

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293271

研究課題名(和文) 実用化を目指した有望なDNA合成画像診断薬4DSTの18F化とその臨床応用

研究課題名(英文) Development of fluorine-18 labeled 4DST derivatives for clinical use

研究代表者

豊原 潤 (Toyohara, Jun)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：50425659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では18F標識4DSTの開発を目的とした。5-fluoromethyl体は不安定で単離できなかった。5-fluoroethyl体は標識可能であったが、体内分布試験の結果、腫瘍への集積性を示さなかった。5-fluoro体は銅ピリジン錯体を用いるスズ体のフッ素化反応により標識可能であったが、収率が低く標識条件の最適化が必要であった。最も有望な5-fluoro体についてスクリーニング毒性試験を行ったところ、静脈内単回投与毒性試験では臨床予定投与量の1000倍でも異常を認めなかったが、遺伝毒性試験(Ames)試験では大腸菌株についてのみ変異原性を認めた。

研究成果の概要(英文)：The thymidine derivative 11C-4DST has the potential to visualize in vivo DNA synthesis rates with positron emission tomography (PET). To expand the use of 4DST needs the fluorine-18 version of this compound. In this study, we tried to synthesize the 18F-4DST analogues for practical use of DNA synthesis imaging. The three candidates were selected. The fluoromethyl version of 4DST was not stable and cannot be obtained as a purified form. The fluoroethyl version of 4DST can be labeled with using N3-Boc-3',5'-di-O-tolyl-5-tosyloxyethane precursor. However, biodistribution studies did not show tumor selective uptake. The 5-fluoro version of 4DST could be labeled by 18F anion with Cu-mediated nucleophilic fluorination of tin-precursor. However, the yields were very low. The acute toxicity studies indicate 5-fluoro-4DST is acceptable as PET drug for human use. In contrast, 5-fluoro-4DST has mutagenic activity in E. Coli as indicated by the Ames study.

研究分野：放射性医薬品科学

キーワード：核医学 PET 放射性医薬品

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍は、自身の組織を構成する正常細胞の一部から発生した異常な細胞であり、制御不能な細胞増殖をする細胞集団であって、周囲の組織に浸潤または転移を起こす。このため、がん細胞の増殖能 (=DNA 合成能) 評価は、がんの病理学的診断において必須の評価項目となっている。

(2) この DNA 合成を評価する方法としては、³H-チミジンを用いたパルスラベル法による DNA 合成 評価法がゴールドスタンダードとされているが、近年では代替法として細胞周期に応じて発現する核抗原に対する免疫組織染色法が一般的に使用されている。しかし、いずれの方法も生きているヒトから組織を摘出する侵襲的な検査法であり、組織ヘテロジェナイエティの問題が残っている。

(3) 一方、PET では生きているヒト体内でのがん細胞増殖能を非侵襲的かつ丸ごと評価できると期待され、この目的を達成するため、1972 年には ¹¹C-チミジンが世界で初めて酵素的に合成され、それ以降、様々な核酸誘導体が開発されてきた。中でも 1998 年には、生体内で安定なチミジンアナログの ¹⁸F-FLT が開発され、欧米を中心にその有用性が検討されている。しかし、¹⁸F-FLT の細胞集積は DNA 合成の律速段階に存在するチミジンキナーゼ活性を反映するものであり、原理的に DNA 合成を画像化する薬剤ではなく、DNA 合成のインビボ測定は未だ達成されていなかった。

(4) この様な状況に対して、豊原らは ³H-チミジンと同様に DNA 合成が評価可能でなおかつインビボでの DNA 合成画像を実現する目的で、生体内での安定性を高めた様々な核酸誘導体を検討し、最も理想的な薬剤として ¹¹C-4DST (以前の論文では ¹¹C-S-dThd と表記) を見出した。前臨床研究の結果から、¹¹C-4DST の高い有用性を見だし、2010 年 3 月より ¹¹C-4DST-PET の臨床研究を開始し、国内 4 施設で多施設共同の臨床研究を展開している。

(5) 初期臨床試験の結果、¹¹C-4DST の脳腫瘍への放射能集積は治療状況に応じて変化に富む集積性を示し、同時に撮像したアミノ酸 PET 薬剤の ¹¹C-メチオニンとは明らかに異なる結果を示し、特に、放射線治療や抗がん剤の治療に対する腫瘍細胞の反応性を鋭敏にとらえられる可能性が示唆された。¹¹C-4DST の脳腫瘍における動態解析結果は、¹¹C-4DST が DNA へ取り込まれていることを指示するものであった。また、SUV 画像による半定量的な解析でも DNA 合成画像が得られる可能性が示唆された。さらに、原発性肺がんにおける検討から、¹¹C-4DST

