

平成 29 年 4 月 21 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15462

研究課題名(和文)ヘパラーゼを分子標的とする放射性ヨウ素標識薬剤の開発

研究課題名(英文)Development of a radioiodine-labeled heparanase-targeted probe

研究代表者

向 高弘(Mukai, Takahiro)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30284706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：がんの転移に重要な役割を果たす酵素であるヘパラーゼを標的とした核医学診断を目的に、ヘパラーゼの選択的阻害剤であるOGT2115を基盤とした新規放射性ヨウ素標識体[¹²⁵I]1および[¹²⁵I]2を設計、合成した。非標識体である1および2は、既報のヘパラーゼ阻害剤と同程度の高いヘパラーゼ阻害活性を有していた。また、[¹²⁵I]1は注射液中において高い安定性を示し、ヘパラーゼ発現量に依存してがん細胞に集積するとともに、健常マウスにおいて良好な体内動態が得られた。以上より、[¹²³I]1はがんの質的診断を可能とする放射性薬剤としての基礎的条件を備えていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Heparanase is an enzyme which plays an essential role for cancer metastasis. In this study, we designed and synthesized novel heparanase-targeted radioiodine-labeled probes, [¹²⁵I]1 and [¹²⁵I]2, based on a chemical structure of selective heparanase inhibitor, OGT2115, for quantitative diagnosis of cancer with single photon emission computed tomography. In a heparanase inhibition assay, non-radioactive 1 and 2 exhibited high heparanase inhibitory potencies similar to heparanase inhibitors previously reported. In addition, [¹²⁵I]1 showed a high stability in injection solution, cellular accumulation in cancer cells dependent on expression level of heparanase, and good in vivo biodistribution in normal mice. These results suggest that [¹²³I]1 targeting heparanase could be a candidate for qualitative diagnosis of cancers.

研究分野：放射線科学

キーワード：薬学 放射線 癌

1. 研究開始当初の背景

核医学診断法は広範囲の放射性化合物(放射性薬剤)の分布状態を一度に画像化できることから、腫瘍診断のような全身を対象とする病変部位の検出には他の画像診断法よりも優れている。また、原発部位および転移部位の検出、さらに治療後の再発、転移に関連したフォローアップは患者のQOLの点から重要である。腫瘍の核医学診断薬の開発は臨床画像診断の分野において強く望まれており、これまでに国内外で多くの腫瘍診断用放射性標識化合物の開発が進められているが、いずれも正常細胞から腫瘍細胞を識別する能力に重点を置いているもので、治療に不可欠な腫瘍の個性を診断しようとするものではない。したがって、全身における腫瘍の存在部位を診断するとともに、その腫瘍の悪性度および転移性の質的診断を可能にする新しいタイプの放射性薬剤の開発が求められている。

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは基底膜の重要な構成成分であり、巨大分子や陽性荷電をもった分子に対する基底膜透過のフィルターとして機能するとともに、基底膜に存在するタイプIVコラーゲンをプロテアーゼによる分解から保護していると考えられている。一方、成長因子等の種々のサイトカインは、ヘパリン結合性を有しており、細胞膜上または細胞外基質に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合して固定化されることにより、機能すべき特定の部位に留まり、多様な細胞間刺激伝達機構に深く関与する。したがって、がん細胞の浸潤によりヘパラン硫酸プロテオグリカンが分解されると、基底膜の物質透過性が高まるとともに、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合している血管新生因子や増殖因子が遊離されることにより血管新生が誘導され、さらにがん細胞自身の浸潤と増殖が促進される。ヘパラン硫酸プロテオグリカンを分解する酵素がヘパラーゼであり、本酵素は種々のがんでは特異的に高発現しており、がんの血行性転移において中心的な役割を担っていることが報告されている(図1)。したがって、がんの転移過程において鍵となる分子であるヘパラーゼを核医学イメージングできれば、腫瘍の悪性度、転移能に関する質的診断が可能になると考えた。

