

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461811

研究課題名(和文) てんかん発症部位および重症度判別に用いるグルタミン酸PETイメージング剤の開発

研究課題名(英文) Development of glutamate imaging agents for Epileptic severity decision

研究代表者

山口 博司 (Yamaguchi, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：00450841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、我々はPET核種によるタモキシフェン誘導体のイメージング剤化について検討をおこなった。タモキシフェンにはグルタミン酸トランスポーターに結合し、グルタミン酸取り込みを阻害する作用があることが報告されているが、一方でエストロゲン受容体にも結合し、ステロイド作用を有することが知られており誘導化が必要であった。

我々はステロイド作用を有さない種々のタモキシフェン誘導体をベンゾフェノン誘導体と対称型ケトンとの還元カップリング反応により合成すると共に[11C]および[18F]による標識検討を実施し、PETイメージング剤への適用を検討した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the imaging agent of tamoxifen derivatives by PET nuclides. The tamoxifen binds to glutamate transporters, but that an effect of inhibiting the glutamate uptake has been reported, on the one hand bind to the estrogen receptor, necessary derivatization are known to have a steroid action .

We synthesized various tamoxifen derivatives without steroid action by reductive coupling reaction between benzophenone derivative and symmetric ketone and examined labeling by [11C] and [18F].

研究分野：放射性医薬品化学

キーワード：PET てんかん グルタミン酸 放射性医薬品 フッ素化

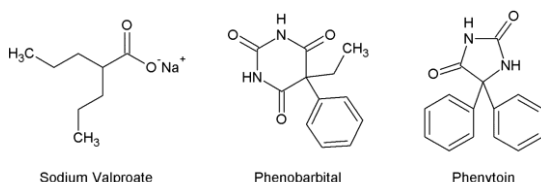
1. 研究開始当初の背景

「てんかん」は、かつて三大精神病の一つとされ「統合失調症」、「うつ病」とともに長年研究されてきた疾患である。現在では疾患に対しての理解が進み、脳の神経細胞の異常な電氣的興奮によって引き起こされる病気であることが明らかとなってきた。てんかんの種類は「特発性てんかん」と「症候性てんかん」に分けられ、その原因としては「特発性てんかん」は遺伝要因、「症候性てんかん」については外傷、脳腫瘍、脳および脳血管の奇形、出産前後に生じた異常などが考えられている。こうした分類は、予後や重症度、そして治療方法を判断するうえで非常に重要である。例えば、特発性てんかんでは、主にバルプロ酸という薬が使われるが、他の薬を使うと改善効果がみられないばかりか、悪化すると報告されている。

近年、脳変性疾患に対し PET (Positron Emission Tomography) が有効な病態診断法として注目され、各種疾患の予後や重症度、治療法の判断に力を発揮している。PET 診断において重要な役割を果たすのが放射性標識されたトレーサーである。我々はてんかんの発症部位および重症度判別に用いることが可能なグルタミン酸神経伝達系イメージング剤の開発について着目した。

てんかんの治療薬には上述のバルプロ酸をはじめ、フェノバルビタール、フェニトインなど様々な薬剤が開発、臨床応用されている(図1)。しかしながら、これらは直接イメージング剤に応用する事が難しい構造や特性を有している。

図1 抗てんかん薬の例



グルタミン酸トランスポーターのグルタミン酸取り込み阻害作用を有する薬剤の一つにタモキシフェンが知られている。しかしながら、タモキシフェンはグルタミン酸取り込み阻害作用を有するものの、エストロゲン受容体 (ER α) の部分作動薬でもあり、この受容体を介してステロイド作用を引き起こす事が報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、てんかんの発症部位および重症度判別に用いることが可能な PET イメージング剤の開発を目的とする。タモキシフェンは、誘導体化することで、ER α に影響を及ぼさず、グルタミン酸トランスポーター (GLUT) のグルタミン酸取り込み阻害作用のみを持たせられることが明らかになってきた。このグルタミン酸取り込み阻害作用を有す

るタモキシフェン誘導体に対して PET 核種である¹¹Cによる標識を行ない、てんかんなどのグルタミン酸神経伝達系に深く関与した疾患異常を可視化できるイメージング剤を開発する。

