

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22689035

研究課題名(和文)がん診断用PET薬剤Br-76標識アミノ酸の開発と臨床への展開

研究課題名(英文)Development of Br-76-labeled amino acid derivatives for imaging tumors

研究代表者

花岡 宏史(Hanaoka, Hirofumi)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50361390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,000,000円、(間接経費) 5,700,000円

研究成果の概要(和文)：Br-76は半減期の比較的長いポジトロン放出核種であることから、本研究では多くの施設で使用できる新規がん診断用薬剤としてのBr-76標識アミノ酸の開発研究を計画した。いくつかのBr-76標識アミノ酸を設計・合成し、評価を行ったところ、 $\alpha$ -メチルフェニルアラニンの2位にBrを導入した2-[Br]-AMPが優れた体内動態および腫瘍集積性を示した。このことから2-[Br-76]-AMPは新規がん診断用アミノ酸として有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Br-76 is an attractive positron emitter due to its long half-life ( $t_{1/2}=16.1$  h). In this study, Br-76-labeled amino acid derivatives were designed, and their potential as a tumor imaging agent was evaluated. Among several Br-76-labeled amino acid derivatives, 2-[Br-76]bromo- $\alpha$ -methyl L-phenylalanine (2-[Br]-AMP) exhibited preferred pharmacokinetics and tumor accumulation in vivo. These findings suggest that 2-[Br-76]-AMP would constitute a potential new PET tracer for tumor imaging.

研究分野：医歯薬学

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：がん 診断 薬学

### 1. 研究開始当初の背景

[<sup>18</sup>F]-FDG は「がん」の核医学診断において極めて有用な放射性薬剤であり、臨床において広く用いられている。その一方で、<sup>18</sup>F-FDG は頭頸部や炎症部位へも集積してしまうことから、がんにより特異的な放射性薬剤が望まれている。その一つとしてアミノ酸を母体化合物とする放射性薬剤が注目されており、国内外で多くの研究開発が行われ、臨床に進んでいるものも少なくない。群馬大学でも <sup>18</sup>F 標識アミノ酸誘導体として [<sup>18</sup>F]-フルオロ- $\alpha$ -メチルタイロシン (FAMT) を開発し、既に臨床で日常的に使用している。臨床において <sup>18</sup>F-FDG と比較すると <sup>18</sup>F-FAMT の方ががんに対する特異性が高いことから、近くに炎症がある場合や悪性腫瘍と良性腫瘍との鑑別においては特に有用であり、診断精度の向上に貢献している。しかしながら [<sup>18</sup>F]-FAMT をはじめとするポジトロン核種で標識したアミノ酸製剤は、それぞれの病院で製造する必要があり、有用であるにもかかわらず、限られた施設でしか使えないのが現状である。

一方で私は、日本原子力研究開発機構・高崎量子応用研究所との共同研究として、新規放射性核種である <sup>76</sup>Br の製造と <sup>76</sup>Br 標識薬剤の開発を行っており、すでにいくつかの <sup>76</sup>Br 標識化合物の製造に成功し、その有用性を見いだしつつある。<sup>76</sup>Br はポジトロン放出核種であるにもかかわらず半減期が長く (半減期 16.1 時間)、またハロゲン核種であることからキレート剤を必要とせずに標識できるという点で、低分子化合物への導入には有利であると考えられる

### 2. 研究の目的

本研究では、多くの施設で使用できる新規がん診断用薬剤として <sup>76</sup>Br 標識アミノ酸の開発研究を計画した。アミノ酸製剤を <sup>76</sup>Br 標識する利点として、①<sup>18</sup>F と同じハロゲンであるため <sup>18</sup>F 標識アミノ酸製剤と同様の分子設計を行うことができる、②半減期が比較的に長いので、良い製剤ができれば企業による製造→供給も可能であり多くの施設で使用できる、という 2 つがあげられる。<sup>76</sup>Br は有望な放射性核種であるが、海外を含めて数施設しか製造を行っておらず、<sup>76</sup>Br の製造および標識薬剤に関する研究はあまり行われていないのが現状であり、今までに <sup>76</sup>Br アミノ酸製剤に関する報告は皆無である。本研究では、広く臨床使用することが可能な、がん診断薬剤として <sup>76</sup>Br 標識アミノ酸を開発することを目標としている。従って本研究では、①<sup>76</sup>Br 標識アミノ酸の選定、②<sup>76</sup>Br 標識アミノ酸の合成法の最適化、③<sup>76</sup>Br の製造法の最適化、の 3 つの検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### ◆ <sup>76</sup>Br 標識アミノ酸の設計・合成および評価

