

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790856

研究課題名（和文） DNA の修復を指標とした放射線感受性腫瘍のインビボ画像化

研究課題名（英文） In vivo imaging of DNA repair for estimating the sensitivity of tumor to radiotherapy

研究代表者

氏名（ローマ字）：上原 知也（UEHARA TOMOYA）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：10323403

研究成果の概要：

癌細胞の放射線感受性のインビボ評価を目的として、DNA 修復関連タンパク質の一つである DNA-PK に注目し、DNA-PK に結合する放射性薬剤の合成を計画した。DNA-PK の阻害剤として知られている NU7441 の基本骨格として、放射性ヨウ素の導入の可能な薬剤を設計、合成した。また、また、治療効果のインビボ評価を目的として、アミノ酸輸送システム A の基質となる放射性ヨウ素標識人工アミノ酸の合成、評価もおこなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	360,000	3,560,000

研究分野：放射性薬品科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：DNA 二重鎖切断，修復酵素，DNAA-PK，放射性ヨウ素，画像診断

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の放射線治療は、外科的手術、化学療法と並ぶ、癌治療の三本柱の一つとされる。放射線治療は組織の形態や機能を温存することが可能であることから身体への負担が少なく、今後の高齢者社会において、益々その利用が期待されている。一方、放射線に対する感受性は癌細胞によって大きく異なることから、非侵襲的に治療前に個々の患者に対する癌細胞の放射線に対する感受性を予測

できれば、個々の患者に対する放射線照射量の最適化が可能となり、その結果、治療効率の向上や余分な被ばくの回避による患者への負担の軽減、さらには医療費の軽減にもつながると考えられる。

放射線が細胞に与える影響についての研究から、DNA の二重鎖切断(DSB)が細胞の生死に対する最も重篤な傷害であることが示されている。致命的な傷害である DSB からの回復のために細胞は相同組換えおよび非同源末端結合

(NHEJ)により DSB の修復を行う。その中でも NHEJ は細胞周期のいずれにおいても実行可能であることから、細胞中の DSB 修復に対する依存度が高いことが報告されている。また、NHEJ を阻害した細胞において、放射線感受性が上がることも報告されている。これまでに、NHEJ に関与するタンパク質として、DNA-PK, ATM, DNA ligase IV などが知られている。

(2) 癌治療の効果判定は、エックス線 CT や MRI などの形態診断が汎用されており、通常、治療開始1ヶ月以上経過してはじめて治療効果が評価される。一方、サイクロロン産生の半減期 20 分の  $^{11}\text{C}$  標識メチオニン ( $^{11}\text{C}$ Met) は、癌組織の形態変化が現れるよりも遙かに早期に癌治療の効果判定を可能とするが、その半減期から、本薬剤の使用は大きく限定される。したがって、放射性ヨウ素あるいは放射性フッ素を標識核種に用いて、 $^{11}\text{C}$ Met と同質の診断情報を与える薬剤が開発されれば、広範な医療機関において治療効果の早期判定が可能となり、個々の患者に適した治療法の早期選定が可能となる。申請者は最近、アミノ酸輸送システム A により取り込まれる薬剤が、 $^{11}\text{C}$ Met と同等の期間で治療効果を判定できることを見出した。

## 2. 研究の目的

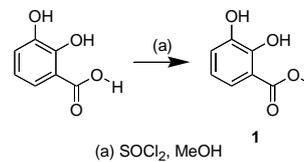
(1) 上記に示したように、非侵襲的にインビボで腫瘍組織内の NHEJ 関連タンパク質を定量できれば、患者に負担をかけることなく癌細胞の放射線感受性を知ることが可能と考えられる。そこで本申請課題では、DNA 修復関連タンパク質の一つである DNA-PK に注目し、DNA-PK に結合する放射性薬剤の開発を計画した。DNA-PK の阻害剤として知られている NU7441 の基本骨格として、放射性ヨウ素の導入の可能な薬剤を設計、合成した。

(2) アミノ酸輸送システム A は N-メチル化アミノ酸を輸送することが知られている。そこで、放射性ヨウ素の導入が容易なフェニルアラニン(Phe)およびチ

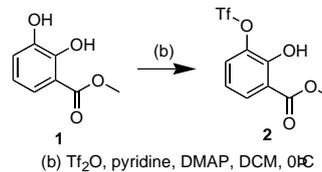
ロシンを (Tyr) を基本骨格とした N-メチルフェニルアラニン (MF), N-メチルチロシン (MY) の放射性ヨウ素標識体を作製し、これらのアミノ酸輸送システム A に対する選択性を評価した。