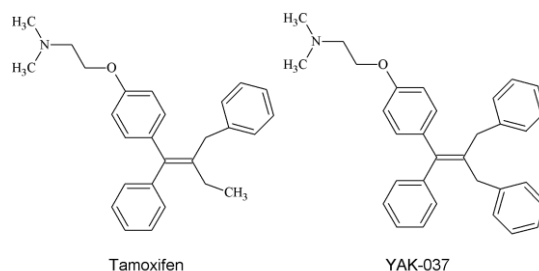


図2 タモキシフェン誘導体の例

研究協力者の大和田、佐藤らは、ステロイド作用をまったく持たない GLUT のグルタミン酸取り込み阻害薬であるタモキシフェン誘導体 (YAK-037) を開発している。本研究ではこのタモキシフェン誘導体に対し、PET 核種¹¹Cもしくは¹⁸Fの導入を試み、「てんかん」によるグルタミン酸神経伝達系の異常を可視化できるイメージング剤の開発を検討することとした。

本研究の最終目標は、てんかん発症部位および重症度判別に用いるグルタミン酸 PET イメージング剤の開発が目的である。研究期間中においてはタモキシフェン誘導体への PET 核種の導入検討、標識体を用いた実験動物を実施する。用いる実験動物としてカニン酸もしくはピロカルピン投与モデルを製作し標識体脳内の集積を観察する。

本薬剤が、てんかんの発症部位特定や重症度判別に可能なイメージング剤に応用利用できれば、将来的に治療薬、治療法の開発に繋がる大きな意義になると考える。

また、本研究では対象疾患をてんかんに絞るが、グルタミン酸は脳内神経伝達物質の代表的な成分であり、この代謝異常を検出できるイメージング剤の開発は、様々な脳変性疾患の早期発見、病態診断に大きな力を発揮する可能性があると考えられる。

3. 研究の方法

- (1) 標識前駆体の合成
- (2) 標識条件の決定
- (3) 結合親和性の解析評価
- (4) 実験動物を用いた評価
- (5) *In silico* ドッキングシミュレーションを用いた化合物設計変更

上記の(1), (2)によって合成、標識した化合物について(3), (4)の手法によって評価し、結果を(1), (2)にフィードバックしながら研究を展開していく。さらに、(5)を追加しての構造最適化を検討した。

4. 研究成果

(1) タモキシフェン誘導体は、一般市販されておらず、合成する必要があった。過去の和田、佐藤らの方法を用い、ジフェニルケトン誘導体とジベンジルケトン誘導体をマクマリー反応により反応させた。次いでジメチルアミン誘導体を反応させたのち、ギ酸エチルおよびクロロギ酸エチルを用いた脱メチル化による原料モノメチル体合成について検討したが、標識反応に用いる事が出来る量を精製できなかつた。そこで、マクマリー反応後の反応として、Boc 保護したアミン誘導体を用いた。反応後、トリフルオロ酢酸による脱保護後フラッシュカラムクロマトグラフィー法により、精製し、標識前駆体を得た。

(2) タモキシフェン誘導体の ^{11}C 標識は、ヨウ化メチル法およびトリフレート法を用いた。ヨウ化メチルの合成は、加速器サイクロトロンおよび自動合成装置を用いておこなった。サイクロトロンで加速したプロトンビームを N_2 ガスに照射して ^{11}C CO_2 ガスを発生させ、自動合成装置上の反応容器内で水素化アルミニウムリチウム溶液に吹込んで接触還元させ、次いでヨウ化水素酸を加えることで ^{11}C ヨウ化メチルを得た。トリフレート法では、精製したヨウ化メチルを 200°C に加熱したトリフレートカラムを通じて得た。タモキシフェン誘導体の溶液に対し、ガス状で ^{11}C ヨウ化メチルもしくは ^{11}C メチルトリフレートを吹込み、標識反応をおこなった。一般的な標識条件を参考に、反応溶媒には MEK、DMSO、塩基性添加剤として水酸化ナトリウム (NaOH)、テトラブチルアンモニウムヒドロキッド (TBAOH)、水素化ナトリウム (NaH) を使用したが反応効率が悪く、十分な標識体を得られなかつた。溶媒、塩基性添加剤の他、原料量、温度および時間など検討した反応条件を示す (表 1)。

	サイクロトロン条件		原料 mg	メチル化 方法	添加剤 (mg)	反応溶媒	反応温度 ($^\circ\text{C}$)	反応時間 (min)	生成物 (MBq)	
	μA	min								
1	20	10	1	CH_3OTf	-	MEK	r.t.	3	-	
2	20	10	1	CH_3OTf	-	MEK	80	3	-	
3	20	10	1	CH_3I	NaOH	1	DMSO	120	3	-
4	20	10	1	CH_3I	TBAOH	1 (μL)	DMSO	120	3	-
5	20	10	5	CH_3I	NaOH	1	DMSO	120	3	-
6	20	10	5	CH_3I	TBAOH	1 (μL)	DMSO	120	3	-
7	20	10	5	CH_3I	NaH	1	DMSO	120	3	-
8	20	10	5	CH_3I	KOH	1	DMSO	120	3	Trace
9	25	5	5	CH_3I	KOH	*1	DMSO	125	5	*2