FAMT をリード化合物として <sup>76</sup>Br 標識アミノ酸の設計を行い、<sup>76</sup>Br 標識の前駆体を合成する。候補化合物としてまずは、LAT1 に対する特異性を高めるためにアミノ酸の  $\alpha$  位にメチル基を導入し、かさ高く脂溶性の高いベンゼン環を側鎖に有し、そこに <sup>76</sup>Br 含有の官能基が結合した化合物を作製する。 $\alpha$ -メチルフェニルアラニン誘導体の <sup>76</sup>Br 導入部位をトリブチルスズ基に置換した化合物を標識前駆体として合成する。その後スズ-<sup>76</sup>Br 交換反応により <sup>76</sup>Br 標識を行い、別途合成した非標識 Br 体と HPLC で比較することにより、目的とする <sup>76</sup>Br 標識アミノ酸を分離精製する。

作製した <sup>76</sup>Br 標識アミノ酸については、まず LAT1 発現細胞を用いた取り込み実験を行い、LAT1 特異的な細胞集積を確認する。その後、ノーマルマウスおよび担癌マウスにおける体内動態、腫瘍集積性を比較検討し、体内動態が最も優れた <sup>76</sup>Br 標識アミノ酸を選定する。すでに臨床使用されている [<sup>18</sup>F]-FAMT と比較することで、臨床応用の可能性について判断することが可能であり。最終的に選定された <sup>76</sup>Br 標識アミノ酸に関しては、群馬大学設置の動物用 PET 装置にて、同じ担癌マウスに対して撮像を行い、[<sup>18</sup>F]-FAMT と遜色ない画像が得られることを確認する。

#### ◆ <sup>76</sup>Br 製造法についての検討

現在の <sup>76</sup>Br の製造は、Cu<sub>2</sub><sup>76</sup>Se をターゲットとした <sup>76</sup>Se (n, p) <sup>76</sup>Br 反応により <sup>76</sup>Br を照射生成させた後、ターゲットから <sup>76</sup>Br を分離することにより行われているが、分離操作による <sup>76</sup>Br の回収率がそれほど高くないことおよびターゲットの再利用ができていないことが問題であり、現状では大量製造は難しく、またかなりのコストがかかることが予想される。そこでより簡便かつ安価でありながら安定的に <sup>76</sup>Br の製造が行えるように製造法の改良を行う。

### 4. 研究成果

#### ◆ <sup>76</sup>Br 標識アミノ酸の設計・合成および評価

FAMT および今回の研究において作製した Br アミノ酸を図 1 に示した。

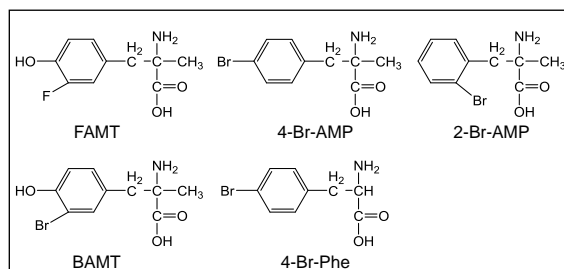


図 1 標識アミノ酸の構造

$^{76}\text{Br}$  標識アミノ酸誘導体としては、まず FAMT のフッ素を臭素に置換した  $^{76}\text{Br}$ -ブromo- $\alpha$ -メチルチロシン (BAMT) を設計・合成した。細胞取込や体内動態を検討したところ、腫瘍細胞への取込や腫瘍への集積性を示したが、生体内での安定性が悪く、脱離した  $^{76}\text{Br}$  が血中や組織へ滞留することが明らかとなり、安定性の高い  $^{76}\text{Br}$  標識アミノ酸誘導体の設計が必要と考えられた。そこで当初の予定通り Phe に  $^{76}\text{Br}$  を導入した、 $^{76}\text{Br}$ - $\alpha$ メチルPhe を合成することとした。まず Tyr 側鎖のフェノール性水酸基の代わりに臭素を導入した、4-[ $^{76}\text{Br}$ ]- $\alpha$ メチルフェニルアラニン (4-Br-AMP) を作製しその評価を行った。その結果、4-Br-AMP は生体内でも十分に安定であるものの、非標的臓器への高い滞留性が認められた。4-Br-AMP の高い脂溶性が要因の一つと考えられたことから、脂溶性を低下させる目的で  $\alpha$  位にメチル基がない  $^{76}\text{Br}$  標識フェニルアラニン (4-Br-Phe) を作製し、その体内動態を検討した。その結果、 $\alpha$  位のメチル基が無くなることで脂溶性は低下し、ある程度のクリアランス向上は認められたものの、まだ非標的臓器への滞留が認められた。このことから単に脂溶性だけが  $^{76}\text{Br}$  標識フェニルアラニン誘導体の非標的臓器への滞留性の主要因ではないことが明らかとなった。