の集積度は病理組織学的な増殖マーカーである Ki-67 と高い相関を示し、¹¹C-4DST の細胞増殖 (=DNA 合成) 診断剤としての有用性を確固たるものとした。

(6) 以上の様に、¹¹C-4DST は日本で独自に開発された PET 薬剤であり、臨床への還元を目指して臨床研究が進められている。しかしながら、この有用な検査法のさらに多施設・多種類のがんへの応用を展開するためには、サイクロトロンを保有しない施設への薬剤供給や検査の利便性を考慮すると ¹⁸F で標識された 4DST 誘導体の開発が必須であった。

2. 研究の目的

本研究では、¹⁸F 標識 4DST 誘導体の開発を試み、その臨床応用にまで達成することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ¹⁸F 標識 4DST 誘導体として、3 化合物 (図 1 参照; ¹⁸F-1, ¹⁸F-2, ¹⁸F-3) の標識前駆体および標準品の合成を計画した。

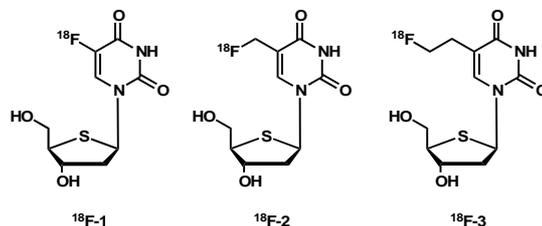


図 1. ¹⁸F 標識 4DST 誘導体候補化合物

(2) ¹⁸F 標識は、¹⁸F-1 に関しては求電子試薬 (¹⁸F-F₂ もしくは CH₃COO¹⁸F) によるウラシル二重結合への付加反応もしくはトリブチルスズ標識前駆体との置換反応を行う。¹⁸F-2 は CH₂I₂ から合成した ¹⁸FCH₂I を用いたトリブチルスズ標識前駆体との C-C クロスカップリング反応もしくは脱離基を有する標識前駆体に対する ¹⁸F アニオンを用いた求核置換反応を行う。¹⁸F-3 の合成は脱離基を有する標識前駆体に対する ¹⁸F アニオンを用いた求核置換反応を行う。水酸基及びアミンの脱保護の後、目的物を得ることを計画した。

(3) 候補化合物のスクリーニング毒性試験として、コールド体の静脈内淡海投与毒性試験ならびに遺伝毒性試験 (Ames 試験) を計画した。

4. 研究成果

(1) 候補化合物のコールド体の合成を試みたところ、5-FCH₂ 体の F-2 化合物化合物は単離後速やかに分解する事が判明し、候補化合物から除外することとした。一方、5-F 体の F-1 化合物 (HPLC 純度 97.6%) と

5-FC₂H₂体のF-3化合物(HPLC純度99.3%)については標品を得ることに成功した。

(2) F-3化合物の¹⁸F標識のため、脱離基にTsOを選択し、3'-OH, 5'-OHならびにN-3の保護基の異なる、以下3種類(図2参照; Pre-1-¹⁸F-3, Pre-2-¹⁸F-3, Pre-3-¹⁸F-3)の標識前駆体の合成を行い、それぞれHPLC純度92.6%, 97.8%, 95.8%で得た。

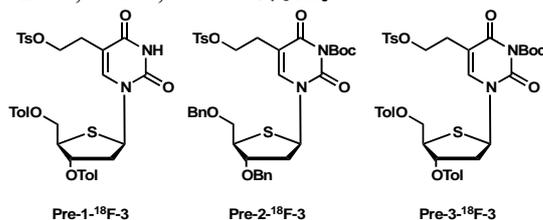


図2. ¹⁸F-F-3標識のための前駆体

(3) 塩基としてK₂CO₃を用い、相関移動触媒としてTBAもしくはK2.2.2を用いてMeCN溶媒中で¹⁸F標識を試みたところ、標識前駆体として、N-Boc-3',5'-di-O-Tol-5-ethyltosylate (Pre-3-¹⁸F-3)を用い、K₂CO₃ (0.2 eq)、K2.2.2 (0.66 eq)下で100、15分間の反応により、TLC上77.5%の収率でProtected-¹⁸F-3を得ることに成功した。引き続き、0.3 M NaOEtによる3',5'-di-O-Tolyl基の脱保護と4 M HClによる3-Boc基の脱保護反応により、目的物をTLC上20%の収率で得た。不純物は¹⁸Fアニオンのみであったため、アルミナカラムにて精製し、¹⁸F-3 (TLC純度100%)を体内分布試験に供した。

