

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591826

研究課題名(和文)チミジンホスホリラーゼ阻害剤に基づくがん内用放射線治療薬剤の開発

研究課題名(英文)Development of radioiodinated uracil derivatives as radionuclide therapeutic agents for thymidine phosphorylase expressing tumors

研究代表者

大倉 一枝(OHKURA, Kazue)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：60094827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：チミジンホスホリラーゼ(TP)は多くのがんを高レベルに発現し、がんの血管新生、浸潤、転移と深く関連している。TP阻害剤を細胞殺傷性の放射性同位元素で標識し、その放射線の作用によりがん細胞を破壊する内用放射線治療薬剤の開発を目的とした。本研究ではin vitroで効果を示したTP阻害性ウラシル誘導体の¹³¹I標識合成法が確立された。また、イミダゾリジニルメチルウラシルの部分構造を変換し、TP阻害活性の制御により腫瘍集積性と低肝集積性をあわせもつ放射性ウラシル誘導体が開発可能なことが示唆された。さらに肝集積を抑制し腫瘍集積性を高めるため、体内動態制御型薬剤を設計した。

研究成果の概要(英文)：Radionuclide therapy is a propitious method for treating and prolonging the lives of patients with cancer. The expression of thymidine phosphorylase (TP) is closely associated with angiogenesis and tumor invasiveness. To develop radiopharmaceuticals for in vivo TP-targeting radiotherapy, several radioiodinated TP inhibitors were synthesized. Although the radioiodinated 5-iodo-6-(oxoimidazolidinyl)methyluracil derivative showed successful results following in vitro evaluations, the results of in vivo evaluations were inadequate for radionuclide therapy. To solve the problem of high radioactivity in the liver due to indicative physiological TP expression, a prodrug was designed to undergo conversion into a strong TP inhibitor by an enzyme overexpressed in the tumor. Although substantial investigations are required, the approach obtained from this study will pave the way for the development of in vivo TP-targeted radiotherapy.

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

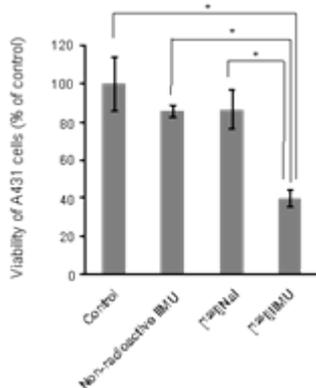
キーワード：放射線 核医学 がん治療 内用放射線治療 チミジンホスホリラーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) がんの撲滅のためのより効果的な治療法として、内用放射線治療は脚光を浴びている治療法の一つである。従来の治療法では効果の見られなかった患者においても高い治療効果を示し、日本でも⁹⁰Y 標識抗 CD20 モノクローナル抗体が新たに 2008 年に承認された。内用放射線治療は外科治療や放射線治療と比べ、放射性物質を腫瘍に集積させるという方法を生かし、所在不明であった腫瘍や複数の転移を起こしているがんの治療も可能にするという利点をもっている。しかし、内用放射線治療に用いる放射性医薬品は、その高い細胞殺傷効果をもつがゆえに、がんを選択的に集積しなければ強い副作用を起こしやすく、診断用薬剤に比べ、がん以外の組織、臓器への集積がより少ない薬剤を見出すことができるか否かが開発の成否のかぎを握る。

(2) 申請者はこれまでに、がんの悪性度や増殖などを大きく反映する血管新生に関連する酵素として核酸代謝酵素チミジンホスホリラーゼ(TP)に着目し、TP 発現に対応して集積するがん分子イメージング剤の開発が可能なることを明らかにした。すなわち、この過程でリード化合物として TP 阻害剤を用いることで、がんを集積する放射性化合物 [¹²⁵I]IIMU を見出すことができた。この TP 結合性、がん集積性の高い化合物を母体とし、細胞殺傷性の放射性同位元素で標識した化合物を用いれば、がんにも効率よく集積した化合物から放出する放射線によりがん細胞を殺傷できる可能性が極めて高いと考えた。

