

5-アミノレブリン酸を用いた腫瘍治療に有用な
画像診断薬剤の開発に関する基礎的研究

2015 年

鈴木 千恵

目次

1. 諸言	6
2. 第一章 [¹¹ C]MALA の標識合成法の開発	11
2-1 方法	12
2-1-1 標識前駆体の合成	12
2-1-2 非放射性 MALA の合成	13
2-1-3 [¹¹ C]MALA の標識合成条件検討	14
2-1-4 [¹¹ C]MALA の自動遠隔標識合成	16
2-2 結果	17
2-2-1 標識前駆体の合成	17
2-2-2 非放射性 MALA の合成	17
2-2-3 [¹¹ C]MALA の標識合成条件検討	18
2-2-4 [¹¹ C]MALA の自動遠隔合成	22
2-3 考察	24
2-4 小括	27
3. 第二章 培養細胞を用いた [¹¹ C]MALA の評価	28
3-1 方法	28
3-1-1 細胞培養	28
3-1-2 [¹¹ C]MALA のマウス血漿中における安定性の評価	28
3-1-3 [¹¹ C]MALA の ALAD による代謝実験	29
3-1-4 [¹¹ C]MALA および [³ H]ALA の細胞取り込み試験	29
3-1-5 細胞取り込み競合阻害実験	29
3-1-6 ウェスタンブロッティング	30
3-1-7 ALA 添加により培養細胞に蓄積する PpIX 量の定量	31
3-1-8 統計解析	31
3-2 結果	32
3-2-1 マウス血漿中安定性	32
3-2-2 ALAD に対する代謝安定性	32
3-2-3 [¹¹ C]MALA および [³ H]ALA の細胞取り込み	32
3-2-4 細胞取り込み競合阻害	33

3-2-5 ALAD の発現量	34
3-2-6 ALA 添加により培養細胞に蓄積する PpIX 量	35
3-3 考察	37
3-4 小活	38
4. 第三章 腫瘍モデルマウスを用いた ^[11C] MALA の評価	39
4-1 方法	39
4-1-1 動物	39
4-1-2 ^[11C] MALA および ^[3H] ALA の正常マウス体内分布試験	39
4-1-3 ^[11C] MALA および ^[3H] ALA の 腫瘍モデルマウス体内分布試験	40
4-1-4 <i>In vivo</i> 安定性試験	40
4-1-5 Dynamic PET 撮像	40
4-1-6 <i>In vivo</i> 阻害実験	41
4-1-7 ALA 投与時の腫瘍 PpIX 蓄積量の定量	41
4-1-8 <i>Ex vivo</i> オートラジオグラフィと腫瘍切片における PpIX 蛍光測定および ALAD 蛍光免疫染色	42
4-1-9 統計解析	43
4-2 結果	44
4-2-1 ^[11C] MALA および ^[3H] ALA の正常マウス体内動態	44
4-2-2 ^[11C] MALA および ^[3H] ALA の腫瘍集積	47
4-2-3 <i>In vivo</i> における安定性	49
4-2-4 Dynamic PET	50
4-2-5 <i>In vivo</i> 競合阻害	51
4-2-6 ALA 投与時に腫瘍に蓄積する PpIX 量	53
4-2-7 ^[11C] MALA の集積、ALAD 発現および PpIX 蓄積量の腫瘍内分布	54
4-3 考察	56
4-4 小活	59
5. 総括	60

6. 参考文献	61
7. 論文目録	67
8. 主査および副査名簿	68
9. 謝辞	69

略語表

A	ALA	5-Aminolevulinic acid	
	ALAD	ALA dehydratase	ALA デヒドラターゼ
	ALAS	ALA synthase	ALA 合成酵素
	ANOVA	Analysis of variance	分散分析
C	COPROIII	Coproporphyrinogen III	
	CT	Computed tomography	コンピュータ断層法
D	DMSO	Dimethyl sulfoxide	
E	ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry	エレクトロスプレーイオン化質量分析
F	FBS	Fetal bovine serum	ウシ胎児血清
	FECH	Ferochelatase	フェロキラーターゼ
	FGR	Fluorescence-guided resection	蛍光ガイド下摘出術
	[¹⁸ F]FET	<i>O</i> -(2-[¹⁸ F]Fluoroethyl)-L-tyrosine	
G	GABA	γ -Aminobutyric acid	
	Gd-MRI	Gadolinium-enhanced MRI	ガドリニウム造影 MRI
	Gly-Sar	Glycylsarcosine	
H	HE	Hematoxylin-Eosin	ヘマトキシリン-エオジン
	HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography	親水性相互作用クロマトグラフィ
	HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィ
	HRP	Horseradish peroxidase	
	HRMS	High resolution mass spectrometry	高分解能質量分析スペクトル
M	MALA	5-Amino-4-oxohexanoic acid	
	[¹¹ C]MET	L-[methyl- ¹¹ C]-methionine	
	MRI	Magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
	NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴
P	PBG	Porphobilinogen	
	PDD	Photodynamic diagnosis	蛍光診断
	PDT	Photodynamic therapy	光線力学療法

	PEPT1/2	Oligopeptide transporter1/2	オリゴペプチドトランスポーター1/2
	PET	Positron emission tomography	陽電子断層撮像法
R	RCC	Radiochemical conversion	放射化学的変換率
	RF	Retention fraction	
	ROI	Region of interest	関心領域
	RP	Reverse phase	逆相
S	SD	Standard deviation	標準偏差
S	SDS	Sodium dodecyl sulfate	
	SDT	Sonodynamic therapy	音響力学療法
	SPECT	Single photon emission computed tomography	単一光子断層撮像法
T	TAC	Time activity curve	時間放射能曲線
	TBAF	Tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride	
	THF	Tetrahydrofuran	
	TLC	Thin layer chromatography	薄層クロマトグラフィ

1. 諸言

がんは 1980 年以來日本人の死因第 1 位であり、その患者数や死亡者数は年々増加している。既存の治療法では治療困難な場合も多く、新たな治療法が開発され続けている。個々の患者に適切な治療を施すために、がんの治療 (Therapy) と、治療法の選択や効果的な治療の実現に有用な情報を与える診断 (Diagnosis) の融合が "Theranostics" として注目されている¹⁾。Theranostics の実現には、多様化するがんの治療に適切な診断法の開発が不可欠である。

5-Aminolevulinic acid (ALA) を投与すると腫瘍特異的に protoporphyrin IX (PpIX) が蓄積することから、ALA を用いた腫瘍治療が注目されている。ALA は生体内に存在するアミノ酸の一つで、ミトコンドリアに存在する ALA 合成酵素

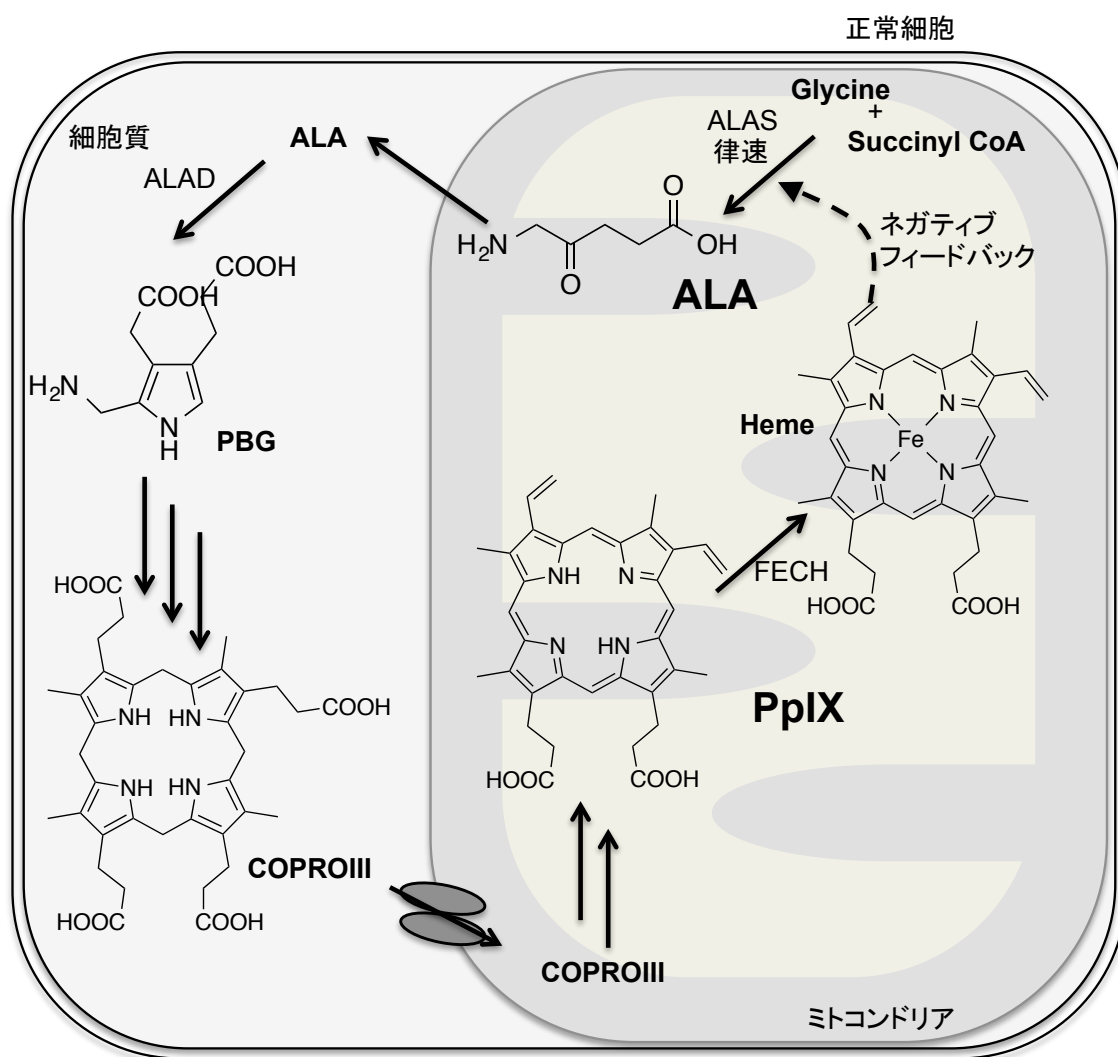


Figure 1. 正常細胞における ALA の代謝と制御

(ALAS) の働きにより合成される²⁾ (Figure 1)。ミトコンドリアで生成した ALA は細胞質に運ばれ、2分子が ALA デヒドラターゼ (ALAD) の働きにより縮合し、porphobilinogen (PBG) を生成し、さらに4分子の PBG が縮合・環化することで、coproporphyrinogen III (COPROIII) へと変換される。COPROIII は再びミトコンドリアに輸送され、protoporphyrin IX (PpIX) を経て heme が合成される。本代謝経路において ALAS が heme 合成の律速酵素であり、その発現量が細胞内の heme により負のフィードバックを受けることで heme 合成量を調整している。ALA を投与すると細胞内に取り込まれ、内因性の ALA と同様に PpIX へと代謝される (Figure 2)。腫瘍において ALA の取り込みが亢進し、さらに PpIX から heme

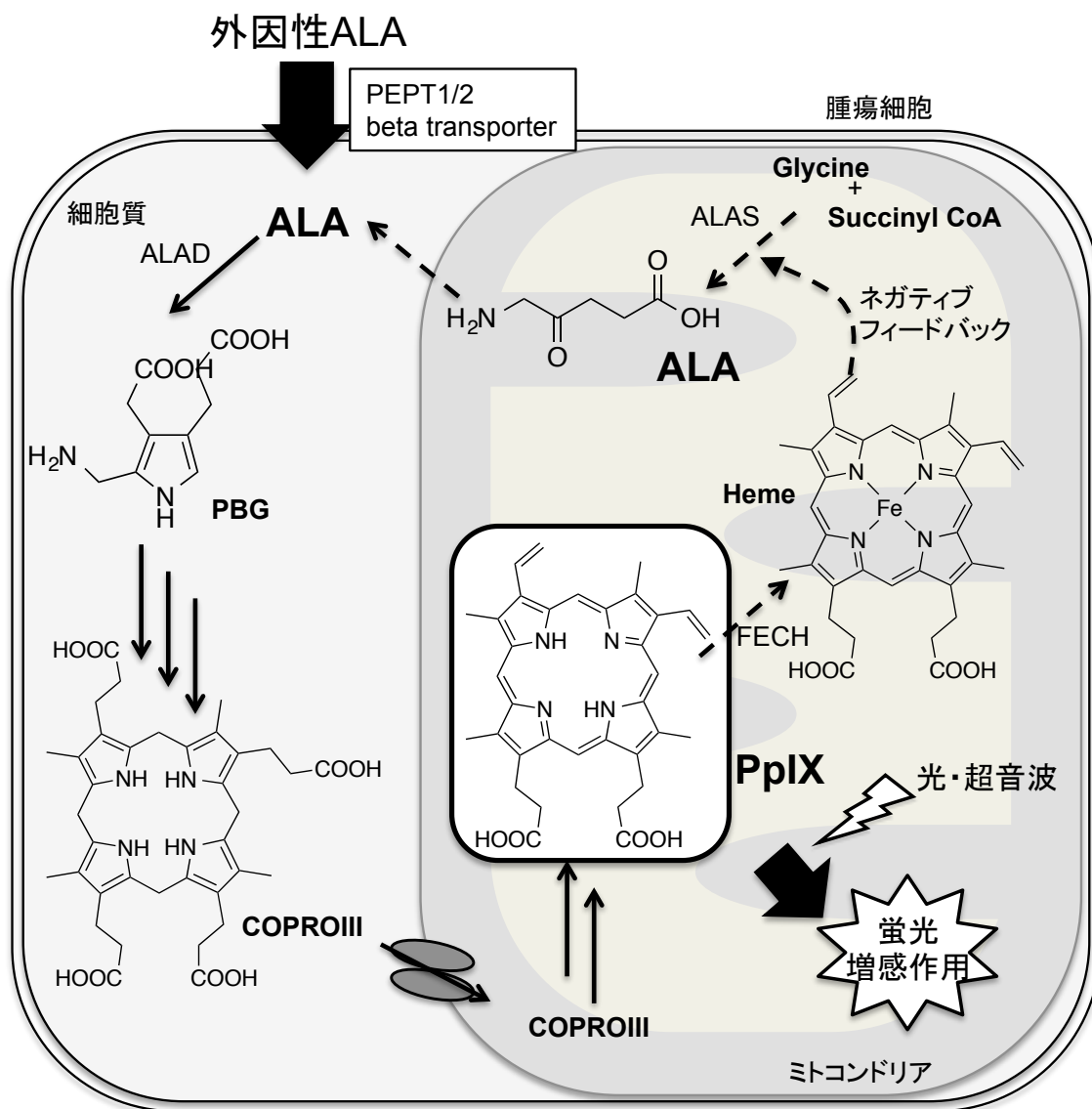


Figure 2. ALA 投与による腫瘍細胞における PpIX 蓄積

への代謝を促進する ferrochelatase (FECH) の発現が低下している³⁾ことから、ALA を投与すると腫瘍細胞特異的に PpIX が蓄積する⁴⁾。PpIX が青色の光により励起され、赤色の蛍光を発することを利用し、がんの蛍光診断 (PDD) や蛍光ガイド下摘出術⁵⁾ (FGR) が可能である。ALA は、本邦においても 2013 年 8 月に悪性神経膠腫の腫瘍摘出術中における腫瘍組織の可視化に対して保険承認 (商品名アラグリオ) され、白色光下における摘出術と比較して腫瘍摘出率の向上および無増悪生存率の改善を達成している⁶⁾。さらに PpIX は、光や超音波により励起し、細胞障害性の活性酸素である一重項酸素などを発生する性質 (光/超音波感受性) を有することから、光や超音波の照射により腫瘍細胞を障害する光線力学療法 (PDT) や音響力学療法 (SDT) が試みられている⁷⁻⁹⁾。実際に、ALA を用いた皮膚がんや膀胱がんなどに対する PDT の臨床試験が行われており、非黒色腫皮膚がん⁵⁾や膀胱がん¹⁰⁾などのいくつかの腫瘍において奏功を示している。ALA 自体は蛍光や光増感作用を持たず、腫瘍において PpIX が合成されることで蛍光や光増感作用を生じる。そのため ALA は他の蛍光診断薬剤や光感受性薬剤と比較して、腫瘍特異性が高く、光線過敏症などの副作用が問題となりにくい¹¹⁾、より高精度で安全ながんの診断・治療薬剤として期待される。一方で、ALA を投与した際に腫瘍に蓄積する PpIX の量は腫瘍ごとに異なることが知られ^{12, 13)}、腫瘍における PpIX の不均一な分布や蓄積量の違いは、FGR における偽陰性に伴う腫瘍摘出率の低下^{13, 14)}や、PDT/SDT における治療効果の個人差^{15, 16)}の原因となる。従って、ALA 投与時の腫瘍 PpIX 蓄積量を治療前に予測できれば、FGR における腫瘍摘出率の向上や、PDT/SDT に適した患者の選択に有用な情報を与えると期待される。

ALA 投与時の PpIX 蓄積量は、PpIX の蛍光測定により直接的に評価可能である¹⁷⁾。しかし、蛍光診断は、光の組織透過性が低いことから、体深部に存在する腫瘍の非侵襲的評価は困難である。一方、がんの画像診断に汎用される X 線-コンピュータ断層法 (CT) や核磁気共鳴画像法 (MRI)、および陽電子断層撮像法 (PET) や単一光子断層撮像法 (SPECT) などの核医学検査は、組織透過性の高い放射線やラジオ波を利用した画像化法で、腫瘍の位置に関わらず評価が可能である。今日までにガドリニウム造影 MRI (Gd-MRI) 診断¹⁸⁾や、L-[methyl-¹¹C]-methionine¹⁹⁾ ([¹¹C]MET) や O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine¹⁴⁾ ([¹⁸F]FET) を用いた PET 診断により ALA 投与時の PpIX 蓄積部位の予測が試みられているが、いずれの画像診断法も PpIX の分布を完全には反映しなかった。

これは、Gd-MRI および、 $[^{11}\text{C}]\text{MET}$ や $[^{18}\text{F}]\text{FET}$ を用いた PET が PpIX 蓄積機序ではなく、それぞれ、脳腫瘍における血液脳関門の破綻²⁰⁾やアミノ酸代謝²¹⁾を評価していることに起因する。そこで、ALA 投与時の PpIX 蓄積機序に着目した新たな診断法の開発が求められる。ALA 投与時の PpIX 蓄積量は ALA の腫瘍細胞への取り込みと腫瘍細胞内における代謝により決定される。従って、PpIX 蓄積量の予測には、ALA の生体内における輸送と代謝の評価が有用である。PET や SPECT などの核医学検査は、放射標識したプローブの体内動態を画像化する手法で、生体内における化合物の輸送や代謝などの機能の評価が可能である²²⁻²⁴⁾。以上の背景から本研究では、ALA 投与時の PpIX 蓄積量を予測する核医学画像診断法の開発に関する基礎的研究を行った。

ALA 投与時の腫瘍特異的な PpIX の蓄積機序や蓄積量を決定する因子に関しては多くの研究が行われている。これらの研究の中で、腫瘍における oligopeptide transporter1/2 (PEPT1/2) や beta transporter の過剰発現による ALA の細胞取り込みの亢進^{15, 25)}や、ALAD などの代謝酵素の亢進^{26, 27)}による PpIX 産生促進の PpIX 蓄積量の腫瘍間差への関与が報告されている。そこで、ALA の細胞取り込みと ALAD による代謝を標的とした核医学診断プローブを設計した。所期の目的を達成するための核医学診断プローブの候補として、放射標識 ALA が挙げられる。放射標識 ALA を投与し、体外画像診断を行った場合、放射活性の追跡により、ALA の腫瘍への取り込みを評価することが可能である。一方で、細胞内に取り込まれた放射標識 ALA および PpIX への代謝の過程で生成する代謝中間体はすべて放射活性を有することから、放射活性の分布のみを評価する体外画像診断では、細胞内に取り込まれた放射標識 ALA の代謝の評価は困難である。