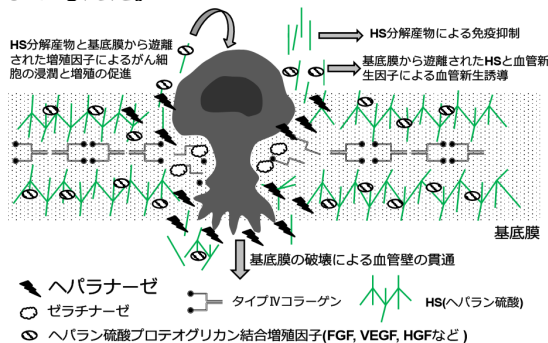
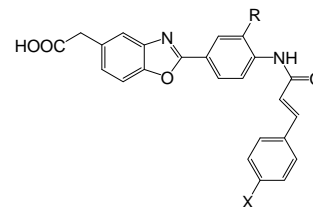


図1 がん細胞による基底膜破壊

2. 研究の目的

本研究では、がんの転移に関与する分子を核医学イメージングする技術を構築することを目的に、腫瘍に特異的に発現し、腫瘍の組織浸潤性、その結果として起こる転移に重要な役割を果たしている酵素、ヘパラーゼを分子標的とした放射性薬剤を開発することを目的とした。ヘパラーゼはがん治療の分子標的として注目を集め、そのため国内外で阻害剤の開発が進められているが、その多くは基質分子と類似した糖構造を有する化合物である。糖構造を有する化合物は、化学合成、分離精製が難しく、また生体膜透過性も低いことから、放射性薬剤の母体骨格として不適であると考え、脂溶性低分子化合物であるヘパラーゼ選択的阻害剤、OGT2115に着目し、これを基本構造とした構造活性相関研究および放射性核種の結合安定性の知見に基づいて、OGT2115の末端のベンゼン環のBr基を放射性ヨウ素に変換した放射性化合物^[125I]1および^[125I]2を設計・合成した(図2)。得られた放射性化合物について、インビトロ評価、健常動物モデルにおける体内分布評価などを行うことにより、ヘパラーゼを分子標的とする放射性薬剤としての有用性を検証することにした。



^[125I]1: R=H, X=I
^[125I]2: R=F, X=I

図2

3. 研究の方法

コールド体合成

ヘパラーゼの阻害剤である OGT2115 ((E)-2-(2-(4-(3-(4-bromophenyl)acrylamido)-3-fluorophenyl)benzo[d]oxazol-5-yl)acetic acid) の構造を基盤に、ヘパラーゼへの結合性維持と脱ヨウ素反応に対する安定性を考慮し、シンナミル基のベンゼン環上の Br 基に放射性ヨウ素を導入した化合物^[125I]1を設計した。同じハロゲン基である I 基に変換してもヘパラーゼへの結合活性が維持されると考えられる。また、OGT2115の中央のベンゼン環の3位にF基を導入することにより、ヘパラーゼに対する阻害活性に加えて、血管新生阻害活性が増大することが報告されている。そこで、中央のベンゼン環の3位にF基を導入した放射性ヨウ素化合物^[125I]2を設計した。合成は、図3-5に示すように、総収率の向上を鑑み、ベンゾオキサゾール誘導体とケイ皮酸誘導体をそれぞれ合成し、ある段階で結合させる収束的合成分

