

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791331

研究課題名(和文) インドメタシンをリード化合物としたCOX-2イメージング剤の開発

研究課題名(英文) Synthesis and evaluation of indomethacin ester and amide derivatives for imaging brain in COX-2

研究代表者

山本 由美 (YAMAMOTO, Yumi)

東北薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：70613446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脳への集積が向上する可能性の高いインドメタシン誘導体に着目し、脳COX-2イメージング剤の開発を行うことを目的とした。導入する側鎖を変化させた¹¹C標識インドメタシン誘導体を合成し、様々な角度から評価を行った。

研究期間全体を通じて、6種のインドメタシン誘導体を合成し、それらの¹¹C標識合成法を確立することに成功した。そしてこれらのCOX-2イメージング剤としての挙動を様々な観点から評価することによって、今後のCOX-2イメージング剤の開発研究を発展させる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to find suitable radioligands for PET studies which are targeted COX-2 in brain. Indomethacin derivatives are selected as a ligand expecting brain uptake.

We prepared and evaluated ¹¹C-labeled ester and amide analogs derived from indomethacin, with different lipophilicities. The in vivo behavior of all radiotracers in mice is characterized by low brain uptake and fast metabolic susceptibility. However, this result suggesting that the lipophilicity could be used to predict the BBB permeability for derivatives of indomethacin and related compounds. Although further structural refinement of the radiotracers is necessary to achieve better enhancement of brain uptake and sufficient metabolic stability, current results will be guiding the design of COX-2 selective radiotracers.

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：COX-2 イメージング インドメタシン 脳 脂溶性

1. 研究開始当初の背景

シクロオキシゲナーゼ(COX)は、アラキドン酸から生理活性物質であるプロスタグランジン類を産生する酵素である。COX には2つのアイソザイムが存在しており、構成型酵素である COX-1 及び、誘導型酵素である COX-2 とに大別される。このうち COX-2 は炎症により誘導されるだけではなく、脳、腎臓などに構成的に発現し、特に脳において、パーキンソン病やアルツハイマー病等の神経変性疾患との関与が示唆されている。しかしこれら病態における COX-2 の働きは未だ解明されていない。

脳における COX-2 の働きを解明するために、生体内 COX-2 分布を時間的・空間的かつ定量的にトレース可能な PET や SPECT などの COX-2 イメージング剤の研究開発が国内外で進められてきた。しかしながら、未だ成功例はない。

申請者が大学院時代より継続して取り組んできた COX-2 イメージング剤の研究開発において、ピラゾール環、イミダゾール環、そしてインドール骨格を有する ^{11}C 標識リガンドの合成に成功した。その評価の結果、1) COX-2 に対する親和性・選択性が低いこと、2) リガンドの脂溶性の高さが非特異結合の要因となったこと、3) P 糖蛋白質などの膜排出蛋白がリガンドの COX-2 への特異結合の低下に大きく影響することを明らかにした (Fujisaki Y. et al., *Ann. Nucl. Med.*, 19, 617-625(2005), Tanaka M. et al., *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 2087-2094(2006))。

2000 年、Kalgutkar らによって、インドメタシンのカルボキシル基に、エステルもしくはアミド側鎖を導入することにより、COX-2 に対する選択性・親和性が向上するという報告が為された (Kalgutkar A.S. et al., *J. Med. Chem.*, 43, 2860-2870(2000))。また、上述の研究において、インドメタシンは P 糖蛋白質の基質とならないことを示唆したことから、申請者は、インドメタシン誘導体の側鎖を変更することにより、1) COX-2 に対する親和性・選択性、2) 脂溶性を変化させることが可能で、かつ 3) P 糖蛋白質の基質とならず、脳への集積が向上するのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究期間内において、インドメタシン誘導体の効率的な合成法を確立し、合成した誘導体の COX-2 に対する阻害活性を評価する。その中で特に COX-2 に対する選択性・親和性の高い化合物を選出し、 ^{11}C によるインドメタシン誘導体の標識化を検討する。インドメタシン誘導体の ^{11}C 標識合成法を確立させた後、得られた ^{11}C 標識体の脂溶性などの物理化学的情報を求めるとともに、正常マウスを用いた生体内分布評価などにより、安定性、薬物動態を評価し、脳における COX-2 イメージング剤としての有用性を明らかにする。

並行して、得られたインドメタシン誘導体に関して、蛋白結合率・膜透過性試験、P 糖蛋白質発現細胞を用いた輸送実験等により、導入した側鎖とその *in vitro* における挙動との関係を精査することで、より効率的な COX-2 イメージング剤の開発手法を模索する。

以上の方法により、COX-2 イメージング剤としての ^{11}C 標識インドメタシンの誘導体の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は(1) 化合物の合成及び阻害活性の評価、(2) ^{11}C 標識及び *in vivo* 評価、(3) *in vitro* 評価の3つの研究項目に分けられる。

