

(論文要約)

前立腺癌の画像診断を目的とした
前立腺特異的膜抗原標的
分子イメージングプローブの開発に関する研究

2017

松岡 大航

第 1 章

SPECT 用 PSMA イメージングプローブとしての SCE 誘導体の開発

背景

悪性腫瘍(癌)の罹患数は、2015 年時点において全世界で 1,750 万人であり、癌の罹患数および死亡数は増加の一途をたどっている^{1,2}。中でも、前立腺癌(prostate cancer: PCa)は、世界中の男性の部位別癌罹患率が最も高く、今後も益々増加していくことが予測される。PCa の特徴として、進行が緩徐な高分化腺がんの割合が高いため、ただちに生命を脅かすような悪性度の高い低分化腺がんとの識別が困難であることが知られている。実際に、5 年生存率は、遠隔転移が見られた場合は約 30% ときわめて低いことが報告されている³。一方で、現在、PCa 発見の重要な契機となるものの一つとして、前立腺特異的抗原(prostate specific antigen: PSA)検診が知られている⁴。PSA 検診は、PCa 疑いの早期スクリーニングには有効であるものの、悪性度の高い PCa を判別することや、局在の特定、転移の有無を評価することは不可能である。さらに、癌再発への反応性が乏しく、再発を早期に発見することが困難であるとされていることから、PCa の治療方針の決定に貢献し、また、再発癌の局在を早期に検出可能な新たな診断法の開発が喫緊の課題となっている⁵⁻⁷。

前立腺特異的膜抗原(prostate specific membrane antigen: PSMA)は、グルタミン酸加水分解活性を有する膜糖タンパク質である^{8,9}。PCa 患者において、PSMA の発現量は正常前立腺組織の 100 から 1000 倍に増加し、特に、限局性 PCa において、悪性度に相関した増加が見られることが報告されている¹⁰⁻¹³。また、同タンパク質は PCa の病期の進行に伴い発現量が増加するため、転移癌や再発癌においても発現が亢進していることが報告されている¹⁴。したがって、PCa の診断及び治療の標的分子として、PSMA が大きな注目を集めている^{15,16}。

PSMA を標的とした画像診断法の開発は、治療前には悪性度の評価や転移巣の検出、治療後には癌再発の早期検出に有効であり、その後の治療方針の決定に寄与することが期待されている^{3,17}。この目的を達成するために、高感度かつ高精度に体外から非侵襲的に標的分子を検出することが可能な、陽電子放出断層撮像法(positron emission tomography: PET)や単光子放出断層撮像法(single photon emission computed tomography: SPECT)を用いる核医学分子イメージング法の利用が望まれている¹⁸。特に、使用する放射性同位元素の物理学的半減期が長く、導入施設数も多いことから、PET に比べて汎用性に優れている SPECT の利用が期待されている^{19,20}。

現在までに、PSMA がグルタミン酸加水分解活性を有していることに基づき、PSMA に対して結合性を有する化合物として、ホスホン酸型化合物である 2-(phosphonomethyl)pentanedioic acid (2-PMPA)²¹⁻²³ やグルタミン酸含有非対称ウレア型化合物である *N*-[*N*-[(*S*)-1,3-dicarboxypropyl] carbamoyl]-*S*-3-iodo-*L*-Tyr (DCIT)^{24,25} などが開発されてきた(Figure 1-1)。所属研究室では、グルタミン酸含有非対称ウレア型化合物である (*S*)-2-(3-((*R*)-1-carboxy-2-mercaptoethyl)ureido)pentanedioic acid (Cys-C(O)-Glu)²⁴ ($K_i = 376$ nM)に着目し、同化合物に succinimidyl 基を導入することで、PSMA に対す

る親和性が約 6 倍向上することを見出した²⁶。さらに, succinimidyl-Cys-C(O)-Glu (SCE)骨格($K_i = 62.1$ nM)に, SPECT 用核種である放射性ヨウ素 (^{123}I)を導入した化合物である (2*S*)-2-(3-((1*R*)-1-carboxy-2-((1-((*R*)-5-carboxy-5-(2-(3-[^{123}I]iodobenzamido)acetamido)pentyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)ethyl)ureido)pentanedioic acid (^{123}I -IGLCE)²⁶が PSMA に対して高い結合親和性を示したことから, SCE 骨格を基盤とした PSMA イメージングプローブの開発戦略が有望であることを明らかにしてきた(Figure 1-2)。しかし, ^{123}I -IGLCE は PCa 移植モデルマウスを用いた検討において, 肝臓や腸などへの非特異的集積が高く, 生体イメージングを行うためには体内動態の面で十分な性能を有しておらず, 他臓器への非特異的な集積性を改善する必要性があった。この原因の一つとして, ^{123}I -IGLCE の脂溶性が比較的高いこと(cLog D: 0.14)が考えられた。PCa は腹腔内リンパ節や骨盤へ転移しやすいことが報告されており²⁷, 転移巣を明瞭に描出するためには腹腔内臓器である肝臓や腸などへの集積は低いことが望ましい。そこで本研究では, ^{123}I -IGLCE の脂溶性をさらに低減させ, 他臓器への非特異的集積を改善することを目的として, 新規 SPECT 用 PSMA イメージングプローブの開発を計画した。

^{123}I を用いた分子設計では, 大幅に脂溶性を低減させることは難しいため, シグナル放出核種として, ^{123}I に比べて水溶性の高い放射性金属核種の導入を計画した。放射性金属核種は SCE 骨格に直接導入することは不可能であるため, 同一分子内に PSMA 認識部位と放射性金属核種標識部位を独立して有する二官能性キレート化合物の概念に基づいて, 新たな SCE 誘導体の分子設計を試みた。具体的には, シグナル放出核種として, ^{123}I の代わりに, 臨床核医学画像診断に最も利用されている SPECT 核種である technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)を選択した²⁸。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は核医学診断に最適な半減期(6.01 時間)及びエネルギー(141 keV)を有し, ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ジェネレータにより用時調製可能であるため, *in vivo* 放射性医薬品の供給量において最も高い割合を占めている。二官能性キレート試薬には, 水溶性が高いアニオン性 tricarbonyl 錯体を容易に形成可能な iminodiacetic acid (IDA)を選択した²⁹。IDA により形成された $^{99\text{m}}\text{Tc}^1(\text{CO})_3$ コアは負電荷を 1 つ有しており, $^{99\text{m}}\text{Tc}^1(\text{CO})_3(\text{IDA})$ 誘導体は, 腎臓へ速やかに移行し排泄される性質を有していることが知られているため³⁰, 肝臓への集積を低減可能であると考えられる。また, IDA により形成される $^{99\text{m}}\text{Tc}^1(\text{CO})_3(\text{IDA})$ 構造は立体的にコンパクトであるため, ファーマコフォアである SCE 骨格の分子標的性への影響が小さいと考えられる。これまでにいくつかの $^{99\text{m}}\text{Tc}^1(\text{CO})_3$ コアを有する PSMA を標的としたイメージングプローブが報告されているものの, いずれも中性または正電荷を帯びた錯体であり^{31, 32}, IDA により形成された負電荷を有するプローブは報告されていない。そこで, 他臓器への非特異的集積を低減させることを目的として, 水溶性が高く, 負に帯電した $^{99\text{m}}\text{Tc}^1(\text{CO})_3(\text{IDA})$ 構造を, ^{123}I -IGLCE と同様の原子数のリンカーを介して SCE 骨格へ導入した $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TSCE (cLog D: -3.14)を設計・合成し(Figure 1-2), SPECT 用 PCa イメージングプローブとしての有用性を評価した。

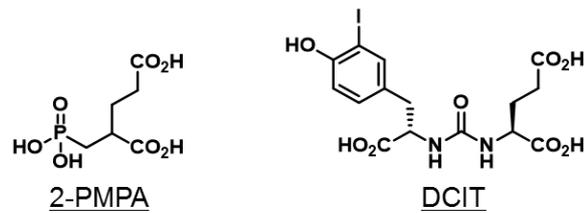


Figure 1-1. Chemical structures of GCP-II inhibitors, phosphonate or urea-based compounds.

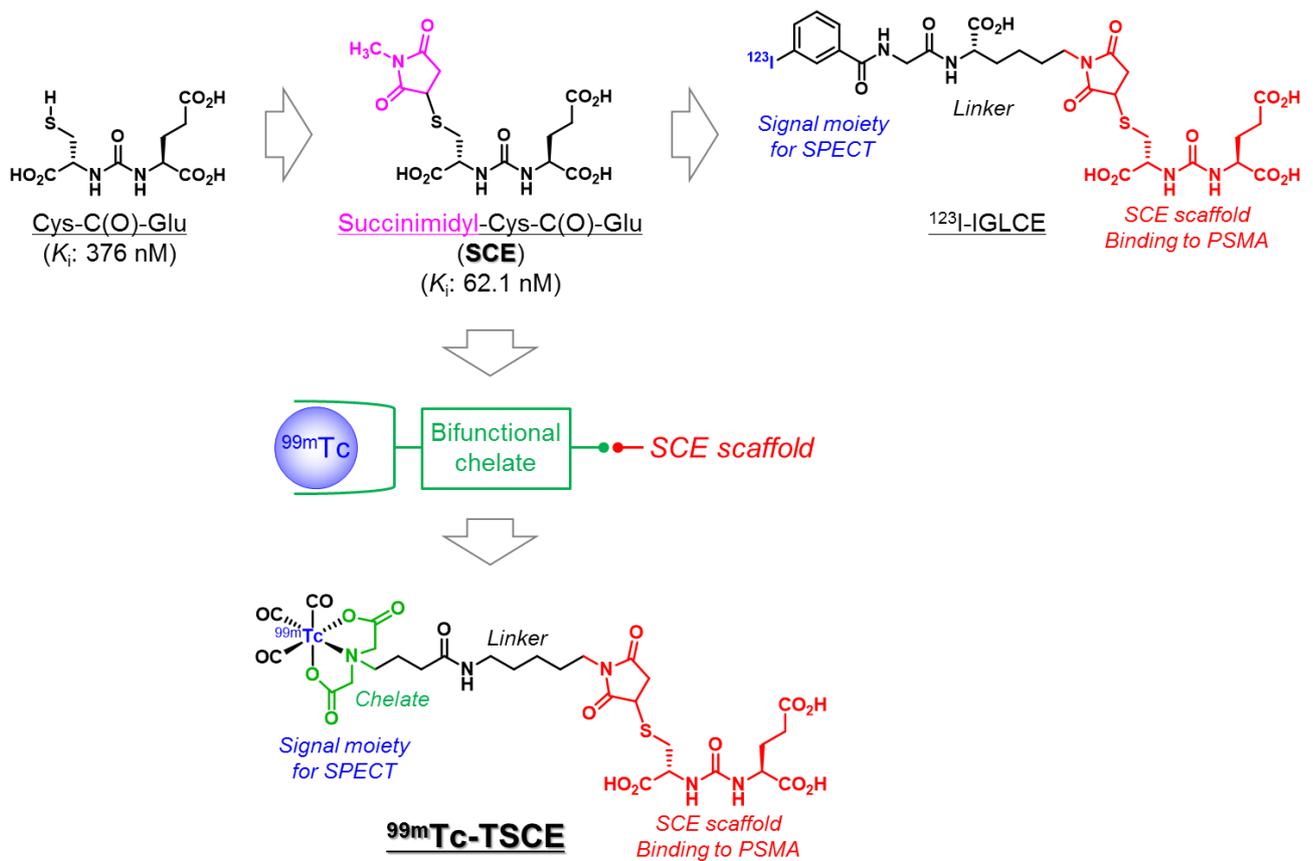


Figure 1-2. Design strategy for ^{99m}Tc-TSCE.

