

## 放射性ヨウ素標識 benzarone の 新規画像診断薬としての有用性の評価

山形 純大

(指導教員：川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨：血管障害治療薬として用いられていた benzarone は、大腸がんの治療に利用できるという報告がある。本研究室で開発した  $^{125}\text{I}$ -benzarone は有機アニオン系薬剤を輸送する数種の薬物トランスポーターに親和性を有することから、がん細胞の取り込み型薬物トランスポーター機能を可視化することで、がんの画像診断のみならず抗がん剤の取り込み能評価も期待される。そこで本研究では、担がんマウスを用いた体内分布実験において放射性ヨウ素標識 benzarone のがん画像診断薬としての有用性を評価した。本研究室で  $^{18}\text{F}$ -FDG を上回る  $^{125}\text{I}$ -benzarone の高集積を確認したヒト由来大腸がん細胞株 LS180 を皮下移植した担がんマウスを用いて、 $^{125}\text{I}$ -benzarone 体内分布実験を行った。また、正常マウスの肝ホモジネートを用いて放射性代謝物を分析した。体内分布実験の結果、 $^{125}\text{I}$ -benzarone の腫瘍対血液比は 1 以下であり、腫瘍への選択的集積は認められなかった。また、肝臓や小腸、大腸の集積が非常に高く、速やかな胆汁排泄が認められ、マウス肝ホモジネート中では薬物代謝酵素である CYP によって  $^{125}\text{I}$ -benzarone が代謝されることも確認された。これらのことから、マウス生体内では  $^{125}\text{I}$ -benzarone が肝臓で代謝を受けたため、化学構造が維持されずがん細胞への集積性が低下したと考えられた。以上より、 $^{125}\text{I}$ -benzarone の腫瘍への選択的集積は認められず、がん画像診断薬としての有用性は低いことが示された。一方、CYP による代謝が確認されたことから、ヨウ素標識 benzarone は放射性代謝物の胆汁排泄を解析する手法を通じて CYP の活性を評価する画像診断薬としての応用が期待できる。

### I. はじめに

がんは 1981 年から現在まで日本人の死因の第 1 位を占めており、2022 年のがん死亡者数は 38 万人を超えている<sup>1)</sup>。現在がんの三大治療法の一つである化学療法では、抗がん剤が様々な取り込み型薬物トランスポーターを介してがん細胞内に取り込まれることでがんを死滅させている<sup>2)</sup>。このため、特定の薬物トランスポーターを介して取り込まれる画像診断薬を開発することで、がんの画像診断のみならず抗がん剤の取り込み能を評価することが可能であると考えた。

本邦において血管障害治療薬として用いられていた 2-ethyl-3-(4-hydroxybenzoyl)benzofuran (benzarone) は、近年の研究で大腸がんの治療に利用できるという報告があり<sup>3)</sup>、本研究室で開発したヨウ素標識体  $^{125}\text{I}$ -benzarone は、本研究室の先行研究において有機アニオン系薬剤を輸送する薬物トランスポーターの OATP1B1 と OAT1 に親和性を有することを確認した。さらに、ヒト由来大腸がん細胞株の DLD-1 と LS180、ヒト由来肺腺がん細胞株の H441 と PC-14 を用いた  $^{125}\text{I}$ -benzarone の細胞集積実験では、現在臨床でがんの核医学画像診断薬として最も広く利用されている  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) よりも高い集積が示されている。そこで本研究では、担がんマウスを用いた体内分布実験において放射性ヨウ素標識 benzarone のがん画像診断薬としての有用性を評価した。

## II. 担がんマウスの作成に使用するがん細胞株の選択

### A) Real-time PCR による薬物トランスポーター遺伝子発現量測定

担がんマウスの作成に使用するがん細胞株を選択するために、本研究室の先行研究で用いた4つのがん細胞株（ヒト由来大腸がん細胞株：DLD-1, LS180、ヒト由来肺腺がん細胞株：H441, PC-14）に対して、それぞれのがん細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成した後、real-time PCR システム (AriaMx, Agilent Technologies) を用いて、OATP1B1 と OAT1 の遺伝子発現量を測定した。ただし、OATP1B1 遺伝子は OATP1B3, OATP1B7 遺伝子と相同性が高く OATP1B1 単独での測定が困難なため、3種類をまとめて測定した。Table 1 に real-time PCR に使用した OATP1B1/3/7 遺伝子と OAT1 遺伝子のプライマー配列および最終濃度を示す。

