

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791357

研究課題名(和文)ピクテスベングラール反応により導入した短寿命PETペプチドプローブの合成と評価

研究課題名(英文)Radiosynthesis and evaluation of peptide probe containing short-lived positron-emitting radionuclides via a Pictet-Spengler reaction

研究代表者

破入 正行 (Hanyu, Masayuki)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：80435552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：短寿命PET核種の一つである炭素11をピクテスベングラール反応によってオリゴペプチドへの導入を試み、以下の結果を得た。(1)炭素11標識前駆体の一つである炭素11ホルムアルデヒドとLys残基の側鎖にTrp塩酸塩を導入した無保護の環状RGDペプチドとの反応を遠隔合成装置により行い、合成終了時の収率が $5.9 \pm 1.9\%$ で得ることに成功した。(2)炭素11標識RGDペプチドを膵がん由来BxPC3とMIAPaca-2細胞を移植したマウス体内の臓器移行性の実験から、このペプチドはBxPC3細胞に集積することがわかった。さらにPETイメージングも行い臓器移行性の結果と一致することも併せて確認した。

研究成果の概要(英文)：A procedure for the synthesis of a carbon-11 labeled oligopeptide containing [1-11C]1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid ([1-11C]Tpi) from the corresponding TrpHCl-containing peptides has been developed involving a Pictet-Spengler reaction with [11C]formaldehyde. The radiolabeling of a TrpHCl-containing RGD peptide using the Pictet-Spengler reaction was successful. Furthermore, the remote-controlled synthesis of a [1-11C]Tpi-containing RGD (1) peptide was attempted using an automatic production system to generate [11C]CH3I. The radiochemical yield of the compound 1 at the end of synthesis was 5.9% (n=4), for a total synthesis time of about 35 min. The usefulness of our synthesis was demonstrated PET studies using the compound 1 for the mouse bearing MIAPaca-2 and BxPC-3, a small cell pancreatic cancer cell line. The BxPC-3 cell-to-muscle and MIAPaca-2 cell-to-muscle of 1 at 22 min were retained at a low level of 2.8 and 1.3, respectively.

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：PETイメージング ピクテスベングラール反応 遠隔合成装置 オリゴペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年、短寿命 PET 核種をオリゴペプチド鎖に直接的に導入する、言い換えれば標識反応点としてキレート剤をペプチド鎖に導入しない方法による標識方法が報告されている。例えば、ペプチド N 末端に安息香酸誘導体を導入した後、フッ素 18 (半減期 110 分) を高温で反応することでフッ素 18 標識オリゴペプチドが調製されている。一方、PET 薬剤を製造する観点から推察すると高い放射エネルギーを用いて製造する場合、被ばくすることを考慮して遠隔装置を用いた合成方法の検討が必要となる。しかしながら、遠隔装置における合成方法は種々の制限がある、すなわち多段階反応を行うには設備などを大幅に変更する必要があり、操作も非常に複雑となる。また反応に用いられる試薬数が多ければ精製 (および品質検査) における煩雑さが増えることも容易に予測される。より簡便でより温和な条件でかつ遠隔装置に適したオリゴペプチド鎖への標識方法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

標識中間体として  $[^{11}\text{C}]$ ホルムアルデヒドを用いて、ピクテスベンガラール反応によるテトラヒドロカルボリン骨格を有する  $[1-^{11}\text{C}]1,2,3,4$ -テトラヒドロ- $\beta$ -カルボリン-3-カルボン酸 ( $[1-^{11}\text{C}]\text{Tpi}$ ) の調製に成功した (図 1)。重要な結果として、Trp の  $\alpha$ -アミノ基が塩酸塩であればピクテスベンガラール反応が進行する点と  $[1-^{11}\text{C}]\text{Tpi}$  は癌細胞に取り込まれない。この結果から、様々なイメージングの標的となるペプチドの前駆体は N 末端に Trp 塩酸塩を導入するのみで標識が可能となり、アルデヒド基をもつ炭素 11 またはフッ素 18 の標識中間体を調製できれば様々な標識オリゴペプチドの簡便な標識方法が確立できることも推察される。

