

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670553

研究課題名(和文) 生体内金属関連反応の画像化を目指した金属核種を必要としない低分子PET薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of a PET organic imaging probe to visualize metal related reaction in vivo

研究代表者

間賀田 泰寛 (Magata, Yasuhiro)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：20209399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で金属が関与する反応を、金属核種を用いなくてもインビボでの機能評価が可能となれば、微量金属関連疾患の病態解明が可能となると期待される。そこで、Cu-62-ATSMをモデル化合物として、キレート構造を一般的なポジトロン核種であるC-11で標識したイメージング剤開発を計画した。その結果、予めCu-ATSM錯体を合成し、C-11メチル基を導入する方法が有効であり、種々反応条件の検討により、所期の化合物が得られた。担癌マウスを作製し、インビボ分布を検討したところ、がんへの集積が認められ、またその集積もヘテロな分布であり、当初目的としたPOCを得られる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：There are many metal related biochemical reactions in the living cells. To image these reactions in vivo without radio-metal nuclide is expected to be useful for pathological elucidation of trace metal related diseases. In this study, we aim to develop a novel PET organic imaging probe for these reactions. Cu-ATSM was selected for a model compound of our POC. C-11-Cu-ATSM-D1 was obtained by C-11 methylation of Cu-ATSM-D2 by optimization of several reaction parameters. Accumulation of radioactivity post injection of C-11-ATSM-D1 in the tumor was observed in vivo and the distribution of the radioactivity in the tumor was heterogeneous. POC can be obtained with more studies.

研究分野：病態機能分析学・核薬学

キーワード：PET がん C-11 金属錯体 マウス

1. 研究開始当初の背景

生体内で起きている生化学的反応は酵素と有機化合物に加えて、多くの反応には Mg や Zn など多種類の微量金属が酵素反応の必要因子として関連している。このため、微量金属代謝異常により惹起する疾患も少なくない。これら金属の代謝動態をインビボで画像化するためには、対象金属の放射性同位元素を用いるか、金属によっては造影効果を利用した MRI を活用することとなるが、MRI では感度の観点から多量の金属を投与する必要があり、安全性やトレーサーとしての観点など問題が多い。金属核種として Tc や In などの SPECT 用元素を活用できる場合は金属核種を用いたイメージングプローブの適用も可能であるが、それ以外の金属反応を評価する場合は対象金属核種を用意する必要があり、特殊な施設でなければ困難である。そこで、本研究では、近年全国に広く導入されるにいたった超小型サイクロトロンにより製造される、C-11 や F-18 を用いて同様の反応の画像化を達成しようとするものである。

このような考え方の検証を目的として、これまでに藤林ら(JNM 38,1155)が報告しているイメージング剤である Cu-62/64-ATSM を対象として検討する。すなわち、Cu-62/64-ATSM は、細胞内に取り込まれた後、銅が代謝的に還元され、キレート構造が開裂して細胞内に集積する。これにより、FDG の集積とは異なり、腫瘍あるいは脳の還元レベルに応答した特異的集積を示す。しかしながら、このためには放射性銅核種が必要となるが、本研究では、これを C-11 標識体で達成し、利用の広汎性の高い、新しい金属関連反応評価用イメージングプローブの開発を試みるものである。

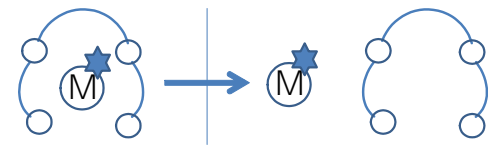
2. 研究の目的

本研究では特殊な製造装置を必要とする放射性金属核種を用いずに、通常の院内超小型サイクロトロンシステムを有すれば利用が可能であるような C-11 や F-18 といった核種を用いる事で、利用の広汎性の高い有機低分子化合物により、生体内金属関連反応の評価を可能とする放射性イメージングプローブを開発しようとするものである。金属関連反応が対象であるので、その中核部分には金属元素を利用するが、放射性トレーサーとして放射性金属核種を用いずに目的を達成する(概念図1)。

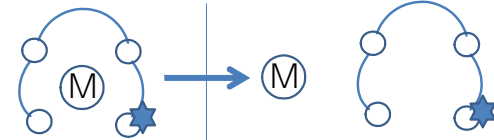
イメージングプローブとして、これまでにその有用性が報告されている Cu-ATSM をモデル化合物として選択する。そのキレート物質を C-11 標識し、細胞内で金属が反応して錯体構造が開裂することに伴い、放射性キレート剤が細胞内に集積するようデザインされた化合物を開発する。これらの検討により、