PET や SPECT における生体内の代謝の評価には、メタボリックトラッピングが多く利用される^{28, 29)}。メタボリックトラッピングでは、細胞内に取り込まれた放射標識プローブが特定の酵素により代謝を受け、生成した代謝物が細胞内に滞留する一方で、代謝を受けない放射標識プローブは細胞外に排出されることで、代謝機能の亢進した細胞にのみ放射活性が蓄積する。そこで本研究でも、放射標識プローブが ALAD と相互作用し、細胞内に滞留することで ALA の細胞内における代謝を評価する薬剤設計を考案した。ALA の 5 位にメチル基を導入した 5-amino-4-oxohexanoic acid (MALA) は、ALA と類似した化学構造を有する (Figure 3) ことから ALA と共通したトランスポーターの基質となり、ALA の細胞取り込みを反映した取り込みを示すと期待した。さらに、MALA は ALAD

の活性中心に共有結合し、カルビノールアミンを形成することで ALAD を阻害する ($K_i = 0.2 \text{ mM}$) ことが知られる³⁰⁾ため、細胞内に取り込まれた MALA は、細胞質で ALAD の発現量に応じて ALAD と結合し、細胞内に滞留すると考えた。こうした動態から、MALA は、ALA の腫瘍細胞への取り込みと ALAD による ALA 代謝を反映し、PpIX 蓄積量を評価できると考えた。

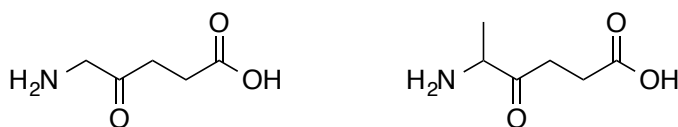


Figure 3. ALA (左) と MALA (右) の構造

本研究では、ALA 投与時の PpIX 蓄積量を予測する画像診断薬剤として、MALA の 6 位炭素をポジトロン放出核種である炭素-11 (¹¹C) で置き換えた [¹¹C]MALA を設計し、第一章では、その標識合成法の開発を、第二章、第三章では、第一章で標識合成法を確立した [¹¹C]MALA を用いて、それぞれ *in vitro* および *in vivo* において PET プローブとしての有用性を評価した。

これらの結果について以下に詳述する。

2. 第一章 ^{11}C MALA の標識合成法の開発

^{11}C はポジトロン放出核種で、PET イメージングに汎用される。全ての有機化合物は構造に炭素を有するため、化合物中の炭素原子の 1 つを ^{11}C に置き換えることで、化合物の構造を変えずに放射標識可能である。 ^{11}C の半減期は 20.4 分と短く、臨床応用した際、患者の不必要な被ばくを避け、また、投与後速やかに消失することから、繰り返しの検査にも適用できる。一方で、 ^{11}C は半減期が短いため ^{11}C 標識 PET プローブの運搬が困難であり、施設内のサイクロトロンを用いて ^{11}C を製造し、PET 検査の都度標識合成を行う。その際、反応開始時には高放射活性を扱うことから、標識合成作業者の被ばくを避けるために、鉛で遮蔽されたセル内で遠隔操作により標識合成を行う。そのため、煩雑な操作は困難であり、 ^{11}C 標識 PET プローブは、簡便な操作で、短時間のうちに効率よく合成・精製する必要がある。そこで本章では、MALA の炭素原子の一つを ^{11}C に置き換えた ^{11}C MALA を、簡便な操作で短時間かつ高収率に得る標識合成法の開発を行った。

2-1 方法

全ての試薬と溶媒は、市販の特級試薬を精製せずに使用した。

^1H および ^{13}C 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、JEOL-ARL-300 spectrometer (日本電子株式会社、東京、日本) を用いて測定した。化学シフト値は、内標準に tetramethylsilane を用い、parts per million (ppm) で記載した。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は、4000 Q TRAP LC/MS/MS system (AB SCIEX, Fpster City, CA) を、高分解能質量分析スペクトル (HRMS) は、JEOL JMS-SX 102A spectrometer (日本電子株式会社) をそれぞれ用いて陽イオンモードで測定した。

^{11}C は、CYPRIS HM18 cyclotron (住友重機械工業株式会社、東京、日本) を用いて、 ^{14}N (p, α) ^{11}C 反応により製造した。

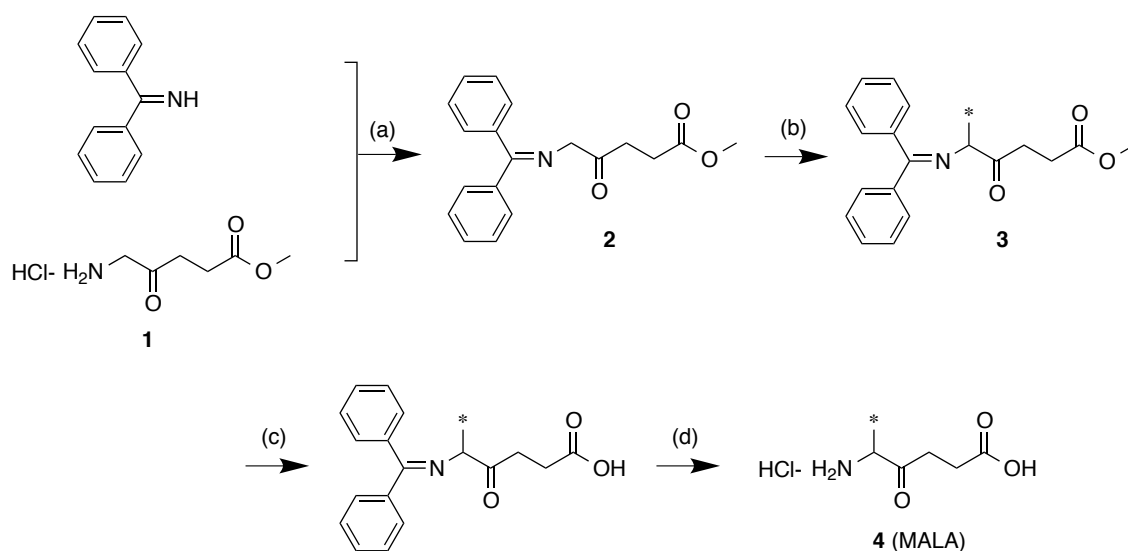
高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 分析は、JASCO HPLC system (日本分光株式会社、東京、日本) を用いて行った。溶出液の放射活性は、NaI (TI) シンチレーション検出器 (ORTEC, Oak Ridge, TN) を用いて測定した。分析用の逆相 (RP)-HPLC は、カラムに COSMOSIL 5C18-AR-II (4.6 mm ID×150 mm、ナカライテスク、京都、日本) を用い、流速 1.0 mL/分で acetonitrile/水 (60/40, v/v) 混液により溶出した。分析用の親水性相互作用クロマトグラフィ (HILIC)-HPLC は、カラムに COSMOSIL HILIC (4.6 mm ID × 150 mm、ナカライテスク) を用い、流速 1.0 mL/分で acetonitrile/30 mM ammonium acetate 水溶液 (80/20, v/v) 混液により溶出した。セミ分取用の HILIC-HPLC には、カラムに COSMOSIL HILIC (10 mm ID × 250 mm、ナカライテスク) を用い、流速 4.0 mL/分で acetonitrile/30 mM ammonium acetate 水溶液 (70/30, v/v) 混液により溶出した。分析用のキラル HPLC には、カラムに CHIRALPAK ZWIX (+) (DAICEL CORPORATION、大阪、日本) を用い、流速 0.5 mL/分で 25 mM formic acid と 12.5 mM diethylamine を含む methanol/acetonitrile/水 (49/49/2, v/v/v) 混液により溶出した。薄層クロマトグラフィ (TLC) は、シリカゲルプレート (silica gel 60 F₂₅₄ aluminum sheets, Merck, Darmstadt, Germany) を用い、*n*-butanol/acetic acid/水 (3/1/1, v/v/v) 混液で展開した。

2-1-1 標識前駆体の合成

2-1-1-1 Methyl(*N*-diphenylmethylene)-5-aminolevulinate (**2**)

Benzophenone imine (100 mg, 0.55 mmol) と methyl 5-aminolevulinate

hydrochloride (100 mg, 0.55 mmol) を 2 mL の dichloromethane に懸濁し、室温で 24 時間攪拌した。反応液を濾過することで、生成した ammonium chloride を除去し、濾液の溶媒を減圧留去した。残渣を ethyl acetate/hexane (1/10, v/v) を溶出溶媒に用いたシリカゲルを担体とするオープンカラムクロマトグラフィで精製し、化合物 **2** を黄色オイル (9.6 mg, 収率 5.6%) として得た。化合物 **2** は精製後直ちに $^1\text{H-NMR}$ および ESI-MS を測定した。 $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD): δ 7.13–7.68 (10H, m, aromatic.), 4.31 (2H, s, NCH_2), 3.63 (3H, s, COOCH_3), 2.83–2.87 (2H, t, COCH_2CH_2), 2.56–2.60 (2H, t, CH_2COO). ESI-MS ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: m/z 324, found: 324.



Scheme 1. MALA の合成

(a) Dichloromethane, (b) CH_3I or $[^{11}\text{C}]\text{H}_3\text{I}$, TBAF, acetonitrile for unlabeled compound, DMSO for ^{11}C , (c) NaOH aq. , (d) HCl aq. * indicates ^{12}C or ^{11}C .

2-1-2 非放射性 MALA の合成

2-1-2-1 Methyl(*N*-diphenylmethylene)-4-oxo-5-aminohexanoate (非放射性 **3**)

上述の通り合成したオープンカラムクロマトグラフィ精製前の化合物 **2** を 1 mL の acetonitrile に溶解し、tetra-*n*-butylammonium fluoride (TBAF) の約 1 mol/L tetrahydrofuran (THF) 溶液 2.75 mL (2.75 mmol) を加えた。次いで、methyl iodide (CH_3I , 37.8 μL , 0.61 mmol) を滴下し、室温で 16 時間攪拌した。溶媒を減圧留去

した後、残渣を ethyl acetate/hexane (1/10, v/v) を溶出溶媒に用いたシリカゲルを担体とするオープンカラムクロマトグラフィに付し、非放射性の化合物 **3** を白色結晶 (25.8 mg, 収率 14.5%) として得た。¹H NMR (CDCl₃): δ 7.13–7.68 (10H, m, *aromatic*), 4.03–4.05 (1H, q, CH), 3.67 (3H, s, COOCH₃), 2.82–3.16 (2H, m, COCH₂), 2.57–2.61 (2H, t, CH₂COO), 1.32–1.35 (3H, d, CH₃). ESI-MS (M + H)⁺: *m/z* 324, found: 324.

2-1-2-2 5-Amino-4-oxohexanoic acid (非放射性 **4**, MALA)

化合物 **3** (49.8 mg, 0.15 mmol) を methanol (2 mL) 溶解し、2 mL の 1.0 M sodium hydroxide (NaOH) 水溶液を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応溶液に、2.0 M hydrochloric acid (HCl) 水溶液を加え pH を 5 付近に調整し、methanol を減圧留去した。5 mL の ethyl acetate で 3 回抽出し、得られた有機層を anhydrous magnesium sulfate で乾燥し、溶媒を減圧留去した。残渣を 1 mL の 1 M HCl 水溶液に溶解し、室温で 1 時間攪拌した。反応液を濾過し、濾液の溶媒を減圧留去した。残渣を 5 mL の hexane で 3 回洗浄することで、非放射性の化合物 **4** (非放射性 MALA) を白色結晶 (14.7 mg, 収率 49.0%) として得た。¹H NMR (CD₃OD): δ 4.35–4.42 (1H, q, CH), 2.89–3.17 (2H, m, CH₂COO), 2.81–2.86 (2H, t, COCH₂), 1.73–1.75 (3H, d, CH₃); ¹³C NMR (CD₃OD): δ 178.8 (C=O), 175.8 (COOH), 55.9 (H₂N–CH), 34.2 (CHCO–CH₂), 28.4 (CH₂–COOH), 15.7 (CH₃); FAB-MS (M + H)⁺: *m/z* 146, found: 146; HRMS (M + H)⁺: *m/z* 146.0817, found: 146.0819.

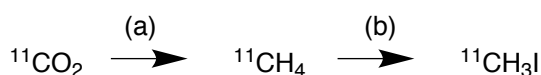
2-1-3 [¹¹C]MALA の標識合成条件検討

2-1-3-1 標識合成のための化合物 **2** の調製

Benzophenone imine (1.0 mg, 5.5 μmol) と methyl 5-aminolevulinate hydrochloride (2.0 mg, 11 μmol) を 0.1 mL の dichloromethane に懸濁し、混合液を室温で 60 分間静置した。同様に methyl 5-aminolevulinate hydrochloride を 1.33 mg, 2.0 mg もしくは 4.0 mg (7.3, 1.1 もしくは 2.2 mmol) 用いた際の、benzophenone imine 消失までの時間を TLC 分析により求めた。反応液を 0.45-μm 濾過膜 (Whatman International, Maidstone, UK) で濾過することで、生成した ammonium chloride と未反応の化合物 **1** を除去し、濾液を窒素雰囲気下で濃縮した。残渣を 200 μL の dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、直ちに ¹¹C 標識に用いた。¹H NMR (CD₃OD): δ 7.13–7.68 (30H, m, *aromatic, benzophenone*), 4.31 (2H, s, NCH₂), 3.63 (3H, s, COOCH₃), 2.83–2.87 (2H, t, COCH₂CH₂), 2.56–2.60 (2H, t, CH₂COO).

2-1-3-2 [¹¹C]Methyl iodide ([¹¹C]H₃I)

Marazano³¹⁾らの方法に従い、下記の通り液層法にて合成した (Scheme 2)。
[¹¹C]carbon dioxide を 0°C にて lithium aluminium hydride の THF 溶液 (0.05 M, 500 μL) にバブリングにて溶解した。溶媒を 150°C 加熱下にて留去した後、残渣に 0°C 冷却下、400 μL の 57% hydroiodic acid 水溶液を加えた。反応溶液を 150°C に加熱し、生成した気体の [¹¹C]H₃I を窒素気流で ascarite カラムと diphosphorus pentoxide カラムを介し DMSO (0.5–1.0 mL) の入ったバイアルに移送し、溶解した。RP-HPLC 分析 (保持時間 4.1 分) により求めた放射化学的純度は、98.0 ± 1.2%であった。



Scheme 2. ¹¹CH₃I の合成

(a) Lithium aluminium hydride, (b) hydroiodic acid.

2-1-3-3 Methyl(*N*-diphenylmethylene)-4-oxo-5-amino-[6-¹¹C]hexanate (3)

化合物 **2** と [¹¹C]H₃I を以下に示す 2 通りの方法で反応させた。

方法 A

化合物 **2** の DMSO 溶液 200 μL に 1.0 または 10 μL の約 1.0 M TBAF/THF 溶液を加えた 10 分後に、100 μL の [¹¹C]H₃I/DMSO 溶液 (約 50 MBq) を加え、混合した。混合液を室温で 90 秒間静置した後、100 μL の acetic acid を加えることで反応を停止し、反応液の一部を RP-HPLC に付し、溶出液の放射活性を経時的に測定した。減衰補正後の放射活性の台形法により求めた曲線下面積比により、放射化学的転換率 (RCC) を算出した。

方法 B

化合物 **2** の DMSO 溶液 200 μL に 100 μL の [¹¹C]H₃I/DMSO 溶液 (約 50 MBq) を加えた直後に 0.5、1.0、1.5 または 10 μL の約 1.0 M TBAF/THF 溶液を加え、

混合した。混合液を室温で 90 秒間静置した後、100 μL の acetic acid を加えることで反応を停止し、反応液の一部を分析用の RP-HPLC に付し、上記と同様の方法で RCC を算出した。

2-1-3-4 5-Amino-4-oxo-[6- ^{11}C]hexanoic acid ([^{11}C]MALA, 4)

化合物 2 の ^{11}C -メチル化反応後、反応溶液に 150 μL の 0.05、0.1、1.0、6.0 M NaOH 水溶液を加え、室温、40 $^{\circ}\text{C}$ 、もしくは 100 $^{\circ}\text{C}$ にて 90 秒間静置した。次いで、加えた NaOH 水溶液の 2 倍の濃度の HCl 水溶液を 150 μL 加え、室温で 90 秒間静置し、反応液の一部を分析用の HILIC-HPLC に付し、上記と同様の方法で RCC を算出した。

2-1-4 [^{11}C]MALA の自動遠隔標識合成

照射終了後、[^{11}C]carbon dioxide を、0 $^{\circ}\text{C}$ にて窒素気流で lithium aluminium hydride の THF 溶液 (0.05 M, 300 μL) の入った第一反応容器に、放射活性が飽和するまでバブリングした。溶媒を 150 $^{\circ}\text{C}$ 加熱下にて留去した後、0 $^{\circ}\text{C}$ 冷却し、残渣に 400 μL の 57% hydroiodic acid 水溶液を加えた。反応溶液を 150 $^{\circ}\text{C}$ に加熱し、生成した気体の [^{11}C]H $_3\text{I}$ を窒素気流で ascarite カラムと diphosphorus pentoxide カラムを介し、化合物 2 の DMSO 溶液 (200 μL) の入った第二反応容器に移送し、溶解した。第二反応容器の放射活性が飽和した後、1.0 μL の約 1.0 M TBAF/THF 溶液を溶解した DMSO 溶液 (150 μL) を加え、室温で 90 秒間静置した。次いで、第二反応容器に 0.1 M NaOH 水溶液 150 μL を加え、混合液を室温で 90 秒間静置した。最後に、0.4 M HCl 水溶液 150 μL を加え、室温で 90 秒間静置し、反応液をセミ分取用の HILIC-HPLC カラムに付した。化合物 4 を含む画分 (保持時間 10-11 分) を回収し溶媒を減圧留去し、残渣を生理食塩水 2 mL に溶解した。調製した [^{11}C]MALA の生理食塩水溶液の一部を調製直後に分析用の HILIC-HPLC とキラル HPLC を用いて、室温で 30 分および 60 分間静置した後に分析用の HILIC-HPLC を用いて分析した。

2-2 結果

2-2-1 標識前駆体の合成

Dichloromethane 中化合物 **1** と 1 等量の benzophenone imine を室温で 24 時間反応させたところ、反応終了時点において TLC 上で化合物 **1** のスポットは消失し、化合物 **2** のスポットのみが新たに生成した。反応溶液を濾過した濾液のシリカゲルを担体とするオープンクロマトグラフィによる精製を試みたところ、化合物 **2** は精製中に速やかに化合物 **1** と benzophenone へと分解し、精製後の収率はごく低値であった。わずかに得られた精製後の化合物 **2** は、24 時間以内に完全に分解した。精製後の化合物 **2** を重 methanol (CD₃OD) 中に溶解し ¹H-NMR を測定したところ、化合物 **2** の 5 位のプロトンピークの積分値は経時的に減少し、6 時間後には完全に消失した。

2-2-2 非放射性 MALA の合成

化合物 **2** は、精製後速やかに加水分解したため、非放射性 MALA の合成には、化合物 **2** を合成後、粗精製の状態で用いた。粗精製の化合物 **2** に TBAF を加えると、黄色に着色し、非放射性的の CH₃I を添加すると、5 位のモノメチル化体が得られた。メチル化後の化合物 **3** は、オープンカラムクロマトグラフィ精製後も安定に存在した。メチルエステルとベンゾフェノンイミンを順次加水分解し、総収率 7.1%で目的とする非放射性 MALA を得た。