本研究は短寿命 PET 核種をピクテスベンガラール反応によってオリゴペプチドへ導入する方法を見出し、標識化されたペプチドの生体内挙動を明らかにする。

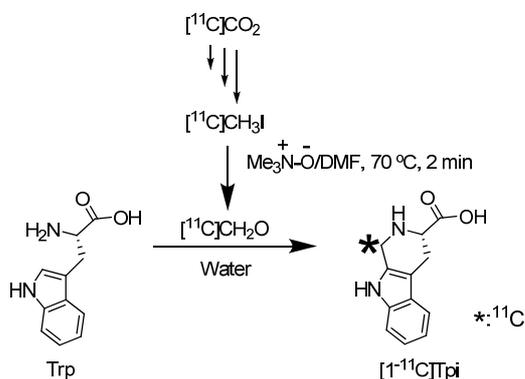


図 1 炭素 11 ホルムアルデヒドを用いたピクテスベンガラール反応による標識方法

3. 研究の方法

(1) フッ素 18 標識中間体の調製とオリゴペプチドへの導入

フッ素 18 を有する標識中間体として  $[^{18}\text{F}]$ ベンズアルデヒドおよび  $[^{18}\text{F}]$ アセトアルデヒドの調製を試み、モデル化合物として Trp を用いて種々の反応条件を精査した。

(2) 炭素 11 標識オリゴペプチドの合成と生体内挙動

炭素 11 標識オリゴペプチドの調製は  $[^{11}\text{C}]$ ホルムアルデヒドとペプチドの N 末端または Lys 側鎖に Trp を導入したオリゴペプチドとの間のピクテスベンガラール反応を手合成により検討を行った後、合成装置を用いた製造を検討した。また胆癌マウスモデルとしてヒトすい臓がん由来 BxPC3 細胞、MIA PaCa-2 細胞および AsPC-1 細胞を移植した。その胆癌マウスを標識化ペプチドの組織移行性および PET イメージングに用いた。

4. 研究成果

(1) フッ素 18 標識中間体の調製とオリゴペプチドへの導入

最初に Trp と  $4-[^{18}\text{F}]$ フルオロベンズアルデヒドとのピクテスベンガラール反応を検討した。 $4-[^{18}\text{F}]$ フルオロベンズアルデヒドの合成は  $\text{F}-^{18}\text{F}$  交換反応または  $4$ -ニトロベンズアルデヒドから誘導した。種々の反応条件を検討したが目的化合物は得られなかった。これは芳香族アルデヒドと Trp のアミノ基との間でイミンを形成するが、そのイミンが安定であるためそれ以上反応が進行しないためだと考えられる。次に脂肪族アルデヒドである  $[^{18}\text{F}]$ フルオロアセトアルデヒドと Trp のピクテスベンガラール反応を検討するため、 $[^{18}\text{F}]$ フルオロアセトアルデヒドの調製を試みた。エチルジトシレートと  $\text{K}[^{18}\text{F}]$ との反応により  $[^{18}\text{F}]$ の導入に成功した。次いで DMSO による酸化を試みたが反応は進行せず目的化合物である  $[^{18}\text{F}]$ フルオロアセトアルデヒドは得ることができなかった。 $[^{18}\text{F}]$ フッ素化の効率が多少劣るものの基質としてプロモアセトアセタールから誘導する  $[^{18}\text{F}]$ フルオロアセトアルデヒドの調製も併せて試みた。一段階目の  $[^{18}\text{F}]$ フッ素化、二段階目の酸加水分解を行ったものの目的化合物の収率は非常に悪く、現在収率の改善を試みている。

(2) 炭素 11 標識オリゴペプチドの合成と生体内挙動

最初に炭素 11 ホルムアルデヒドと Trp 塩酸塩誘導体との間のピクテスベンガラール反応を検討し、種々の  $[1-^{11}\text{C}]\text{Tpi}$  誘導体を構築した。芳香環部位に電子供与基を有する Trp 塩酸塩誘導体は標識反応が進行したのに対して電子吸引基をもつ Trp 塩酸塩誘導体は標識反応が全く進行しなかった。この結果から、炭素 11 ホルムアルデヒドのピクテスベンガラール反応において芳香環の塩基性の制御

が非常に重要であることがわかった。また Trp エチルエステル塩酸塩、Trp アミド塩酸塩と N-メチル Trp 塩酸塩を用いても中程度の収率で目的物を得た。この結果からオリゴペプチドに Trp 塩酸塩を導入することで炭素 11 標識が可能となることが示唆された。