※1 KOH (250 mg) を DMSO (3 mL) に懸濁させ、その上清を使用

※2 分取までは可能だが、濃縮過程で分解

表 1 タモキシフェン誘導体 ^{11}C 標識条件

標識条件検討の結果、表 1 の 9 が至適条件であったが、濃縮後の最終製剤について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法による分析を実施したところ、標品と異なる構造体に変化しており、過程で分解してしまっていることが示唆された。

(3) タモキシフェン誘導体への ^{18}F 標識について検討した。*In silico* ドッキングシミュレーションを用いてタモキシフェン骨格における ^{18}F 導入可能位を割り出した (図 3)。

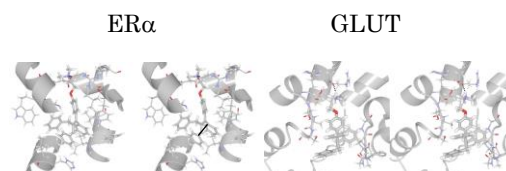


図 3 ER α および GLUT への
タモキシフェン誘導体結合様式

計算結果より、新規薬剤デザインには以下の条件が求められる結果が得られた (図 4)。

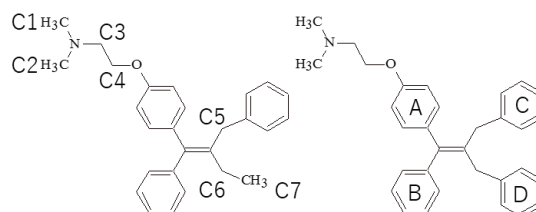


図 4 タモキシフェン ^{18}F 導入候補位

- ① 新規デザインする薬剤は、3 個のみ芳香族環を有するタモキシフェンが ER α に結合することが明らかとなっているため、ER α への結合を防止するためには 4 つの芳香環もしくは相当する立体構造障害を有させることが必要である。
- ② 計算の結果、C5、C6 および C7 は ER α への結合阻害には関与しないため、炭素鎖を短縮することが可能。
- ③ YAK037 では、アミンと芳香環 A がエーテル結合を介して結合するアルキル基 (C1- C4) は GLUT との複合体を作るために必要な構造であり、これ以上改変するのは望ましくない。
- ④ GLUT への結合阻害に関与しない芳香環は A-C であり、ここにフッ素基の導入を検討する事が望ましい。

これらの条件を満たし、合成可能な骨格について合成検討をおこなった。合成条件は、先の ^{11}C 標識原料合成時と同様にケトン誘導体のマクマリー反応およびアミン誘導体とのエーテル化反応を用い、複数の原料化合物合成を試みた (図 5)。

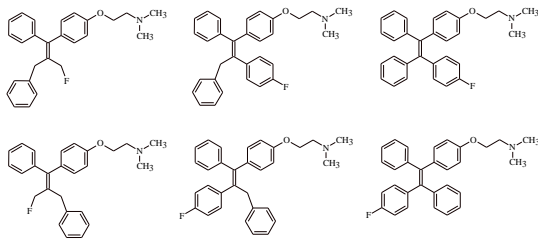


図5 フッ素導入タモキシフェン誘導体

合成検討を進める一方、各化合物の cLogP 値の算出をおこなったところ、いずれの化合物も脳をターゲットにした化合物としては高値であることがわかった。

(4) 高い cLogP 値を有する化合物は、血液脳関門 (BBB : Blood Brain Barrier) の透過性が困難である。そこで、フッ素基導入可能なタモキシフェン誘導体すべてについて、cLogP 値を求めた。cLogP 値の低い誘導体候補を合成し、 $[^{18}\text{F}]$ 標識を実施した (図6)。

