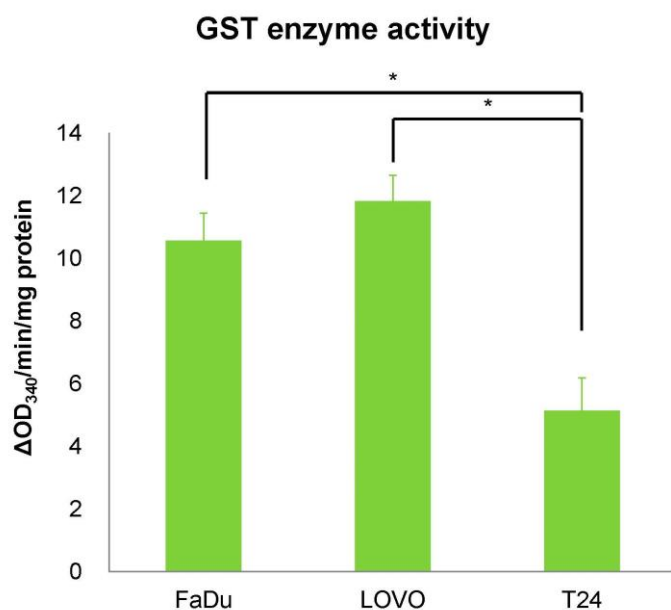


図 17.

低酸素条件下 (1% O₂) にて培養した各がん細胞中の GST 活性. *p<0.01.

グルタチオン抱合関連遺伝子の発現

GST-P1 および多剤耐性関連タンパク質 1 (*MRP-1*) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により評価した (図 18). 各サンプルの mRNA 発現量は, ハウスキーピング遺伝子である β -actin の発現量で補正した. FaDu 細胞において, LOVO 細胞および T24 細胞と比較して有意な *GST-P1* の発現上昇が認められた. また *MRP-1* の発現量は, 放射能取込量と逆の順番を示した (T24>LOVO>FaDu).

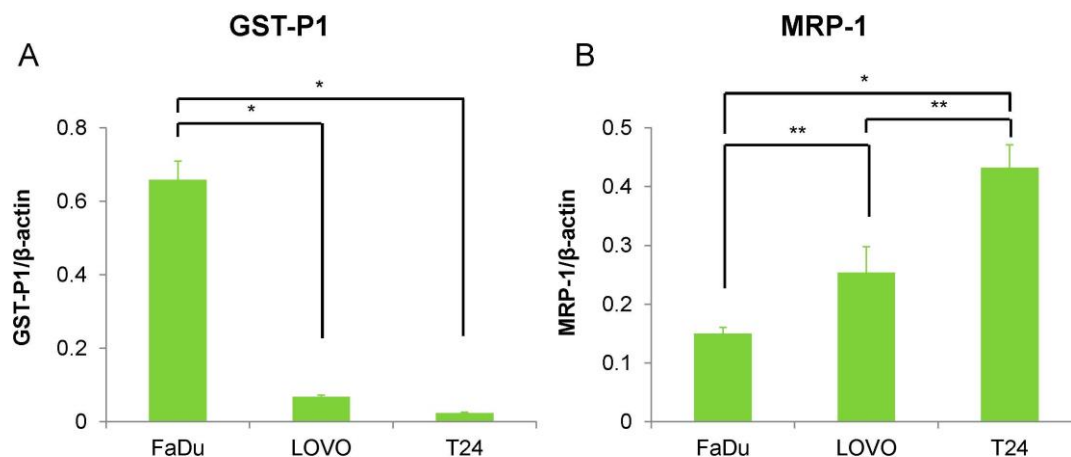


図 18.
低酸素条件下 (1% O_2) にて培養した各がん細胞中の mRNA 発現量の定量 PCR 解析. A: *GST-P1*. B: *MRP-1*. *p<0.01, **p<0.05.

考察

第 1 章において, ^{18}F -FMISO は還元代謝物のグルタチオン抱合体 (amino-FMISO-GS) として腫瘍内低酸素領域に局在を示すことを明らかにした. さらに本章において, グルタチオン抱合体が低酸素培養細胞中における主要代謝物であることを確認した (図 15). しかし, FMISO の細胞内集積, 特に amino-FMISO-GS の生成は低酸素環境にのみに依存するのか, あるいはその他の細胞内因子の影響を受けるのかについては不明であった. そこで, まず放射能取込量の異なる 3 種類の細胞腫 (FaDu 細胞, LOVO 細胞および T24 細胞) を用いて, LC/MS により細胞内 amino-FMISO-GS 量を評価した. ^{18}F -FMISO 集積量は細胞腫によらず, 低酸素環境下では通常酸素環境下と比較して有意に高値を示した (図 15). この結果は ^{18}F -FMISO が低酸素環境下の細胞に特異的に集積するという既報の結果と一致している. さらに, 低酸素状態の FaDu 細胞 (FMISO 高集積細胞) において, amino-FMISO-GS は FMISO 由来化合物の主要要素であったことから, 腫瘍中低酸素細胞に取り込まれた ^{18}F -FMISO の多くは, amino-FMISO-GS として存在することを明らかにした (図 15).

一方, FaDu, LOVO および T24 すべての細胞腫において amino-FMISO-GS の生成が確認されたものの, 同一の低酸素環境下にも関わらず放射能集積量は細胞ごとに異なることを見出した. すなわち, ^{18}F -FMISO 高集積を示す FaDu 細胞において amino-FMISO-GS 生成量が最も高く, 次いで LOVO 細胞が続く, ^{18}F -FMISO の集積量の低い T24 細胞において amino-FMISO-GS 生成量は最も低値を示した (図 15).

同一の低酸素状態下であるにもかかわらず, 3 細胞種間の放射能集積量に相違が認められたことから, FMISO の低酸素細胞への集積には酸素濃度以外のほかの要因の寄与があると仮説を立てた. 低酸素細胞に取り込まれた FMISO は主に amino-FMISO-GS に代謝される. したがって, 3 細胞種間のグルタチオン抱合能が FMISO 集積を規定する要因であると仮定し, 低酸素環境下におけるグルタチオン抱合関連因子を評価した.

GSH のチオール基は GST 類の触媒により, 求電子性化合物と抱合する. GST は変異原性, 発がん作用を有する化合物が引き起こす細胞毒性からの防御機構として重要な役割を果たす酵素であり, 哺乳類においてさまざまな有害化合物の解毒に関与する第 2 相薬物代謝酵素に分類される³⁴. GST ファミリーの中でも, GST π はさまざまながん細胞に最も豊富に存在するアイソザイムであることが知られており, ヒトにおいて GST π を規定するのは GST-P1 遺伝子のみである^{35,36}. したがって, 次に, GSH 量, GST 酵素活性および GST-P1 発現量を FaDu, LOVO および T24 細胞で比較評価した. 低酸素状態下 FaDu 細胞における細胞内 GSH 量は, LOVO および T24 細胞と比較して有意に高値を示した一方で, GSSG はいずれの細胞腫においても非常に微量であった (図 16). この結果は, 反応性グルタチオンである GSH が FMISO 高集積細胞 (FaDu) において豊富に存在することを示している. さらに, FaDu 細胞における GST 活性は LOVO 細胞と同程度であり T24 細胞と比較して有意に高値を示したことは, FaDu および LOVO 細胞ではグルタチオン抱合反応速度が速いことを意味している. これらの結果は, FMISO の細胞内取込量は酸素濃度のみではなく, GSH 量や GST 酵素活性にも影響を受けることを意味していると考えられる.

MRP は ATP 結合カセット (ABC) トランスポーターファミリーであり, ATP 依存的に様々なグルタチオン抱合体を細胞外に排出する. MRP-1 発現は, 抗がん剤であるアルキル化剤 (クロラムブシルなど) の耐性に関与することが報告されている³⁷. また, MRP-1 は, 広い基質特異性を有するグルタチオン抱合体トランスポーターとして知られている³⁸. 3 細胞種における MRP-1 の mRNA 発現量は FMISO 集積量と逆の順

番を示し, T24 細胞 (FMISO 低集積細胞) で最も高く, 次いで LOVO 細胞 (FMISO 中集積細胞), FaDu 細胞 (FMISO 高集積細胞) の順であった (図 18). したがって MRP-1 の発現上昇により amino-FMISO-GS の細胞外排出が促進されることが, ^{18}F -FMISO の取込量低下に寄与していると考えられる. これらの結果から, FaDu 細胞における amino-FMISO-GS の生成亢進と排出低下が FMISO の高集積に寄与していることが示唆される. また 3 細胞腫における FMISO の共有結合割合が細胞内 amino-FMISO-GS 生成量と逆の順番を示し, T24 細胞で最も高く, 次いで LOVO 細胞, FaDu 細胞の順で低下したことは, T24 細胞のようなグルタチオン抱合能が低い細胞種では, グルタチオン抱合体に代謝される代わりに生体内高分子への付加体が形成されたためであると考えられる.

細胞内 GSH 量, 抱合反応過程および MRP を介する排出は, 相乗的に化学療法に対する抵抗性に影響することが報告されている. またグルタチオン抱合を含む第 2 相代謝反応は細胞毒性を示す薬物に対する抵抗性に関与することが知られている^{37, 39, 40}. したがって, FMISO-PET は, 低酸素に加えてグルタチオン抱合能が高い状態 (高 GSH 量, 高 GST 活性および低 MRP-1 発現量) を画像化している可能性が考えられる. すなわち, FMISO-PET 画像は腫瘍内の低酸素状態を純粹に反映するものではなく, グルタチオン抱合能に影響を受けることが示唆される. 加えて, 抗がん剤の中には解毒過程で腫瘍細胞内においてグルタチオン抱合を受けるものがあり, シスプラチンなどの抗がん剤治療を受けている患者では GSH 枯渇が報告されている³⁹. したがって, グルタチオン抱合を受ける薬物を投与された患者では, 同様に細胞内 GSH を消費する FMISO の腫瘍への集積は競合される可能性が想定される. これらの知見は, FMISO の集積については FMISO を用いた核医学診断において, 腫瘍の種類や治療歴等の患者状態が影響を及ぼす可能性を示唆している.

以上第 3 章では, 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た. Amino-FMISO-GS 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, FMISO 集積はグルタチオン抱合能と相関する可能性が示された.

総括および結論

本研究で得られた知見は以下の通りである.

- 第 1 章

腫瘍内低酸素領域に集積した FMISO 化学形態について検討し, これまでの通説とは異なり, 放射能の多くは低分子として存在することを見出した. また IMS を用いた分布評価から, 低分子代謝物である FMISO 還元体のグルタチオン抱合体が, ARG と同様の分布パターンを示し, 腫瘍内低酸素領域に局在することを明らかとした. これらの結果は, ^{18}F -FMISO 投与により得られる腫瘍内の画像は, グルタチオン抱合体の寄与が高い可能性を示している.

- 第 2 章

FMISO と同様に 2-nitroimidazole 骨格を有する pimonidazole 関連代謝物の分布を IMS により評価し, FMISO と同様低酸素領域においてグルタチオン抱合体を生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 系化合物に普遍的な現象であることを明らかとした.

- 第 3 章

低酸素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, FMISO はグルタチオン抱合体を形成することで低酸素細胞に集積することを明らかとした. また FMISO 高集積細胞では, 細胞内グルタチオン量およびグルタチオン抱合酵素活性, 発現量は高値を示す一方で, グルタチオン抱合体排出トランスポーター発現量は低値を示すことを見出した. 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細胞における FMISO 集積に寄与する可能性を明らかとした. これらの結果は, FMISO を用いた PET 診断は, がん組織内の酸素濃度のみに依存するわけではなく, がん細胞のグルタチオン抱合体形成能の影響も受けることを示唆している.

今後は, GST π および MRP-1 阻害下における FMISO 取込量や抗がん剤等グルタ

チオン抱合を受ける薬物との相互作用を評価すること等で、 ^{18}F -FMISO PET 画像の考察に有用な知見が得られるものと考えられる。本研究は、これまでの通説とは異なり、 ^{18}F -FMISO 投与後画像は酸素濃度のみではなく、グルタチオン抱合体形成能が高い状態を描出する可能性を示す点で、今後の FMISO イメージングにおいて考慮すべき重要な知見である。また本研究は、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に大きく寄与するものであり、今後の新規低酸素イメージング剤の研究開発において新たな指標となりうることが期待される。

謝辞

本研究の終わりに鑑み、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学アイソトープ総合センター 久下 裕司 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

同時に、本研究の遂行にあたり、懇切なる御指導と御協力を賜りました、北海道大学アイソトープ総合センター志水 陽一 助教（現、京都大学医学部附属病院放射線部）に厚く深く感謝の意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり、有益な御助言、御指導をいただきました北海道大学大学院医学研究科 玉木 長良 名誉教授、趙 松吉 教授（現、福島県立医科大学ふくしま国際医療科学センター先端臨床研究センター）、北海道大学アイソトープ総合センター 西嶋 剣一 講師（現、北海道大学病院薬剤部）、北海道大学大学院医学研究科 馮 飛 博士始め教職員のみなさまにそれぞれ謹んで感謝致します。

また、本研究の遂行にあたり、多大なる御協力と御助言を戴きました、塩野義製薬株式会社 沼田 義人 博士、東野 賢一 博士、吉岡 健 博士、坂本 真吾 氏、田中 由香里 博士始め研究員のみなさま、シオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社 山口 嘉隆 博士にもそれぞれ謹んで感謝申し上げます。

加えて、本論文の作成にあたり有益な御助言と御指導を戴きました、北海道大学大学院医学研究科 志賀 哲 先生、秋田 弘俊 先生、白土 博樹 先生にそれぞれ謹んで感謝申し上げます。

引用文献

1. Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 393-410 (2011).
2. Horsman, M. R., Mortensen, L. S., Petersen, J. B., Busk, M. & Overgaard, J. Imaging hypoxia to improve radiotherapy outcome. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 674-87 (2012).
3. Krohn, K. A., Link, J. M. & Mason, R. P. Molecular imaging of hypoxia. *J Nucl Med* 49 Suppl 2, 129S-48S (2008).
4. Weissleder, R. & Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452, 580-9 (2008).
5. Nunn, A., Linder, K. & Strauss, H. W. Nitroimidazoles and imaging hypoxia. *Eur J Nucl Med* 22, 265-80 (1995).
6. Troost, E. G. et al. Correlation of [18F]FMISO autoradiography and pimonidazole [corrected] immunohistochemistry in human head and neck carcinoma xenografts. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, 1803-11 (2008).
7. Caprioli, R. M., Farmer, T. B. & Gile, J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 69, 4751-60 (1997).
8. Gobey, J. et al. Characterization and performance of MALDI on a triple quadrupole mass spectrometer for analysis and quantification of small molecules. *Anal Chem* 77, 5643-54 (2005).
9. Marto, J. A., White, F. M., Seldomridge, S. & Marshall, A. G. Structural characterization of phospholipids by matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal Chem* 67, 3979-84 (1995).
10. Vaidyanathan, S., Gaskell, S. & Goodacre, R. Matrix-suppressed laser desorption/ionisation mass spectrometry and its suitability for metabolome analyses. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20, 1192-8 (2006).
11. Castellino, S., Groseclose, M. R. & Wagner, D. MALDI imaging mass spectrometry: bridging biology and chemistry in drug development. *Bioanalysis* 3, 2427-41 (2011).
12. Tang, G., Wang, M., Tang, X., Gan, M. & Luo, L. Fully automated one-pot synthesis of [18F]fluoromisonidazole. *Nucl Med Biol* 32, 553-8 (2005).

13. Prekeges, J. L., Rasey, J. S., Grunbaum, Z. & Krohn, K. H. Reduction of fluoromisonidazole, a new imaging agent for hypoxia. *Biochem Pharmacol* 42, 2387-95 (1991).
14. Brown, R. S. et al. Intratumoral distribution of tritiated fluorodeoxyglucose in breast carcinoma: I. Are inflammatory cells important? *J Nucl Med* 36, 1854-61 (1995).
15. Xie, C., Zhong, D. & Chen, X. A fragmentation-based method for the differentiation of glutathione conjugates by high-resolution mass spectrometry with electrospray ionization. *Anal Chim Acta* 788, 89-98 (2013).
16. Judy L. Bolton, R. A. M. Kinetics and mechanism of the decomposition in aqueous solutions of 2-(hydroxyamino)imidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 8172-81 (1989).
17. Raleigh, J. A. & Koch, C. J. Importance of thiols in the reductive binding of 2-nitroimidazoles to macromolecules. *Biochem Pharmacol* 40, 2457-64 (1990).
18. Ma, S. & Zhu, M. Recent advances in applications of liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites. *Chem Biol Interact* 179, 25-37 (2009).
19. McLelland, R. A. Molecular interactions and biological effects of the products of reduction of nitroimidazoles. NATO Advanced Research Workshop on Selective Activation of Drugs by Redox Processes., 125–136 (1990).
20. Varghese, A. J. & Whitmore, G. F. Cellular and chemical reduction products of misonidazole. *Chem Biol Interact* 36, 141-51 (1981).
21. Rasey, J. S., Nelson, N. J., Chin, L., Evans, M. L. & Grunbaum, Z. Characteristics of the binding of labeled fluoromisonidazole in cells in vitro. *Radiat Res* 122, 301-8 (1990).
22. Hsieh, Y., Chen, J. & Korfmacher, W. A. Mapping pharmaceuticals in tissues using MALDI imaging mass spectrometry. *J Pharmacol Toxicol Methods* 55, 193-200 (2007).
23. Miura, D., Tsuji, Y., Takahashi, K., Wariishi, H. & Saito, K. A strategy for the determination of the elemental composition by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry based on isotopic peak ratios. *Anal Chem* 82, 5887-91 (2010).
24. Cornett, D. S., Frappier, S. L. & Caprioli, R. M. MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of drugs and metabolites in tissue. *Anal Chem* 80, 5648-53 (2008).
25. Varghese, A. J. Glutathione conjugates of misonidazole. *Biochem Biophys Res Commun* 112, 1013-20 (1983).

26. Berube, L. R., Farah, S., McClelland, R. A. & Rauth, A. M. Effect of 1-methyl-2-nitrosoimidazole on intracellular thiols and calcium levels in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol* 42, 2153-61 (1991).
27. Brezden, C. B., McClelland, R. A. & Rauth, A. M. Mechanism of the selective hypoxic cytotoxicity of 1-methyl-2-nitroimidazole. *Biochem Pharmacol* 48, 361-70 (1994).
28. Berube, L. R., Farah, S., McClelland, R. A. & Rauth, A. M. Depletion of intracellular glutathione by 1-methyl-2-nitrosoimidazole. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22, 817-20 (1992).
29. Mulcahy, R. T., Gipp, J. J., Ublacker, G. A., Panicucci, R. & McClelland, R. A. Cytotoxicity and glutathione depletion by 1-methyl-2-nitrosoimidazole in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 38, 1667-71 (1989).
30. Townsend, D. M. & Tew, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369-75 (2003).
31. Ben Amara, A. et al. Placental macrophages are impaired in chorioamnionitis, an infectious pathology of the placenta. *J Immunol* 191, 5501-14 (2013).
32. Li, T. et al. Glutathione S-transferase P1 correlated with oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Int J Med Sci* 10, 683-90 (2013).
33. Chen, L. et al. Effect of hypoxia-inducible factor-1 α silencing on the sensitivity of human brain glioma cells to doxorubicin and etoposide. *Neurochem Res* 34, 984-90 (2009).
34. Hayes, J. D. & Pulford, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 445-600 (1995).
35. Yellin, S. A. et al. Relationship of glutathione and glutathione-S-transferase to cisplatin sensitivity in human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Cancer Lett* 85, 223-32 (1994).
36. Board, P. G. & Menon, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3267-88 (2013).
37. Riddick, D. S. et al. Cancer chemotherapy and drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 33, 1083-96 (2005).
38. Ishikawa, T., Kuo, M. T., Furuta, K. & Suzuki, M. A new aspect on glutathione-associated biological function of MRP/GS-X pump and its gene expression. *Cytotechnology* 27, 81-93 (1998).
39. Komiya, S., Gebhardt, M. C., Mangham, D. C. & Inoue, A. Role of glutathione

- in cisplatin resistance in osteosarcoma cell lines. *J Orthop Res* 16, 15-22 (1998).
40. Yamamoto, Y. et al. Significance of GSTP1 for predicting the prognosis and chemotherapeutic efficacy in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 30, 1687-94 (2013).