

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791168

研究課題名（和文）リンパ節転移の予測的評価への応用を目指した VEGFR-3 画像化プローブの開発

研究課題名（英文）Development of a VEGFR3 imaging agent by PET for predictive diagnosis of lymph node metastasis.

研究代表者

古本 祥三 (FURUMOTO SHOZO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00375198

研究成果の概要（和文）：

本研究では、癌転移一形態であるリンパ行性転移について、その早期診断を実現するための新規 PET 用標識薬剤の開発を目指した。リンパ行性転移の早期過程に関与している VEGFR3 の阻害剤をベースとして、炭素 11 標識プローブの開発を試みた。そして、標識前駆体および標識体の合成に成功し、AH109A 担癌ラットで PET 腫瘍イメージングでは、高くはないが、放射能の腫瘍集積性が観察され、今後のより詳細な検証が期待される。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to develop a new radiolabeled imaging probe to visualize a VEGFR3 receptor, which is a key molecule in the early process of lymph node metastasis. Thus, imaging of VEGFR3 would be applicable to early diagnosis of lymph node metastasis. In this study, 11C-labeled VEGFR3 and its precursor for radiolabeling by methylation was successfully synthesized. Small animal PET imaging with the tracer showed a radioactivity uptake in tumor tissue in an AH109A tumor bearing rat.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：放射性医薬品・造影剤

1. 研究開始当初の背景

癌の転移性は、癌の悪性化に寄与する最大の因子である。癌の転移は細胞の移行経路によってリンパ行性と血行性に分類される。前者によってもたらされるリンパ節転移は、癌の臨床的な進行度分類に必須となる評価項目であり、予後不良を決定づける重大な悪性

因子である。このような臨床的重要性から、CT、MRI、PET などによるリンパ節転移病変の描出・検出を目的とした画像診断研究は数多く行われてきた。しかし、近年に至るまでリンパ節転移の分子病態機序に関する知見は乏しかったため、本研究課題で提案するような“分子イメージング”のコンセプトを基盤としたリンパ節転移に関する画像診断研究

や放射性薬剤開発の研究は、今日に至るまで展開されていない。

しかし、近年目覚ましい発展を遂げているリンパ行性転移の分子生物学的知見に立脚した新しい癌転移性評価プローブの開発が可能であると考えた。

その分子生物学的知見および臨床病理所見に基づくリンパ行性癌転移の機序は、(1) 癌原発巣における VEGFR-3 の過剰発現およびその活性化因子 VEGF-C の過剰分泌、(2) 癌組織内のリンパ管新生の誘導、(3) 癌細胞の腫瘍リンパ管から所属リンパ節への移動・侵入、(4) 所属リンパ節内での癌細胞生着・増殖(転移の成立)、となる(JJpnCollAngiol, 48, 131, 2008)。従って、リンパ行性転移過程の最上流に位置する過剰発現 VEGFR-3 の画像化プローブを開発できれば、癌原発巣のリンパ節転移発生リスクを予測的に評価するための画像診断薬として利用できる可能性がある。

2. 研究の目的

このような背景・着想から、VEGFR-3 の画像化プローブとして VEGFR-3 に結合性を示すリガンド分子の放射性標識体の合成を行い、その生物学的有用性の基礎検討を行う研究課題を提案することにした。

3. 研究の方法

2-(3, 4, 5-Trimethoxy-phenyl)-acetamide

(1) の合成

氷冷下で 3, 4, 5-trimethoxy phenyl acetic acid (1.0 eq), HOBt (1.3 eq), WSCI・HCl (1.3 eq), DCM, DMF を加えて攪拌した。その後 0.5 M NH₃/dioxane (3.5 eq) を加えて室温で一晩攪拌した。2 M NaHCO₃ で反応を停止後、水を