アミノ酸側鎖の芳香環の 4 位をハロゲンで置換するよりも 2 位をハロゲンで置換した方が、体内からのクリアランスが早いとの報告があることから、Phe の 2 位に Br を導入した誘導体、2-[ $^{76}\text{Br}$ ]- $\alpha$ -メチルフェニルアラニン (2-Br-AMP) を設計・合成した。2-Br-AMP はノーマルマウスの体内分布実験において、血液からの速やかなクリアランスと腎臓からの速やかな消失を示した (図 2)。

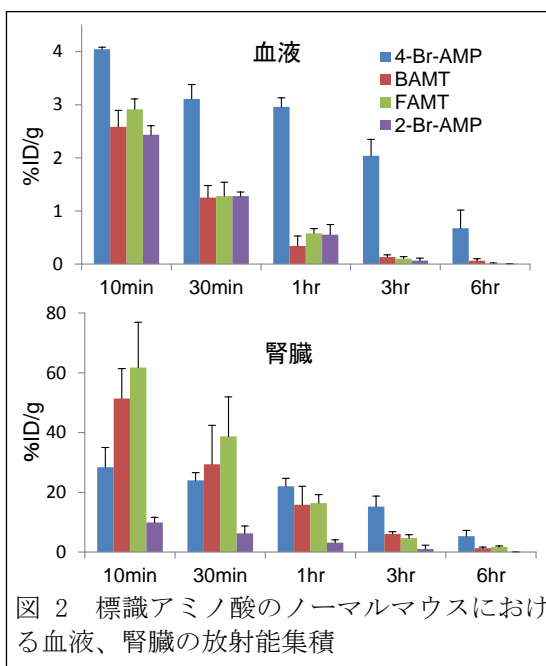


図 2 標識アミノ酸のノーマルマウスにおける血液、腎臓の放射能集積

この 4 位と 2 位に Br で導入した Phe 誘導体の体内動態の相違を調べる目的で、血漿タンパクとの結合性および水オクタノール分配係数を検討したところ、2-Br-AMPの方がタンパク結合率が低くまた水溶性が高いということが明らかになった。従って、2-Br-AMPのクリアランスが 4-Br-AMP と比べて早い一因として、タンパク結合率の低さと水溶性の高さが関係していることが示唆された。また腫瘍細胞を用いた取り込み実験を行ったところ 2-Br-AMP は LAT-1 特異的に腫瘍細胞に取り込まれる事が明らかとなった。

2-Br-AMP は担がんマウスを用いた検討において腫瘍へ高く集積したことから、2-[ $^{76}\text{Br}$ ]-AMP を用いて動物用 PET 装置にて撮像を行ったところ投与早期より腫瘍を明瞭に描出することができた (図 3)。

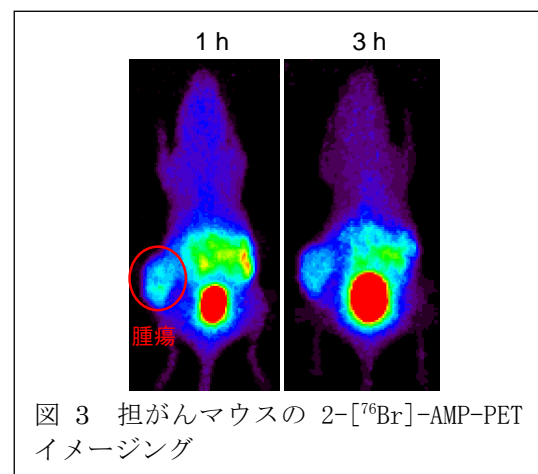


図 3 担がんマウスの 2-[ $^{76}\text{Br}$ ]-AMP-PET イメージング

以上の結果より、2-[ $^{76}\text{Br}$ ]-AMP は新規がん診断用アミノ酸として有用であることが示された。

また  $^{18}\text{F}$  標識アミノ酸を用いて L 体と D 体の体内動態の違いについても検討を行った。その結果、D 体は L 体に比べて腫瘍集積性は低いものの、血液や各臓器への滞留性が非常に低く、体内からすみやかにクリアランスされることが明らかとなった。このことから  $^{76}\text{Br}$  標識アミノ酸誘導体においても場合によっては D 体を検討すること有効である可能性が示された。