## 3. 研究の方法

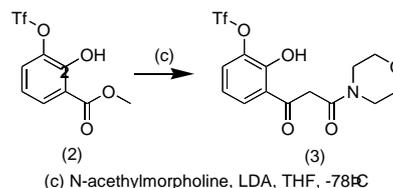
(1) 放射性ヨウ素標識 DNA-PK 阻害剤の合成  
2,3-Dihydroxy benzoic acid methyl ester (化合物 1) の合成:  $-10^\circ\text{C}$  に冷却したメタノール 10 mL に塩化チオニル (2.6 mL) を滴下した。次いで、2,3-dihydroxy benzoic acid を加え、室温に戻した後、一晩攪拌した。溶媒を留去後、クロロホルムに溶解し、飽和炭酸ナトリウム水溶液により洗浄した。有機層を減留去することにより化合物 1 を得た。



2-Hydroxy-3-trifluoromethylsulfonyloxybenzoic acid methylester (化合物 2) の合成: 化合物 1 (0.5 g) pyridine (0.24 mL), 4-dimethyl amino pyridine (DMAP, 37 mg) をジクロロメタン (DCM, 10 mL) に溶解し、 $0^\circ\text{C}$  に冷却した。無水トリフレート (0.5 mL) をゆっくりと滴下し、その後一晩攪拌した。溶媒を留去後、酢酸エチル、ヘキサン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より精製し、化合物 2 を得た。

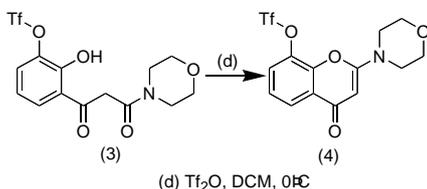


Trifluoro-methanesulfoinic acid  
2-hydroxy 3-(3-morpholin-4-yl-3-oxo-propionyl)phenylester (化合物 3) の合成: 化合物 2 (0.2 g), N-acetylmorpholine (77.5  $\mu\text{L}$ ) をテトラヒドロフラン (THF, 5 mL) に溶解し、 $-78^\circ\text{C}$  に冷却した。Lithium diisopropylamide (LDA) をゆっくりと滴下し、その後室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧粒去し、酢酸エチル、ヘキサンを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製し、化合物 3 を得た。

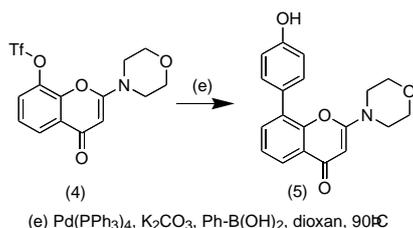


Trifluoro-methanesulfoinic acid

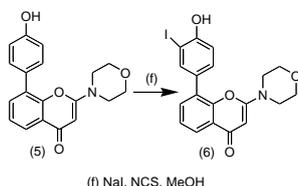
2-morpholino-4-yl-4-oxo-4H-chromen-8-yl ester (化合物 4) の合成: 化合物 3 (0.1 g) を DCM 2 mL に溶解し, 0°C に冷却した。無水トリプレートをゆっくりと滴下し, その後室温で一晩攪拌することで, 分子内環化を行った。溶媒を減圧粒去し, 酢酸エチル, ヘキサンを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製し, 化合物 4 を得た。



8-(4-Hydroxy phenyl)-2-morpholine-4-yl-chromen-4-one (化合物 5) の合成: 化合物 4 (0.1 g),  $K_2CO_3$  (36 mg), 4-hydroxybenzeneboronic acid (35.9 mg) および触媒として tetrakis (triphenylphosphine)palladium (30 mg) をジオキサン (10 mL) に溶解し, 90°C で一晩攪拌した。溶媒を減圧粒去し, 酢酸エチル, ヘキサン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より精製し, 化合物 5 を得た。



