

第2回分子イメージング研究センターシンポジウム

－ マルチモーダルイメージングの可能性 －

## はじめに

平成19年10月19日(金)に「マルチモーダルイメージングの可能性」をテーマに第2回分子イメージング研究センターシンポジウムが開催されました。

平成17年11月に設立された分子イメージング研究センターにおける研究も3年目をむかえ、分子プローブ開発、先端生態研究、脳機能研究、腫瘍イメージング研究の各分野で研究を推進しております。分子イメージングのモダリティとしては、当研究センターのメインテーマである核医学技術(PET/SPECT)に加え、光イメージング、磁気共鳴イメージング(MRI)があります。今後、分子イメージング研究がさらに発展し、病態解明や疾患診断・治療に貢献して行くためには、それぞれのモダリティの特徴を生かすと共に、それらを融合して活用していくことが求められています。

そこで、今回のシンポジウムでは、本邦においてPET、光、MRIの3つのモダリティの研究をリードしておられる先生方に特別講演をお願いしました。PETに関しては、大阪大学の畑澤教授、光イメージングに関しては北海道大学の田村教授、MRIに関しては滋賀医科大学の犬伏教授からマルチモダリティという言葉キーワードとして、それぞれの分野における最先端の研究状況をお話いただき、それに引き続いて、放医研におけるそれぞれの分野の研究の最新の状況を紹介するという形式といたしました。それぞれのセッションでは、活発な討論が行われ、今後のマルチモダリティへの展開に向けて有意義なシンポジウムであったと考えております。

最終的な参加者は所内93名、所外81名の計174名となりました。また、多くの方から(89%)「良かった」との評価をいただくことができました。

最後に、本シンポジウムにご協力いただいた方々、また出席いただいたすべての方々に深く感謝いたします。

平成20年3月

第2回分子イメージング研究センターシンポジウム実行委員会

実行委員長 佐賀 恒夫



# 目 次

はじめに	佐賀 恒夫 (放医研)
フィジオーム研究とPET分子イメージング	畑澤 順 (大阪大) ..... 1
末梢性ベンゾジアゼピン受容体PETリガンド [ <sup>11</sup> C] DAA1106の開発と脳損傷および神経変性による経時変化、 グリア特異性について	前田 純 (放医研) ..... 4
PET画像解析による神経受容体定量画像化	木村 裕一 (放医研) ..... 9
PETで見るがんのすがた	佐賀 恒夫 (放医研) ..... 13
脳内のグルタチオン抱合体排出輸送系を捉える測定方法 およびPETプローブの開発	岡村 敏充 (放医研) ..... 19
RGDペプチドを用いた <i>in vivo</i> 光イメージングによる integrin $\alpha_v\beta_3$ 発現の可視化	金 朝暉 (放医研) ..... 24
Quantum Dots : From Multimodal Imaging Diagnostics to Radiation-Induced Photodynamic Therapy of Cancer	Rumiana Bakalova (放医研) ..... 32
ナノ素材とMRI分子プローブ	犬伏 俊郎 (滋賀医科大) ..... 39
機能性MRIプローブの開発と応用	青木伊知男 (放医研) ..... 45
ニトロキシラジカル造影剤を使った腫瘍組織内レドッ クスマッピング	松本謙一郎 (放医研) ..... 46
分子イメージングで光が果たす役割は？	田村 守 (北海道大) ..... 52

# フィジオーム研究とPET分子イメージング

大阪大学大学院医学系研究科 畑澤 順

Corresponding: hatazawa@tracer.med.osaka-u.ac.jp

はじめに

フィジオーム (Physiome) は physiology as a whole を意味する造語で、生体の生理機能の総体を指している。ゲノム情報を起点とし、蛋白質、多糖類などの機能性分子、細胞内小器官、細胞、組織、臓器、個体に至る機能と構造を階層的、統合的にとらえるフィジオーム生命科学の研究手法として、PET分子イメージングの果たす役割は大きい。本講演では、現状のPET分子イメージングの問題点とそれを克服するための試み（高分解能半導体PET、PET/MRの開発、<sup>124</sup>Iによる生体機能分子の標識、高感度プラナーイメージングシステムによる薬物動態解析）について述べる。大阪大学臨床医工学融合研究教育センターではグローバルCOEプログラムの支援を受け、フィジオームとシステムバイオロジーの拠点形成を開始した。フィジオームプロジェクトはゲノムレベルから個体レベルで生じる生体情報を有効に活用し、生体機能を理解し医療や産業に役立てようとする試みである。そのためには、生理機能を記述する共通言語（ゲノム研究における塩基配列、プロテオーム研究における蛋白質立体構造に相当）が必要であり、時空間スケールの現象を記述する数理モデル、データベース化のための共通プラットフォームの構築（脳機能解析における statistic parametric mapping）が欠かせない。PET分子イメージングにおける情報の構造化の必要性について述べる。

## 1. フィジオーム研究

これまで、医学・生物学研究は表現型 (phenotype) による分類に従って行われてきた。臨床医学において、症状による疾患分類、病因による分類（外傷、炎症、腫瘍、循環障害、変性、機能性）はこれに相当し、細胞レベル、臓器レベルの体系化が行われた。重要な役割を担ったのは、17世紀に開発された顕微鏡と組織の染色法であり、“すべての細胞は細胞から生じる”という基本的な概念を確立することに寄与した。

2001年、ヒト遺伝子（ゲノム）の全塩基配列が決定され以降はポストゲノムの時代といわれている。これは、ゲノムを起点として生命現象・疾患を再体系化しようとする試みを促し、生体機能を分子の視点で理解しようとする医学・生物学の新たな潮流となった。例えば、遺伝子名GCK、染色体上の位置7p15（遺伝子レベル）の産物グルコキナーゼ（生化学レベル）が解糖系のブドウ糖代謝を調節する（細胞レベル）。この遺伝子は膵β細胞、肝細胞に特異的に発現し（臓器レベル）、摂食にともなうインスリン分泌を調節している（個体レベル）。遺伝子型 (genotype) による医学・生物学の再体系化は、遺伝子を起点としてそこから生じる生体機能分子と生理機能の多階層にわたる体系化を意味する。

## 2. ゲノム研究とフィジオーム研究

PETによるフィジオーム研究は、細胞や臓器レベルでの生理機能を解析する中心的な手法となる。例えば、現在では高次脳機能を担う遺伝子およびタンパク質の解析が行われている。Tonegawaらは  $\alpha$ -calcium calmodulin kinase II欠損ノックアウトマウスを作製し、その行動を解析した (Capecchi MR. Science 244:1288, 1989, Silva AJ, Paylor R, Whener J, Tonegawa S. Science 257:206-211, 1992)。このノックアウトマウスで詳細な行動実験を行った結果、学習効果を維持することができないという特質が明らかになった。すなわち、特定の遺伝子欠損、タンパク質欠損が高次脳機能障

害の原因となることが明らかにされた。この実験において、PETにより脳ブドウ糖代謝、神経伝達機能を測定できれば、さらに脳局所機能障害と対応させることが可能になる。実験動物では、遺伝子操作を行いPETによる生理・代謝機能の画像化を行うことができる。ヒトでは、遺伝子異常が明らかな疾患を対象に同様の研究を行うことができる。Glucose transporter-1欠損症はてんかん発作を繰り返し、精神発達遅滞を引き起こす。FDG-PETでは、側頭葉のブドウ糖代謝が低下しておりてんかん焦点の存在が疑われる。一方、他の領域にはFDGの取り込みが正常に認められGlucose transporter-1以外のブドウ糖輸送系が機能していることをうかがわせる。このような代償性のメカニズムについては全く不明である。なぜ側頭葉にはこのような代償機構が生じないのであろうか。

### 3. 分子発がんPET

正常な体細胞が「がん化」するには、細胞分裂、分化、血管新生、浸潤、細胞死に関連する遺伝子の多段階の変異を必要とする。がん原遺伝子の機能獲得型変異により、細胞増殖を促進する細胞内シグナル伝達機構が活性化される。対立遺伝子の一方の点突然変異でがん原遺伝子はがん遺伝子となる。がん抑制遺伝子は細胞増殖を制御しているが、機能喪失型変異により細胞増殖の制御に関連する機構が障害される。癌抑制遺伝子が失活するには、対立遺伝子の双方が変異する必要がある。分子レベルで発がんのメカニズムが明らかになると、抗がん剤の作用点もこれまでの細胞分裂から腫瘍特異的にけんかする。例えば、消化管間質腫瘍 (gastrointestinal stromal tumor: GIST) は、消化管壁を構成するCajal介在細胞のc-kit遺伝子の点突然変異が原因であることが解明された。チロシンキナーゼ活性が亢進し、癌化の原因となる。慢性骨髄性白血病治療薬イマチニブはチロシンキナーゼ阻害剤であり、治療標的と一致するため、GISTにもイマチニブの効果が期待され、治験が行なわれた。図は、GIST治療前後の2-deoxy-2- [<sup>18</sup>F] fluoro-D-glucose (FDG) PETを示す。治療後にはFDG集積が低下し、GISTに対してイマチニブが有効であることがわかる。

### 4. 新しい画像機器の応用

PET分子イメージングを展開するには、現状のPET技術はまだ未熟である。撮像機器に関しては、高分解能化 (マウス脳が観察可能なレベル)、高感度化 (経時的な撮像が可能)、形態画像装置との複合化が必要になる。

#### 1) 半導体PET

文部科学省の特別推進研究の支援を受け、東北大学と大阪大学では空間分解能1mm以下の超高分解能半導体PETを開発した。PET画像の分解能は、消滅放射線の角度揺動、検出器の大きさ、陽電子分布によって規定される。CdTe半導体を用いることにより検出器の小型化をはかり、高空間分解能を達成した。視野中心で0.75mm (FWHM) である。FDG画像でマウス脳の構造が同定できる。本装置を用いて、今後様々な遺伝子改変マウスの脳代謝を測定することが可能である。

#### 2) PET-MRI

SPECT-CTやPET-CTなど形態・機能画像複合装置が開発されている。一方、CTの組織コントラストには限界がありMRIは極めて組織コントラストが高いことから、世界的なPET-MRIの開発競争がはじまった。磁場内ではPET検出器 (光電子増倍管、電子回路など) が正常に作動しないため、新規の検出器システムが必要になる。大阪大学、神戸市立工業高等専門学校、(株)日立金属は独立行政法人医薬基盤研究所の支援を受け、小動物用PET-MRIを開始した。光ファイバー方式を採用し、磁場内で作動するPET検出器部を作製した。MRI磁場内でラット脳のFDG画像を撮像した。現在、MRIおよびPET単体部分の製作が行われており、次年度には複合装置の性能評価が行われる。

#### 3) 対向型ポジトロン撮像装置

小動物に投与した放射性医薬品の体内動態を解析するには、空間分解能よりも感度が必要な場合がある。浜松フォトニクスによって開発された対向型ポジトロン撮像装置は、平面画像のみ可能であるが秒単位の撮像が可能であり、投与直後の放射性医薬品の体内動態を解析するのに適している。本装置を用いて、 $^{11}\text{C}$ 標識抗てんかん薬 ( $^{11}\text{C}$ -phenitoin) の体内分布を計測した。トレーサ量 ( $2\mu\text{g}$ 以下) 静脈投与後、ターゲット臓器の脳へは約2%が集積した。投与後20分には肝臓から胆道を介して腸管へ排泄された。投与後20分には尿への排泄が確認された。 $^{11}\text{C}$ -phenitoinによる以前の報告では、投与後1時間までは脳組織内にはphenitoinの代謝産物は検出されない。また、尿中放射性分子はグルクロン酸包合による水酸化代謝産物である。対向型ポジトロン撮像装置による $^{11}\text{C}$ -phenitoinの動態解析からは、投与量の約2%が20分以内に脳組織に輸送され、0.5%が尿中に排泄されることが明らかになった。

## 5. 新しい放射性同位元素の生成

PETフィジオーム研究では、機能性分子(核酸、タンパク質、糖鎖など)の放射性核種による標識と動態解析が必要になる。現在行われている標識技術は、 $^{18}\text{F}$ や $^{11}\text{C}$ などの短半減期核種の標識に適しており、短時間に標識合成を終了させ高比放射能の標識薬剤を得るために、加熱、酸アルカリ処理、特殊な溶媒を利用している。このような標識合成は機能性分子の機能を損なう可能性があり、機能性分子の標識が可能な長半減期の新しい核種を開発する必要に迫られた。

東北大学サイクロトロンRIセンターと共同で $^{124}\text{I}$ を生成し、 $^{124}\text{I}$ 標識放射性機能分子 ( $^{124}\text{I}$ -iomazenil) を合成した。 $^{124}\text{I}$ は物理的半減期103時間、反応性が高く加熱なしに高分子化合物(遺伝子、蛋白質、糖鎖など)やQDの標識が可能である。また、標識薬剤の体内分布を長期間観察することが可能である。 $^{124}\text{I}$ は酸化Teを固体ターゲットに装着し $^{124}\text{Te}$  (p, n)  $^{124}\text{I}$ 反応で生成する。固体ターゲット、自動搬送装置、精製装置が必要で、現在これらの設備を有する東北大学サイクロトロンRIセンターと大阪大学核物理研究センターで合成が行われている。Iomazenilは神経細胞膜上の中枢性ベンゾジアゼピン受容体に選択的に結合する。 $^{124}\text{I}$ -iomazenil投与後、ラット脳を半導体PETで撮像し、撮像後切片を作製してautoradiographyを行った。両者ともに大脳皮質への高集積を認めた。

## 6. データの標準化、体系化、構造化

ヒト局所脳機能解析研究初期には各研究グループが個別のプラットフォーム上に脳機能地図を作製していた。Fristonらは、Statistical Parametric Mapping (SPM) をウェブ上に公開し大多数の研究者がこれを利用するようになった (Friston KJ, et al. Hum Brain Mapp 2: 189-210 1995 <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>)。そこに至るには、ヒト脳機能解析手法の開発(撮像条件、実験条件、画像再構成の標準化)、解析ソフトの無償頒布、教育コース、結果のデータベース化、Journal発行などが必要であった。様々な領域において、解析法の標準化、それを元にした研究結果の体系化、外部への情報発信、外部からの利用を視野に入れた情報の構造化が必要になる。大阪大学では平成19年からグローバルCOEプログラム“医・工・情報学融合による予測医学基盤創成”を開始した。生理機能のデータベース化とそのため数理モデルの開発を目指している。

# 末梢性ベンゾジアゼピン受容体PETリガンド [<sup>11</sup>C] DAA1106の開発と 脳損傷および神経変性による経時変化、グリア特異性について

独) 放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター  
分子神経イメージング研究グループ分子生態研究チーム 前田 純  
Corresponding: jun@nirs.go.jp

## 1. はじめに

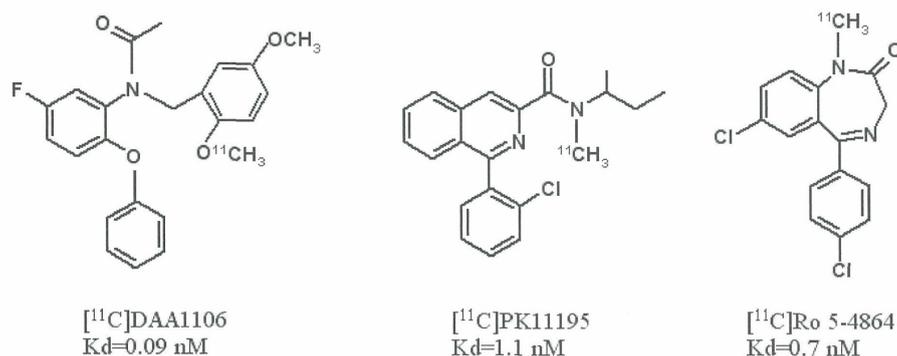
脳神経組織は神経細胞および神経膠細胞（グリア細胞）から構成されており、グリア細胞は数の上で神経細胞の10倍存在し、脳組織容積の1/2を占めると言われている。グリア細胞はその形状から星状膠細胞（アストロサイト）、小膠細胞（ミクログリア）、希突起神経膠細胞（オリゴデンドロサイト）、上衣細胞に大分されている。グリア細胞は一般に神経細胞の支持細胞と見なされてきたため、これまでの脳の分子イメージング研究は神経細胞機能に対し主眼が置かれていた。しかしながら、近年アルツハイマー病などの神経変性疾患の進行過程にはグリア細胞機能が深く関わるということが明らかとなり、その分子マーカーの開発が急務となっている。

## 2. 末梢性ベンゾジアゼピン受容体（PBR）PETリガンドによるミクログリア細胞画像化

脳梗塞、脳挫傷およびアルツハイマー病などの神経変性疾患ではその受傷部位ないし病巣部においてミクログリア細胞の増殖が認められる。増加したミクログリア細胞は脱落した細胞塊の除去や周囲の神経細胞への栄養作用もつ反面、過剰な増殖は神経障害を増幅させると考えられている。従って、増殖したミクログリア細胞の画像化はこれらの疾患の病状の把握や治療効果の判別に重要なマーカーになると考えられる。このマーカーとして最近注目されているのがPBRである。PBRはもともと末梢臓器に広範に分布するベンゾジアゼピン類が結合する部位であり、抗不安薬が結合するGABA<sub>A</sub>ベンゾジアゼピン結合部位とは全く異なる<sup>1)</sup>。正常の脳組織においてはPBRの発現密度は極めて低いものの、脳虚血の障害部位においてPBR結合が増加することが示されている<sup>2)</sup>。この結合増加箇所はミクログリア細胞の増殖領域と極めて一致しており、炎症により増加したミクログリア細胞内で発現が亢進していると推察されている<sup>2,3)</sup>。PBRは主にミトコンドリア外膜上に発現し、ミトコンドリア内へのコレステロールの取り込みに関与している<sup>4)</sup>。しかしながら、PBR結合の増加機構およびその役割については現在のところ明らかとなっていない。

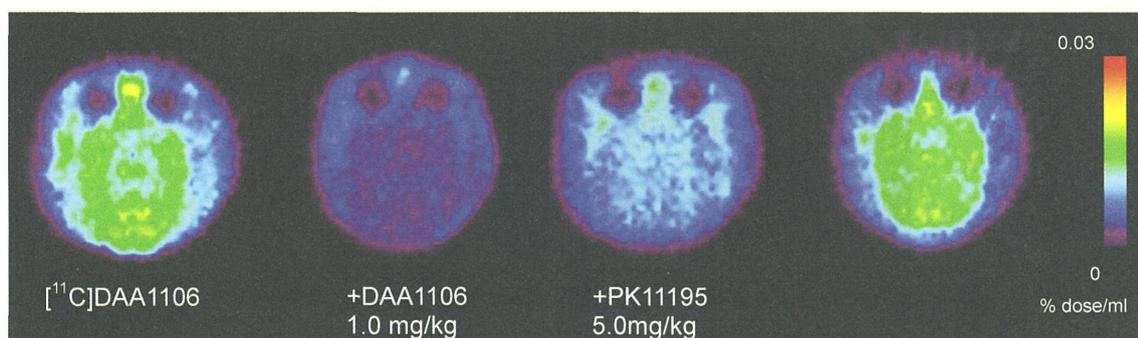
## 3. PBR画像化リガンドDAA1106の開発

現在のところ世界のPET研究施設において、イソキノリン系骨格の [<sup>11</sup>C] PK11195（図1）がPBRのPETリガンドとして繁用されている。特にアルツハイマー型認知症患者を対象としたPET研究では、正常高齢者と比較して [<sup>11</sup>C] PK11195の結合が増加しており<sup>5)</sup>、種々の炎症性神経変性疾患のマーカーとして非常に注目されている<sup>6)</sup>。PK11195は脳への移行性が悪いため直接的な画像解析は困難であり、特異的シグナルの検出には画素のクラスター化を行い非特異的集積を抽出する必要がある<sup>3,5)</sup>。しかしながら、どの程度の水準で非特異的集積とするかは研究施設間により異なるため、バイアスが入る恐れがある。そのため我々は直接的にPBRを画像定量化可能なPETリガンドの開発に着手した。ここで注目したのがDAA1106である（図1）。DAA1106は既存のPBRリガンドとは全く異なるジフェニルアセトアミド骨格を有しており、PBRに対する親和性は約10倍高い<sup>7)</sup>ため、これまでの欠点を克服できると想定した。そこで本化合物の2位の水酸基に [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>標識し評価を行った。



(図1) PBRリガンドの構造とPBRへの解離定数

$[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ をアカゲザルに投与したところ脳内へ高い移行性を示し、この濃度は $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ に比べ4倍高かった<sup>8)</sup>。この脳内分布は非標識のDAA1106 1mg/kgもしくはPK11195 5mg/kgを静脈内に前処置すると完全に抑制された<sup>8)</sup> (図2)。このことからDAA1106脳内の集積はPBRの結合に由来するものと確認された。また、興奮性神経毒カイニン酸海馬注入によるラット海馬神経破壊により、 $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ 結合は注入側において *ex vivo* および *in vitro* ともに著明な増加が認められた<sup>8)</sup>。このことから  $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ は神経障害によるPBR密度増加を検出できるPETリガンドであることが明らかとなった。



(図2)  $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ 投与後30分から90分後までのアカゲザル頭部平均画像

$[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ の集積はコールドDAA1106およびPK11195前処置でブロックされるが、中枢性ベンゾジアゼピン結合部位の拮抗薬flumazenilでは阻害効果は認められない。

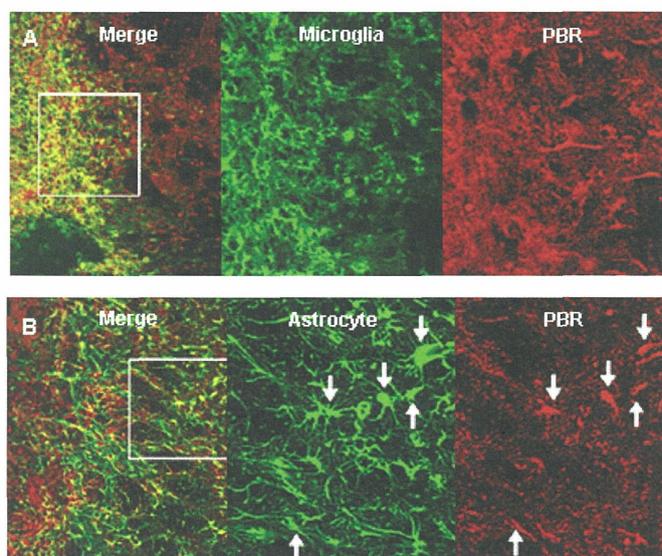
$[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ は20分と半減期が短いため、他施設への輸送を考慮に入れると半減期が110分と長い $[^{18}\text{F}]\text{DAA1106}$ の合成について検討する必要がある。そこで、 $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ と同箇所 $[^{18}\text{F}]\text{fluoro ethyl}$ 標識について行い検討を行った。その結果、 $[^{18}\text{F}]\text{fluoroethyl DAA1106}$  ( $[^{18}\text{F}]\text{FEDAA1106}$ )は $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ と同様の性質を維持していた<sup>9)</sup>。また、実験的脳挫傷モデルにおいて受傷後7日後に障害部位における $[^{18}\text{F}]\text{FEDAA1106}$ の集積は著明に増加していた。対照的に同部位における $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込みを指標とした糖代謝は著明に低下しており、 $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ と同様に神経損傷のマーカーとして有用であることが示唆された。

#### 4. PBRが発現するグリア細胞タイプの検証

これまでのところ神経損傷によるPBR増加の由来は損傷領域に集積・増殖したミクログリア細胞および脳血管破綻により漏出した単球由来のマクロファージであるという説が大勢を占めている<sup>2,3)</sup>。しかしながら、以前の報告ではPBRに対する良好に結合する抗体がなかったため、経時的にグリア

の増殖・形態変化とPBRの増加の相関については十分検証はされていない。そこで我々はラットエタノール脳内局所注入モデルを用いPBR発現細胞の特定を行った。エタノール注入モデルの利点として、注入部位においてエタノールによる蛋白凝固を誘発し他の領域へ拡散しないため、他のモデルと異なり局所的な障害を得ることが可能である<sup>10)</sup>。