#### ◆ $^{76}\text{Br}$ 製造法についての検討

$^{76}\text{Br}$  はサイクロトロンで照射した  $\text{Cu}_2^{76}\text{Se}$  ターゲットから乾式蒸留法により分離することにより製造を行うが、 $^{76}\text{Br}$  の回収率の向上には、分離の際に  $\text{Cu}_2^{76}\text{Se}$  ターゲットにかかる温度の設定が重要であった。購入した電気炉を用いて温度の最適化を行うことにより、回収率を向上させることに成功した。現在、最適化した条件を用いることで安定的に 70% 以上の  $^{76}\text{Br}$  を回収することができ、臨床に用いるのに十分な量の  $^{76}\text{Br}$  を製造することが可能である。またターゲットの土台を石英から

タングステンとすることでターゲットの再利用も可能となった。以上より、簡便かつ安価で、安定的に  $^{76}\text{Br}$  を製造する手法も開発することができた。

#### 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ohshima Y, Hanaoka H, Tominaga H, Kanai Y, Kaira K, Yamaguchi A, Nagamori S, Oriuchi N, Tsushima Y, Endo K, Ishioka NS. Biological evaluation of 3- $^{18}\text{F}$ fluoro- $\alpha$ -methyl-D-tyrosine (D- $^{18}\text{F}$ )FAMT) as a novel amino acid tracer for positron emission tomography. Ann Nucl Med 27, 314-24 (2013) 査読有  
DOI: 10.1007/s12149-013-0687-7
- ② Ohshima Y, Hanaoka H, Watanabe S, Sugo Y, Watanabe S, Tominaga H, Oriuchi N, Endo K, Ishioka NS. Preparation and biological evaluation of 3- $^{76}\text{Br}$ ]bromo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine, a novel tyrosine analog for positron emission tomography imaging of tumors. Nucl Med Biol, 38, 857-65 (2011) 査読有  
DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2011.02.001

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hanaoka H, Watanabe S, Ohshima Y, Suzuki Y, Yamaguchi A, Uehara T, Ishioka NS, Tsushima Y, Endo K, Arano Y: Development of  $^{76}\text{Br}$ -labeled  $\alpha$ -methyl L-phenylalanine for imaging tumors. 2013 Society of Nuclear Medicine Annual Meeting (Vancouver, Canada)、2013 年 6 月 8 日～12 日
- ② 大島康宏、花岡宏史、渡邊茂樹、渡辺智、須郷由美、織内昇、遠藤啓吾、石岡典子、3- $^{76}\text{Br}$ ]bromo- $\alpha$ -methyl-D-tyrosine の腫瘍 PET イメージング薬剤としての有用性の評価、第 52 回日本核医学会総会(札幌)、2012 年 10 月 12 日
- ③ 大島康宏、花岡宏史、富永英之、渡邊茂樹、織内昇、遠藤啓吾、石岡典子、3- $^{18}\text{F}$ fluoro- $\alpha$ -methyl-D-tyrosine による D 体アミノ酸トレーサーの低腎集積機構の検討、第 51 回日本核医学会総会(つくば)、2011 年 10 月 28 日
- ④ 大島康宏、花岡宏史、渡邊茂樹、織内昇、遠藤啓吾、石岡典子、PET imaging of renal and bladder tumor with 3- $^{18}\text{F}$ Fluoro- $\alpha$ -methyl-D-tyrosine (D- $^{18}\text{F}$ )FAMT)、第 70 回日本癌学会総会(名古屋)、2011 年 10 月 3 日

- ⑤ 花岡宏史、渡邊茂樹、大島康宏、織内昇、石岡典子、遠藤啓吾、Development of  $^{76}\text{Br}$ -labeled amino acid derivative for PET imaging of tumor、第 69 回日本癌学会総会(大阪)、2010 年 9 月 24 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

花岡 宏史 (HANAOKA HIROFUMI)  
千葉大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：50361390

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし