質量イメージングによる低酸素領域集積性ニトロイミダゾール薬剤の集積機序の解明

志水 陽一

Accumulation Mechanism of 2-Nitroimidazole-based Hypoxia Imaging Probes Revealed by Imaging Mass Spectrometry

Yoichi Shimizu

Department of Radiology, Kyoto University Hospital; 54 Shogoinkawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.

(Received July 1, 2018)

Hypoxia in tumor tissues plays a pivotal role in tumor progression and angiogenesis, and is associated with cancer therapeutic resistance. For the diagnosis of hypoxia, non-invasive imaging techniques, especially positron emission tomography (PET) with 2-nitroimidazole-based probes, are used, since 2-nitroimidazole-based probes are considered to undergo reductive metabolism on their 2-nitroimidazole moiety and become trapped in hypoxic cells. However, the detailed mechanism of their accumulation remains unclear because of the difficulty in estimating the metabolites by radioisotopic analysis. Imaging mass spectrometry (IMS) can distinguish the distribution patterns of the drug and its metabolites. To clarify the accumulation mechanism of 2-nitroimidazole-based probes in hypoxic cells, we evaluated [^{18}F] fluoromisonidazole (FMISO), a 2-nitroimidazole-based PET probe, in combination with radioisotopic analysis and IMS. We found that the glutathione conjugate of reduced FMISO (amino-FMISO-GS) was the main FMISO metabolite, and was specifically distributed in the hypoxic regions of tumors. The same phenomenon was observed when we examined another 2-nitroimidazole-based probe, pimonidazole. The *in vitro* cellular uptake study revealed that FMISO accumulation in hypoxic cells depends on the cell type. In those cells exhibiting higher FMISO uptake, the reactive glutathione level and enzyme (glutathione *S*-transferase; GST) activity catalyzing the glutathione conjugation reaction was significantly higher, whereas the expression level of the efflux transporter (multidrug resistance-associated protein 1; MRP1) was significantly lower. Our study suggests that 2-nitroimidazole-based probes accumulate in hypoxic cells *via* glutathione conjugation following reductive metabolism, which depends not only on the glutathione conjugation capacity of the cells but also on hypoxic conditions.

Key words—hypoxia; 2-nitroimidazole; imaging mass spectrometry; positron emission tomography

1. はじめに

固形腫瘍内において、がん細胞の増殖亢進による血管形成の遅延に伴い酸素供給の低下した領域、“低酸素領域”が形成されることが知られている。¹⁾ 低酸素領域は腫瘍の悪性化、薬物及び放射線治療に対する抵抗性に関与することから、腫瘍内における本領域部位の存在及び局在を同定することは、腫瘍の悪性度鑑別及び放射線治療部位の決定・効果予測等の指標として有効であると考えられている。²⁾ がん組織内の低酸素領域を同定する手法として、特定の分子の分布を非侵襲的に体外から可視化できる分

子イメージング技術、特に放射性同位元素 (β^+ 線放出核種, γ 線放出核種) を標識した薬剤を用いた *in vivo* 分子イメージング手法である陽電子放射断層撮像法 (positron emission tomography; PET) や単一光子放射断層撮影 (single photon emission computed tomography; SPECT) などの核医学イメージング法が注目されている。³⁾ 核医学イメージング法による低酸素領域の同定には主に 2-nitroimidazole を母体骨格に有する F-18 (β^+ 線放出核種) 標識イメージング剤が用いられており、中でも [^{18}F] fluoromisonidazole ([^{18}F] FMISO) は現在様々な研究に用いられており、臨床応用が進んでいる (Fig. 1).³⁾ 2-Nitroimidazole を母体骨格に有するイメージング剤は細胞内に受動拡散等により移行した後、細胞内のニトロレダクターゼ等により 2-nitroimidazole 環のニトロ基が還元されることが知られ

京都大学医学部附属病院放射線部 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54)

e-mail: yoichis@kuhp.kyoto-u.ac.jp

本総説は、平成 29 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (医療系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Chemical Structures of 2-Nitroimidazole Based Compounds

A: [^{18}F]FMISO, B: pimonidazole.