(1) 化合物の合成及び阻害活性の評価

報告されている文献 (Kalgutkar A.S. et al., *J. Med. Chem.*, 43, 2860-2870(2000)) を元に、数種類のインドメタシン誘導体を合成する。先ず初めに合成する化合物は文献に記載されている2種の化合物とし、それらの合成法を基にしてさらに様々な側鎖を持つ4種のインドメタシン誘導体を合成した。

また、阻害活性の評価に関しては、Cayman chemical 社より販売されている Colorimetric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay kit を使用し、本化合物の COX-2 阻害活性および選択性を評価した。

(2) ^{11}C 標識及び *in vivo* 評価

^{11}C 標識のための標識前駆体として、インドメタシン誘導体を脱メチル化したフェノール体を文献 (Hu W. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 11, 1153-1160(2003)) に従い合成した。また、 ^{11}C 標識は $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{OTf}$ により行った。

合成した ^{11}C 標識体は、1-オクタノールと生理的リン酸緩衝液による shake-flask method (Wilson A.A. et al., *Appl. Radiat. Isot.*, 54, 203-208(2001)) によって脂溶性の指標である $\log P$ 値を求めた。*in vivo* 評価は ^{11}C 標識体を正常マウスに投与する生体内分布実験、COX 阻害剤との同時投与による阻害実験、Cyclosporine A 前投与による P 糖蛋白質阻害下生体内分布実験、及び代謝分析を行い、これら *in vivo* 評価により、合成した ^{11}C 標識体の COX-2 イメージング剤としての有用性を評価した。

(3) *in vitro* 評価

合成したインドメタシン誘導体を用いて、P 糖蛋白質等、膜排出蛋白質が多く発現しているとされる Caco-2 細胞を用いた monolayer efflux assay (Collett A. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288, 171-288(1999), Petr P. et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312, 144-152(2005)) により、インドメタシン誘導体の P 糖蛋白質に対する親和性を評価した。

以上3つの研究項目にて合成・評価を行い、得られた結果から、インドメタシン誘導体のCOX-2 イメージング剤としての可能性について考察を行った。

4. 研究成果

インドメタシン誘導体の効率的な合成法の確立を行い、総収率最大70.6%にて6種のインドメタシン誘導体の合成に成功した。その後、合成した6種のインドメタシン誘導体のCOX-2に対する阻害活性評価を行ったところ、6種のうち5種のインドメタシン誘導体においてCOX-2に対する選択性・親和性が認められた。これら5種の化合物に対し、¹¹Cによるインドメタシン誘導体の標識化を検討し、インドメタシン誘導体の¹¹C標識合成法を確立することに成功した。

得られた¹¹C標識体の脂溶性を求めるとともに、正常マウスを用いた生体内分布評価を行ったところ、正常マウスへの投与後1分の¹¹C標識インドメタシン誘導体の脳取り込み量は、化合物の脂溶性の指標であるlogP_{7.4}値と負の相関があることが明らかとなった。この脳取り込みは保持されず、¹¹C標識インドメタシン誘導体の脳クリアランスが高い傾向にあることが認められたが、この高い脳クリアランスの原因の一つとして、BBB上に存在するP糖タンパク質等の膜排出タンパク質の関与を示唆する結果が得られた。

Caco-2細胞を用いた脳移行性評価には¹¹C標識体は適さないため、*in vitro*評価を可能とする¹⁴C標識体の合成を試み、¹¹Cだけでなく¹⁴Cでの標識合成にも成功した。

Caco-2細胞を用いた脳移行性評価によって、合成したインドメタシン誘導体のうち2種の化合物において、flux ratio>3.5となり、P糖タンパク質等の膜排出タンパク質と高い親和性があることを明らかにした。この結果は*in vivo*評価結果を支持する結果であることから、インドメタシン誘導体の脳移行性にはP糖タンパク質等の膜排出タンパク質の寄与が大きいことを強く示唆していると言える。

研究期間全体を通じて、6種のインドメタシン誘導体を合成し、それらのうちCOX-2選択性および親和性を有する5種の¹¹C標識合成法を確立することに成功した。そしてこれらのCOX-2イメージング剤としての挙動を様々な観点から評価することによって、今後のCOX-2イメージング剤の開発研究を進展させうる知見を得た。

今後は、本研究課題で明らかとなったCOX-2イメージング剤として求められる性質を満たしうる、ニメスリドを母体骨格とした誘導体の合成および評価を軸として研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yumi Yamamoto, Kiichi Ishiwata, Jun

Toyohara, Kouhei Sano, Fumihiko Yamamoto, *Takahiro Mukai, and *Minoru Maeda, “¹¹C-Labeled Analogs of Indomethacin Esters and Amides for Brain Cyclooxygenase-2 Imaging: Radiosynthesis, In Vitro Evaluation and In Vivo Characteristics in Mice”, *Chem. Pharm. Bull.*, 59(8), 938-946, (2011), 査読あり

