

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591828

研究課題名(和文)EGFシグナル阻害による癌治療計画の支援システム構築を目指した新規診断薬の開発

研究課題名(英文)Development of new radiopharmaceuticals for support system of anti-tumor drug therapy.

研究代表者

平田 雅彦(hirata, masahiko)

大阪薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00268301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療計画を支援可能な新規放射性薬剤の開発を行った。新規に合成した化合物は、標的に対する親和性が弱く、新規イメージング薬剤としては不適であった。これらの結果を基に検討した結果、側鎖が活性に大きく影響すると思われた。また、既存化合物を用いて抗癌剤の薬効予測が可能であった。新規化合物による治療計画支援システムの構築には至らなかったが、親和性の異なる化合物の検討から、効果予測が早期に可能と考えられた。

研究成果の概要(英文)：New radiopharmaceuticals which could support a cancer treatment plan were developed. The affinity of new radiopharmaceuticals to EGFR-TK were weak as imaging probe. From these results, a side chain greatly influenced activity. From some examination, the prediction of the curative effect of the anticancer drug was got using our new compounds.

研究分野：放射薬品化学

キーワード：放射性医薬品 EGF チロシンキナーゼ SPECT 核医学 診断 放射性ヨウ素

## 1. 研究開始当初の背景

ゲフィチニブやエルロチニブのような、臨床的に有効な上皮増殖因子受容体キナーゼ (EGFR-TK) 阻害薬の発見は、非小細胞肺癌 (NSCLC) の治療に新たな道を開き、合理的な薬物設計の可能性を示した。これらの薬剤は、ある特定の患者では、劇的な抗腫瘍効果を示す一方で、重篤な副作用 (間質性肺炎等) が社会的に大きく取り上げられ、慎重な投与が求められている。これまでに EGFR 遺伝子変異がゲフィチニブやエルロチニブの重要な感受性因子であることが報告され、遺伝子変異による薬剤感受性変化 (Science, 293:876-80, 2001) の把握について、遺伝子診断を始めとする感受性の有無の検討がなされている。さらには、遺伝子の 2 次変異あるいは種々の要因による PI3 キナーゼ AKT 経路の活性化による薬剤耐性が生じることが明らかとなり、EGFR-TK 阻害剤耐性癌の治療に関して様々な検討がなされるに至っている。EGFR-TK 阻害剤を用いた癌の治療計画を適切に支援するためには、EGFR-TK 阻害剤奏功癌の選別 EGFR-TK 阻害剤奏功癌の薬剤耐性の早期検出 EGFR-TK 阻害剤薬剤耐性獲得の要因の正確な情報提供が重要と考えられる。

PET・SPECT 画像診断は、放射性分子プローブを用いることにより遺伝子やタンパク質の発現又はその働きを画像化する非侵襲的かつ全身検索可能な診断方法であるため、分子標的薬剤の治療効果予測や治療効果判定を行える診断技術として注目されている。

以上の様な背景を基に、申請者は、PET・SPECT 画像診断による EGFR-TK 阻害剤による癌治療計画を支援するシステムの構築を計画した。これまでに、EGFR-TK 阻害剤奏功癌の選別に関して有用な新規分子イメージング薬剤である放射性ヨウ素標識 PYK の開発に成功し、ゲフィチニブの癌に対する感受性の差を画像として明確に捉えることに成功した。

本研究では、画像診断による EGFR-TK 阻害剤を用いた癌治療計画支援システムの構築のために EGFR-TK 阻害剤奏功癌の薬剤耐性の早期検出 EGFR-TK 阻害剤薬剤耐性獲得の要因の正確な情報提供を達成するための新たな分子イメージング薬剤の開発を行う。

EGFR-TK 阻害剤の薬剤耐性獲得の要因には、これまでにいくつかの報告がなされており、その一つに EGFR 遺伝子の 2 次変異により、アミノ酸残基 Thr<sup>790</sup> が Met に変わる突然変異 (T790M) が起こる。このアミノ酸残基は、EGFR-TK 阻害剤が ATP 結合部位に結合する際に、「門番役」として働いており、この 2 次変異により、EGFR-TK 阻害剤の ATP 結合部位に対する結合を阻害し、癌が薬物耐性を獲得する。