実験方法

試薬・機器

試薬は、ナカライテスク株式会社、東京化成工業株式会社、和光純薬株式会社、Sigma Aldrich 社から購入した。中圧分取液体クロマトグラフィー装置には、山善株式会社製自動設定中圧分取液体クロマトグラフシステム(EPCLC-W-Prep 2XY; 送液ポンプ(ミキサー内蔵): No. 580D, 検出器(波長固定型): prep UV-254W, フラクションコレクター: FR-260)を使用し、HI-FLASH COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 オングストローム, 粒子径: 40 μm , カラムサイズ: L あるいは 2L) および INJECT COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 オングストローム, 粒子径: 40 μm , カラムサイズ: M あるいは L)を装着した。 $^1\text{H-NMR}$ には、日本電子株式会社製 JNM-ECS400 を用い、tetramethylsilane を内部標準物質として測定した。大気圧化学イオン化質量分析(APCI-MS)およびエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)には、株式会社島津製作所製高速クロマトグラフ質量分析計 LCMS-2010 EV あるいは LCMS-2020 を用いて測定した。 $\text{Na}[^{125}\text{I}]\text{I}$ は株式会社 MP Biomedicals 及びパーキンエルマージャパン株式会社より購入したものをを使用した。テクネシウム注-10M ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ 過テクネチウム酸ナトリウム)は日本メジフィジックス株式会社より購入したものをを使用した。2-PMPA は Tocris Bioscience 社より購入したものをを使用した。Cys-C(O)-Glu は、神戸天然物化学株式会社に合成を依頼したものをを使用した。Isolink kit は Paul Scherrer Institute より購入した。マイクロ波を用いた反応には、CEM 社製マイクロ波反応装置(PETWave)を使用した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC) には、株式会社島津製作所製 LC-20AD あるいは LC-20AT を使用し、検出器として紫外スペクトル検出器 SPD-20A と日立アロカメディカル株式会社製シンチレーションサーベイメーターTCS-172 あるいはユニバーサル技研株式会社製HPLC用放射線検出器US-3000Tを使用した。移動相に用いる超純水は MQ Integral15 (日本ミリポア株式会社)を用いて調製した。放射能の測定には、パーキンエルマー社製 Wallac WIZARD 1470 あるいは Wallac WIZARD 1480, および ALOKA 社製キュリーメータ(IGC-7)を用いて測定した。PSMA 陰性ヒト PCa 細胞(PC-3)及び PSMA 陽性ヒト PCa 細胞(LNCaP)を DS PHARMA BIOMEDICAL 社より購入した。C.B-17/Icr +/+及び C.B-17/Icr scid/scid Jcl マウスは日本クレア社より購入した。SPECT/CT 撮像には FX3300 (FX3300 imager; SII NanoTechnology Inc., Northridge, CA, USA)を使用した。

Re-TSCE 及び $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TSCE 標識前駆体の合成

4-(Benzyloxy)-4-oxobutan-1-aminium chloride (**2**)

アルゴン雰囲気下、4-amino-n-butyric acid (1000 mg, 9.69 mmol)をベンジルアルコール(10.0 mL)に溶解し、モレキュラーシーブ 3A 及び塩化チオニル(1730 mg, 14.54 mmol)を氷上で加えた後、室温で 85 分間攪拌した。減圧留去後、残渣を酢酸エチルに溶かし、セライトろ過により不純物を除去した。ヘキサンを加えることで再結晶させ、目的物 **2** を収量 1692 mg (76.0 %)で得た。 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.23 (s, 3H), 7.25–7.37 (m, 5H), 5.07 (s, 2H), 3.09 (br, 2H), 2.50 (br, 2H), 2.10 (br, 2H). ESI-MS

m/z: 194 [M - Cl]⁺.

Benzyl 4-[bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino]butanoate (3)

アルゴン雰囲気下、化合物 **2** (2667 mg, 11.61 mmol) をジメチルホルムアミド(30.0 mL) に溶解し、炭酸カリウム(4809 mg, 34.8 mmol) 及び methyl bromoacetate (5328 mg, 34.8 mmol) を加えた後、80 °C で 9.5 時間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧留去した。残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/1) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、目的物 **3** を収量 2519 mg (64.3 %) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7.35–7.36 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.69 (s, 6H), 3.53 (s, 4H), 2.75 (t, *J* = 6.96 Hz, 2H), 2.44 (t, *J* = 7.54, 2H), 1.77–1.84 (m, 2H). ESI-MS m/z: 338 [M + H]⁺.

4-[Bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino]butanoic acid (4)

アルゴン雰囲気下、化合物 **3** (1180 mg, 3.50 mmol) を酢酸エチル(10.0 mL) に溶解した。Pd/C (130 mg) を加えた後、慎重に容器内を水素ガスで置換し、室温で 6 時間激しく攪拌した。セライトろ過により不純物を除去し、酢酸エチルで洗浄した。溶媒を減圧留去し、目的物 **4** を直接次の反応に用いた。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.72 (s, 6H), 3.58 (s, 4H), 2.82 (t, *J* = 6.38 Hz, 2H), 2.52 (t, *J* = 6.67 Hz, 2H), 1.77–1.84 (m, 2H). ESI-MS m/z: 248 [M + H]⁺.

Succinimidyl 4-[bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino]butanoate (5)

未精製の化合物 **4** (1805 mg) をジメチルホルムアミド(18.0 mL) に溶解し、*N*-hydroxysuccinimide (840 mg, 7.30 mmol) 及び 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (1399 mg, 7.30 mmol) を加えた後、室温で 12 時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧留去した。残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/1) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、目的物 **5** を収量 1227 mg (51.1 %) で得た。ESI-MS m/z: 345 [M + H]⁺, 343 [M - H]⁻.

Methyl 2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole-1-carboxylate (7)

アルゴン雰囲気下、maleimide (2427 mg, 25.0 mmol) を酢酸エチル(20.0 mL) に溶解し、*N*-methyl morpholine (2529 mg, 25.0 mmol) 及び methyl chlorocarbonate (2363 mg, 25.0 mmol) を氷上で徐々に加えた後、0 °C で 30 分間攪拌した。その後室温に戻し、12 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルを用いて濾過し、濾液を減圧留去した。残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/1) を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィに付し、目的物 **7** を収量 2080 mg (53.6 %) で得た。APCI-MS m/z: 156 [M + H]⁺.

tert-Butyl (5-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)pentyl)carbamate (8)

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-1,5-diaminopentane (488 mg, 2.41 mmol) を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(10

mL)/1,4-ジオキサン(2.0 mL)混液に溶解し、氷上で化合物 **7** を徐々に加えた後、室温で2時間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧留去した。残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/2)を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィに付し、目的物 **8** を収量 251 mg (36.9 %) で得た。ESI-MS m/z : 283 $[M + H]^+$ 。

5-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)pentan-1-aminium chloride (**9**)

化合物 **8** (251 mg, 0.89 mmol) に 4 N 塩酸/酢酸エチル溶液を加え、緩やかに振とうした。その後、減圧留去し、目的物 **9** を収量 178 mg (91.9 %) で得た。ESI-MS m/z : 219 $[M + H]^+$ 。

N-[5-(Maleimidyl)pentyl]-4-[bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino]butanamide (**10**)

化合物 **5** (281 mg, 0.82 mmol) をアセトニトリル(7.0 mL)に溶解し、化合物 **9** (178 mg, 0.82 mmol) 及び *N,N*-diisopropylethylamine (210.9 mg, 1.63 mmol) を加えた後、室温で4時間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧留去した。残渣をクロロホルム/メタノール(10/1)を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィに付し、目的物 **10** を収量 264 mg (78.5 %) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 6.70 (s, 2H), 6.17 (s, 1H), 3.71 (s, 6H), 3.50–3.53 (m, 4H), 3.20 (dd, $J = 6.96, 13.33$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 6.38$ Hz, 2H), 2.27 (t, $J = 6.96$ Hz, 2H), 1.75–1.81 (m, 2H), 1.57–1.64 (m, 4H), 1.48–1.56 (m, 2H), 1.24–1.34 (m, 2H)。ESI-MS m/z : 412 $[M + H]^+$ 。

N-[(1*R*)-*N*-({2-[*N*-(5-{4-[Bis(2-methoxy-2-oxoethyl)amino]-1-oxobut-1-yl}amino)pentyl]succinimid-3-yl}thio)-1-carboxyethyl]carbamoyl-L-glutamic acid (**11**)

化合物 **10** (21 mg, 0.051 mmol) をアセトニトリル(0.60 mL)に溶解し、Cys-C(O)-Glu (16.5 mg, 0.056 mmol)水溶液(0.20 mL)へ加えた後、1 N 水酸化ナトリウム水溶液で pH 6.0 – 8.0 に調整し、室温で1時間攪拌した。反応後 HPLC を用いて精製した。カラムは YMC-Pack ODS-AQ 20-mm \times 250-mm を使用し、メタノール濃度 30% から開始して、勾配はクロマト開始後から 60 分にかけて 30% から 80% とし、流速 5.0 mL/min で行った。凍結乾燥を行い、目的物 **11** を収量 10.6 mg (29.4 %) で得た。¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ : 4.45 (d, $J = 4.58$ Hz, 1H), 4.17–4.23 (m, 5H), 3.94–4.00 (m, 1H), 3.75 (s, 6H), 3.41 (t, $J = 6.87$ Hz, 2H), 3.31 (t, $J = 7.16$ Hz, 2H), 3.16–3.25 (m, 1H), 3.13 (t, $J = 5.15$ Hz, 1H), 3.07 (t, $J = 6.87$ Hz, 2H), 2.96–3.01 (m, 1H), 2.60 (dq, $J = 18.90, 4.01$ Hz, 1H), 2.42 (t, $J = 7.16$ Hz, 2H), 2.35 (t, $J = 6.59$ Hz, 2H), 2.09 (td, $J = 13.60, 6.87$ Hz, 1H), 1.84–1.96 (m, 3H), 1.85–1.88 (m, 3H), 1.38–1.50 (m, 4H), 1.14–1.20 (m, 2H)。ESI-MS m/z : 706 $[M + H]^+$ 。

Re-TSCE (**12**)

化合物 **11** (3.5 mg, 0.0050 mmol) を超純水(0.45 mL)に溶解し、[Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ (0.050 mL) を加えた後、1 N 水酸化ナトリウム水溶液 pH 6.0 – 8.0 に調整した。17 bars (max), 300 W (max) のマイクロ波照射下で 110°C, 5 分間加熱した後、HPLC を用いて精製した。カラムは 5C₁₈-AR-II 4.6-mm \times 150-mm

を使用し、メタノール濃度 15%から開始して、勾配はクロマト開始後から 60 分にかけて 15%から 80%とし、流速 1.0 mL/min で行い、目的物 **12** を得た。ESI-MS m/z: 945 [M - H]⁻。

^{99m}Tc-TSCE (**13**)の放射化学合成

Na^{99m}TcO₄ (300 μL)をガラスバイアルに分取し、生理食塩水で 1.0 mL にメスアップ後、IsoLink kit for TricarbonylTM に全量を加えた。100°C で 10 分間加熱し、[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺を調整した後、化合物 **11** (0.50 mg, 0.71 μmol)が入ったバイアルに 1.0 mL 加えた。塩酸を用いて pH 6.0 – 8.0 に調整後、17 bars (max), 300 W (max)のマイクロ波照射下で 110°C, 5 分間加熱し、HPLC を用いて精製した。カラムは 5C₁₈-AR-II 4.6-mm × 150-mm を使用し、メタノール濃度 15%から開始して、勾配はクロマト開始後から 60 分にかけて 15%から 80%とし、流速 1.0 mL/min で行った。分取した溶液を Sep-pak C18 Light を用いてメタノールに溶媒置換し、アルゴンガスを用いて風乾した。

親水性の評価

逆相 HPLC の保持時間により ^{99m}Tc-TSCE の親水性を評価した。カラムは 5C₁₈-AR-II 4.6-mm × 150-mm を使用し、メタノール濃度 30%よりクロマトを開始し、勾配はクロマト開始後 10 分から 20 分にかけて 30%から 60%とし、流速 1.0 mL/min で行った。対照化合物として、¹²⁵I-IGLCE 及び ¹²⁵I-DCIT を既報の合成方法に従って合成し、同様の条件で親水性を評価した。

細胞培養

LNCaP 細胞及び PC-3 細胞の培養には 10% Fetal Bovine Serum (FBS)含有 Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)にグルタミン(1 mM), ペニシリン(100 U/mL), ストレプトマイシン(10 mg/mL)を混合した培地を使用し、37°C, 5% CO₂ 環境下にて培養した。

結合選択性評価

LNCaP 細胞(4 × 10⁵ cells/well)及び PC-3 細胞(4 × 10⁵ cells/well)を 12 ウェルプレートに播種し、CO₂ インキュベーター中で 48 時間培養した。培地を除去後、各ウェルを 500 μL のアッセイ用培地 (0.5% FBS 含有 RPMI 培地)で 2 回洗浄した。各ウェルに ^{99m}Tc-TSCE (74 kBq/mL)を加え、CO₂ インキュベーター中で 1 時間インキュベートした。非特異的結合は 1.0 mM の PSMA 阻害剤(2-PMPA)を加えて評価した。各ウェルを 500 μL のアッセイ用培地で 2 回洗浄後、0.2 N 水酸化ナトリウム水溶液で細胞を溶解させた。細胞に結合した放射能をガンマカウンターで計測し、タンパク質濃度で補正した。

結合親和性評価

LNCaP 細胞 (4×10^5 cells/well)を 12 ウェルプレートに播種し、CO₂インキュベーター中で 48 時間培養した。培地を除去後、各ウェルを 500 μ L のアッセイ用培地 (0.5% FBS 含有 RPMI 培地)で 2 回洗浄した。各ウェルに ^{99m}Tc-TSCE (74 kBq/mL)及び 2-PMPA (10 pM - 10 μ M)を加え、CO₂インキュベーター中で 1 時間インキュベートした。各ウェルを 500 μ L のアッセイ用培地で 2 回洗浄後、0.2 N 水酸化ナトリウム水溶液で細胞を溶解させた。細胞に結合した放射能をガンマカウンターで計測し、50%阻害濃度(IC₅₀ 値)を GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.)で算出した。対照化合物として、¹²⁵I-DCIT を用いて、^{99m}Tc-TSCE と同様の条件で親和性を評価した。