ている。通常酸素環境下においては、細胞内に存在する酸素により再酸化され、元の化学形態に戻り、再び細胞外に排泄されるが、低酸素環境下ではこの再酸化反応が抑制されることにより還元反応がさらに進行し、最終的に生体内高分子と共有結合することにより、細胞内に滞留し、低酸素領域を描出していると考えられてきた。⁴⁾ しながら、組織内における放射能分布評価に用いられているオートラジオグラフィ（autoradiography; ARG）法や PET イメージング法など放射性同位元素を用いた従来の分析手法では、投与された放射性同位元素に由来する放射能の空間的分布を評価する手法であるため、得られた画像から化合物の化学形態を区別することは極めて困難であった。そのため、実際にどのような [^{18}F] FMISO 代謝物が低酸素領域の描出に関与しているかについて評価することは極めて難しく、その詳細な集積メカニズムは明らかとされていなかった。

ところで、質量分析法は分子の質量を分析する手法であり、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析装置（Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry; FTICR-MS）など高質量分解能で分析可能な質量分析装置を用いて薬剤の代謝物などを同定する研究が盛んに行われている。⁵⁾ さらに近年、この質量分析法に基づく新たな分子イメージング手法として質量分析イメージング法（imaging mass spectrometry; IMS）が開発されてきた。⁶⁾ IMS は組織切片上における分子の分布を質量情報に基づき直接可視化できることから、脂質などの内因性生体分子や薬物や薬物代謝物など様々な分子の分布評価に用いられている。^{7,8)} IMS は、薬物代謝領域で従来用いられてきている放射性同位元素を用いた分析手法とは異なり、測定対象分子に特異的な分子プローブを必要とせず、一度の測定で複数の分子の分布を同時に評価することが可能であり、薬物及びその代謝物の分布をそれぞれ選択的に

可視化することができる。⁹⁾

本稿では、質量分析、特に IMS 技術と放射性同位元素を用いる核医学イメージング手法とを融合することにより、腫瘍内低酸素領域における 2-nitroimidazole を母体骨格に有する低酸素イメージング剤（FMISO 及び pimonidazole）の化学形態及びその分布を評価し、本イメージング剤の低酸素領域への集積メカニズムの解明を試みた研究成果について紹介する。

2. PET 診断用低酸素イメージング剤“FMISO”の低酸素環境下組織内における代謝物評価¹⁰⁾

まず、固形腫瘍低酸素領域に集積した [^{18}F] FMISO の化学形態を評価するため、[^{18}F] FMISO (270–430 MBq, 550 mg/kg) を投与した FaDu ヒト頭頸部がん細胞移植 Balb/c ノードマウスの腫瘍組織を投与 4 時間後に摘出し、腫瘍ホモジネートを作製した後、メタノール抽出法により生体内高分子への共有結合割合を評価した。その結果、腫瘍組織における高分子画分の放射能存在割合は $32.2 \pm 4.0\%$ であり、従来の想定とは異なり、⁴⁾ 投与した FMISO の過半数が低分子画分に存在することを見出した。そこで抽出した腫瘍ホモジネート低分子画分について、ラジオ高速液体クロマトグラフィー（radio-HPLC）法により [^{18}F] FMISO 由来成分を分析したところ、FMISO 及び 2-nitroimidazole 骨格のニトロ基がアミノ基に還元された FMISO 代謝物（amino-FMISO）をそれぞれ存在比約 20%、約 5% で検出したことに加え、未知の化学形態を有する画分を存在比約 45% で検出した。このことより、[^{18}F] FMISO を投与したマウスにおける腫瘍内の放射能分布像はこの未知の化学形態を有する画分の分布を強く反映している可能性が示唆された。

そこで、FMISO 及び amino-FMISO の分布を評価するため、FMISO 投与マウス腫瘍組織凍結切片について、超高質量分解能を有する FTICR-MS を用いた IMS 測定を行った。その結果、FMISO (m/z : 190 $\rightarrow$ m/z : 174.067) 及び amino-FMISO (m/z : 160.088) は腫瘍内にて均一な分布を示し、その分布は ARG 法により同定した放射能分布及び pimonidazole（外因性低酸素マーカー）免疫組織染色の陽性領域とは一致しなかった [Figs. 2 (A), (B), (F) and (G)]. また、FMISO から amino-FMISO に還元代謝される際の間接代謝物と推測さ

Fig. 2. Representative Mass Spectrometric Images of FMISO and Its Metabolites, ARG and Pimonidazole Staining in Mouse Tumors at 4 h after Administration of FMISO

(A): IMS images of FMISO (m/z : 190 $\rightarrow$ m/z : 174.067). (B): IMS images of amino-FMISO (m/z : 160.088). (C): IMS images of nitroso-FMISO (m/z : 174.067). (D): IMS images of hydroxylamino-FMISO (m/z : 176.083). (E): IMS images of amino-FMISO-GS (m/z : 465.157). (F): ARG image derived from fluorine-18. (G): Immunohistochemical staining of pimonidazole. The scale bar represents 1 mm. Reproduced with some modifications from Ref. 10) with permission from publisher.