Table 1 各遺伝子のプライマー配列および最終濃度

薬物トランスポーター	プライマー配列		最終濃度 [nM]
	Forward	Reverse	
OATP1B1	GCACTGGGTTTCCACTCAAT	CAGTTGTTGGTGGACCACTTT	200
OATP1B1/3/7	OATP1B3 GCAATGGGTTTCCAGTCAA	AGCTGTTGGTGGACCACTTC	
	OATP1B7 GCAATCGGCTTCCATTCAAT	AGCTGTTGGTGGACCACTTC	
OAT1	GCGCCTTTTTTGCCTTCT	TTCCCGCTTCCCATTGATC	300

### B) 結果と考察

Table 2 に各がん細胞株における OATP1B1/3/7 と OAT1 の遺伝子発現量を示した。OAT1 の遺伝子発現量に対して OATP1B1/3/7 の遺伝子発現量は非常に多く、<sup>125</sup>I-benarone のがん細胞への集積には OAT1 よりも OATP1B1 の寄与が大きいと考えられた。よって、OATP1B1/3/7 の遺伝子発現量が多い DLD-1 と LS180 の2つのがん細胞株のうち、Fig. 1 に示すように先行研究において<sup>125</sup>I-benarone の細胞集積量が高く、投与後 30 分までの安定した集積が得られた LS180 を選択した。

Table 2 各がん細胞における OATP1B1/3/7 と OAT1 の遺伝子発現量 [μg]

	DLD-1	LS180	H441	PC-14
OATP1B1/3/7	$1.55 \times 10^6$	$2.29 \times 10^6$	$5.44 \times 10^5$	$1.46 \times 10^4$
OAT1	$3.09 \times 10^2$	$2.80 \times 10^2$	$1.05 \times 10^3$	$9.41 \times 10^2$

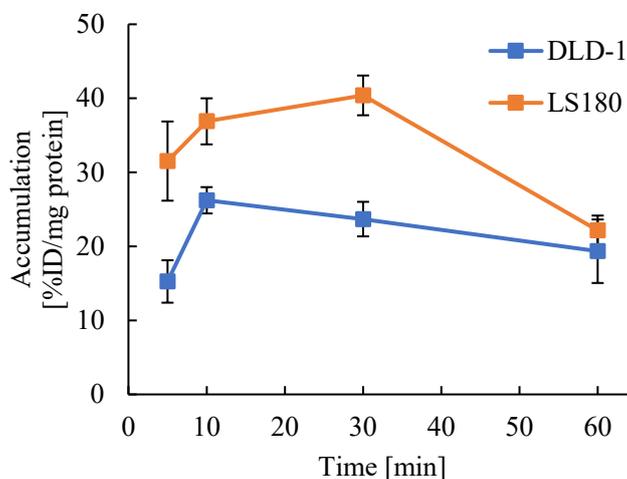


Fig. 1 DLD-1, LS180 への<sup>125</sup>I-benarone の経時的集積

### III. 担がんマウスを用いた $^{125}\text{I}$ -benzarone の体内分布実験

#### A) 実験材料および実験方法

$^{125}\text{I}$ -benzarone は、原料として benzarone (東京化成工業) を使用し、chloramine T (Nacalai tesque) を酸化剤として用いる直接法で標識した。 $^{125}\text{I}$ -NaI (2.0 MBq, PerkinElmer) と、acetonitrile (Nacalai tesque) に溶解した 1.0 mM の benzarone 溶液 200  $\mu\text{L}$  を混和し、1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) (富士フイルム和光純薬) に溶解した 0.1 mM の chloramine T 溶液 200  $\mu\text{L}$  を加えて反応を開始した。反応開始 60 分後に 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解した 1/10 飽和溶液のピロ亜硫酸ナトリウム (富士フイルム和光純薬) を 40  $\mu\text{L}$  加えることで反応を停止した。反応後の溶液を高速液体クロマトグラフィ (high performance liquid chromatography: HPLC) を用いて table 3 に示す条件で分離し、 $^{125}\text{I}$ -benzarone を精製した。検出機器には UV 検出器 (UVL-7405, Hitachi), RI 検出器 (GABI Nova, Elysia-raytest) を使用し、分離精製後に窒素灌流して acetonitrile を除去した。その後薄層クロマトグラフィ (thin-layer chromatography: TLC) を用いて、固定相にシリカゲル薄層板 (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck)、移動相に chloroform (Nacalai tesque) : diethyl ether (Nacalai tesque) = 1 : 1 で  $^{125}\text{I}$ -benzarone の放射化学的純度検定をした。

