

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09949

研究課題名(和文) 抗がん剤の個別化治療を可能とするSPECTを利用した高精度多剤耐性予測法の確立

研究課題名(英文) Development of high accuracy multidrug resistance prediction method using SPECT imaging for individualized anticancer therapy

研究代表者

小林 正和 (KOBAYASHI, Masato)

金沢大学・健康増進科学センター・助教

研究者番号：30444235

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)：本研究では、個別化薬物治療を目指し、抗がん剤の複雑な薬物動態に関する単光子放出断層撮像法を用いた高精度多剤耐性予測法の確立を目的とした。その結果、これまで同じ多剤耐性予測をもたらすと報告されていた[99mTc]sestamibiと[99mTc]tetrofosminにおいて、[99mTc]sestamibiはMDR1とMRP1、一方[99mTc]tetrofosminはMDR1とMRP1-3に親和性があり、各々異なる多剤耐性予測法と成り得ることが判明した。また、[131I]adsterolはBCRPのみに親和性があり、更に高精度な予測法となる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We developed high an accuracy multidrug resistance prediction method using SPECT imaging for individualized anticancer therapy. Although [99mTc]sestamibi and [99mTc]tetrofosmin has been reported to be the same method, we clarified that [99mTc]sestamibi had affinity to MDR1 and MRP1, whereas [99mTc]tetrofosmin had affinity to MDR1 and MRP1-3. Thus, these SPECT tracers had different method for multidrug resistance prediction in this study. Additionally, [131I]adsterol was possibility to be higher accuracy multidrug resistance prediction method than [99mTc]sestamibi and [99mTc]tetrofosmin because [131I]adsterol had only affinity to BCRP.

研究分野：放射線科学

キーワード：核医学 分子イメージング 個別化治療 多剤耐性 薬物トランスポータ

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤治療は、現代のがん治療において必要不可欠な治療法の一つである。その薬剤として、生体内で異物と認識されるものを多く使っているが、近年、栄養素のアミノ酸を基にした分子標的薬も開発されている。これらの抗がん剤におけるがん細胞内外への取込や排出には膜輸送タンパク質の取込型と排出型トランスポーターが関与していることが多く、近年の分子生物学の発展により、そのトランスポーターの種類が増加と細分化が進んでいる。臨床核医学検査を用いた抗がん剤の多剤耐性予測として、 $[^{99m}\text{Tc}]$ sestamibi 等を使用した単光子放出断層撮像法 (SPECT) と、 $[^{11}\text{C}]$ verapamil 等を用いた陽電子放出断層撮像法 (PET) が存在する。両者とも抗がん剤が、がん細胞に取り込まれた直後に、排出される要因である P 糖タンパク (multiple drug resistance 1; MDR1) の発現の有無を、抗がん剤投与前に確認する手法であるが、現在の複雑化した抗がん剤の多剤耐性予測として以下の三つの問題点がある。一点目は、多くの抗がん剤が、がん細胞に発現している取込型トランスポーターにより取り込まれるが、上記の従来予測法では、このトランスポーターが考慮されていない。二点目は、SPECT において、抗がん剤は多数の排出型トランスポーターに関与しているにも関わらず、多剤耐性予測のための SPECT 薬剤の開発が乏しく、MDR1 以外の排出型トランスポーター (multidrug resistance proteins; MRP1-8 や breast cancer resistance protein; BCRP) に対する親和性を個別に評価していない。一方 PET では、種々の排出型トランスポーターに着目した PET 薬剤が既に開発されているが、PET 薬剤合成には特殊かつ高価な機械を必要とするため SPECT よりも汎用性が乏しく、全世界的な普及が難しい。三点目は、多くの抗がん剤が、がんのトランスポーター遺伝子発現量に応じて、がん細胞に集積するが、従来法ではこの発現量を考慮していない点である。申請者は、抗がん剤と同様な高分子化合物の肝機能測定用 SPECT 薬剤を使用して、肝臓への取込と排出に関与する主要なトランスポーターを識別可能な *in vitro* 法を確立した。この手法を応用し、臨床 SPECT 薬剤が関与するがん細胞のトランスポーターを解明後、その発現量も測定する。SPECT 薬剤はトランスポーターによって、がん細胞に迅速に取り込まれた後、即座に排出されるため、少ない放射能計数値でイメージングする技術が非常に重要である。申請者は、本研究で使用する核医学イメージングの画質向上のため、これまで SPECT のみならず、PET のイメージング技術に関する研究も行ってきた (基盤研究(C) 24601008)。この技術を応用して、SPECT イメージングを用いた担がんマウスにおけるがんトランスポーターの種類及び集積量と、*real-time* PCR 法を用いたがんトランスポーターの種類及び遺伝子発現量の関