(3) [¹²⁵I]IIMU の皮膚がん細胞(A431)殺傷効果については、図に示すように in vitro での検討を行い、[¹²⁵I]IIMU 添加群(右端)では、対照群、非放射性 IIMU 添加群、[¹²⁵I]NaI 添加群と比べ、細胞生存率が有意に低下したことから、[¹²⁵I]IIMU は、TP 阻害による細胞傷害作用を示さないごく少量の物質でも細胞と結合した [¹²⁵I]IIMU から放出される放射線の効果によりがん細胞を殺傷できることが示された。



2. 研究の目的

本研究は、がんの内用放射線治療薬剤の開発を目的とする。TP 阻害剤をがん細胞の破壊に

効果的なオージェ電子や β^- 線を放出する放射性同位元素で標識し、この標識化合物から放出される放射線的作用により TP を発現するがん細胞を破壊し、がんを治療できることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TP を高発現した(A431)担がんマウスを用い¹²⁵I 標識 IIMU の詳細な体内動態評価を組織摘出法により行った。

(2) 担がんマウスに¹²³I 標識 IIMU を投与し、小動物 SPECT を実施した。

(3) [¹³¹I] NaI と NCS を用いた IIMU の¹³¹I 標識化を検討した。また、標識体の精製、分取、製剤化及び保存の安定性を検討した。

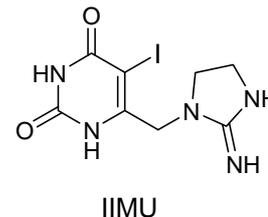
(4) IIMU 以外のイミダゾリジニルメチル型薬剤の設計・合成を行い、TP 阻害活性測定、in vitro がん細胞取り込み、マウス体内動態評価、担がんマウス体内動態評価を組織摘出法により行った。

(5) ウラシルの 6 位メチレンに種々の置換基を有する 5-ヨドウラシル誘導体を合成し、その TP 阻害活性を測定した。この中で TP 阻害活性の高い誘導体について、¹²⁵I 標識体を合成した。

(6) 体内動態化学制御型薬剤として、プロドラッグの設計をおこなった。非放射性プロドラッグを合成し、TP 阻害活性を測定した。

4. 研究成果

(1) ¹²⁵I 標識 IIMU の体内動態評価から、各組織、臓器の放射線量評価を行い、内用放射線治療に必要な投与量のレベルを推定することができた。



(2) ¹²³I 標識 IIMU を用いる担がん動物の SPECT 撮像では、腫瘍への高い集積を認めた (Fig. 1)。

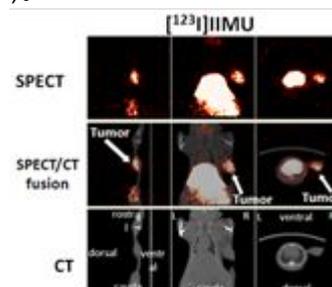


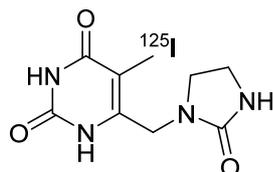
Fig. 1

また肝臓への高い集積は、TP 阻害剤の添加により低減したことから、これは TP の生理的集積に対応しているものと推定された。

(3) I-131 と I-125 の標識化では、供給さ

れる標識化剤 NaI の NaOH 溶液の濃度の違いがある。NaOH を多く含む¹³¹I NaI に種々の酸の添加などの検討を行った結果、再現性のよい、収率の高い標識方法が見出された。また、精製後の¹³¹I IIMU の安定性については、I-125 と同程度であることが明らかになった。製剤化についても、I-125 の場合と同様に行うことができた。