(4) S-180肉腫を移植したddYマウスに¹⁸F-3を投与し、投与30分後に屠殺し、血液、筋肉、骨および腫瘍を摘出し組織への放射能集積(%ID/g)を調べた。その結果、¹⁸F-3は骨への集積が高く、生体内での脱フッ素を認め、腫瘍への集積性も低かった。以上の結果から、5-fluoroethyl体の¹⁸F-3は候補化合物として適していない事が示された(表1参照)。

表1. ¹⁸F-3の腫瘍移植マウスにおける体内分布(n=3)

組織	%ID/g	血液比
血液	0.95 ± 0.10	1.00 ± 0.00
筋肉	0.56 ± 0.01	0.59 ± 0.05
骨	1.64 ± 0.30	1.12 ± 0.38
腫瘍	0.50 ± 0.21	0.54 ± 0.28

(5) これまでの検討結果から、残る化合物は5-F体の¹⁸F-1のみとなった。¹⁸F-1の標識には求電子試薬(¹⁸F-F₂もしくはCH₃COO¹⁸F)によるウラシル二重結合への付加反応もしくはトリブチルスズ標識前駆体との置換反応が想定されるため、標識前駆体として、3'-OH, 5'-OHならびにN-3の保護基の異なる、以下2種類(図3参照; Pre-1-¹⁸F-2, Pre-2-¹⁸F-2)の標識前駆体の合成

を行い、いずれもHPLC純度99.5%で得た。また、求電子反応では、比放射能が低く、大量(ca. 20-40mg)の標識前駆体を必要とするため、4'-O体のPre-¹⁸FdUrd(図3参照)を合成し(HPLC純度99.5%)標識条件の検討を行った。さらに、比放射能が低いことから安全性の懸念があるため、スクリーニング毒性試験として単回静脈内投与毒性試験と遺伝毒性試験(Ames試験)を実施した。

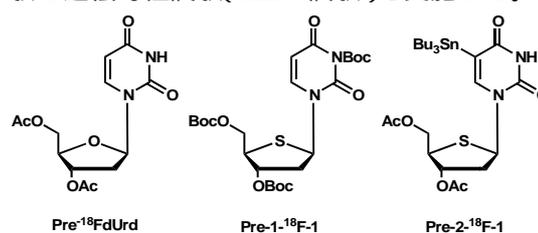


図3. ¹⁸F-F-1標識のための前駆体

(6) 類似化合物であるPre-¹⁸FdUrd(74μmol)を、5%酢酸を含むCH₂Cl₂溶液(4mL)に溶解し、室温下で[¹⁸F]F₂ガスを吹き込むことによって標識を行った。溶媒を除去したのち、1Mリン酸ナトリウム(pH11)を用いて130、5分間加熱することにより加水分解を行い、中和後分取HPLC(図4参照)にて目的物を精製した。目的物は減衰補正後収率24%、放射化学的純度100%、比放射能38MBq/μmolにて得ることに成功した。

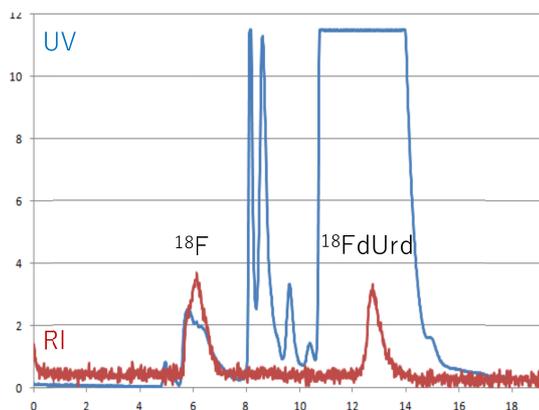


図4. ¹⁸FdUrdの分取HPLCチャート

(7) この比放射能の知見に基づき、¹⁸F-1のコード体のスクリーニング毒性試験を実施したところ、推定臨床投与量の約1,000倍のF-1を投与しても何ら毒性兆候は求められなかった。Ames試験では、高用量において細胞の増殖抑制効果が認められたため、低用量にて試験を実施したところ、E.Coliの1株において陽性を示した。