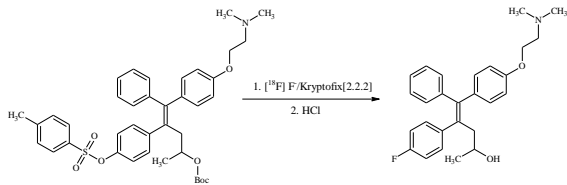


図6 タモキシフェン誘導体の $[^{18}\text{F}]$ 標識

(5) てんかんモデル動物としてはラットのピロカルピン投与モデルを採用した。実験モデル動物作製方法は、塩化リチウム投与し、21時間後に塩酸ピロカルピン投与。90分間観察して、スコア4以上のものを採用した。予備実験として、図5で得られた $[^{18}\text{F}]$ 標識タモキシフェン誘導体を正常ラットに対して静尾注により投与したが、脳組織への移行が観察できなかった。この標識体において、脳移行性に関連する因子である cLogP 値は 3.95 と他の脳を対象としたイメージング剤と比較して十分に高い脂溶性値を有しているが、BBB 透過性が不十分であることがわかった。cLogP 値以外の BBB 透過性の目安となるのが双極子モーメントである。そこで、タモキシフェンおよび $[^{11}\text{C}]$ 標識タモキシフェン誘導体、 $[^{18}\text{F}]$ 標識タモキシフェン誘導体それぞれについて構造モデリングプログラム (Gaussian09) を用いて構造の最適化と双極子モーメントを算出した (図7)。

	Dipole Moment
タモキシフェン	1.4153
$[^{11}\text{C}]$ タモキシフェン誘導体	1.6195
$[^{18}\text{F}]$ タモキシフェン誘導体	1.8261

図7 タモキシフェンおよび誘導体の双極子モーメント

一般的な脳イメージング剤の双極子モーメントと比較していずれも高い値である結果が得られた。特に $[^{18}\text{F}]$ タモキシフェン誘導体については修飾により分子径が大きくなっていることが明らかである。双極子モーメント、cLogP 値共に低値になるように分子設計、官能基変換を加える必要が示唆された。

本研究期間内に作成したてんかんモデル動物への投与にまでは至らなかった。しかしながら、研究の過程で得られた各核種による標識用前駆体合成法、計算化学的手法を用いた化合物のスクリーニング方法など、得られた結果は、グルタミン酸トランスポーターイメージング剤開発の礎になると考える。

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)

[学会発表] (計6件)

- ① Takuya Sumi, Hiroshi Yamaguchi, Ryuichiro Terada, Jiyoung Kang, Masaru Tateno, Extended applicability of molecular docking simulation for ligand design by optimizing configurational and conformational sampling spaces, 第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30日~2016年12月02日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ② Takuya Sumi, Hiroshi Yamaguchi, Jiyoung Kang, Masaru Tateno, Enhancement of applicability of ligand-receptor docking simulation by optimizing configurational and conformational sampling spaces, 第54回日本生物物理学会年会, 2016年11月25日~2016年11月27日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)
- ③ Takuya Sumi, Hiroshi Yamaguchi, Ryuichiro Terada, Jiyoung, Kang, Masaru Tateno, Achievement of broad-range applicability of molecular docking calculation of ligand and receptor by optimizing configurational and conformational sampling spaces, 第5回生命医薬情報学連合大会 (IIBMP2016), 2016年09月29日~2016年10月01日, 東京国際交流館プラザ平成(東京都江東区)
- ④ 山口博司, 鷺見拓哉, Jiyoung Kang, 山城敬一, 舘野賢, 加藤克彦, 渡辺宏久, 祖父江元, グルタミン酸代謝系 PET イメージング剤の分子設計と合成検討, 第39回フッ素化学討論会, 2016年09月29日~2016年09月30日, 佐賀アバンセ(佐賀県佐賀市)
- ⑤ 山口博司, 山城敬一, 岡田真希, 鷺見拓哉, Kang Jiyoung, 舘野賢, 張明栄, 加藤克彦, 渡辺宏久, 祖父江元, グルタミ

ン酸代謝系イメージング剤の開発検討，
第56回日本核医学会学術総会，2016年
11月03日～2016年11月05日，名古屋
国際会議場（愛知県名古屋市）

- ⑥ 山口博司，龍福雅恵，岡田真希，張明栄，
山城敬一，加藤克彦、渡辺宏久，祖父江
元，グルタミン酸代謝系イメージング剤
の開発検討，第55回日本核医学会学術
総会，2015年11月05日～2015年11月
07日，ハイアットリージェンシー東京（東
京都新宿区）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 博司 (YAMAGUCHI HIROSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講
師

研究者番号：00450841

(2) 研究分担者

岡田 真希 (OKADA MAKI)
国立研究開発法人量子科学技術研究開発
機構・放射線医学総合研究所 標識薬剤開
発部・研究員（任常）

研究者番号：00415407

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

舘野 賢 (TATENO MASARU)
兵庫県立大学・生命理学研究科・教授
姜 志始 (KANG JIYOUNG)
兵庫県立大学・生命理学研究科・特任助教
佐藤 薫 (SATO KAORU)
国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長
大和田 智彦 (OHWADA TOMOHIKO)
東京大学・薬学系研究科・教授