実験動物にはヌードマウス (BALB/c, 4 週齢、雄、日本エスエルシー) を用いた。4 週齢のマウスに II で選択したヒト由来大腸がん細胞株 LS180 を皮下移植し、移植 2 週間後のマウスを担がんマウスとして実験に用いた。

作成した担がんマウスに  $^{125}\text{I}$ -benzarone を 1 匹あたり 37 kBq/200  $\mu\text{L}$  ずつ尾静脈投与した。投与後 5, 10, 30, 60 分に採血と解剖を行い、オートウェル  $\gamma$  カウンター (AccuFLEX ARC- $\gamma$ 7010, Hitachi Aloka) を用いて血液と各臓器の放射能を測定した。式 (1) を用いて重量集積率を算出し、 $^{125}\text{I}$ -benzarone の各臓器への集積を評価した。また、腫瘍の重量集積率を血液の重量集積率で除することで腫瘍への選択的集積を評価した。

Table 3 HPLC の分析条件

Column	5C <sub>18</sub> -AR-II 10mm I.D.-250mm (Nacalai tesque)
Solvents	0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) : acetonitrile = 20 : 80
Flow rate	1.0 mL/min

$$\text{重量集積率 [\% ID/g]} = \frac{\text{サンプルの counts [cpm] / 投与した RI の counts [cpm]}}{\text{サンプルの重量 [g]}} \times 100 \quad (1)$$

#### B) 結果と考察

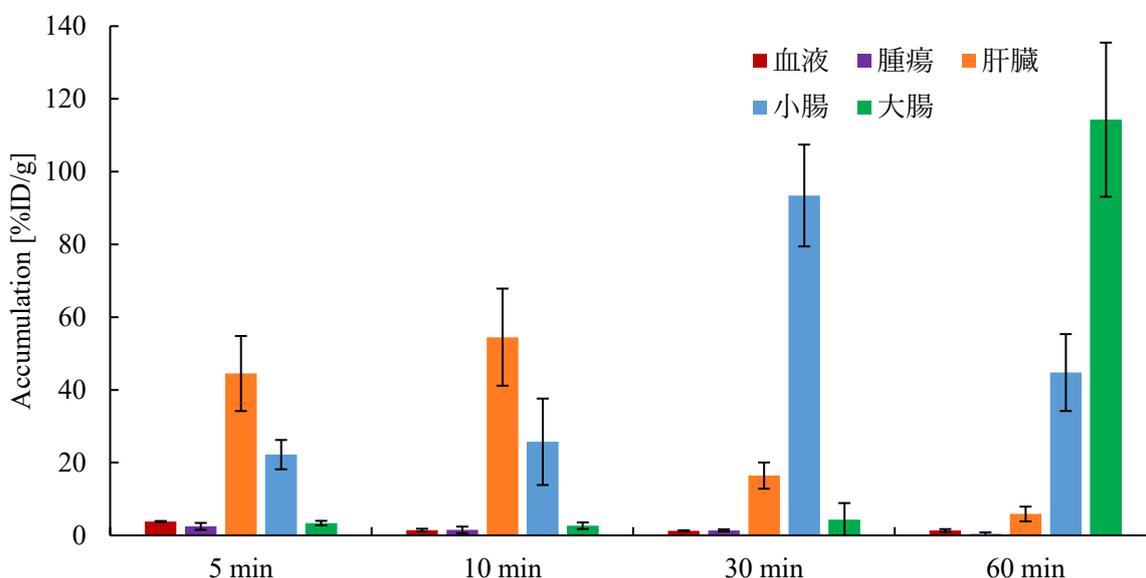
精製後の  $^{125}\text{I}$ -benzarone の放射化学的純度は 93% 以上であった。