により行うことにした。

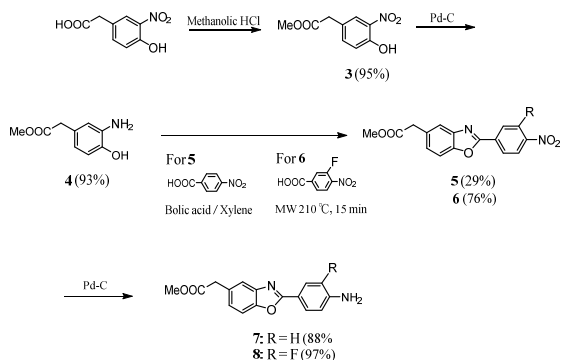


図3 ベンゾオキサゾール誘導体の合成

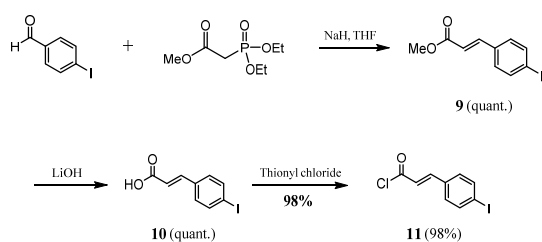


図4 ケイ皮酸誘導体の合成

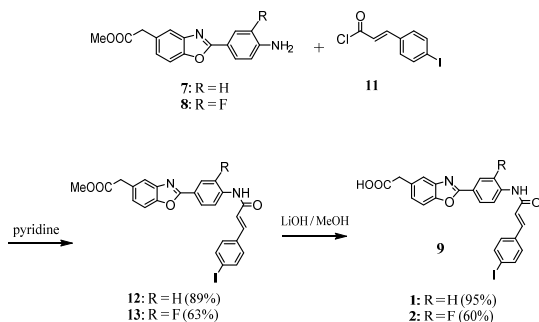


図5 コールド体(1,2)の合成

ホット体合成

標識前駆体としては、放射性ヨウ素の導入が容易であり、その後の分離精製に有利であると考えられるトリブチルスズ体の合成を行うことにした。ベンゾオキサゾール誘導体7または8とケイ皮酸誘導体14より得られたプロモ体をトリブチルスズ体の標識前駆体とした後に、放射性ヨウ素を導入し、加水分解を行いHPLCにより分離精製した(図6)。

HPLC <conditions >

Column: COSMOSIL 5C18-AR-II 4.6x250 mm

Mobile phase: CH₃CN containing 0.1% TFA:

H₂O containing 0.1% TFA = 60:40

Flow rate: 0.9 ml/min ([¹²⁵I]1), 1.0 ml/min ([¹²⁵I]2)

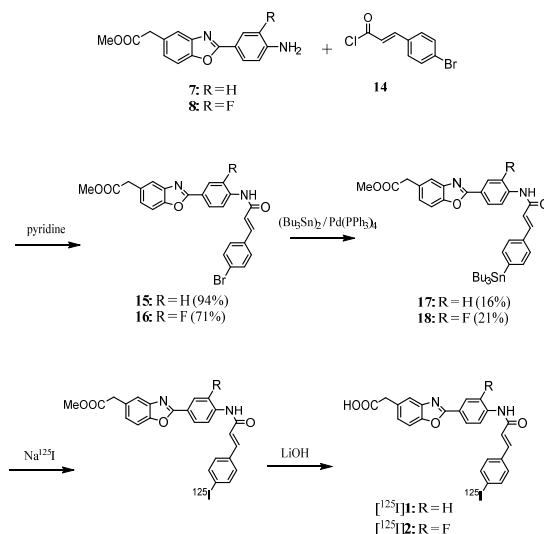


図6 ホット体の合成

ヘパラーゼ阻害活性測定

96-well plate にヘパリンを固相化し、化合物 1、2 を加え、ヘパラーゼと反応させた後、well に残ったヘパリンを抗体で検出し IC₅₀ を算出することによりヘパラーゼ阻害活性を評価した。コントロールとしては、ヘパラーゼ阻害活性が既に報告されている化合物 19 (Courtney et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 2295, 2005) (図7)を用いた。

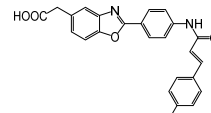


図7 化合物 19

細胞集積性評価

ヘパラーゼ高発現細胞として BT549 ヒト乳がん細胞および MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞、ヘパラーゼ低発現細胞として HCC1954 ヒト乳がん細胞、コントロールとしてヘパラーゼを発現していない MCF-7 ヒト乳がん細胞を用い、[¹²⁵I]1 を加え、37 でインキュベートした。経時的に カウンタにより放射能を測定し、細胞取込みを評価した。

安定性の評価

放射性ヨウ素標識体 [¹²⁵I]1 および [¹²⁵I]2 を緩衝液およびマウス血しょう中にてインキュベートし、経時的に HPLC にて化学形を分析することにより、インビトロでの安定性を評価した。