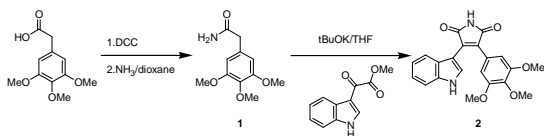


図 1

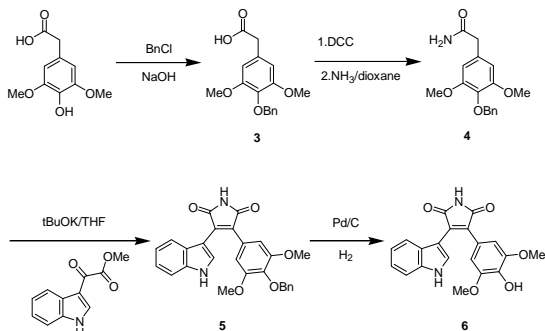


図 2

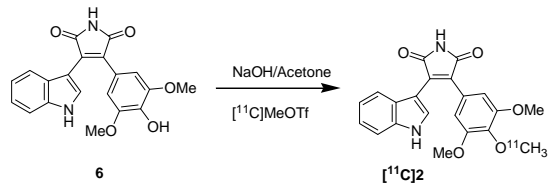


図 3

加え CHCl₃ で抽出した。飽和食塩水、硫酸マグネシウムで脱水後濃縮。シリカゲルに吸着させた後ハイフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、得られたフラクションを濃縮した。

3-(1H-Indol-3-yl)-4-(3, 4, 5-trimethoxy-phenyl)-pyrrole-2, 5-dione (2) の合成

真空下で 4 Å Molecular sieves を 3 h 以上活性化させた後、容器内部を窒素ガスで置換した。その後 THF に懸濁させた化合物 1 を加え、氷冷下で 1 M t-BuOK/THF を加え(溶液が紫色になるまで加える)、室温に戻し一晩攪拌した。飽和 NH₄Cl 水を加えて反応を停止させた後ろ過し、水を加えて酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水、硫酸マグネシウムで脱水後濃縮した。シリカゲルに吸着させた後ハイフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、得られたフラクションを濃縮した。

(4-Benzyloxy-3, 5-dimethoxy-phenyl)-acetic acid (3) の合成

4-hydroxy-(3, 5-dimethoxy)-phenyl acetic acid, BnCl (1.3 eq), 2 M NaOH / THF (= 1/1.5) を加え、還流(100 °C)条件下一晩反応させた。5 M HCl で中和後、水を加えて酢酸エチルで抽出した。飽和食塩水、硫酸マグネシウムで脱水後濃縮した。ハイフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、得られたフラクションを濃縮した。

2-(4-Benzyloxy-3, 5-dimethoxy-phenyl)-acetamide (4) の合成

(1) と同様に合成した。

3-(4-Benzyloxy-3, 5-dimethoxy-phenyl)-4-(1H-indol-3-yl)-pyrrole-2, 5-dione (5)

(2) と同様に合成した。

3-(4-Hydroxy-3, 5-dimethoxy-phenyl)-4-(1H-indol-3-yl)-pyrrole-2, 5-dione (6)

化合物 5、MeOH/THF (= 6/1)、10 % Pd/C (原料の 10% の重量) を加え、容器内をアスピレーター・風船を用いて水素置換し、3 h 攪拌した。反応後ろ過し、濃縮後、ハイフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、得られたフラクションを濃縮した。

[¹⁴C]2 の標識合成

標識前駆体(化合物 6) 1mg をアセトン 1mL に溶解し、そのうち 300 μL を反応に使用した。1mL 字バイアル中で、2N NaOH を 2 μL 添加した後、[¹⁴C]MeOTf をバブリング法により反応溶液中に導入して室温でメチル化反応を行った。反応終了後、蒸留水 300 μL を加えて攪拌し、セミ分取 HPLC によって精製操作を行った。分取フラクションに蒸留水 20mL とアスコルビン酸を加えた後、セバック tC18 に流して標識体を固相に補足し、エタノールで溶出して、Tween を添加してからエバポレーターで溶媒を除去し、最終的に生理食塩液を加えて注射剤を調製した。