エタノールを線条体に5 $\mu$ L注入すると3日後から [<sup>14</sup>C] DAA1106の結合が有意に増加し、7日後に極大となり、その後90日まで有意な増加は維持していた。同領域のミクログリアおよびアストサイトを免疫染色し顕微鏡で観察したところ、受傷領域の周囲に貪食型のミクログリアが多数集積・増殖しており、その周囲をさらにアストロサイトが取り囲む像が得られた。細胞数を計測したところ、ミクログリア細胞の増加が圧倒的であり、アストロサイトと比較しミクログリア細胞数がDAA1106結合密度と有意に相関していた。さらに詳細にPBRの発現細胞を明らかとするために、蛍光二重免疫染色によりPBRとグリア細胞を共染色し検証を行った。ミクログリアは損傷24時間後より損傷部位への集積が顕著に認められるものの、ミクログリアが膨化し始める3日後よりPBR陽性となり、90日後までPBRの発現は維持していた (図3 A)。一方、膨化したアストロサイト内にもPBRの発現は観察されるものの、受傷3日後から7日と一過性であり (図3 B)、受傷14日以降になるとPBR陽性細胞は認められなかった。この結果から脳組織障害により増加するPBRの由来は主として著しく増殖・膨化したミクログリア細胞に起因しているものの、PBRは活性化ミクログリアに特異的なマーカーというよりも包括的な活性化グリアのマーカーといったほうが妥当ではないかと我々は考察している<sup>11)</sup>。

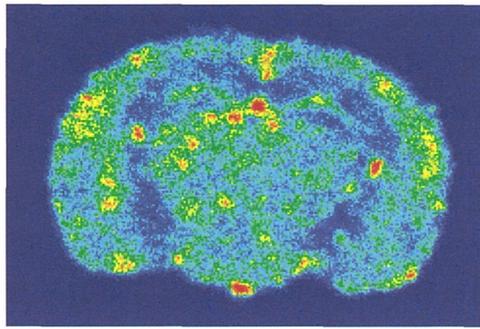


(図3) A (上段) : エタノール注入7日後のミクログリア (緑) とPBR (赤) の蛍光2重染色像

B (下段) : エタノール注入7日後のアストロサイト (緑) とPBR (赤) のの蛍光2重染色像

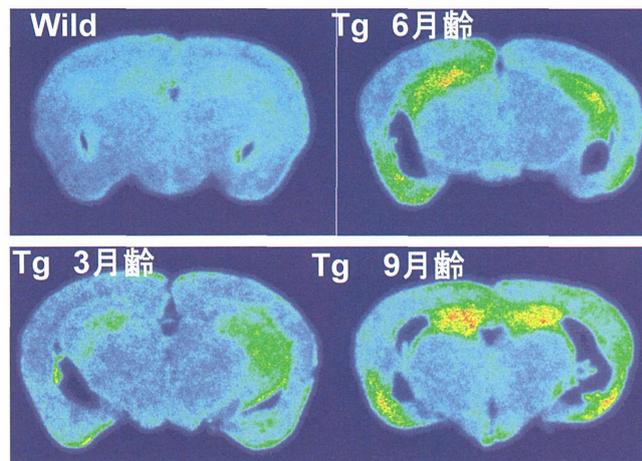
## 5. アルツハイマー病画像診断への応用

アルツハイマー病患者では老人斑周囲に活性化ミクログリアが集積しており、それに対応してPBR密度が増加していることは明らかである<sup>5)</sup>。従ってDAA1106のPETによる脳内PBRの測定は認知症の早期診断法のひとつとなる可能性がある。そこで我々は家族性アルツハイマー病を引き起こす原因遺伝子を導入した2種類のアルツハイマー病モデルマウスAPP23マウスおよびTauP301Sを用い、DAA1106の有用性の評価をおこなっている。APP23マウスは家族性変異アミロイド前駆体タンパクを導入したマウスで、生後18月齢で $\beta$ アミロイドを過剰に産生する<sup>12)</sup>。このマウスに[<sup>18</sup>F]FEDAA1106を投与した後脳を摘出してオートラジオグラムを作成したところ、 $\beta$ アミロイドと対応した集積を認めた (図4)。



(図4) APP23マウス (26月齢) に  $[^{18}\text{F}]$  FEDAA1106を37MBq処置したときのオートラジオグラム

またTau301Sマウスは神経線維のひとつであるTauタンパクが過剰にリン酸化される変異遺伝子が導入されており、生後6月齢以降に海馬の萎縮が顕著にみられる<sup>13)</sup>。このマウスの脳切片に  $[^3\text{H}]$  DAA1106オートラジオグラフィーを行ったところ、海馬の萎縮が認められない3月齢の時点ですでにDAA1106の結合は増加しており、萎縮に伴い結合量は増大していった(図5)。このことから海馬萎縮の過程においてミクログリアの過剰な活性化が重要な因子のひとつであると考えられる。今後これらのマウスモデルでPBRの増大を小動物PETで計測可能かどうか検証する予定である。



(図5) Tau P301Sマウスの  $[^3\text{H}]$  DAA1106オートラジオグラム

## 6. おわりに

我々の研究結果からPBRリガンドDAA1106のPETによる神経変性疾患のイメージングはアルツハイマー病などの画像診断に有望であることが示唆された。今後様々な神経変性疾患を対象とした臨床研究によりDAA1106の有用性を実証していく必要がある。また、PBRはミトコンドリア膜に存在する透過性膜遷移孔の構成タンパクのひとつであり、アポトーシス発現に重要なミトコンドリア外へのシトクロムcの流失に深く関わっている。従ってPBRは脳イメージング用のリガンドに留まらず、新たな治療標的となりうると考えられる。

## (文献)

- 1) C. Braestrup and R. F. Squires : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 3805-3809 (1977).
- 2) D. T. Stephenson, D. A. Schober and et al. J. Neurosci. 15, 5263-5274 (1995).
- 3) R. B. Banati : Glia, 40, 206-217 (2002).
- 4) H. Li, Z. Yao and et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 98, 1267-1272 (2001).

- 5) A. Cagnin, D. J. Brooks and et al. : Lancet, 358, 461-467 (2001).
- 6) 前田純、樋口真人、須原哲也 : 日本神経精神薬理学雑誌, 26, 17-21 (2006).
- 7) S. Chaki, T. Funakoshi and et al. : Eur. J. Pharmacol. 371, 197-204 (1999)
- 8) J. Maeda, T. Suhara and et al. : Synapse, 52, 283-291 (2004).
- 9) M. R. Zhang, J. Maeda and et al. : J. Med. Chem. 47, 2228-2235 (2004).
- 10) A. Takeuchi, Isobe A. I and et al. : Eur. J. Neurosci. 10. 1613-1620 (1998)
- 11) J. Maeda, M. Higuchi and et al. : Brain Res. 1157, 100-111 (2007)
- 12) J. Maeda, B. Ji and et al. : J. Neurosci. 27, 10957-10968 (2007)
- 13) Y. Yoshiyama, M. Higuchi and et al. : Neuron 54, 337-351 (2007)

# PET画像解析による神経受容体定量画像化

(独) 放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター  
先端生体計測研究グループ 画像解析研究チーム 木村 裕一

Corresponding: ukimura@ieee.org

## 1. はじめに

本稿では、陽電子断層装置 (Positron Emission Tomography; PET) を用いての神経受容体濃度の定量画像化の現状についてまとめる。PETは分子イメージング領域で使用される主要な画像化手法の一つであり、生体機能に関する画像の作成が可能である。最初にPETの概略を説明した後、神経受容体定量画像化の現状について述べ、最後に今後の展望に触れる。

## 2. PET

放射性同位元素を用いて合成された生化学物質は、その生理学的な性質が通常の元素による場合と同一である一方、そこから放射される放射線を体外より検出することで、投与された物質の位置や量を測定することが可能となる。PETはこのような核医学的手法の一つであり、特に陽電子崩壊を起こす放射性同位元素を使用することから、陽電子の英語名、positronがその名前の由来となる。また、放射性同位元素を含む生化学物質を放射性薬剤と呼ぶ。

陽電子崩壊によって安定化を図る元素の代表例としては、 $^{15}\text{O}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ が挙げられ、いずれも生体内に通常存在する、あるいは生化学物質に対して親和性が良好な元素となる。その結果、PETでは生体内に存在する物質あるいは生体との親和性の良好な生化学物質そのものをトレーサとして使用可能となることから、多岐にわたる生体機能の撮影が可能となる。例えば $^{15}\text{O}$ を用いて合成された $^{15}\text{O}_2$ 、 $\text{C}^{15}\text{O}_2$ 、 $\text{C}^{15}\text{O}$ の3種類のガスを順に用いることで、脳 [Mintun84] あるいは骨格筋 [Mizuno03] における局所血流量や酸素消費量が絶対値として測定可能であり、脳については脳血管性病変の診断に使用されている。あるいは $^{11}\text{C}$ は神経伝達物質やその関連機能に関与するほとんどの生化学物質に含まれる元素であることから、様々な神経受容体を測定対象とすることができる。

PETではその定量性が良好である点も特徴である。陽電子崩壊ではその物理的メカニズムによって、ほぼ180度方向に一对の $\gamma$ 線が放出される。これを体外に配置した $\gamma$ 線検出器群によって検出することで、生体内における $\gamma$ 線に対する吸収の補正が可能となる。また放射線は原理的に測定精度の高い物理量である。その結果、PETでは [nmol/mL] 程度の精度で投与された放射性薬剤の濃度を画像として得ることが可能となる。

## 3. 動態解析

PETから得られる画像に対して更に動態解析を実施することで、生体機能、例えば神経受容体濃度の画像化が可能となる。投与された放射性薬剤は動脈血によって組織へ運ばれた後、毛細血管より組織に移行する。しかし移行したトレーサはその一部が神経受容体と特異的に結合を果たすのみであり、他は、あるいは未結合のままの状態組織内に存在する、あるいは非特異的な結合対象と緩やかに結合した状態を取る。更に未結合の放射性薬剤の一部は静脈側に戻り、体循環によって運び去られるといった経過を辿る。一方PETが撮影するのはあくまで組織中に存在する放射性薬剤の総量であり、測定対象としている神経受容体と結合しているものだけではない。従ってPET画像は神経受容体濃度を直接反映していない。

そこで放射性薬剤の体内での動態を考慮したコンパートメントモデルを元に、薬剤投与後に実施

する複数回のPETの撮影によって対象組織内の放射性薬剤濃度の経時的変化を解析することで、神経受容体の濃度を初めて測定することが可能となる [Carson03, Innis07]。このよう撮影を動態撮影、また解析を動態解析と呼ぶ。動態解析では薬剤投与後90分程度の間PET撮影を継続する必要があり、また通常上腕動脈内にカテーテルを予め挿入し、ここから経時的に採血した動脈血中の放射能濃度が解析に必要なことから、撮影手技的には煩雑である。しかし、生体機能の値が絶対値として得られる点で有意義な撮影手法である。

#### 4. 動態解析の問題点

動態解析では、コンパートメントモデルと呼ばれる放射性薬剤の移動に関するモデルを用いる。コンパートメントモデルは、毛細血管と組織の間といった領域間での放射性薬剤の移動を記述したモデルであり、この領域をコンパートメントと称する。コンパートメント間の物質の移動量を規定するパラメータ、速度定数と呼ばれるが、これを用いることでモデルへの入力となる血中放射能濃度と組織中放射能濃度の関係式が導かれる。実際の動態解析では、これら二つの放射能濃度を実測しこれから速度定数を推定することになる。受容体の濃度は、速度定数から計算される。

しかし、速度定数およびモデルと実測データの合致度を表わす評価関数との関係が非線形となることから、コンパートメントモデルの推定は不安定でかつ計算時間を要するものとなる。非線形推定では、モデルを推定するための式を陽に書くことができない。代りに、予め与えられた初期値から逐次的に最適解を探索する、いわゆる逐次推定法を採ることになる。その結果モデル推定値が初期値に依存することになり、また計算時間を要する演算となる。また、一般に非線形推定では複数の擬似的解が多数存在する点もコンパートメントモデルの推定を複雑なものとしている [Bard74, Kimura96]。

特に速度定数による画像を作成するために画素毎に動態解析を実施場合には、非線形推定のこの問題点はより深刻となる。1画素の大きさは概ね3から5 [mm] 立方程度と小さいことから、そこに含まれる放射性薬剤が少ない。従って画素単位でのPETのデータは雑音を多く含むものとなることから、非線形推定における推定の不安定性はより顕著となる。またPET画像の画素数は莫大である。典型的なPET画像では、1スライスのサイズは128×128画素であり、50スライス程度を擁する。全体の50%に脳実質が含まれていると仮定すると、41万画素程度となる。仮に1画素辺りの推定時間を10秒とすると、総計算時間は47日に達し実用とならない。

コンパートメントモデル推定の安定化及び高速化には、幾つかのアプローチが提案されている。

一つは、モデルの線形化による方法である。このアプローチでは一部の速度定数の推定を放棄する代りに、非線形推定を線形推定に変換することで推定の安定化及び高速化を図る [Logan00, Ichise03, Wu02, Lammertsma96, Gunn97]。また著者は、MAP推定及び形状認識手法を応用したアルゴリズムを提案した [Kimura06]。これは、予め解の候補となるPETデータ群をテンプレートとして作成しておき、個々の実測データに対しその形状が最もよく一致するテンプレートを選別することで推定値を得る方法である。繰り返し計算が不要となるために高速の計算が可能となり、また初期値を必要としないことから推定の不安定性も解決される。概ね1スライス当り1分の計算時間で、機能画像の作成が可能となっている。

動態解析に対する実用上の問題点としては、更に動脈採血が挙げられる。動脈血漿中の放射能濃度はコンパートメントモデルの推定において必須であることから、動態撮影に先立っての上腕動脈へのカテーテルの留置手技が必要となる。日常臨床の一部として行われる手技なので危険性はほとんど無いが、被検者に対しては痛みや不快感をもたらす。また、動脈確保に要する時間は撮影時間の延長に繋がる。今後PETを用いた受容体定量画像化をより普及させるためには、この省略が必要

となる。

採血省略手法としては、血液データの代表値を個々の測定に流用する方法 [Takikawa93]、放射性薬剤が持つ動態に関する特徴を活用する手法 [Lammertsma96, Logan96]、PETデータ中から血液成分を抽出する方法 [Lee05, Su05] 等がある。また、我々のグループでは、統計数理を活用した一連のアルゴリズムを提案し [Naganawa07]、臨床プロトコルとして実用化を果たしている [Naganawa06, Mishina07]。

小型実験動物では採血量が極めて限定されることから、動脈採血の省略は、齧歯類に対する定量PETの実現においても重要である。

## 5. おわりに

以上、神経受容体定量を中心にPETを用いた定量機能画像作成について述べた。分子イメージング分野では、光、MRI、超音波といった様々な画像化手法が出揃いつつあり、それぞれの長所短所を有している。その中でPETは、高い定量性の下多種の生体機能を画像化できる点が長所となる。適切なデータ処理を加えることで、PETの可用性が今後ますます向上すると考えられる。

## Reference

- Mintun84 MA Mintun, ME Raichle, *et al.*, “Brain oxygen utilization measured with O-15 radio-tracers and positron emission tomography”, *J Nucl Med*, 25, 177-187, 1984.
- Mizuno03 Masaki Mizuno, Yuichi Kimura, *et al.*, “Regional differences in blood flow and oxygen consumption in exercised muscle and their relationship during recovery from exhaustive exercise”, *J Appl Phys*, 95, 2204-2210, 2003.
- Carson03 Richard E Carson, “Tracer kinetic model in PET”, in “Positron emission tomography – basic science and clinical practice”, ed. Peter E Valk, Dale L Bailey, David W Townsend and Michael N Maisey, Springer, Ch. 6, 147-179, 2003.
- Innis07 Robert B Innis, Vincent J Cunningham, Jacques Delforge, *et al.*, “Consensus Nomenclature for In Vivo Imaging of Reversibly-binding Radioligands”, *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 1533-1539, 2007.
- Bard74 Yonathan Bard, “The initial guess”, in “Nonlinear parameter estimation”, Ch. 5-20, 120-123, Academic Press Inc., 1974.
- Kimura96 木村裕一, 外山比南子, 千田道雄, “FDG動態計測における速度定数推定値の分布とノイズの関係に関する基礎的検討”, *核医学*, 33, 107-114, 1996.
- Logan00 J Logan, “Graphical analysis of PET data applied to reversible and irreversible tracers”, *Nucl Med Biol*, 27, 661-670, 2000.
- Ichise03 M Ichise, J-S Liow, *et al.*, “Linearized reference tissue parametric imaging methods : application to [<sup>11</sup>C] DASB positron emission tomography studies of the serotonin transporter in human brain”, *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 1096-1112, 2003.
- Wu02 Y Wu, RE Carson, “Noise reduction in the simplified reference tissue model for neuroreceptor functional imaging”, *J Cereb Blood Flow Metab*, 22, 1440-1452, 2002.
- Lammertsma96 AA Lammertsma, SP Hume, “Simplified reference tissue model for PET receptor studies”, *NeuroImage*, 4, 153-158, 1996.

- Gunn97 RN Gunn, AA Lammertsma, *et al.*, “Parametric imaging of ligand-receptor binding in PET using simplified reference region model”, *NeuroImage*, 6, 279-287, 1997.
- Kimura06 Y Kimura, M Naganawa, *et al.* “MAP-based kinetic analysis for voxel-by-voxel compartment model estimation : detailed imaging of cerebral glucose metabolism using FDG”, *NeuroImage*, 29, 1203-1211, 2006.
- [Logan96] J Logan, JS Fowler, *et al.*, “Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data”, *J Cereb Blood Flow Metab*, 16, 834-840, 1996.
- [Lee05] JS Lee, DS Lee, *et al.*, “Parametric image of myocardial blood flow generated from dynamic  $H_2^{15}O_2$  PET using factor analysis and cluster analysis”, *Med Biol Eng Comput*, 43, 678-685, 2005.
- [Su05] K-H Su, L-C Wu, *et al.*, “Quantification method in [ $^{18}F$ ] fluorodeoxyglucose brain positron emission tomography using independent component analysis”, *Nucl Med Comm*, 26, 995-1004, 2005.
- [Naganawa07 M Naganawa, Y Kimura, *et al.*, “Temporal and spatial blood information estimation using Bayesian ICA in dynamic cerebral positron emission tomography”, *Dig Sig Proc*, 17, 979-993, 2007.
- Naganawa06] M Naganawa, Y Kimura, *et al.*, “Quantification of adenosine  $A_{2A}$  receptors in the human brain using [ $^{11}C$ ] TMSX and positron emission tomography”, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 39, 679-687, 2006.
- [Mishina07] M Mishina, K Ishiwata, Y Kimura, *et al.*, “Distribution of adenosine  $A_{2A}$  receptors in normal human brain by [ $^{11}C$ ] TMSX PET”, *Synapse*, 61, 778-784, 2007.

# PETで見るがんのすがた

独) 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グループ 佐賀 恒夫

Corresponding: saga@nirs.go.jp

## 1. はじめに

がんの基礎研究の進歩により、正常細胞ががん化する過程において、様々な遺伝子レベル、細胞レベルでの変化が起こることがわかってきた<sup>1)</sup>。がん化した細胞は、新しく獲得した性質に基づいて、細胞分裂を繰り返し腫瘍塊を形成するとともに、がん細胞が周辺の正常組織に浸潤し、さらに血行性・リンパ行性転移を形成し、進行がんへと進展していく。分子イメージングとは、「分子レベル、細胞レベルで起こる現象や変化の時間的・空間的な分布・動きを直接・間接にモニターすること」と定義されるが<sup>2)</sup>、分子イメージングの手法を用いて、このような細胞ががん化の過程で獲得した様々な性質を直接（遺伝子レベル）または間接（タンパク発現、酵素活性、代謝変化など）に評価することにより、個々のがんの個性を明らかにし、それに基づいた治療を行う、いわゆる個別化医療への貢献が期待される。本稿では、PETを中心とする腫瘍の分子イメージング研究の現状について紹介する。

## 2. 代表的な腫瘍イメージングプローブ

がん細胞の持つ様々な性質のイメージングを行うためには、それぞれの性質を特異的にしかも感度良く捉えるための薬剤(分子プローブ)の開発が重要である。表1にこれまでに開発された代表的な腫瘍イメージングプローブを示す。がんのPET診断においては、がん細胞の代謝変化を見るプローブが現在の主流で、なかでもブドウ糖代謝をみるフルオロデオキシグルコース(FDG)を用いたFDG-PETは、悪性腫瘍の日常診療において欠かせない診断法の一つとなっている。それ以外にも、がんの性質を様々な角度から評価するための分子プローブが開発され、いくつかのものは、臨床でその有用性が試されている。現在、放医研では、重粒子線治療患者に対して、アミノ酸輸送・タンパク合成をみる<sup>11</sup>C標識メチオニンを用いたPETが主として行われているが、昨年度より、新たに細胞増殖に直接関連する核酸代謝イメージングプローブや腫瘍の治療抵抗性の大きな原因となる腫瘍内の低酸素の状態を見る低酸素イメージングプローブを用いたPET診断の臨床研究を開始している。

表1 代表的な腫瘍イメージングプローブ

ターゲット	名 称
代謝	
ブドウ糖	フルオロデオキシグルコース ( <sup>18</sup> F-FDG)
アミノ酸	メチオニン ( <sup>11</sup> C-methionine)
核酸	フルオロチミジン ( <sup>18</sup> F-FLT)
脂質	酢酸 ( <sup>11</sup> C-acetate)、コリン ( <sup>11</sup> C-choline)
低酸素	フルオロミソナダゾール ( <sup>18</sup> F-MISO) <sup>61</sup> Cu-, <sup>62</sup> Cu-ATSM
受容体	
エストロゲン	フルオロエストラジオール ( <sup>18</sup> F-FES)
ソマトスタチン	オクトレオチド ( <sup>68</sup> Ga-DOTATOC)
癌遺伝子産物・腫瘍関連抗原	モノクローナル抗体・抗体フラグメント
新生血管	RGDペプチド、VEGF <sub>121</sub>

### 3. FLT-PETによる核酸代謝イメージング

無制限・活発な細胞分裂（増殖能）は、がん細胞の持つ基本的な性質である。がん細胞の増殖能をイメージングで評価することにより、治療開始前に、腫瘍の悪性度を判断可能になるとともに、治療に伴う増殖能の変化を見ることにより、治療効果の判定・早期効果予測が可能になると期待されている。これまでは、FDGやメチオニンなどのプローブを用いて、間接的に細胞増殖能を評価してきたが、細胞増殖に直接関連するDNA合成（核酸代謝）を見るプローブを用いることにより、細胞増殖を直接に評価することが可能になり、現在この核酸代謝イメージングが世界中で注目されている。そのなかの代表的なプローブが $^{18}\text{F}$ 標識フルオロチミジン（FLT）である（図1）<sup>3)</sup>。

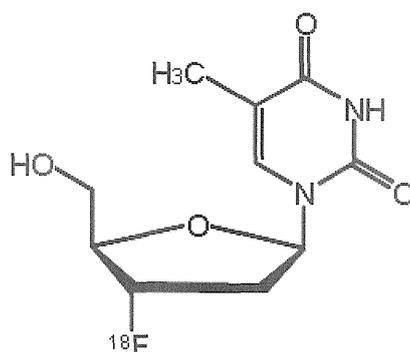
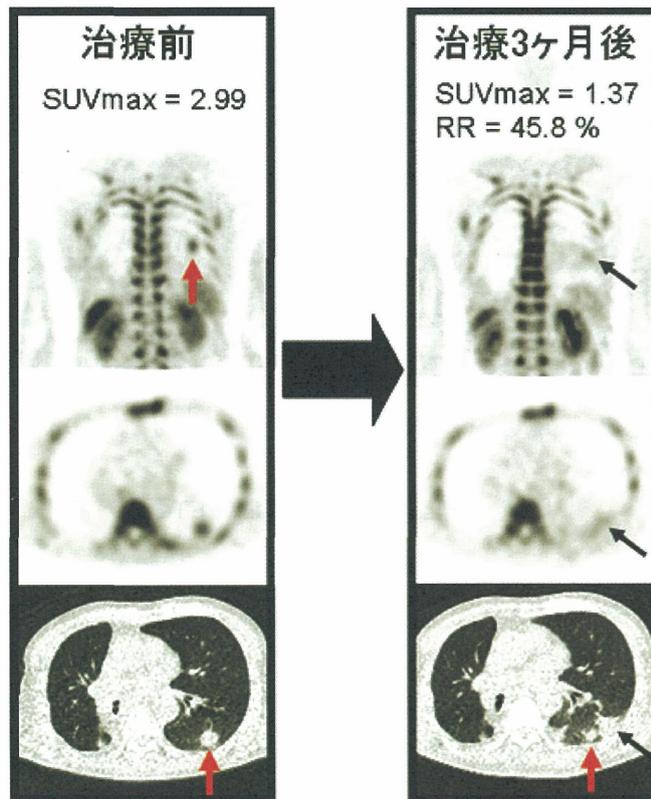