れる分子 (nitroso-FMISO; m/z : 174.067, hydroxylamino-FMISO; m/z : 176.083) も腫瘍組織内に存在することを認めたが、これら中間代謝物の分布も FMISO と amino-FMISO と同様に腫瘍内にて均一であり、ARG 及び pimonidazole 免疫組織染色とは一致しなかった [Figs. 2(C) and (D)]. そこで、低酸素領域には未知の FMISO 代謝物が分布していると考え、FMISO 投与による腫瘍内低分子の変動分子を IMS 測定により探索したところ、ARG 及び pimonidazole 免疫組織染色の陽性領域と類似した分布を示す未知分子 (m/z : 465.157) を見い出した [Fig. 2(E)]. そこで、この未知分子の化学形態を推定するため、超高質量分解能測定による組成解析を行ったところ、本未知分子の精密質量及び同位体パターンは組成式が $C_{16}H_{26}FN_6O_7S$ である化合物と一致し、このような組成式を持つ FMISO 代謝物として amino-FMISO のグルタチオン抱合体 (amino-FMISO-GS) が推定された。次に、腫瘍中における amino-FMISO-GS の生成を確認するため、FMISO 投与マウス腫瘍ホモジネートについて、液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS 分析) による構造解析を行ったところ、amino-FMISO-GS の標準物質と一致するプロダクトイオンを複数検出したことから、腫瘍中に存在する FMISO 未知代謝物は推定通り amino-FMISO-GS であることを確認した。さらに、radio-HPLC により低分子画分における amino-FMISO-GS 存在割合を再評価した

ところ、FMISO の存在比率は約 20% と低かったのに対し、amino-FMISO-GS の存在比率は約 50% であり、腫瘍組織中において FMISO は主に amino-FMISO-GS として存在することが示された。

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドであり、特に還元型グルタチオン (glutathione-SH; GSH) は細胞内に流入した低分子化合物と結合してグルタチオン抱合体を形成し、化合物の極性を上げる能力を有することが知られている。¹¹⁾ よって、FMISO も低酸素環境下の細胞内にてグルタチオン抱合体を形成することによりその極性が上昇し、その結果細胞内に滞留しているものと推測された。

以上の結果より、 $[^{18}F]$ FMISO の腫瘍組織内低酸素領域への集積には、従来想定されていた生体内高分子への共有結合に加え、FMISO 還元代謝物のグルタチオン抱合体 (amino-FMISO-GS) が大きく寄与していることを見い出した。

3. イメージング質量分析による免疫組織染色用低酸素マーカー “Pimonidazole” の腫瘍内集積メカニズムの解明¹²⁾

2. の検討において、FMISO は低酸素環境下の細胞内にて還元代謝を受けた後、グルタチオン抱合反応を受けることにより細胞内に集積していることを明らかにした。そこで、この集積メカニズムが FMISO 特有のものであるか、あるいは他の 2-nitroimidazole を母体骨格に有する化合物でも同様

Fig. 3. Representative Mass Spectrometric Images of Amino-pimonidazole and Reduced Glutathione (GSH) in Mouse Tumors (A)–(C): IMS images of amino-pimonidazole-GS (m/z : 530.239). (D)–(F): IMS images of GSH (m/z : 308.091). (A), (D): IMS images at 0.5 h after administration of pimonidazole. (B), (E): IMS images at 2 h after administration of pimonidazole. (C), (F): IMS images at 4 h after administration of pimonidazole. The scale bar represents 1 mm. Reproduced with some modifications from Ref. 12) with permission from publisher.

の集積メカニズムで低酸素領域に集積するののかについて検証するため、FMISOと同様に2-nitroimidazoleを母体骨格に有し、免疫組織染色による低酸素領域の同定に広く用いられている低酸素マーカー“pimonidazole”について、腫瘍組織内における代謝物評価を行った。