(4) TP 阻害性ウラシル化合物イミダゾリ



ジニルメチル誘導体¹¹C]BOMU について、以前に評価した結果、IIMU に比べ肝臓への集積が少ないこと、遅い時間点では診断薬として有用である可能性があることが示唆されていた。そこで、¹²⁵I IOMU を合成し、その体内動態を評価すれば、肝集積を低減した薬剤の開発が可能になると期待した。

IOMU の TP 阻害活性は IIMU と比べて低下した。¹²⁵I IOMU を正常マウスに投与した

Table 1. Biodistribution of ¹²⁵I IOMU following intravenous administration in balb/c mice bearing A431 tumors*

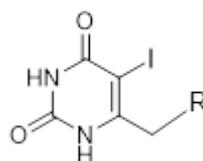
Tissue	Time after injection (min)			
	5	30	60	180
Blood	3.13 ± 0.3	0.19 ± 0.04	0.11 ± 0.03	0.34 ± 0.07
	4.10 ± 0.32	0.25 ± 0.05	0.12 ± 0.03	0.38 ± 0.09
Plasma	3.20 ± 0.70	1.28 ± 0.84	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.29
	1.73 ± 0.26	0.09 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.14 ± 0.03
Heart	2.67 ± 0.26	0.22 ± 0.03	0.27 ± 0.22	0.37 ± 0.08
	5.58 ± 0.34	0.49 ± 0.09	0.25 ± 0.03	0.22 ± 0.05
Liver	1.47 ± 0.17	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.24 ± 0.04
	15.14 ± 2.4	0.73 ± 0.19	0.25 ± 0.05	0.41 ± 0.23
Kidney	1.26 ± 0.82	0.67 ± 0.50	1.44 ± 1.25	1.99 ± 0.07
	7.4 ± 0.86	9.45 ± 1.31	6.77 ± 2.64	0.54 ± 0.11
Small intestine	1.97 ± 0.3	1.93 ± 0.47	6.78 ± 3.79	8.62 ± 1.40
	1.25 ± 0.64	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.13 ± 0.12
Muscle	0.13 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
	0.13 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00

* Each value represents the % injected dose/gram tissue and is the mean ± S.D. for four mice.

ところ、肝集積は投与 30 分後で既に低く、2 位のカルボニル基への変換によって、他の臓器への集積を増加させることなく、低肝

集積性を付与できる可能性が示された。培養細胞とのインキュベーション実験では、¹²⁵I IOMU は TP 発現に対応した腫瘍集積性を示す可能性が示されたものの、担がんマウスに投与したところ、Table 1 に示すように腫瘍集積性は低いものであった。¹²⁵I IOMU は十分な腫瘍集積性を示さなかったが、イミダゾリジニルメチルウラシルの部分構造の変換に基づく TP 阻害活性の制御により、治療に十分な腫瘍集積性と低肝集積性をあわせもつ放射性ウラシル誘導体が開発可能なことが示唆された。

(5) ウラシルの 6 位メチレン鎖にアミノ基、水酸基などを導入した誘導体を合成した。このうち、TP 阻害活性が高い化合物について、125-I を導入した



しかしながら、標識化が低収率であること、精製段階における分解を伴ったことから、さらに検討が必要であると考えられた。

(6) TP 阻害活性の強い IIMU は腫瘍に集まるとともに肝臓への高い集積も認めた。この分布は肝臓に生理的に発現している TP に集積していることが示唆された。そこで TP 阻害活性のないプロドラッグ[不活性型]を投与し、腫瘍に発現する酵素により、これを TP 阻害活性の高い[活性型]に変換し、放射性同位元素で標識した活性型薬物から放射される放射線で腫瘍細胞を殺傷する方法を計画した。この度設計したプロドラッグおよび[活性型]化合物(非放射性)を合成し、その TP 阻害活性を測定したところ、プロドラッグ[不活性型]にはほとんど TP 阻害活性はなく、[活性型]化合物には高い TP 阻害活性が認められた。プロドラッグの放射性ヨウ素標識は円滑に進行するものの HPLC カラムによる精製後分取画分の濃縮段階での分解が著しく、これを抑制することが困難であった。今後、標識方法の検討が必要である。