[¹⁴C]2 の小動物 PET イメージング

本実験は、東北大学動物実験専門委員会の承認を得た上で実施した。小動物 PET には、島津社製クレビボ PET および CT を使用した。撮像対照には、ドンリユーラットの皮下に AH109A 腫瘍細胞を皮下移植して作製した担癌ラットと、ddy マウスの皮下にエールリッヒ腫瘍細胞を移植して作製した担癌マウスを用いた。イソフルラン麻酔下、標識薬剤(6-11MBq)を尾静脈内投与し、PET 撮像した。その後、CT 撮像を行った。

4. 研究成果

標品化合物の合成では、化合物 1 は、白色結晶として収率 56% で、得られた。化合物 2 の合成では、使用する塩基は t-BuOK/THF が最良であった。塩基量は基質の 4 倍にすると副生成物が出ず、反応は良好な収率で進行し、黄色個体、収率 69% で目的化合物を得ることができた。

標識前駆体の合成では、化合物 3 の合成では、白色結晶として、収率 53% で目的化合物を得ることができた。化合物 4 の合成では、白色結晶として、84% の収率で目的化合物を得ることができた。化合物 5 の合成では、赤橙色結晶として、82% の収率で目的化合物を得ることができた。化合物 6 の合成では、反応時間が長すぎると二重結合までも還元されてしまうため、TLC による反応追跡が必要。

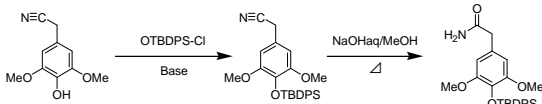


図 4

3 h が最も良い結果を与え、赤色固体として、収率 73% で目的化合物を得ることができた。この前駆体合成では、出発原料にニトリル化

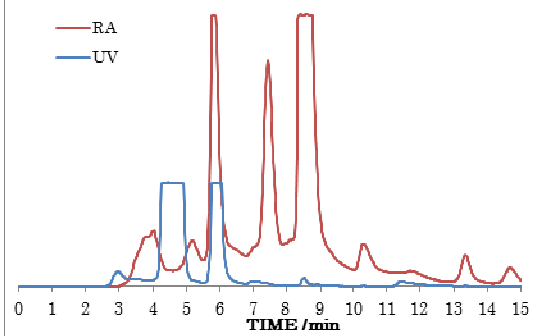


図 5

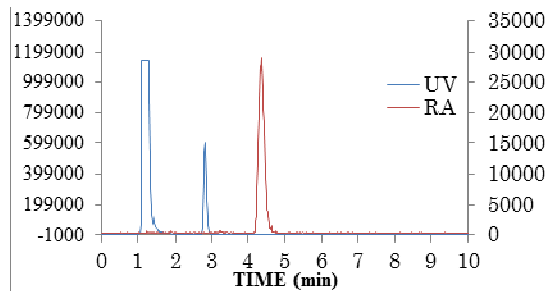


図 6

化合物を用いて、図 4 の合成ルートでの合成を試みたが、加水分解の際 OTBDPS 基が外れてしまい、その後の合成が続かず、断念した。また、標品化合物のメトキシメチル基を、3 臭化ホウ素または 3 フッ化ホウ素で脱メチル化する方法も検討したが、反応が進まないか、フェノール基がすべて脱メチル化されてしまい、合成が達成出来なかった。

標識合成に関しては、反応溶媒として DMF や DMSO を用いた場合は、十分なメチル化が進行せず、アセトンがもっとも良好な結果を与えた。標識化合物の精製は分取 HPLC で問題なく行えた。HPLC クロマトグラフは 5 の通りであった。目的標識体は、約 8.5 分にシングルピークとして分離し、単離することができた。その結果、高い放射化学的純度で目的物を精製することができた。分析 HPLC のクロマトグラフは図 6 のようになった。

精製終了後における放射化学的収率は 30 ~ 40% で、製剤化終了後の放射化学的純度は 97% 以上となり、注射薬液として十分利用できる結果となった。比放射能は 1.2 ~ 7.8 Ci/μmol であった。