(8) ¹⁸FdUrdについて正常ddYマウス全身PET(図5参照)ならびに体内分布(図6参照)を検討したところ、分子構造から示唆されるように、チミジンホスホリラーゼが豊富な肝臓においてN-Cグリコシド結合の開裂反応を受け5-[¹⁸F]fluorouracilとなつ

た代謝物が腎臓から膀胱中に排泄された。生体内での脱フッ素に伴う骨への放射能集積が少ないことから、生体内での標識安定性は高いものと思われ、4'-S 体である ^{18}F -1 の有効性を示唆する結果であった。



図 5. マウス全身 PET 像：投与量 11.5MBq、30-90 分の画像

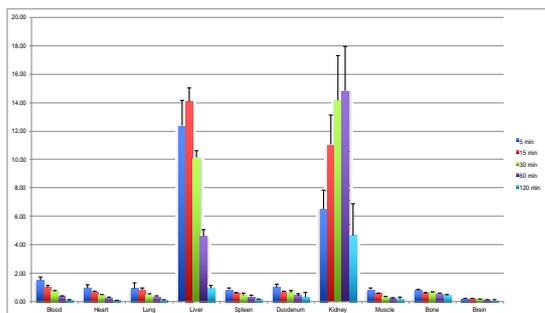


図 6. ^{18}F dUrd のマウス体内分布：縦軸(%ID/g)

(9) Ames 試験が陽性であること、推定される臨床投与量が $100\mu\text{g}$ を超え 1-2mg に相当しマイクロドーズの概念が適用できないこと、さらに高価な原料を大量に使用することなどから、 ^{18}F を用いる標識方法は臨床応用を目的とする上で現実的ではないと判断されたため、 ^{18}F アニオンを用いた標識検討を実施することとした。近年報告された方法に従い、テトラキス(ピリジン)銅(II)トリフラートをを用いて Pre-2- ^{18}F -1 を前駆体として ^{18}F 標識を試みたところ(図 7. 参照)、トレースレベル(1%)ではあるが、Protected- ^{18}F -1 の生成を TLC 上にて確認することに成功した。

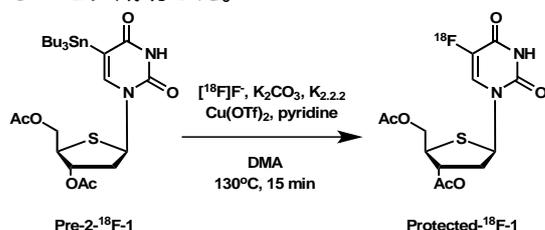


図 7. 銅触媒によるスズ体の求核置換反応による ^{18}F 化

(10) 今後、標識条件の最適化を行うことによって、臨床使用可能な品質・収量の ^{18}F -1 が得られる可能性が示唆された。この標識方法であれば、臨床投与量は数 μg 以下であり、安全性の懸念もクリアする事ができる事が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

Sakata M, 3 名, Ishii K, 3 名, Ishiwata K, Toyohara J, Initial evaluation of a novel adenosine A2A receptor ligand 11C-prelabeled in healthy human subjects. J. Nucl. Med., 査読有, 印刷中

Doi: 10.2967/jnumed.116.199474.

Sakata M, Toyohara J, 2 名, Ishii K, 1 名, Ishiwata K, Age and gender effects of ^{11}C -ITMM binding to metabotropic glutamate receptor type 1 in healthy human participants. Neurobiol. Aging, 査読有, Vol.55, 2017, 72-77.

Doi:

10.1016/j.neurobiolaging.2017.03.022.

Sakata M, 3 名, Ishii K, 1 名, Ishiwata K, Toyohara J, Assessment of safety, efficacy, and dosimetry of a novel 18-kDa translocator protein ligand, [^{11}C]CB184, in healthy human volunteers. EJNMMI Res., 査読有, Vol.7. No.1, 2017, 26.

Okamoto M, 1 名, Ishiwata K, 1 名, Toyohara J, Synthesis and evaluation of 7

-(3-[^{18}F]fluoropropyl)-testosterone and 7

-(3-[^{18}F]fluoropropyl)-dihydrotestosterone. Ann. Nucl. Med., 査読有, Vol.31, No.1, 2017, 53-62.

Toyohara J, Importance of P-gp PET imaging in pharmacology. Curr. Pharm. Des., Vol.22, No.38, 2016, 5830-5836.