8-(4-iodo-3-hydroxyphenyl)-2-morpholine-4-yl-chromen-4-one (化合物 6) の合成: 化合物 5 (10 mg), NaI (2.3 mg) をメタノール 1 mL に溶解した。メタノール 1 mL に溶解した N-chlorosuccinic acid (NCS, 4.1 mg) を酸化剤として先の溶液に加えた。1 時間後, 亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (10 mg/mL) を 1 mL 加え, 反応を止めた。メタノールと水を溶出溶媒とする逆相 HPLC により精製し, 化合物 6 を得た。



放射性ヨウ素標識化合物の合成: 1%酢酸メタノールに溶解した化合物 5 (0.5 mg/mL, 44.6  $\mu$ L) に放射性ヨウ素 ( $Na^{125}I$ ) を加えた。1%酢酸メタノールに溶解した NCS (0.5 mg/mL, 9.9  $\mu$ L) を加え, 60 分室温で反応させた。亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (0.3 mg/mL, 13  $\mu$ L) を加え, 反応を止めた。メタノールと水を溶出溶媒とする逆相 HPLC により精製し, 放射性ヨウ素標識化合物を得た。

(2) L-N-methylphenylalanine methylester の

(化合物 7) 合成: メタノール 3.5 mL を -10°C に冷却し, 塩化チオニル 2.4 mL をゆっくりと滴下した。L 体の MF (LMF, 600 mg) を加え, 一晩攪拌した。溶媒を減圧粒去することで, 化合物 7 を得た。

L-3-iodo-N-methylphenylalanine methylester (化合物 8, I-LMF) の合成: 化合物 7 (530 mg) を DCM 5.5 mL に溶解し, IPy2BF4 (0.95 g),  $CF_3SO_3H$  (0.45 mL) を順次加えた。室温で 4 時間反応後, 飽和炭酸ナトリウム水溶液で中和した後, 酢酸エチルにて抽出した。溶媒を減圧留去後, 酢酸エチル, ヘキサン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より精製し, 化合物 8 を得た。

L-3-iodo-N-methylphenylalanine (化合物 9) の合成: 化合物 8 (50 mg) を 1 N 水酸化ナトリウム水溶液 (0.2 mL) に溶解し, 一晩攪拌した。1N 塩酸で中和することで化合物 9 を得た。

3-(tributylstannayl)-N-methylphenylalanine methylester (化合物 10) の合成: 化合物 8 (120 mg) をジオキサン 5 mL に溶解し, bis(tri-n-butyltin) (305 mg), tetrakis (triphenylphosphine)palladium (4.3 mg) を順次加え, 窒素気流下 18 時間加熱還流した。溶媒留去後, 酢酸エチル, ヘキサン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より精製し, 化合物 10 を得た。

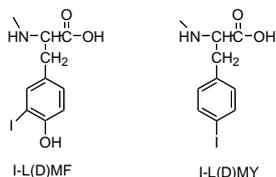
3-(tributylstannayl)-N-methylphenylalanine (化合物 11) の合成: 化合物 10 (100 mg) を 1 N 水酸化ナトリウム水溶液 (0.5 mL) に溶解し, 一晩攪拌した。10% クエン酸水溶液で中和し, 酢酸エチルで抽出することで化合物 11 を得た。

放射性ヨウ素標識: 1%酢酸メタノールに溶解した化合物 11 (0.5 mg/mL, 44.6  $\mu$ L) に放射性ヨウ素 ( $Na^{125}I$ ) を加えた。1%酢酸メタノールに溶解した NCS (0.5 mg/mL, 9.9  $\mu$ L) を加え, 60 分室温で反応させた。亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (0.3 mg/mL, 13  $\mu$ L) を加え, 反応を止めた。メタノールと水を溶出溶媒とする逆相 HPLC により精製し, 放射性ヨウ素標識化合物を (\*I-LMF) 得た。D 体 (\*I-DMF) についても同様に作製した。

3-iodo-N-methyltyrosine (I-MY) の合成: L-N-methyl tyrosine (30 mg) を 0.1 N 塩酸 (1.8 mL) に溶解し,  $KIO_3$  (6.54 mg/3 mL 0.1 N 塩酸) を加えた。KI (5.4 mg, 0.3 mL 0.1 N 塩酸) をゆっくりと滴下し, 室温で 60 分反応した。亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (10 mg/mL, 0.5 mL) を加え, 反応を止めた後, メタノールと水を溶出溶媒とする逆相 HPLC により精製した。