標識するオリゴペプチドとして、Trp-Gly, Trp-Asp-Gly-Glu-Ala, cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys[Trp])の三種類を用いて反応を検討した。Trp 塩酸塩および標品である Tpi を含むペプチドは通常用いられる固相合成法、環状 RGD では活性エステル法により Trp および Tpi を含むペプチドを合成した。炭素 11 ホルムアルデヒドとのピクテスベングラー反応を手合成で行った結果、 $[1-^{11}\text{C}]$ Tpi-Gly の収率が 57%,  $[1-^{11}\text{C}]$ Tpi-Asp-Gly-Glu-Ala の収率が 61%, cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys( $[1-^{11}\text{C}]$ Tpi))(1, 図 2) の収率が 22%であった。この反応においてペプチドの官能基(グアニジノ基、カルボン酸、フェノール性水酸基、アミド結合)に影響を及ぼさないことも確認した。この結果から、無保護のオリゴペプチドでも標識反応ができることがわかった。次に遠隔合成装置を用いた標識反応を行い、炭素 11 二酸化炭素の放射能 21.0 GBq から 22.2 GBq を用いて放射化学的収率  $5.9 \pm 1.9\%$  (n=4) で化合物 **1** を得た。さらに cyclo(Arg-Ala-Asp-D-Tyr-Lys( $[1-^{11}\text{C}]$ Tpi))(2) も放射化学的収率  $4.3 \pm 1.5\%$  (n=4) で得ることに成功した。

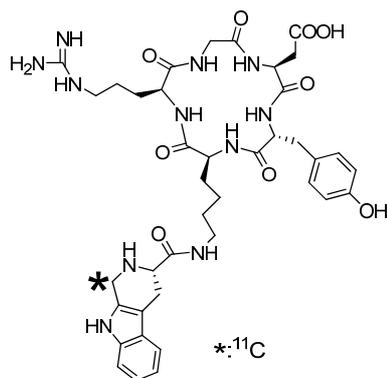


図 2 cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys( $[1-^{11}\text{C}]$ Tpi)) の構造式

ヒトすい臓がん由来 BxPC-3 細胞、MIA-Paca-2 細胞および AsPC-1 細胞を移植したマウスに化合物 **1** および **2** を尾静脈から投与し、その臓器移行性を調べた(図 3、4)。その結果、化合物 **1** は BxPC-3 細胞に移行するのに対して、MIA-Paca-2 細胞および AsPC-1 細胞には移行しなかった。また化合物 **2** は癌細胞に集積が認められない。これは化合物 **1** が細胞膜上の  $\alpha\text{V}\beta 3$  インテグリンを認識しているからだと考えられる。さらに BxPC-3 細胞、MIA-Paca-2 細胞を移植したマウスに化合物 **1** または **2** を尾静脈から投与し PET イメー

ジングを行った(図 5)。その結果、化合物 **1** は BxPC-3 細胞に集積した。PET イメージングと組織移行性の結果が一致したことを確認した。

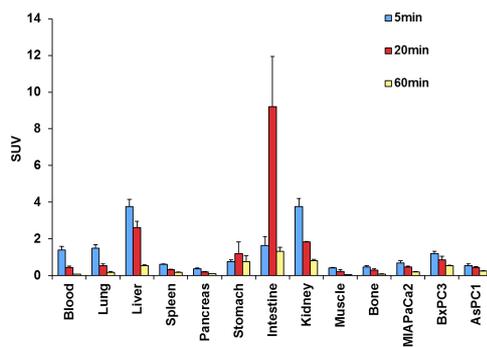


図 3 cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys( $[1-^{11}\text{C}]$ Tpi)) の臓器移行性