まず、pimonidazole及びその代謝物の腫瘍組織内分布を評価するため、FMISOの検討の際と同様に、FaDu移植マウスにpimonidazole (200 mg/kg)を投与し、投与0.5, 2, 4時間後に腫瘍を摘出して薄切凍結切片を作製した。得られた凍結切片についてIMS測定を行ったところ、いずれの凍結切片からもpimonidazole (m/z : 255.145), pimonidazole還元体 (amino-pimonidazole, m/z : 225.171), amino-pimonidazoleのグルタチオン抱合体 (amino-pimonidazole-GS, m/z : 530.239), 及びpimonidazole還元中間体 (nitroso-pimonidazole, m/z : 239.150, hydroxylamino-pimonidazole, m/z : 241.166)と一致する m/z を検出した。なお、amino-pimonidazole-GSについてはpimonidazole投与マウス腫瘍ホモジネートサンプルのLC-MS/MS分析により、別途合成した標品と同位体パターン及びフラグメントイオンが一致することを確認した。また、pimonidazole, amino-pimonidazole, nitroso-pimonidazole, hydroxylamino-pimonidazoleは投与4時間後までFMISOを用いた検討の際と同様に腫瘍組織内において均一に分布しており、pimonidazoleの免疫組織染色陽性領域とは一致しなかった。一方、amino-pimonidazole-GSは投与0.5時間後より腫瘍

組織内で不均一な分布を示し、pimonidazoleの免疫組織染色陽性領域と一致することを認めた。このことより、pimonidazoleは投与早期より腫瘍組織の低酸素領域内において還元代謝及びグルタチオン抱合反応を受けて集積していることが示唆された。

2. でも述べたように、グルタチオン抱合反応にはグルタチオン（特に還元型グルタチオン; GSH）が関与していることから、次に、腫瘍組織内におけるamino-pimonidazole-GSとGSHの分布について、IMSを用いて経時的に観察した。その結果、投与0.5時間後ではamino-pimonidazole-GSの分布とGSHの分布との間に明瞭な相関は認められなかったのに対し、投与4時間後ではGSHはamino-pimonidazole-GSの分布が確認された領域では検出されなかった (Fig. 3)。2-Nitroimidazole構造を有する化合物を細胞に添加すると細胞内GSHが減少するという現象が報告されており、¹³⁾ 今回IMS測定にて観察されたamino-pimonidazole-GSが分布する腫瘍内領域からGSHが経時的に消失した現象は、pimonidazoleが腫瘍内に移行した後、組織内のGSHを消費してグルタチオン抱合体を形成することを示しているものと考えられる。

ところで、pimonidazoleの免疫組織染色作業には極性溶媒を用いた洗浄工程が含まれていることから、免疫組織染色時と同様に洗浄した後、IMS測定を行った。その結果、洗浄を行っていない腫瘍組織切片では検出されたamino-pimonidazole-GS由来のイオン強度が洗浄を行った腫瘍組織切片上では著しく低下したことから、pimonidazoleの免疫組

組織染色では amino-pimonidazole-GS ではなく、別の pimonidazole 由来代謝物を認識して染色していることが示唆された。同様に、 $[^{18}\text{F}]$ FMISO を投与したマウス腫瘍組織切片について、洗浄した後に ARG 測定を行ったところ、洗浄をしていない組織切片と比べて洗浄後の組織切片では放射能分布の領域は同じであるもののその集積量が低下していることを認めた。2. の検討において、 $[^{18}\text{F}]$ FMISO は腫瘍内において高分子画分にも一部存在していたことを考慮すると、pimonidazole の免疫組織染色では pimonidazole の生体内高分子との共有結合体のみを描出していると考えられる。また、冒頭でも記載したように IMS は一度の測定で複数の分子を同時に画像化することが可能であり、かつ免疫組織染色とは異なり、観察対象の抗原に対する特異的抗体が不要である。よって、IMS により同定した amino-pimonidazole-GS の分布と pimonidazole 免疫組織染色の陽性領域がほぼ同等であったことを考慮すると、IMS による amino-pimonidazole-GS の分布を評価することにより組織内低酸素領域をより簡便に同定できる可能性が示唆された。

以上の結果より、FMISO で観察された腫瘍組織内低酸素領域への集積メカニズム（還元代謝後、グルタチオン抱合体を形成）は FMISO のみならず、2-nitroimidazole を母体骨格に有する化合物において認められる普遍的な現象である可能性が示された。

4. FMISO の低酸素環境下細胞への集積と細胞内グルタチオン抱合因子発現・活性度との関連性評価¹⁴⁾

FMISO や pimonidazole など 2-nitroimidazole を母体骨格に有する低酸素イメージング剤は、腫瘍組織内で還元代謝を受けた後、グルタチオン抱合体を形成することで低酸素領域に集積していることを明らかにした。ところで、グルタチオン抱合反応は、反応を触媒する酵素の活性や細胞腫等により影響を受けることが知られている。¹⁵⁾ また FMISO は酸素濃度が一定の条件下においても細胞の種類によりその集積量が異なることが報告されている。¹⁶⁾ そこで、がん細胞の種類と FMISO 集積量、グルタチオン抱合体生成量及びグルタチオン抱合体形成能との関連性について評価した。