PCa 移植モデルマウス

動物実験は京都大学動物実験委員会での承認を受け、その指針を遵守して行った。培養した LNCaP 細胞及び PC-3 細胞は 2.5 g/L トリプシン・1 mM エチレンジアミン四酢酸で処理後、リン酸緩衝食塩水(PBS(-))で再懸濁し、細胞数を計数した。PBS(-) : BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix (1 : 1) で細胞懸濁液を調製し、マウスの右下肢に LNCaP 細胞を移植し($1-5 \times 10^6$ cells/mouse), 左下肢に PC-3 細胞を移植した($1-5 \times 10^6$ cells/mouse). PCa モデルマウスは癌病巣径が 5-10 mm まで成長した時点で実験に使用した。作製したモデルマウスの LNCaP 癌病巣及び PC-3 癌病巣における PSMA 発現の有無はウエスタンブロットにより確認した。癌組織を回収後、タンパク質分解酵素阻害剤含有細胞溶解液に懸濁し、12,000 \times g で 10 分間遠心した。上清を回収して 1 mg/mL にタンパク質濃度を調製後、laemmli sample buffer と混和し、100°C で 5 分間煮沸した。電気泳動は 5 - 20% Tris-HCl ゲルを用いて 20 mA/枚(電流固定)で 90 分間行った。その後、メタノールで 30 秒間親水化した PVDF 膜を用いて 100 V (電圧固定)で 1 時間ウエスタンブロットを行った。転写後、PVDF 膜は 5%スキムミルク含有 PBS-T (0.05% Tween20)で 1 時間ブロッキングし、抗 GCPII 抗体 (GCP-04: 1000 倍希釈)または抗 GAPDH 抗体(14C10: 1000 倍希釈)を加えて 16 時間インキュベートした。PBS-T で 5 分間洗浄を 3 回繰り返し、HRP 標識抗 mouse IgG1 抗体(2000 倍希釈)または HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体(2000 倍希釈)を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。5 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、化学発光検出試薬で検出した。

体内分布実験

生理食塩水に溶解させた ^{99m}Tc-TSCE (74 kBq/100 μ L) を、LNCaP 細胞と PC-3 細胞を移植した PCa 移植モデルマウスに尾静脈投与した。マウスは所定のタイムポイント(投与後 5 分, 30 分, 及び 120 分)において断頭屠殺した。血液を回収した後、組織を摘出して、質量と集積した放射能を測定し、組織への集積を評価した。阻害群には 2-PMPA (10 mg/kg weight)を共投与し、投与 120 分後における ^{99m}Tc-TSCE の体内分布を評価した。

小動物 SPECT/CT

LNCaP 細胞と PC-3 細胞を移植し PCa 移植モデルマウスをイソフルランで麻酔し，生理食塩水に溶解させた ^{99m}Tc -TSCE (9.45 MBq/0.3 mL)を尾静脈投与した．阻害群には 2-PMPA (10 mg/kg weight) を共投与した．投与後 30–64 分及び 120–154 分の間に SPECT 撮像を行った．SPECT 撮像には直径 1.0 mm, 焦点距離 9.0 mm のシングルピンホールコリメーターを使用し，エネルギー幅は ^{99m}Tc の 140 keV を中心に 20%に設定，回転半径 35 mm, 回転角度 360°, 投影時間 60 秒，投影回数 32 回にて行った．SPECT 撮像後に CT 撮像(空間分解能 50 μm , 管電圧 60 kV, 管電流 310 μA)を行った．SPECT の投影データは 3 次元 ordered-subset expectation maximization (OSEM)法による画像再構成を行い，CT の投影データはボクセルサイズ 0.177 \times 0.177 \times 0.177 mm³での 512 \times 512 \times 512 の画像行列として Feldkamp の再構成法による画像再構成を行った．3 次元データ解析視覚化用ソフトウェア AMIRA バージョン 5.1 (FEI Company)にて SPECT/CT の画像解析を行った．

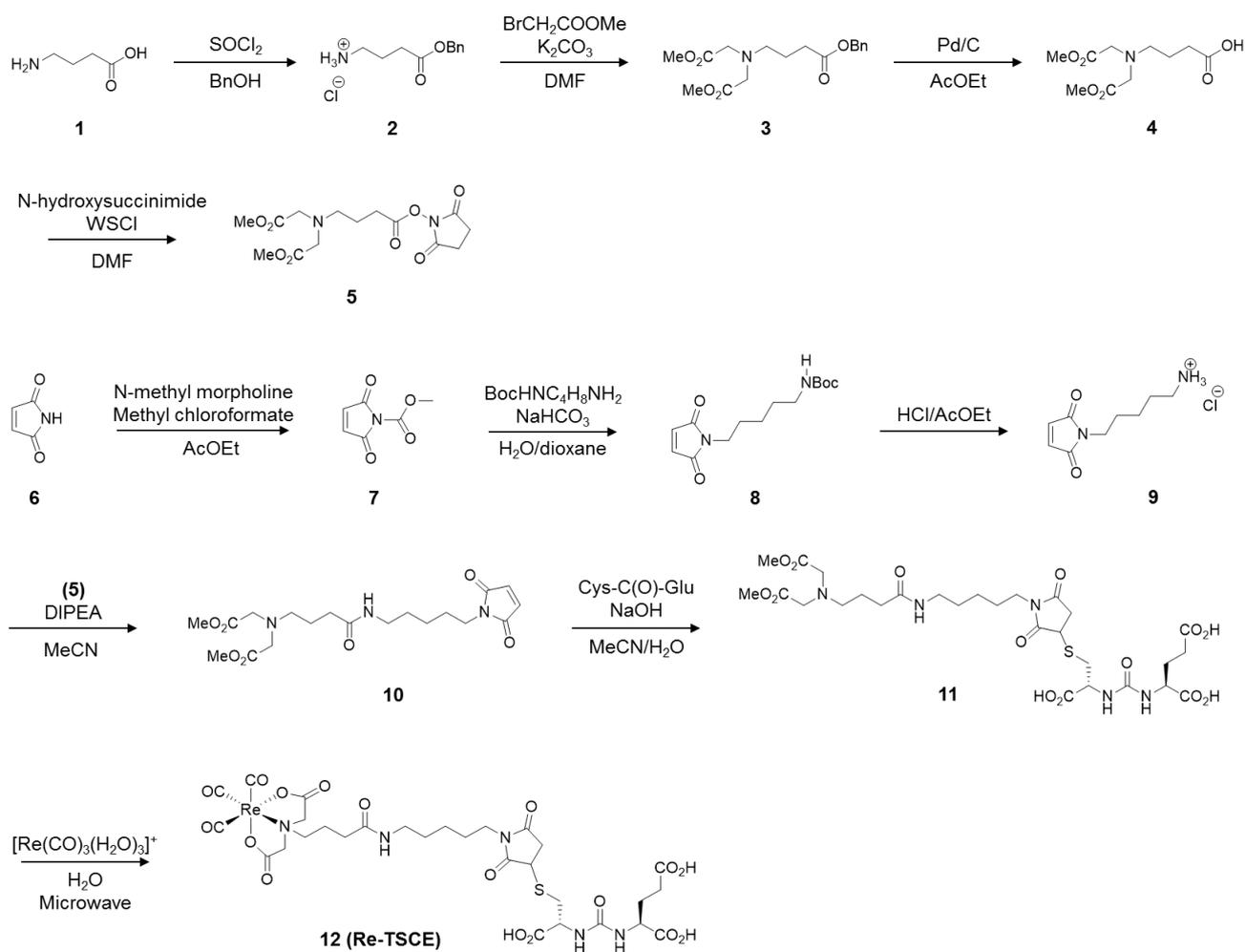
統計解析

統計解析には Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc.)を使用し，Mann-Whitney's U test または Bonfferoni multiple-comparison test にて $P < 0.05$ の場合に有意差ありとした．

結果及び考察

Re-TSCE 及び ^{99m}Tc -TSCE 標識前駆体の合成

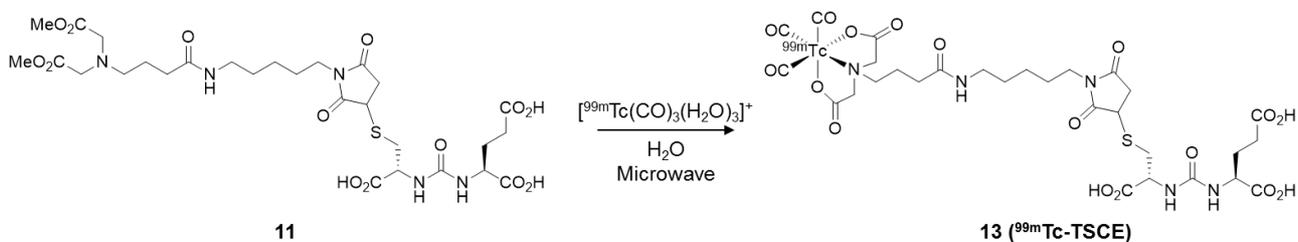
Scheme 1-1 に示した合成経路により, Re-TSCE を合成した. 4-amino-n-butyric acid を原料として 4 工程を経て化合物 **5** を総収率 23.8% で得た. 化合物 **6** を出発原料として, 3 工程を経て化合物 **9** を総収率 23.8% で得た. その後, 化合物 **5** と反応させることで化合物 **10** を 78.5% で得, さらに Cys-C(O)-Glu 母核と反応させることで ^{99m}Tc -TSCE 標識前駆体(化合物 **11**)を総収率 2.1% で得た. さらに, $[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ と反応させることで, Re-TSCE (化合物 **12**)を総収率 0.61% で得た.



Scheme 1-1. Synthetic route for Re-TSCE and precursor of ^{99m}Tc -TSCE.

^{99m}Tc-TSCE (13)の放射化学合成

Scheme 1-2 に ^{99m}Tc 標識経路を示す。Na^{99m}TcO₄ から IsoLink kit for Tricarbonyl™ を用いて調製した [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ を ^{99m}Tc 標識前駆体(化合物 11)に加え、マイクロウェーブを用いた 1 段階反応を行った。HPLC により精製し、^{99m}Tc-TSCE (化合物 13)を放射化学的収率 14%、放射化学的純度 98%以上で得た。



Scheme 1-2. Radiolabeling of ^{99m}Tc-TSCE.

親水性の評価

¹²⁵I-DCIT, ¹²⁵I-IGLCE, 及び ^{99m}Tc-TSCE の親水性を逆相 HPLC の保持時間(retention time: Rt)から評価した。その結果を Table 1-1 に示す。^{99m}Tc-TSCE は ¹²⁵I-DCIT と同程度の保持時間を示し、¹²⁵I-IGLCE に比べて短い保持時間を示したことから、^{99m}Tc-TSCE は ¹²⁵I-IGLCE に比べて親水性が向上したことが明らかとなった。

Table 1-1. Retention times of ¹²⁵I-DCIT, ¹²⁵I-IGLCE, and ^{99m}Tc-TSCE analysed by reverse phase HPLC.

Compound	Rt [min]
¹²⁵ I-DCIT	14.90
¹²⁵ I-IGLCE	23.03
^{99m} Tc-TSCE	13.64

結合選択性評価

^{99m}Tc -TSCE の PSMA に対する結合選択性を評価するために、PSMA 陽性細胞(LNCaP)及び PSMA 陰性細胞(PC-3)を用いて結合選択性を評価した。また、非特異的結合を評価するために、PSMA 阻害剤(2-PMPA)を加えて同様の検討を行った。その結果を Figure 1-3 に示す。PSMA は抗体や低分子などのリガンドが結合することで、PSMA-リガンド複合体がエンドサイトーシスにより細胞内へ内在化されることが知られている⁹。そこで、細胞に内在化された放射能を検出することにより評価した。 ^{99m}Tc -TSCE は PC-3 細胞への結合に比べ(0.30 %ID/mg protein), LNCaP 細胞に 10 倍以上高く結合(4.05 %ID/mg protein)し、また、2-PMPA の共添加により、LNCaP 細胞への結合は 0.49 %ID/mg protein まで阻害され、PC-3 細胞への結合は変化しなかった(0.33 %ID/mg protein)ことから、PSMA に特異的に結合している可能性が示された。

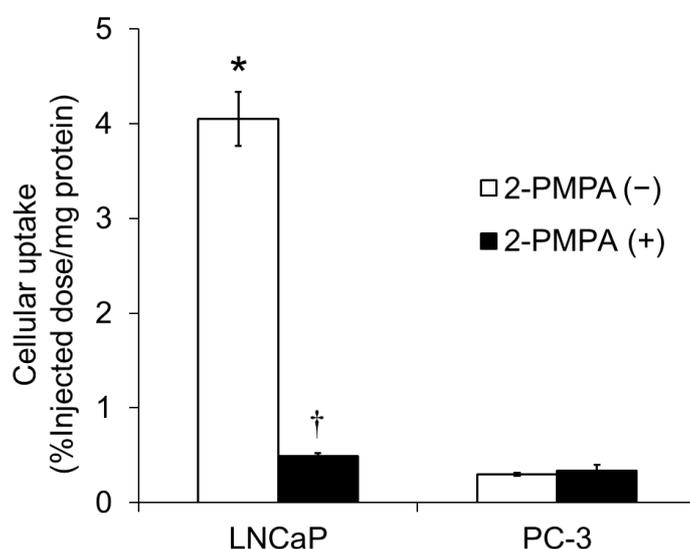


Figure 1-3. *In vitro* cellular uptake study. The internalization of ^{99m}Tc -TSCE into LNCaP (PSMA-positive) and PC-3 (PSMA-negative) cells after incubation with or without 2-PMPA was evaluated. Values are presented in units of % Injected dose/mg protein. * $P < 0.05$ vs PC-3 without 2-PMPA and † $P < 0.05$ vs LNCaP without 2-PMPA. (n=3)