放射性ヨウ素標識: L-N-methyl tyrosine (1.95 mg/mL 0.01 M リン酸緩衝液 pH 7.4, 5  $\mu$ L) に放射性ヨウ素を加え, 同じ溶媒に溶か

したクロラミン T (2.81 mg/mL, 5  $\mu$ L)を加えた。室温で 15 分反応させた後、亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (1.08 mg/mL, 5  $\mu$ L)を加え、反応を停止した。次いで、メタノールと水を溶出溶媒とする逆相 HPLC により精製し、放射性ヨウ素標識体 (\*I-LMY)を得た。D 体 (\*I-DMY)についても同様に作製した。



放射性化合物のアミノ酸輸送システムの選択制の検討では、U87MG ヒトグリオーマ細胞への放射性ヨウ素標識化合物の取り込みをアミノ酸輸送システム A の基質として methylamino isobutyric acid (MeAIB)を、アミノ酸輸送システム L の基質として 2-amino-2-norbornane carboxylic acid (BCH)を添加した阻害実験により求めた。

#### 4. 研究成果

(1) 放射性ヨウ素標識 DNA-PK 阻害剤の開発  
放射性ヨウ素標識化合物の前駆体である化合物 5 の総収率が 1%以下と以上に低く、今後の改良が必要と考えられた。放射性ヨウ素標識体は放射化学的収率 30%、放射化学的純度 95%以上で得られた。今後、細胞を用いた検討により、取り込みなどを検討していく。

(2) LMF, DMF の放射性ヨウ素標識はそれぞれ,%で得られた。また, LMY, DMY の放射性ヨウ素標識はそれぞれ,%で得られた。得られた放射性ヨウ素標識化合物 \*I-LMF, \*I-DMF, \*I-LMY, \*I-DMY はいずれも経時的な取り込みの増加を示したが、その取り込み量は 1%前後と低かった。\*I-LMY, \*I-DMY の細胞への取り込みを MeAIB および BCH による阻害を行ったが、有意な変化は見られなかった(図 1)。アミノ酸輸送システム ASC の基質であるセリンによる阻害を起こって見たが、阻害効果は見られなかった。取り込み量が低く、阻害効果が観察されにくかった可能性も考えられることから、今後新たな評価法により再評価する予定である。一方, \*I-LMF, \*I-DMF の細胞への取り込みは BCH では、それぞれ 13.5%, 5%の取り込みが減少したのに対して、MeAIB ではそれぞれ 38%, 36%の阻害が観察された(図 2)。従って, \*I-LMF, \*I-DMF の取り込みの一部はアミノ酸輸送システム A により行われているものと考えられた。しかし、これらの化合物においても取り込み量が低いことから、阻害効果が観察されにくかった可能性も考えられる。今後新たな評価法により再評価する予定である。

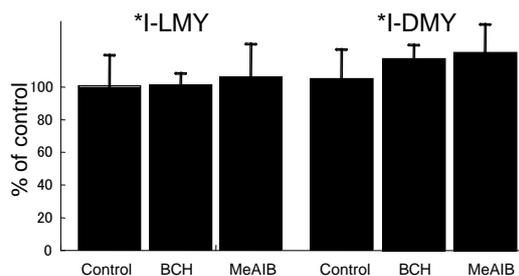


図 1 \*I-LMY と \*I-DMY の細胞内取り込み経路の評価。

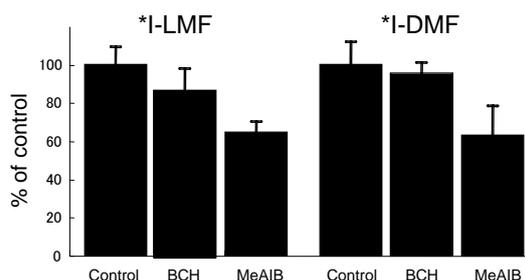


図 2 \*I-LMF と \*I-DMF の細胞内取り込み経路の評価。

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

- ① 上原知也, アミノ酸輸送システム A の基質による癌の治療効果判定, 3 回トランスポーター研究会年会, 2008 年 6 月 7-8 日 京都大学薬学部

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

上原 知也 (UEHARA TOMOYA)

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号: 10323403