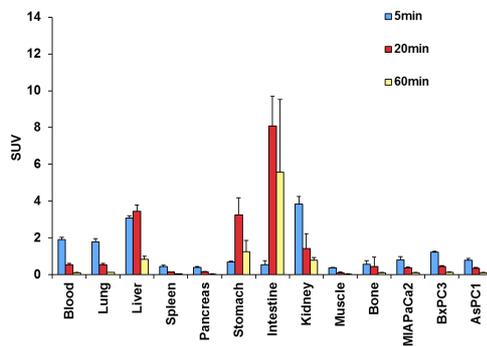


図 4 cyclo(Arg-Ala-Asp-D-Tyr-Lys( $[1-^{11}\text{C}]$ Tpi)) の臓器移行性

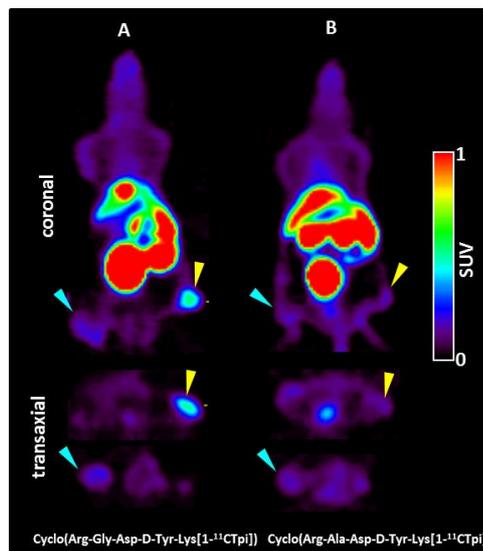


図 5 投与 50-60 分後の PET 画像 (青色矢印: MIA-Paca-2 細胞; 黄色矢印 BxPC-3 細胞) A: cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys( $[1-^{11}\text{C}]$ Tpi)) B: cyclo(Arg-Ala-Asp-D-Tyr-Lys( $[1-^{11}\text{C}]$ Tpi))

## 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 4 件)

(1) Masayuki Hanyu, Aya Sugyou, Aung U Winn, Atsushi Tsuji, Kazunori Kawamura, Tsuneo Saga, Ming-Rong Zhang, Toshimitsu Fukumura, Radiolabeling and Preliminary PET Study of Carbon-11 Labeled Amino Acids and Oligopeptides by Using Carbon-11 Formaldehyde; Peptide Science 2013, Y. Nishiuchi and T. Teshima (Ed.), The Japanese Peptide Society, 181-182, 2014. (査読有)

(2) Masayuki Hanyu, Yuuki Takada, Hiroki Hashimoto, Kazunori Kawamura, Ming-Rong Zhang, Toshimitsu Fukumura, Carbon-11 radiolabeling of an oligopeptide containing tryptophan hydrochloride via a Pictet-Spengler reaction using carbon-11 formaldehyde, Journal of Peptide Science, 2013, 19(10), 663 - 668, 2013. (査読有)

(3) Masayuki Hanyu, Yuuki Takada, Hiroki Hashimoto, Kazunori Kawamura, Ming-Rong Zhang, Toshimitsu Fukumura, Radiolabeling of oligopeptides containing [1-<sup>11</sup>C]-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxylic acid via a Pictet-Spengler reaction; Peptide Science 2012, K. Sugimura (Ed.), The Japanese Peptide Society, 303-304, 2013. (査読有)

(4) Yuuki Takada, Masayuki Hanyu, Koutarou Nagatsu, Toshimitsu Fukumura, Radiolabeling of aromatic compounds using K[\*Cl]Cl and OXONE, Journal of Labeled Compounds & Radiopharmaceuticals, 2012, 55(10), 383 - 386. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) Masayuki Hanyu, Aya Sugyou, Aung U Winn, Atsushi Tsuji, Kazunori Kawamura, Tsuneo Saga, Ming-Rong Zhang, Toshimitsu Fukumura, Radiolabeling and Preliminary PET Study of Carbon-11 Labeled Amino Acids and Oligopeptides by Using Carbon-11 Formaldehyde; 4<sup>th</sup> Asia-Pacific International Peptide Symposium, in conjunction with the 50<sup>th</sup> Japanese Peptide Symposium, 2013, 11/08, OSAKA.

(2) Masayuki Hanyu, Atsushi Tsuji, Kazunori Kawamura, Ming-Rong Zhang, Toshimitsu Fukumura, Radiosynthesis and preliminary PET study of an <sup>11</sup>C-labelled RGD peptide containing [1-<sup>11</sup>C]1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid; 10<sup>th</sup> Australian Peptide Conference, 2013, 09/13, Penang, MALAYSIA.

(3) 破入正行, 高田由貴、橋本裕輝、河村和紀、張明榮、福村利光, Pictet-Spengler 反応を経由した[1-<sup>11</sup>C]1,2,3,4-テトラヒドロ-β-カルボリン-3-カルボン酸を含むオリゴペプチドの標識反応, 第49回日本ペプチド学会, 2012年11月09日, 鹿児島

(4) 高田由貴、破入正行、福村利光, オキソンをういた芳香族化合物への放射性塩素標識に関する研究, 日本核医学会, 2012年10月12日, 札幌

(5) 破入正行, 橋本裕輝, 河村和紀, 福村利光, ピクテ-スベングラー反応を用いた[<sup>11</sup>C]-テトラヒドロカルボリン誘導体の合成, 日本核医学会, 2012年10月11日, 札幌

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

破入 正行 (Hanyu Masayuki)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号: 80435552