図1： $^{18}\text{F}$ 標識フルオロチミジン

チミジン誘導体のFLTは、増殖細胞に取り込まれ、DNA合成の酵素（チミジンキナーゼ-1）によりリン酸化された状態で、細胞内に貯留する。一方、増殖をしていない静止期細胞では、この酵素の活性がほとんど認められず、したがってFLTの集積は、細胞の増殖能を反映することになる。これまで、肺がんや脳腫瘍、悪性リンパ腫などで、FLTの集積が腫瘍の増殖能や悪性度を反映することが報告されている<sup>4-8)</sup>。我々の行った、原発性脳腫瘍を対象にした検討においても、FLTの腫瘍集積は脳腫瘍の悪性度・増殖能を反映していた<sup>9)</sup>。治療効果判定における有用性は、その結果が最近報告されつつあるが、その評価は定まっていない。乳がん患者を対象にした検討では、化学療法の治療効果をFLT-PETにより早期に評価できると報告されている<sup>10, 11)</sup>。一方、直腸癌での検討では、FLT集積の変化はその後の手術で確認された組織学的な治療効果と相関しなかった<sup>12)</sup>。今後のさらなる検討が期待される。放医研では、現在肺がんの重粒子線治療患者を対象に、FLT-PETによる治療効果判定の臨床試験が進行中である。これまでの結果では、治療後のFLT集積低下は同時期に施行されたメチオニンPETでのメチオニン集積低下よりも強い傾向が見られたが、長期効果および予後との関連については、さらなる経過観察が必要である（図2）。



左肺の腫瘍（赤矢印）に見られたFLTの集積は、治療後には著明に低下している。治療領域の肋骨の骨髄細胞への生理的集積もほとんど消失している。治療後には、放射性肺臓炎に一致してFDLの淡い集積を認めている（黒矢印）。

図 2：肺癌の重粒子線治療前後のFLT-PET画像

#### 4. Cu-ATSM-PETによる腫瘍内低酸素イメージング

悪性腫瘍の組織内には、十分に酸素が行き届かない領域、いわゆる低酸素領域が存在する。酸素の不足する領域では、細胞分裂を停止した細胞が多く、このような細胞は放射線療法や化学療法に対し抵抗性になることが知られており、腫瘍内低酸素細胞の存在は、治療効果不足・再発の大きな原因の一つと考えられている。がんの組織内の低酸素領域の有無およびその分布に関する情報を得ることは、治療方針を決めたり、治療効果を予測したりする上で、重要な意味を有する。現在、低酸素領域を特異的にイメージングするプローブがいくつか開発されているが、放医研ではその一つであるCu-ATSMの臨床試験を行っている（図3、図4）。

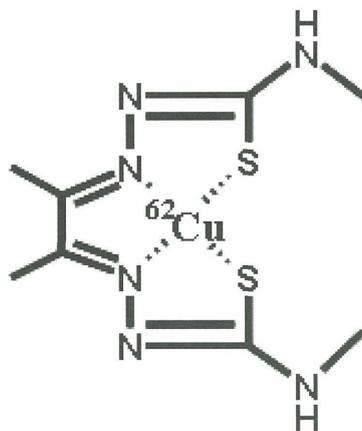
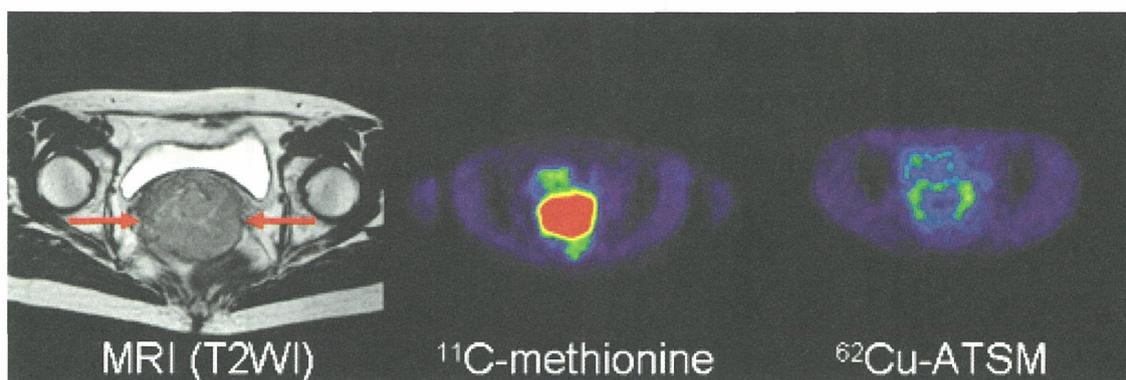


図 3：Cu標識ATSM



MRIで見られる子宮頸部の腫瘍（赤矢印）に一致してメチオニンの高集積を認めるが、Cu-ATSMは腫瘍の周辺部に淡く認めるのみである。

図4：子宮頸癌のCu-ATSM-PET画像

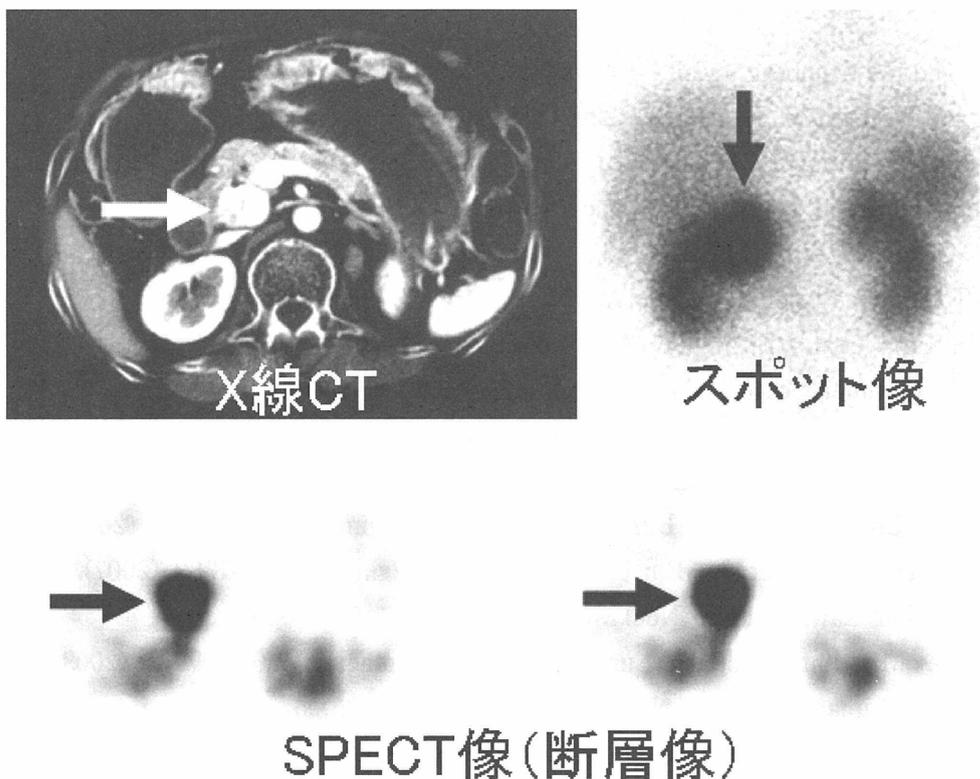
Cu-ATSMは細胞内に取り込まれたあと、酸素の足りていない細胞からは排出されるが、酸素の不足する細胞内のみとどまる性質があり、Cu-ATSMの集積の程度が腫瘍内低酸素の状態を反映すると考えられる。実験腫瘍での検討では、FDGの腫瘍内分布とCu-ATSMのそれは異なっており、FDGの集積する領域は酸素が足りており、細胞分裂も盛んであるが、Cu-ATSMの集積する領域は、低酸素で細胞分裂が止まっていることが報告されている<sup>13)</sup>。また、Cu-ATSMの集積性と放射線治療の効果を比較した検討では、Cu-ATSMの集積の高い腫瘍ほど局所制御率、生存率が悪いとの報告がある<sup>14)</sup>。重粒子線治療は、通常の放射線治療とは異なり、低酸素状態の細胞にも同等の治療効果があるとされており、Cu-ATSM-PETが、重粒子線治療が特にその力を発揮できる症例（＝通常の放射線治療は効きにくく、重粒子線治療が必要な症例）の選択に有用な情報を提供できるのではと期待される。

## 5. 新規プローブの開発状況

現在、がん細胞の様々な性質をイメージングする目的で、多くの新しいプローブが開発・検討されている。上述した、FLTに代わる新規核酸代謝プローブとして、<sup>11</sup>C標識チオチミジンが放医研にて開発された<sup>15)</sup>。FLTがDNAに取り込まれないのに対し、<sup>11</sup>C標識チオチミジンは増殖細胞のDNAに取り込まれることがわかっており、細胞増殖評価のスタンダードであるチミジンに近い挙動を示すと考えられる。また、実験動物での検討では、FLTに優る腫瘍集積性を示しており、現在、臨床での検討に向けて準備を進めている。

がん細胞が増殖し、周囲の組織に浸潤し、転移をおこすためには腫瘍組織内に血管を新たに作る必要があり、そのために、がん細胞や周りの間質細胞はVEGFをはじめとする種々の腫瘍血管新生因子を分泌し、血管の新生を促しており、血管新生は診断・治療の重要な標的である。このような血管新生のプロセスをイメージングするプローブが開発されている<sup>16)</sup>。

がん細胞には、様々な受容体（レセプター）が過剰発現することが知られており、このような場合に、その受容体に特異的に結合する物質を放射性同位元素で標識して担癌患者に投与することにより、がん細胞に特異的に発現した受容体を標的としたイメージングが可能になる。その代表的なものが、乳がん細胞に発現したエストロゲン受容体や消化管ホルモン産生腫瘍細胞に発現したソマトスタチン受容体を標的としたイメージングである。後者は、欧米では日常臨床で使用されているが、残念ながら本邦では未だ認可されていない<sup>17)</sup>（図5）。



膵臓頭部背側に認める腫瘍（白矢印）に一致して<sup>111</sup>In-標識オクトレオチドの高集積を認める（黒矢印）。

図5：ソマトスタチン受容体イメージング

また、当初はSPECT核種であるIn-111標識体を使用していたが、現在PET診断への応用のために、Ga-68などのポジトロン核種標識体が検討されている<sup>18)</sup>。腫瘍における受容体の発現を知ることにより、受容体を標的とした治療の適応の判定や治療効果の評価・予測が可能になる。また、ベータ線放出核種でプローブを標識することにより、受容体を標的とした内照射治療への応用も可能である。

このほか、がん細胞表面に発現する抗原（癌遺伝子産物やがん関連抗原など）に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いたイメージング・治療の研究も進められており、われわれも中皮腫特異抗原であるmesothelinやc-kitを標的とした抗体イメージングの検討を進めている。PETイメージングに向けては、体内からのクリアランスを促進するための抗体の低分子量化（DiabodyやMinibodyなど）、さらにその動態に見合った中半減期ポジトロン核種（I-124やCu-64など）での標識が必要になる<sup>19)</sup>。

## 6. おわりに

がん細胞の有する様々な性質をイメージングで捉える腫瘍分子プローブが開発され、いくつかはすでに臨床の場で試されている。これにより、それぞれのがんの個性が明らかになれば、その個性に見合った治療計画を立てることが可能になり、また治療効果を早期に予測・判定することにより、遅れることなく治療方針を変更することも可能になると期待されている。また、がん組織に特異的に集まる性質をもつプローブを、診断用の放射性同位元素（ガンマ線やポジトロン）の代わりに細胞障害性の高い放射線（ベータ線）を放出する放射性同位元素で標識することで、がん特異的放射線治療（内照射療法）への展開も可能であり、腫瘍分子イメージング研究の今後の発展が期待される。

引用文献

1. D Hanahan and RA Weinberg : Cell, 100, 57-70 (2000).
2. M Thakur and BC Lentle : Radiology, 236, 753-5 (2005).
3. LB Been, AJH Suurmeijer, et al : Eur J Nucl Med Mol Imaging, 31, 1659-72, (2004).
4. H Vesselle, J Grierson, et al. : Clin Cancer Res., 8, 3315-23 (2002).
5. AK Buck, G Halter, et al. : J Nucl Med., 44, 1426-31 (2003).
6. W Chen, T Cloughesy, et al. : J Nucl Med., 46, 945-52 (2005).
7. SJ Choi, JS Kim, et al. : Eur J Nucl Med Mol Imaging 32, 653-9 (2005).
8. AK Buck, M Bommer, et al. : Cancer Res., 66, 11055-61 (2006).
9. T Saga, H Kawashima, et al. : Clin Nucl Med., 31, 774-80 (2006).
10. BS Pio, CK Park, et al. : Mol Imaging Biol., 8, 36-42 (2006).
11. L Kenny, RC Coombes, et al. : Eur J Nucl Med Mol Imaging, 34, 1339-47 (2007).
12. HA Wieder, H Geinitz, et al. : Eur J Nucl Med Mol Imaging, 34, 878-83 (2007).
13. T Tanaka, T Furukawa, et al. : Nucl Med Biol., 33, 743-50 (2006).
14. F Dehdashti, MS Mintun, et al. : Eur J Nucl Med Mol Imaging, 30, 844-50 (2003).
15. J Toyohara, K Kumata, et al. : J Nucl Med., 47, 1717-22 (2006).
16. W Cai, K Chen, et al. : J Nucl Med, 47, 2048-56 (2006).
17. T Saga, A Shimatsu, et al. : Acta Radiol., 46, 227-32 (2005).
18. I Buchmann, M Henze, et al. : Eur J Nucl Med Mol Imaging, 34, 1617-26 (2007).
19. G Sundareshan, PJ Yazaki, et al. : J Nucl Med., 44, 1962-9 (2003).

# 脳内のグルタチオン抱合体排出輸送系を捉える測定方法および PETプローブの開発

独) 放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター  
分子認識研究グループ 岡村 敏充、菊池 達矢、岡田 真希  
Corresponding: okamura@fml.nirs.go.jp

## 1. はじめに

脳の毛細血管は血管内皮細胞同士が隙間無く密着結合し、血液脳関門 (Blood Brain Barrier, BBB) を形成している。BBBは血液から脳組織内への物質の移行を制限する関所であり、一般に、低分子の脂溶性物質はBBBを容易に通過することができるが、水溶性物質のBBB透過性は非常に低い。また、BBBには栄養物質を血液から脳に供給する輸送系が存在し、水溶性のグルコースやアミノ酸等はこの輸送系を介してBBBを通過することができる。反対に、脳から血液方向の輸送系 (排出システム) も存在することが徐々に明らかにされてきた<sup>1)</sup>。排出システムは脳内に侵入する脂溶性異物や不要な代謝物を積極的に除去することによって、脳を有害な物質から保護している。排出システムに関わる分子として、P糖タンパク (Pgp) やmultidrug resistance-associated protein (MRP) が存在し、これらはATPの加水分解のエネルギーを利用して基質を細胞内から細胞外に排出する一次性能動輸送型のトランスポーターである。異物である薬物の中には脂溶性が高いにもかかわらず、脳移行性が低いことが知られており、これは排出システムにより、脳への流入速度よりも速い速度で薬物が脳から血液中に排出されると考えられている。このように、中枢作用薬物の脳移行性において排出システムは極めて重要な役割を果たしている。また、排出システムの破綻が脳内に有害物質や不要な代謝物の蓄積をもたらし、その結果様々な脳疾患を誘発するのではないかと考えることができる。実際、排出トランスポーターの発現と神経変性疾患との関与が報告されつつある<sup>1, 2)</sup>。従って、脳内の排出システムをインビボで非侵襲的にかつ定量的に測定することができれば、薬物治療の改善や脳疾患の病態解明に大きく貢献することが期待される。本稿では、当研究チームが考案した排出システムを評価するための新規測定法について紹介する。

## 2. インビボにおける排出システムの測定法

### 2-1. 従来の方法

現在、脳内の排出システムをインビボで評価するための方法として2つの方法が存在する。一つは、PET核種で標識したトランスポーターの基質 (拡散型プローブ) を静脈内投与し、その後得られた脳内動態から排出システムを評価する方法である (図1 A)。この方法では、プローブは単純拡散によってBBBを通過し、速度定数 ( $K_1$ ) で脳組織内に入り、その後再び拡散 ( $k_2$ ) と排出システム ( $k_{eff}$ ) の2つのルートで血液中に戻る。脳からプローブが血液中に移行する速度は $k_2$ と $k_{eff}$ の和 ( $k_{out}$ ) で表され、通常この方法では分布容積 ( $K_1/k_{out}$ ) を求めることによって排出システムを評価する。このようなプローブには  $[^{11}C]$  ベラパミルや  $[^{11}C]$  カルベジロールなどがあり、分布容積を指標に脳内Pgp機能を非侵襲的に評価できることが示唆されている<sup>3)</sup>。しかしながら、これらのプローブは排出システムによる排出と拡散による排出を区別することができないので、定量的な評価は非常に困難である。また、プローブは基質として認識されるため正常状態ではほとんど脳内に入らないので、排出システムの機能が低下した場合しか評価することができない。

もう一つは、水溶性の放射性基質 (非拡散型プローブ) を脳内に直接投与する方法であり、現在

はBrain Efflux Index法として確立されている<sup>4, 5</sup>。この方法は侵襲的であるが水溶性基質の場合、拡散による排出が少ないので、キャリアーを介したプローブのみの排出速度 ( $k_{eff}$ ) を定量的に推定することができる (図1 B)。しかしながら、この方法では複数の実験動物を要するため、単一個体の排出速度を推定することは不可能であり、侵襲性から当然ヒトに適用することもできない。

そこで、当研究チームはMetabolite Extrusion Method (MEM) という脳内の排出システムを非侵襲的かつ定量的に評価するための方法を考案した<sup>6</sup>。

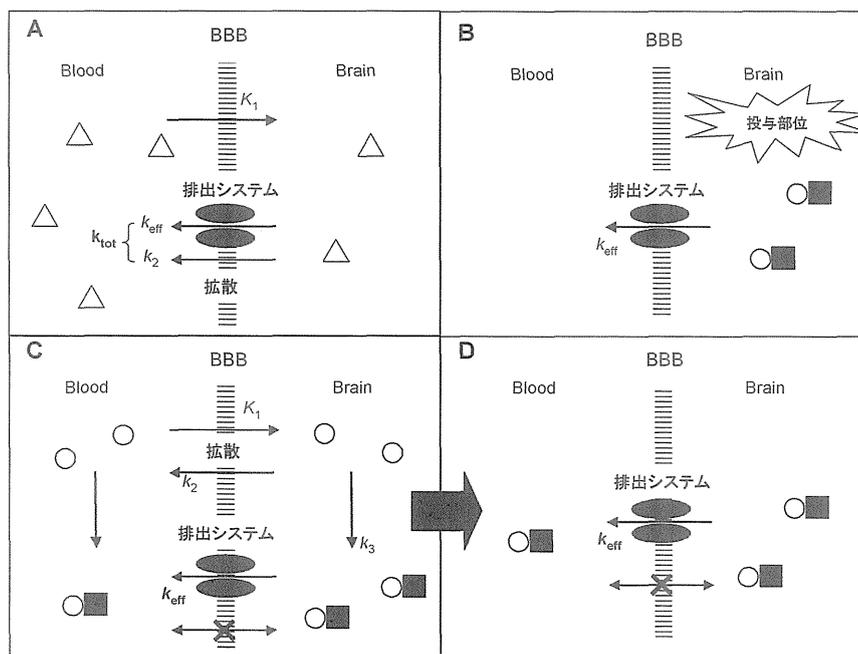


図1. インビボにおける排出システムの測定法

A : 拡散型プローブ ( $\Delta$ ) の静脈内投与      B : 非拡散型プローブ ( $\bigcirc$ ■) の脳内直接投与  
 C : MEM ; プロプローブ ( $\bigcirc$ ) 投与直後      D : MEM ; 一定時間経過後

## 2-2. Metabolite Extrusion Method

MEMは脂溶性の標識薬剤 (プロプローブ) を静脈内投与しBBBを通過させた後、脳内で水溶性基質 (プローブ) に変換させるというプロドラッグ的アプローチに基づいている。すなわち、脂溶性のプロプローブを静脈内投与すると単純拡散によってBBBを容易に通過し ( $K_1$ )、その後、一部は拡散によって再度血液中に戻り ( $k_2$ )、残りは速やかにプローブに変換される ( $k_3$ )。変換されたプローブは排出システムによって速度定数 $k_{eff}$ で脳から血液中に排出される。投与直後の脳内放射能の減少はプロプローブとプローブの双方に依存するが (図1 C)、プロプローブが完全に代謝された後、放射能の減少はプローブのみに依存し、脳内直接投与方法と同様な状態になると考えられる (図1 D)。この場合、動脈採血なしに、排出速度 ( $k_{eff}$ ) を非侵襲的かつ定量的に推定することができる。MEMにおけるプロプローブの必要な性質は、BBBを通過すること、速やかにかつ特異的にプローブに変換することである。また、プローブは拡散によるBBBの透過性が小さく、無視しうることなどの特性が必要となる。本研究ではグルタチオン (GSH) 抱合体排出輸送系を標的としてMEM型プローブの開発とMEMの妥当性の検証を行った。

## 3. GSH抱合体排出輸送系を評価するためのMEMに基づくプローブの設計

GSH抱合体は細胞内でGSHが毒物や薬物に付加する解毒反応によって生成され、さらに排出システムによって細胞内から細胞外に輸送される。MEMに基づきGSH抱合体排出輸送系を評価するため

のプロプローブは、①容易に血液脳関門を通過すること、②脳内で速やかにかつ特異的にGSHと反応することが必要となる。6-Chloropurineは肝臓および腎臓のグルタチオントランスフェラーゼ(GST)の基質であり、インビボでGSH抱合体に変換されることから<sup>7)</sup>、6-chloropurineをプロプローブのリード化合物として用いた。予備的検討において、6-halogenopurine誘導体を設計しGSTとの反応性、安定性、標識の可能性を評価した。その結果、6-chloro-7-methylpurine (7m6CP) とそのGSH抱合体 (7mPSG) をプロプローブおよびプローブの候補化合物として選択した (図2)。また、<sup>14</sup>Cまたは<sup>11</sup>Cヨウ化メチルを用いることによりそれぞれの放射性核種をプロプローブに導入することが可能である。

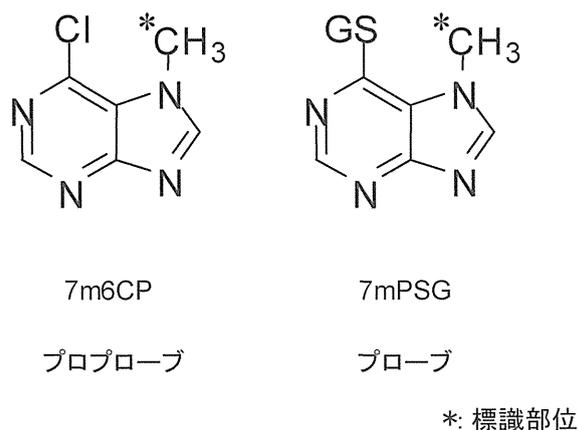


図2. 候補化合物

#### 4. プローブの評価

##### 4-1. ラット大脳皮質ホモジネートを用いたインビトロ評価

上述したように、プロプローブはGSHと高い反応速度 (図1 Cにおける $k_3$ ) を有することが必要である。ラット大脳皮質を用いて実質組織でのGSHとの反応速度をTLC/BAS法により求めた結果、 $[^{14}\text{C}]7\text{m6CP}$ の反応速度は $0.33 (\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{mL}^{-1})$ であり、速やかに反応することが確認された。また、 $[^{14}\text{C}]7\text{m6CP}$ を2 mMのGSHを含むリン酸緩衝液に加えた場合、インキュベート60分後において約90%が未変化体であったのに対して、脳ホモジネート中では90%以上が代謝された。このときの放射性代謝物をHPLCで分析した結果、放射能の約90%がGSH抱合体 (7mPSG) として同定された。以上の結果から、 $[^{14}\text{C}]7\text{m6CP}$ はインビボにおいてGSHと酵素的に速やかに (半減期約2分) 反応し、 $[^{14}\text{C}]7\text{mPSG}$ に変換されることが予測された。

##### 4-2. ラットを用いたインビボ評価

信頼性の高い $k_{\text{off}}$ を得るためには、プロプローブは高い脳移行性、プローブは拡散によってBBBを透過しないことが必要となる。図3は  $[^{14}\text{C}]7\text{m6CP}$ および  $[^{35}\text{S}]7\text{mPSG}$ をラットに尾静注後の大脳皮質における取り込みを示す。 $[^{14}\text{C}]7\text{m6CP}$ は投与後1分において約0.8% ID/g tissue取り込みを示し、高いBBB透過性を有することが確認された。一方、 $[^{35}\text{S}]7\text{mPSG}$ では、1分から60分まで脳内放射能は低値を示し、水溶性の高い  $[^{35}\text{S}]7\text{mPSG}$ は単純拡散によりBBBをほとんど透過しないことが認められた。

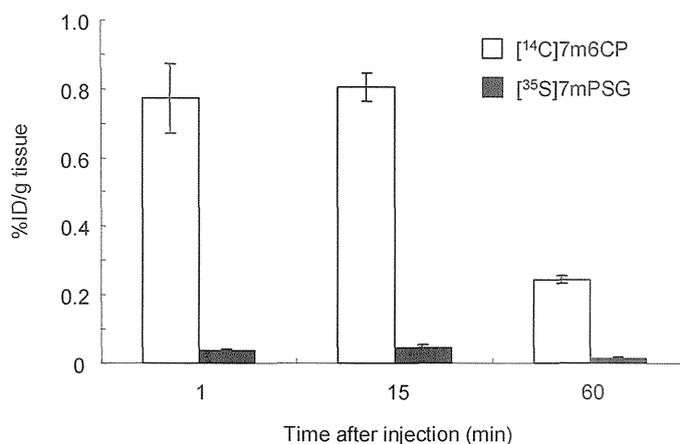


図3. 標識薬剤投与後の脳内取り込み量

さらに [<sup>14</sup>C]7m6CPはインビボにおいて脳内で速やかに、かつ特異的にGSH抱合体 (7mPSG) へ変換されていることが必要である。このことを確認するために、 [<sup>14</sup>C]7m6CPをラットに投与後5、15、60分における脳内放射性物質の化学形をTLCおよびHPLCにより分析した。TLCによる分析では、投与5分後で放射能の90%が原点に観測され、 [<sup>14</sup>C]7m6CPに相当するピークは5.6%であり、15分後にはこのピークがほぼ完全に消失した。さらに、HPLCによる分析では、投与15分後および60分後で標品7mPSGと同一の保持時間 (15.3分) に放射能の約80%が検出され、 [<sup>14</sup>C]7m6CPに相当するピーク (17.3分) は極めて低値を示した。これらの結果より、 [<sup>14</sup>C]7m6CPはMEMで必要とされるGSHとの反応特異性の条件を満たすことが確認された。

#### 4-3. プロプローブおよびプローブの経時変化の推定

脳内動態のデータおよび化学形の分析結果を基に、プロプローブ ([<sup>14</sup>C]7m6CP) とプローブ ([<sup>14</sup>C]7mPSG) 量の経時的変化を推定した (図4)。その結果、 [<sup>14</sup>C]7m6CPの放射能は時間とともに減少し、投与後15分においてほぼ完全に消失した。一方、 [<sup>14</sup>C]7mPSGはプロプローブの減少にともない増加した。これらの結果より、投与後15分以降はGSH抱合体 [<sup>14</sup>C]7mPSGのみが排出されていると考えられる。15分以降の脳内取り込み量を片対数でプロットすると直線性が得られたことから、脳内放射能は指数関数的に減少していることが示唆され、この時のプローブの排出速度は $0.0253 \text{ min}^{-1}$ と推定された。また、 [<sup>14</sup>C]7mPSGの単純拡散によるBBB透過性は極めて低いことから、 [<sup>14</sup>C]7mPSGは排出システムによって脳から血液中へ輸送されていると考えられる。

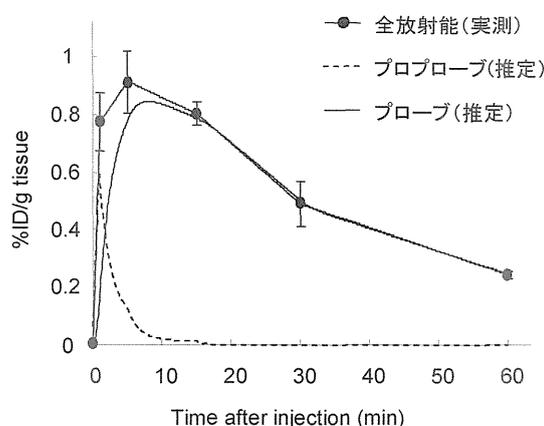


図4. [<sup>14</sup>C]7m6CP投与後の時間-放射能曲線

#### 4-4. 7mPSGの排出に関与するトランスポーター

排出トランスポーターMRP1は広範な基質選択性を有しており、特にGSH抱合体などの抱合体代謝物や水溶性化合物は良好な基質であることが示されている<sup>9)</sup>。そこでインビトロの系において7mPSGに対するMRP1の基質認識性を検証した。<sup>[35S]</sup>7mPSGはMRP1 vesicleに時間依存的およびATP依存的に取り込まれたのに対して、コントロールvesicleへの取り込みはATP存在下、非存在下ともに低値を示した。この結果より設計したプローブ (7mPSG) はMRP1の基質であることが確認され、7mPSGの脳からの排出にはMRP1が関与していることが考えられた。

#### 5. おわりに

今回、我々は脳内の排出システムを非侵襲的かつ定量的に評価するための方法 (MEM) を考案した。MEMに基づき設計したプロプローブは効率よく、特異的に水溶性のGSH抱合体を脳内に送達することができ、脳内プロプローブの消失後GSH抱合体は指数関数的に脳から排出されることが明らかとなった。これらのことから、PET核種で標識した <sup>[14C]</sup>7m6CPを用いることによって、脳内のGSH抱合体排出輸送系を非侵襲的かつ定量的に評価できると考えられる。さらに、7mPSGがMRP1の基質であることから、<sup>[14C]</sup>7m6CPは脳内MRP1機能を定量するためのPET薬剤として期待される。今後は、MRP1だけでなく他の排出トランスポーター (P糖タンパクなど) を標的としたMEM型プローブの開発を行う予定である。

#### 引用文献

- 1) W. Loscher and H. Potschka, Prog Neurobiol, 76, 22-76 (2005).
- 2) R. Sultana and D. A. Butterfield, Neurochem Res, 29, 2215-20 (2004).
- 3) P. H. Elsinga, N. H. Hendrikse, et al., Curr. Pharm. Des., 10, 1493-503 (2004).
- 4) H. F. Cserr and B. J. Berman, Am J Physiol, 235, F331-7 (1978).
- 5) A. Kakee, T. Terasaki, et al., J Pharmacol Exp Ther, 277, 1550-9 (1996).
- 6) T. Okamura, T. Kikuchi, et al., Bioorg Med Chem, 15, 3127-33 (2007).
- 7) I. Y. Hwang and A. A. Elfarra, J. Pharmacol. Exp. Ther., 264, 41-6 (1993).
- 8) S. Dallas, D. S. Miller, et al., Pharmacol Rev, 58, 140-61 (2006).

# RGDペプチドを用いた*in vivo*光イメージングによる

## integrin $\alpha_v\beta_3$ 発現の可視化

### *In vivo* optical imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$ expression using cRGD peptides

独) 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グループ 金 朝暉

Corresponding: zhaohui@nirs.go.jp

#### Background

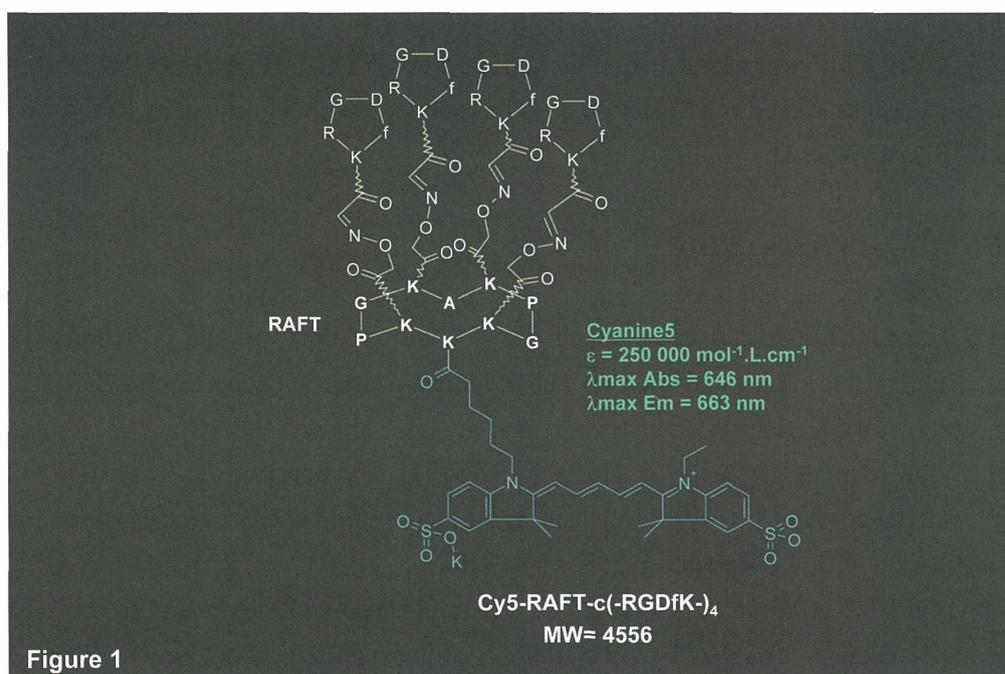
Integrins are an important class of transmembrane heterodimeric glycoprotein involved in cell-matrix interaction. Among the superfamily of integrins,  $\alpha_v\beta_3$  integrin has been validated as an interesting target for specific therapies in oncology as it plays an important role in tumor growth, local invasion and metastasis and angiogenesis. Moreover, it is overexpressed in activated endothelial cells during angiogenesis and also in many types of tumor cells such as osteosarcomas, neuroblastomas, carcinomas (lung, breast, prostate, bladder), glioblastomas, and invasive melanoma. The key component of the ligand of  $\alpha_v\beta_3$  is an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) tripeptide motif, which is found in extracellular matrix proteins, for example, vitronectin and fibronectin. Cyclic pentapeptides containing RGD (cRGD) show high affinity and selectivity to  $\alpha_v\beta_3$ , depending on the conformation of the RGD-containing loop and its adjacent residues. Using cRGD for *in vivo* non-invasive imaging and targeting of  $\alpha_v\beta_3$  has recently become an important issue for early cancer detection and cancer control<sup>1)</sup>. Radiolabeled cRGD peptides in combination with nuclear imaging techniques such as positron emission tomography (PET) have been increasingly applied for imaging of  $\alpha_v\beta_3$  expression in animal tumor models, as summarized by Kwon S *et al.*<sup>2)</sup>. Furthermore, PET using [<sup>18</sup>F] galacto-RGD has been applied in patients with different types of tumors, exhibiting its ability for monitoring of angiogenesis as well as cancer detection<sup>3-5)</sup>. On the other hand, although nuclear imaging is an established clinical molecular imaging modality that offers good sensitivity at deep tissue sites, some limitations remain. It is time-consuming, needs highly skilled personnel and offers relatively poor spatial resolution even in superficial sites. Molecular optical imaging, especially NIRF (near-infrared fluorescence) reflectance imaging, is a very powerful experimental tool for studying the temporal and spatial dynamics of biomolecules in real-time and *in vivo*<sup>6,7)</sup>, and would find its position in certain clinical situations where the nuclear modality may not be suited or not enough providing comprehensive information. For example it may be used for intraoperative navigation aiding to define surgical margin and detect residual lesions because it can provide improved resolution and sensitive detection of the superficial lesions, with very short exposure time for every acquisition. Furthermore, optical probes are interesting because their signal emission can be controlled by chemical modification of the fluorescent dye, which may offer more specific targeting and functional activity<sup>8)</sup>. *In vivo* optical imaging using NIR-dye labeled cRGD peptide has been recently reported for imaging of  $\alpha_v\beta_3$  expression in animal tumor models<sup>9,10)</sup>.

Our group has developed a new molecular tool RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub><sup>11)</sup>. Its core, called RAFT (Regioselectively Addressable Functionalized Template), is composed of a decapeptide platform containing up to 6 lysine residues with side chains pointing to either side. 4 cRGD monomers were attached to the upper

face of RAFT to form targeting domain. The lower face of RAFT can be functionalized with various cargoes. According to the chemical synthesis, the attachment of a specific motif or a combination of different motifs can be completely controlled for particular application. The present study is to show the usefulness of fluorescence dye-labeled multivalent RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub> as an efficient optical probe for early and non-invasive tumor detection by comparing its bioactivity and tumor-targeting specificity to those of the monovalent cRGD<sup>12-14</sup>. In addition, the development of a self-quenched Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub> is also introduced here<sup>15</sup>.

## Synthesis

### (1) RGD-Peptides and Labeling



**Figure 1.** Structure of Cy5-RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>.

RAFT is a cyclic decapeptide (c [-Lys (Boc) -Lys (Alloc) -Lys (Boc) -Pro-Gly-Lys (Boc) -Lys (Alloc) -Lys (Boc) -Pro-Gly-]) with up to six lysine residues. Protection of the lysine in position 1, 3, 6, or 8 and of the two in positions 2 and 7 results in RAFT molecule having two orthogonally addressable domains pointing on either side of the cyclopeptide backbone. On the upper face, four copies of the c[-RGDfK-] peptide were grafted for recognition of the integrin. The bottom face can be used to link one or two drugs (plasmids, oligonucleotides, peptides, tags, chemicals) and/or agents for molecular imaging. The four c[-RGDfK-] were linked on the RAFT using an oxime bond (R1-O-N=C-R2). This reduces the risk that one domain sterically affects the conformation and accessibility of the other as it is observed when cRGD is linked directly to another function. Cy5 mono-NHS (N-hydroxysuccinimide) ester was added for fluorescence labeling. The replacement of the amino acid “G” to “A” leads to the loss of specificity for integrin α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>. The molecule RAFT-c(-Rβ AdfK)<sub>4</sub> was synthesized as a negative control peptide.

### (2) Synthesis of Quenched Cy5-RAFT-c(-RGDfK-) 4 Conjugate

Starting with the synthesis of cyclic decapeptide c[-K (boc) -K (alloc) -K (boc) -P-G-K (boc) -A-K

(*boc*) -*P-G*-], the purified cyclic decapeptide dissolved in H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (1:1) was then added to a solution of H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (1:1) containing cyclic [-*R-G-D-f-K* (CO-CHO) -]. The solution mixture was stirred at room temperature (RT) for 4 days and then lyophilized to obtain the RGD-containing peptide as a white solid. The pure peptide was dissolved in a degassed solution containing DMF/PBS (3:1, pH 4.8). Boc-protected cysteine dissolved in DMF/PBS (3:1, pH 4.8) was then added and the mixture stirred under Argon at RT for 1 h. To a solution containing the peptide dry DMF was added a solution of Cy5 mono-NHS ester in dry DMF with DIEA. The solution mixture was stirred at RT for 48 h. The solvent was then removed under reduced pressure to obtain the peptide as a deep blue solid. The crude peptide was then dissolved in solution containing TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (95:2.5:2.5) and the solution was stirred at RT for 45 min. The solvents were removed under reduced pressure. The residue was dissolved in DMF/H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN and purified by RP-HPLC to afford the product as a deep blue powder. To a solution containing the Cy5-containing peptide in dry DMF was added a solution of quencher QSY21-NHS ester in dry DMF with DIEA. The solution mixture was stirred at 45°C for 16 h. The product was then purified by RP-HPLC to produce RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q.

### **RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub> versus cRGD**

#### **(1) *In Vitro* Studies**

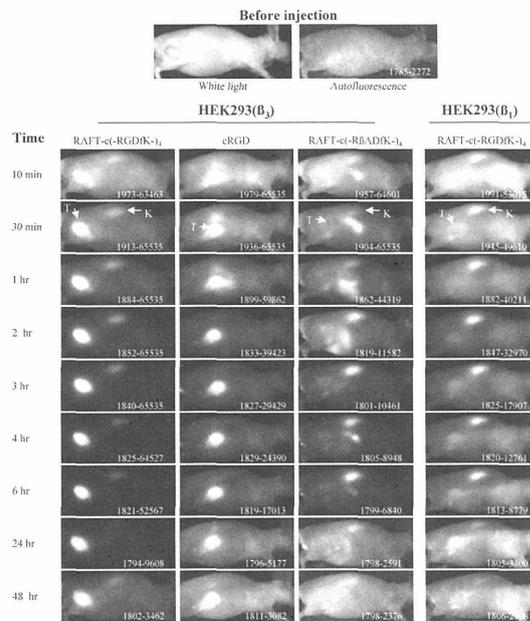
HEK293 ( $\beta_3$ ) and HEK293 ( $\beta_1$ ) cells, stable transfectants of human  $\beta_3$  and  $\beta_1$  subunits respectively from the human embryonic kidney cell line, as well as human ovarian adenocarcinoma IGROV1 cells were used in this study. FACS analysis and Western blot analysis showed the strong  $\alpha_v\beta_3$  expression in HEK293 ( $\beta_3$ ), low to moderate levels of  $\alpha_v\beta_3$  in IGROV1, and negative  $\alpha_v\beta_3$  in HEK293 ( $\beta_1$ ).

The binding of RGD peptides in these 3 cell lines was then observed using confocal laser scanning microscopy after incubation with Cy5-labeled RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub>, cRGD, or RAFT-*c* (-R $\beta$ ADfK)<sub>4</sub> at final concentrations of 0.1-0.5  $\mu$ M for 30 min at 37°C. None of these peptides bound to the HEK293 ( $\beta_1$ ) cells, and as expected also, the RAFT-*c* (-R $\beta$ ADfK)<sub>4</sub> control peptide did not bind to the  $\alpha_v\beta_3$ -positive HEK293 ( $\beta_3$ ) and IGROV1 cells. In contrast, cRGD and RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub> were reacting with either of the  $\alpha_v\beta_3$ -positive cells moderately and very strongly, respectively. In order to confirm if the multivalent RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub> offer an increased affinity for  $\alpha_v\beta_3$ , we performed “competitive cell adhesion assay” using  $\alpha_v\beta_3$ -positive HEK293 ( $\beta_3$ ) cells. The assays showed that the negative control RAFT-*c* (-R $\beta$ ADfK)<sub>4</sub> did not inhibit cell adhesion. cRGD inhibited the cell adhesion with an IC<sub>50</sub> at 30  $\mu$ M, while RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub> strongly prevented cell attachment with an IC<sub>50</sub> at 3  $\mu$ M which was 10 times less than that of cRGD. This result suggests RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub> has an increased affinity for  $\alpha_v\beta_3$ -positive cells by its multivalent ligation.

#### **(2) *Animal* Studies**

**A. Imaging of subcutaneous tumor models (Fig. 2):** In order to confirm whether the grafting of multiple cRGD motifs to RAFT could enhance the tumor-to-background ratio, time courses of non-invasive *in vivo* optical imaging studies were conducted in nude mice bearing subcutaneous (s.c.) HEK293 ( $\beta_3$ ) (high levels of  $\alpha_v\beta_3$ ), HEK293 ( $\beta_1$ ) ( $\alpha_v\beta_3$ -negative) or IGROV1 (low to moderate levels of  $\alpha_v\beta_3$ ) xenografts. Each mouse received 10 nmol Cy5-labeled RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub>, cRGD, or RAFT-*c* (-R $\beta$ ADfK)<sub>4</sub> by intravenous (i.v.) injection. The  $\alpha_v\beta_3$ -negative HEK293 ( $\beta_1$ ) tumors did not take-up the RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub> peptide, demonstrating the specificity of RAFT-*c* (-RGDfK)<sub>4</sub> for the  $\alpha_v\beta_3$

integrin. In  $\alpha_v\beta_3$ -positive HEK293 ( $\beta_3$ ) the RGD-tetramer and the monomer reached similar maximal tumor uptake 5 to 30 min postinjection (p.i.). Between 30 min and 4 h p.i., the tetramer's signal remained very elevated in the tumor ( $65472 \pm 90$  to  $61875 \pm 3434$  photons/pixel) while a marked decrease (from  $63744 \pm 3031$  to  $28349 \pm 9727$  photons/pixel) was measured with the cRGD. At later time points RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub> always showed a better tumor accumulation than the monomer. The negative control probe RAFT-c(-R $\beta$ ADfK)<sub>4</sub> was rapidly washed-out from the tumors. In normal skin, all 3 probes exhibited similar kinetic curves, except at early time points (5 min to 1 h) where cRGD showed a somewhat stronger non-specific diffusion. Finally, the tumor contrast (tumor-to-skin ratio) was markedly enhanced with RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>. Four hours p.i. the tumor/skin ratio reached the value of  $15.9 \pm 3.6$  with RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>. This was significantly higher than that of the monomeric cRGD ( $5.9 \pm 2.0$ ), or the  $1.4 \pm 0.1$  ratio obtained for the control probe.



**Figure 2**

**Figure 2.** Representative fluorescence images of Swiss nude mice bearing HEK293 ( $\beta_1$ ) or HEK293 ( $\beta_3$ ) s.c. tumors after i.v. injection of 10 nmol Cy5-labeled RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>, cRGD, or RAFT-c(-R $\beta$ ADfK)<sub>4</sub>. The values shown in each image represent the range of minimal to maximum signal intensity in each mouse. “T” and “K” indicate tumor and kidney, respectively.

For mice bearing IGROV1 tumors, which express a relatively low level of  $\alpha_v\beta_3$ , the tumor-to-skin ratio was also found to be statistically better with RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>. At 6 h after i.v. injection, Cy5-RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub> provided the expected contrast ( $3.24 \pm 0.772$ ), significantly higher than those of the control Cy5-RAFT-c(-R $\beta$ ADfK)<sub>4</sub> ( $1.44 \pm 0.299$ ;  $p = 0.0357$ ) and Cy5-labeled monovalent cRGD ( $2.00 \pm 0.179$ ;  $p = 0.0159$ ). Although cRGD produced a stronger fluorescence signal in the tumor than RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>, its level in skin was also higher, resulting in a lower tumor/skin ratio. Besides the expected specific RGD-mediated binding, other factors such as molecule perfusion and increased vascular permeability also participate to the accumulation of a probe in a tumor. This is especially important for small molecular weight compounds like Cy5-cRGD (3 times smaller than Cy5-RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>). In addition, it is known that endocytosis of cRGD may follow a nonspecific pathway, whereas dimeric and even multimeric cRGD may predominantly induce integrin-dependent endocytosis.

HEK293 ( $\beta_3$ ) tumors of mice treated as mentioned above were excised at 3 h p. i., and observed by confocal microscopy. Cy5-RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub> was massively internalized by tumor cells, and virtually each tumor cell was strongly labeled. A similar pattern was obtained with the monomeric cRGD although the intensity of the signal was lower. IGROV1 tumors sampled at 3 h after i.v. injection were also analyzed using confocal microscopy. Both RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub> and the monovalent cRGD stained the endothelial cells of the tumor microvasculature as well as numerous tumor cells. No specific fluorescence labeling of the tumor was found in mice injected with PBS alone or the control peptide Cy5-RAFT-c(-R  $\beta$  ADfK)<sub>4</sub> in both tumor types.