2-2-3 [¹¹C]MALA の標識合成条件検討

2-2-3-1 標識合成のための化合物 **2** の調製

Benzophenone imine に対して、化合物 **1** を 1.0, 1.33, 2.0 および 4.0 等量用いて反応を開始し、経時的に TLC 分析を行ったところ、それぞれ 12, 6, 1 および 1 時間後に benzophenone imine のスポットの消失を確認した。化合物 **1** を 2.0 等量用いた反応後の反応溶液を RP-HPLC で分析したところ、化合物 **2** とその加水分解産物である benzophenone のみが観察された (Figure 4)。

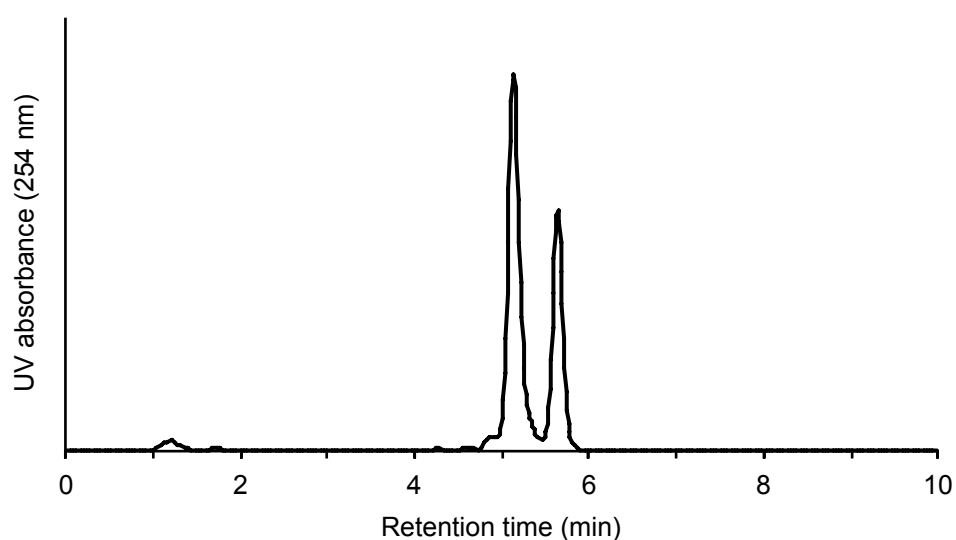


Figure 4. 標識前駆体の RP-HPLC 分析結果

保持時間 5.1 分：標識前駆体 (**2**)、5.6 分：benzophenone (加水分解産物)

保持時間 4.8 分の benzophenone imine は観察されない。

2-2-3-3 ¹¹C-メチル化条件の検討

[¹¹C]H₃I を加えた直後に TBAF を加える方法 B では、[¹¹C]H₃I を加える 10 分前に TBAF を加える方法 A と比較して、高い RCC で ¹¹C-メチル化が進行した (Table 1)。¹¹C-メチル化生成物である [¹¹C]**3** の構造は、RP-HPLC の保持時間 (7.7 分) が非放射性化合物 **3** と一致することにより確認した (Figures 5A and 5B)。方法 B で、TBAF を 1.0-1.5 μmol 加えた時にもっとも高い RCC を与えた (Table 1, entries 4 and 5)。方法 A や過剰の TBAF の使用では RP-HPLC の保持時間 2-3 分の放射活性が増大し RCC は低下した (Table 1, entries 1, 2, and 6; and Figures 5C and 5D)。

Table 1 ¹¹C-メチル化収率

Entry	TBAF (μmol)	Method	RCC ^a (%)
1	1.0	A	2.8
2	10	A	5.1
3	0.5	B	40.8 ± 18.4
4	1.0	B	75.6 ± 6.4
5	1.5	B	75.6
6	10	B	40.2

^aRCC は、減衰補正後のラジオクロマトグラムから算出した。

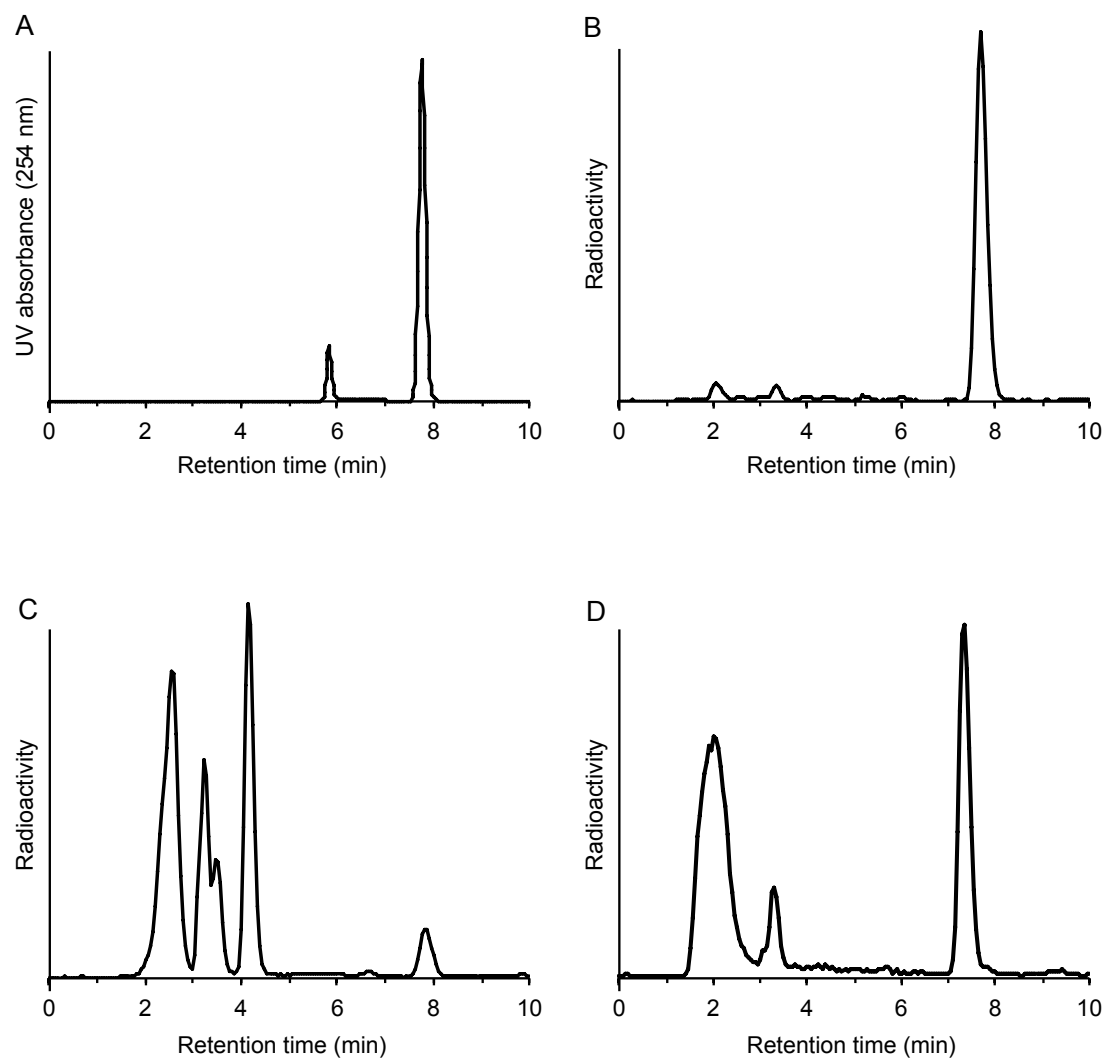


Figure 5. ^{11}C -メチル化の RP-HPLC 分析

(A) 非放射性 **3** (保持時間 7.7 分), 5.7 分 : benzophenone (加水分解産物); (B) Table 1, entry 4; (C) Table 1, entry 2; (D) Table 1, entry 6.

2-2-3-4 [¹¹C]3 の脱保護条件の検討

NaOH 濃度 0.1 M、室温でエステル加水分解を行った後に、酸処理によりベンゾフェノンイミンを加水分解することで、もっとも高い RCC で目的とする [¹¹C]MALA ([¹¹C]4) を得た (Table 2, entry 6)。[¹¹C]MALA の構造は、HILIC-HPLC の保持時間 (11.6 分) が非放射性 MALA と一致することにより確認した (Figures 6A and 6B)。高濃度の NaOH を用いた反応および高温での反応では、HILIC-HPLC の保持時間 2-5 分の目的物より脂溶性の高い副生成物の割合が増大し、RCC は低下した (Table 2, entries 1-4 and Figure 6C)。

Table 2. 脱保護収率

Entry	NaOH (mol/L)	温度	RCC ^a (%)
1	6	100°C	0
2	1	100°C	6.2
3	1	40°C	16.5
4	0.1	100°C	26.5
5	0.1	40°C	51.4
6	0.1	室温	51.9 ± 8.2
7	0.05	40°C	7.5

^aRCC は、減衰補正後のラジオクロマトグラムから算出した。

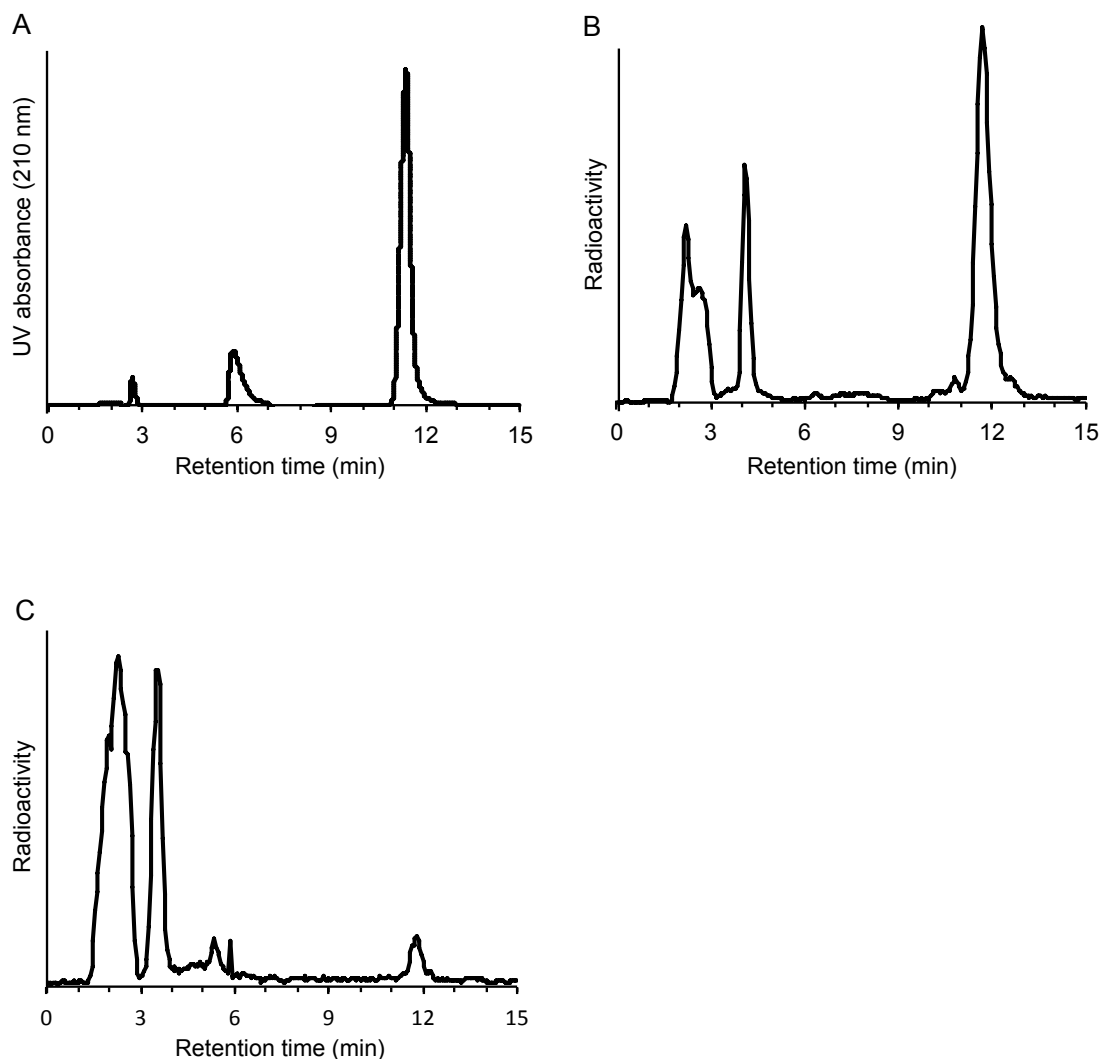


Figure 6. 脱保護反応の HILIC-HPLC 分析

(A) 非放射性 4 (保持時間 11.3 分); (B) Table 2, entry 6; (C) Table 2, entry 2.

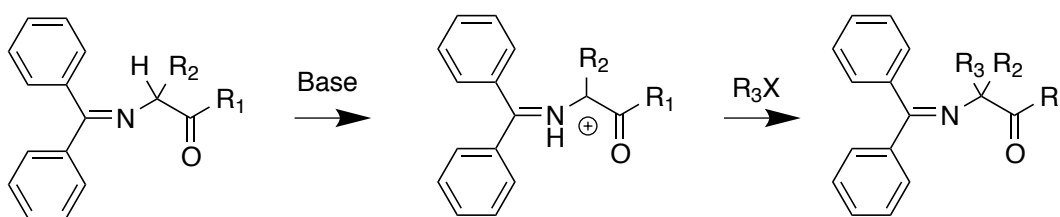
2-2-4 [¹¹C]MALA の自動遠隔合成

高放射活性の [¹¹C]carbon dioxide を使用するために、自動遠隔操作により上述の条件で反応を行った後、反応液をセミ分取用 HILIC-HPLC を用いて精製、溶媒を減圧留去、再溶解することで [¹¹C]MALA を調製した。照射終了時点で 11.8-29.6 GBq の [¹¹C]Carbon dioxide を用い、放射化学的収率 $4.4 \pm 1.7\%$ (減衰補正なし、n = 10) で [¹¹C]MALA (0.43~1.85 GBq) を得た。 [¹¹C]Carbon dioxide の回

収から $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の調製に要した時間は、約35分であった。得られた $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の精製直後の化合物4のHILIC-HPLCを用いて算出した放射化学的純度は $97.5 \pm 1.9\%$ であった (Figure 7)。HILIC-HPLCの溶出液の210 nmにおける吸光度分析において、ALAのピークは観察されなかった。キラルHPLC分析では、17.6分と20.8分に2つの放射活性ピークが観察され、これらの保持時間は、非放射性の化合物4の保持時間と一致した。2つのピークの面積比は、52:48であった。調製した $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の生理食塩水溶液 (260 MBq/mL) を、室温で30分および60分間静置した後のHILIC-HPLCで求めた放射化学的純度はそれぞれ $97.1 \pm 0.8\%$ および $97.4 \pm 0.6\%$ で、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ 以外の放射活性ピークは認められなかった。

2-3 考察

^{11}C は、窒素ガス ($^{14}\text{N}_2$) をターゲットとして陽子を照射し、(p, α) 反応により得られる。生成した ^{11}C は、ターゲット中に混入させた酸素 (O_2) とのホットアトム反応により生成する $[^{11}\text{C}]$ carbon dioxide として得られ、反応性の高い標識中間体へと変換した後に、標識合成に用いる。 $[^{11}\text{C}]$ carbon dioxide を lithium aluminium hydride で還元した後に hydroiodic acid と反応させることで生成する $[^{11}\text{C}]\text{H}_3\text{I}$ (scheme 2) はもっとも汎用されている標識中間体の一つで、主に求核置換反応により標識前駆体に ^{11}C メチル基を導入する³²⁾。一方、Schiff 塩基を用いて α 位の酸性度を増加させた α -アミノ酸³³⁾やペプチド³⁴⁾は、ハロゲン化アルキルを用いた求核置換反応による α 位アルキル化に用いられ、様々な天然・非天然アミノ酸やペプチドが合成されている (Scheme 3)。放射標識合成においては、求電子剤に $[^{11}\text{C}]\text{H}_3\text{I}$ を用いて L- $[^{11}\text{C}]\alpha$ -methyl tryptophan³⁵⁾ ($[^{11}\text{C}]\text{AMT}$) や 2-amino- $[3\text{-}^{11}\text{C}]\text{isobutyric acid}$ ³⁶⁾ ($[3\text{-}^{11}\text{C}]\text{AIB}$) が標識合成されている。Schiff 塩基型の前駆体を用いた α -アルキル化では、塩基を用いて α -水素を引き抜きアニオン中間体を経て、ハロゲン化アルキルを求核置換反応させる (Scheme 3)³³⁾。

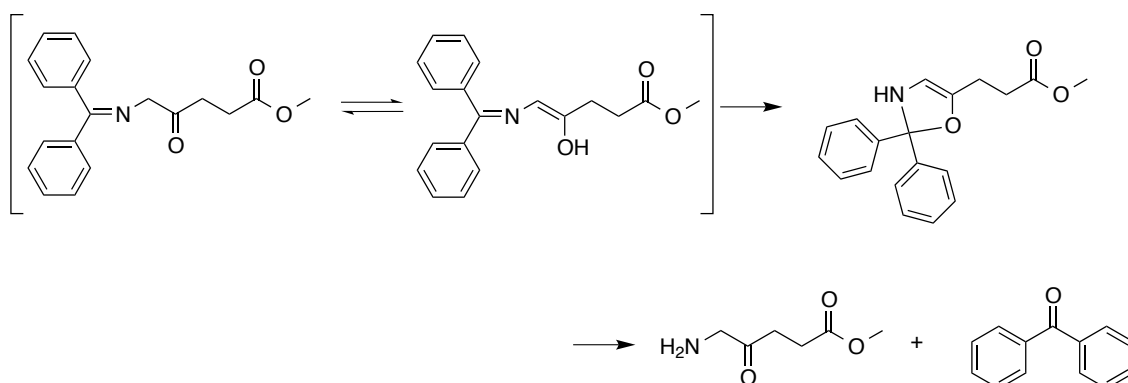


Scheme 3. Schiff 塩基型前駆体の α -アルキル化反応

$[3\text{-}^{11}\text{C}]\text{AIB}$ の標識合成では、DMSO 溶液中、穏和で安定な塩基である TBAF を用いることで、短時間かつ高収率に、再現性よく ^{11}C -メチル化反応が進行した。ALA の 5 位もアミノ基とカルボニル基に隣接しており、アミノ酸やペプチドと同様に Schiff 塩基誘導体化した際の高い酸性度を利用して ^{11}C -メチル基を導入することが可能であると考え、Scheme 1 に示す合成経路を設計した。

^{11}C 標識に先立ち、標識前駆体を合成した。多くの α -アミノ酸エステルやペプチドと benzophenone imine の反応により、Schiff 塩基が安定に単離されている

ことから、本研究においても標識前駆体である化合物 **2** を methyl aminolevulinate と benzophenone imine から合成し、精製しようと試みた。TLC 分析の結果、縮合反応は定量的に反応したものの、化合物 **2** は、精製操作中に加水分解し、安定性が問題となった。 α -アミノ酸エステルのベンゾフェノンイミンが安定に存在する^{33, 34, 37)}にも関わらず化合物 **2** が速やかに加水分解する理由として、化合物 **2** の5位の酸性度の高さが考えられる。一般に、ケトンの α -プロトンの酸性度は、カルボン酸エステルの α -プロトンと比較して高く、ケト-エノール互変異性体を生じる可能性がある。実際に、重 methanol 中で化合物 **2** の¹H-NMR を測定したところ、5位のプロトンの積分値が経時的に減少し、プロトン-重水素交換反応が示唆された。互変異性により生じたエノール体の水酸基は、イミンのカルボニル炭素と反応し、5員環型の反応中間体を経て methyl aminolevulinate と benzophenone に加水分解する可能性がある (Scheme 4)。