まず、3 種類のがん細胞（FaDu 細胞、LOVO ヒト結腸がん細胞、T24 ヒト膀胱がん細胞）に $[^{18}\text{F}]$

FMISO (2.5 MBq, 250 nmol/well) を添加し、通常酸素環境下あるいは低酸素環境下（酸素濃度：1%）で 4 時間インキュベートした。その結果、通常酸素条件下の各細胞における放射能の集積量はいずれの細胞種とも低く、ほぼ同等であった（FaDu; 0.122 ± 0.009 , LOVO; 0.223 ± 0.048 , T24; 0.100 ± 0.005 % dose/mg protein)。一方、低酸素環境下の細胞における放射能集積量は、FaDu 細胞において最も高く (0.851 ± 0.009 % dose/mg protein)、LOVO 細胞では中程度の集積がみられたのに対し (0.617 ± 0.021 % dose/mg protein)、T24 細胞における集積量は有意に低くなった (0.167 ± 0.011 % dose/mg protein, $p < 0.01$)。FMISO の生体内高分子への共有結合割合を、細胞懸濁液のメタノール抽出により算出したところ、FaDu 細胞では $29.77 \pm 0.47\%$ 、LOVO 細胞では $36.71 \pm 1.28\%$ 、T24 細胞では $47.20 \pm 1.84\%$ であった。また、抽出した低分子画分について LC-MS/MS 測定を行ったところ、FaDu 細胞、LOVO 細胞及び T24 細胞のいずれにおいても細胞内で amino-FMISO-GS が生成していることを確認するとともに、その生成量は放射能集積量と相関することを見出した（FaDu: 0.502 ± 0.035 , LOVO: 0.158 ± 0.006 , T24: 0.007 ± 0.001 % dose/mg protein)。以上のことから、FMISO は同一低酸素環境下においても細胞種によりその集積量が異なり、その集積量の変化には amino-FMISO-GS の生成度合いが関与している可能性が示された。

そこで、FaDu、LOVO 及び T24 細胞における細胞内グルタチオン抱合関連因子の発現量・活性度について評価した。まず、細胞内 GSH 量について測定したところ、FaDu 細胞では評価に用いた 3 つの細胞種の中で最も高値を示し、LOVO 細胞及び T24 細胞ではほぼ同程度であった（FaDu; 650.5 ± 39.3 , LOVO; 147.7 ± 7.9 , T24; 214.7 ± 32.7 nmol/mg protein)。なお、酸化型グルタチオン（GSSG）についても測定したところ、いずれの細胞においても GSH と比べて極めて低値であり（FaDu; 23.9 ± 1.3 , LOVO; 1.7 ± 0.1 , T24; 1.8 ± 0.2 nmol/mg protein)、細胞内グルタチオンの大半は 2-nitroimidazole との反応性に富む還元型（GSH）として存在し、特に FMISO 高集積細胞（今回の検討では FaDu 細胞）内に豊富に存在することが示された。また、グルタチオン抱合反応はグルタチオン抱合酵素

が関与していることを明らかにした (Fig. 4).

本来, グルタチオン抱合関連因子については, 細胞内の発現度の違いに加え, 投与された薬剤の酵素・トランスポーター活性度への影響も考慮する必要がある, 例えばシスプラチンなどの抗がん剤治療を受けている患者では腫瘍内 GSH 枯渇が報告されている.¹⁹⁾ よって, このようなグルタチオン抱合を受ける薬物を投与された患者では, 同様に細胞内 GSH を消費する [¹⁸F] FMISO は腫瘍組織内において競合阻害を受ける可能性が想定される. これらの知見は, [¹⁸F] FMISO を用いた核医学診断において, 腫瘍の種類や治療歴等の患者状態が診断精度に影響を与える可能性を示している.

現在も新たな低酸素イメージング剤の開発研究が盛んに進められているが, その中で筆者も今回行った IMS と核医学イメージング手法を融合した評価法を用いることにより, 新規に開発した低酸素イメージングの集積メカニズムを明らかにすることに成功している.²⁰⁾ ほかに標的組織内で代謝されることにより特異的に集積するイメージング剤が数多く報告されていることから, 今後このような代謝捕捉型イメージング剤の開発研究において, 従来の手法に IMS の技術を組み合わせることにより, より精密な集積メカニズム解明・ドラッグデザインが可能となり, 核医学イメージング剤は勿論, 一般治療薬の創薬研究に貢献することが期待される.