Doi:

10.2174/1381612822666160804092258

Doi: 10.1007/s12149-016-1130-7.

Toyohara J, Evaluation of DNA synthesis with carbon-11-labeled 4'-thiothymidine. World J. Radiol., 査読有, Vol.8, No.9, 2016, 799-808.

Doi: 10.4329/wjr.v8.i9.799.

Toyohara J, Sakata M, 5 名, Ishii K, 1 名, Ishiwata K, Preclinical and first-in-human studies of [^{11}C]CB184 for imaging the 18-kDa translocator protein by positron emission tomography. Ann. Nucl. Med., 査読有, Vol.30, No.8, 2016, 534-543.

Doi: 10.1007/s12149-016-1094-7.

Okamoto M, 3 名, Ishiwata K, 1 名, Toyohara J, Optimization of the alkyl side chain length of fluorine-18-labeled 7

-alkyl-fluoroestradiol. Nucl. Med.

Biol., 査読有, Vol.43, No.8, 2016, 512-519.

Doi:

10.1016/j.nucmedbio.2016.05.008.
Minamimoto R, 2名, Toyohara J, 4名, Kubota K, Comparison of ^{11}C -4DST and ^{18}F -FDG PET/CT imaging for advanced renal cell carcinoma: preliminary study. Abdom. Radiol. (NY), 査読有, Vol.41, No.3, 2016, 521-530.

Doi: 10.1007/s00261-015-0601-y.
Tanaka K, 5名, Toyohara J, 1名, Correlation of

$4'$ -[methyl- ^{11}C]-thiothymidine uptake with Ki-67

immunohistochemistry and tumor grade in patients with newly diagnosed gliomas in comparison with ^{11}C -methionine uptake. Ann. Nucl. Med., 査読有, Vol.30, No.2, 2016, 89-96.

Doi: 10.1007/s12149-015-1035-x.
Okamoto M, 2名, Ishiwata K, 2名, Toyohara J, Synthesis and evaluation of 7

-(3-[^{18}F]fluoropropyl)estradiol. Nucl. Med. Biol., 査読有, Vol.42, No.7, 2015, 590-197.

Doi:

10.1016/j.nucmedbio.2015.03.005.
Plotnik DA, 5名, Toyohara J, 1名, In vitro analysis of transport and metabolism of $4'$ -thiothymidine in human tumor cells. Nucl/ Med. Biol., 査読有, Vo.42, No.5, 2015, 470-474.

Doi:

10.1016/j.nucmedbio.2014.12.005.
Toyota Y, 4名, Toyohara J, 2名, Comparison of $4'$ -[methyl- ^{11}C]thiothymidine (^{11}C -4DST) and $3'$ -deoxy- $3'$ -[^{18}F]fluorothymidine (^{18}F -FLT) PET/CT in human brain glioma imaging. EJNMMI Res., 査読有, Vol.5, 2015, 7.

Doi: 10.1186/s13550-015-0085-3.
Okasaki M, Kubota K, 4名, Ishiwata K, Toyohara J, 4名, Comparison of ^{11}C - $4'$ -thiothymidine, ^{11}C -methionine, and ^{18}F -FDG PET/CT for the detection of active lesion of multiple myeloma. Ann. Nucl. Med., 査読有, Vol.29, No.3, 2015, 224-232.

Doi: 10.1007/s12149-014-0931-9.
Ito K, 2名, Toyohara J, 3名, Ishiwata K, Kubota K, Volumetric comparison of positron emission tomography/computed tomography

using

$4'$ -[methyl- ^{11}C]-thiothymidine with 2-deoxy-2- ^{18}F -fluoro-D-glucose in patients with advanced head and neck squamous cell carcinoma. Nucl. Med. Commun., 査読有, Vol.36, No.3, 2015, 219-225.

Doi: 10.1097/MNM.0000000000000241.
Minamimoto R, Toyohara J, 7名, Ishiwata K, Kubota K, A pilot study of $4'$ -[methyl- ^{11}C]-thiothymidine PET/CT for regional lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. EJNMMI Res., 査読有, Vol.4, No.1, 2014.

Doi: 10.1186/2191-219X-4-10.