体内動態の評価

放射性ヨウ素標識体 [¹²⁵I]1 を健常マウス (n=5-6) に投与し、経時的に血液を採取した後、各臓器を摘出し、カウンタによる放射能測定することにより評価した。また、放射能の排泄経路、代謝過程も併せて検討した。

4. 研究成果 コールド体合成

ベンゾオキサゾール誘導体 7, 8 の合成は、4-hydroxy-3-nitrophenylacetic acid を出発原料として、塩酸メタノールによるメチルエステル化と Pd-C によるニトロ基の水素化により 4-amino-4-hydroxyphenylacetic acid methyl ester (4) を収率 89% で得た。ベンゾオキサゾール誘導体 7 は、*p*-ニトロ安息香酸との環化反応とそれに続く水素化にて、5 より収率 88% で得た。ニトロ体 6 については、5 と同様の方法では得ることができなかったが、マイクロウェーブ合成装置を用いて、4 と 3-fluoro-4-nitrobenzoyl chloride との反応により収率 76% で得ることができた。その後、水素化を行い、ベンゾオキサゾール誘導体 8 を収率 97% で得た。

ケイ皮酸誘導体 11 は、ヨードベンズアルデヒドとジエチルホスホノ酢酸エチルよりケイ皮酸メチルエステル 9 を定量的に得たのちに、加水分解し、塩化チオニルとの反応により 11 を収率 98% で合成した。

コールド体 1, 2 は、ベンゾオキサゾール誘導体 7 または 8 とケイ皮酸誘導体 11 との求核置換反応によりエステル体を得た後、LiOH にて加水分解し、それぞれ収率 95% および 60% で得た。

ホット体合成

標識前駆体は、ベンゾオキサゾール誘導体 7 または 8 とケイ皮酸誘導体 14 との求核置換反応によりエステル体をそれぞれ収率 94% および 71% で得た。その後、パラジウム触媒存在下、 $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2$ を反応させ、トリブチルスズ体 17, 18 をそれぞれ収率 16%、21% で合成した。放射性ヨウ素標識では、酸化剤としては *N*-クロロスクシンイミド、過酸化水素、クロラミン T をそれぞれ用いて検討した。その結果、 $[^{125}\text{I}]1$ については、酸化剤として過酸化水素を用いて、その後、LiOH で加水分解することにより、放射化学的収率 37%、放射化学的純度 97% 以上で得ることができた(図 8)。 $[^{125}\text{I}]2$ では、酸化剤としてクロラミン T を用いることにより、放射化学的収率 46%、放射化学的純度 99% 以上で得ることができた(図 9)。

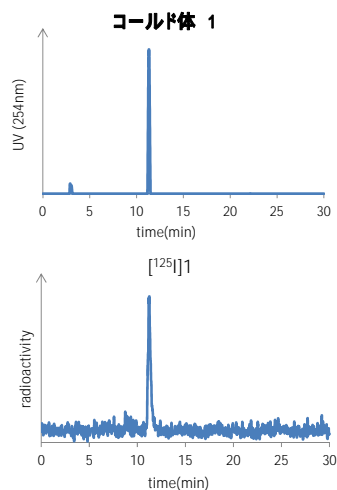


図 8

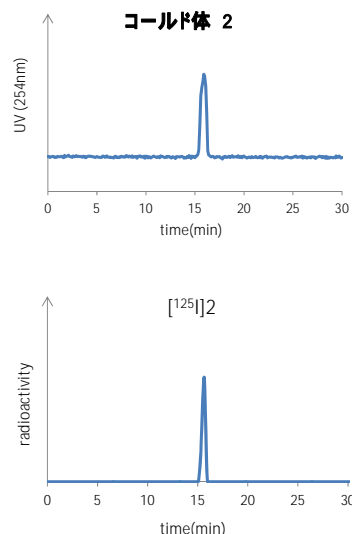


図 9

ヘパラーゼ阻害活性測定

化合物 1 および 2 の IC_{50} は、それぞれ 0.44 μM 、0.41 μM であり、ヘパラーゼの阻害活性が既に報告されている化合物 19 (IC_{50} : 0.39 μM) と比べてほぼ同等の IC_{50} を示し、シナミル基のベンゼン環上の Br 基の代わりに I 基を導入したとしてもヘパラーゼ阻害活性に影響がないことがわかった。

