

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2023

課題番号：17K10369

研究課題名（和文）細胞周期制御因子CDK2を標的とした放射性プローブの開発

研究課題名（英文）Development of a radioactive probe targeting the cell cycle regulatory factor CDK2

研究代表者

北浦 廣剛 (Kitaura, Hirotake)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：10281817

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：各種がんにて高活性を示す細胞周期制御因子CDK2タンパク質を標的とした、がんの放射性画像診断薬の開発を行った。CDK2への新規阻害化合物のデザイン・合成・活性評価を行い、有望な化合物（I-KAN）を得た。125I-KANは高いCDK2阻害活性（IC50 = 0.096  $\mu$ M）とA431細胞の増殖抑制活性（CC50 = 1.8  $\mu$ M）を持ち、60分後でのA431細胞内への取り込みは500% dose/mg proteinを示した。CDK2をより高発現するがん細胞種にて担がんモデルマウス作製を行うため、ウェスタンブロット解析と細胞取り込み実験を行い、胃がん細胞株MKN45細胞が最適であると判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの画像診断にて広汎に使用されている18F-FDGは、糖代謝の激しい脳や肝臓等では診断が困難な状況が見られる。そこで、CDK2のようながんの細胞増殖の激しさを指標とする診断薬を開発できれば、このような臓器内における腫瘍において画像診断の精度が向上する可能性があり、学術的及び社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要（英文）：We developed a cancer imaging diagnostic radiotracer targeting the cell cycle regulatory factor CDK2 protein, which exhibits high activity in various types of cancer. We designed, synthesized, and evaluated novel CDK2-binding inhibitory compounds, leading to the identification of a promising compound (I-KAN). I-KAN demonstrated potent CDK2 inhibition activity (IC50 = 0.096  $\mu$ M) and proliferation suppression activity in A431 cells (CC50 = 1.8  $\mu$ M). Cellular uptake of 125I-KAN in A431 cells showed a 500% dose/mg protein increase after 60 minutes. We conducted Western blot analysis and cellular uptake experiments using various cancer cell lines, and found that the gastric cancer cell line MKN45, which exhibits higher CDK2 expression, is optimal for establishing a xenograft mouse model for our cancer imaging studies.

研究分野：放射性医薬品

キーワード：がんのイメージング CDK2 サイクリン依存性キナーゼ 細胞周期制御因子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CDK 阻害剤は、癌の分子標的治療薬として Palbociclib が我が国において乳がん治療に承認されている。これは主に CDK4 と CDK6 を標的としており、より広汎な癌治療を目指し、他の CDK ファミリー阻害剤の開発が進行中である。その中でも CDK2 阻害剤は、現在本邦での臨床試験中のものも含め数種類が知られており、これらを活用することで癌治療だけでなく腫瘍部位のイメージングに有用な化合物の創出も期待されているが、未だ成功例はない。ヨウ素 124 化 Palbociclib 類似体を用いた CDK4 を標的としたがんイメージングは、ドイツにて試みられているものの、担がんモデルマウスでの腫瘍への取り込み活性が低く改善が続けられている状況であった。

### 2. 研究の目的

細胞周期制御因子であるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) を標的とした新たながんイメージング剤を開発するのが目的である。多くの腫瘍にて CDK2 が高活性のため細胞増殖が激しいことを利用し、従前のグルコース誘導体を用いた診断では困難を伴う糖代謝の亢進した脳や肝臓、消化器等において精度の高い画像診断が可能となる手法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

1 年度目 (2017 年度): CDK2 標的放射性プローブの設計とその非放射性化合物の合成を行う。既知の CDK2 阻害剤をリード化合物とし、放射性ヨウ素標識位置の設計検討を行う。設計した化合物と同じ構造の非放射性ヨウ素化合物を合成し、CDK2 のキナーゼ活性への IC50 から結合力を解析する。

2 年度目 (2018 年度): CDK2 標的放射性プローブの合成研究と CDK2 への結合性評価を行う。高い結合性が認められた化合物について、その放射性標識体の合成法を検討し確立する。試験管内での CDK2 への結合解析や細胞への取り込み実験を行うため、半減期の長いヨウ素 125 標識にて解析を行う。