Table 4 に  $^{125}\text{I}$ -benzarone 投与後 5, 10, 30, 60 分の腫瘍と血液の重量集積率、腫瘍対血液比を示した。腫瘍対血液比は 1 程度かそれ以下であり、 $^{125}\text{I}$ -benzarone の腫瘍への選択的集積は認められなかった。また、Fig. 2 に  $^{125}\text{I}$ -benzarone 投与後 5, 10, 30, 60 分の血液、腫瘍、肝臓、小腸、大腸の重量集積率を示した。投与後早期から肝臓の集積が高く、時間経過に従って小腸、大腸の順に集積が増加した。

Table 4 および Fig. 2 より、投与した  $^{125}\text{I}$ -benzarone の大部分が早期から胆汁排泄を受け、小腸に排泄され、大腸へと移行したと考えられた。また、肝臓内で代謝によって  $^{125}\text{I}$ -benzarone の化学構造が変化したことで、がん細胞への選択的集積性が低下した可能性があるかと推測した。そこで、正常マウスの肝ホモジネートを用いた  $^{125}\text{I}$ -benzarone の代謝物分析を行い、マウス肝臓内で  $^{125}\text{I}$ -benzarone に構造変化が生じているかを検討した。

Table 4 腫瘍および血液の重量集積率と腫瘍対血液比

		5 min	10 min	30 min	60 min
重量集積率 [%ID/g]	腫瘍	2.48 ± 0.94	1.51 ± 0.90	1.36 ± 0.31	0.41 ± 0.41
	血液	3.79 ± 0.16	1.45 ± 0.36	1.26 ± 0.14	1.32 ± 0.40
腫瘍対血液比		0.65	1.04	1.08	0.31

Fig. 2 担がんマウスにおける <sup>125</sup>I-benzarone の重量集積率IV. マウス肝ホモジネートによる <sup>125</sup>I-benzarone 代謝物分析

## A) 実験材料および実験方法

体内に摂取された薬物の大部分は薬物代謝酵素によって代謝を受けており、そのなかでも cytochrome P450 (CYP) による代謝が約 70 %を担っている<sup>4)</sup>。また、benzarone の構造類似体である benzbromarone は CYP2C9 により代謝を受けることが確認されている<sup>5)</sup>ことから、<sup>125</sup>I-benzarone の代謝も CYP によるものであると仮定して代謝物生成の有無を評価した。

正常マウス (ddY、7 週齢、雄、日本エスエルシー) の肝臓を用いて作成した肝ホモジネート 20 μL に 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 75 μL、CYP のエネルギー源を作り出す NADPH 生成系 (0.5 mM β-NADP<sup>+</sup>, 5 mM glucose-6-phosphate, 1 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) 50 μL、III と同様の方法で作成した 370 kBq の <sup>125</sup>I-benzarone 25 μL を混合し、反応溶液が 250 μL になるように精製水を加えた。比較対象として NADPH 生成系を精製水に置き換えたサンプルを用意し、NADPH 生成系を加えたサンプルを NADPH (+)、精製水に置き換えたサンプルを NADPH (-) とした。<sup>125</sup>I-benzarone 添加後、37 °C で 60 分間インキュベーションした。その後、反応を停止させるために氷冷した acetonitrile を 50 μL 添加し、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を III と同様の条件で TLC 分析した。

## B) 結果と考察

Figure 3 (a), (b) に両サンプルの TLC 分析結果を示した。両サンプルで Rf 値 0.5 付近に <sup>125</sup>I-benzarone のピークが確認された一方で、CYP のエネルギー源である NADPH 生成系を加えたサンプル (NADPH (+)) のみで Rf 値 0.3 付近にピークが確認された。したがって、<sup>125</sup>I-benzarone が NADPH 依存性酵素である CYP により代謝を受けたと考えられた。