DOI:10.1248/cpb.59.938

Tomonori Kobayashi, *Yohei Saito, Yosuke Ohtake, Akiko Maruko, Yumi Yamamoto, Fumihiko Yamamoto, Yoshikazu Kuwahara, Motoi Fukumoto, Manabu Fukumoto, Yasuhito Ohkubo, Effect of aging on norepinephrine-related proliferative response in primary cultured periportal and perivenous hepatocytes., *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 303(7), G861-869, (2012), 査読あり

DOI:10.1152/ajpgi.00081.2012

〔学会発表〕(計14件)

齋藤 陽平, 小林 智徳, 山本 由美, 山本文彦, 大久保 恭仁

肝再生における脂質代謝への加齢の影響
日本薬学会第134年会、2014年3月28-30日、熊本

長嶋 春香, 山本 由美, 関 成美, 堀切 美里, 齋藤 陽平, 山本文彦, 大久保 恭仁
脳COX-2を標的としたindomethacin dibenzoyl thiamideの合成と評価

日本薬学会第134年会、2014年3月28-30日、熊本、**年会優秀発表賞受賞**

安彦 亮, 齋藤 陽平, 桑原 義和, 山本 由美, 山本文彦, 福本 学, 大久保 恭仁

肝がん細胞株HepG2の放射線耐性獲得に対するTransglutaminase 2の関与
日本薬学会第134年会、2014年3月28-30日、熊本

齋藤 陽平, 桑原 義和, 山本 由美, 山本文彦, 福本 学, 大久保 恭仁

シンポジウムS1E-4 新たな創薬標的としてのトランスグルタミナーゼ2の多機能性について「肝がん細胞のTG2による増殖応答制御」

第87回日本薬理学会年会、2014年3月19-21日、仙台

山本 由美, 長嶋 春香, 森本 浩之, 向 高弘, 大嶋 孝志, 齋藤 陽平, 山本文彦, 大久保 恭仁, 前田 稔

COXイメージングを目的としたニメスリド誘導体の合成と評価

第53回日本核医学会学術総会、2013年11月8-10日、福岡

木村 光晴, 山本文彦, 大西 いぶき, 牧野 顕, 山本 由美, 齋藤 陽平, 小関 英一, 木村俊作, 大久保 恭仁

¹²⁵I標識A₃B型ラクトソームの病態モデル

動物を用いた基礎評価
第 53 回日本核医学会学術総会, 2013 年 11 月 8-10 日、福岡
小林 智徳、齋藤 陽平、山本 由美、山本文彦、大久保 恭仁
EGCG による EGF 応答性加齢ラット正常肝細胞に対する影響
日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28-30 日、横浜
大西 いぶき、山本文彦、木村 光晴、原恵理、原 功、牧野 顕、山本 由美、齋藤 陽平、小関 英一、木村 俊作、大久保 恭仁
¹²⁵I 標識 A₃B 型ラクトソームの合成と腫瘍モデルマウスにおける生体内分布
第 12 回放射性医薬品・画像診断薬研究会, 2012 年 12 月 15 日、京都
Tomonori Kobayashi, Yohei Saito, Hidekazu Takahashi, Mistutaka Watanabe, Yumi Yamamoto, Fumihiko Yamamoto, Yasuhito Ohkubo
The Effect of Aging on Lipid Metabolism and Proliferative Capacity During Liver Regeneration
第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日、福岡
大西 いぶき、山本文彦、柴田 彩佳、中澤 由香里、金夫 有惟、木村 光晴、牧野 顕、原 功、山本 由美、齋藤 陽平、小関 英一、木村 俊作、大久保 恭仁
A₃B 型ラクトソームの ¹²⁵I 標識体合成と基礎的評価
第 51 回日本薬学会東北支部大会, 2012 年 10 月 7 日、青森
山本 由美、高橋 佳那江、千葉 真由美、長嶋 春香、齋藤 陽平、山本文彦、前田 稔、大久保 恭仁
COX-2 イメージングを目的とした indomethacin 誘導体の *in vitro* 脳移行性評価
第 51 回日本薬学会東北支部大会, 2012 年 10 月 7 日、青森、若手研究者発表賞 受賞
長嶋 春香、山本 由美、高木 栄里佳、齋藤 陽平、山本文彦、大久保 恭仁
脳 COX-2 イメージングのための indomethacin dibenzoyl thiamide の合成
第 51 回日本薬学会東北支部大会, 2012 年 10 月 7 日、青森
小林 智徳、齋藤 陽平、桑原 義和、福本基、福本 学、山本 由美、山本文彦、大久保 恭仁
EGF 応答性細胞増殖に及ぼす電離放射線および加齢の影響
日本放射線影響学会 第 55 回大会, 2012 年 9 月 6-8 日、仙台
小林 智徳、齋藤 陽平、岸田 彰、工藤 千春、桑原 義和、福本 基、福本 学、山本 由美、山本文彦、大久保 恭仁
放射線耐性肝がん細胞の細胞増殖能
日本放射線影響学会 第 55 回大会, 2012 年 9 月 6-8 日、仙台

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/hosya/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 由美 (YAMAMOTO, Yumi)
東北薬科大学・薬学部・助手
研究者番号 : 7 0 6 1 3 4 4 6