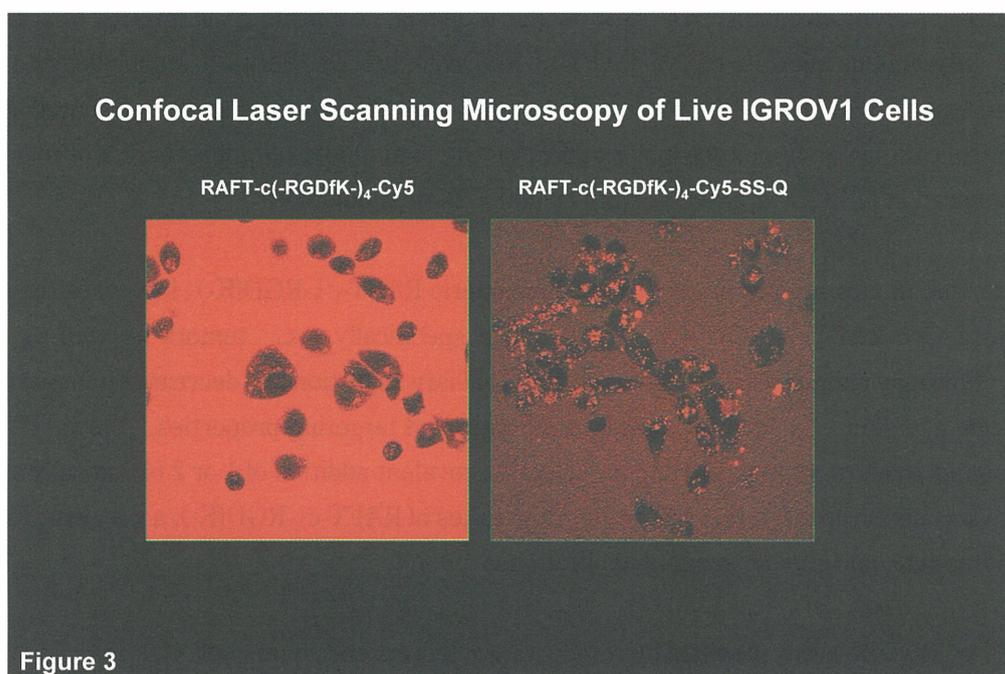
**B. Imaging of Abdominal Metastases :** We finally tried to determine whether Cy5-RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub> or Cy5-cRGD could allow a non-invasive detection of deep, and small IGROV1/pGL3 peritoneal tumors. IGROV1/pGL3 cells, stable transfectants of IGROV1 cells with luciferase-expression vector, were injected intraperitoneally (i. p.) to the nude mice, and about 2 weeks later the mice were used for imaging study. As expected, luciferase-positive nodules located in the abdominal region were identified in each mouse by bioluminescence imaging (BLI) after i. p. injection of luciferin. In 3 out of 4 mice of the Cy5-RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>-treated group, the Cy5 signal colocalized with luciferase positive nodules. In the fourth mouse, the Cy5 signal was too weak, certainly because of the very small size of the nodule as shown by the very low BLI intensity. Note that in all 4 mice, the diameter of the tumor nodules ranged between 1 and 5 mm and were hardly visible under normal light after opening the abdomen. We thus performed optical imaging-guided biopsy and frozen tissue sections were observed by confocal microscopy. Cy5-labeled cells were also presenting a typical pattern of malignant cells after hematoxylin-eosin staining. These data clearly reflect the good sensitivity of the Cy5-RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub> staining as well as it confirms that of BLI. In contrast, no tumor specific Cy5 signal was showing up in the 4 mice injected with Cy5-cRGD. This was mainly due to the strong background fluorescence in the intestine which eventually masked the specific Cy5-cRGD signal and prevented identification of the positive nodules. Indeed, normalized images of the extracted tissues (stomachs and intestines) from tumor-free mice clearly showed that the gastrointestinal uptake was higher for Cy5-cRGD than its multivalent analog. It is important to note that using a normalized signal range, no significant autofluorescence from mouse diet in the intestine of PBS-injected mice was visible. Finally, as expected, none of the 4 Cy5-RAFT-c(-R  $\beta$  ADfK)<sub>4</sub>-injected mice showed detectable signal in BLI positive tumors.

## ***Non-invasive Imaging of RGD Internalization***

### ***(1) In Vitro Studies***

Optical imaging was conducted in either RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>-Cy5 or RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q solution. It was found that when conjugated with a quencher by -SS- bound, the emission of fluorescence from RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>-Cy5 was inhibited by 13.5 times. However, after adding a reducing reagent 2-mercaptoethanol for cleaving the -SS- bridge, the fluorescence emission could restore almost completely. These findings show RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q is an activatable molecular probe with both quenching and dequenching efficiency. This probe was further tested in cellular level by incubation with live cells and observed using a confocal microscope. In IGROV1 cells in the presence of RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>-Cy5, a very intense signal was observed coming from the RAFT-c(-RGDfK)<sub>4</sub>-Cy5 in culture medium, greatly hampering the visualization of the specific signal coming from the labeled cells (Fig. 3). In contrast,

this background signal was absent when using the quenched molecule (Fig. 3) and the intracellular vesicles containing the “activated-smart probe” were then easily detected. A similar experiment performed on HEK293 ( $\beta_3$ ) cells produced identical results. But, since HEK293 ( $\beta_3$ ) cells expressed very high levels of  $\alpha_v\beta_3$ , the peptide concentration was used 5 times lower and the laser power down from 30% to 1%. In these conditions the background signal coming from the free RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5 was low but a strong fluorescence coming from a large excess of peptides accumulated on the cell surface still affected the visualization of intracellular vesicles. Again, when using RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q, the unbound molecules in suspension remained undetectable, and only a faint signal was coming from the membrane-associated molecules. Nonetheless, most of the Cy5 signal was coming from intracellular vesicles. Thus Cy5-SS-Q allows the visualization of an intracellular signal despite the presence of a large excess of extra- and peri-cellular probe concentration. The kinetic of the internalization process was then observed in live HEK293 ( $\beta_3$ ) cells by real-time microscopic imaging. The intracellular signal became visible 10 min after addition of RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q, and augmented regularly during the first 2 h. Finally, live IGROV1 or HEK293 ( $\beta_3$ ) cells were incubated simultaneously with the quenched probe and the Green-fluorescent LysoTracker probe during 90 min and examined by confocal microscopy. A large proportion of the red Cy5 signal colocalized with the green fluorescence coming from LysoTracker in both cell lines. This suggested that the dequenching effect occurs mainly in acidic vesicles including lysosome.



**Figure 3.** Confocal microscopy of intracellular Cy5 dequenching in live cells. Representative images of IGROV1 cells were taken after 2 h of incubation with RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5 or RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q at a final concentration of 0.5  $\mu$ M. The detected Cy5 signal was pseudocolored red.

## (2) Animal Studies

Time courses of non-invasive *in vivo* optical imaging studies were conducted in nude mice bearing s. c. IGROV1 tumors. Each mouse received 10 nmol RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5 or RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q by i. v. injection. Tumors were stained as early as 10 min after administration of RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5, but not with the quenched probe. The Cy5 signal coming from the quenched probe was building up

more slowly than with the original probe. While the RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5 signal in the tumor began to decrease as soon as 10 min after injection, the fluorescence intensity was increasing regularly during the first 3 h into the tumors treated by RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q. Although the tumor/skin ratio was not significantly different during the first 6 h for both molecules, it augmented and peaked at 10 h with the quenched probe while it was already significantly lower with the conventional one. As an example, the tumor/skin ratio is  $3.18 \pm 0.17$  for RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q and  $1.78 \pm 0.23$  for RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5 24 h after injection.

Tumors sampled at 3 h after *i. v.* injection of each molecule were then analyzed by confocal microscopy using constant acquisition parameters optimized for imaging RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q. Results showed that the quenched probe produced much stronger fluorescence signal in tumor cells or in the stroma than RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5, supporting the macroscopic findings. High-magnification image showed RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q was actively internalized by tumor cells *in vivo* also. Besides the staining of the tumor cells, the stroma was also fluorescent, with a pattern resembling that of a CD31 immunostaining of blood vessels. This suggested that RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q was also binding to endothelial cells.

### Summary and Prospect

In conclusion, we demonstrated that Cy5-RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub> was indeed binding to the  $\alpha_v\beta_3$  receptor with an improved activity as compared to its monomeric analog, confirming the interest of using multivalent ligands. Intravenous injection of Cy5-RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub> in HEK293 ( $\beta_3$ ) tumor-bearing nude mice provided tumor/skin ratio above 15. Such high contrast plus the opportunity to use the HEK293 ( $\beta_1$ ) negative control cell line or tumor are major assets for the community of researchers working on the design and amelioration of RGD-targeted vectors or on RGD-antagonists.

The *in vitro* and *in vivo* studies show that the multimeric RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub> increases the selectivity of cRGD since Cy5-RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub> targets more specifically *s. c.* tumors as well as abdominal metastases. This may mainly be due to its lower hepatobiliary excretion and decreased nonspecific binding to the intestine and skin. In addition, besides its improved targeting properties, the RAFT molecule was also designed to allow an easy and chemo-selective covalent addition of 1 or 2 biologically active compounds on its second functional face. Altogether this makes of RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub> a very promising vector for future therapeutic and clinical imaging applications.

Cy5-RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub> was modified by conjugating a fluorescence quencher (Q) to Cy5 via a disulfide bond (-SS-) with the rationale that the resultant RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q is fluorescence-activated upon internalization-induced disulfide cleavage. Optical imaging of the probe solution showed that fluorescence emission for RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q was strongly inhibited when compared to the unmodified form, and nearly totally recovered upon chemically induced disulfide cleavage. Real-time confocal microscopy of  $\alpha_v\beta_3$ -positive cell lines in culture showed only intracellular Cy5 signal could be clearly detected for RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q-incubated cells. Whole body imaging of mice bearing  $\alpha_v\beta_3$ -positive tumor xenografts showed RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q significantly enhanced tumor contrast due to the prolonged tumor retention. As compared to the rapid accumulation of the unquenched molecule, the initially steadily increasing fluorescence in tumor produced by RAFT-c(-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q indicated

the process of fluorescence dequenching. Histology of the excised tumor clearly exhibited the intracellular signal produced by RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q. This study demonstrates the potential of RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub>-Cy5-SS-Q as a functionalized probe for *in vivo* measuring receptor-mediated RGD internalization and subsequent events.

Since PET imaging is so far the only established molecular imaging modality for clinical use. It is of necessity to develop RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub> as a PET imaging probe. This would validate the optical imaging modality, and also help to translate it into clinical application. It is also expected that the combined use of PET and optical imaging would provide more comprehensive and complementary biological information than the single-modality. In collaboration with Pascal Dumy's group in University Joseph Fourier in France, the development of RAFT-c (-RGDfK-)<sub>4</sub>-based PET probe is underway.

#### References

- 1) Chen X : Mini Rev Med Chem, 6, 227-234 (2006).
- 2) Kwon S, Ke S and *et al.* : Mol Imaging, 4, 75-87 (2005).
- 3) Haubner R, Weber WA and *et al.* : PLoS Med, 2, e70 (2005).
- 4) Beer AJ, Haubner R and *et al.* : Clin Cancer Res, 12, 3942-3949 (2006).
- 5) Beer AJ, Grosu AL and *et al.* : Clin Cancer Res, 13, 6610-6616 (2007).
- 6) Shah K and Weissleder R : NeuroRx, 2, 215-225 (2005).
- 7) Du W, Wang Y and *et al.* : Anal Bioanal Chem, 386, 444-457 (2006).
- 8) Weissleder R, Tung CH and *et al.* : Nat Biotechnol, 17, 375-378 (1999).
- 9) Wang W, Ke S and *et al.* : Mol Imaging, 3, 343-351 (2004).
- 10) Cheng Z, Wu Y and *et al.* : Bioconjug Chem, 16, 1433-1441 (2005).
- 11) Boturyn D, Coll JL and *et al.* : J Am Chem Soc, 126, 5730-5739 (2004).
- 12) Garanger E, Boturyn D and *et al.* : Mol Ther, 12, 1168-1175 (2005).
- 13) Jin ZH, Jossierand V and *et al.* : Mol Imaging, 5, 188-197 (2006).
- 14) Jin ZH, Jossierand V and *et al.* : Mol Cancer, 6, 41 (2007).
- 15) Jin ZH, Razkin J and *et al.* : Mol Imaging, 6, 43-55 (2007).

# Quantum Dots : From Multimodal Imaging Diagnostics to Radiation-Induced Photodynamic Therapy of Cancer

Rumiana Bakalova, Ichio Aoki, Zhivko Zhelev, Iwao Kanno

Biophysics Group, Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences,  
NIRS, Japan.

Corresponding : bakalova@nirs. go. jp

Nanotechnology-based tools and techniques are rapidly emerging in the field of molecular imaging, bio-sensing and targeted drug delivery. Employing constructs such as quantum dots (QDs), fullerenes, dendrimers, liposomes, nanotubes and emulsion, these advances lead toward the concept of personalized medicine and the potential for very early, even pre-symptomatic, diagnoses coupled with highly effective targeted therapy. The new term nanomedicine has been used recently.

Why nanoparticles are so attractive for molecular imaging diagnostics? Nanoparticles allow a concentration of a large amount of contrast molecules in a very small area/volume (~20-100 nm in diameter). Thus, after conjugation with target-specific ligands, even single cells or molecules could be detected in the blood stream or tissues, using different techniques. The nanoparticles have also a potential for therapeutic purposes (e. g., drug and gene delivery), which is expected to generate innovations and play a crucial role in medicine. For example, the diagnosis and treatment of cancer at the cellular level could be greatly improved with the development of techniques that enable a highly selective interaction and delivery of analyte probes into the cancer cells and subcellular compartments. Target-specific drug/gene delivery and early diagnosis of cancer is one of the priority research areas in which nanomedicine will play a vital role. Nanomedicine attracts also other clinical fields as surgery, cardiology, respiratory diseases, etc.

## Quantum Dots for Multimodal Molecular Imaging

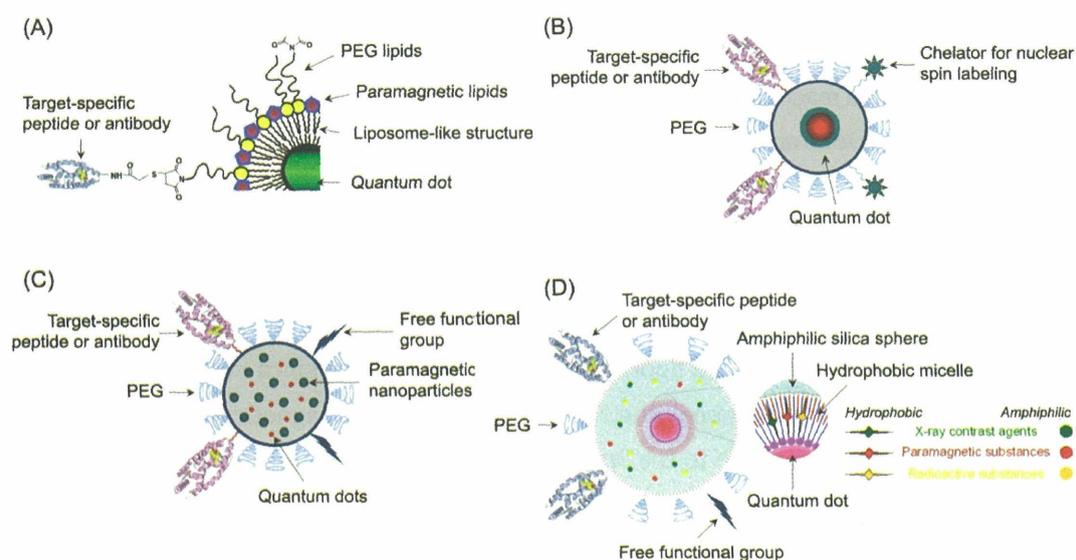
Among all nanoparticles, QDs are most attractive for molecular imaging diagnostics. Over the past few years, QDs have won recognition as new generation fluorophores in optical imaging, because of their unique spectral properties over traditional organic dyes : a high quantum yield ; broad absorption spectra with narrow, symmetric fluorescence spectra spanning the ultraviolet to near-infrared ; large effective excitation/emission Stokes-shifts ; a high resistance to photo-bleaching and an exceptional resistance to photo- and chemical-degradation. All these characteristics make QDs 10-20 times brighter than classical organic dyes under photon-limited in vivo and in situ conditions, where the light intensities are severely attenuated by tissue scattering and absorption. <sup>1</sup> These novel optical properties of QDs could be used for optimizing of signal-to-noise ratio and improving the sensitivity of fluorescence detection devices, as well as for increasing the quality of fluorescent cellular and molecular labeling and in vivo deep-tissue imaging. The size-tunable fluorescent emission (as a function of core size for binary semiconductor materials) and the broad excitation spectra (which allow excitation of mixed QD populations at a single wavelength) give a possibility for multiplex imaging. In addition, the architecture of water-soluble QDs allows a development of novel nanobioprobes with dual- and multimodality, for simultaneous application in different imaging techniques [e. g., fluorescent imaging (FI), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), computing tomography (CT), X-ray imaging, etc.].

In particular, by fabricating QD probes that exhibit both fluorescent and paramagnetic properties, optical imaging and MRI can be used in a complementary fashion. This is a powerful combination as MRI offers an ability to follow the distribution of molecules *in vivo* and provides an anatomical reference, whereas optical imaging can be applied to obtain detailed information at subcellular levels.

As a research tool, the multimodal probes have a large application potential - from monitoring tissue implants to studying the real-time dynamics of tumor metastases and biochemical mediators. The simultaneous application of one probe in several imaging techniques has two major privileges: (i) it minimizes the accumulation of different side-effects and artifacts as a result of different pharmacodynamics and properties of different molecular probes (e. g., target-selectivity, half-life in microcirculation, sensitivity, non-specific noise effects, etc.); and (ii) it allows most precise comparative analysis of the images obtained by techniques, based on different principles.

The existing prospect of using QDs for development of multimodal probes has attracted the interest of researchers in many different scientific fields. The number of publications on the topic increases exponentially.<sup>2-17</sup> However, the interpretations are still speculative, especially in terms of *in vivo* multimodal imaging.

Currently, three basic structures of multimodal QD probes have been described in the literature (Figure 1A-C). The first two structures (Figure 1A, B) consist of QD with different types of molecules, attached on its surface, e. g., polyethylenglycol (PEG), biocompatible ligand for target-specific interaction, and paramagnetic lipids or chelators for nuclear spin labeling/radiolabeling.<sup>5,12</sup> These two structures are very compact. The contrast signals are comparatively high. However, there is a serious limitation in this design. The attachment of target-specific ligands and PEG on QD surface restricts the number of contrast molecules on the same surface, because of limited number of functional groups. This circumstance does not affect the optical properties of the probe, but could be crucial for their paramagnetic properties.



**Figure 1.** Structures of multimodal QD probes described in the literature. (A) According to ref. 12. (B) According to refs. 5. (C) According to ref. 3. (D) Our originally designed multimodal QD probe (according ref. 17).

The third structure (Figure 1C) consists of QD nanocrystals (e. g., CdSe, CdTe, CdS, InAs, InP) and paramagnetic nanoparticles (e. g., Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, FePt, CoPt<sub>3</sub>) incorporated

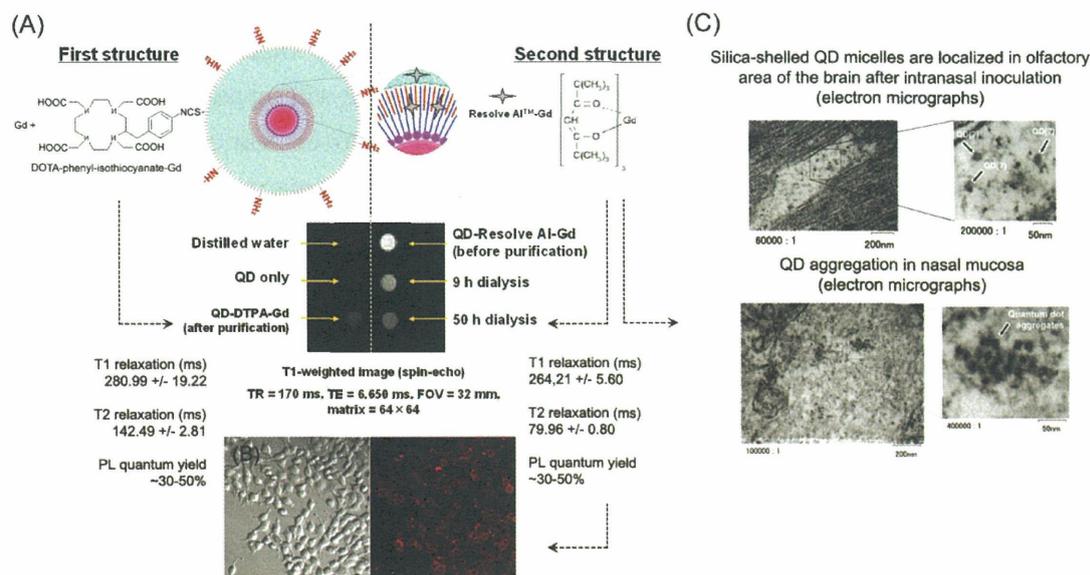
together in comparatively small silica spheres, as well as fluorescent/paramagnetic heterodimers (e. g.,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Au, CoPt-Au, FePt-Ag,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Au-PbSe, gamma- $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -CdS, FePt-CdS, Co/CdS core/shell, Co/CdSe core/shell, CdSe/Zn $_{1-x}$ MnxS) over-coated with silica to ensure water-solubility.<sup>2-4,6,7</sup> The combination of QD nanocrystals and magnetic nanoparticles in close proximity of heterodimers usually results in decreasing of their fluorescent and paramagnetic characteristics in comparison with the isolated materials.<sup>2,3</sup> In this context, the incorporation of isolated fluorescent nanocrystals and isolated magnetic nanoparticles in silica spheres seems a better choice, at least for the time being. In this design, there are a lot of free functionalities on the surface of silica sphere, allowing an attachment of large number of PEG molecules and biocompatible ligands, without restriction of the number of contrast substances incorporated into the polymer coat. The silica coat is biologically inert. Nanosponges and nanofoams are also a good alternative to the silica. The silica coat isolates QDs and contrast agents from the environment and prevents immunomodulation if the resulted nanoparticles are small enough. On the other hand, the silica is a porous material, allowing penetration of small molecules (e. g., water, oxygen, etc.) inside the sphere. This circumstance has a dual effect and the balance is important. The accessibility of water molecules to the paramagnetic substances does not affect their properties. Moreover, it could be an advantage if 1H-MRI substances are incorporated in silica spheres (e. g., Gd-, Mn-, Co-compounds). However, the accessibility of water and oxygen to QDs results in a decrease of fluorescent intensity. The reported fluorescence quantum yield of silica-coated QDs is usually 20% or lower in aqueous solutions. It is necessary to develop methodologies allowing a strong isolation of QDs from the polar environment without influencing the permeability of water molecules for silica coat and its accessibility to the paramagnetic contrast agent.

The impossibility to define the exact concentration of multimodal silica-coated QDs is a serious shortcoming of this design, because of restriction of dose-dependent and quantitative analyses. In addition, silica-coated QD probes suffer of comparatively low stability in high-salt physiological fluids, an aggregation takes place and it compromises the quality and precision of the measurements. The aggregation could change completely the pharmacokinetics of any imaging probe in the organism and results in artifacts. A conjugation with PEG or Dextran overcomes this limitation.

Below, we would like to introduce our new multimodal QD probe, based on single QD micelles incorporated in small silica spheres (15-20 nm in diameter) (Figure 1D). The micelle part allows an incorporation of hydrophobic paramagnetic substances into the silica sphere. The hydrophobic micelle isolates QD nanocrystal from the polar molecules, penetrating from the environment into the silica sphere and keeps its fluorescence properties. The fluorescence quantum yield of silica-coated QD micelles is up to 30-50% in aqueous solution. In the same time, the hydrophobic paramagnetic molecules are localized on the micelle surface and are accessible to the water. Amphiphilic paramagnetic substances could be also incorporated in silica coat. In both cases, the incorporation of paramagnetic compounds in close proximity to QDs does not affect significantly their paramagnetic characteristics. The contrast signal is the same as of the isolated paramagnetic material. The described structure is compact and chemically stable in water and low-salt buffers. After conjugation with PEG or Dextran, it becomes stable in high-salt physiological fluids. The incorporation of one QD in one silica sphere allows normalization of nanoparticle concentration. The concentration of our silica-shelled QDs related in close proximity to the concentration of QD nanocrystals in moles, calculated from their absorbance spectra.

Figure 2A represents a comparative analysis of paramagnetic and fluorescent properties of two multi-

modal probes, based on silica-shelled single QD micelles. In the first probe, a Gd-DOTA-isothiocyanate was attached on the surface of silica sphere. In the second probe, amphiphilic Gd-derivative (Resolve Al<sup>TM</sup>-Gd) was incorporated inside silica sphere. In both probes, Gd-compound was given in equal concentrations in the process of synthesis. The fluorescent properties of both structures were same. Their quantum yields are ~30-50%, depending on the initial quantum yield of QDs in organic solvent. The paramagnetic properties were slightly different. After purification, using 50 hours dialysis, T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> (relaxation times) of the probe, consisting of Gd inside silica sphere, were shorter than T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> of the probe, consisting of Gd on the surface. This suggests that the probe, consisting of Gd inside silica sphere, may provoke a stronger positive contrast than the Gd on the surface due to the volume of Gd binding area.