係を比較検討する。

2. 研究の目的

本研究では、SPECT 薬剤が関与するがんトランスポーターの種類と発現量を把握し、抗がん剤の動態に関与するトランスポーターが関係する SPECT 薬剤を見出すと同時に、特定のトランスポーターのみに親和性を有する新規 SPECT 薬剤の開発も行う。これらの SPECT 薬剤を組み合わせ、従来法より高精度な多剤耐性予測法を確立する。

3. 研究の方法

SPECT による従来多剤耐性予測法は、抗がん剤の排出に大きく関わる MDR1 のみに着目していたが、現在の抗がん剤は他の排出型トランスポーターも関与しているゆえに不十分な手法である。本研究では、種々のがんトランスポーターを考慮した多剤耐性予測法を確立するため以下を明確にすることにした。

① *In vitro* 法を用いた SPECT 薬剤が関与するがんトランスポーターの解明

Real-time PCR によりトランスポーターの種類と遺伝子発現量を測定したがん細胞株等を使い、*in vitro* 法で、既存の SPECT 薬剤が関与するがんトランスポーターの種類を解明すると同時に、がん細胞に対する SPECT 薬剤の集積量が、がんトランスポーターの発現量を反映しているか検討した。

② 小動物 SPECT 装置の性能評価と撮像条件の設定

使用する装置の性能評価後に、新規核医学イメージングに必要な低投与放射能で撮像可能な最適な撮像条件を設定した。

③ 担がんマウスを用いた SPECT 薬剤に関する排出型トランスポーターの確認と発現量の測定

担がんマウス等において、*real-time* PCR を用いたトランスポーターの種類と遺伝子発現量の定量的測定値と、SPECT で得られた測定値を比較することで、がんのトランスポーターの種類と発現量が把握可能であると同時に、抗がん剤と同じトランスポーターが関与する既存の SPECT 薬剤を見出した。

④ 特定のトランスポーターに親和性を有する新規 SPECT 薬剤の開発

既存の SPECT 薬剤と組み合わせ、更に高精度な多剤耐性予測法を確立するために、抗がん剤の動態に関与し、特定のがんトランスポーターに親和性を有する新たな SPECT 薬剤の開発を目指した。

4. 研究成果

① *In vitro* 法を用いた SPECT 薬剤が関与するがんトランスポーターの解明

使用した SPECT 薬剤は、アミノ酸 SPECT 薬剤 $3\text{-}[^{125}\text{I}]\text{iodo-}\alpha\text{-methyl-L-tyrosine}$ ($[^{125}\text{I}]\text{IMT}$) と、アミノ酸 SPECT 薬剤以外の $[^{99m}\text{Tc}]\text{sestamibi}$ 、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{tetrofosmine}$ 、 $[^{131}\text{I}]$ -

6-beta-iodomethyl-19-norcholesterol (^{131}I adsterol)であった。また、ヒト由来がん細胞株には、神経芽細胞腫培養細胞株 SK-N-SH、肺腺癌培養細胞株 H441 と A549、前立腺癌培養細胞株 PC3 を選択し、real-time PCR を使ってトランスポーターの種類とその発現量を確認した。上記の SPECT 薬剤が関与するトランスポーターを解明するために、これらの細胞株のみならず薬物トランスポーター単一発現系ベシクルを用いた実験を行った結果、 ^{125}I IMT はアミノ酸トランスポーター system L がその動態に関与していたが、薬物トランスポーターの関与はなかったため、アミノ酸 SPECT 薬剤では、抗がん剤の動態に関与する高精度多剤耐性予測法の開発は困難であると考えられた。一方、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi は MDR1 と multidrug resistance-associated protein (MRP)1、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tetrofosmin は MDR1 と MRP1-3(図 1)、 ^{131}I adsterol は BCRP への親和性のみが確認できた(図 2)。したがって、 ^{131}I adsterol は抗がん剤の動態に深く関与する BCRP という従来から着目していた MDR1 とは異なる排出型薬物トランスポーターに特異的に親和性を有するため、 ^{131}I adsterol を用いることで、従来法では検出できなかった高精度多剤耐性予測法を確立できる可能性が考えられた。

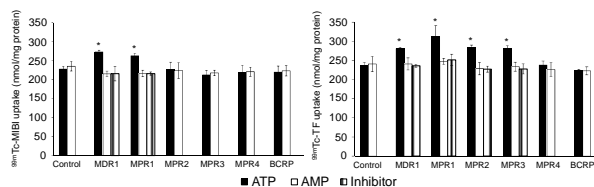


図 1 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ MIBI ; 左) と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tetrofosmin ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ TF ; 右)の排出型薬物トランスポーターの親和性評価

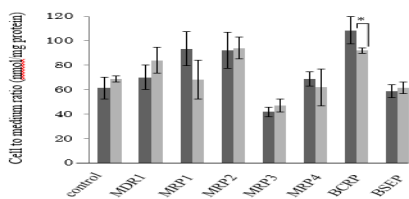


図 2 ^{131}I adsterol と排出型薬物トランスポーターの親和性評価(ブラック ; ATP 負荷, グレー ; AMP 負荷)

2 小動物 SPECT 装置の性能評価と撮像条件の設定

①の in vitro の結果を in vivo で確認するために必要な小動物 SPECT 装置の性能評価を行った。MILabs 社製小動物用 SPECT 装置 U-SPECT/CT において、ファントムを使用して性能を評価した結果、感度 525 cps/MBq、空間分解能 0.4 mm という結果が得られた。これは他の SPECT 装置と比較して高感度であったが、分解能は若干低かった。また、この結果を基に、低放射能計測値で撮像可能な最適な撮像条件を設定することに成功した。

3 担がんマウスを用いた SPECT 薬剤に関する排出型トランスポーターの確認と発現量の測定

神経芽細胞腫 SK-N-SH の担がんマウスを用いて、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tetrofosmin におけるがんトランスポーターの確認と発現量の測定を行った。その結果、細胞実験と同様に、担がんマウスにおいても、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi と MDR1 あるいは MRP1 の親和性は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tetrofosmin よりも高かったため、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tetrofosmin よりも腫瘍から多量かつ迅速に排泄されたと考えられた。一方、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tetrofosmin と MRP2 かつ MRP3 の親和性は、MDR1 かつ MRP1 と比べて低かったが、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi よりも腫瘍細胞に発現する多剤耐性を確認できると思われた。さらに、 ^{131}I adsterol においては、ラット由来褐色細胞腫の担がんマウスを用いた検討を計画したところ、がんが適切に成育しなかったため、BCRP が高発現しているマウスの肝臓を用いて検討した。その結果、 ^{131}I adsterol の BCRP の親和性が確認できたが、この親和性は非常に低かった。今後、 ^{131}I adsterol とラット由来褐色細胞腫の担がんマウスで BCRP の関与を探索する必要がある。

4 特定のトランスポーターに親和性を有する新規 SPECT 薬剤の開発

③において、BCRP に特異的に親和性を有した ^{131}I adsterol の BCRP 親和性を向上させることを考えた。 ^{131}I adsterol の基本骨格であるコレステロール類似体を参考にして、新規 SPECT 薬剤の合成を目指し、分子設計を現在考案している。したがって、既存の放射性医薬品である $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi を用いて、MDR1 と MRP1 の多剤耐性予測が可能であり、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tetrofosmin を用いて MDR1 と MRP1-3 の多剤耐性予測が可能となることが判明した。つまり、これまで $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tetrofosmin は同じ多剤耐性予測をもたらすと思われていたが、今回の検討の結果、それぞれ関与する排出型トランスポーターが違ったため、異なる多剤耐性予測が可能になると思われた。

^{131}I adsterol ではこれらの放射性医薬品で確認できない BCRP のみを検出可能であったが、この検出能が低かったため、 ^{131}I adsterol をベースとした新規 SPECT 薬剤を開発し、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sestamibi と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tetrofosmin と組み合わせることで、抗がん剤の個別化治療を可能とする高精度多剤耐性予測法を確立できると考えられた。

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 13 件)

Tsujikawa T, Tsuyoshi H, Kanno M, Yamada

S, Kobayashi M, Narita T, Kimura H, Fujieda S, Yoshida Y, Okazawa H. Selected 18F-FDG PET radiomic features remain the same: Clinical validation with PET/CT and PET/MR scans. *Oncotarget*, 2018, in press. [査読あり](#)