Scheme 4. 推定される化合物 **2** の分解機序

化合物 **2** を methyl aminolevulinate と benzophenone imine から合成後、精製せずに使用する場合、標識前駆体溶液には、2種類の原料と標識前駆体の分解産物である benzophenone が存在し得る。これらの化合物の中で化合物 **2** は、もっとも^{[11}C]H₃I に対する反応性が高いと考えられる。そのため非放射性標品の合成や、^{[11}C]MALA の標識合成には、化合物 **2** を用時調製し、精製せずに用いた。^{[11}C]MALA は繰り返し標識合成することから、簡便かつ短時間に標識前駆体溶液を得られることが望ましい。そこで化合物 **2** の合成反応条件の検討を行った。

Benzophenone imine に対して 2 等量の化合物 **1** を用いることで、反応時間 1 時間で benzophenone imine は消失した (Figure 4)。未反応の化合物 **1** と副生成物である ammonium chloride は、有機溶媒に対する溶解度が低いため、濾過により除去した。濾液を濃縮し、¹¹C-メチル化溶媒に再溶解することで、粗精製の化合物 **2** 溶液を調製し、¹¹C-標識実験に用いた。

粗精製の化合物 **2** を DMSO に溶解し、小スケールでの反応により ¹¹C-メチル化反応の反応条件を検討した。TBAF を加える量と加える時期を変え、RCC に与える影響を検討した。TBAF を [¹¹C]H₃I を加えた直後に添加する方法 B では、[¹¹C]H₃I を加える 10 分前に添加する方法 A と比較して目的とする ¹¹C-メチル化体 ([¹¹C]**3**) を高 RCC で与えた (Table 1)。TBAF の量は、1.0-1.5 μmol で最も高い RCC を与え (entries 4, 5)、過剰の TBAF を使用すると RCC は低下した (entry 6)。

方法 A において化合物 **2** は、TBAF により 5 位のプロトンが引き抜かれアニオン構造を形成した後に [¹¹C]H₃I と反応する。一方で、方法 B では化合物 **2** は、アニオンを形成した直後に [¹¹C]H₃I と反応する。どちらの方法においても、化合物 **2** の DMSO 溶液は TBAF を加えた直後に黄色に着色後、数分で脱色し、アニオンの形成と引き続くアニオンの分解が示唆された。迅速なアニオン形成と形成したアニオンの不安定性が、方法 B が方法 A と比較して高い RCC を与えた原因であると考えられる。10 μmol の TBAF を添加した entry 6 では、RP-HPLC の保持時間 2-4 分に溶出する副生成物が生じ、¹¹C-メチル化体の RCC は低値であった (Figure 5D)。これらの副生成物は、[¹¹C]H₃I と TBAF のみを混合した際にも観察されることから、entry 6 では過剰の TBAF と [¹¹C]H₃I との反応が目的とする ¹¹C-メチル化と競合し、収率を低下させたものと考えられる。

化合物 **3** のエステルとイミンを塩基および酸で順次加水分解した。化合物 **4** は、穏やかな条件での加水分解により高 RCC で得られ (Table 2, entries 5 and 6; Figure 6B)、高濃度の NaOH 水溶液を用いた場合や高温でエステル加水分解では化合物 **4** より脂溶性の高い副生成物 (HILIC-HPLC の保持時間 1.5-4.5 分) が生じた (Table 2, entries 1-4; Figure 6C)。一般に水溶液中におけるイミンの安定性は非常に低く、塩基性条件でのエステル加水分解中にもイミンの一部が加水分解され、化合物 **4** およびそのメチルエステルが生じる可能性がある。ALA は、塩基性水溶液中で不安定でピラジン構造を形成することが知られており³⁸⁾、また、1 級アミノ基とカルボン酸エステルを 5 結合の距離に有する化合物は、塩基性条件下でアミノリシスにより分子内環化する可能性がある³⁹⁾。化合物 **4** およびそ

のメチルエステル体も同様に、塩基性水溶液中でピラジン構造や δ -ラクタム構造の副生成物を生じ (Figure 8)、化合物 4 の収率を低下させる可能性がある。穏やかな塩基性条件におけるエステル加水分解では、これらの副反応が抑えられ、高 RCC で目的とする化合物 4 を与えたものと考えられる。

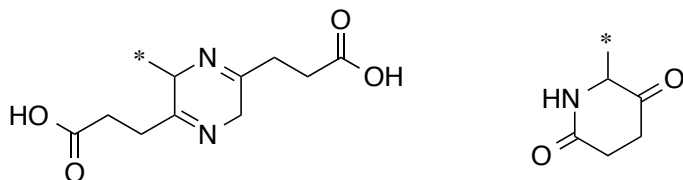


Figure 8. 想定される副生成物の構造
左: ピラジン構造, 右: δ -ラクタム構造。

自動遠隔合成では、照射終了から 35 分と短時間に、高い放射化学的収率で再現性よく高放射化学的純度の $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ を得た。精製後の $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ のキラル HPLC 分析では、2つのピークが観察された。本合成法において $[^{11}\text{C}]\text{H}_3\text{I}$ はアニオン型の間体と反応することから、これら2つのピークは、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の5位を不斉中心とする光学異性体であると考えられる。得られた $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の放射活性は、*in vitro* および小動物を用いた *in vivo* 実験に十分であり、臨床応用に必要な放射活性も合成可能であると期待される。 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ は生理食塩水溶液中で60分間放射線分解などを受けず安定に存在し、調製した $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の生理食塩水溶液は、投与されるまでに分解しないことが示された。

2-4 小括

$[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ を短時間に高放射化学的収率で得られる標識合成法を開発した。本 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ 合成法は、自動遠隔合成に適応可能で、得られた $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の放射活性および放射化学的純度・安定性は、非臨床における $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の有用性評価に十分であり、その有用性が示された。

3. 第二章 培養細胞を用いた¹¹C]MALA の評価

本薬剤設計では¹¹C]MALA が、ALA と共通した機序で腫瘍細胞に取り込まれ、ALAD の活性部位に結合し細胞内に滞留することで、¹¹C]MALA の体内動態が ALA の取り込みと代謝の一部を反映し、PpIX 蓄積量を予測すると期待される。本章では、培養細胞を用いて *in vitro* において¹¹C]MALA の腫瘍細胞への取り込み機序や、取り込み量と PpIX 蓄積量との関係を検討し、¹¹C]MALA の PET プローブとしての可能性を評価した。

3-1 方法

第二章で使用した試薬、機器について、必要なものは同様に使用した。¹¹C]MALA は、第一章に記述した方法で合成した。非放射性の ALA は和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) から、[3,5-³H(N)]aminolevulinic acid hydrochloride (³H]ALA, 740 GBq/mmol) は American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO) からそれぞれ購入した。その他の試薬と溶媒は、特級試薬を精製せずに使用した。

3-1-1 細胞培養

ヒト膵がん由来細胞株 AsPC-1、BxPC-3 と MIA PaCa-2、ヒト乳がん由来細胞株 Sk-Br-3、およびヒト膠芽腫由来細胞株 U-87 MG は、American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) から購入した。AsPC-1 と BxPC-3 は、10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加した RPMI 1640 培地 (和光純薬) を、Sk-Br-3、U-87 MG と MIA PaCa-2 は、10%ウシ胎児血清を添加した D-MEM (High Glucose) 培地 (和光純薬) を用い、加湿、5%二酸化炭素中 37°C 環境下で培養した。以下、これらの培地を通常培地と記す。

3-1-2 ¹¹C]MALA のマウス血漿中における安定性の評価

¹¹C]MALA の生理食塩水溶液 30 μ L (約 15 MBq) をマウス血漿 270 μ L と混合し、37°C で 60 分間インキュベートした。インキュベート後の溶液を一部採取し、TLC にて放射化学的純度を評価した。また、インキュベート溶液 200 μ L を 10-kDa cutoff 限外濾過膜 (Microcon YM-10, Millipore, Bedford, MA) に付し、10,000 \times g で 3 分間遠心分離し、濾液の放射活性濃度をオートウェルガンマカウンタで測定した。さらに、濾液の一部を分析用 HILIC-HPLC で分析した。

3-1-3 [¹¹C]MALA の ALAD による代謝実験

すべての動物実験は、放射線医学総合研究所所内規定の動物実験法に従い、所内動物実験委員会の承認を得て実施した。ネンブタール麻酔下、Fischer 雄性ラット 9 週齢の肝臓を摘出し、氷上で、4-5 倍量の 0.039 M の sodium chloride を含むリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) を加え、テフロンホモジナイザーによりホモジナイズ (3,000 rev/min, 10 strokes) した。ホモジネートを 4°C にて 4,000 × g で 10 分間遠心分離し、上清を肝ホモジネートとして用いた。肝ホモジネートの ALAD 活性は Shionoya の方法に従い測定した⁴⁰⁾。

[¹¹C]MALA の生理食塩水溶液 100 μL (約 50 MBq) を最終濃度が 10 mM になるように還元型 glutathione を加えた肝ホモジネート 350 μL と混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。インキュベート溶液を 10-kDa cutoff 限外濾過膜に付し、10,000 × g で 10 分間遠心分離し、濾液の一部を分析用 HILIC-HPLC で分析した。

3-1-4 [¹¹C]MALA および [³H]ALA の細胞取り込み試験

各ウェル 1 × 10⁵ 個の AsPC-1、Sk-Br-3、U-87 MG、BxPC-3 もしくは MIA PaCa-2 細胞を 500 μL の通常培地に懸濁し、24 ウェルプレートに播種し、18 時間培養した。各ウェルの細胞を 500 μL の PBS (-) で 3 回洗浄した後、およそ 15 MBq の [¹¹C]MALA を含む 0.1% glucose 添加 PBS (-) を 500 μL 加え、37°C で 10 分間インキュベートした。インキュベート終了後直ちに、500 μL の冷 PBS (-) で 3 回洗浄し、細胞を 100 μL の 0.1 M NaOH 水溶液に溶解した。細胞溶解液の一部を採取し、オートウェルガンマカウンタで ¹¹C の放射活性を測定した。 [³H]ALA の細胞取り込み試験は、 [¹¹C]MALA の代わりに 18.5 kBq [³H]ALA を用いて同様の操作で行った。細胞溶解液の一部を採取し、1 mL の液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor, PerkinElmer, Waltham, MA) と混合し、³H の放射活性を液体シンチレーションカウンタを用いて測定した。細胞溶解液の一部を採取し、タンパク質濃度を Quick Start Bradford Protein assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて測定した。細胞集積量は、添加量に対する百分率をタンパク質 1 mg あたりに補正して表記した。

3-1-5 細胞取り込み競合阻害実験

各ウェル 1 × 10⁵ 個の AsPC-1 細胞を 500 μL の通常培地に懸濁し、24 ウェル

プレートに播種し、18時間培養した。各ウェルの細胞を 500 μ L の PBS (-) で 3 回洗浄した後、最終濃度が 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mM になるように ALA、glycylsarcosine (Gly-Sar) もしくは γ -aminobutyric acid (GABA) を添加したおよそ 15 MBq の [14 C]MALA を含む 0.1% glucose 添加 PBS (-) を 500 μ L 加え、37°C で 10 分間インキュベートした。インキュベート終了後、上記と同様の方法で細胞内の放射活性とタンパク濃度を測定し、細胞集積量を求めた。

3-1-6 ウェスタンブロッティング

5 \times 10⁵ 個の AsPC-1、Sk-Br-3、U-87 MG、BxPC-3 もしくは MIA PaCa-2 細胞を 3 mL の通常培地に懸濁し、60 mm dish に播種し、18 時間培養した。細胞を冷 PBS (-) で洗浄し、セルリフターで手早く回収後、4°C で 20,000 \times g、1 分間遠心分離した。1 mM の 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride を添加した細胞溶解緩衝液 200 μ L (Cell Signaling Technology, Danvers, MA; 組成: 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 1 mM disodium ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetate (EDTA-2Na), 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium diphosphate decahydrate, 1 mM β -glycerophosphoric acid, 1 mM sodium orthovanadate, 1 μ g/ml leupeptin) を加え、Bioruptor (Olympus、東京、日本) を用いて超音波処理を 5 分行った。再び 4°C で 15,000 rpm, 1 分間遠心分離し、上清を回収し、タンパク質濃度を Quick Start Bradford Protein assay Kit を用いて測定した。抽出したタンパク質 (40 μ g) を 12.5% (w/v) glycerol, 1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.01% (w/v) bromophenol blue, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) 中 98°C で 5 分間還元・変成させ、SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) により分子量ごとに分離した。Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) を用い、polyvinylidenedifluoride (PVDF) 膜にタンパク質を転写した。その後、0.05% Tween-20 (v/v) を含む Tris-HCl 緩衝生理食塩水溶液 (pH 7.6) (TBS-T) に溶解した 3% (w/v) Perfect-block (Mo Bi Tec, Gottingen, Germany) を用い 4°C で一晩ブロッッキングし、TBS-T で 100 倍 (0.02 mg/mL) に希釈した抗 ALAD 抗体 (Atlas Antibodies AB, Stockholm, SWEDEN) と 4°C で 64 時間反応させた。反応終了後、TBS-T で 3 回洗浄し、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗 rabbit 抗体 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) と TBS-T 中室温で 30 分間反応し、過剰の抗体を TBS-T で 3 回洗浄し除去

した。PVDF 膜を ECL Prime kit (GE Healthcare) で処理し、HRP との反応により生じた化学発光を LAS-3000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan) で画像化した。PVDF 膜を 0.2 M glycine-HCl 緩衝液 (pH 2.2) 中室温で 60 分間インキュベートすることで抗体を PVDF 膜から除去し、TBS-T で 3 回洗浄した。再び 3% (w/v) perfect-block で 4°C にて一晩ブロッキングし、TBS-T で 2,000 倍 (1 µg/mL) に希釈した抗 β -actin 抗体 (sigma) と室温で 30 分反応させた。反応終了後、0.05 % Tween-20-PBS で 3 回洗浄し、HRP 標識抗 mouse 抗体 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) と 30 分室温で反応させた。0.05 % Tween-20-PBS で 3 回洗浄し、抗 rabbit 抗体と同様に画像化した。解析には Image Gauge (FUJIFILM) を用い、抗 ALAD 抗体、抗 β -actin 抗体それぞれのバンドに手動で関心領域 (ROI) を設定しシグナルを定量し、ALAD/ β -actin 比として表記した。

3-1-7 ALA 添加により培養細胞に蓄積する PpIX 量の定量

本実験は Gaullier らの方法に準じて行った⁴¹⁾。すなわち、各ウェル 3×10^5 個の AsPC-1、Sk-Br-3、U-87 MG、BxPC-3 もしくは MIA PaCa-2 細胞を 2 mL の通常培地に懸濁し、6 ウェルプレートに播種し、18 時間培養した。各ウェルの細胞を 500 µL の PBS (-) で 3 回洗浄した後、最終濃度 1 mM になるよう ALA を添加した FBS を含まない通常培地を 1 mL 加え、37°C で 4 時間インキュベートした。インキュベート終了後、2 mL の冷 PBS (-) で 3 回洗浄し、60 µL の 1 M perchloric acid 水溶液と methanol の混液 (1:1, v/v) を加え、セルリフターを用いて細胞を回収した。細胞懸濁液を 4°C で $10,000 \times g$ 、1 分間遠心分離し、上清を 50 µL 採取し蛍光強度 (励起波長 405 nm、蛍光波長 620 nm) を測定した。種々の濃度の PpIX を 1 M perchloric acid 水溶液と methanol の混液 (1:1, v/v) に溶解し、同様の蛍光強度を測定することで検量線を作成し、細胞抽出液中の PpIX を定量した。対照実験として、ALA を添加せずにインキュベートを行い、同様の測定を行った。PpIX 蓄積量は、タンパク質 1 mg あたりに補正して表記した。

3-1-8 統計解析

実験結果は、各実験を 3 回反復して得られた平均値 \pm 標準偏差 (SD) として表記した。細胞取り込み競合阻害実験における多郡間比較では、分散分析 (ANOVA) の後 Dunnett の多重比較検定を用いた。各測定値間の関係は、Pearson の相関分析を用いて分析した。

3-2 結果

3-2-1 マウス血漿中安定性

インキュベート 60 分後における HILIC-HPLC を用いて算出した未変化体の割合は $97.4 \pm 0.7\%$ であり、TLC においても未変化体以外の放射活性は観察されなかった。限外濾過法により求めた血漿タンパク結合率は $2.7 \pm 0.3\%$ であった。

3-2-2 ALAD に対する代謝安定性

インキュベート 30 分後における HILIC-HPLC を用いて算出した未変化体の割合は $99.1 \pm 0.6\%$ であり、未変化体以外のピークは観察されなかった。

3-2-3 [^{11}C]MALA および [^3H]ALA の細胞取り込み

インキュベート 10 分後における [^{11}C]MALA の細胞集積量は、AsPC-1 細胞で $6.79 \pm 0.9\%/mg$ protein ともっとも高く、次いで Sk-Br-3 細胞、U-87 MG 細胞の順に低下した (Figure 9A)。BxPC-3 細胞と MIA PaCa-2 細胞への [^{11}C]MALA の集積量は、AsPC-1 細胞への集積量の 5%未満と非常に低値であった。一方で、 [^3H]ALA の細胞取り込み量には、5 種類の細胞株間で大きな差がなく (Figure 9B)、各細胞株間における [^{11}C]MALA と [^3H]ALA の集積量に相関関係は認められなかった (Figure 9C, $R^2 = 0.23$, $P = 0.41$)。

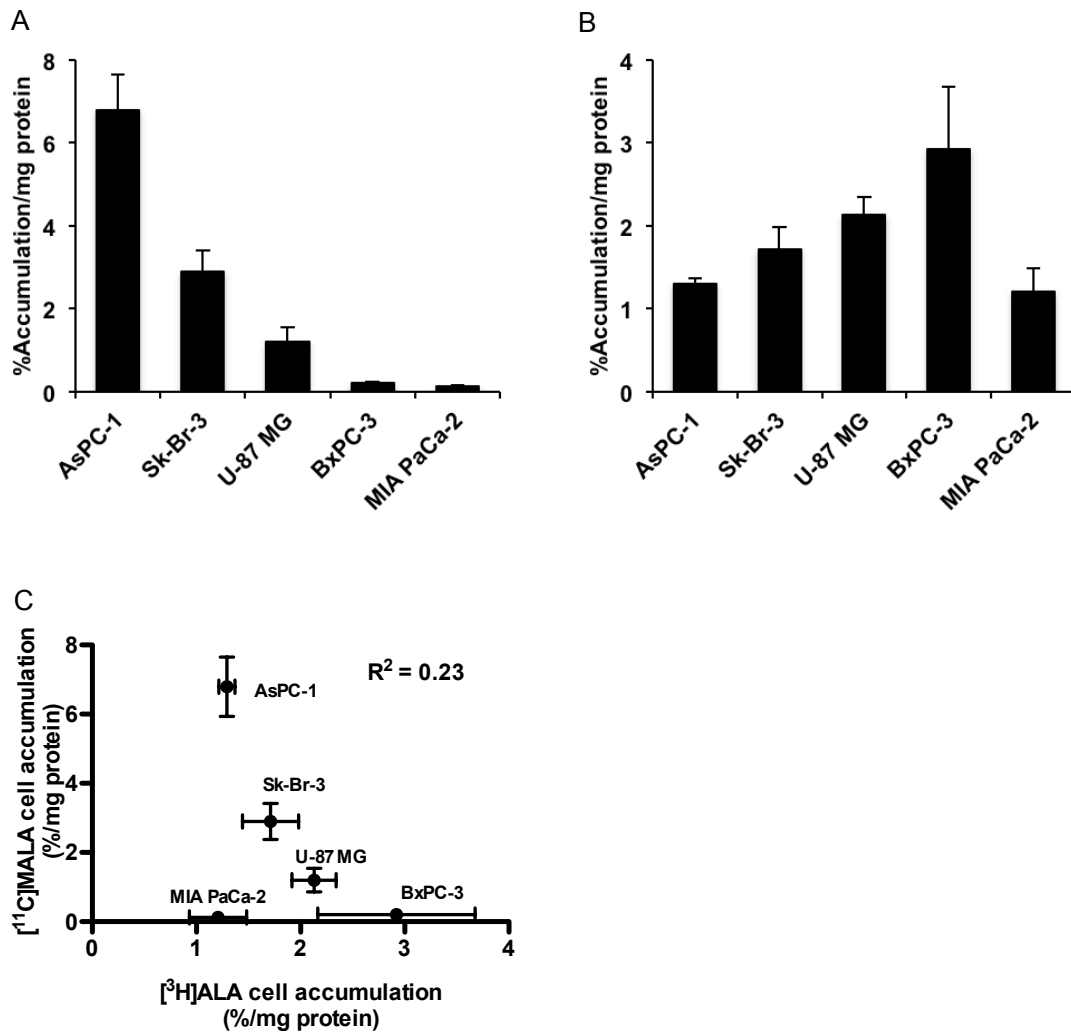


Figure 9. [¹¹C]MALA および [³H]ALA の細胞取り込み試験

(A) [¹¹C]MALA を細胞と 10 分間インキュベートした際の細胞集積量, (B) [³H]MALA を細胞と 10 分間インキュベートした際の細胞集積量, (C) [¹¹C]MALA の細胞集積量と [³H]MALA の細胞集積量の関係。