**Figure 2.** (A) Spectral characteristics of multimodal silica-shelled single QD micelles consisting of DOTA-phenyl-isothiocyanate-Gd on the surface of silica sphere (first structure) or Resolve Al<sup>TM</sup>-Gd incorporated inside the silica sphere (second structure). MRI measurements were performed in a 4.7-Tesla magnet (General Electric, CT) interfaced to a Bruker Avance console (Bruker Medical GmbH, Germany). A 30 mm diameter Litz coil (Doty Scientific Inc., SC, USA) was used for measurement of the samples. Sample temperature was maintained at room temperature (approximately 25 °C). The measurements were performed in the following order : T<sub>1</sub> weighted imaging using conventional spin echo (SE) sequence, multi-echo SE imaging for T<sub>2</sub> calculations, and inversion recovery SE imaging for T<sub>1</sub> calculations. For calculation of photoluminescence (PL) quantum yield, the spectrally integrated emission of particle dispersion in phosphate buffered saline was compared to the emission of an ethanol solution of rhodamine 6G (Fluka) of identical optical density (<0.015) at the excitation wavelength 365 nm. In both MRI and optical images, the concentration of nanoparticles in each sample corresponded to 1 μM QDs. (B) Intracellular delivery of QD probe in cancer cells. Silica-shelled QDs (500 nM QDs) was incubated with cells within 1 hour in humidified atmosphere at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. The cells were washed by PBS and fluorescent images were obtained by Olympus FV1000 microscope. (C) Electron micrographs of localization of positively charged silica-shelled QD micelles in olfactory area of the brain after 7 days intranasal inoculation in mice. Aggregates were detected in nasal mucosa after 3 days intranasal inoculation in mice. The images were kindly provided from Dr. Yoko Ishihara (Kurume University, Kurume, Japan).

It is necessary to note that Resolve Al<sup>TM</sup>-Gd has a low hydrophobicity and comparatively small part (~10%) of its molecules is retained in silica spheres. The incorporation of strongly hydrophobic contrast

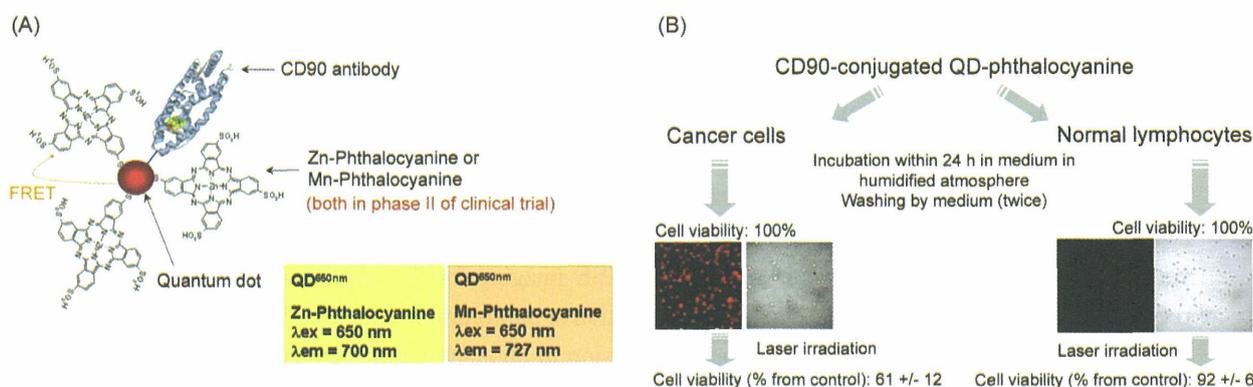
substances in the micelle part of silica-shelled QDs could improve significantly the paramagnetic characteristics of this multimodal probe, which is under way in our Team.

In preliminary experiments, we established that non-pegylated, and positively charged silica-shelled QDs (15-18 nm in diameter) are localized in olfactory area of the brain after 7 days intranasal inoculation in mice (Figure 2C). However, only few QDs were found in the brain tissue, presumably due to aggregation of non-pegylated probe in nasal mucosa. An additional improvement of the surface of QD probe could increase its stability in physiological fluids and its permeability for brain tissue.

The cytotoxicity of pegylated probe was comparatively low. There was no cytotoxic effect up to 500 nM concentration on cultured cell lines. However, speaking about the cytotoxicity of nanoparticles, it is necessary to note that this parameter is usually varified on cancer cells that are inherently resistant to many external agents. The data on normal cells are scanty. Currently, there are no data about the metabolism of silica-shelled QDs in living organisms and it is unclear what will happen if the nanoparticles are accumulated in different organs for a long time. The best case seems to be their excretion through kidney avoiding any long-term accumulation and metabolism in the liver, bone marrow or other organs.

### Quantum Dots for Photodynamic Therapy of Cancer

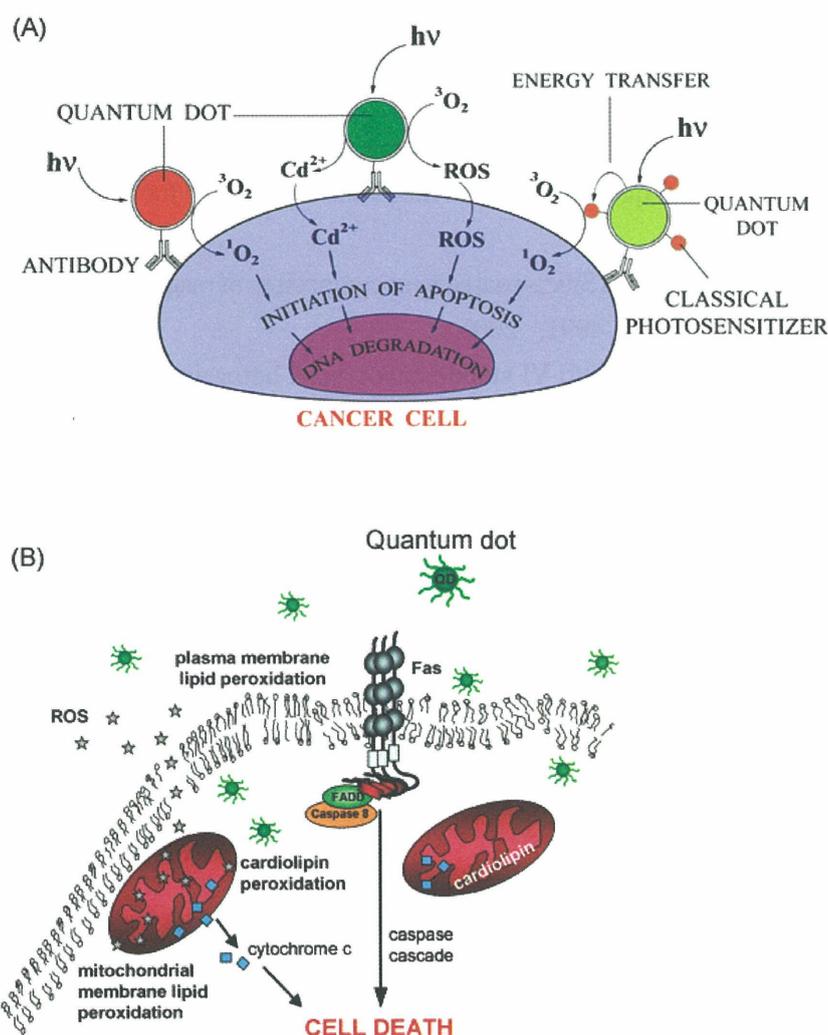
The cytotoxic effect of QDs has a dual nature. Several years ago, it was found that uncoated QDs are energy donors and possess photosensitizing properties and could be used in light-mediated cancer-cell killing.<sup>18-20</sup> Moreover, hybrid nanoparticles consisting of QDs and classical photosensitizers (e. g., phthalocyanines, eosins, natural pigments, etc.) or QDs and X-ray contrast substances have a great potential in radiation-induced photodynamic therapy of cancer. These hybrid photosensitizing probes could be additionally conjugated with cancer-selective ligands, which should minimize their side-effects on normal cells and tissues.



**Figure 3.** (A) Structure of QD-based photosensitizing probe. FRET - fluorescence resonance energy transfer. (B) Cancer-selective laser-induced cytotoxicity of QD-phthalocyanine-CD90 conjugate. Incubation conditions : Cells (leukemia cell line Jurkat or normal lymphocytes,  $2 \times 10^5$  cells/ml) were incubated with QD-phthalocyanine-CD90 ( $1 \mu\text{M}$  QD) in RPMI-1640 medium, in humidified atmosphere, within 24 hours. The cells were washed twice by medium and analyzed for target-selectivity (using fluorescent confocal microscopy) and viability (using flow cytometry). The cells were subsequently subjected to laser irradiation and cell viability assay.

Below, we describe a new photosensitizing probe, consisting of QDs conjugated with metal-containing phthalocyanines (Figure 3A). The probe was conjugated with cluster-of-differentiation antibody (CD90) with high affinity to leukemia cells. The conjugate was incubated with leukemia cells (Jurkat) or normal

lymphocytes within 24 h in humidified atmosphere. The cells were washed by cultured medium to remove non-bound QD-phthalocyanine-CD90 conjugates. The probe was selectively bound to the leukemia cells, which was visualized using fluorescent confocal microscopy. Interaction with normal lymphocytes was not detected. Both, leukemia cells and normal lymphocytes were subjected to laser irradiation. The cell viability was analyzed before and after irradiation. It was established that the viability of leukemia cells markedly decreased (~40%) after irradiation, while the viability of normal lymphocytes remained to the control levels (Figure 3B). The results suggest that QD-phthalocyanines possess target-selective light-mediated cytotoxicity due to the specific binding with cancer cells.



**Figure 4.** Potential mechanisms for QD induced cell death. (A) According to Bakalova et al. 18 ; (B) According to Maysinger et al. 19

In 2004, we hypothesized that non-coated QDs and hybrid QD substances could generate reactive oxygen species or could induce Cd-mediated cytotoxicity in cancer cells (Figure 4A).<sup>18</sup> This hypothesis has been approved by several groups, demonstrating that the mechanism of QD induced cell death involves acceleration of lipid peroxidation, activation of tumor necrosis factor (Fas) and suppression of mitochondrial function (Figure 4C).<sup>19,20</sup>

Since the penetration depth of red laser in tissues is less than 1 cm, the current efforts are directed to development of hybrid QD probes with enhanced photosensitizing properties by using X-rays and their approval in pre-clinical practice.

## References

1. Zhelev Z, Bakalova R, Ohba H et al : In Nanotechnologies for the Life Sciences (Ed. Kumar C), Wiley-VCH Verlag, GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 175-207 (2007).
2. Redl F-X, Cho K-S, Murray CB et al. : Three-dimensional binary superlattices of magnetic nanocrystals and semiconductor quantum dots. *Nature*. 423 : 968-971, 2003.
3. Wang DS, He JB, Rosenzweig N et al : Superparamagnetic Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Beads-CdSe/ZnS quantum dots core-shell nanocomposite particles for cell separation. *Nano Lett*. 4 : 409-413, 2004.
4. Gu H, Zheng R, Zhang X et al: Facile one-pot synthesis of bifunctional heterodimers of nanoparticles: a conjugate of quantum dot and magnetic nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 126 : 5664-5665, 2004.
5. Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA et al : Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*. 307 : 538-544, 2005.
6. Santra S, Yang H, Holloway PH et al : Synthesis of water-dispersible fluorescent, radio-opaque, and paramagnetic CdS : Mn/ZnS quantum dots : a multifunctional probe for bioimaging. *J Am Chem Soc*. 27 : 1656-1657, 2005.
7. Yi DK, Selvan T, Lee SS et al: Silica-coated nanocomposites of magnetic nanoparticles and quantum dots. *J Am Chem Soc*. 127 : 4990-4991, 2005.
8. Know K-W, Shim M :  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/II-VI sulfide nanocrystal heterojunctions. *J Am Chem Soc*. 127 : 10269-10275, 2005.
9. Kim H, Achermann M, Balet LP et al : Synthesis and characterization of Co/CdSe core/shell nanocomposites : bifunctional magnetic-optical nanocrystals. *J Am Chem Soc*. 127 : 544-546, 2005.
10. Pellegrino T, Fiore A, Carlino E et al: Heterodimers based on CoPt<sub>3</sub>-Au nanocrystals with tunable domain size. *J Am Chem Soc*. 128 : 6680-6698, 2006.
11. Cozzoli PD, Pellegrino T, Manna L: Synthesis, properties and perspectives of hybrid nanocrystal structures. *Chem Soc Rev*. 35 : 1195-1208, 2006.
12. Mulder WJM, Koole R, Brandwijk RJ et al: Quantum dots with a paramagnetic coating as a bimodal molecular imaging probe. *Nano Lett*. 6 : 1-6, 2006.
13. Selvan ST, Patra PK, Ang CY et al: Synthesis of silica-coated semiconductor and magnetic quantum dots and their use in the imaging of live cells. *Angew Chem Int Ed*. 46 : 1-6, 2007.
14. Wang S, Jarrett BR, Kauzlarich SM et al : Core/shell quantum dots with high relaxivity and photoluminescence for multimodality imaging. *J Am Chem Soc*. 129 : 3848-3856, 2007.
15. Prinzen L, Miserus R-J, Dirksen A et al : Optical and magnetic resonance imaging of cell death and platelet activation using annexin a5-functionalized quantum dots. *Nano Lett*. 7 : 93-100, 2007.
16. Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I et al : Designing quantum dot probes. *Nature Photonics*. 1 : 487-489, 2007.
17. Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I et al : Silica-shelled single quantum dot micelles as imaging probes with dual or multimodality. *Anal Chem*. 78 : 5925-5932, 2006.
18. Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z et al : Quantum dots as photosensitizers? *Nature Biotechnology*. 22 : 1360-1361, 2004.
19. Choi AO, Cho SJ, Desbarats J et al. : Quantum dot-induced cell death involves Fas upregulation and lipid peroxidation in human neuroblastoma cells. *J Nanotechnol*. 5 : 1-13, 2007.
20. Tsay JM, Michalet X: New light on quantum dot cytotoxicity. *Chem Biol*. 12 : 1159-1161, 2005.

# ナノ素材とMRI分子プローブ

滋賀医科大学 MR医学総合研究センター 犬伏 俊郎

Corresponding: tinu@belle.shiga-med.ac.jp

## 要約

核磁気共鳴画像 (MRI) 法を利用する分子イメージングでは、再生医療で用いられるES細胞や細胞治療で用いる免疫系細胞を生体内で可視化する方法が編み出され、移植細胞の無侵襲追跡が可能になっている。さらに、ナノテクノロジーを応用した素材が分子イメージングに利用されようとしている。本稿では、MR法が細胞や分子の識別を可能にする様々な標識 (プローブ) を紹介するとともに、あわせて、マルチモーダルイメージングに関連させて、MR細胞・分子イメージングの課題や展望についてまとめたい。

## はじめに

最近の分子イメージングの潮流に、MRやPETなどの計測手段自体があまり前面に現れず、様々な計測法を駆使しながらも生命科学における本質的な問題の解決法やその臨床応用をめざし、これらを実現するための新しい分子イメージング用プローブの開発に重点が移行しつつある印象を受ける。とはいえ、細胞トラッキングはMRが最も活躍する分野で、ソフトウェアとしてのプローブ、ことにMRのみにとどまらず光 (蛍光) やPET/SPECTなど複数のモダリティに対応するプローブの開発が目立つようになった。昨年のも分子イメージング学会 (SMI、ハワイ) の最後の「分子イメージングの未来」と題するセッションでは、蛍光粒子としての半導体Qdot、蛍光と磁性を併せ持つmagnetofluorescent nanoparticles (MFN)、超音波をDDSや治療に利用するNanoparticleの3題の演題がセッションの座長により取り上げられ、プローブ開発がこれからの分子イメージングに重要性を持つことが示されていた。これらのプローブは細胞を標的にすると、イメージングのためばかりではなく、センシングや細胞の分離・精製にも活用でき、その上に薬物輸送や治療の機能を加えれば、一石二鳥どころか三鳥、四鳥にも使えるプローブとして期待が高まる。本講演ではMRの新しい分子・細胞の標識剤を取り上げながら、細胞トラッキングの観点からMRを用いる分子イメージングの未来を見つめてみたい。

## 1. MR法の特性

臨床診断に用いられる画像法の中で、MRの特性を簡単にまとめてみる。MR法の第一の特性は超音波画像法のように繰り返し計測ができ、しかも、X線CTに匹敵する画像解像度を持ちながら、放射線被爆の心配がない点にある。このことから、外科手術のモニタとして術中に用いると、通常のX線透視や、術前の診断画像に比べ、MRははるかに有用性である。また、治療効果の判定や予後の検診にも威力を発揮する。しかしながら、MR法の短所は他の画像法に比べると、特に超伝導磁石を含む装置が大型化し、MR装置を設置する施設などの設備投資がかさむ。その上、MRでは強力な磁界を用いるため、上記のように手術に用いと、全ての手術機器や器具から麻酔器、治療器具にいたるまで非磁性化しなければならない。

MR法のもう一つの、といっても負の特性は、特定の分子 (遺伝子やタンパク質) に由来するMR信号の選別と検出が難しいことにある。したがって、分子イメージングのためには、造影剤のように特定の分子を識別する標識剤 (プローブ) を必要とする。この意味で、MRによる計測では高度な選択性には欠けるが、逆に全ての信号が無差別的に検出できるため、背景 (バックグラウンド)

の解剖画像が造作なく撮影できることに大きな特長がある。このことは、放射線源の標識剤を使用するPETでは、標識の部位のみしか検出できず、他の画像データとの融合が必要になってくると大きく異なっている。

## 2. 新しいMR標識剤（プローブ）

MR分子イメージングにも多様な標識剤（プローブ）が開発されてきた。その識別部位には、これまでMRで造影剤に用いられる常磁性物質が利用される。これは蛍光色素を用いた分子プローブの色素やPET/SPECTの放射性同位元素に相当する。例えば、SPIO（超常磁性酸化鉄）のような磁性粒子を、腫瘍に関連するカテプシンやその血管新生に関与するインテグリン $\alpha_v\beta_3$ をターゲットとするものや、アポトーシス細胞の検出にアネキシンVを用いるなど、様々な分子・細胞レベルの情報をMRで画像化する新しい手法が編み出されている。また、分子生物学で用いる緑色蛍光タンパク質（GFP）のようなレポーター遺伝子として、MRでは常磁性鉄を含むフェリチンを過剰発現させ、MRIのコントラストから遺伝子発現を画像化せる手法も考案されている。

最近のMR分子イメージングのトピックスは細胞トラッキング(Cell Trafficking and Biology)であり、幹細胞<sup>1, 2, 3)</sup>や免疫療法<sup>4, 5)</sup>に関連した細胞追跡が数多く報告され、MRIの分子イメージングへの応用の中では細胞トラッキングが際立っている。細胞トラッキングの一例として、我々が携わってきた研究の中で、アルツハイマー病モデル・ラットの脳内プラーク(アミロイド $\beta$ を投与して人工的に作成した)に静脈から投与された磁気標識を施したミクログリアが集積する画像を図1に掲げておく<sup>4)</sup>。

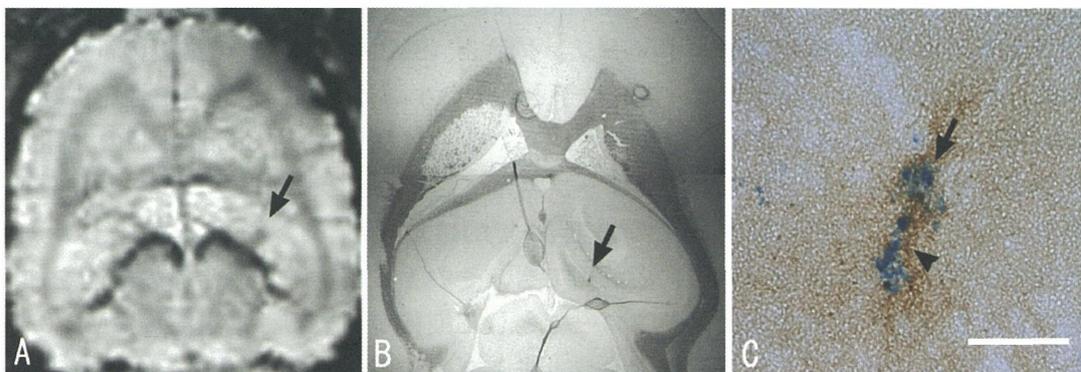


図1 アルツハイマー病モデルとミクログリア A. ラット脳の $T_2^*$ -強調MR画像（水平断）、B. 組織化学画像とC. その拡大図（スケール・バーは $50\mu\text{m}$ を表す。）アミロイド $\beta$ が投与された部位（矢印）に常磁性標識されたミクログリア（静脈から投与）が集積していることを示す。アミロイド $\beta$ の反対側には生理食塩水がコントロールとして投与されている。B. はMR画像（A）に対応する組織画像でMR画像のコントラストが得られる部位に鉄粒子で標識されてミクログリアの集積が観察された。C. Bの拡大図でアミロイド（茶色）の沈着した部位にミクログリア（青色）が集積している。

この例から、MRによる細胞トラッキングがどのようなものかをご理解いただきたい。MRの場合、陰性造影剤である常時性酸化鉄のナノ粒子（SPIO）が用いられているが、オフレゾナンスによる陽性のコントラストを引き出す計測法がかなり普及してきた。MR画像法としてはバックグラウンドの画像に比べ相対的に高信号としてSPIOの存在を識別することは有効ではあるものの、本質的に常磁性による $T_2$ 短縮効果でMR信号強度が低下していることには変わりはない。新しい磁気粒子の開発が望まれるところである。

## 3. ナノ粒子プローブ

MRによる細胞トラッキングの標識剤にはMR造影剤として利用されている市販のSPIOが用いられてきた。造影剤は当然ながら、入手が容易で、しかも生体親和性、特に水への溶解性に優れ、標的細胞への導入も簡便に行える。しかしながら、ナノ粒子の表面電荷に由来する市販SPIOの細胞への導入の難しさ<sup>6)</sup>や、細胞への導入後の細胞毒性、特に移植された後のSPIO標識細胞の挙動に問題があり、ES細胞から分化誘導された神経細胞などは数日程度しか細胞の機能が発揮されない<sup>7)</sup>との報告がなされている。その原因はこれまでのところ究明はされていないが、SPIOの+の電荷や、鉄粒子を取り巻くデキストラン等の表面保護剤の安定性に問題があることが想像される。このことから、我々はより強固な被覆剤としてシリカ・シェルを持つ磁性ナノ粒子の合成を行っており、その成果の一部を以下に紹介する。このシリカ被覆には様々な化学合成の手法により修飾を施すことが可能で、その手始めとして蛍光色素を結合させている。この蛍光はMRで検出できるSPIOと合わせ、蛍光-MRバイモーダル分子イメージングのプロープ (Magnetofluorescent Porous Nanocapsules) としても利用される可能性がある。図2には、我々が合成したSPIOを核に、可視から近赤外にいたる蛍光を持つ様々な色素をドーブしたシリカをシェルにしたナノ粒子を示した。色素が有機分子であるために、必要な蛍光波長を持つ分子の設計が可能であることが特徴である。

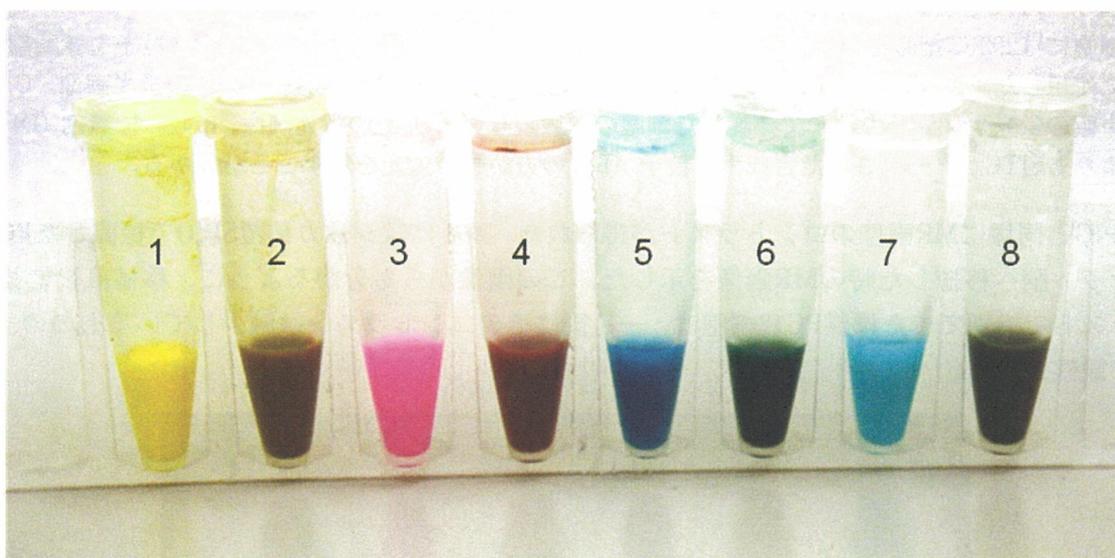


図2 MRと蛍光計測に利用するシリカナノ粒子。

核にはMRの造影剤であるSPIO、シェルには蛍光色素をドーブしたシリカを用いて合成したシリカナノ粒子。1. FITC、2. SPIO-FITC、3. Cy3、4. SPIO-Cy3、5. Cy5、6. SPIO-Cy5、7. Cy5.5、8. SPIO-Cy5.5。