〔学会発表〕(計56件)

1. Toyohara J, Imaging of adenosine A_{2A} receptors in a healthy human brain by positron emission tomography with [^{11}C]preladenant. International symposium molecular imaging agents in medicine, 2017年2月13日~15日, フローニンゲン大学医療センター(フローニンゲン、オランダ)
2. 豊原潤、脳機能イメージングのための新規PETトレーサーの開発、Neurovascular Unit 研究会、2017年1月28日、慶應義塾大学医学部(東京都・新宿区)
3. 豊原潤、臨床応用を目指したPET薬剤の次世代化(招待講演)、2016年11月3日~5日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
4. Toyohara J, First-in-human studies of imidazopyridineacetamide, [^{11}C]CB184, as a novel 18 kDa translocator protein seeker. EANM '16, 2016年10月15日~19日, 国際会議場(バルセロナ・スペイン)
5. 豊原潤、基礎研究と臨床研究は両立できる(招待講演)、PETサマーセミナー2016、2016年8月26日~28日、ANAクラウンプラザホテル熊本ニユースカイ(熊本県・熊本市)
6. Toyohara J, Preclinical and first-in-man studies of imidazopyridine acetamide, [^{11}C]CB184, as a novel 18 kDa translocator protein seeker. SNMMI 2016 Annual Meeting, 2016年6月11日~15日, 国際会議場(サンディエゴ・USA)
7. 豊原潤、PET薬剤製造の基礎-アミロイドPET薬剤等を作るために必要な知識-(招待講演)、第16回日本核医学春季大会、2016年4月23日~24日、大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

8. Toyohara J, (R)-[¹¹C]Emopamil as a novel tracer for imaging enhanced P-glycoprotein function in the brain. EANM '15, 2015年10月10日～24日, 国際会議場(ハンブルク・ドイツ)
9. 豊原潤、 [¹⁸F]Flutemetamol 性施設認証に必要な条件: TMIG のケース、PET サマーセミナー2015 in 東京ベイ(招待講演)、2015年9月4日～6日、東急ベイ舞浜(千葉県・浦安市)
10. 豊原潤、細胞増殖イメージングトレーサー(がん)、PET サマーセミナー2015 in 東京ベイ(招待講演)、2015年9月4日～6日、東急ベイ舞浜(千葉県・浦安市)
11. Toyohara J, Structure activity relationships of ¹⁸F-labeled 7-alkyl-estradiol derivatives. ISRS2015, 2015年5月26日～31日、ミズーリ大学(コロンビア・USA)
12. 豊原潤、PET 薬剤製造の基礎-FDG 以外の薬剤を作るために必要な基礎知識(招待講演)、第15回日本核医学会春季大会、2015年4月25日～26日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)
13. 豊原潤、放射性フッ素 18 標識 7-alkyl-estradiol 誘導体の構造活性相関、日本薬学会第135回年会、2015年3月25日～28日、神戸サンポーホール(兵庫県・神戸市)
14. 豊原潤、放射性薬剤入門-合成から管理まで(招待講演)、第54回日本核医学会総会、2014年11月6日～8日、大阪府立国際会議場(大阪府・大阪市)
15. 豊原潤、ヒトを対象とした分子イメージング(招待講演)、第58回日本薬学会関東支部大会、2014年10月4日、昭和薬科大学(東京都・町田市)
16. 豊原潤、¹¹C-4DST を用いた DNA 合成の分子イメージング(招待講演)、第72回日本医学放射線学会、2013年4月11日～14日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計2件)

1. Toyohara J, Sakata M, Ishiwata K, Springer, PET and SPECT of Neurobiological System, 2015, 600 pages.
2. Nariai T, Inaji M, Sakata M, Toyohara J, Springer, Tumors of the Central Nervous System, 2013, 500 pages.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊原 潤 (TOYOHARA, Jun)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長
研究者番号: 50425659

(2) 研究分担者

木村 裕一 (KIMURA, Yuichi)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号: 60205002
(平成26年度より研究分担者)

窪田 和雄 (KUBOTA, Kazuo)
一般社団法人脳神経疾患研究所・PET センター・その他
研究者番号: 40161674
(平成26年度より研究分担者)

(3) 連携研究者

石渡 喜一 (ISHIWATA, Kiichi)
一般社団法人脳神経疾患研究所・南東北創薬・サイクロトロン研究所・所長
研究者番号: 510043037

石井 賢二 (ISHII, Kenji)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
研究者番号: 10231135

織田 圭一 (ODA, Keiichi)
北海道科学大学・保険医療学部・教授
研究者番号: 70224235

坂田 宗之 (SAKATA, Muneyuki)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号: 00403329

成相 直 (NARIAI, Tadashi)
東京医科歯科大学・医学部付属病院・准教授
研究者番号: 00228090