本研究の POC 取得を目指す。
(概念図1)

これまでの金属関連反応イメージング剤



本研究による金属関連反応イメージング剤



M: 金属
★: 放射性標識

3. 研究の方法

Cu-ATSM 誘導体の合成

Cu-62-ATSM は Fujibayashi ら (Fujibayashi Y, Taniuchi H, Yonekura Y, et al. Copper-62-ATSM: a new hypoxia imaging agent with high membrane permeability and low redox potential. J Nucl Med. 38:1155-1160, 1997.) が開発した、PET 用ガンイメージングプローブであり、ミトコンドリアが酸素欠乏等により過還元状態にある時、通常 2 価の金属銅が還元され 1 価銅となる事で錯体構造から銅イオンが乖離し、細胞内に滞留するというメカニズムである (Obata A, Yoshimi E, Waki A, et al. Retention mechanism of hypoxia selective nuclear imaging/radiotherapeutic agent cu-diacetyl-bis(N4-methylthiosemicarbazone) (Cu-ATSM) in tumor cells. Ann Nucl Med. 15:499-504, 2001.)。その構造中にはいくつかのメチル基を有し、その誘導体化により反応する還元性の程度が変化することが知られている (Wada K, Fujibayashi Y, Tajima N, et al. Cu-ATSM, an intracellular accessible superoxide dismutase (SOD) like copper complex: evaluation in an ischemia-reperfusion injury model. Biol Pharm Bull. 17:701-704, 1994.)。本検討でも Cu-ATSM 自体の C-11 標識体を得る事を目的として計画したが、その原料合成の容易さ等を考慮し、また、出来るだけ原構造に近くなる事を目指し、ATSM より一つメチル基の少ない錯体構造、Cu-ATSM-D1 とすることとした。そこで、C-11 メチル化の反応原料として、ATSM より二つメチル基の少ない化合物、ATSM-D2 を準備することとした。本化合物はジケントンに対してチオセミカルバジドの 2 倍当量を酸触媒下で添加し目的物を定量的に得た。さらに当量の塩化銅(II)を添加することで、Cu-ATSM-D2 を黄色結晶として得た。

C-11-Cu-ATSM 誘導体の合成

C-11 メチル化反応の原料となる

Cu-ATSM-D2 は溶解性が悪く、C-11 メチル化反応に用い得る有機溶媒では DMSO にしか溶けないため、本反応の検討において溶媒は全て DMSO を用いることとした。反応条件としては、原料量、添加する塩基の種類と量、反応温度、反応時間等が問題となるので、これらについて検討を行った。

担癌マウスにおける体内分布評価

得られた標識体を用いて担癌マウスにおける生体内動態について検討を行った。そこで、解剖法および PET 撮像により、全身での放射能集積量を評価することとし、担癌マウスにおける体内分布評価を行った。

頭頸部扁平上皮がんである SCC7 およびヒト肺胞基底上皮腺癌である A549、それぞれの癌細胞を培養し、コンフルエント状態に達したものをトリプシン処理し、細胞を採取した。細胞は 10%FCS RPMI1640 培地に懸濁し、200 μ l 当たり 1×10^7 個になるように細胞を調製した。得られた細胞懸濁液 200 μ l を生後 4 週間の BALB/c-nu 系雄性ヌードマウス(20~25g)の大腿部あるいは上腕部に皮下注射し 2~4 週間、飼育した。癌細胞担癌マウスに C-11 標識 Cu-ATSM-D1 (1MBq/100 μ l) を尾静脈より投与し、40 分後に屠殺した。その後、癌および各臓器を採取し、重量並びに放射能を測定した。測定結果より各臓器 1g 当たりの放射能を全投与量に対するパーセント(% dose/g tissue)として算出し、各組織・臓器への集積について比較検討した。また、同様に担癌マウスを作成し、動物用ベッドに麻酔下で固定後、X 線 CT を撮像した。次いで尾静脈より C-11 標識 Cu-ATSM-D1 (20MBq/100 μ l) を投与し、同時に PET 撮像を開始した。60 分間の撮像終了後、屠殺して癌および各臓器を採取し、重量並びに放射能を測定した。