結合親和性評価

^{99m}Tc -TSCE の PSMA に対する結合親和性を定量的に評価するために、PSMA 阻害剤である 2-PMPA を競合リガンドとし、LNCaP 細胞を用いて結合阻害実験を行った。また、 ^{125}I -DCIT を同様の条件で評価した。その結果を Figure 1-4 に示す。 ^{125}I -DCIT 及び ^{99m}Tc -TSCE の細胞における放射能が、2-PMPA の濃度依存的に低下したことから、 ^{125}I -DCIT 及び ^{99m}Tc -TSCE は PSMA に対して結合性を有することが示された。 ^{125}I -DCIT 及び ^{99m}Tc -TSCE に対する 2-PMPA の 50%阻害濃度(IC_{50})を算出したところ、 ^{99m}Tc -TSCE に対して 3.4 nM、 ^{125}I -DCIT に対して 0.080 nM であった。この結果は、 ^{99m}Tc -TSCE の PSMA への結合量を 50%阻害するためには、 ^{125}I -DCIT の PSMA への結合量を 50%阻害することに比べて、約 40 倍高い濃度の 2-PMPA が必要であることを示している。すなわち、 ^{99m}Tc -TSCE の PSMA への結合親和性は ^{125}I -DCIT に比べて高いことを示しており、 ^{99m}Tc -TSCE は PSMA イメージングプローブとして十分な結合親和性を有する可能性が示唆された。

^{99m}Tc -TSCE が、既存の PSMA を標的とした ^{125}I -DCIT に比べて高い結合親和性を示した理由として、 ^{125}I -DCIT の母核である tyrosine-urea-glutamate と比較して、SCE 骨格が PSMA に対してより高い親和性を有する可能性が考えられる。また、 ^{99m}Tc -TSCE のシグナル放出領域であるアニオン性 tricarbonyl 錯体、及びこれと SCE 骨格を繋ぐリンカー領域は PSMA への結合に寄与しないと考えられ³²⁻³⁴、 ^{99m}Tc を導入するために構造的にコンパクトな錯体を選択することで、SCE 骨格の PSMA に対する結合親和性への負の影響を抑えることができたことも一因として考えられるが³⁵、詳細な理由は明らかではない。

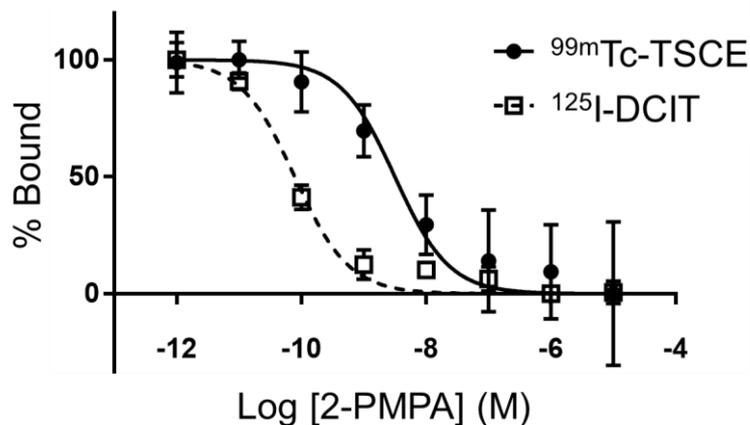


Figure 1-4. *In vitro* inhibition assay. Displacement curves of two radiolabeled probes, ^{99m}Tc -TSCE and ^{125}I -DCIT, in an inhibition assay based on the binding of 2-PMPA to PSMA. Values are shown as the means \pm standard errors of three independent experiments. (n=3)

PCa 移植モデルマウスの作製

LNCaP 細胞及び PC-3 細胞における PSMA の発現量をウエスタンブロットにより検討した。その後、C.B-17/Icr *scid/scid* Jcl マウスに LNCaP 細胞及び PC-3 細胞を移植し、癌組織径が 5–10 mm まで成長した時点で PSMA の発現量を検討した。その結果を Figure 1-5 に示す。LNCaP 細胞において、PSMA の発現が確認されたものの、PC-3 細胞においては確認されなかった。それぞれの細胞を移植した癌病巣においても、同様に、PSMA の発現は LNCaP 癌病巣でのみ認められた。

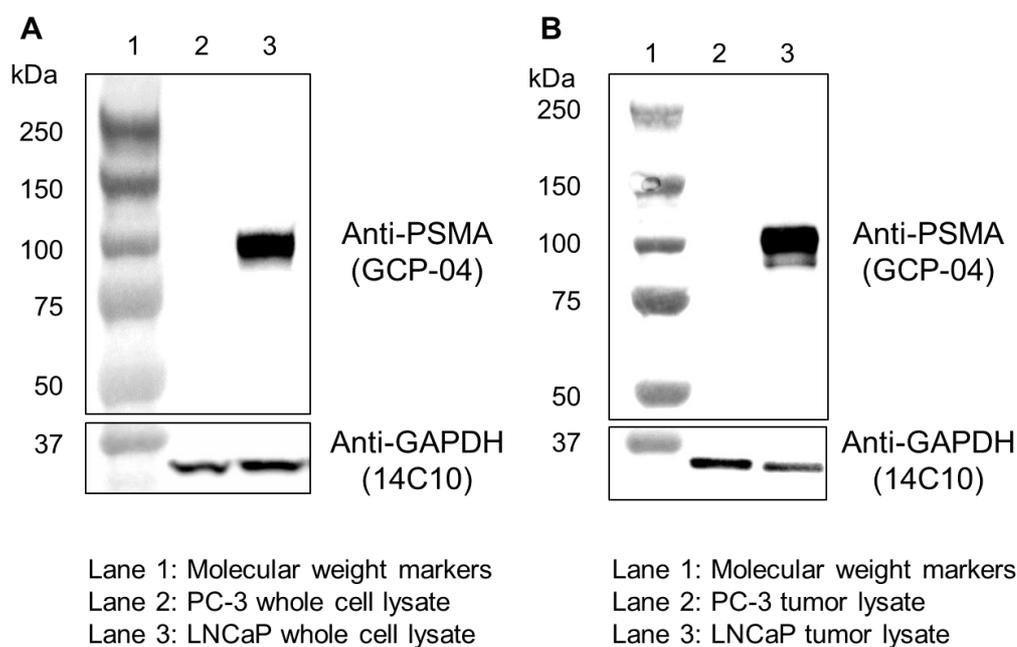


Figure 1-5. Western blotting of LNCaP and PC-3 cells (**A**) and tumors (**B**). PVDF membrane was incubated with anti-PSMA antibody (upper) and anti-GAPDH antibody (lower).

体内分布の評価

^{99m}Tc -TSCE の体内挙動を検討するために、LNCaP 細胞移植モデルマウスを用いて体内分布実験を行った。その結果を Table 1-2 に示す。また、生体内での PSMA への特異性を評価するために、2-PMPA を共投与した実験も行った(Figure 1-6)。

^{99m}Tc -TSCE は投与 30 分後に LNCaP 癌病巣に高く集積し(12.8 %ID/g), その後徐々に消失したが、投与 120 分後においても保持され(5.0 %ID/g), PSMA 陽性癌病巣への高い移行性が確認された。 ^{99m}Tc -TSCE の癌病巣への集積の PSMA 特異性を検討したところ、2-PMPA の共投与により投与 120 分後において有意に低下した(0.43 %ID/g)ことから、 ^{99m}Tc -TSCE は PSMA を標的として LNCaP 癌病巣に集積したことが示された。所期の通り、 ^{99m}Tc -TSCE の肝臓への集積は 5 分後(5.7 %ID/g)から 30 分後にかけて速やかな消失性を示し(2.3 %ID/g), 120 分後まで持続的に消失した(1.1 %ID/g)。一方、 ^{125}I -IGLCE は投与 30 分後から 60 分後まで肝臓からの消失は認められず(30 分 : 13.7 %ID/g, 60 分 : 13.9 %ID/g), 180 分後においても 9.0 %ID/g と高い集積を示している。したがって、 ^{99m}Tc -TSCE は、 ^{125}I -IGLCE と比較して肝臓からの消失性は改善されたと考えられる。また、腸においては、 ^{99m}Tc -TSCE の集積は投与 5 分後から 120 分後まで低い値を示し(30 分 : 2.3 %ID/g, 120 分 : 1.7 %ID/g), ^{125}I -IGLCE の、投与直後から 60 分後まで集積し、その後消失していく (60 分 : 16.5 %ID/g, 180 分 : 5.8 %ID/g) 性質と比較して、集積率及び消失性も改善された(Table 1-2)。さらに、 ^{99m}Tc -TSCE の肝臓及び腸への集積は 2-PMPA の共投与により影響を受けなかったことから、これらの臓器への集積は PSMA に対する特異的な結合によるものではないことが明らかとなった。以上の結果から、水溶性を向上させることにより、肝臓や腸などへの非特異的集積を低減させ、他臓器からの消失性も改善することに成功した。腎臓からのクリアランスに関しては、大きな改善は認められなかったものの、投与 180 分後まで集積量が増加し続ける ^{125}I -IGLCE (30 分 : 88.8 %ID/g, 60 分 : 92.8 %ID/g, 180 分 : 110 %ID/g, 540 分 : 97.1 %ID/g)に比べて、比較的早期にクリアランスされる傾向が観察された。 ^{99m}Tc -TSCE の腎臓への集積が高い原因として、腎臓で高度に発現している PSMA に結合して集積していることが示唆された⁸。

Table 1-2. Biodistribution of ^{99m}Tc-TSCE. All values are presented in units of %ID/g tissue. *Accumulation in the stomach is presented in units of %ID/tissue. Values are expressed as means ± standard deviations. Ratios are based on the %ID/g tissue values. (n=4)

%ID/g	5 min	30 min	120 min
Blood	11.4 ± 2.3	3.2 ± 0.5	0.6 ± 0.1
Heart	4.1 ± 1.1	1.7 ± 0.4	0.2 ± 0.0
Lung	9.6 ± 1.2	3.0 ± 0.3	0.4 ± 0.0
Liver	5.7 ± 1.0	2.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1
Kidney	124.9 ± 26.2	136.0 ± 6.4	56.8 ± 20.6
*Stomach	1.1 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.0
Intestine	3.3 ± 0.8	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.4
Spleen	15.9 ± 4.6	18.8 ± 4.6	4.9 ± 3.8
Pancreas	3.8 ± 1.0	1.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1
Muscle	1.5 ± 0.5	1.0 ± 0.6	0.3 ± 0.1
LNCaP	4.0 ± 1.2	12.8 ± 2.2	5.0 ± 2.7
LNCaP/Blood	0.4 ± 0.2	4.1 ± 1.3	8.3 ± 5.8
LNCaP/Muscle	3.0 ± 1.5	16.8 ± 10.5	14.4 ± 2.7
LNCaP/Liver	0.7 ± 0.3	5.6 ± 1.5	4.4 ± 2.4

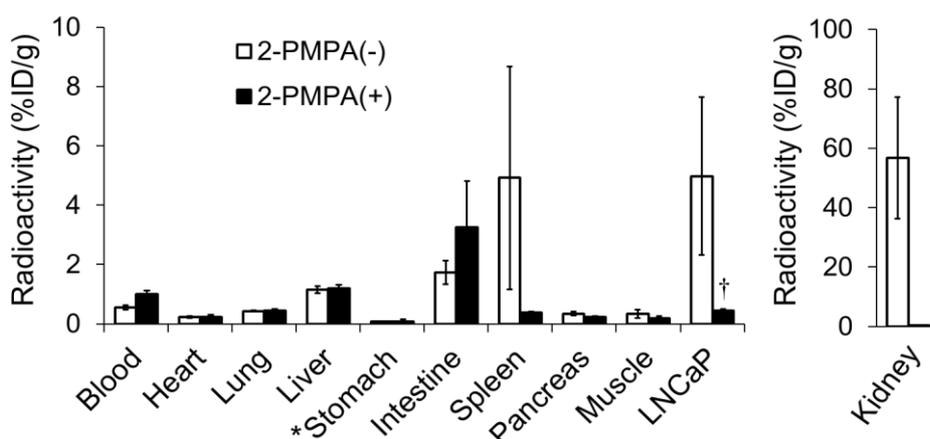


Figure 1-6. *In vivo* blocking study. All mice were sacrificed 120 min after injection. All values are presented in units of %ID/g tissue. *Accumulation in the stomach is presented in units of %ID/tissue. Values are expressed as means ± standard deviations. Ratios are based on the %ID/g tissue values. †*P* < 0.05 vs LNCaP with 2-PMPA (n=3)