3-2-4 細胞取り込み競合阻害

[¹¹C]MALA の AsPC-1 細胞への集積量は、Gly-Sar や GABA の添加によって阻害剤の濃度依存的に低下し、5 mM の Gly-Sar により未添加時の $31.8 \pm 3.3\%$ 、5 mM の GABA の添加により $55.5 \pm 0.5\%$ に有意に低下した。 [¹¹C]MALA の集積

量は、ALA の添加によっても濃度依存的に低下し、5 mM 添加時には、未添加時の $13.4 \pm 1.7\%$ と顕著に阻害された (Figure 10)。

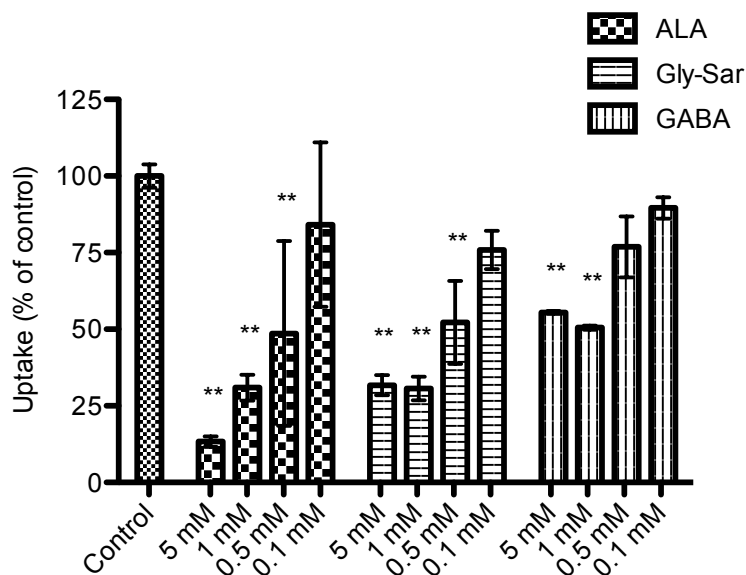


Figure 10. [^{11}C]MALA 細胞取り込みの競合阻害

Gly-Sar: PEPT1/2 の阻害剤, GABA: beta transporter の阻害剤, ** $P < 0.01$ vs control.

This figure was originally published in *BMCL*. C. Suzuki et al. Synthesis and *in vitro* cellular uptake of ^{11}C -labeled 5-aminolevulinic acid derivative to estimate the induced cellular accumulation of protoporphyrin IX. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23:4567-4570. © by Elsevier.

3-2-5 ALAD の発現量

AsPC-1 細胞は 5 種類の細胞株内でもっとも高い ALAD タンパクの発現量を示し、次いで Sk-Br-3 細胞、U-87 MG 細胞の順に ALAD タンパクの発現量は低下した (Figure 11A)。BxPC-3 細胞と MIA PaCa-2 細胞における ALAD タンパクの発現量は低値であった。ALAD タンパクの発現量は、細胞取り込み試験により求めた [^{11}C]MALA の細胞取り込み量と強く相関した (Figure 11B, $R^2 = 0.98$, $P < 0.01$)。

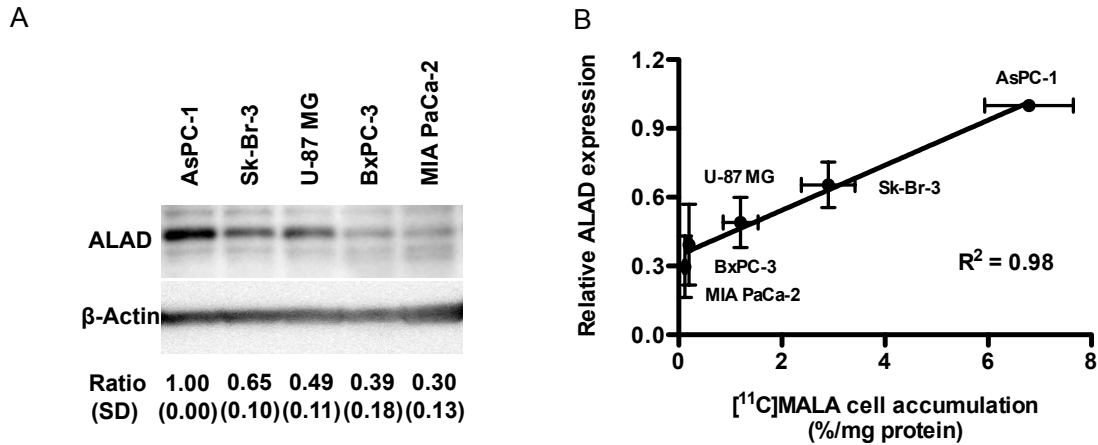


Figure 11. ALAD タンパクの発現量

(A) Western blotting analysis, (B) ALAD 発現量と [¹¹C]MALA 細胞集積量の関係
 These figures were originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo-[6-¹¹C]Hexanoic Acid as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*. 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

3-2-6 ALA 添加により培養細胞に蓄積する PpIX 量

5 種類の細胞株すべてにおいて、ALA を添加せずにインキュベートを行った対照実験では、PpIX の蛍光は検出できなかった (< 30 pg PpIX/well) のに対し、ALA とインキュベートすることで、顕著な蛍光強度の増加が認められた。ALA 添加により生じた PpIX 蓄積量は、AsPC-1 細胞でもっとも高く、インキュベート 4 時間後で 188.4 ± 20.2 ng/mg protein であった (Figure 12A)。Sk-Br-3 細胞への PpIX 蓄積量は、AsPC-1 細胞への蓄積量の 40%程度であり、残る 3 種の細胞株への蓄積量は 30%未満であった。ウェスタンブロッティング法により求めた ALAD タンパクの発現量は、PpIX 蓄積量と相関 (Figure 12B, $R^2 = 0.90$, $P < 0.05$) した。また、細胞取り込み試験により求めた [¹¹C]MALA の細胞集積量も、PpIX 蓄積量と相関 (Figure 12C, $R^2 = 0.95$, $P < 0.01$) した。一方で、細胞取り込み試験により求めた [³H]ALA の細胞集積量は、PpIX 蓄積量と有意な相関を示さなかった (Figure 12D, $R^2 = 0.23$, $P = 0.48$)。

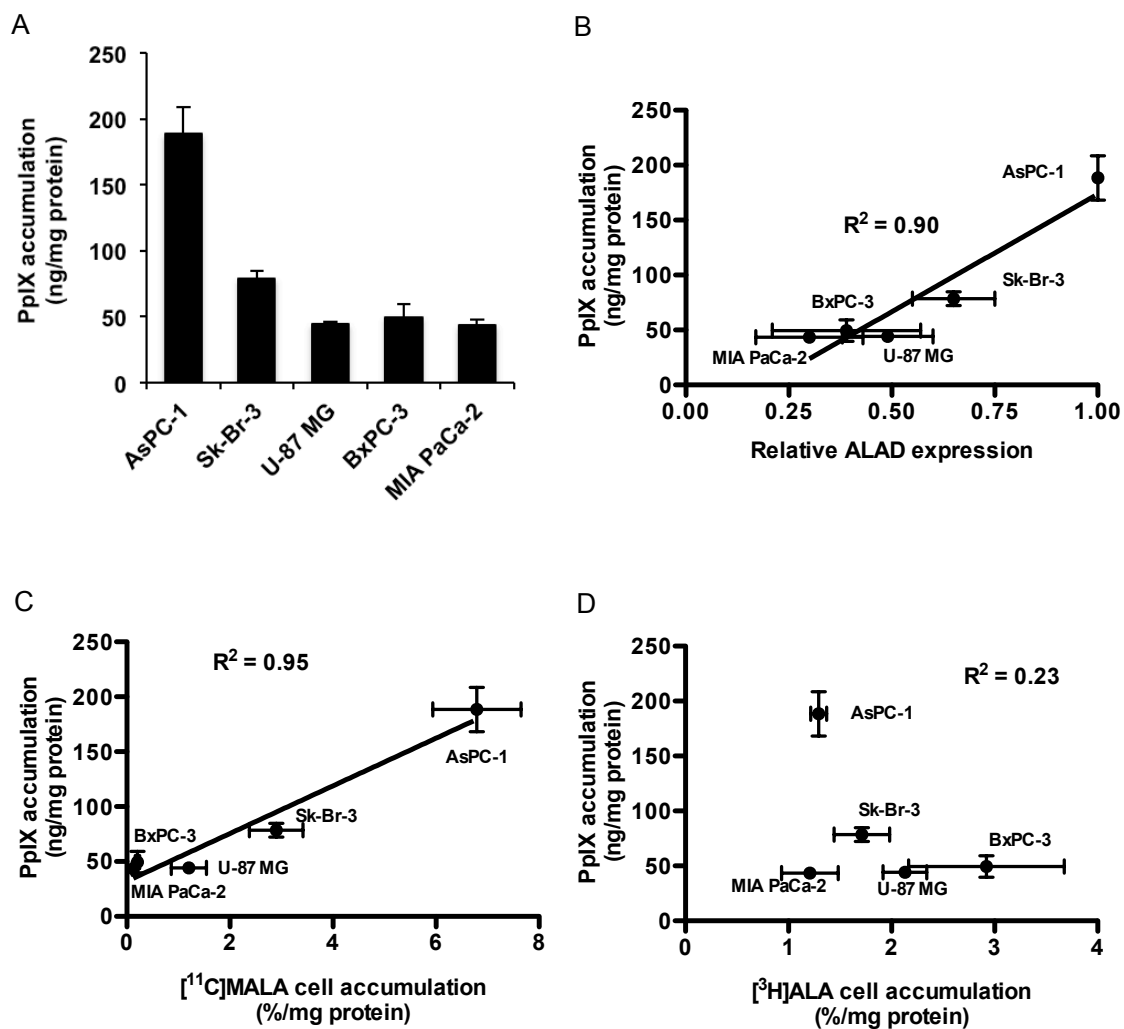


Figure 12. *In vitro* における PpIX 蓄積量

(A) ALA を細胞と 4 時間インキュベートした際の PpIX 蓄積量, (B) ALAD 発現量と PpIX 蓄積量の関係, (C) $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の細胞集積量と PpIX 蓄積量の関係, (D) $[^3\text{H}]\text{ALA}$ の細胞集積量と PpIX 蓄積量の関係。

A part of these figures was originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo-[6- ^{11}C]Hexanoic Acid as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*. 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

3-3 考察

ALA を投与した際に腫瘍に蓄積する PpIX の量は、腫瘍細胞への ALA の取り込みによって決定すると報告されている^{15, 25)}。しかし、本研究において、^[3H]ALA の腫瘍細胞集積量は、PpIX 蓄積量と相関を示さなかった (Figure 12D)。同様の結果は、異なるがん細胞を用いた検討においても報告されている⁴²⁾。これは、細胞内で PpIX の合成に関わる酵素の発現量および活性が腫瘍ごとに異なっており、PpIX 合成速度が異なるためと考えられる。これらの知見は、ALA を投与した際に腫瘍に蓄積する PpIX の量を予測するための PET プローブは、ALA の腫瘍細胞への取り込みのみでなく、ALA の代謝をも評価する必要があることを示す。

ALA は、主にジペプチドやトリペプチドを輸送する PEPT1/2⁴³⁾や、 β -アミノ酸や γ -アミノ酸を輸送する beta transporter⁴⁴⁾によって細胞に取り込まれることが知られている。MALA は、ALA と類似した構造を有することから、ALA と同様にこれらのトランスポーターの基質になることが予想されるが、MALA のトランスポーターによる基質認識性に関する報告は未だされていない。そこで、^[11C]MALA の腫瘍細胞への取り込みと、トランスポーターによる基質認識性を培養細胞を用いて検討した。^[11C]MALA の腫瘍細胞への集積量は 5 種の細胞株間で大きく異なった (Figure 9A)。取り込み機序推定のための競合阻害実験は、もともと^[11C]MALA をもともと多く取り込んだ AsPC-1 を用いて行った。^[11C]MALA の AsPC-1 細胞への取り込みは、PEPT1/2 の基質である Gly-Sar と beta transporter の基質である GABA の添加により、阻害剤の濃度依存的に阻害された (Figure 10)。これらの結果は、^[11C]MALA が PEPT1/2 や beta transporter の基質となり、腫瘍細胞内に輸送されることを示す。さらに、^[11C]MALA の AsPC-1 細胞への取り込みは、過剰の非放射性 ALA の添加によっても濃度依存的に阻害され、これより、^[11C]MALA が ALA と共通の機序により細胞に取り込まれることが示された。これらの結果より、^[11C]MALA の細胞取り込みは、ALA の細胞取り込みを反映すると期待される。一方で、^[3H]ALA の細胞集積量は、5 種の細胞株間で大きく異ならず (Figure 9B)、^[11C]MALA の細胞集積量と相関しなかった (Figure 9C)。これは、^[3H]ALA と^[11C]MALA では、細胞に取り込まれた後の挙動が異なることを示唆する。ALA は、細胞内で代謝され PpIX へと変換されるのに対し、^[11C]MALA は、ALAD 存在下でインキュベートしても代謝物を生じなかった。このように、^[11C]MALA と^[3H]ALA の細胞集積量の違いは、^[3H]ALA

が細胞内で代謝されるのに対し、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ は、細胞内で代謝されることなく排出もしくは滞留することに起因すると考えられる。

ALAD の発現量は ALA を投与した際の PpIX 蓄積量を決定する^{26, 27)}と報告されている。本研究においても、ウェスタンブロッティングにより求めた ALAD の発現量が *in vitro* で ALA を細胞とインキュベートした際に細胞内に蓄積する PpIX 量と相関し (Figure 12B)、ALA の取り込みと ALAD 発現量の評価が PpIX 蓄積量の予測に有用である可能性が示された。 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の細胞集積量は、ALAD の発現量と相関した (Figure 12C)。MALA は、ALAD の活性部位に結合し ALAD の阻害剤として働くことが知られており³⁰⁾、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ は細胞内に取り込まれた後に ALAD と結合することで、ALAD の発現量に依存して細胞内に滞留することが示唆された。さらに、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の細胞集積量は、細胞を ALA とインキュベートした際に蓄積する PpIX 量とも相関しており、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ -PET により ALA 投与時の腫瘍における PpIX 蓄積量を予測できる可能性を認めた。

3-4 小活

培養細胞を用いた *in vitro* における検討より、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍細胞への集積量は、ALA の細胞取り込みおよび ALAD による代謝を反映することで、PpIX 蓄積量を評価できる可能性が示された。

4. 第三章 腫瘍モデルマウスを用いた¹¹C]MALA の評価

¹¹C]MALA の腫瘍集積取り込み量は、ALA の細胞取り込みおよび ALAD による代謝を反映することで、PpIX 蓄積量を評価できる可能性が *in vitro* において示された。一方で、*in vivo* イメージングでは、PET プローブの細胞への取り込みや細胞内における滞留に加え、組織への血流や PET プローブの血中からの消失などが PET 画像に大きな影響を与える。本章では、腫瘍モデルマウスを用いて *in vivo* における¹¹C]MALA の ALA 投与時の腫瘍 PpIX 蓄積量を予測する PET プローブとしての有用性を評価した。

4-1 方法

第一章・第二章で使用した試薬、機器について、必要なものは同様に使用した。HILIC-HPLC は、カラムに COSMOSIL HILIC (4.6 mm ID × 150 mm、ナカライテスク) を用い、流速 1.0 mL/分で acetonitrile /30 mM ammonium acetate 水溶液 (75/25, v/v) 混液により溶出した。その他の試薬と溶媒は、特級試薬を精製せずに使用した。

4-1-1 動物

BALB/c-nu/nu 雄性マウス (5 週齢) は、日本エスエルシー (静岡、日本) より購入した。AsPC-1 細胞 (3×10^6 個) もしくは U-87 MG 細胞 (5×10^6 個) は、100 μ L の D-PBS (-) に懸濁し、マウス両肩の皮下に移植した。BxPC-3 細胞 (2×10^6 個) もしくは MIA PaCa-2 細胞 (1×10^7 個) は、BD Matrigel Matrix (BD Biosciences, Bedford, MA)/D-PBS (-) (1/1, v/v) 混液 100 μ L に懸濁し、同様に移植した。すべての動物実験は、放射線医学総合研究所所内規定の動物実験法に従い、所内動物実験委員会の承認を得て実施した。

4-1-2 ¹¹C]MALA および³H]ALA の正常マウス体内分布試験

BALB/c-nu/nu 雄性マウス (6 週齢) の尾静脈より、16 MBq の¹¹C]MALA と 18.5 kBq の³H]ALA を含む生理食塩水溶液 100 μ L を投与した。投与 1、10、30、60、90 分後に各群 5 匹のマウスを屠殺し、血液および関心臓器を採取、重量を測定後、¹¹C の放射活性をオートウェルガンマカウンタにより測定した。¹¹C の放射活性が減衰後、50-200 mg の組織を 1 mL の組織可溶化剤 (Soluen-350, PerkinElmer) に加え、60°C でインキュベートすることにより溶解し、50 μ L の過

酸化水素水を添加し、脱色した。血液は、50 μ L を採取し、100 μ L の過酸化水素水で脱色した後、1 mL の Soluen-350 に溶解した。すべての組織溶解液に 9 mL の Hionic-Fluor を添加後、液体シンチレーションカウンタを用いて ^3H の放射活性を測定した。各臓器への集積量は、投与量に対する百分率を臓器重量 1 g あたりに補正した %ID/g で表記した。

4-1-3 [^{11}C]MALA および [^3H]ALA の腫瘍モデルマウス体内分布試験

動物実験は、腫瘍が直径 10 mm 程度に成長した時点で実施した。各腫瘍モデルマウスの尾静脈より、 9.15 ± 2.69 MBq の [^{11}C]MALA と 18.5 kBq の [^3H]ALA を含む生理食塩水溶液 100 μ L を投与した。投与 1、10、60 分後に各群 4 匹のマウスを屠殺し、血液および関心臓器の重量と放射活性を、正常マウスにおける体内動態試験と同様の方法で測定した (n=4)。