3 年度目 (2019 年度): がん細胞株を用いた放射性プローブの細胞内取り込みの評価と *in vivo* での放射性プローブの安定性を評価する。担がんモデルマウス作製に用いられる各種ヒトがん細胞株を用い、がん細胞内取り込み活性を解析する。

4 年度目 (2020 年度): 放射性プローブの正常マウスでの組織集積性評価と担がんモデルマウスでのがん集積性を解析する。マウスモデルに放射性プローブを投与後、組織摘出し体内放射能分布を解析する。がんへの集積性が認められれば、さらに SPECT 診断にて詳細な画像診断を行う。また非放射性 CDK2 阻害剤の同時投与により、がん集積性が抑制されるかを確認することで、その CDK2 集積特異性を確認する。

### 4. 研究成果

各種がんにて活性の高い細胞周期制御因子 CDK2 のキナーゼ活性中心を標的として合成した化合物 I-KAN は、CDK2 への IC50 は 0.096  $\mu\text{M}$  であり、高い結合性が認められた。他の CDK ファミリーについては IC50 が、0.16  $\mu\text{M}$  (CDK1), 0.24  $\mu\text{M}$  (CDK4), 0.41  $\mu\text{M}$  (CDK5), 0.23  $\mu\text{M}$  (CDK6), 0.78  $\mu\text{M}$  (CDK7)であった。CDK1 と CDK4, 6 に関しても、CDK2 の 0.4-0.6 倍の結合能を有することが分かった。

この放射性ヨウ素置換体  $^{125}\text{I}$ -KAN に関して、放射化学的収率 22%、放射化学的純度 97%、比放射能 38 GBq/mmol となる合成法を確立した。

放射性標識化合物の細胞内取り込み効率の評価を行うため、ヒト皮膚がん細胞 (A431) を用い、培養シャーレ内での放射性化合物の細胞取り込み実験を行った。A431 細胞において時間依存的な細胞内取り込みの上昇が認められ、化合物添加後 10 分にて 170 %Dose/mg protein、60 分後では 500% dose/mg protein の高値が認められた。しかし、CDK2 阻害剤 AT7519 を用い、細胞取り込みへの競合によりその特異性を検討したが、阻害効果は 50%程度で濃度依存的な阻害効果の増大が弱かった。上記のように CDK1、CDK4, 6 への結合活性も強いことから、他の未解析の CDK ファミリーへの結合も予想された。よって I-KAN 化合物は、標的としていた CDK2 以外に CDK1、CDK4, 6 にも結合し、このことが担がん動物モデルを用いた画像診断に影響を与える可能性が示唆された。ただし、CDK4, 6 を含め多くの CDK はがんに関与しており、がん種の範囲を広げて診断、活用できる可能性があると考えた。

そこでさらに、ウェスタンブロット法を用いて、CDK ファミリータンパク質の発現量を各種がん細胞株にて比較解析した。その結果、CDK2 タンパク質の発現量が多く、かつ  $^{125}\text{I}$ -KAN 化合物の細胞取り込み活性が高く、また CDK2 阻害剤による細胞取り込み阻害効果が強いヒト胃がん細胞株 MKN45 が、担がんモデル動物の作成に適していると考えられた。

追記として、2019 年度末にて本学アイソトープ研究センターが廃止され、また 2020 年度初めからのコロナ禍のため、当初の予定であった北海道大学アイソトープ総合センターでの共同研究

が当初の予定通り進めることが困難となった。今後の課題として残された、担がんモデル動物の作成、画像診断薬としての評価を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大倉 一枝  (Ohkura Kazue)  (60094827)	北海道医療大学・薬学部・教授   (30110)	
研究分担者	大島 伸宏  (Oshima Nobuhiro)  (80508648)	北海道医療大学・薬学部・助教   (30110)	
研究分担者	久下 裕司  (Kuge Yuji)  (70321958)	北海道大学・アイソトープ総合センター・教授   (10101)	
研究分担者	東川 桂  (Higashikawa Kei)  (10756878)	北海道大学・アイソトープ総合センター・助教   (10101)	
研究分担者	水野 雄貴  (Mizuno Yuki)  (90805194)	北海道大学・アイソトープ総合センター・助教   (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------