Zhou ら (NATURE 462 24-31 2009) は、「門番

役」のタンパクのアミノ酸残基である Cys<sup>797</sup> に着目し、この残基と共有結合を形成することによって T790M 型 EGFR と不可逆的に反応する化合物のスクリーニングを行い、数種のピリミジン化合物を同定した。中でも、WZ4002 は Cys<sup>797</sup> との共有結合が形成されて変異型の門番役残基と相互作用していることが示された。申請者は、このことに着目し、T790M 変異を検出しようとする新規分子イメージング薬剤として、WZ4002 の放射性ヨウ素誘導体を開発することを計画した。一方、PI3 キナーゼ経路抑制因子である、PTEN タンパクの不活性化、上流因子の HGF レセプターの活性化は、PI3 キナーゼから AKT に至る生存シグナルの経路を活性化し、EGFR-TK 阻害剤の抗癌作用を大幅に低下させることが知られている。したがって、これらのシグナル伝達の活性化を把握することが可能となれば、EGFR-TK 阻害剤の 2 次変異以外の薬剤耐性を検知できるだけでなく、その後の治療方針決定に有用な情報を与えるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

PET・SPECT 画像診断による EGFR-TK 阻害剤による癌治療計画を支援するシステムの構築を目標とした新規放射性薬剤の開発

## 3. 研究の方法

### 新規キナゾリン誘導体の開発

#### 新規キナゾリン誘導体の合成

EGFR-TK 阻害剤であるエルロチニブの構造に着目し、エルロチニブに放射性ヨウ素を導入した新規誘導体 4-(3'-iodoanilino)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazoline (ZSP), 4-(3'-iodophenoxy)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazoline (SZP) をデザインし、下記の Scheme で合成した。さらに、放射性ヨウ素標識前駆体としてトリブチルスズ基を有する標識前駆体を合成した。

#### SZP の EGFR-TK に対する阻害活性とその阻害様式

次いで、SZP の EGFR-TK に対する阻害活性とその阻害様式を調べた。SZP の EGFR-TK に対する阻害活性は、<sup>32</sup>P]ATP を基質とした EGFR-TK 活性測定法から阻害曲線を作成し、その結果を基にコントロールに対する 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を求めるとともに、既存の EGFR-TK 阻害剤と比較した。また、SZP の阻害様式は、ヒト扁平上皮癌由来細胞 (A431) より調製した膜画分を酵素試料、<sup>32</sup>P]ATP を基質として測定し、Lineweaver-Burk plot を作成し、その結果を基に阻害様式を検討するとともに SZP の阻害定数 (K<sub>i</sub>) を算出した。

## 放射性ヨウ素標識 SZP の生体内動態とインビボにおける各種癌への集積性

放射性ヨウ素標識 SZP の生体内動態とインビボにおける各種癌への集積性を調べた。各種癌細胞を移植した担癌モデルマウスを作製し、これらのマウスの尾静脈より  $[^{125}\text{I}]$ SZP を投与した。続いて、投与 1、2、6 時間後に屠殺後、各組織を採取し、放射能を測定した。この結果を基に、投与量に対する各組織の放射能集積量 (% dose/g) を算出した。

## インビトロにおける $[^{125}\text{I}]$ SZP の EGFR-TK に対する選択性

インビトロにおける  $[^{125}\text{I}]$ SZP の EGFR-TK に対する選択性を調べた。EGFR-TK 選択的阻害剤として、ZD1839、PD153035、Genistein 及び当研究室で開発した m-IPQ、PYK を使用した。又、対照として、PDGFR-TK 阻害剤である AG17、プロテインキナーゼ阻害剤である RG13022 と、EGFR-TK 活性の下流のシグナル伝達に参与する MEK の選択的阻害剤である PD98059 を用いた。