小動物 SPECT/CT

^{99m}Tc -TSCE の体内動態を検討した結果、最も LNCaP 癌病巣への集積が高かったのは投与 30 分後であり、良好なイメージングの指標である癌/血液比が最も高かったのは投与 120 分後であった。癌/筋肉比及び癌/肝臓比は、投与後 30 分及び 120 分のどちらにおいても大きく変化しなかった。そこで、SPECT の撮像は投与後 30 分及び 120 分から実施した。その結果を Figure 1-7 に示す。投与 30 分後及び 120 分後のいずれにおいても、LNCaP 癌病巣を明瞭に描出し、PC-3 癌病巣は描出しなかった。さらに、腸や肝臓からの目立ったシグナルは観察されず、 ^{125}I -IGLCE で問題となっていた他臓器からの非特異的なシグナルを改善することに成功した。したがって、 ^{99m}Tc -TSCE を用いた SPECT 撮像により PSMA 陽性癌病巣と PSMA 陰性癌病巣の弁別が可能であることが明らかとなった。

過去の報告において、PSMA の発現量と PCa の悪性度には高い相関性があることが知られている¹⁰⁻¹³。これらの知見より、PSMA の発現を定量し得る ^{99m}Tc -TSCE を使用した SPECT 検査によって、PCa の悪性度を評価できる可能性が示された。

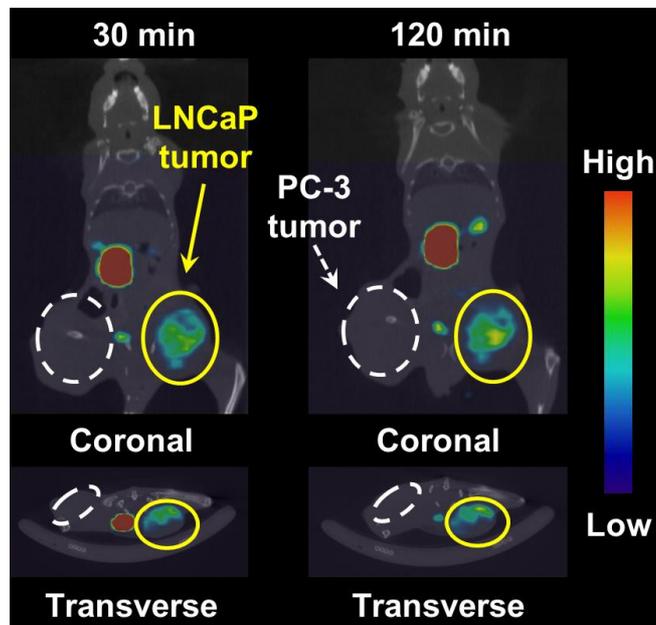


Figure 1-7. SPECT/CT images of ^{99m}Tc -TSCE. Coronal (upper) and transverse (lower) SPECT/CT images of ^{99m}Tc -TSCE distribution were obtained at 30 and 120 min after injection.

小括

本章において、既存の PSMA に親和性を有する化合物で問題とされている肝臓や小腸への非特異的集積を改善することを目的として、PSMA に高親和性を有する SCE 骨格を基盤とした ^{99m}Tc 標識化合物を開発し、新規 SPECT 用 PSMA イメージングプローブとしての有用性を評価し、以下に述べる結果を得た。

- (1) アニオン性 ^{99m}Tc -tricarbonyl 錯体を導入した新規 SCE 誘導体(^{99m}Tc -TSCE)を合成した。
- (2) 逆相 HPLC を用いた検討の結果、 ^{99m}Tc -TSCE は ^{123}I -IGLCE に比べて高い水溶性を示した。
- (3) LNCaP 細胞及び PC-3 細胞を用いた *in vitro* 結合選択性評価の結果、 ^{99m}Tc -TSCE は PSMA を発現する LNCaP 細胞にのみ結合して内在化され、PSMA を発現しない PC-3 細胞には結合せず、PSMA に対する高い結合選択性を示した。
- (4) LNCaP 細胞を用いた結合親和性評価の結果、 ^{99m}Tc -TSCE は PSMA イメージングプローブとして十分な結合親和性を示した。
- (5) PCa 移植モデルマウスを用いた体内放射能分布実験において、 ^{99m}Tc -TSCE は LNCaP 癌病巣に高く集積し、PSMA 阻害剤である 2-PMPA を共投与したところ集積が低下し、*in vivo* において PSMA への高い結合特異性を示した。また、肝臓への集積は低く、腸からの速やかな消失性も認められた。
- (6) PCa 移植モデルマウスを用いた SPECT/CT イメージングの結果、 ^{99m}Tc -TSCE は LNCaP 癌病巣を明瞭に描出し、PC-3 癌病巣との弁別にも成功した。

以上の結果より、 ^{99m}Tc -TSCE は、PSMA を標的とした SPECT 用 PCa イメージングプローブとして有効であり、PCa の悪性度評価に利用できる可能性が示された。

第2章 近赤外蛍光イメージング用 PSMA イメージングプローブとしての SCE 誘導体の開発

背景

PCa の治療法として最も広く行われている外科的前立腺全摘除術において、根治的治療後の再発率が高いことが問題となっている³⁶。手術による前立腺全摘除を施した患者の 20%から 30%の患者に PSA 値の再上昇(PSA 再発)が見られ、この現象は最大で 60%にも達するとされており、その後、画像診断により癌の存在が確認された時点では、転移を伴っている可能性が非常に高いことが報告されている³⁷⁻⁴⁰。この臨床的再発の大きなリスク要因の一つとして、術中の腫瘍細胞の不完全な切除による腫瘍の残存、すなわち、切除断端陽性(positive surgical margins: PSM)が知られており、PSM を防止する新たな方策が求められている⁴¹⁻⁴⁶。このような状況の下、近年、新たな概念として「標的化局所治療法」が注目を集めている^{47,48}。これは、患者の寿命に影響し得る悪性度の高い癌を標的化し、局所的に切除または治療することで、健常組織は温存することにより、手術後の合併症を可能な限り防止する低侵襲性の治療法である。しかしながら、手術中に PCa のみを検出・標的化する手法は未だ確立されておらず、手術中に癌病巣のみを標的化可能な方法の開発が求められている。この手術中に癌病巣を標的化・可視化する方法として、リアルタイムに明視野との融合画像が取得可能で、放射線により被爆しないため安全性の高い光イメージング法の利用が期待されている⁴⁹。特に、自家蛍光が少なく、組織透過性に優れる 650 – 900 nm の近赤外(nar-infrared: NIR)領域の蛍光を利用した NIR 蛍光イメージング法の利用が望まれている⁵⁰。

第1章では、PSMA を標的とした SPECT 用新規イメージングプローブとして ^{99m}Tc-TSCE を開発し、その有用性を示した。そして、SCE 骨格を基盤とした PSMA イメージングプローブの開発戦略が、¹²³I 標識化合物に限らず、臨床上汎用される ^{99m}Tc を有するプローブ開発にも有望であることを見出した。そこで、本章においては、SCE 骨格を基盤とした開発戦略を NIR 蛍光イメージングに用いるプローブの開発へと応用することを試みた。そこで、本章においては、SCE 骨格を基盤とした開発戦略を NIR 蛍光イメージングに用いるプローブの開発へと応用することを試みた。具体的には、SCE 骨格へ、NIR 蛍光色素として既に臨床応用もされており、高い安全性が報告されている IRDye 800CW⁵¹を導入することで、新規 SCE 誘導体を設計・合成し(Figure 2-1)、NIR 蛍光イメージングに用いる PCa イメージングプローブとしての有用性を評価した。

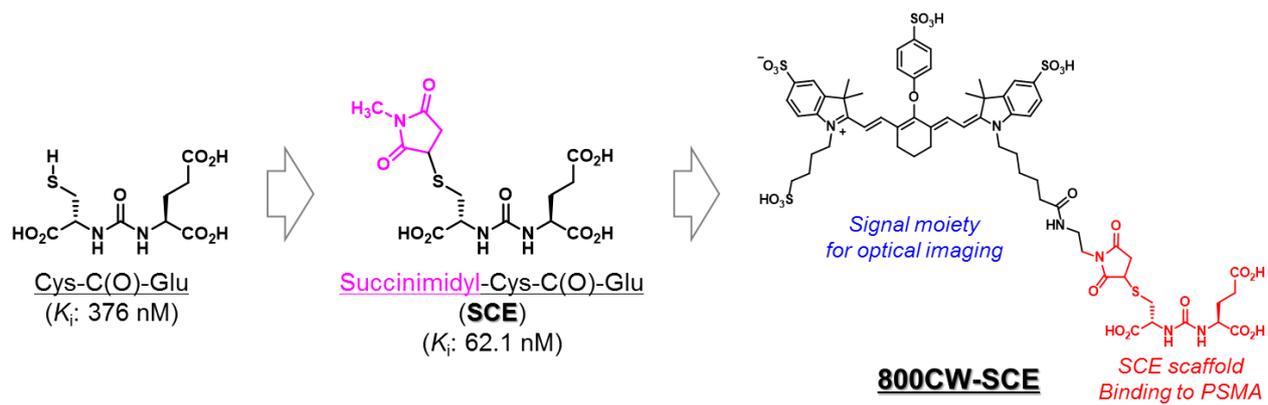


Figure 2-1. Design strategy for novel IRDye 800CW-labeled PSMA targeting probe.

実験方法

試薬・機器

第1章と同じ試薬・機器を使用し、新たに使用したものについては以下に示す。トリエチルアンモニウム酢酸緩衝液は和光純薬株式会社より購入し、IRDye 800CW-Maleimide はリコーバイオサイエンス株式会社より購入した。蛍光特性は株式会社島津製作所製 RF-6000 を使用して測定した。蛍光イメージングにはパーキンエルマー社製 IVIS Spectrum を使用した。細胞の観察にはオリンパス株式会社製 IX 81N-ZDC-IMAGE を使用した。

合成(800CW-SCE)

Cys-C(O)-Glu (0.53 mg, 1.80 μmol)を超純水(30 μL)に溶解し、1 N 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH 6.0 – 8.0 に調製した。ジメチルスルホキシド(40 μL)に溶解した IRDye 800CW-Maleimide (0.70 mg, 0.60 μmol)を加えた後、室温で 15 分間攪拌した。反応後 HPLC を用いて精製した。カラムは 5C₁₈-AR-II 4.6-mm \times 250-mm を使用し、溶媒にはトリエチルアンモニウム酢酸緩衝液(10 mM, pH 7.0)及びメタノールを用いた。メタノール濃度 5%から開始して、勾配はクロマト開始 5 分後から 45 分にかけて 5%から 100%とし、流速 1 mL/min で行った。凍結乾燥を行い、800CW-SCE を収量 0.75 mg (85.6 %)で得た。ESI-MS m/z: 1418.3 [M – H]⁻。

蛍光特性の評価

800CW-SCE 及び IRDye 800CW-Maleimide をメタノールに溶解し、RF-6000 を用いて、37°C で極大励起波長、極大蛍光波長、及び蛍光量子収率を測定した。蛍光量子収率は、ICG ($\Phi = 0.016$)⁵²を標準試料として使用し、730 nm の波長で励起し、650 – 900 nm の蛍光波長領域を分析した。

細胞培養

第一章と同様の方法を用いて行った。

細胞内在化実験

800CW-SCE 及び IRDye 800CW-Maleimide の PSMA に対する結合選択性を、LNCaP 細胞及び PC-3 細胞を用いた細胞内在化実験により評価した。LNCaP 細胞(5×10^5 cells/well)及び PC-3 細胞 (5×10^5 cells/well)を 12 ウェルプレートに播種し、CO₂ インキュベーター中で 24 時間培養した。培地を除去後、各ウェルを 1 mL のアッセイ用培地(0.5% FBS 含有 RPMI 培地)で 1 回洗浄した。各ウェルにアッセイ用培地(1 mL)で溶解した評価化合物(5 nmol)を加え、CO₂ インキュベーター中で 3 時間インキュベートした。非特異的結合は 2-PMPA (100 μM)を加えて評価した。各ウェルを 1 mL のアッセイ用培地で 3 回洗浄後、Hoechst 33342 (5000 倍希釈)含有リン酸緩衝液を加え、室温で 10 分間インキュベートした。溶液を除去後、4%パラホルムアルデヒド含有リン酸緩衝液 (500 μL)を加え、IX

81N-ZDC-IMAGE を用いて観察した。

PCa モデルマウス

CB17/Icr-Prkdc^{scid}/CrjCrlj マウスはオリエンタルバイオ社より購入した。動物実験は京都大学動物実験委員会での承認を受けて、その指針を遵守して行った。培養した LNCaP 細胞及び PC-3 細胞の移植は、第一章と同様の方法を用いて行った。

生体イメージング実験

IVIS Spectrum を用いて生体イメージングを行った。LNCaP 細胞及び PC-3 細胞を移植した PCa 移植モデルマウスをイソフルランで麻酔し、PBS に溶解させた 800CW-SCE (10 nmol/100 μ L) を尾静脈投与した。投与後 24 時間まで継時的に蛍光撮像を行った(励起: 745 nm, 蛍光: 800 nm, 露光時間 1 秒)。LNCaP 癌病巣及び PC-3 癌病巣に関心領域(ROI)を設定し、各 ROI における蛍光強度を継時的に算出した。化合物の体内分布を評価するため、投与後 12 時間及び 24 時間に撮像後、断頭屠殺し、組織を摘出した。IVIS Spectrum で各臓器を撮像した後、LNCaP 癌病巣及び PC-3 癌病巣に ROI を設定し、蛍光強度を算出した。その後、蛍光強度を、測定した組織重量で補正した。生体内における PSMA 特異性を評価するため、*in vivo* 阻害実験を行った。800CW-SCE 及び 2-PMPA (10 μ mol) を共投与し、投与後継時的に体内分布を評価し、投与後 24 時間に撮像後、断頭屠殺し、組織を摘出した。摘出した組織を上記と同様の方法で評価した。また、反応前の蛍光色素のみを投与し、上記と同様の方法で評価した。

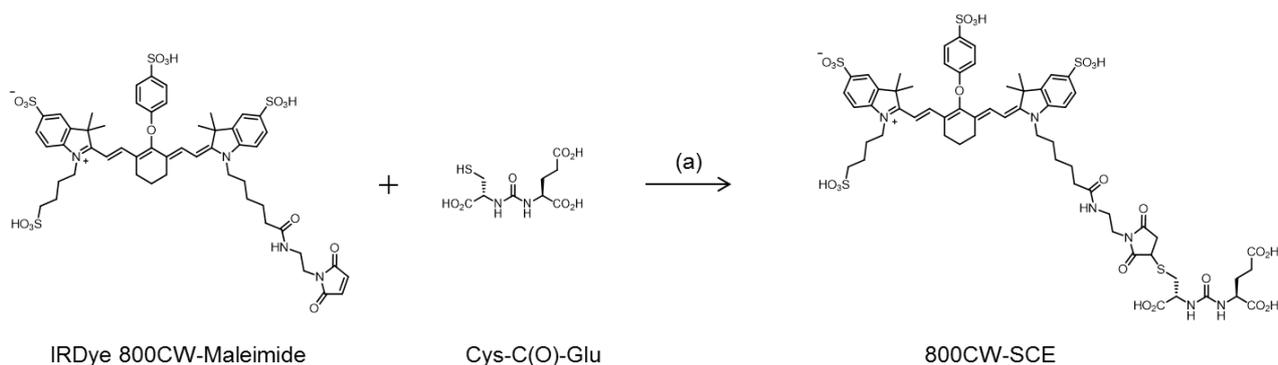
統計解析

第一章と同様の方法を用いて行った。

結果及び考察

800CW-SCE の合成

Scheme 2-1 に示した合成経路により, IRDye 800CW のマレイミド基と Cys-C(O)-Glu 母核のチオール基の共役求核付加反応を利用して 800CW-SCE を合成した. 800CW-SCE の保持時間を検討したところ, 26.16 分にピークが検出され, 未反応の IRDye 800CW-Maleimide の保持時間が 29.40 分であったことから NIR 蛍光色素と完全に分離できたと考えられる. また, SCE 骨格を導入することにより, NIR 蛍光色素の水溶性がわずかに向上したことが示唆された(Figure 2-2).



Scheme 2-1. Conjugation of Cys-C(O)-Glu with NIR fluorophores. (a) NaOH, H₂O, DMSO, pH 7.0, 86%.

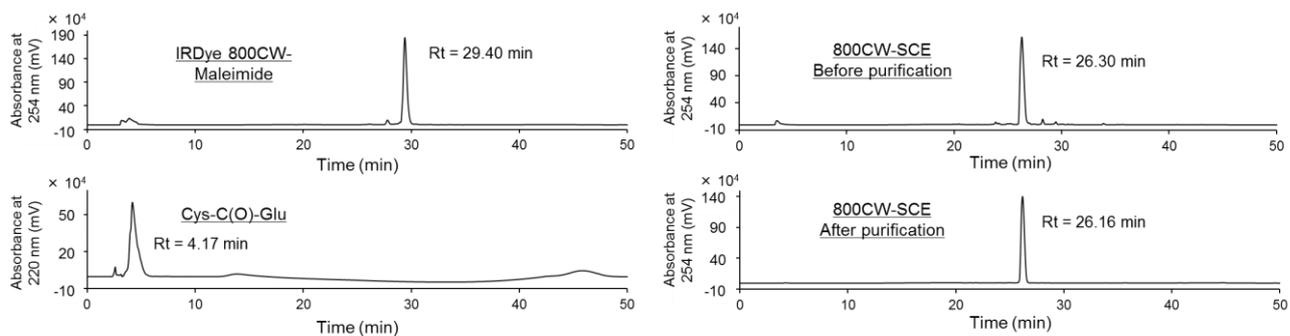


Figure 2-2. HPLC analyses of IRDye 800CW-Maleimide, Cys-C(O)-Glu, and before and after purification of 800CW-SCE under same conditions.

蛍光特性の評価

800CW-SCE 及び IRDye 800CW-Maleimide を用いて蛍光特性を評価した。その結果を Table 2-1 に示す。800CW-SCE の極大励起波長，極大蛍光波長，及び蛍光量子収率は，IRDye 800CW-Maleimide の値と比べて同等であり，蛍光色素への Cys-C(O)-Glu 母核の導入は，蛍光特性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

Table 2-1. Optical properties of IRDye 800CW-conjugate.

Compound	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)	Quantum yield (Φ)
IRDye 800CW-Maleimide	778	796	0.024
800CW-SCE	775	800	0.025

細胞内在化実験

800CW-SCE 及び IRDye 800CW-Maleimide の PSMA に対する結合選択性を評価するために、PC-3 細胞及び LNCaP 細胞を用いて細胞内在化能を検討した。また、PSMA に対する結合特異性を評価するために、2-PMPA を共添加した検討も行った。その結果を Figure 2-3 及び Figure 2-4 に示す。800CW-SCE は、LNCaP 細胞に内在化され、細胞膜表面及び細胞内から NIR 蛍光シグナルが観察され、PC-3 細胞からは蛍光シグナルは観察されなかったことから、LNCaP 細胞選択的に結合・内在化されることが示された(Figure 2-3)。一方、IRDye 800CW-Maleimide は、2-PMPA の有無にかかわらず、いずれの細胞からも NIR 蛍光シグナルは観察されなかった(Figure 2-4)。したがって、800CW-SCE が PSMA に対する結合特異性を示すために、SCE 骨格が重要である可能性が示された。

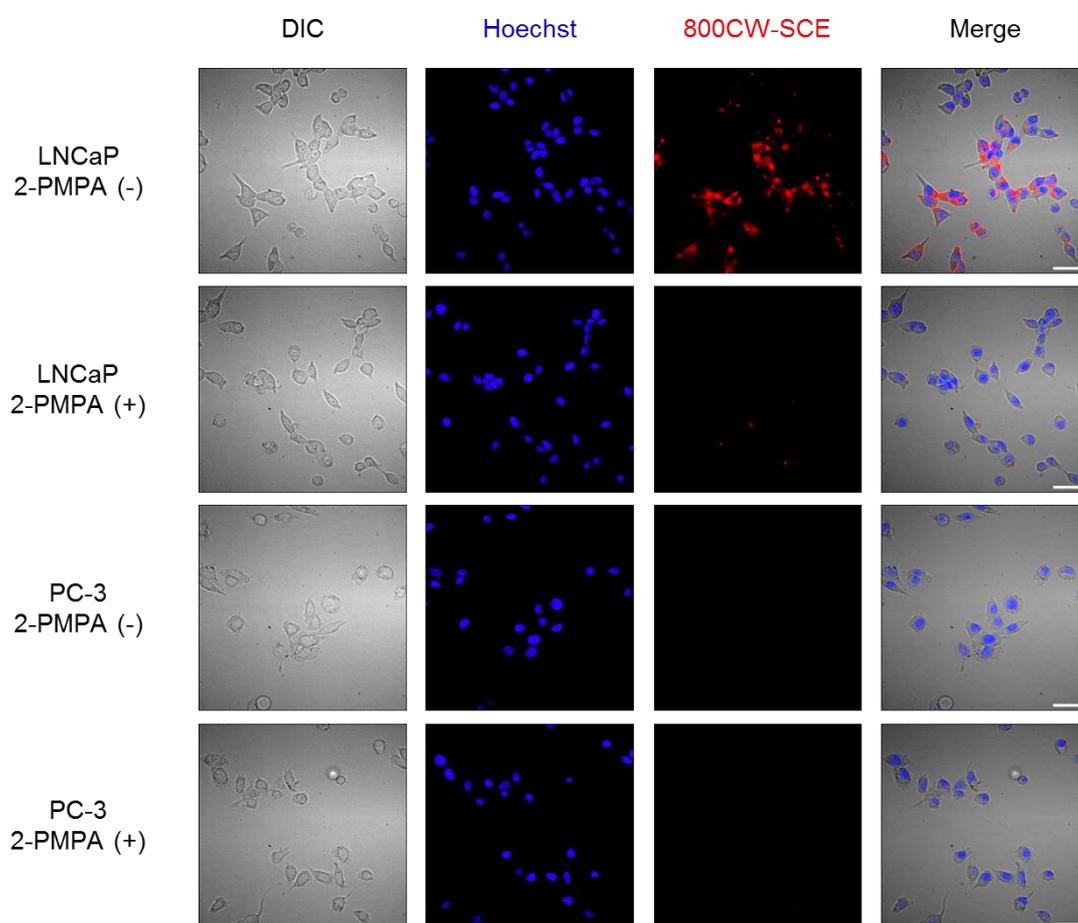


Figure 2-3. *In vitro* cellular uptake study. The uptake of 800CW-SCE into each cell after incubation with or without 2-PMPA was evaluated. Representative images of differential interference contrast (DIC) (left), Hoechst 33342 (left-middle), NIR-fluorescence (right-middle), and merge data (right) are shown. Bar = 50 μ m.

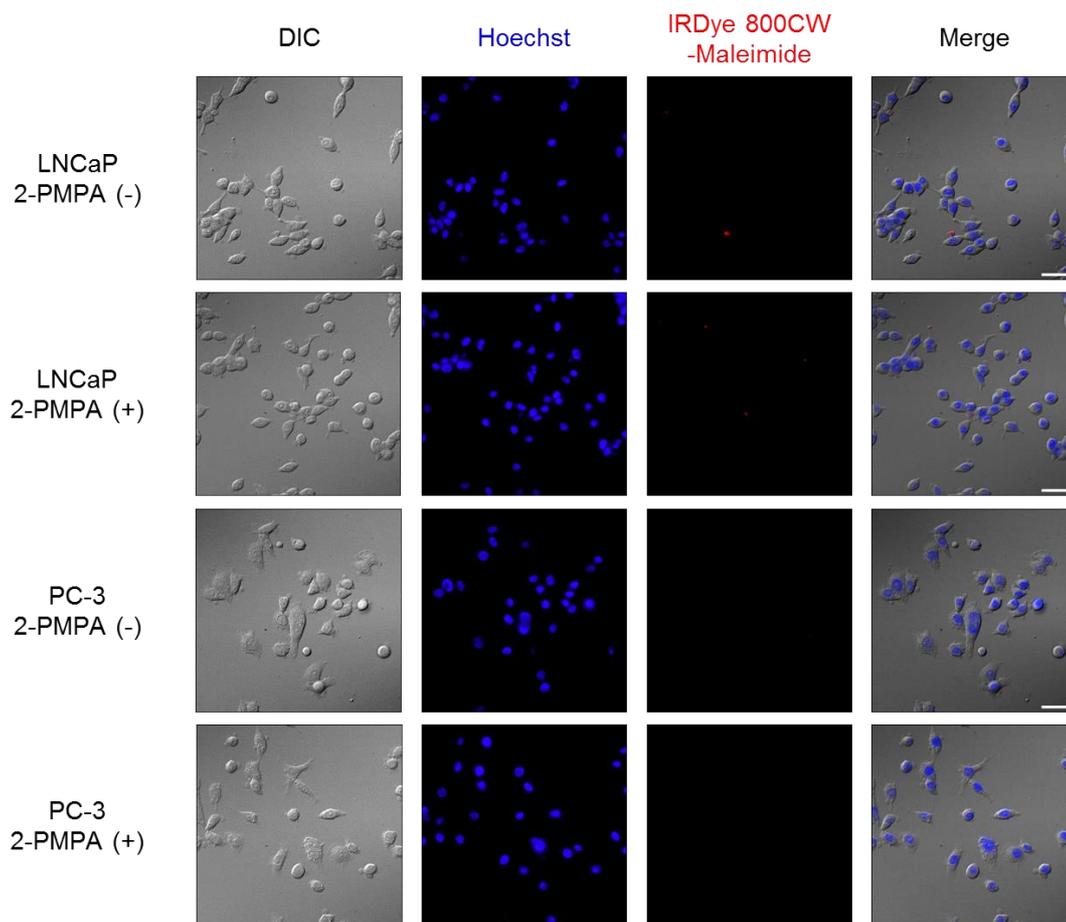


Figure 2-4. *In vitro* cellular uptake study. The uptake of IRDye 800CW-Maleimide into each cell after incubation with or without 2-PMPA was evaluated. Representative images of differential interference contrast (DIC) (left), Hoechst 33342 (left-middle), NIR-fluorescence (right-middle), and merge data (right) are shown. Bar = 50 μ m.