4. 研究成果

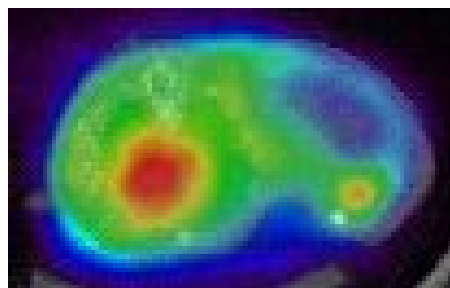
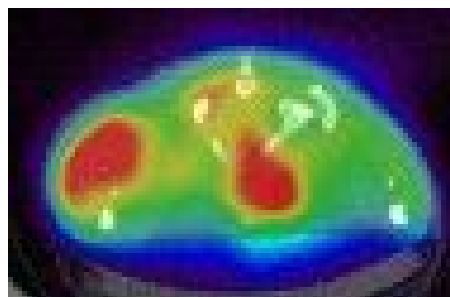
本研究は、生体内の微量金属関連反応をインビボで非侵襲的に画像化することを目的として、特殊な製造装置を必要とする放射性金属核種を用いずに、通常の院内超小型サイクロトロンシステムで利用可能な C-11 等を用いて、利用の広汎性の高い有機低分子化合物としての PET イメージングプローブを開発しようとするものである。本研究が成功すれば、これまで生化学的にしか評価されてこなかった微量金属関連疾患についても、インビボでその病態解明に迫られる可能性を秘めているとともに、治療薬開発へも有用な情報を与えるものとして期待される。また、本概念は生体内の多くの金属関連反応に対して活用可能であり、これまでインビボで評価されていなかった種々反応について、その動態が解明されうるものと期待される。本研究では、C-11 標識イメージングプローブを開発することとし、これまでに金属放射性核種である Cu-62 で標識され、その有用性が報告されている Cu-ATSM をモデル化合物として用

いることとして検討を行った。

C-11-Cu-ATSM-D1 の標識反応条件を検討したところ、DMSO を反応溶媒とし、塩基として TBAF を用い、室温 5 分の反応を行うことで所期の標識体を得る事が出来た。しかしながら、反応副生成物も多く観察され、放射化学的純度約 90%、放射化学的収率も約 45%程度であることから、今後さらに改良の余地があると考えられた。

得られた C-11 標識 Cu-ATSM-D1 を担癌マウスに投与し、投与 40 分後における体内動態を評価した。その結果、本標識体はその比較対象である、Cu-62-ATSM 同様に、初期に高い取込が認められ、その後放射能の腸管への排出が認められた。がん細胞として、A549 および SCC7 を用いたが、それぞれ対象部位である筋肉への取り込みに比較して、1.1~1.3 倍程度の放射能の取り込みが認められた。また、別に撮像した PET 画像によると、上記体内分布実験と同様に肝臓および腸管に高い放射能が観察された。ガンへの取り込みはその大きさにもよるものの、均一では無く、場所による不均一さが認められた。PET 撮像に用いた担癌マウスのガンはある程度大きくなっており、その画像から内部はネクロシスを伴っていると思われる、これによる部位差があるものと考えられた(PET 画像)。画像上に關心領域を設定すると、対照となる筋肉部位に比べて 2 倍程度の放射能の取り込みが認められた。今後、同一個体で FDG による撮像と比較することにより、C-11-Cu-ATSM-D1 の分布が Cu-62-Cu-ATSM で観察されるような FDG 分布とのミスマッチを呈するものかどうか、更に詳細な検討が必要である。

(PET 画像、上段大腿部 SCC、下段上腕部 A549、いずれも CT 画像との融合画像)



この結果より、あらかじめ Cu-ATSM 錯体を合成後に C-11 メチル基を導入する方法が有効であることが示され、種々反応条件の検討の結果、塩基性触媒の種類、溶媒の種類、反

応温度、反応時間、基質濃度比、分取精製条件等を検討することで収率は低いながらも安定して所期の化合物を得ることが可能となった。2種類のがん細胞を用いた担癌マウスを作製し、得られた化合物を用いてインビボ分布検討を行ったところ、がんへの集積が認められ、またその集積もヘテロな分布であり、当初目的としたPOCを得られる可能性が強く示された。これに基づき、今後更に研究を進展させ、生体内微量金属関連反応のインビボ画像化を可能とする放射性金属核種を用いない低分子PETイメージングプローブの開発を推進する予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

間賀田 泰寛(MAGATA, Yasuhiro)
浜松医科大学 光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：20209399

(2)研究分担者

阪原 晴海(SAKAHARA Harumi)
浜松医科大学医学部・教授

研究者番号：10187031

小川 美香子(OGAWA Mikako)

浜松医科大学 メディカルフォトンクス研究センター・准教授

研究者番号：20344351

(採択と同時に異動のため関与せず)

鈴木 千恵(SUZUKI Chie)

浜松医科大学 光先端医学教育研究センター・助教

研究者番号：20637285

(平成27年度より分担研究者)

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()