## 各種癌細胞における放射性ヨウ素標識 SZP の EGFR-TK 結合親和性と癌集積性の相関性

エルロチニブやゲフィチニブは患者によって奏効率が異なるため、個々の患者に対してその効果予測を行うことが重要である。奏効率が異なる原因として、EGF 受容体チロシンキナーゼ (EGFR-TK) の遺伝子変異によるエルロチニブの EGFR-TK 結合親和性の上昇が挙げられる。そこで、放射性ヨウ素標識誘導体 SZP を用いたエルロチニブの効果予測の可能性について検討した。まず、各癌細胞から調製した膜成分を用いて Binding Assay を行った。この結果を基に、Scatchard 解析法により各癌細胞の EGFR-TK に対する結合親和性の指標である解離定数 ( $K_d$ ) と最大結合量 ( $B_{max}$ ) を求めた。次いで、先に調べた各種担癌モデルマウスにおける、 $[^{125}\text{I}]$ SZP 投与 1 時間後の癌集積量と EGFR-TK に対する親和性との関係を調べた。

## EGF レセプターの二次変異を検出可能なピリミジン誘導体の合成

EGFR 遺伝子の二次変異を検出可能な、新規 PET 用癌診断薬の開発を計画した。本研究では、5-chloro-4-[3-(2-fluoroethylamino)phenoxy]-N-(2-methoxy-4-morpholino-phenyl)pyrimidin-2-amine をドラッグデザインし、合成した。

## 新規 PI3 キナーゼ活性診断薬の合成

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は、細胞内シグナル伝達の中心的な役割を果たす酵素で、細胞の生存や血管新生を促進させる。多くの癌において PI3K が過剰発現し、また、EGFR を標的とした抗癌剤に耐性の有する癌においても、PI3K 発現の上昇が報告されている。PI3K 活性を把握する事は癌の診断のみならず、

EGFR を標的とした抗癌剤の薬物耐性を検出できる可能性がある。さらに、PI3K を標的とする抗癌剤の薬効予測にも繋がる事が期待される。これらの背景を基に、新規 PI3K 活性診断薬の開発を計画し、チエノピリミジン骨格を有する 2 種の新規 PET 診断薬をドラッグデザインし、合成した。

## 4. 研究成果

### 新規キナゾリン誘導体の開発

*In vitro* における各種癌細胞への  $[^{125}\text{I}]$ SZP の取込み量は、変異型 EGFR 癌細胞の PC-9 で 3.10% となり、二点変異型 EGFR 癌細胞である H1975 は 2.24%、野生型 EGFR 発現細胞の A431 では 1.36% となった (図 1)。SZP はエルロチニブ非感受性細胞に比べ、エルロチニブ感受性細胞において高い取込み量を示した。また、 $[^{125}\text{I}]$ SZP の各種癌細胞における  $B_{max}$ : 値と  $K_d$ : 値は PC-9 で  $B_{max}$ : 7.5 pmol/mg、 $K_d$ : 16.3 nM、H1975 で  $B_{max}$ : 13.4 pmol/mg、 $K_d$ : 26.7 nM が得られ、A431 で  $B_{max}$ : 16.3 pmol/mg、 $K_d$ : 126.3 nM となった。*In vitro* における各種癌細胞の  $[^{125}\text{I}]$ SZP の取込み量と  $K_d$  値の間には高い相関関係が得られた ( $R^2=0.8246$ )。以上の結果から、SZP は各種癌細胞において EGFR の変異による結合親和性の変化に応じた集積性を示すと考えられる。したがって、SZP を用いて各種癌細胞に対するエルロチニブの結合親和性の違いを把握可能であり、SZP によるエルロチニブの効果予測の可能性が示唆された。