細胞集積性評価

コントロールとして用いた MCF-7 と比較して、ヘパラーゼを発現している BT549、MDA-MB-231、HCC1954 において、 $[^{125}\text{I}]1$ の取り込み量に増加が見られた(図 10)。また、ヘパラーゼ発現量の多い BT549 および MDA-MB-231 に $[^{125}\text{I}]1$ が多く集積したことから、 $[^{125}\text{I}]1$ の細胞への取り込み量はヘパラーゼ発現量に依存している可能性が示された。

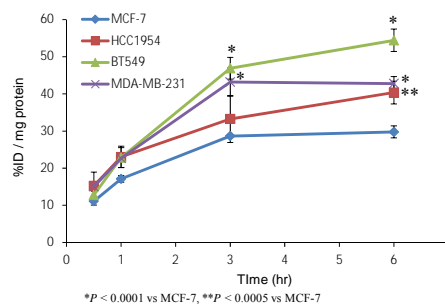


図 10 細胞集積性評価

安定性の評価

注射液中での安定性を評価するため、 $[^{125}\text{I}]1$ を生理食塩水中で分析を行ったところ、24 時間後でも安定であることが示された(図 11)。一方、マウス血しょう中では、未変化体は 6 時間後には 76%、24 時間後には 55% まで減少していることを確認した(図 12)。

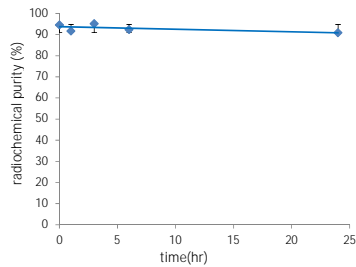


図 11 生理食塩水での $[^{125}\text{I}]1$ の安定性

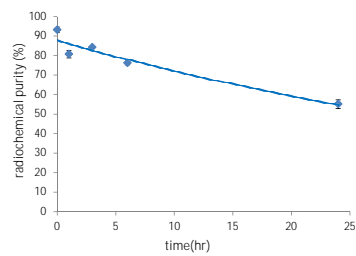


図 12 マウス血しょう中での $[^{125}\text{I}]1$ の安定性

体内動態の評価

健常マウスにおいて、 $[^{125}\text{I}]1$ は、血液中から速やかに消失し、良好な体内動態を示した(図 13)。また放射能は、投与初期に肝臓への集積を認め、その後、経時的に小腸へ胆汁排泄されることが認められた。

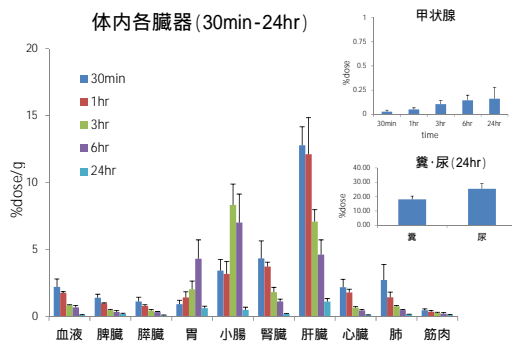


図 13 健常マウスにおける $[^{125}\text{I}]1$ の体内分布

以上、ヘパラーゼ選択的阻害剤の構造活性相関を基盤とした新規放射性化合物 $[^{125}\text{I}]1$ および $[^{125}\text{I}]2$ を設計・合成し、ヘパラーゼ阻害活性を保持することがわかった。 $[^{125}\text{I}]1$ の基礎的評価を行った結果、 $[^{125}\text{I}]1$ はヘパラーゼ発現量に依存して細胞に集積する可能性を示し、また、体内動態評価において、良好な体内動態が得られた。今後、 $[^{125}\text{I}]2$ についても基礎データを集めるとともに、癌細胞を用いた浸潤阻害活性評価、担癌マウスにおける体内分布評価を行い、イメージング剤としての評価の検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向 高弘 (Mukai Takahiro)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：30284706

(3) 連携研究者

萩森 政頼 (Hagimori Masayori)
長崎大学・薬学部・准教授
研究者番号：40446125