謝辞 本研究の遂行に際しまして, 終始に渡りご指導とご鞭撻を賜りました北海道大学アイソトープ総合センター 久下裕司教授に謹んで感謝申し上げます. また, 本研究の遂行にあたり多大なる貢献を頂きました塩野義製薬株式会社 正木悠紀子博士を始め北海道大学アイソトープ総合センター, 北海道大学大学院医学研究院核医学教室の先生方, 塩野義製薬株式会社の共同研究者の皆様には感謝申し上げます. 最後に, 学生時代より終始懇篤なご指導とご鞭撻を賜り, この度日本薬学会近畿支部奨励賞にご推薦頂いた京都大学大学院薬学研究科 佐治英郎名誉教授に感謝申し上げます.

利益相反 開示すべき利益相反はない.

REFERENCES

- 1) Wilson W. R., Hay M. P., *Nat. Rev. Cancer*, **11**, 393–410 (2011).
- 2) Horsman M. R., Mortensen L. S., Petersen J. B., Busk M., Overgaard J., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **9**, 674–687 (2012).
- 3) Troost E. G., Laverman P., Philippens M. E., Lok J., van der Kogel A. J., Oyen W. J., Boerman O. C., Kaanders J. H., Bussink J., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **35**, 1803–1811 (2008).
- 4) Krohn K. A., Link J. M., Mason R. P., *J. Nucl. Med.*, **49** (Suppl. 2), 129S–148S (2008).
- 5) Patti G. J., Yanes O., Siuzdak G., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 263–269 (2012).
- 6) Caprioli R. M., Farmer T. B., Gile J., *Anal. Chem.*, **69**, 4751–4760 (1997).
- 7) Gobey J., Cole M., Janiszewski J., Covey T., Chau T., Kovarik P., Corr J., *Anal. Chem.*, **77**, 5643–5654 (2005).
- 8) Sugimoto M., Shimizu Y., Yoshioka T., Wakabayashi M., Tanaka Y., Higashino K., Numata Y., Sakai S., Kihara A., Igarashi Y., Kuge Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 1554–1565 (2015).
- 9) Castellino S., Groseclose M. R., Wagner D., *Bioanalysis*, **3**, 2427–2441 (2011).
- 10) Masaki Y., Shimizu Y., Yoshioka T., Tanaka Y., Nishijima K., Zhao S., Higashino K., Sakamoto S., Numata Y., Yamaguchi Y., Tamaki N., Kuge Y., *Sci. Rep.*, **5**, 16802 (2015).
- 11) Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **45**, 51–88 (2005).
- 12) Masaki Y., Shimizu Y., Yoshioka T., Feng F., Zhao S., Higashino K., Numata Y., Kuge Y., *PLoS One*, **11**, e0161639 (2016).
- 13) Bérubé L. R., Farah S., McClelland R. A., Rauth A. M., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **22**, 817–820 (1992).
- 14) Masaki Y., Shimizu Y., Yoshioka T., Nishijima K. I., Zhao S., Higashino K., Numata Y., Tamaki N., Kuge Y., *Ann. Nucl. Med.*, **31**, 596–604 (2017).
- 15) Townsend D. M., Tew K. D., *Oncogene*, **22**, 7369–7375 (2003).

-
- 16) Rasey J. S., Nelson N. J., Chin L., Evans M. L., Grunbaum Z., *Radiat. Res.*, **122**, 301–308 (1990).
- 17) Yellin S. A., Davidson B. J., Pinto J. T., Sacks P. G., Qiao C., Schantz S. P., *Cancer Lett.*, **85**, 223–232 (1994).
- 18) Ishikawa T., Kuo M. T., Furuta K., Suzuki M., *Cytotechnology*, **27**, 81–93 (1998).
- 19) Komiya S., Gebhardt M. C., Mangham D. C., Inoue A., *J. Orthop. Res.*, **16**, 15–22 (1998).
- 20) Shimizu Y., Zhao S., Yasui H., Nishijima K. I., Matsumoto H., Shiga T., Tamaki N., Oga-
wa M., Kuge Y., *Mol. Imaging Biol.*, in press.
doi: 10.1007/s11307-018-1214-y