このことから、ヨウ素標識 benzarone は、放射性代謝物の胆汁排泄を解析することで、CYP 活性を評価可能な画像診断薬として応用できる可能性があり<sup>6)</sup>、個人差のある CYP 活性を定量解析することは医薬品の適切な投与量の決定に寄与し、薬物療法の個別化における根拠に基づく医療 (evidence-based medicine: EBM) の実践につながると考える。

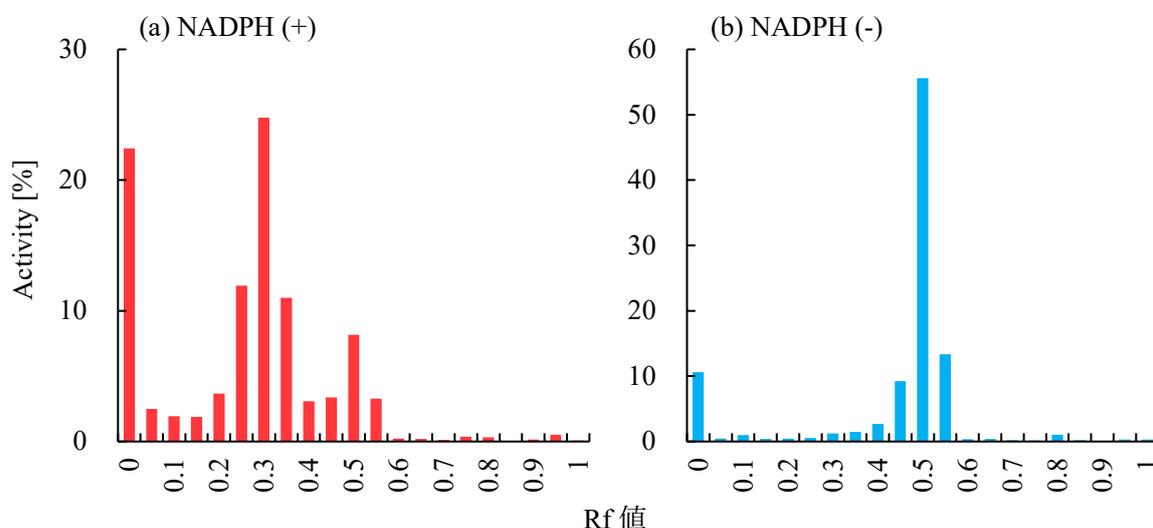


Fig. 3 肝ホモジネート中の <sup>125</sup>I-benzarone 放射性代謝物 TLC 分析

## V. 結語

<sup>125</sup>I-benzarone の腫瘍への選択的集積は認められず、がん画像診断薬としての有用性は低いと考えられた。一方、CYP による代謝が確認されたことから、ヨウ素標識 benzarone は放射性代謝物の胆汁排泄を解析する手法を通じて CYP の活性を評価する画像診断薬としての応用が期待できる。

## VI. 謝辞

本研究を終えるにあたりご指導くださいました川井恵一教授、小林正和教授、水谷明日香助教、ご協力いただきました大滝幹恵技術補佐員と本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

## VII. 参考文献

- 1) 厚生労働省. 令和 4 年 (2022) 人口動態統計月報年計 (概数) の概況.  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai22/index.html>.
- 2) Sprowl JA, Mikkelsen TS, Giovinazzo H. *et al.* Contribution of tumoral and host solute carriers to clinical drug response. *Drug Resist Updat.* 15(1-2): 5-20; 2012.
- 3) Yang C, Liu H. Both a hypoxia-inducible EYA3 and a histone acetyltransferase p300 function as coactivators of SIX5 to mediate tumorigenesis and cancer progression. *Ann Transl Med.* 10(13): 752; 2022.
- 4) Williams JA, Hyland R, Jones BC. *et al.* Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos.* 32(11): 1201-1208; 2004.
- 5) 国嶋 千代子, 井上 郁夫, 及川 寿浩他. Benzbromarone (Urinorm®) の代謝・毒性および薬理作用に関する研究. *J Saitama Med School.* 30(4): 187-194; 2003.
- 6) Mizutani A, Kobayashi M, Aibe R. *et al.* Measurement of hepatic CYP3A4 and 2D6 activity using radioiodine-labeled *O*-desmethyl-venlafaxine. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(19): 11458; 2022.