小動物 PET による腫瘍イメージングの検討結果としては、エールリッヒ担癌マウスの場合の PET-CT 画像は図 7 の結果が得られた。画像は、投与後 55 分から 10 分間撮像したもので、腸管に非常に高い放射能集積を認めたが、腫瘍については特異的集積は確認されな

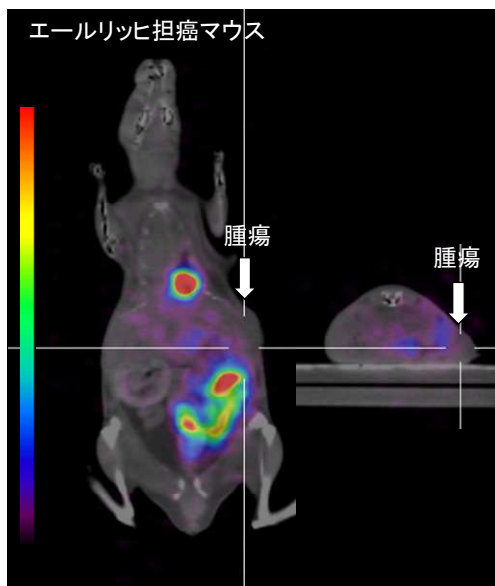


図 7

かった。

AH109A 担癌ラットを用いた PET 撮像については、結果は図 8 のようになった。この場合も、肝臓、腸管などの腹部に高い放射能集積を認めたが、胸部に比べ、腫瘍に若干高い放射能集積がみられた。腫瘍の中でも、皮下側よりも体幹側に高めの放射能集積が観察された。この部位は、体幹との境界領域に相当するが、AH109A は腫瘍増殖能が高く、リンパ節転移も起きやすい腫瘍であることから、ここではリンパ管の形成が起きやすい可能性があり、そのため放射能集積がみられた可能性がある。

以上、本研究において、リンパ管新生の可視化を目指して、それに深く関与している VEGFR3 受容体の阻害剤を炭素 11 標識することに成功した。しかし、小動物 PET を利用した担癌モデルマウスの腫瘍イメージングで

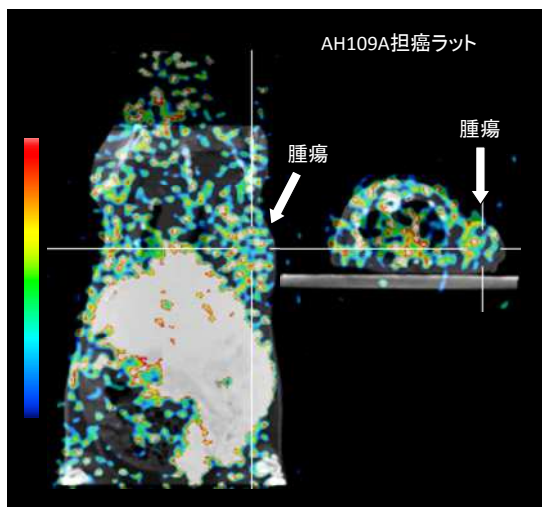


図 8

は、放射能の腫瘍特異的集積性は認められなかった。AH109A 担癌ラットでは若干の腫瘍集積性がみられた。今後は、担癌モデル動物の妥当性を再検討し、また VEGFR3 の発現と放射能の集積性の相関性を調べ、VEGFR3 イメージングの有効性を詳細に検証する必要があるだろう。

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 1 件)

1. Saiki H, Iwata R, Nakanishi H, Wong R, Ishikawa Y, Furumoto S, Yamahara R, Sakamoto K, Ozeki E. Electrochemical concentration of no-carrier-added [(18)F]fluoride from [(18)O]water in a disposable microfluidic cell for radiosynthesis of (18)F-labeled radiopharmaceuticals. Appl Radiat Isot. 2010 Sep;68(9):1703-8. 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

古本 祥三 (FURUMOTO SHOZO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00375198

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者