ここで合成されたシリカナノ粒子は、SPIOと同様に8) センダイウイルスの膜エンベロップ9) (石原産業、GenomOne) を用いて様々な細胞に取り込ませることができる。一例として、293FT細胞にFITCをドーブさせたシリカナノ粒子を導入した。図3には 本合成ナノ粒子と比較するために、市販のシリカナノ粒子、Sicstar-Green (粒子径：70nm、Nanomod社) と比較した。

この図からも分かるように、両者のナノシリカ粒子は細胞内へ導入されることが分かるが、市販のナノ粒子 (図3D) の蛍光に比べ、合成したナノ粒子の方が蛍光強度も強く、また、繰り返して蛍光を観察できる。ただし、シリカ被覆は鉄染色のための酸処理でも溶解しにくいいため、プルシアンプルー (ベルリンブルー) では染色が難しいので、この蛍光の付与は組織化学的検査での識別に有用になる。

シリカ被覆SPIOで標識した細胞は、培養段階では目立った細胞毒性は示さなかった。さらに、このような標識細胞をラット脳に移植したところ、これまでの市販のMR造影剤として用いられて

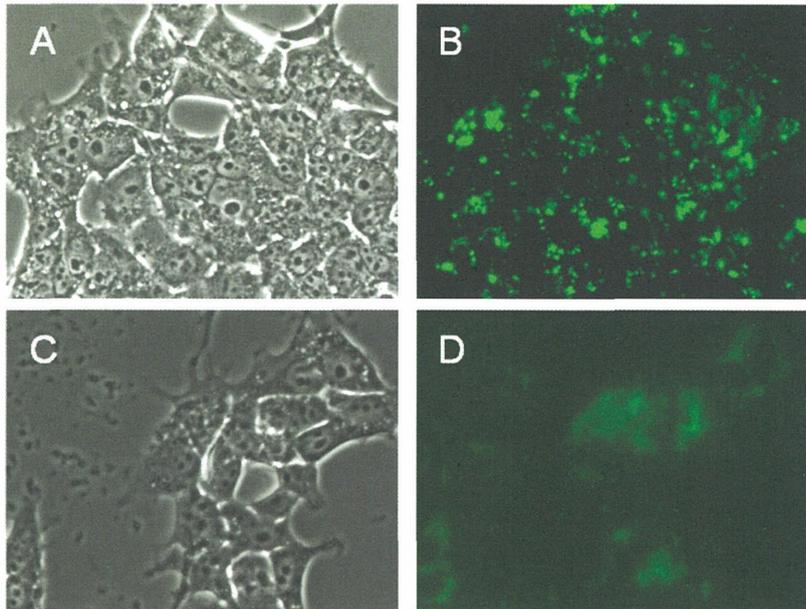


図3 FITCを含有するシリカナノ粒子で標識した細胞の写真と蛍光画像。

細胞には293FT細胞を用い、蛍光色素FITCをシェルのシリカ層にドープしたナノ粒子を標識剤に使用した。A. FITC含有ナノシリカ粒子で標識した細胞の顕微鏡写真とB. その蛍光画像。C. 市販の蛍光ナノシリカ粒子で標識した細胞の顕微鏡写真とD. その蛍光画像。市販の標識剤 (D) よりもFITCがドープされた合成ナノ粒子 (B) の方が強い蛍光を示すことが分かる。

いるSPIOと同様にMR画像のコントラストが得られた。図4にはシリカ被覆SPIOで標識したPC12細胞をラット脳へ移植した時のMR画像を示した。この画像からも分かるように、移植直後に強いコントラストで識別できた標識PC12細胞は、一月後にそのコントラストは減少しているものの、同じ部位で観察される。

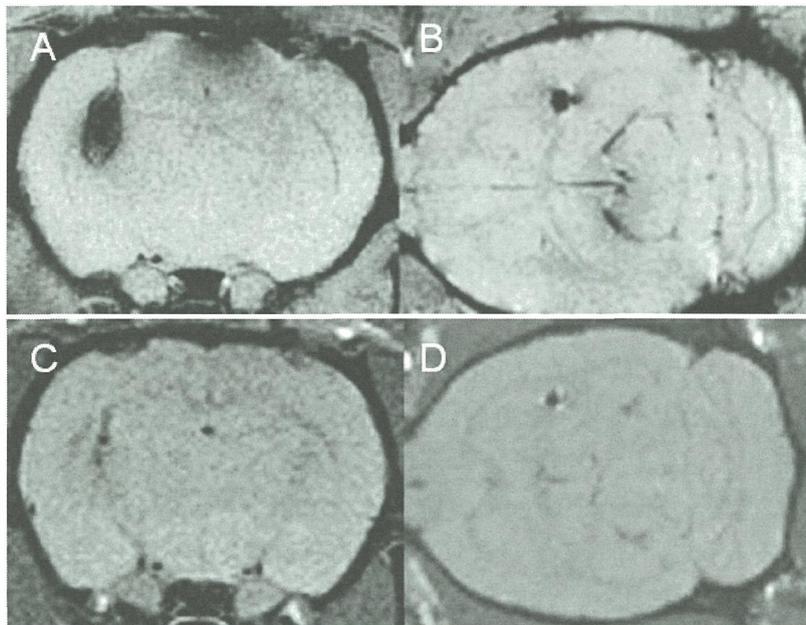


図4 シリカ被覆SPIOで標識したPC12細胞のラット脳におけるMR画像。

細胞標識にはシリカで被覆したSPIOを用い、ラット脳の線条体へ標識細胞を移植した。A. 移植直後のラット脳の冠状断 (T<sub>1</sub>-強調画像)、とB. その水平断。C. 一ヶ月後の冠状断とD. その水平断。SPIOによるコントラストから移植した細胞が識別されるとともに、一ヶ月後にも移植部位に細胞が留まることがわかる。

#### 4. マルチモーダル画像法

近年、臨床画像診断の分野でPETの普及が際立っている。その原動力はX線CTと組み合わせたPET-CTが開発されたことによる。元来、FDGをはじめとする様々なPET試薬が用いられ、体内での標識剤の位置情報を得、腫瘍の診断から脳機能のような生理的情報を画像化することに威力を見せる。これに、X線CTによる解剖学的情報を加味することで、癌の有無と体内での位置情報を一度に診断できるようになる。このことから、癌検診に大きな期待が寄せられている。PET-CTのように、二つの画像計測手法を組み合わせる方法は、個別の手法では得られない卓越した生体画像情報を引き出すことが可能になる。

X線CTに比べ、MR画像法は軟部組織の描出能に優れ、PETで得られる分子情報を重ね合わせる解剖画像としてはX線によるCT画像より好ましい。こうした考えから、現在はPET-MRIの開発が海外で急ピッチに進められている。MR装置では強力な磁石を使用するため、PETのガンマ線検出用管球を強力な磁界内に収める事が難しいが、スプリット型の磁石を開発し、管球をはさみ込むことから、この問題の解決を図っている。また、PETとMRの2台の装置を並べて設置し、対象動物を移動させて計測する組み合わせも報告されている。さらには、強力な磁場内で動作する非磁性のダイオード式検出器が試作され、人体用のMR装置への組み込みも始まっている。比較的早い時期に、臨床用PET-MRIが登場するかも知れない。このような装置の開発を見越して、PETとMRI兼用の分子イメージングプローブの開発がすでに始まっている。

一方、PETにも装置本体に加え標識試薬を合成するためのシンクロトロンのような大掛かりな装備を必要とし、装置の大型化は避けられない。このPETに比べ装置が小型で簡便に利用できる光学系の生体計測装置もMRIと組み合わせれば、それぞれの長所を生かしながら、互いの短所を補い合うことができる。従来、分子生物学や細胞生物学の発展に寄与してきた顕微鏡下で観察する色素プローブは、その波長を可視光から近赤外へ伸ばすことで、動物の体内からでも検出が可能になる。但し、光学系装置だけでは、生体内での光の吸収や散乱により、深部組織からの計測は難しく、そのため、画像の解像度にも難点があることは言うまでもない。そこで高解像度の画像を提供するMRIとの組み合わせが重要になる。

#### まとめ

本稿で取り上げているMR分子プローブで強調しておきたい点は、MRによる分子イメージングがこの領域で活躍するPETや蛍光イメージングと異なり、これまでのところMR用の標識剤（プローブ）がこれらの二法に比べて極めて数が少ないことである。分子イメージングに欠かせない、高感度で特異性の高いMR用分子プローブの開発が待たれる所以である。

また、現在MR分子イメージングの主流である磁氣的標識によるMR分子イメージング法が臨床に応用されるまでにはかなりの時間を要するかも知れない。しかし、今日用いられている分子イメージングの、蛍光色素標識やレポーター遺伝子を利用した手法は生体内での画像化が難しく、一方、核医学的手法にも侵襲性や画像解像度、あるいは、長期間の継続的な観察に問題が残る。この点、MRによる分子イメージングは、遺伝子治療や再生医療を推進する重要な画像法になると期待される。新しい分子イメージングのためのプローブの開発と、そのプローブを効率良く検出するMRのハード・ソフトウェア面での改良が車の両輪となって、MR画像法はこれからも更に前進していくであろう。このことから医学、工学や製薬など多方面の協調がMR分子イメージングの発展には欠かせないものと考えられる。

## 文献

- 1) J. M. W. Bulte, S. -C. Zhang, P. Gelderen *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 96, 15256 (1999)
- 2) M. Hoehn, E. Kustemann, J. Blunk *et al.* Proc Natl Acad Sci USA 99, 16267 (2002)
- 3) M. Modo, M. Hoehn and J. W. M. Bulte Molec. Img. 4, 143 (2005)
- 4) Y. Song, S. Morikawa, M. Morita, T. Inubushi, *et al.*, Histol Histopathol. 21, 705 (2006).
- 5) Takata K, Kitamura Y, Yanagisawa D, *et al.* FEBS Lett. 581,475 (2007).
- 6) Montet-Abou K, Montet X, Weissleder R, Josephson L. Mol Imaging. 6, 1 (2007)
- 7) Walczak P, Kedziorek DA, Gilad AA, Barnett BP, Bulte JW. Magn Reson Med. 58, 261 (2007).
- 8) K. Toyoda, I. Tooyama, M. Kato, *et al.*, Neuroreport. 15, 589 (2004).
- 9) Y. Kancda, T. Nakajima, T. Nishikawa *et al.* MoleCTherapy 6, 219 (2002).

## キーワード

造影剤、細胞トラッキング、SPIO、フェリチン、バイモーダル分子イメージング、ナノ粒子、センダイウイルス、PET-CT、PET-MRI

## 機能性MRIプローブの開発と応用

独) 放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター  
先端生体計測研究グループ・計測システム開発チーム 青木伊知男

Corresponding : aoki@nirs. go. jp

分子・細胞事象を反映したイメージング手法として、本研究チームでは、現在、核磁気共鳴画像法 (MRI) を中心に、1) 機能性造影剤による脳神経に対する適用、2) リポソーム、Quantum dots、フラーレンなどナノキャリアを利用した腫瘍への集積と可視化およびハイブリッド化、3) 細胞標識による再生・移植治療の可視化、などを中心に取り組んでいる。今回は、チームが発足して約半年間の成果として、7T高磁場磁気共鳴画像装置を用いて、ナノキャリアを使用した腫瘍への集積・局所抗癌剤放出に関する試みを中心に報告する。ナノキャリアは、MR造影剤・蛍光色素・治療薬等を複合的に搭載可能であるほか、腫瘍への集積性も期待できるため、様々な特性を持つ素材の開発が進められている。その中で、温度感受性リポソームを使用した複合造影剤を用いて、腫瘍モデルでの薬剤集積および放出の可視化に成功した。

# ニトロキシラジカル造影剤を使った腫瘍組織内レドックスマッピング

独) 放射線医学総合研究所重粒子医科学センター  
粒子線生物研究グループ 松本謙一郎  
Corresponding : matsumok@nirs. go. jp

## 1. はじめに

組織の酸素濃度、およびその結果として生じる酸化還元状態は、がんの放射線治療を考える上で非常に重要なファクターである。組織中の酸素濃度が、組織中での活性酸素種の生成に非常に深く関わっており、放射線の効果を左右する重要な因子であることは既に広く知られている。一方、組織の酸化還元状態は、ある種の放射線防御剤の効果に対して非常に大きく影響することが分ってきた。そこで、これらの生理的あるいは病的な情報を可視化するために、磁気共鳴の原理に基づく幾つかの方法を用いて、いわゆるファンクショナルイメージング法の開発が行われている<sup>1, 2)</sup>。それらの中から、本稿では、ニトロキシラジカル造影剤によるレドックスイメージングについて述べる。

## 2. ニトロキシラジカルの放射線防御効果と*in vivo*酸化還元反応

生体に対する放射線の影響には、水の電離によって生じる様々な活性種や、更にそこから生じる様々な活性酸素種、あるいは有機フリーラジカル種が深い関わりを持っていることは良く知られている。そのためこれまでも、多くの抗酸化剤が放射線防御剤として取り上げられてきた。その中で、TEMPOLと呼ばれるニトロキシラジカルが、正常組織特異的な放射線防御効果を持つものとして注目されている。このTEMPOLの正常組織特異性には、生体内でのニトロキシラジカルの酸化還元反応が大きく関わっている。

ニトロキシラジカルは常磁性の物質であるが、生体内で代謝を受けて非常磁性のヒドロキシルアミン体へ直接あるいは間接的に一電子還元される。放射線により発生するヒドロキシルラジカルやスーパーオキシド等の活性酸素種は、ニトロキシラジカルを一電子酸化し、オキソアンモニウムカチオン体を生成する。オキソアンモニウムカチオンは、グルタチオン (GSH) やNADHあるいはNADPHなどの水素供与体から水素を受け取り、ヒドロキシルアミン体へ二電子還元される。更にヒドロキシルアミンは、酸化的な雰囲気下では、ニトロキシラジカル体へ比較的容易に再酸化されることが分かっている。その中で、ニトロキシラジカル体からオキソアンモニウムカチオン体への酸化反応は、ニトロキシラジカルのラジカルスキャベンジャーとしての働きに直接関係するものと考えられ、この反応がその放射線防御作用に深く関わっている。

別な見方をすると、放射線防御作用を持つのはニトロキシラジカル体であって、その還元体であるヒドロキシルアミン体は直接は放射線防御作用を持たないと言える。事実、TEMPOLのフリーラジカル体を培養細胞系にくわえてガンマ線を照射すると、投与量依存的に細胞の生存率の増加、すなわち放射線防御作用が観察される<sup>3)</sup>。ところが、同じ系にTEMPOLのヒドロキシルアミン体であるTEMPOL-Hを添加した場合には、放射線防御作用は観察されない<sup>3)</sup>。

一方、TEMPOL-Hをマウスに投与してガンマ線を照射した場合には、TEMPOLと同等の放射線防御作用が認められる<sup>4)</sup>。これは、TEMPOL-Hがマウス体内でTEMPOLへと再酸化されることに基づいている。実際、TEMPOL-Hを投与した後、血中のニトロキシラジカル体、すなわちTEMPOLの濃度を測定すると、TEMPOL濃度が一時的に上昇し、その後徐々に低下する。TEMPOL-H投与後の血中TEMPOL濃度の減衰曲線は、投与約15分後より後の部分で、TEMPOLそのものを投与した場合の減衰曲線とほぼ重なる<sup>4)</sup>。つまり生体内では、比較的速い速度でTEMPOL-HからTEMPOLへの酸

化反応が起こっていることが分る。

一方、マウス頭部への1日1回6 Gyの5日間にわたる分割照射によって、マウスの唾液の生成は対照群に比べて54%の抑制を受けるが、この放射線による唾液生成の抑制は、各照射前のTEMPOL投与によって有意に抑えられた<sup>5)</sup>。すなわちTEMPOLは、唾液腺組織に対する放射線障害を防御したと言える。しかしながら、放射線による腫瘍組織の成長抑制効果に対しては、TEMPOLは殆ど効果を示さない<sup>5)</sup>。つまりTEMPOLは、正常組織に特異的な放射線防御効果を持っているといえる。

では、どのようにして正常組織に特異的な放射線防御効果が得られるのか。その仮説としては、TEMPOLが正常組織よりも腫瘍組織でより速く還元されてTEMPOL-Hとなる可能性と、あるいはTEMPOLそのものが腫瘍組織からより速く除去される可能性が挙げられる。その事実については、既にEPRイメージングによる実験からいくつかの証拠が得られている。carbamoyl-PROXYLと呼ばれるニトロキシルラジカルの経時変化を、マウス正常組織とRIF-1腫瘍で比較すると、腫瘍組織では正常組織よりもニトロキシルラジカル由来のシグナルが速く消失することが報告されている<sup>6)</sup>。SCC腫瘍を用いた別の実験でも同様の結果が得られており、carbamoyl-PROXYL由来のEPRシグナルは、SCC腫瘍で正常組織よりも速く消失する<sup>7)</sup>。

### 3. EPRによるニトロキシルラジカルの組織内消失速度マッピング

常磁性種であるニトロキシルラジカルは、EPRすなわち電子常磁性共鳴法で直接測定することができ、EPRの分野ではいわゆるスピンプローブ、すなわち酸化還元感受性造影剤として比較的多くの研究に使用されている。EPRイメージングと組み合わせることにより、ニトロキシルラジカルの分布とその経時変化を画像として観察することが出来る。経時的に測定した幾つかのEPR画像から、画素ごとにシグナル消失速度を計算し、消失速度のマッピングが行える。標的臓器にROIを取り、それぞれの消失速度をヒストグラムで比較すると、その違いが視覚的にも明らかとなる<sup>7)</sup>。しかし一般的に、EPRイメージングには、解像度の低いことや時間分解能が悪いこと、更に解剖学的情報が得られないなど、多くの制限がある。また*in vivo* EPR装置とは言っても、現在の所、その測定対象はマウスやラット程度の小動物に限られており、現時点では臨床応用を考えると不利な点が多い。

### 4. MRIによるニトロキシルラジカルの消失速度マッピング

常磁性種であるニトロキシルラジカルはプロトンの $T_1$ 短縮効果を持っており、これにより $T_1$ 短縮型MR造影剤として利用することが可能である。事実ニトロキシルラジカルは、それがEPRイメージングに使用されるよりも前、1980年代の始めごろには、 $T_1$ 短縮型MR造影剤として研究されていた。しかしながら、そのリラキシビティーが低い ( $r_1 \approx 0.15 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) ことと、*in vivo*で比較的速く常磁性が消失すること、更にその後、造影効果の高いGd造影剤 ( $r_1 \approx 4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) が登場したこともあいまって、ニトロキシルラジカルがMR造影剤として臨床で使用されることはなかった。ところが最近では、S/Nの良い高磁場MRI装置が普及し始めており、また効果的なパルスシーケンスの開発、特に $T_1$ 強調のパルスシーケンスの開発は目覚しく、これらにより再びニトロキシルラジカルを $T_1$ 強調MR造影剤として使用できる可能性が出てきた。それらの高性能のMRI装置によってニトロキシルラジカルの検出を行うことが出来るのであれば、EPRイメージングで問題とされてきた多くの制限は一気に解決されることになる。但し、その場合には、ニトロキシルラジカルに起因する $T_1$ 強調信号の変化に基づいて間接的に検出することになるので、信号の成り立ちについて十分な理解と注意が必要である。

しかし*in vivo* EPRイメージングと同等の実験条件を考えた場合には、 $T_1$ コントラストの複雑さはそれほど問題とはならない。 $T_1$ 強調グラディエントエコー法を使った場合の、ニトロキシルラジカ

ルによる $T_1$ コントラストの変化率をシミュレーションした時、 $T_1$ コントラストの変化率とニトロキシラジカル濃度との間にはほぼ直線に近い関係が得られ、濃度が低い部分ではより直線性が高い。すなわち*in vivo* EPRイメージング実験で使われるニトロキシラジカルの血中濃度レベルであれば、 $T_1$ 強調信号を利用して準定量的な測定が行えるのである。アスコルビン酸によるニトロキシラジカルの還元の時変化を、それぞれEPRイメージングとMRIで撮像した場合にも、それぞれの画像から画像強度の減衰速度を計算すると、おおよそ同等の速度が得られる<sup>8)</sup>。MRI画像から得られた減衰速度は、 $T_1$ コントラストの変化に基づいているので、本来のラジカル濃度の減衰速度とは質的に異なるが、バイオロジカルな実験条件下での両者の値の差は十分に小さいと言える。

4.7 Tの動物用MRI装置を使って、マウスの大腿部に植えつけたSCC腫瘍でのニトロキシラジカルの動態を観察した結果を示す。マウスにcarbamoyl-PROXYLを尾静脈投与すると、腫瘍組織でも正常組織でも画像強度が一度増加し、その後徐々に低下する。このとき、腫瘍組織ではその減衰が速い。消失速度マップを得ると、腫瘍組織と正常組織での速度の違いがはっきりと色分けされており、腫瘍組織とその周辺の正常組織との違いまでもはっきりと観察することができた (図1)。

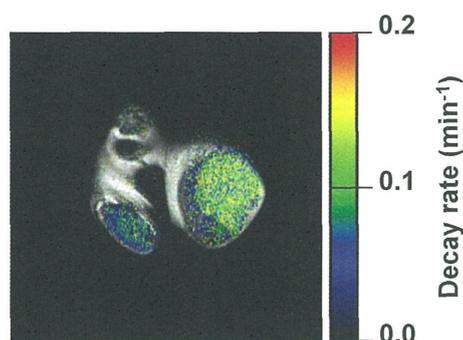


図1. マウスの大腿部横断面における $T_1$ 強調MRシグナルの消失速度マッピング.  $T_1$ 強調MSME像との融合画像.