本研究では、invitro 実験で効果の立証された IIMU の 131-I 標識体の合成法が確立された。また、体内分布実験の評価から、内用放射線治療のための投与レベルが推定された。IIMU の肝臓集積を低減し、より腫瘍への集積を高めるため、いくつかの誘導体を合成した。IIMU と同様にウラシル 6 位にイミダゾリジンを有する化合物 IOMU は肝集積は低減したものの、腫瘍への集積も低下し、治療薬としては不適であった。そこで、肝臓への集積が低下し、腫瘍への集積を高めることができる薬剤として、代謝活性型プロドラッグの分子

設計を行った。ヨウ素標識化に問題が残り、担がん動物の実験には至らなかったが、今後内用放射線治療薬剤を開発する上で重要な知見を与えるものと期待される。

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)

〔雑誌論文〕(計 1件)

Li H., Zhao S., Jin Y., Nishijima K., Akizawa H., Ohkura K., Tamaki N., Kuge Y. Radiolabeled uracil derivatives as a novel SPECT probe for thymidine phosphorylase suppresses accumulation into tumor cells by target gene knockdown. Nucl. Med. Commun., 32, 1211-1215 (2011). 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

Nishijima K, Zhao S, Zhao Y, Feng F, Shimizu Y, Abo N, Akizawa H, Ohkura K, Tamaki N, Kuge Y. Preparation and evaluation of IIMU for SPECT imaging thymidine phosphorylase expression in tumors, 20th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences 2013, 5,12-17, Jeju, Korea.

小橋信弥, 女池俊介, 奥村侑紀, 阿部務, 秋澤宏行, 大倉一枝, 西嶋剣一, 趙松吉, 久下裕司, 松本博樹. チミジンホスホリラーゼイメージング剤 [¹²³I]IIMU による Capecitabine の治療効果予測, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28-30 日, 横浜

趙松吉, 李花, 西嶋剣一, 秋澤宏行, 大倉一枝, 玉木長良, 久下裕司. チミジンホスホリラーゼを標的とする新規腫瘍イメージング剤 ¹²³I-IIMU の開発: マウス組織におけるチミジンホスホリラーゼ発現と ^{123/125}I-IIMU 集積との関係, 第 7 回分子イメージング学会学術集会, 2012 年 5 月 24-25 日, 浜松

西嶋剣一, 越田早織, 趙松吉, 秋澤宏行, 大倉一枝, 松本博樹, 志賀哲, 玉木長良, 久下裕司, チミジンホスホリラーゼイメージング剤 [¹²³I]5-iodo-6[(2-iminoimidazolidinyl)methyl]uracil の開発; タンパク結合測定と画像化の検討, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28-30 日, 札幌

秋澤宏行, 趙松吉, 高橋正幸, 西嶋剣一, 関興一, 玉木長良, 久下裕司, 大倉一枝, 放射性標識核酸誘導体による腫瘍の核医学診断と内用療法, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28-30 日, 札幌

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1件)

名称: ウラシル化合物又はその塩、これらを有効成分として含有するイメージング剤、およびこれらを有効成分として含有する腫瘍

診断をするためのイメージング剤

発明者: 大倉一枝, 関興一, 西嶋剣一, 高橋正幸, 久下裕司, 玉木長良, 趙松吉

権利者: 国立大学法人北海道大学

学校法人東日本学園・北海道医療大学

種類: 特許

番号: 特許第 5179811 号

取得年月日: 2012 年 1 月 18 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大倉 一枝 (OHKURA Kazue)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号: 60094827

(2) 研究分担者

久下 裕司 (KUGE Yuji)

北海道大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号: 70321958

秋澤 宏行 (AKIZAWA Hiromichi)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 90311795

(3) 連携研究者

玉木 長良 (TAMAKI Nagara)

北海道大学・大学院・医学研究科・教授

研究者番号: 30171888