Kobayashi M, Jiang T, Telu S, Zoghbi SS, Gunn R, Rabiner EA, Owen DR, Guo Qi, Pike VW, Innis RB, Fujita M. ¹¹C-DPA-713 has much greater specific binding to translocator protein 18 kDa (TSPO) in human brain than does ¹¹C-(R)-PK11195. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018;38(3):393-403. [査読あり](#)

Zhu WJ, Kobayashi M, Yamada K, Nishi K, Takahashi K, Mizutani A, Nishii R, Flores LG 2nd, Shikano N, Kunishima M, Kawai K. Development of radioiodine-labeled acetaminophen for specific, high-contrast imaging of malignant melanoma. *Nucl Med Biol*, 2018;59:16-21. [査読あり](#)

Fujita M, Kobayashi M, Ikawa M, Gunn RN, Rabiner EA, Owen DR, Zoghbi SS, Haskali MB, Telu S, Pike VW, Innis RB. Comparison of four ¹¹C-labeled PET ligands to quantify translocator protein 18 kDa (TSPO) in human brain: (R)-PK11195, PBR28, DPA-713, and ER176. *EJNMMI Research*, 2017;7(1):84. doi: 10.1186/s13550-017-0334-8. [査読あり](#)

Kagawa S, Nishii R, Higashi T, Yamaguchi H, Ogawa E, Ono M, Okudaira H, Kobayashi M, Yoshimoto M, Shikano N, Kawai K. Relationship between [¹⁴C]MeAIB uptake and amino acid transporter family gene expression levels or proliferative activity in human carcinoma cells: comparison with [³H]Methionine uptake. *Nucl Med Biol*, 2017;49:8-15. [査読あり](#)

Ono M, Oka S, Okudaira H, Kobayashi M, Kawai K, Yoshimura H. Assessment of amino acid/drug transporters for renal transport of [¹⁸F]fluciclovine (anti-[¹⁸F]FACBC) in vitro. *Int J Mol Sci*, 2017;17(10):pii:E1730. [査読あり](#)

Kobayashi M, Mizutani A, Nishi K, Nakajima S, Shikano N, Nishii R, Fukuchi K, Kawai K. Difference in accumulation and the transport mechanism of L- and D-methionine in high- and low-grade human glioma cells. *Nucl Med Biol*, 2017;44(1):78-82. [査読あり](#)

Kobayashi M, Matsunari I, Nishi K, Mizutani A, Miyazaki Y, Ogai K, Sugama J, Shiba K, Kawai K, Kinuya S. Simultaneous acquisition of ^{99m}Tc and ¹²³I-labeled radiotracers using a preclinical SPECT scanner with CZT detectors. *Ann Nucl Med*, 2016;30(4):263-71. [査読あり](#)

Ono M, Oka S, Okudaira H, Nakanishi T, Mizutani A, Kobayashi M, Schuster DM, Goodman MM, Shirakami Y, Kawai K.

[¹⁴C]Fluciclovine (alias anti-[¹⁴C]FACBC) uptake and ASCT2 expression in castration-resistant prostate cancer cells. *Nucl Med Biol*, 2015;42(11):887-92. [査読あり](#)

Mizutani A, Matsunari I, Kobayashi M, Nishi K, Fujita W, Miyazaki Y, Nekolla SG, Kawai K. Impact of injection dose, post-reconstruction filtering, and collimator choice on image quality of myocardial perfusion SPECT using cadmium-zinc telluride detectors in the rat. *EJNMMI Physics*, 2015;2(1):7. DOI 10.1186/s40658-015-0111-6. [査読あり](#)

Kobayashi M, Mori T, Tsujikawa T, Mizutani A, Ogai K, Sugama J, Kiyono Y, Kawai K, Okazawa H. Comparison of image quality with ⁶²Cu and ⁶⁴Cu-labeled radiotracers in Positron Emission Tomography whole-body phantom imaging. *Hell J Nucl Med*, 2015;18(2):103-7. [査読あり](#)

Kobayashi M, Nishii R, Shikano N, Florens LG 2nd, Mizutani A, Ogai K, Sugama J, Nagamachi S, Kawai K. Development of radioiodine-labeled 4-hydroxyphenylcysteamine for specific diagnosis of malignant melanoma. *Nucl Med Biol*, 2015;42(6):536-40. [査読あり](#)