生体イメージング

800CW-SCE を用いて、生体外から非侵襲的に PSMA 陽性癌病巣を検出することが可能か検討するため、生体イメージングを行った。また、投与 12 時間後及び 24 時間後に臓器を摘出し、*ex vivo* での撮像を行い、癌病巣への集積量を定量的に評価した。その結果を Figure 2-5 及び Figure 2-6 に示す。800CW-SCE は、投与後全身に移行し、徐々に消失したものの 4 時間後までは特定臓器への集積は認められず、LNCaP 癌病巣及び PC-3 癌病巣間での集積量の差は認められなかった(LNCaP_{4h} = 13.7×10^8 , PC-3_{4h} = 11.7×10^8)。投与 8 時間後以降、PC-3 癌病巣からは継時的な消失性を示したものの、LNCaP 癌病巣への集積は長く保持され、投与 12 時間後及び 24 時間後には高い LNCaP/PC-3 比(Ratio of LNCaP/PC-3_{24h} = 2.77)を示し、LNCaP 癌病巣を明瞭に描出した(LNCaP_{24h} = 5.44×10^8 , PC-3_{24h} = 2.05×10^8) (Figure 2-5A)。LNCaP 癌病巣への集積が PSMA 選択的であるか検討するため、2-PMPA を共投与した検討も行った。2-PMPA 共投与群は非投与群と同様、投与 4 時間後まで全身からシグナルを検出し、投与 12 時間後まで徐々に消失し、この時点で癌病巣へのわずかな集積が確認できた。この集積は長い時間保持されず、投与 24 時間後には LNCaP 癌病巣及び PC-3 癌病巣の両者において、目立った集積は確認されなかった(LNCaP_{24h} = 2.28×10^8 , PC-3_{24h} = 2.17×10^8) (Figure 2-5B-a and B-c)。したがって、800CW-SCE は、LNCaP 癌病巣を PSMA 特異的かつ明瞭に描出し、PC-3 癌病巣との弁別が可能であることが明らかとなった。

摘出した癌組織を *ex vivo* で撮像し、組織重量で補正したところ、800CW-SCE の LNCaP 癌病巣への集積は PC-3 癌病巣への集積と比較して、投与 12 時間後において 3.27 倍、投与 24 時間後には 3.89 倍も高いことが示され、この結果は生体イメージングの結果と一致した(Figure 2-6C and 6D)。また、LNCaP 癌病巣への高い集積は、2-PMPA の共投与により投与 12 時間後及び 24 時間後において阻害され、PSMA に対する選択的な集積であることも明らかとなった。投与 12 時間後の時点では、胃、腸及び肝臓など腹腔内臓器からの蛍光シグナルがわずかに確認されたものの、2-PMPA により抑制されなかったことから、消失過程にある非特異的な集積であることが示された(Figure 2-6A)。これらの臓器への非特異的な集積は、投与 24 時間には大幅に低下し、800CW-SCE は 24 時間後までに非特異的組織から消失するのに十分な性能を有していることが明らかとなった(Figure 2-6B)。マウスの腎臓は PSMA を高度に発現する臓器として報告されており、腎臓への集積は、投与 12 時間及び 24 時間後において有意に抑制されたことから、PSMA への特異的な結合を反映したものであると考えられる。

開発した 800CW-SCE は、PSMA 陽性癌病巣を体外から明瞭に描出したことから、手術中においても同癌病巣を明確に検出可能であることが示唆された。さらに、筋肉や他臓器に対して高い集積比を示したことから、手術中に良好なコントラストの画像を取得できる可能性も示された。

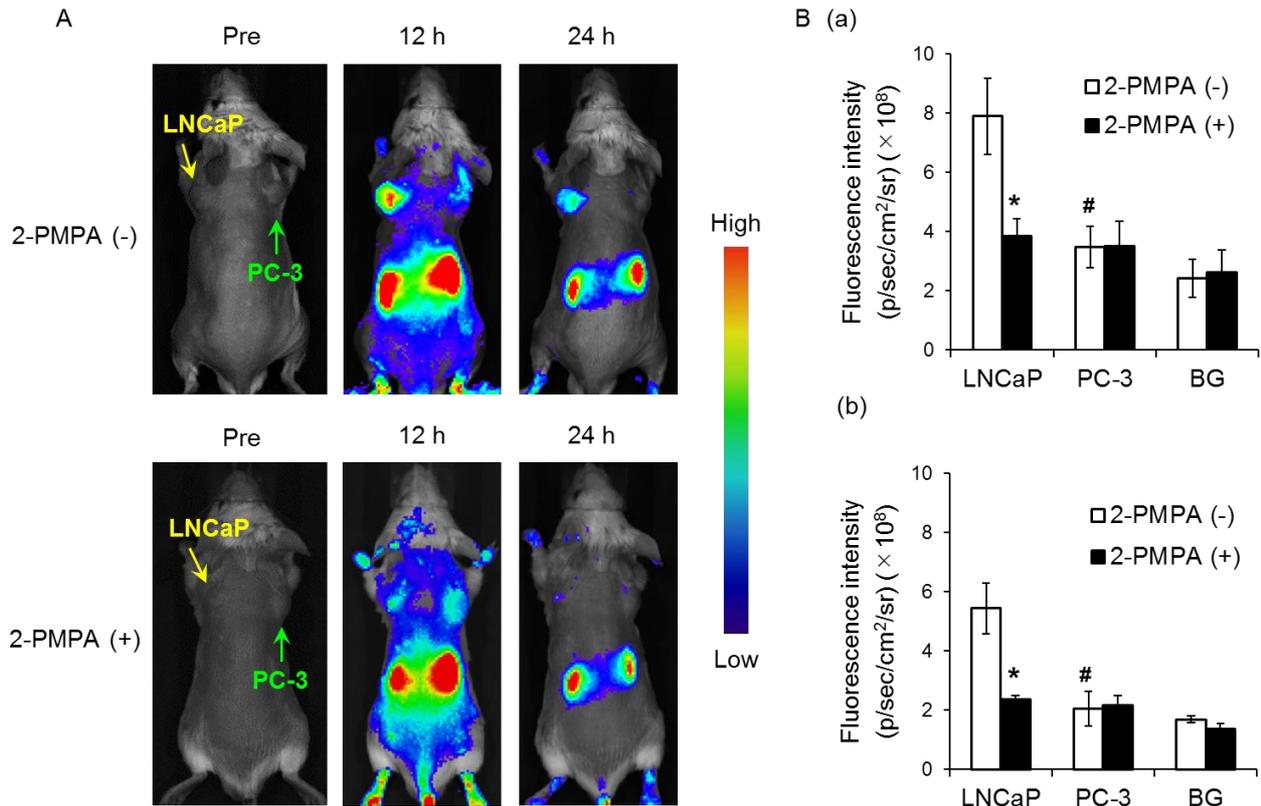


Figure 2-5. *In vivo* imaging of 800CW-SCE. (A) *In vivo* images of mice with or without 2-PMPA. Representative images are shown of $n = 4$ or 5 . (B) Quantification of 800CW-SCE in LNCaP tumors, PC-3 tumors, and background (BG) from the mice used in A at 12 (a) and 24 h (b) after intravenous administration. Values represent mean \pm SD of 4 animals. (* $P < 0.05$ vs LNCaP without 2-PMPA; # $P < 0.05$ vs LNCaP without 2-PMPA).

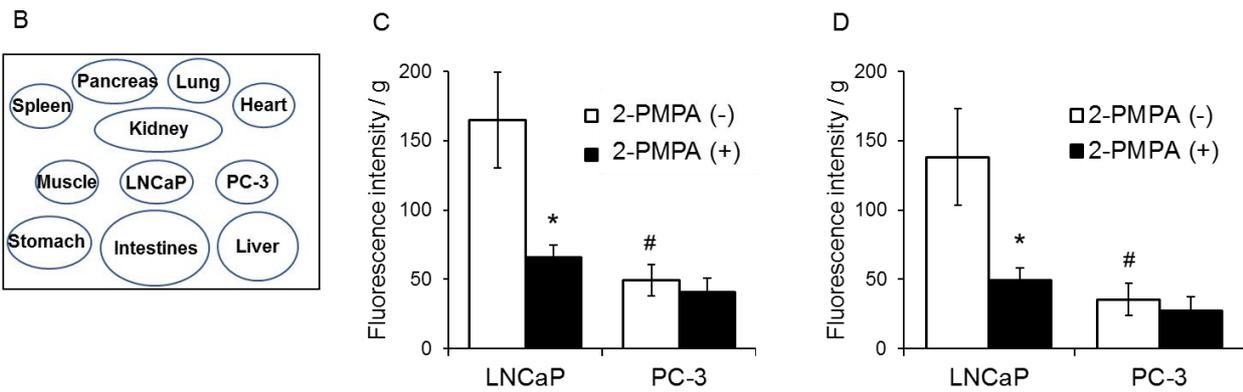
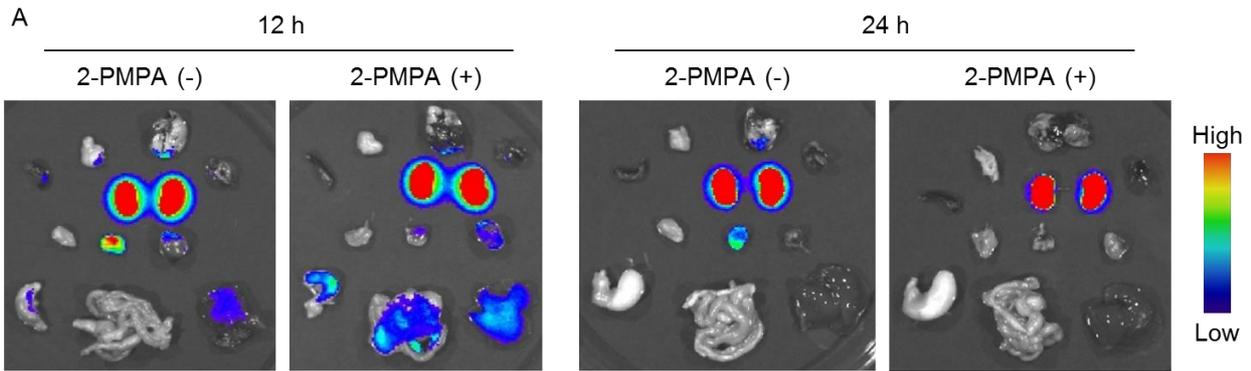


Figure 2-6. *Ex vivo* imaging of 800CW-SCE. (A and B) Representative images are shown of $n = 4$ or 5 . The fluorescent signal in LNCaP tumors was significantly higher than in PC-3 tumors at 12 (C) and 24 h (D) after administration of 800CW-SCE. Values represent mean \pm SD of 4 animals. (* $P < 0.05$ vs LNCaP without 2-PMPA; # $P < 0.05$ vs LNCaP without 2-PMPA).

小括

本章において、NIR 蛍光イメージング法に適した PSMA 標的分子イメージングプローブの開発を目的として、PSMA に高親和性を有する SCE 骨格を基盤としてシアニン系の NIR 蛍光色素を導入する戦略により新規 SCE 誘導体(800CW-SCE)を開発し、その有用性に関する評価を行い、以下に述べる結果を得た。

- (1) IRDye 800CW を導入した新規 SCE 誘導体(800CW-SCE)を合成した。
- (2) LNCaP 細胞または PC-3 細胞を用いた結合特異性評価の結果、800CW-SCE は、LNCaP 細胞に PSMA 特異的に結合・内在化された。
- (3) PCa 移植モデルマウスを用いた生体イメージングの結果、800CW-SCE は、LNCaP 癌病巣を明瞭かつ PSMA 特異的に描出し、PC-3 癌病巣に対する LNCaP 癌病巣への高い集積比を示した。
- (4) 800CW-SCE は、LNCaP 癌病巣以外の他の臓器への目立った集積は確認されず、非標的臓器からの速やかな消失性を示した。

以上の結果より、800CW-SCE は、PSMA を標的とした NIR 蛍光イメージングに用いる PCa イメージングプローブとして有効である可能性が示された。

引用文献

1. Fitzmaurice, C. *et al.*, Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, **3**, 524-548 (2017).
2. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, **68**, 7-30 (2018).
3. Kratochwil, C.; Afshar-Oromieh, A.; Kopka, K.; Haberkorn, U.; Giesel, F. L., Current Status of Prostate-Specific Membrane Antigen Targeting in Nuclear Medicine: Clinical Translation of Chelator Containing Prostate-Specific Membrane Antigen Ligands into Diagnostics and Therapy for Prostate Cancer. *Semin Nucl Med*, **46**, 405-418 (2016).
4. Shariat, S. F.; Scardino, P. T.; Lilja, H., Screening for prostate cancer: an update. *Can J Urol*, **15**, 4363-4374 (2008).
5. Suardi, N.; Gandaglia, G.; Gallina, A.; Di Trapani, E.; Scattoni, V.; Vizziello, D.; Cucchiara, V.; Bertini, R.; Colombo, R.; Picchio, M.; Giovacchini, G.; Montorsi, F.; Briganti, A., Long-term outcomes of salvage lymph node dissection for clinically recurrent prostate cancer: results of a single-institution series with a minimum follow-up of 5 years. *Eur Urol*, **67**, 299-309 (2015).
6. Abdollah, F.; Briganti, A.; Montorsi, F.; Stenzl, A.; Stief, C.; Tombal, B.; Van Poppel, H.; Touijer, K., Contemporary role of salvage lymphadenectomy in patients with recurrence following radical prostatectomy. *Eur Urol*, **67**, 839-849 (2015).
7. Kosuri, S.; Akhtar, N. H.; Smith, M.; Osborne, J. R.; Tagawa, S. T., Review of salvage therapy for biochemically recurrent prostate cancer: the role of imaging and rationale for systemic salvage targeted anti-prostate-specific membrane antigen radioimmunotherapy. *Adv Urol*, **2012**, 921674 (2012).
8. Barinka, C.; Rojas, C.; Slusher, B.; Pomper, M., Glutamate carboxypeptidase II in diagnosis and treatment of neurologic disorders and prostate cancer. *Curr Med Chem*, **19**, 856-870 (2012).
9. Davis, M. I.; Bennett, M. J.; Thomas, L. M.; Bjorkman, P. J., Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5981-5986 (2005).
10. Sokoloff, R. L.; Norton, K. C.; Gasior, C. L.; Marker, K. M.; Grauer, L. S., A dual-monoclonal sandwich assay for prostate-specific membrane antigen: levels in tissues, seminal fluid and urine. *Prostate*, **43**, 150-157 (2000).
11. Silver, D. A.; Pellicer, I.; Fair, W. R.; Heston, W. D.; Cordon-Cardo, C., Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clin Cancer Res*, **3**, 81-85 (1997).
12. Ross, J. S.; Sheehan, C. E.; Fisher, H. A.; Kaufman, R. P., Jr.; Kaur, P.; Gray, K.; Webb, I.; Gray, G. S.; Mosher, R.; Kallakury, B. V., Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **9**, 6357-6362 (2003).
13. Wright, G. L., Jr.; Grob, B. M.; Haley, C.; Grossman, K.; Newhall, K.; Petrylak, D.; Troyer, J.; Konchuba,