4-1-4 *In vivo* 安定性試験

AsPC-1 移植マウスに 50.06 MBq の [^{11}C]MALA を投与し、投与 10 分後に断頭により屠殺した。屠殺後直ちに血液を採取し、4°C において $15,000 \times g$ で 4 分間遠心分離し、血漿を得た。得られた血漿 200 μ L に 600 μ L の acetonitrile を混合し、再度 4°C において $15,000 \times g$ で 4 分間遠心分離することで除タンパクを行った。肝臓、脾臓および AsPC-1 腫瘍の一部の重量を測定し、2 倍 (w/v) 量の acetonitrile を加えホモジナイズし、4°C において $15,000 \times g$ で 4 分間遠心分離し上清を回収した。除タンパク後の血漿と各組織のホモジネートを HILIC-HPLC にて分析した。

4-1-5 Dynamic PET 撮像

各腫瘍モデルマウスの尾静脈に、イソフルラン麻酔下、[^{11}C]MALA (11.35 ± 0.94 MBq) の生理食塩水溶液 100 μ L を投与し、投与直後から 90 分間 (5 \times 1 min, 5 \times 5 min, 3 \times 10 min, and 2 \times 15 min) 小動物用 PET 装置 (Inveon, Siemens Medical Solutions, Malvern, PA) を用いて dynamic PET 撮像を行った。撮像中は、白熱灯とヒーターを用いて体温を 37°C 付近に保った。画像は、3 次元最大事後推定法 (3D maximum a posteriori) により吸収補正をせずに再構成を行った。PET 画像上の腫瘍に ROI を手作業で設定し、ROI 中の放射活性濃度の平均値を算出した (n=4)。腫瘍からの放射活性の消失相の各タイムポイントにおける放射活性の ROI

内濃度を時間に対してプロットし、最小二乗法により双指数関数に近似した。回帰曲線の消失後期相を腫瘍放射活性が最大値になる時間に外挿した切片を、腫瘍最大放射活性で除し、retention fraction (RF) を求めた (Figure 13)。

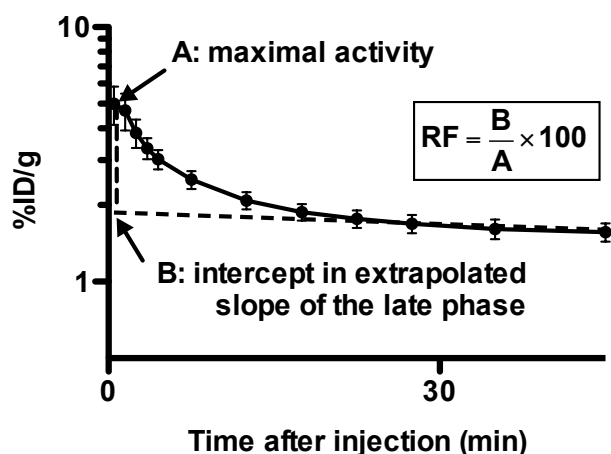


Figure 13. TAC の解析

消失後期相を腫瘍放射活性が最大値になる時間に外挿した切片 (B) を、腫瘍最大放射活性 (A) で除し、RF を算出した。

4-1-6 *In vivo* 阻害実験

11.59 ± 0.82 MBq の¹¹C]MALA を 0、1.0、もしくは 4.0 mg の非放射性 ALA と混合し、AsPC-1 移植マウスに尾静脈から投与した。投与 1、10、60 分後に各群 4 匹のマウスを屠殺し、血液および関心臓器の重量と放射活性を、正常マウスにおける体内動態試験と同様の方法で測定した。また、上述の方法で、投与直後から 90 分間 dynamic PET 撮像を行った。

4-1-7 ALA 投与時の腫瘍 PpIX 蓄積量の定量

各腫瘍モデルマウスの尾静脈より、6.0 mg の ALA を投与し、4 時間後に屠殺・腫瘍を採取した。50-200 mg の腫瘍を秤量し、1 M perchloric acid 水溶液と methanol の混液 (1:1, v/v) 1 mL を加え、Mixer Mill MM300 (QIAGEN KK, 東京, 日本) を用いて 25 s⁻¹ で 4 分間ホモジナイズした。ホモジネートを 4°C において

1,000 × g で 10 分間遠心分離し、上清を 200 μL 採取し蛍光 (励起波長 405 nm、蛍光波長 620 nm) を測定した。種々の濃度の PpIX を 1 M perchloric acid 水溶液と methanol の混液 (1:1, v/v) に溶解し、同様の蛍光を測定することで検量線を作成し、ホモジネート中の PpIX を定量した。対照実験として、PBS を投与し 4 時間後に腫瘍を採取し、同様の測定を行った。PpIX 蓄積量は、腫瘍から抽出された PpIX 量 (ng) を腫瘍の重量 1 mg あたりに補正して表記した (n = 4)。

4-1-8 *Ex vivo* オートラジオグラフィと腫瘍切片における PpIX 蛍光測定および ALAD 蛍光免疫染色

AsPC-1 移植マウスに 6.0 mg の ALA を尾静脈より投与し、3 時間後に 84.91 MBq の [¹¹C]MALA を投与した。さらに 60 分後 (ALA 投与 4 時間後) にマウスを屠殺し、腫瘍を optical-cutting-temperature compound, Sakura, 東京, 日本) 中で凍結した。以降、蛍光顕微鏡観察までの操作はすべて、可能な限り遮光条件下で行った。厚さ 20 μm の切片を作製し風乾後、イメージングプレート (FUJIFILM) に 20 分間接触させ、bio-imaging-analyzer (BAS) を用いて、放射活性の分布を画像化した。

¹¹C の放射活性が減衰後、切片を 4% paraformaldehyde・リン酸緩衝液 (和光純薬) を 100 μL 添加し、室温で 15 分間固定した。0.05% Tween-20 (v/v) を添加した D-PBS (-) (PBS-T) に溶解した 1% (w/v) BSA (1% BSA/PBS-T) を用い室温で 30 分間ブロッキングし、1% BSA/PBS-T で 100 倍 (0.02 mg/mL) に希釈した抗 ALAD 抗体 (Innitrogen, Carlsbad, CA) と室温で 30 分間反応させた。反応終了後、D-PBS (-) で 3 回洗浄し、Alexa Fluor 488 標識抗 rabbit 抗体 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) と 1% BSA/PBS-T 中室温で 30 分間反応し、過剰の抗体を D-PBS (-) で 3 回洗浄し除去した。切片を封入後、顕微鏡 (BX53, Olympus) を用いて、Alexa Fluor 488 と PpIX の蛍光をそれぞれ観察した。

観察後のスライドガラスを D-PBS (-) で一晩洗浄することで、封入剤を除去し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。すなわち、切片を精製水で洗浄後 Hematoxylin に 20 秒浸し、流水で 5 分間洗浄した。その後、精製水で洗浄後、Eosin に 5 分間浸し、再度流水で 5 分間洗浄した。精製水で洗浄後、50%、70%、90%、95%、99.5%、99.5% ethanol 水溶液 (v/v) に 3 分ずつ浸し、最後に脱水 ethanol に 3 分間浸すことで、組織中の水を除いた。その後、xylene に 5 分ずつ 3 回浸すことで、ethanol を xylene に置換し、Mount-Quick を用いて封入した。染色し

た切片を顕微鏡 (BX53) を用いて明視野で観察した。

4-1-9 統計解析

実験結果は、平均値 ± 標準偏差 (SD) として表記した。*In vivo* 阻害実験における多群間比較では、分散分析 (ANOVA) の後 **Dunnnett** の多重比較検定を用いた。各測定値間の関係は、**Pearson** の相関分析を用いて分析した。

4-2 結果

4-2-1 [¹¹C]MALA および [³H]ALA の正常マウス体内動態

[¹¹C]MALA および [³H]ALA 投与一定時間後における放射活性の分布を Table 3 および 4 に示す。 [¹¹C]MALA の血液濃度は、尾静脈から投与 1 分後から 10 分後までに、 $10.54 \pm 0.93\%ID/g$ から $3.94 \pm 1.80\%ID/g$ へと速やかに減少した。 [¹¹C]MALA は、投与 10 分後に最も高く集積し、その後減少したことから、尿排泄が主な排出経路であることが示唆された。 [³H]ALA は [¹¹C]ALA と同様に速やかに血液から消失した。

Table 3. [¹¹C]MALA の正常マウス体内分布 (%ID/g ± SD)。

	1 min	10 min	30 min	60 min	90 min
Blood	10.54 ± 0.93	3.94 ± 1.80	1.78 ± 0.16	1.56 ± 0.45	1.00 ± 0.15
Brain	0.37 ± 0.03	0.20 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Heart	5.07 ± 0.53	2.14 ± 0.31	1.62 ± 0.13	1.41 ± 0.07	0.95 ± 0.06
Lung	9.52 ± 0.81	4.31 ± 0.59	3.03 ± 0.53	2.14 ± 0.27	1.33 ± 0.25
Liver	8.92 ± 0.75	10.75 ± 0.58	5.30 ± 0.67	3.71 ± 0.54	2.23 ± 0.31
Spleen	6.03 ± 0.79	15.20 ± 0.60	10.10 ± 1.32	6.79 ± 0.93	5.08 ± 1.88
Pancreas	3.14 ± 0.21	2.26 ± 0.09	1.96 ± 0.52	1.61 ± 0.19	1.12 ± 0.17
Stomach	5.03 ± 0.34	3.12 ± 0.33	1.86 ± 0.20	1.78 ± 0.31	1.05 ± 0.08
Intestine	7.47 ± 1.06	7.34 ± 0.57	4.90 ± 0.73	4.20 ± 0.88	2.48 ± 0.28
Kidney	61.63 ± 7.95	91.30 ± 6.53	51.32 ± 8.20	32.78 ± 4.44	19.30 ± 2.66
Muscle	2.64 ± 0.13	1.04 ± 0.12	0.83 ± 0.30	0.61 ± 0.09	0.80 ± 0.95
Bone	4.60 ± 0.84	3.06 ± 0.12	1.77 ± 0.51	1.50 ± 0.44	1.09 ± 0.49

This table was originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo-[6-¹¹C]Hexanoic Acid as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*. 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

Table 4. [³H]ALA の正常マウス体内分布 (%ID/g ± SD)。

	1 min	10 min	30 min	60 min	90 min
Blood	7.01 ± 0.85	2.12 ± 0.39	1.57 ± 0.15	1.14 ± 0.21	1.16 ± 0.13
Brain	0.75 ± 0.14	0.64 ± 0.11	0.99 ± 0.10	0.97 ± 0.15	0.59 ± 0.28
Heart	3.63 ± 0.36	1.22 ± 0.16	0.98 ± 0.09	0.83 ± 0.18	0.43 ± 0.06
Lung	5.93 ± 0.50	2.58 ± 0.25	1.70 ± 0.28	1.31 ± 0.16	1.02 ± 0.18
Liver	7.28 ± 0.60	11.85 ± 1.07	11.03 ± 0.76	12.59 ± 0.63	10.36 ± 0.42
Spleen	2.70 ± 0.67	2.60 ± 0.65	1.88 ± 0.52	1.24 ± 0.17	0.82 ± 0.15
Pancreas	3.54 ± 0.42	2.15 ± 0.08	1.91 ± 0.26	1.72 ± 0.17	1.18 ± 0.26
Stomach	2.77 ± 0.13	2.43 ± 0.15	1.94 ± 0.44	1.65 ± 0.27	1.17 ± 0.44
Intestine	4.41 ± 0.31	2.50 ± 0.20	2.17 ± 0.21	1.70 ± 0.24	1.18 ± 0.11
Kidney	23.46 ± 2.04	14.48 ± 1.94	9.52 ± 0.24	7.15 ± 0.78	5.25 ± 1.00
Muscle	2.59 ± 0.35	1.64 ± 0.28	1.18 ± 0.14	1.04 ± 0.12	0.76 ± 0.28

4-2-2 [¹¹C]MALA および [³H]ALA の腫瘍集積

In vitro における検討に用いた Sk-Br-3 細胞は、雄性および雌性いずれのヌードマウスにも皮下腫瘍を形成しなかったため、*in vivo* における腫瘍集積や、ALA 投与時の PpIX 蓄積量の検討は、残る 4 種類の細胞株 (AsPC-1, U-87MG, BxPC-3 および MIA PaCa-2) を用いて行った。 [¹¹C]MALA および [³H]ALA の投与 1、20、60 分後における腫瘍集積量および集積量の腫瘍/正常筋肉比を Tables 5 および 6 に示す。 [¹¹C]MALA は、AsPC-1 腫瘍に最も長く蓄積し、他の 3 種の腫瘍では、投与 1 分後に集積した後、減少した。一方で、 [³H]ALA の投与 20、60 分後における腫瘍集積量は、4 種類の腫瘍間で大きな差は認められなかった。 [¹¹C]MALA の投与 1 分後における腫瘍/筋肉比は、 [³H]ALA の腫瘍/筋肉比と正の相関を示した (Figure 14)。

Table 5. [¹¹C]MALA と [³H]ALA の *in vivo* 腫瘍集積 (%ID/g)。

	[¹¹ C]MALA			[³ H]ALA		
	1 min	10 min	60 min	1 min	10 min	60 min
AsPC-1	3.45 ± 0.71	7.10 ± 0.37	6.48 ± 1.61	5.22 ± 1.06	2.10 ± 0.14	1.74 ± 0.27
U-87 MG	3.97 ± 0.95	2.63 ± 0.37	1.95 ± 0.24	4.92 ± 1.42	2.87 ± 1.13	1.22 ± 0.10
BxPC-3	3.54 ± 0.92	3.08 ± 0.19	1.60 ± 0.50	4.05 ± 1.35	3.07 ± 0.19	1.61 ± 0.25
MIA PaCa-2	3.23 ± 1.54	2.05 ± 0.47	0.89 ± 0.04	2.20 ± 0.06	2.88 ± 0.37	1.84 ± 0.25

This table was originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo-[6-¹¹C]Hexanoic Acid as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*. 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

Table 6. [^{11}C]MALA と [^3H]ALA の腫瘍/正常筋肉比。

	[^{11}C]MALA			[^3H]ALA		
	1 min	10 min	60 min	1 min	10 min	60 min
AsPC-1	1.94 ± 0.81	7.56 ± 0.30	10.83 ± 0.98	0.94 ± 0.16	1.07 ± 0.06	1.60 ± 0.14
U-87 MG	2.11 ± 0.29	3.61 ± 0.37	3.92 ± 0.15	1.09 ± 0.56	1.71 ± 0.47	1.14 ± 0.17
BxPC-3	1.32 ± 0.32	2.32 ± 0.52	5.80 ± 0.58	0.72 ± 0.28	1.24 ± 0.25	1.51 ± 0.09
MIA PaCa-2	1.43 ± 0.65	1.83 ± 0.76	1.86 ± 0.18	0.72 ± 0.29	1.05 ± 0.30	1.42 ± 0.19

This table was originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo-[6- ^{11}C]Hexanoic Acid as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*. 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

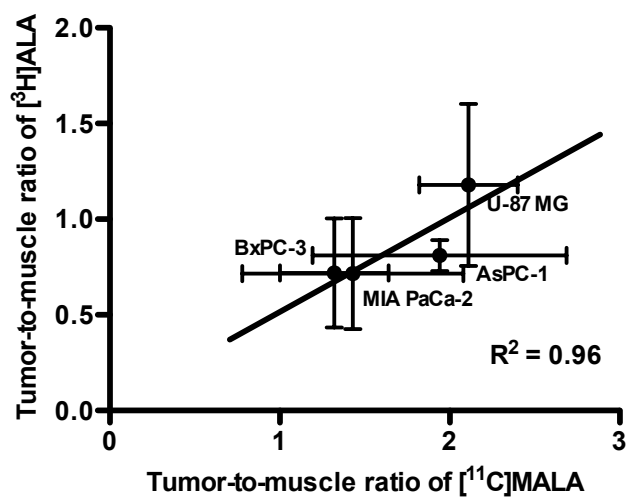


Figure 14. 投与 1 分後における [^{11}C]MALA と [^3H]ALA の腫瘍/筋肉比の関係

4-2-3 *In vivo* における安定性

[¹¹C]MALA 投与 10 分後の各組織中の ¹¹C 放射活性の化学形を除タンパク後に HILIC-HPLC で分析した結果を Figure 15 に示す。除タンパク前後の血漿および肝臓、脾臓、AsPC-1 腫瘍抽出物中には、未変化体の [¹¹C]MALA 以外の放射活性はほとんど認められなかった。

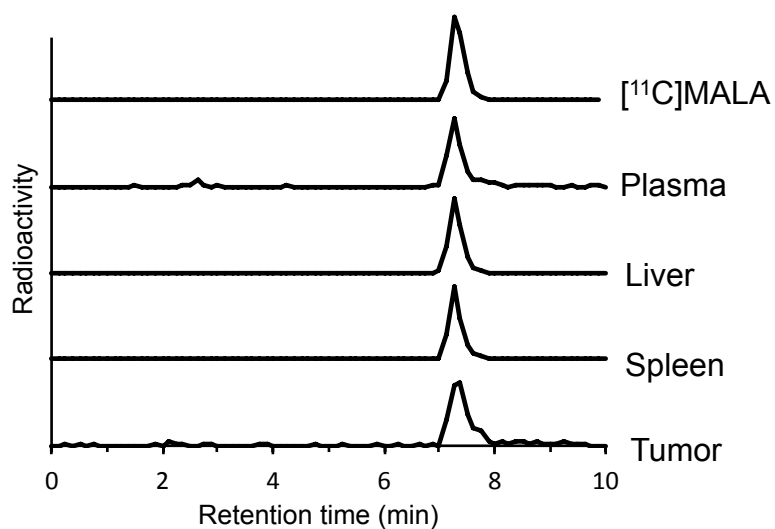


Figure 15. [¹¹C]MALA の *in vivo* 安定性
除タンパク後の HILIC-HPLC 分析結果

4-2-4 Dynamic PET

$[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ を投与後、1-2 分、5-10 分、60-75 分後のマウスの腫瘍を含む体軸横断面 PET 画像を Figure 16A に、腫瘍 ROI 内の放射活性濃度の平均値を経時的にプロットした時間放射能曲線 (time activity curve, TAC) を Figure 16B に示す。 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ は、4 種類の腫瘍への集積は、投与 5 分後までに最大値に達しその後経時的に減少した。腫瘍からの消失速度は、AsPC-1 腫瘍で他の 3 種類の腫瘍より顕著に遅く、投与 90 分後まで大部分の放射活性が腫瘍内に保持された。TAC から算出した RF の値を Table 7 に示す。RF の値は、AsPC-1 腫瘍で、 99.06 ± 1.82 ともっとも高く、他の 3 種類の腫瘍では AsPC-1 と比較して低値であった。