Ogura M, Shikano N, Nakajima S, Sagara J, Yamaguchi N, Kusanagi K, Okui Y, Mizutani A, Kobayashi M, Kawai K. A strategy for improving FDG accumulation for early detection of metastasis for primary pancreatic cancer: stimulation of the Warburg effect in AsPC-1 cells. *Nucl Med Biol*, 2015;42(5):475-81. [査読あり](#)

[学会発表](計8件)

Tsujikawa T, Kobayashi M, Tsuyoshi H, Yamada S, Oikawa H, Ono Y, Yoshida Y, Okazawa H. Impact of image acquisition time on textural features in 18F-FDG PET/MR. The Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2017 Annual Meeting, Denver (USA), 2017/6/10-14.

外間つづみ, 川村総栄, 小林正和, 高橋浩太郎, 水谷明日香, 福地一樹, 川井恵二. . . 医薬品の胆汁排泄を担う排泄型薬物トランスポーター評価法の確立. 第56回日本核医学会学術総会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2016年11月3-5日.

Innis RB, Fujita M, Kobayashi M, Ikawa M, Jiang TH, Haskali MB, Telu S, Castellano S, Taliani S, Zoghbi SS, Pike VW. Comparison in healthy subjects of four PET radioligands to image translocator protein 18kDa (TSPO). The 11th International Symposium on Functional Neuro Receptor Mapping of the Living Brain, Boston (USA), 2016/7/13-16.

Kobayashi M, Mizutani A, Nishi K, Nakajima S, Shikano N, Nishii R, Kawai K. Difference

of accumulation and transport mechanism of ^{11}C -labeled L- and D-methionine in high and low-grade tumor cells. The Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2016 Annual Meeting, San Diego (USA), 2016/6/11-16.

小林正和, 水谷明日香, 辻内孝文, 西弘大, 福地一樹, 川井恵一. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 放射性医薬品における腫瘍細胞外排泄機序の違い. 第11回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2016年5月28, 29日

Mizutani A, Kobayashi M, Matsunari I, Nishi K, Miyazaki Y, Kawai K. Quantitative simultaneous acquisition of dual tracer using $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and ^{123}I -labeled radiotracers in preclinical SPECT scanner with CZT detector. World Molecular Imaging Congress 2015, Honolulu (USA), 2015/9/2-5.

Kobayashi M, Mori T, Tsujikawa T, Mizutani A, Kiyono Y, Okazawa H, Kawai K. Comparison of image quality with ^{62}Cu and ^{64}Cu -radiotracers in whole body tumor imaging. World Molecular Imaging Congress 2015, Honolulu (USA), 2015/9/2-5.

Kobayashi M, Jenko K, Zoghbi SS, Lohith T, Rallis-Frutos D, Page E, Ikawa M, Pike V, Innis RB, Fujita M. Blockade of translocator protein (TSPO) to measure specific binding of ^{11}C -(R)-PK 11195 in human brain. The 62th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, Baltimore (USA), 2015/6/6-10.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 心臓疾患診断剤, 心臓疾患診断用組合せ医薬及び心臓疾患診断用キット

発明者: 小林正和, 川井恵一, 加奈川優

権利者: 小林正和, 川井恵一, 加奈川優

種類: 特許

番号: 特許願 2016-7541

出願年月日: 2016年1月19日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.well-pro.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 正和 (KOBAYASHI, Masato)

金沢大学・健康増進科学センター・助教

研究者番号: 30444235

(2)研究分担者

川井 恵一 (KAWAI, Keiichi)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号: 30204663

(3)連携研究者

玉井 郁巳 (TAMAI, Ikumi)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号: 20155237

岡沢 秀彦 (OKAZAWA, Hidehiko)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授

研究者番号: 50360813

國嶋 崇隆 (KUNISHIMA, Munetaka)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号: 10214975

西井 龍一 (NISHII, Ryuichi)

放射線医学総合研究所・分子イメージング診断治療研究部・主任研究員

研究者番号: 60463212

鹿野 直人 (SHIKANO, Naoto)

茨城県立医療大学・保健医療学部・准教授

研究者番号: 80295435

西 弘大 (NISHI, Kodai)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号: 10719496

(4)研究協力者

イニス ロバート (INNIS, B Robert)

米国 National Institute of Mental Health・Molecular Imaging Branch・Chief