## 5. レドックス ? クリアランス ?

ここで、このEPRシグナルまたはMRシグナルの時間的な消失は、はたしてニトロキシラジカルの還元によるものなのか、あるいは単なる組織からのクリアランスではないのかという疑問が生じる。そこで組織中のニトロキシラジカルとヒドロキシルアミンの総量の経時変化を測定し、そのうちの程度が還元により常磁性を消失したかを調べた。ヒドロキシルアミン体はフェリシアン化カリウムなどの酸化剤を加えてやると容易に酸化されてニトロキシラジカル体となるので、組織のホモジネートにフェリシアン化カリウムを加えて全てをラジカル体としてやれば、組織中のニトロキシラジカルのトータル量をEPRを使って測定することが出来る。このようにして、正常筋肉および腫瘍組織中のニトロキシラジカルのトータル量を測定すると、上述のイメージング実験に必要な時間の範囲では、両組織中の造影剤トータル量はほぼ一定に保たれていることが分った。すなわち、*in vivo*で観察されたEPRまたはMRシグナルの消失は、ニトロキシラジカルの還元によって起こっていることが示唆された<sup>8)</sup>。

更に、膜透過性の異なる3種類のニトロキシラジカルのマウス体内での動態を観察した<sup>9)</sup>。TEMPOLは両親媒性の分子で、水にも油にも良く解け、比較的自由的な膜透過性を持つてる。carbamoyl-PROXYLは、低い脂溶性を持っているので、少量が膜を透過あるいは膜内に溶け込むことが出来る。しかしcarboxy-PROXYLは、ほとんど膜を通過することが出来ない。各ニトロキシラジカルの各組織での $T_1$ シグナルの経時変化と、造影剤のトータル量の経時変化とを比較すると、TEMPOLとcarbamoyl-PROXYLでは、トータル量に比べて $T_1$ シグナルのほうが速く消失するが、carboxy-PROXYLではトー

タル量と $T_1$ シグナルがほぼ同じ速度でゆっくり減衰していることが分った。このことから、非膜透過性のニトロキシラジカルが還元に対して抵抗的であるのが分り、同時に*in vivo*での $T_1$ シグナルの低下は、細胞内での還元反応によるものであることが示唆された。更に腫瘍組織および正常筋肉組織内での $T_1$ シグナルの経時変化に基づいて、ニトロキシラジカルの組織内消失速度を比較すると、膜透過性のニトロキシラジカルでは、腫瘍組織において正常組織よりも速く消失することが分った。これはすなわち、ニトロキシラジカルの組織内還元速度の違いを反映するものと解釈することが出来る。これらの事実から、膜透過性のニトロキシラジカルを用いて得られる $T_1$ シグナルの経時変化に関する画像情報は、組織細胞内のニトロキシラジカルの還元反応に基づくものであり、組織細胞内の酸化還元反応のバランスを反映するものである。そこで、この手法をMRレドックスイメージングと呼ぶことにした。

## 6. MRレドックスイメージング法の応用

TEMPOLの唾液腺に対する放射線防御作用のメカニズムについて、MRレドックスイメージング法で得られたデータに基づいて考察した<sup>9)</sup>。この実験では、SCC腫瘍と唾液腺を同一スライスに収めるため、マウスの前足に腫瘍を植えつけた。 $T_1$ 強調画像の連続撮像を開始し、その途中、何枚かのベースライン画像を撮像した後、TEMPOLを尾静脈から投与した。 $T_1$ シグナルはTEMPOL投与後直ちに上昇し、約1分でピークに達し、その後徐々に減少した。予め撮像した $T_2$ マッピングによるスカウトイメージを基にして、腫瘍と正常筋肉組織と唾液腺にROIを取り、ROI内の $T_1$ シグナルの増加率の自然対数を時間に対してプロットし、その傾きから、正常筋肉組織、SCC腫瘍組織、および唾液腺でのTEMPOLの還元速度を求めた。唾液腺と正常筋肉組織でのTEMPOLの還元速度は、ほぼ同等の値を示したが、腫瘍組織では有意に速い還元速度が得られた。この結果から、腫瘍組織においては、放射線防御効果を持つTEMPOLから放射線防御効果を持たないヒドロキシラミン体への還元が、正常組織に比べて有意に速いことが示され、これによってTEMPOLの正常組織特異的な放射線防御作用が与えられていることが示唆された。

また別の実験で、ニトロキシラジカル還元速度と腫瘍サイズの関係と比較すると、腫瘍サイズの増大に伴って還元速度が速くなることが分った。これは、腫瘍組織の増大に伴う低酸素部位の拡大によるものと考えられる。腫瘍ではGSH濃度が比較的高く、GSHによるニトロキシラジカル還元速度の増加が起こることが既に知られているが<sup>10)</sup>、これに加えて、腫瘍内の低酸素の環境はヒドロキシラミンからニトロキシラジカルへの再酸化を抑制するので、その結果、腫瘍組織ではニトロキシラジカル還元速度が有意に増加すると考えられる(図2)。つまりニトロキシラジカル還元速度が有意に増加することによって、有意に速い還元速度を持つ場所を探しだし、低酸素の腫瘍組織を認識することが可能になると考えている。

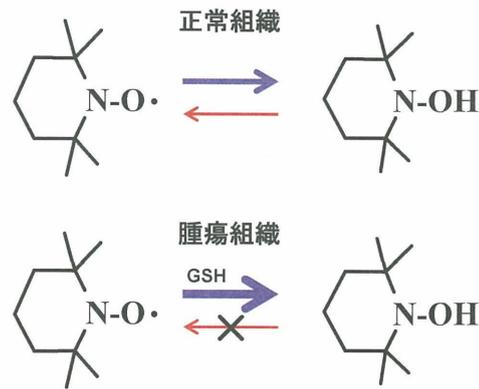


図2. 腫瘍組織と正常組織でのニトロキシルラジカルの酸化還元反応の違い。腫瘍組織内ではGSH濃度が高くニトロキシルラジカルからヒドロキシルアミンへの還元が起こり易い上に、腫瘍内の低酸素の環境によってヒドロキシルアミンからニトロキシルラジカルへの再酸化が抑えられる。このため腫瘍組織では有意に速いニトロキシルラジカルの還元速度が生じる。

## 7. おわりに

ニトロキシル造影剤のもう一つの利点は、それ自体が放射線防御効果を持っている点である。レドックスマッピングによる腫瘍組織の診断が行われたならば、引き続いて実際に放射線治療が行われることになると予想できるが、この時、体内に残存するニトロキシルラジカル体は正常組織に特異的な放射線防御剤としても働くことができると考えられる。すなわちレドックスマッピングを実施した後、腫瘍組織では効率的に還元されて、しかし正常組織では十分なラジカル体が保持されているタイミングを見計らって放射線治療を行うことによって、より効果的な治療ができるようになるのではないかと期待している。

## 引用文献

1. Matsumoto K, Subramanian S, Murugesan R, Mitchell JB, Krishna MC. Spatially resolved biological information from in vivo EPRI, OMRI, and MRI. *Antioxid. Redox Signal.* 9: 1125-1141, 2007.
2. Soule BP, Hyodo F, Matsumoto K, Simone NL, Cook JA, Krishna MC, Mitchell JB. Therapeutic and Clinical Applications of Nitroxide Compounds. *Antioxid. Redox Signal.* 9: 1691-1698, 2007.
3. Mitchell JB, DeGraff W, Kaufman D, Krishna MC, Samuni A, Finkelstein E, Ahn MS, Hahn SM, Gamson J, Russo A. Inhibition of oxygen-dependent radiation-induced damage by the nitroxide superoxide dismutase mimic, tempol. *Arch. Biochem. Biophys.* 289: 62-70, 1991.
4. Hahn SM, Krishna MC, DeLuca AM, Coffin D, Mitchell JB. Evaluation of the hydroxylamine Tempol-H as an in vivo radioprotector. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 953-958, 2000.
5. Cotrim AP, Hyodo F, Matsumoto K, Sowers AL, Cook JA, Baum BJ, Krishna MC, Mitchell JB. Differential radiation protection of salivary glands versus tumor by Tempol with accompanying tissue assessment of Tempol by magnetic resonance imaging. *Clin. Cancer Res.* 13: 4928-4933, 2007.
6. Kuppusamy P, Afeworki M, Shankar RA, Coffin D, Krishna MC, Hahn SM, Mitchell JB, Zweier JL. In vivo electron paramagnetic resonance imaging of tumor heterogeneity and oxygenation in a murine model. *Cancer Res.* 58: 1562-1568, 1998.
7. Subramanian S, Matsumoto K, Mitchell JB, Krishna MC. Radio frequency continuous-wave and time-domain EPR imaging and Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging of small animals :

- instrumental developments and comparison of relative merits for functional imaging. *NMR Biomed.* 17 : 263-294, 2004.
8. Matsumoto K, Hyodo F, Matsumoto A, Koretsky AP, Sowers AL, Mitchell JB, Krishna MC. High-resolution mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents. *Clin. Cancer Res.* 12 : 2455-2462, 2006.
  9. Hyodo F, Matsumoto K, Matsumoto A, Mitchell JB, Krishna MC. Probing the intracellular redox status of tumors with magnetic resonance imaging and redox-sensitive contrast agents, *Cancer Res.* 66 : 9921-9928, 2006.
  10. Kuppusamy P, Li H, Ilangovan G, Cardounel AJ, Zweier JL, Yamada K, Krishna M, Mitchell JB. Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels. *Cancer Res.* 62 : 307-312, 2002.

# 分子イメージングで光が果たす役割は？

北海道大学 田村 守

Corresponding:

## 1. はじめに

分子イメージングの言葉が生まれてからわずかしか時間がたっていないが、この概念はかつてのヒトゲノムプロジェクトに匹敵する医学・生物学分野における究極の課題である。この分子イメージングは本邦においてややもすれば、PETを中心とした臨床診断の開発に重点が置かれているような印象であるが、決してそのような狭い概念ではなく、むしろヒトゲノムの決定後、次の課題、“遺伝子の機能解明を中心に、生命活動を担うすべての分子に関する情報、すなわち、いつ、どこで、どのような形をした分子（タンパク質が中心であるが、糖鎖やその他を含む）がどんな役割を果たし、その異常はどのような疾病を引き起こすのか？そしてそれをいかにして分子レベルで治療するか”への問いである。これに答えるため、米国NIHは2005～2014年までの10年にMolecular Library and Imagingを立ち上げ、上記の分子ライブラリーを作り上げることを最終目標とした。図-1にNIHにおける分子イメージングの10年のロードマップを示す。あえて日本語に直さなかったのは、英語のニュアンスと正式文書の意味を持たせたい為である（黄色はこの中でも特にNIH本体で取り組むべき課題を示す）。これが出されてからすでに3年が経過し、一部で評価がスタートしている。このロードマップに示されるように、分子イメージングの最終目標は、右の上段のHigh Riskで8～10年後には、①イメージング及び細胞や組織レベルでの分析技術（ゲノム分析やプロテオミクスなど）を組み合わせた個人の病態治療（Personalized treatment）を確立すること、②丸ごと動物（人を含めた）全体の生理学（生化学、分子生物学ではないことに注意）を理解するための分子イメージングを完成することである。これがいかに夢のようなものであるか次の事を考えれば容易に理解できよう。すなわち我々が個の受精卵から出発し胎児を経て生まれ、成人として数10兆個の細胞になるとき、その分化の全過程をすべて分子レベルで明らかにすることである。このロードマップから明らかなのは、上の目的のため我々は必要とするすべての画像化技術やターゲット分子の検出技術を大幅に向上させ（ここでは1000倍!!）ることが要求されている（左上段）。ここに光の技術が新たに注目を集めつつある理由がある。

MOLECULAR IMAGING		
High Risk		
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Catalog molecular targets characterized by genomics</li> <li>•Develop high specificity/high detectability probes towards 1000x improvement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Establish public/private partnerships to increase probe number and availability</li> <li>•Functional and quantitative imaging of specific cell processes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Personalized treatment with imaging or imaging combined with cell/tissue analysis (genomics, proteomics, etc) for patient evaluation, selection, and monitoring for targeted therapies</li> <li>•Molecular imaging to understand physiology in the whole animal</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Contract cores for toxicology studies</li> <li>•Collaborate with FDA to minimize regulatory hurdles</li> <li>•Development of hybrid imaging systems</li> <li>•Identify surface molecules on cells &amp; tissue proteins to act as therapeutic and image targets (subset of database)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Probes to monitor therapy effectiveness/safety (biomarker/catalog of surrogate markers)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•“Expert” image data interpretation tools</li> <li>•Integration of cellular topology with cell signaling pathways</li> <li>•Single molecule detection at high through-put to assay molecular events in cells</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Imaging agent and probe database: probe usefulness, availability/source, working protocols</li> <li>•Institutional training grants in molecular imaging: chemistry to interpretation (to dev. high specificity...)</li> <li>•Training synthetic chemists to increase work force</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Core probe synthesis facility</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Develop library of clonable probes for full genome expression</li> </ul>
LowRisk [1-3 years]	[4-7 years]	[8-10 years]

図-1 NIHにおける分子イメージングに関するロードマップ

## 2. 光の利点と分子イメージングにおけるその役割

“光”、広い意味での電磁波は、次のような多くの利点を持つ。

- (1) 超高感度の検出能力—1分子検出が可能
- (2) 超高選択性—分光学的な性質を利用することにより、細胞や生体組織のように多数の成分が混在している状態で、特定のターゲットのみを選択的に検出、画像化が可能。
- (3) 広い空間解像度を持つ—分子の大きさのナノメートルから人体のcmまでの空間解像度を持つ。
- (4) 生体に対して高い無侵襲性を持つ—画像診断のみならず、長期の連続的モニタリングも可能。
- (5) 他のモダリティとの非干渉性—PET、CT、MRI、あるいは超音波などとの併用が可能。
- (6) ポータビリティが高く、比較的装置はシンプルで、特別な施設がいらぬ—家庭のようなところでも使用可能。

などがあげられる。

これらの利点の中で、(1)~(3)を生かした顕微鏡を中心とした細胞イメージングはGFPに代表される蛍光ラベル法の発達により、細胞内情報伝達系の解析を中心として膨大な仕事がなされている。

臨床医学を意識した光の応用の視点からは、次のステップとして生きた生体組織における個々の細胞内での分子の働きを見ることが必要であろう。この“顕微鏡を生きた丸ごとの生体で”は非常に多くの困難さを伴う。それは生体組織は細胞1個の計測と異なり、光がまっすぐ進まない多重散乱系に由来する。従って従来の分光法、特に紫外—可視領域の吸収や発光（蛍光と化学発光）に対し、“濁った溶液での測定は避けるべき”と教科書に書かれてある。この多重散乱系での光の吸収と発光の定量的理解とその画像化が、光イメージング法の基本問題である。これらに対する最近の成果あるいはいくつかの試みを紹介する。

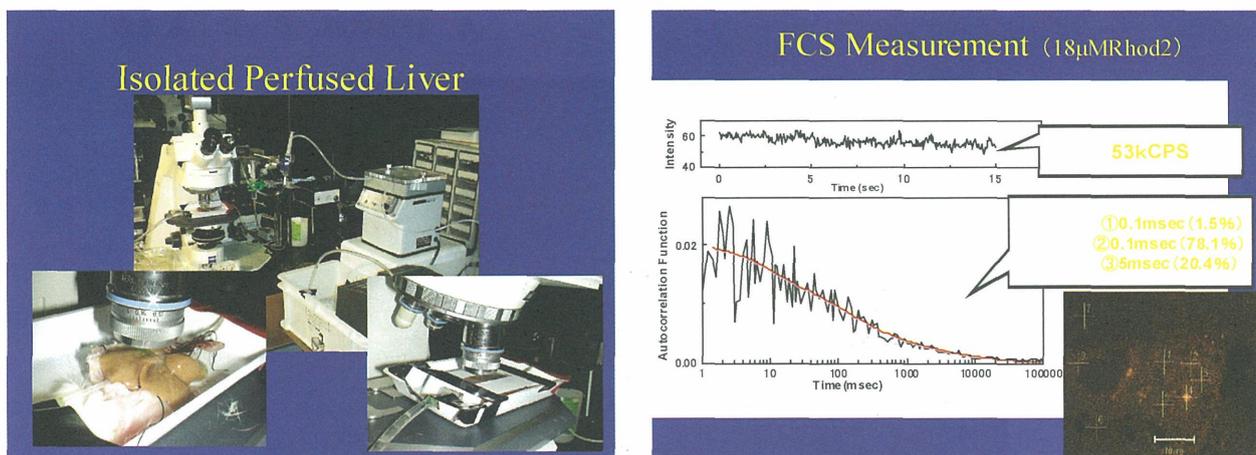


図-2 ラット灌流肝臓における1分子計測の例 A：セットアップ、B：自己相関カーブ

## 3. 1分子計測法のin vivo展開

細胞レベルでの顕微鏡下における蛍光観察はすでにルーチン化しており、特に蛍光タンパク質（GFP等）を融合させた各種のタンパク質の挙動を共焦点顕微鏡を用いて解析する一連の仕事は、細胞内情報伝達系の解明等の主流となっている。我々はこの顕微鏡観察システムに新たに蛍光分子の動的情報（分子の大きさや自由拡散による分子の移動あるいは蛋白間の相互作用の有無）を得ることが可能な計測手法である、蛍光相関分光法（Cross-Correlation Spectroscopy, FCCS）を開発してきた<sup>(1)</sup>。この手法を生きた生体組織の中の一つの細胞に応用した例を図2（A、B）に示す<sup>(2)</sup>。クレブス—リンゲル液で灌流したラット灌流肝を顕微鏡下に置く。Ca<sup>++</sup>—指示薬を注入したあと、FCSを測ると自由に動いているCa<sup>++</sup>と動きにくい状態とが混在していることがわかる。このように今後

の方向として、生きた丸ごと生体へ顕微鏡をいかに持ち込むか、いわゆるin vivo顕微鏡や、内視鏡に顕微鏡機能を持たせた、micro-endoscopeが開発されつつある。今では人の消化器系臓器の1個の細胞を見ること（光バイオプシー）も可能である。

#### 4. 光診断法

光を利用した診断法である光診断(Optical Diagnosis)ですすでに臨床に使われているのが蛍光内視鏡である。図-3にラット灌流心臓におけるNADH蛍光の好気-嫌気時における(この場合、灌流を止める)蛍光マップを示す。白く見える部分がNADHの増加領域を示し、嫌気領域である。このことは生体組織においてNADH蛍光の地図は低酸素領域あるいは血流変動が生じている領域を示すことになる。この事実をうまく利用し、実際の医療診断に利用されている例を図-4に示す<sup>(3)</sup>。生体由来の自家蛍光画像を内視鏡で得たもので通常の白色光では不鮮明な病変部が蛍光画像でははっきりと観察される。このような蛍光内視鏡に分光装置を装着した多機能分光内視鏡も開発されつつある。

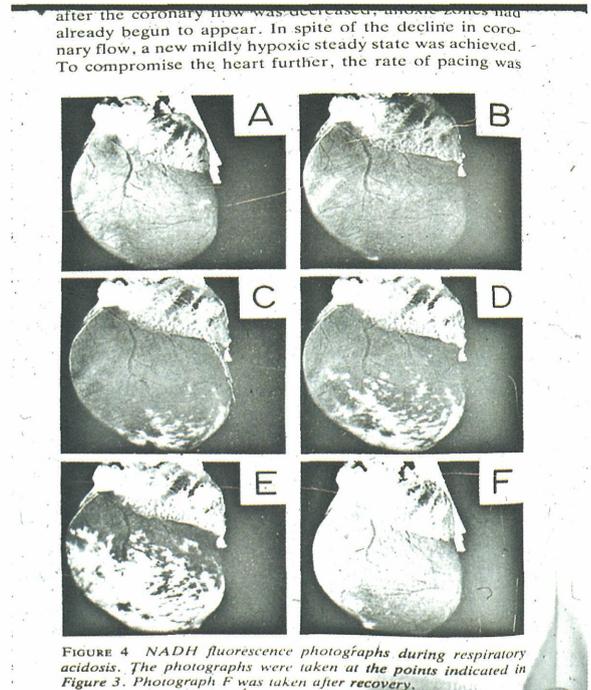


図-3 ラット灌流心臓におけるNADH蛍光画像  
A：好気状態、B～D：灌流液

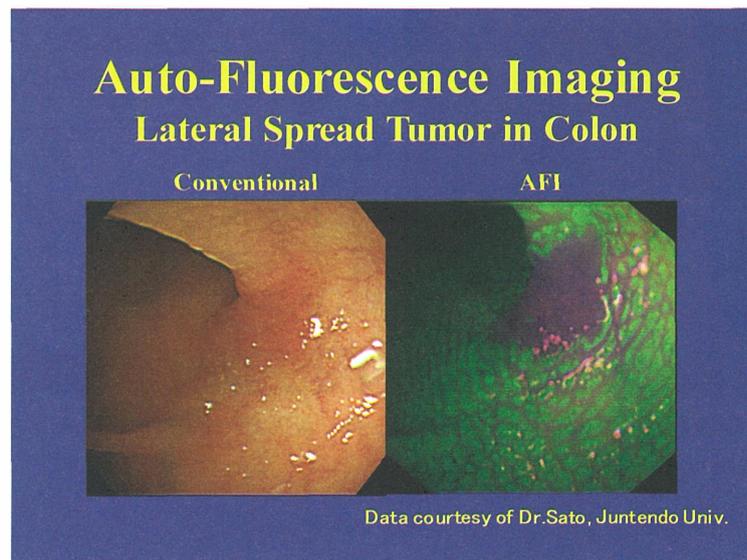


図-4 蛍光内視鏡による病変部の検出

#### 5. 近赤外画像診断の現状

光の持つ欠点一つは、生体組織に対し、透過性が低い点である。この欠点は近赤外光(700～1100nm)でかなり改善される。現在では厚さにして～10cmの生体組織(新生児頭部や乳房など)を透過した光を検出できる。図-5は乳がんの検出に近赤外光による画像診断を応用した例である<sup>(4)</sup>。血液の酸素濃度画像から、0.5cm程度のガンの検出が可能である。本邦においても時間分解計測法を用いた“光マンモグラフィー”の試作と臨床評価が行われている。

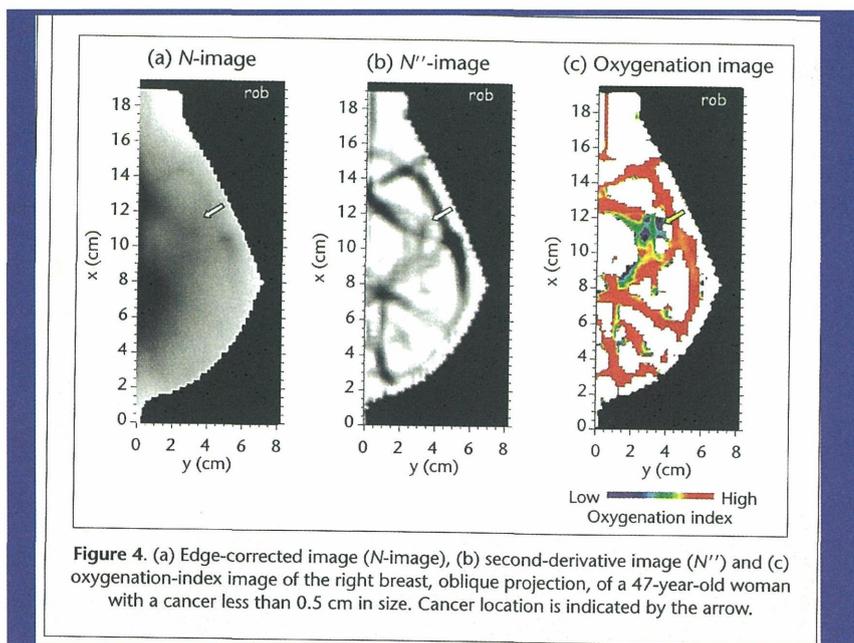


図-5 乳ガンの光画像診断

#### 6. 終わりに

分子イメージングにおける光の果たす役割は、始まったばかりである。現時点で他のMRIやPETと比較したとき、見るべき成果は少ない。しかし光の持つ利点を考えれば逆に今後の臨床応用の可能性も大きいと言える。光を更に生かすには、図-6のように新たな光プローブ、あるいは光造影剤の開発が必須となろう。

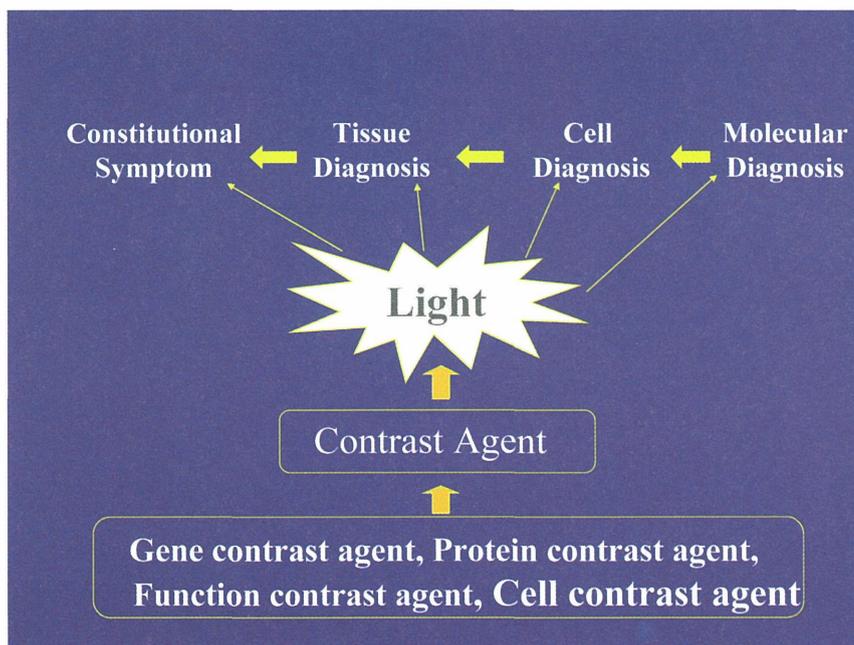


図-6 光造影剤 (Contrast Agent) による光診断

図-1のロードマップに示されるように、分子イメージングは決してPETを中心とした臨床応用だけではない。そこではPET、MRI、CTそして光イメージングと多様な画像診断法を分子レベルに拡大し、生命現象の基本を解き明かし、そしてその成果を医療に生かす壮大な概念である。そこでは“1分子計測を人の身体で”、が最終目標となろう。

#### 引用文献

- (1) K. Saito, E. Ito, Takakuwa, et al, FEBS Letter, 54, 126-131 (2003)
- (2) 斎藤有香、田村守、金城政孝、生物物理、209、209 (2006)
- (3) オリンパスカタログ (順天堂大学、佐藤信紘教授提供)
- (4) S. Fantini, Heffer E. L., Siebold H., et al, Optics and Photonics News, November (2003)

第2回分子イメージング研究センターシンポジウム  
「マルチモーダルイメージングの可能性」

平成20年3月刊行

発 行 独立行政法人放射線医学総合研究所  
郵便番号 263-8555  
住 所 千葉県千葉市稲毛区穴川4丁目9番1号  
連 絡 先 放射線医学総合研究所  
企画部国際・交流課  
TEL : 043-206-3024 FAX : 043-206-4061  
ホームページ <http://www.nirs.go.jp>  
印 刷 株式会社 さくら印刷

Printed in Japan

© 2007 独立行政法人 放射線医学総合研究所

ISBN 978-4-938987-46-6