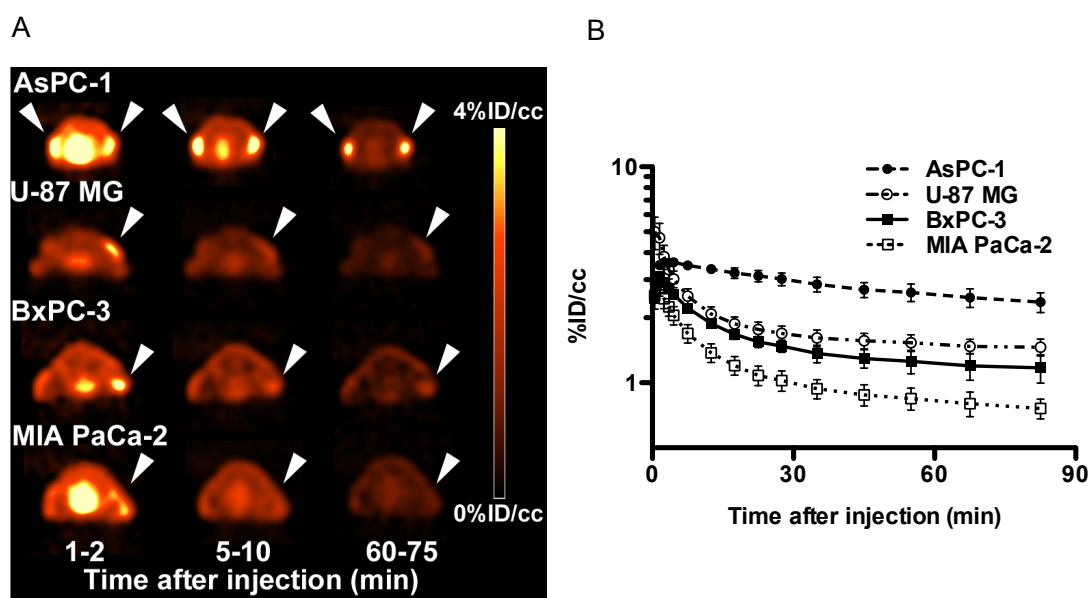


Figure 16. Dynamic PET 撮像

(A) 腫瘍モデルマウスにおける $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ 体軸横断面 PET 画像 (B) 腫瘍における $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の TAC

These figures were originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo- $[6-^{11}\text{C}]\text{Hexanoic Acid}$ as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*. 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

Table 7. PET 画像から算出した $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の RF

	RF (%)
AsPC-1	99.06 ± 1.82
U-87 MG	37.38 ± 3.08
BxPC-3	51.61 ± 4.12
MIAPaCa-2	41.46 ± 2.73

This table was originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo- $[6-^{11}\text{C}]\text{Hexanoic Acid}$ as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med.* 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

4-2-5 *In vivo* 競合阻害

$[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ を過剰の非放射性 ALA と同時投与した際の、解剖法により求めた放射活性の血中濃度の経時変化を Figure 17A に、PET 画像より求めた腫瘍内 ROI 内放射活性濃度を Figure 17B にそれぞれ示す。 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の血液クリアランスは、過剰の ALA の同時投与の有無および ALA の濃度によって変化しなかった。一方で腫瘍集積は、過剰の ALA の同時投与により ALA の濃度依存的に、初期取込量が低下し、さらに腫瘍からの消失速度が上昇した。PET 画像から算出した RF の値を Table 8 に示す。 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の AsPC-1 腫瘍における RF は、1.0 もしくは 4.0 mg の ALA を同時に投与することで、 99.06 ± 1.82 から 69.8 ± 12.3 および 55.07 ± 9.64 にそれぞれ低下した。

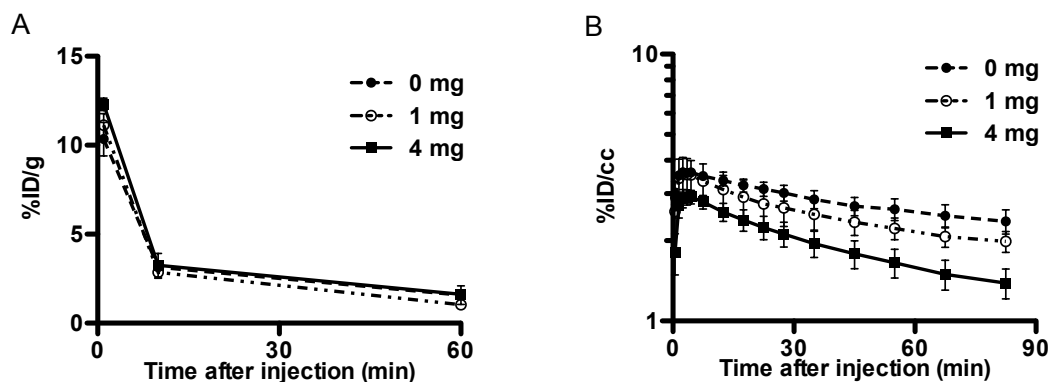


Figure 17. *In vivo* 阻害実験

過剰の非放射性 ALA を同時投与した際の $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の (A) 血液中放射活性濃度, (B) PET 画像より算出した腫瘍集積。

These figures were originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo- $[6-^{11}\text{C}]\text{Hexanoic Acid}$ as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*. 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

Table 8. *In vivo* 阻害実験における $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の RF.

ALA (mg)	RF (%)
0	99.06 ± 1.82
1	69.68 ± 12.3 ^a
4	55.07 ± 9.64 ^b

^a $P < 0.05$ and ^b $P < 0.01$ compared with the RF of AsPC-1 without unlabeled ALA determined by Dunnett's multiple comparison test.

This table was originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo- $[6-^{11}\text{C}]\text{Hexanoic Acid}$ as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*. 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

4-2-6 ALA 投与時に腫瘍に蓄積する PpIX 量

マウスにおける ALA 投与後に腫瘍に蓄積するポルフィリン量は、さまざまな腫瘍に対して調べられており、300 mg/kg of body weight の ALA を投与した 3-5 時間後に最大値に達することが知られている⁴⁵⁾。そこで本研究では、6 mg の ALA を投与した 4 時間後に腫瘍内に存在する PpIX の量を蛍光測定により定量した。4 種類の腫瘍における PpIX の蓄積量を Figure 18A に示す。PpIX は、AsPC-1 腫瘍に最も高く蓄積し、残る 3 種の腫瘍における蓄積量は低値であった。4 種類腫瘍における PpIX の蓄積量と¹¹C]MALA 投与 60 分後の集積量の関係を Figure 18B に示す。ALA を投与した 4 時間後における PpIX 蓄積量は、¹¹C]MALA 投与 60 分後の腫瘍集積量と正の相関を示した。

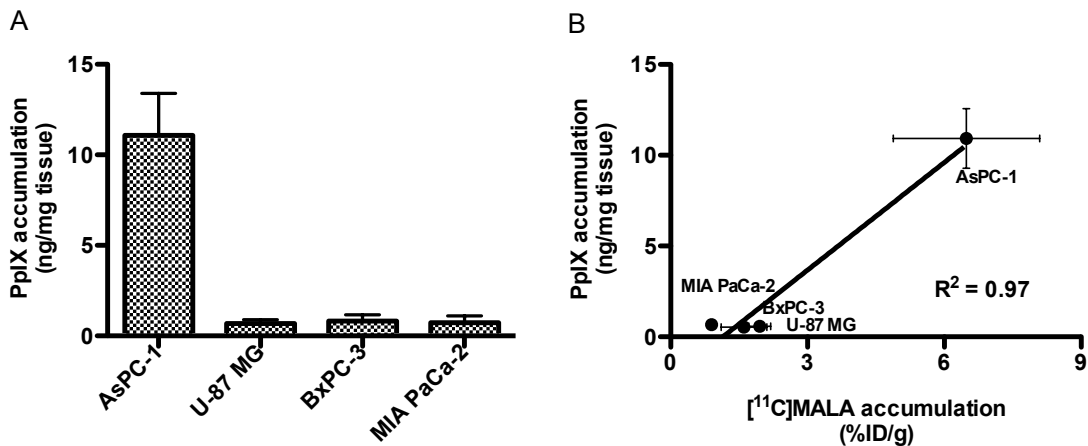


Figure 18. *In vivo* における PpIX 蓄積量

(A) ALA を投与と 4 時間後の腫瘍 PpIX 蓄積量, (B) ¹¹C]MALA の投与 60 分後における腫瘍集積量と ALA 投与 4 時間後の PpIX 蓄積量の関係。

These figures were originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo-[6-¹¹C]Hexanoic Acid as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*. 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

4-2-7 [¹¹C]MALA の集積、ALAD 発現および PpIX 蓄積量の腫瘍内分布

腫瘍における [¹¹C]MALA のオートラジオグラムと ALA 投与により蓄積した PpIX の腫瘍内分布をそれぞれ Figure 19A および 19B に示す。 [¹¹C]MALA は腫瘍内に不均一に分布し、放射活性の局在が認められた。ALAD の発現量の腫瘍内分布を蛍光免疫染色により評価した結果を Figure 19C に示す。ALA 投与により蓄積した PpIX の大部分は、ALAD の高発現部位に存在した。 [¹¹C]MALA の腫瘍内分布は、ALAD の発現および PpIX 蓄積の腫瘍内分布と完全には一致しないものの類似した傾向を示した。ネクロシスなどの組織学的異常を評価するために HE 染色を行った結果を併せて Figure 19D に示す。腫瘍内に明らかなネクロシス部位は存在しなかった。

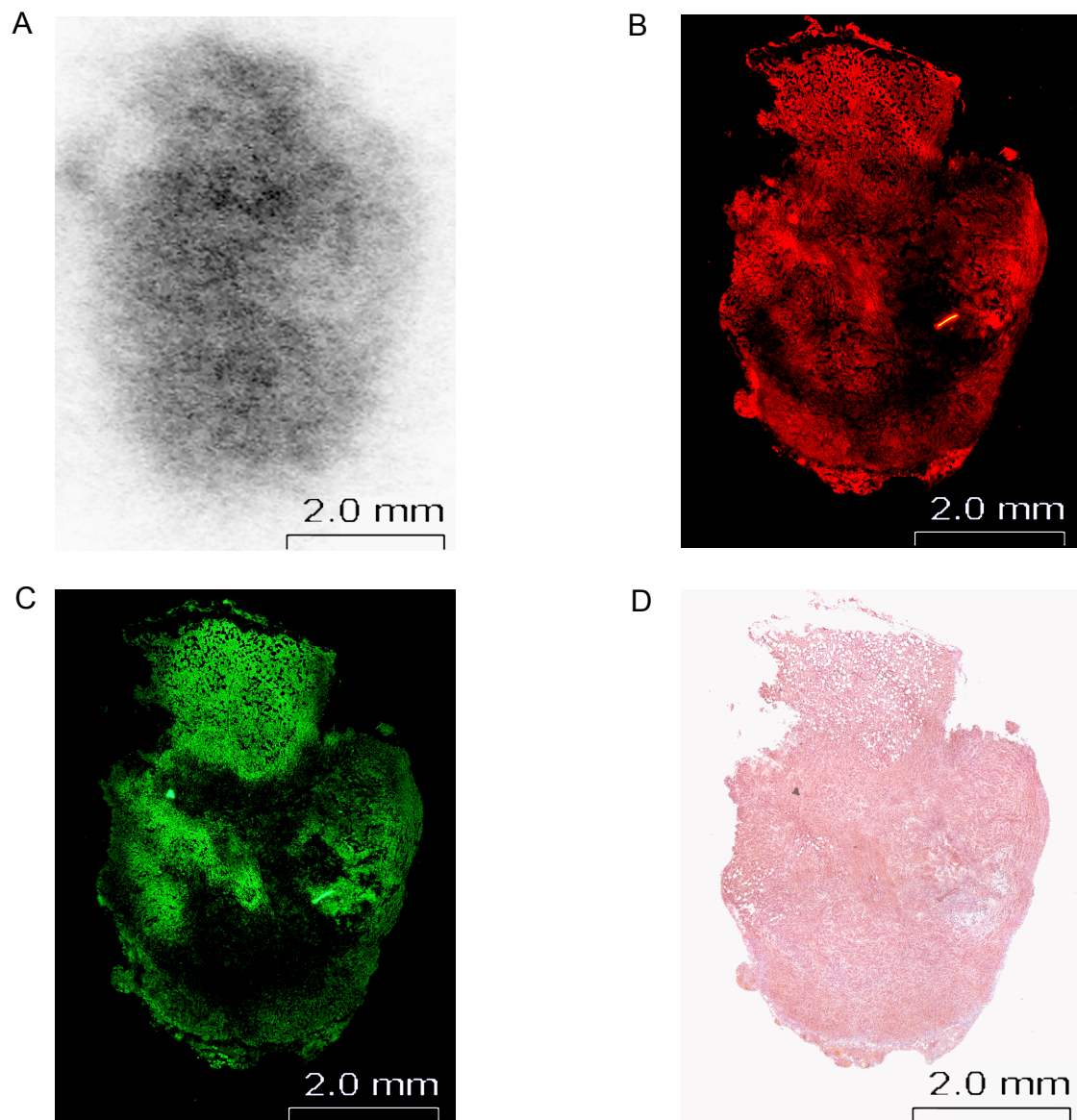


Figure 19. [^{11}C]MALA の集積、ALAD 発現および PpIX 蓄積量の腫瘍内分布

(A) [^{11}C]MALA 投与 60 分後における腫瘍切片オートラジオグラム, (B) PpIX の蛍光画像, (C) ALAD 蛍光免疫染色, (D) HE 染色。

These figures were originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo-[6- ^{11}C]Hexanoic Acid as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med.* 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

4-3 考察

[¹¹C]MALA および [³H]ALA は、いずれも速やかに血液中から消失し、尿中へと排泄された。 [¹¹C]MALA は投与後速やかに腫瘍へ集積し、PET 画像より求めた [¹¹C]MALA や [³H]ALA の腫瘍集積は、投与 5 分後までに最大値に達した。 [¹¹C]MALA の投与早期における腫瘍集積量は、主に血流やトランスポーターを介した両化合物の細胞内への取り込みを反映すると考えられる。 *In vitro* における検討より、 [¹¹C]MALA と ALA は共通した機序により細胞内に輸送されることから、投与早期における [¹¹C]MALA の腫瘍集積量は、ALA の腫瘍集積量を反映すると期待される。実際に投与 1 分後における [¹¹C]MALA と [³H]ALA の集積量の腫瘍/正常筋肉比を比較したところ、両者には正の相関が認められ、 [¹¹C]MALA の腫瘍取り込みが [³H]ALA の腫瘍取り込みを反映することが示唆された。

[¹¹C]MALA は、投与後速やかに血液中から消失し、血液および [¹¹C]MALA の集積の高かった肝臓、脾臓および AsPC-1 腫瘍において代謝物はほとんど観察されなかった。これらの結果は、*in vivo* において [¹¹C]MALA が安定に存在し、また、 [¹¹C]MALA の投与直後を除き、腫瘍への血液からの放射活性の供給はほとんどないことを示す。従って、投与早期において腫瘍に集積した放射活性の投与後期における減少は、ほとんど [¹¹C]MALA の腫瘍からの排出のみを反映する。PET 画像より算出した TAC の片対数プロット (Figure 16B) の形状は、4 種の腫瘍における放射活性が一過性の取り込みの後、二相性に消失することを示す。この結果は、腫瘍内に異なる消失速度をもつ二成分が存在することを示唆する。本薬剤設計において、 [¹¹C]MALA は、腫瘍内に取り込まれた後に ALAD と結合して腫瘍内に滞留することから、この消失速度の異なる二成分は、ALAD と結合した [¹¹C]MALA ([¹¹C]MALA-ALAD 複合体) と、非結合の [¹¹C]MALA であり、非結合の [¹¹C]MALA が、消失前期相における速い消失を、 [¹¹C]MALA-ALAD 複合体が消失後期相における遅い消失を示すと想定される (Figure 20)。本モデルにおいて RF は、腫瘍細胞内に取り込まれた全放射活性のうち、ALAD と結合した放射活性の割合を近似的に示す。 [¹¹C]MALA は、*in vitro* の検討においてもっとも高い ALAD の発現量を示した AsPC-1 腫瘍に、他の 3 種の腫瘍と比較して長く滞留し、高い RF の値を示した。これより [¹¹C]MALA は、腫瘍内で ALAD と結合することで、ALAD の発現量に依存して腫瘍内に滞留することが示唆される。さらに、過剰の ALA を用いた *in vivo* 競合阻害実験では、ALA の投与量依存的に [¹¹C]MALA の投与初期における取り込みと投与後期における滞留が阻

害された。ALA の投与量に関わらず $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の血液クリアランスは一定であったことから、これらの腫瘍放射活性の変化は、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の全身動態の変化に伴う腫瘍組織への供給量の変化ではなく、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍細胞への取り込みや排出の変化に起因することを示す。従って、過剰の ALA の同時投与による $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍への初期取り込みおよび投与後期における滞留の阻害は、*in vivo* において $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ が ALA と共通した機序により腫瘍に取り込まれ、また、その滞留機序も細胞内における ALA の挙動と競合することを示す。ALA は細胞内で PpIX へと変換される過程で最初に ALAD の作用により PBG へと代謝されることから、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ と ALA が ALAD の活性部位で競合することにより、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA-ALAD}$ 複合体の形成が阻害され、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍細胞からの排出が促進されたと考えられる。これらの結果は、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ が ALA と共通した機序により細胞に取り込まれ、ALAD と結合することで ALAD の発現量依存的に細胞内に滞留するという仮説を支持する。

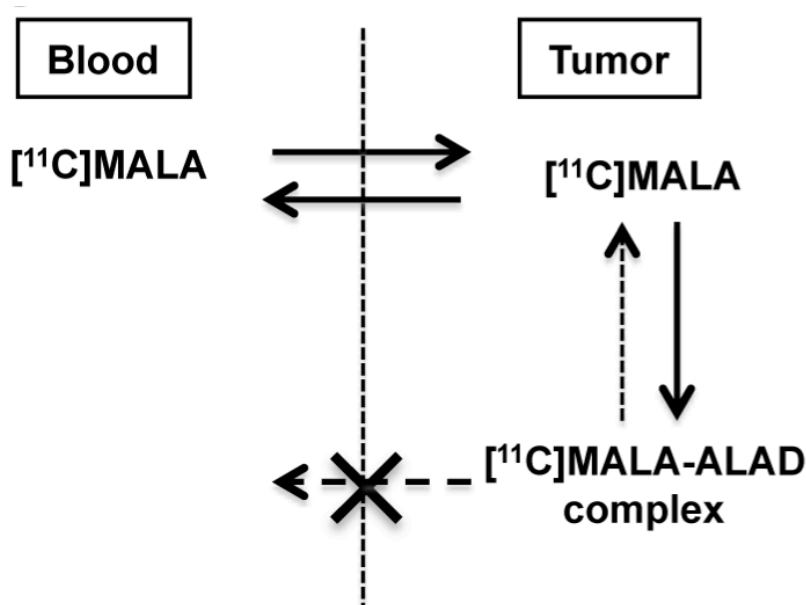


Figure 20. $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍滞留機序

This figure was originally published in *JNM*. C. Suzuki et al. Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo- $[6-^{11}\text{C}]\text{Hexanoic Acid}$ as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med.* 2014;55:1671-1677. © by the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Inc.