- A.; Schellhammer, P. F.; Moriarty, R., Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology*, **48**, 326-334 (1996).
14. Sweat, S. D.; Pacelli, A.; Murphy, G. P.; Bostwick, D. G., Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Urology*, **52**, 637-640 (1998).
 15. Kiess, A. P.; Banerjee, S. R.; Mease, R. C.; Rowe, S. P.; Rao, A.; Foss, C. A.; Chen, Y.; Yang, X.; Cho, S. Y.; Nimmagadda, S.; Pomper, M. G., Prostate-specific membrane antigen as a target for cancer imaging and therapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, **59**, 241-268 (2015).
 16. von Eyben, F. E.; Picchio, M.; von Eyben, R.; Rhee, H.; Bauman, G., ⁶⁸Ga-Labeled Prostate-specific Membrane Antigen Ligand Positron Emission Tomography/Computed Tomography for Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol Focus* (2016). pii: S2405-4569(16)30160-2. doi: 10.1016/j.euf.2016.11.002.
 17. Maurer, T.; Eiber, M.; Schwaiger, M.; Gschwend, J. E., Current use of PSMA-PET in prostate cancer management. *Nat Rev Urol*, **13**, 226-235 (2016).
 18. Afshar-Oromieh, A.; Babich, J. W.; Kratochwil, C.; Giesel, F. L.; Eisenhut, M.; Kopka, K.; Haberkorn, U., The Rise of PSMA Ligands for Diagnosis and Therapy of Prostate Cancer. *J Nucl Med*, **57 Suppl 3**, 79S-89S (2016).
 19. Gourni, E.; Henriksen, G., Metal-Based PSMA Radioligands. *Molecules*, **22**, (2017). pii: E523. doi: 10.3390/molecules22040523.
 20. Kluba, C. A.; Mindt, T. L., Click-to-Chelate: development of technetium and rhenium-tricarbonyl labeled radiopharmaceuticals. *Molecules*, **18**, 3206-3226 (2013).
 21. Jackson, P. F.; Cole, D. C.; Slusher, B. S.; Stetz, S. L.; Ross, L. E.; Donzanti, B. A.; Trainor, D. A., Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase. *J Med Chem*, **39**, 619-622 (1996).
 22. Slusher, B. S.; Vornov, J. J.; Thomas, A. G.; Hurn, P. D.; Harukuni, I.; Bhardwaj, A.; Traystman, R. J.; Robinson, M. B.; Britton, P.; Lu, X. C.; Tortella, F. C.; Wozniak, K. M.; Yudkoff, M.; Potter, B. M.; Jackson, P. F., Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury. *Nat Med*, **5**, 1396-1402 (1999).
 23. Graham, K.; Lesche, R.; Gromov, A. V.; Bohnke, N.; Schafer, M.; Hassfeld, J.; Dinkelborg, L.; Kettschau, G., Radiofluorinated derivatives of 2-(phosphonomethyl)pentanedioic acid as inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) for the imaging of prostate cancer. *J Med Chem*, **55**, 9510-9520 (2012).
 24. Kozikowski, A. P.; Zhang, J.; Nan, F.; Petukhov, P. A.; Grajkowska, E.; Wroblewski, J. T.; Yamamoto, T.; Bzdega, T.; Wroblewska, B.; Neale, J. H., Synthesis of urea-based inhibitors as active site probes of glutamate carboxypeptidase II: efficacy as analgesic agents. *J Med Chem*, **47**, 1729-1738 (2004).
 25. Barinka, C.; Byun, Y.; Dusich, C. L.; Banerjee, S. R.; Chen, Y.; Castanares, M.; Kozikowski, A. P.; Mease,

- R. C.; Pomper, M. G.; Lubkowski, J., Interactions between human glutamate carboxypeptidase II and urea-based inhibitors: structural characterization. *J Med Chem*, **51**, 7737-7743 (2008).
26. Harada, N.; Kimura, H.; Ono, M.; Saji, H., Preparation of asymmetric urea derivatives that target prostate-specific membrane antigen for SPECT imaging. *J Med Chem*, **56**, 7890-7901 (2013).
 27. Gartrell, B. A.; Saad, F., Managing bone metastases and reducing skeletal related events in prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, **11**, 335-345 (2014).
 28. Dokic, D. D., [Technetium-99m radiopharmaceuticals for in vivo diagnostics]. *Med Pregl*, **58**, 180-184 (2005).
 29. Kimura, H.; Mori, D.; Harada, N.; Ono, M.; Ohmomo, Y.; Kajimoto, T.; Kawashima, H.; Saji, H., Microwave-assisted synthesis of organometallic complexes of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ and $\text{Re}(\text{CO})_3$: its application to radiopharmaceuticals. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **60**, 79-85 (2012).
 30. Lipowska, M.; Klenc, J.; Jarkas, N.; Marzilli, L. G.; Taylor, A. T., Monoanionic ^{99m}Tc -tricarbonyl-aminopolycarboxylate complexes with uncharged pendant groups: Radiosynthesis and evaluation as potential renal tubular tracers. *Nucl Med Biol*, **47**, 48-55 (2017).
 31. Hillier, S. M.; Maresca, K. P.; Lu, G.; Merkin, R. D.; Marquis, J. C.; Zimmerman, C. N.; Eckelman, W. C.; Joyal, J. L.; Babich, J. W., ^{99m}Tc -labeled small-molecule inhibitors of prostate-specific membrane antigen for molecular imaging of prostate cancer. *J Nucl Med*, **54**, 1369-1376 (2013).
 32. Ray Banerjee, S.; Pullambhatla, M.; Foss, C. A.; Falk, A.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Mease, R. C.; Pomper, M. G., Effect of chelators on the pharmacokinetics of ^{99m}Tc -labeled imaging agents for the prostate-specific membrane antigen (PSMA). *J Med Chem*, **56**, 6108-6121 (2013).
 33. Foss, C. A.; Mease, R. C.; Fan, H.; Wang, Y.; Ravert, H. T.; Dannals, R. F.; Olszewski, R. T.; Heston, W. D.; Kozikowski, A. P.; Pomper, M. G., Radiolabeled small-molecule ligands for prostate-specific membrane antigen: in vivo imaging in experimental models of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **11**, 4022-4028 (2005).
 34. Banerjee, S. R.; Foss, C. A.; Castanares, M.; Mease, R. C.; Byun, Y.; Fox, J. J.; Hilton, J.; Lupold, S. E.; Kozikowski, A. P.; Pomper, M. G., Synthesis and evaluation of technetium-99m- and rhenium-labeled inhibitors of the prostate-specific membrane antigen (PSMA). *J Med Chem*, **51**, 4504-4517 (2008).
 35. Mesters, J. R.; Barinka, C.; Li, W.; Tsukamoto, T.; Majer, P.; Slusher, B. S.; Konvalinka, J.; Hilgenfeld, R., Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer. *Embo J*, **25**, 1375-1384 (2006).
 36. Bianco, F. J., Jr.; Scardino, P. T.; Eastham, J. A., Radical prostatectomy: long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function ("trifecta"). *Urology*, **66 Suppl 5**, 83-94 (2005).
 37. Freedland, S. J.; Presti, J. C., Jr.; Amling, C. L.; Kane, C. J.; Aronson, W. J.; Dorey, F.; Terris, M. K., Time trends in biochemical recurrence after radical prostatectomy: results of the SEARCH database. *Urology*, **61**, 736-741 (2003).

38. Khuntia, D.; Reddy, C. A.; Mahadevan, A.; Klein, E. A.; Kupelian, P. A., Recurrence-free survival rates after external-beam radiotherapy for patients with clinical T1-T3 prostate carcinoma in the prostate-specific antigen era: what should we expect? *Cancer*, **100**, 1283-1292 (2004).
39. Kessler, B.; Albertsen, P., The natural history of prostate cancer. *Urol Clin North Am*, **30**, 219-226 (2003).
40. Carroll, P., Rising PSA after a radical treatment. *Eur Urol*, **40 Suppl 2**, 9-16 (2001).
41. Eastham, J.; Tokuda, Y.; Scardino, P., Trends in radical prostatectomy. *Int J Urol*, **16**, 151-160 (2009).
42. Hull, G. W.; Rabbani, F.; Abbas, F.; Wheeler, T. M.; Kattan, M. W.; Scardino, P. T., Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol*, **167**, 528-534 (2002).
43. D'Amico, A. V.; Whittington, R.; Malkowicz, S. B.; Cote, K.; Loffredo, M.; Schultz, D.; Chen, M. H.; Tomaszewski, J. E.; Renshaw, A. A.; Wein, A.; Richie, J. P., Biochemical outcome after radical prostatectomy or external beam radiation therapy for patients with clinically localized prostate carcinoma in the prostate specific antigen era. *Cancer*, **95**, 281-286 (2002).
44. D'Amico, A. V.; Whittington, R.; Malkowicz, S. B.; Schultz, D.; Blank, K.; Broderick, G. A.; Tomaszewski, J. E.; Renshaw, A. A.; Kaplan, I.; Beard, C. J.; Wein, A., Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Jama*, **280**, 969-974 (1998).
45. Heidenreich, A.; Bastian, P. J.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Joniau, S.; van der Kwast, T.; Mason, M.; Matveev, V.; Wiegel, T.; Zattoni, F.; Mottet, N., EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol*, **65**, 124-137 (2014).
46. Heidenreich, A.; Bastian, P. J.; Bellmunt, J.; Bolla, M.; Joniau, S.; van der Kwast, T.; Mason, M.; Matveev, V.; Wiegel, T.; Zattoni, F.; Mottet, N., EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. *Eur Urol*, **65**, 467-479 (2014).
47. Bostwick, D. G.; Waters, D. J.; Farley, E. R.; Meiers, I.; Rukstalis, D.; Cavanaugh, W. A.; Ragde, H.; Dineen, M. K.; Bahn, D.; Scionti, S.; Babian, R.; Ellis, D. S.; Rewcastle, J. C.; Burke, H. B.; Andriole, G. L.; Onik, G.; Barqawi, A. E.; Maksem, J.; Barzell, W. E., Group consensus reports from the Consensus Conference on Focal Treatment of Prostatic Carcinoma, Celebration, Florida, February 24, 2006. *Urology*, **70 Suppl 6**, 42-44 (2007).
48. Eggener, S. E.; Scardino, P. T.; Carroll, P. R.; Zelefsky, M. J.; Sartor, O.; Hricak, H.; Wheeler, T. M.; Fine, S. W.; Trachtenberg, J.; Rubin, M. A.; Otori, M.; Kuroiwa, K.; Rossignol, M.; Abenhaim, L., Focal therapy for localized prostate cancer: a critical appraisal of rationale and modalities. *J Urol*, **178**, 2260-2267 (2007).
49. Gibbs, S. L., Near infrared fluorescence for image-guided surgery. *Quant Imaging Med Surg*, **2**, 177-187 (2012).
50. Haque, A.; Faizi, M. S. H.; Rather, J. A.; Khan, M. S., Next generation NIR fluorophores for tumor imaging and fluorescence-guided surgery: A review. *Bioorg Med Chem*, **25**, 2017-2034 (2017).

51. Marshall, M. V.; Draney, D.; Sevick-Muraca, E. M.; Olive, D. M., Single-dose intravenous toxicity study of IRDye 800CW in Sprague-Dawley rats. *Mol Imaging Biol*, **12**, 583-594 (2010).
52. Sevick-Muraca, E. M.; Lopez, G.; Reynolds, J. S.; Troy, T. L.; Hutchinson, C. L., Fluorescence and absorption contrast mechanisms for biomedical optical imaging using frequency-domain techniques. *Photochem Photobiol*, **66**, 55-64 (1997).