[¹¹C]MALA の消失後期相における腫瘍集積量は、[¹¹C]MALA の腫瘍取り込みと滞留の両方の影響を受けることから、ALA の腫瘍取り込みと細胞内における代謝の一部を反映し、ALA 投与時の PpIX 蓄積量の予測に有用であると期待される。TAC の片対数プロットの傾きが投与 30 分後以降ほぼ一定になることから、¹¹C の半減期を考慮し、投与 60 分後における [¹¹C]MALA の腫瘍集積と ALA 投与時の PpIX 蓄積量との関係性を評価した。[¹¹C]MALA の投与 60 分後における腫瘍集積量は、ALA 投与 4 時間後における PpIX 蓄積量と相関し、[¹¹C]MALA を投与した 60 分後に PET 撮像を行うことで、治療時の PpIX 蓄積量を予測できる可能性が示された。PDT や SDT の治療効果は、腫瘍に蓄積する PpIX の量によって大きく影響を受ける^{15,16)}。従って、[¹¹C]MALA を用いた PET により治療前に PpIX 蓄積量を予測出来れば、ALA を用いた PDT や SDT の治療効果を予測でき、PDT や SDT に適した患者の選択に有用な情報を与えると期待される。

ALA を投与した際の PpIX 蓄積は、腫瘍内においても不均一な分布を示すことが知られる^{13,14)}。そこで、皮下腫瘍内における [¹¹C]MALA および ALA 投与後の PpIX 蓄積の腫瘍内分布を評価した。マウスの腫瘍は 10 mm 程度であり、空間分解能が数 mm 程度である PET を用いた腫瘍内分布の評価は困難であることから、凍結切片を作製し切片内における分布を評価した。HE 染色により腫瘍内に明らかな壊死部位は認められなかった一方で、腫瘍内における PpIX の分布は不均一であり、[¹¹C]MALA の腫瘍内分布と完全には一致しないものの類似していた。腫瘍内における ALAD の発現量も不均一であり、PpIX の分布と類似していたが、完全には一致しなかった。この結果は、PpIX の蓄積が ALAD の発現のみでなく ALA の腫瘍細胞への取り込みなど複数の要因によって決定することを示す。[¹¹C]MALA の腫瘍内分布も PpIX の腫瘍内分布と完全には一致せず、これは、¹¹C の放出するポジトロン の 飛程 の 長さ に 起因 する 空間 分解 能 の 低 さ に 加 え、腫瘍における ALAD 以外の酵素による代謝や生成した PpIX の腫瘍外への排出などが PpIX 蓄積に関与する可能性²⁵⁾が原因として考えられる。ALA を投与した際に腫瘍に蓄積する PpIX の量を決定する機序は非常に複雑で、動物モデルと臨床検体の乖離も知られることから、臨床検体を用いた更なる評価が [¹¹C]MALA の有用性評価には必要であると考えられるが、以上の結果は [¹¹C]MALA の腫瘍集積が、ALA の取り込みと ALAD による代謝を反映することで PpIX 蓄積の腫瘍内分布を予測できる可能性を示す。PpIX の腫瘍内における不均一な分布は、PDT や SDT における治療効果の減弱につながるほか、FGR においては、偽陰性

に伴う腫瘍摘出率の原因にもなる。 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ -PET 診断より得られる PpIX の分布は、CT や MRI などの他の形態学的画像と容易に組み合わせ可能なことから、腫瘍内における PpIX の空間的な分布を術前に知ることができ、FGR における腫瘍摘出率の向上が期待される。

本研究で開発した標識合成法で合成した $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ は、ラセミ体として得られ、本研究における *in vitro*、*in vivo* 評価は、すべて 2 つのエナンチオマーの混合体を用いて行った。光学活性をもつ化合物は光学特異的な生物学的性質を持つ可能性がある⁴⁶⁾ことから、両エナンチオマーは異なるトランスポーター認識性や ALAD との結合性を示す可能性がある。ラセミ体を用いた本研究において $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の ALA 投与時の PpIX 蓄積量を予測する PET プローブとしての有用性が示されたことから、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の 2 つのエナンチオマーを分離し、それぞれの薬物動態を評価することで、腫瘍により高く特異的に集積する PET プローブの開発が期待される。

4-4 小活

$[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の体内動態は、投与早期に観察される取り込みが ALA の腫瘍取り込みを、投与後期に観察される滞留が ALAD 発現量を反映した。 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の取り込みと滞留の双方の影響を反映する消失後期相における $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ の腫瘍集積量は、ALA 投与時の PpIX 蓄積量と相関し、 $[^{11}\text{C}]\text{MALA}$ -PET は、ALA の細胞取り込みと ALAD による細胞内における代謝を反映することで、ALA 投与時の PpIX 蓄積量を非侵襲的に評価できると期待される。

5. 総括

本研究では、ALA 投与時に腫瘍に蓄積する PpIX 量を予測する PET プローブとして ^{11}C MALA を設計し、 ^{11}C MALA の標識合成法の開発および *in vitro* および *in vivo* における基礎的評価を行った。 ^{11}C MALA は短時間かつ高収率に得られ、 ^{11}C MALA の体内動態は、ALA の腫瘍取り込みおよび ALAD による代謝を反映し、その腫瘍集積量は PpIX 蓄積量と相関した。以上の結果は、 ^{11}C MALA-PET により ALA 投与時の腫瘍における PpIX 蓄積量および腫瘍内分布を治療前に非侵襲的に評価できる可能性を示す。ALA 投与時の PpIX 蓄積量および腫瘍内分布の治療前評価は、FGR におけるさらなる腫瘍摘出率の向上および PDT/SDT に適した患者の選択に有用な情報を与えると期待される。

以上、本研究結果は、 ^{11}C MALA-PET が、より効果的な ALA を用いた腫瘍治療の実施に有用であることを示す。

6. 参考文献

- (1) Pene, F.; Courtine, E.; Cariou, A.; Mira, J. P.: Toward theragnostics. *Critical care medicine*, 37(1 Suppl), S50-58, 2009.
- (2) Franken, A. C.; Lokman, B. C.; Ram, A. F.; Punt, P. J.; van den Hondel, C. A.; de Weert, S.: Heme biosynthesis and its regulation: towards understanding and improvement of heme biosynthesis in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91(3), 447-460, 2011.
- (3) Ohgari, Y.; Nakayasu, Y.; Kitajima, S.; Sawamoto, M.; Mori, H.; Shimokawa, O.; Matsui, H.; Taketani, S.: Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. *Biochem Pharmacol*, 71(1-2), 42-49, 2005.
- (4) Krammer, B.; Plaetzer, K.: ALA and its clinical impact, from bench to bedside. *Photochem Photobiol Sci*, 7(3), 283-289, 2008.
- (5) Colditz, M. J.; Jeffree, R. L.: Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: Clinical, radiological and pathological studies. *J Clin Neurosci*, 19(11), 1471-1474, 2012.
- (6) Stummer, W.; Pichlmeier, U.; Meinel, T.; Wiestler, O. D.; Zanella, F.; Reulen, H. J.; Group, A. L.-G. S.: Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*, 7(5), 392-401, 2006.
- (7) Nokes, B.; Apel, M.; Jones, C.; Brown, G.; Lang, J. E.: Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. *J Surg Res*, 181(2), 262-271, 2013.
- (8) Ohmura, T.; Fukushima, T.; Shibaguchi, H.; Yoshizawa, S.; Inoue, T.; Kuroki, M.; Sasaki, K.; Umemura, S.: Sonodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid and focused ultrasound for deep-seated intracranial glioma in rat. *Anticancer Res*, 31(7), 2527-2533, 2011.
- (9) Peng, Q.; Warloe, T.; Berg, K.; Moan, J.; Kongshaug, M.; Giercksky, K. E.; Nesland, J. M.: 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer*, 79(12), 2282-2308, 1997.
- (10) Kriegmair, M.; Baumgartner, R.; Lumper, W.; Waidelich, R.;

Hofstetter, A.: Early clinical experience with 5-aminolevulinic acid for the photodynamic therapy of superficial bladder cancer. *Br J Urol*, 77(5), 667-671, 1996.

(11) Webber, J.; Kessel, D.; Fromm, D.: Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *J Surg Res*, 68(1), 31-37, 1997.

(12) Gibbs, S. L.; Chen, B.; O'Hara, J. A.; Hoopes, P. J.; Hasan, T.; Pogue, B. W.: Protoporphyrin IX level correlates with number of mitochondria, but increase in production correlates with tumor cell size. *Photochem Photobiol*, 82(5), 1334-1341, 2006.

(13) Widhalm, G.; Wolfsberger, S.; Minchev, G.; Woehrer, A.; Krssak, M.; Czech, T.; Prayer, D.; Asenbaum, S.; Hainfellner, J. A.; Knosp, E.: 5-Aminolevulinic acid is a promising marker for detection of anaplastic foci in diffusely infiltrating gliomas with nonsignificant contrast enhancement. *Cancer*, 116(6), 1545-1552, 2010.

(14) Floeth, F. W.; Sabel, M.; Ewelt, C.; Stummer, W.; Felsberg, J.; Reifenberger, G.; Steiger, H. J.; Stoffels, G.; Coenen, H. H.; Langen, K. J.: Comparison of ¹⁸F-FET PET and 5-ALA fluorescence in cerebral gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 38(4), 731-741, 2011.

(15) Hagiya, Y.; Endo, Y.; Yonemura, Y.; Takahashi, K.; Ishizuka, M.; Abe, F.; Tanaka, T.; Okura, I.; Nakajima, M.; Ishikawa, T.; Ogura, S.: Pivotal roles of peptide transporter PEPT1 and ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 in 5-aminolevulinic acid (ALA)-based photocytotoxicity of gastric cancer cells *in vitro*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 9(3), 204-214, 2012.

(16) Kinoshita, M.; Hynynen, K.: Mechanism of porphyrin-induced sonodynamic effect: possible role of hyperthermia. *Radiat Res*, 165(3), 299-306, 2006.

(17) Valdes, P. A.; Leblond, F.; Kim, A.; Harris, B. T.; Wilson, B. C.; Fan, X.; Tosteson, T. D.; Hartov, A.; Ji, S.; Erkmén, K.; Simmons, N. E.; Paulsen, K. D.; Roberts, D. W.: Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker. *J Neurosurg*, 115(1), 11-17, 2011.

- (18) Valdes, P. A.; Moses, Z. B.; Kim, A.; Belden, C. J.; Wilson, B. C.; Paulsen, K. D.; Roberts, D. W.; Harris, B. T.: Gadolinium- and 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX levels in human gliomas: an *ex vivo* quantitative study to correlate protoporphyrin IX levels and blood-brain barrier breakdown. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71(9), 806-813, 2012.
- (19) Arita, H.; Kinoshita, M.; Kagawa, N.; Fujimoto, Y.; Kishima, H.; Hashimoto, N.; Yoshimine, T.: ¹⁴C-methionine uptake and intraoperative 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence as separate index markers of cell density in glioma: a stereotactic image-histological analysis. *Cancer*, 118(6), 1619-1627, 2012.
- (20) Runge, V. M.; Price, A. C.; Wehr, C. J.; Atkinson, J. B.; Tweedle, M. F.: Contrast enhanced MRI. Evaluation of a canine model of osmotic blood-brain barrier disruption. *Invest Radiol*, 20(8), 830-844, 1985.
- (21) Jager, P. L.; Vaalburg, W.; Pruim, J.; de Vries, E. G.; Langen, K. J.; Piers, D. A.: Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. *J Nucl Med*, 42(3), 432-445, 2001.
- (22) Haberkorn, U.; Markert, A.; Mier, W.; Askoxylakis, V.; Altmann, A.: Molecular imaging of tumor metabolism and apoptosis. *Oncogene*, 30(40), 4141-4151, 2011.
- (23) Phelps, M. E.: Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 9226-9233, 2000.
- (24) Strauss, L. G.; Conti, P. S.: The applications of PET in clinical oncology. *J Nucl Med*, 32(4), 623-648; discussion 649-650, 1991.
- (25) Hagiya, Y.; Fukuhara, H.; Matsumoto, K.; Endo, Y.; Nakajima, M.; Tanaka, T.; Okura, I.; Kurabayashi, A.; Furihata, M.; Inoue, K.; Shuin, T.; Ogura, S.: Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 10(3), 288-295, 2013.
- (26) Feuerstein, T.; Schauder, A.; Malik, Z.: Silencing of ALA dehydratase affects ALA-photodynamic therapy efficacy in K562

- erythroleukemic cells. *Photochem Photobiol Sci*, 8(10), 1461-1466, 2009.
- (27) Gibson, S. L.; Havens, J. J.; Metz, L.; Hilf, R.: Is delta-aminolevulinic acid dehydratase rate limiting in heme biosynthesis following exposure of cells to delta-aminolevulinic acid? *Photochem Photobiol*, 73(3), 312-317, 2001.
- (28) Cumming, P.; Gjedde, A.: Compartmental analysis of dopa decarboxylation in living brain from dynamic positron emission tomograms. *Synapse*, 29(1), 37-61, 1998.
- (29) Gallagher, B. M.; Fowler, J. S.; Gutterson, N. I.; MacGregor, R. R.; Wan, C. N.; Wolf, A. P.: Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [¹⁸F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 19(10), 1154-1161, 1978.
- (30) Erskine, P. T.; Newbold, R.; Brindley, A. A.; Wood, S. P.; Shoolingin-Jordan, P. M.; Warren, M. J.; Cooper, J. B.: The x-ray structure of yeast 5-aminolaevulinic acid dehydratase complexed with substrate and three inhibitors. *J Mol Biol*, 312(1), 133-141, 2001.
- (31) Marazano, C.; Maziere, M.; Berger, G.; Comar, D.: Synthesis of methyl iodide-¹¹C and formaldehyde-¹¹C. *The International journal of applied radiation and isotopes*, 28(1-2), 49-52, 1977.
- (32) Bolton, R.: Isotopic methylation, 44(10), 701-736, 2001.
- (33) O'Donnell, M. J.; Bennett, W. D.; Bruder, W. A.; Jacobsen, W. N.; Knuth, K.; Leclef, B.; Polt, R. L.; Bordwell, F. G.; Mrozack, S. R.; Cripe, T. A.: Acidities of Glycine Schiff-Bases and Alkylation of Their Conjugate Bases. *Journal of the American Chemical Society*, 110(25), 8520-8525, 1988.
- (34) Ooi, T.; Tayama, E.; Maruoka, K.: Highly stereoselective N-terminal functionalization of small peptides by chiral phase-transfer catalysis. *Angewandte Chemie (International ed)*, 42(5), 579-582, 2003.
- (35) Chaly, T.; Diksic, M.: Synthesis of "no-carrier-added" alpha-[¹¹C]methyl-L-tryptophan. *J Nucl Med*, 29(3), 370-374, 1988.
- (36) Kato, K.; Tsuji, A. B.; Saga, T.; Zhang, M. R.: An efficient and expedient method for the synthesis of ¹¹C-labeled alpha-aminoisobutyric acid: a tumor imaging agent potentially useful for cancer diagnosis.

Bioorganic & medicinal chemistry letters, 21(8), 2437-2440, 2011.

- (37) O'Donnell, M. J.; Boniece, J. M.; Earp, S. E.: The synthesis of amino acids by phase-transfer reactions. *Tetrahedron Letters*, 19(30), 2641-2644, 1978.
- (38) Gadmar, O. B.; Moan, J.; Scheie, E.; Ma, L. W.; Peng, Q.: The stability of 5-aminolevulinic acid in solution. *J Photoch Photobio B*, 67(3), 187-193, 2002.
- (39) Taylor, P. J. M.; Bull, S. D.; Andrews, P. C.: An aza-enolate alkylation strategy for the synthesis of alpha-alkyl-delta-amino esters and alpha-alkyl valerolactams. *Synlett*(9), 1347-1350, 2006.
- (40) Shionoya, S.; Urabe, A.; Hashimoto, Y.; Kondo, M.; Urata, G.: Induction of delta-aminolevulinic acid synthase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in normal human bone marrow cultures. *Stem cells*, 2(3), 145-154, 1982.
- (41) Gaullier, J. M.; Berg, K.; Peng, Q.; Anholt, H.; Selbo, P. K.; Ma, L. W.; Moan, J.: Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Res*, 57(8), 1481-1486, 1997.
- (42) Krieg, R. C.; Messmann, H.; Rauch, J.; Seeger, S.; Knuechel, R.: Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. *Photochem Photobiol*, 76(5), 518-525, 2002.
- (43) Novotny, A.; Xiang, J.; Stummer, W.; Teuscher, N. S.; Smith, D. E.; Keep, R. F.: Mechanisms of 5-aminolevulinic acid uptake at the choroid plexus. *Journal of neurochemistry*, 75(1), 321-328, 2000.
- (44) Bermudez Moretti, M.; Correa Garcia, S.; Perotti, C.; Batlle, A.; Casas, A.: δ -Aminolevulinic acid transport in murine mammary adenocarcinoma cells is mediated by beta transporters. *Br J Cancer*, 87(4), 471-474, 2002.
- (45) Hua, Z.; Gibson, S. L.; Foster, T. H.; Hilf, R.: Effectiveness of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin as a photosensitizer for photodynamic therapy *in vivo*. *Cancer Res*, 55(8), 1723-1731, 1995.
- (46) Qu, W.; Zha, Z.; Ploessl, K.; Lieberman, B. P.; Zhu, L.; Wise, D. R.; Thompson, C. B.; Kung, H. F.: Synthesis of optically pure

4-fluoro-glutamines as potential metabolic imaging agents for tumors. *J Am Chem Soc*, 133(4), 1122-1133, 2009.

7. 論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Chie Suzuki, Koichi Kato, Atsushi Tsuji, Tatsuya Kikuchi, Ming-Rong Zhang, Yasushi Arano, Tsuneo Saga: Synthesis and *in vitro* cellular uptake of ^{11}C -labeled 5-aminolevulinic acid derivative to estimate the induced cellular accumulation of protoporphyrin IX. *Bioorg Med Chem Lett*, 23(16): 4567 - 4570, 2013.

Chie Suzuki, Atsushi Tsuji, Koichi Kato, Tatsuya Kikuchi, Hitomi Sudo, Maki Okada, Aya Sugyo, Ming-Rong Zhang, Yasushi Arano, Tsuneo Saga: Preclinical Characterization of 5-Amino-4-Oxo-[6- ^{11}C]Hexanoic Acid as an Imaging Probe to Estimate Protoporphyrin IX Accumulation Induced by Exogenous Aminolevulinic Acid. *J Nucl Med*, 55(10): 1671-1677, 2014.

8. 主査および副査名簿

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 工学博士 根矢 三郎

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 理学博士 石橋 正己

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 伊藤 晃成

9. 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 荒野 泰 教授に心より深謝の意を表します。

同時に、本研究において懇切なる御指導、御助言を頂きました千葉大学大学院 薬学研究院 上原 知也 准教授、群馬大学大学院 医学系研究科 花岡 宏史 特任准教授 (元 千葉大学大学院 薬学研究院 助教)、千葉大学大学院 薬学研究院 鈴木 博元 助教に心から感謝の意を表します。

学位審査において貴重な御指導、御助言を頂いた千葉大学大学院 薬学研究院 根矢 三郎 教授、千葉大学大学院 薬学研究院 石橋 正己 教授、千葉大学大学院 薬学研究院 伊藤 晃成 教授に御礼申し上げます。

放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センターにおける業務との両立について、寛容に御支援、御助力を頂きました分子病態イメージング研究プログラム 佐賀 恒夫 プログラムリーダーと辻 厚至 チームリーダーに厚く御礼申し上げます。研究を行うにあたり多くの御指導と御助言をいただいた国立精神・神経医療研究センター 脳病態統合イメージングセンター 加藤 孝一 室長に厚く御礼申し上げます。実験を進めるにあたり多くの御助言と御協力を頂いた放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター 分子病態イメージング研究プログラム 須藤 仁美 博士、須堯 綾さん、小川 由利子さん、黒田 直子さん、分子認識研究プログラム プログラムリーダー 張 明榮 先生、菊池 達矢 博士、岡田 真希 博士、先端生体計測研究プログラム 脇坂 秀克さんをはじめとする分子イメージング研究センターの皆様および ^{11}C 標識化合物の製造にあたり多大なご助力をいただきましたサイクロトロンスタッフの皆様に心より感謝の意を表します。

また、研究を進めるにあたり、多くの有益な御助言、御協力を頂きました千葉大学大学院 金沢 直樹 修士、SYAIFUL Hudri 修士、和田 祥汰 学士、金井 彩香 学士、水野 雄貴 修士、横山 幹 学士と多くの時間を割いて討論に参加いただいた分子画像薬品学研究室の皆様心より感謝致します。

最後に、常に温かく見守り、支えてくれた家族、友人に深く感謝致します。

2015年3月

鈴木 千恵