### EGF レセプターの二次変異を検出可能なピリミジン誘導体の合成

Morpholine (1) と 5-fluoro-2-nitro-anisole (2) を DMF 中、室温で 1 日攪拌し、3 とした後 (収率 93.5%)、接触水素還元により 4 を得た (収率 95.2%)。別途、2,4,5-trichloropyrimidine と 3-nitrophenol から合成した 5 と 4 を 2-methyl-2-propanol に溶解後、TFA を加え 100 で 1 日還流し、6 を得た (収率 65.3%)。さらに、6 のニトロ基の鉄還元あるいは接触水素還元を試みたが、共に原料が分解し、目的物 7 は得られなかった。そこで、より穏やかな還元法であるスズ還元を行うことで、原料の分解を伴うことなく、目的のアミノ体 7 を得ることができた (収率 68.2%)。最後に、2-fluoroethanol (8) から合成したトシル体 (9) により、7 のフルオロエチル化を試みたが、溶媒である THF では、7 の溶解性が低く、目的物が得られなかった。そこで、溶媒を DMF に変更し、100 で 1 日還流した結果、最終目的物 10 を得ることができた。

### 新規 PI3 キナーゼ活性診断薬の合成

Methyl-3-amino-2-thiophene carboxylate (1) を出発原料とし、多段階の合成経路を経て 2

種の新規PI3K活性診断薬剤の合成に成功した。PI3K活性を測定したところ、PI3K活性は低いものであり、更なる改良が必要と考えられた。

#### 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 5件)

1. Zhu HJ, Ogawa M, Magata Y, Hirata M, Ohmomo Y, Sakahara H.

Relationship between uptake of a radioiodinated quinazoline derivative and radiosensitivity in non-small cell lung cancer.

Am J Nucl Med Mol Imaging. (査読有) 7;4(4): 293-302. 2014 PMID: 24982815

2. Yoshimoto M, Hirata M, Kanai Y, Naka S, Nishii R, Kagawa S, Kawai K, Ohmomo Y.

Monitoring of gefitinib sensitivity with radioiodinated PHY based on EGFR expression.

Biol Pharm Bull. (査読有) 37(3):355-60. 2014 PMID: 24583857

3. Masahiko Hirata, Yasukazu Kanai, Sadahiro Naka, Mitsuyoshi Yoshimoto, Shinya Kagawa,

Keiji Matsumuro, Hideyuki Katsuma, Hiroshi Yamaguchi, Yasuhiro Magata, Yoshiro Ohmomo A useful EGFR-TK ligand for tumor diagnosis with SPECT: development of radioiodinated 6-(3-morpholinopropoxy)-7-ethoxy-4-(30-iodophenoxy)quinazoline.

Ann Nucl Med. (査読有) 27, 431-443 2013 DOI: 10.1007/s12149-013-0703-y,

4. Hui Jun Zhu, Mikako Ogawa, Yasuhiro Magata, Masahiko Hirata, Yoshiro Ohmomo, Hiroki Namba, Harumi Sakahara

Assessment of epidermal growth factor receptor status in glioblastomas

Asia Oceania J Nucl Med Biol. (査読有) 1(2),47-52 2013.

5. Evaluation of Radioiodinated Quinazoline Derivative as a New Ligand for EGF Receptor Tyrosine Kinase Activity Using SPECT. Masahiko Hirata, Yasukazu Kanai, Sadahiro Naka, Keiji Matsumuro, Shinya Kagawa,

Mitsuyoshi Yoshimoo and Yoshiro Ohmomo Ann Nucl Med. (査読有) 25, 117-124 (2011). DOI 10.1007/s12149-010-0432-4

〔学会発表〕(計 9件)

2014

1. Mitsuyoshi Yoshimoto, Sadaaki Kimura, Masahiko Hirata, Yoshiro Ohmomo, Keiichi Kawai, and Hirofumi Fujii

Pharmacokinetics and anti-tumor activity of

AY002 with high affinity to EGFR-TK

Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging ST. Luise, 6月

2. Akira Makino, Takahiro Arai, Takashi Temma, Masahiko Hirata, Masahiro Ono, Yoshiro Ohmomo, Hideo Saji

Development of a novel PET tracer targeting phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in tumor 27th Annual European Association of Nuclear Medicine Congress in Gothenburg, Sweden, 10月 2013

3. Yoshimoto M, Kimura S, Yamada K, Hirata M, Ohmomo Y, Kunishima M, Kawai K, Fujii H.

Synthesis and evaluation of iodinated cyclopropanecarboxylic acid {3-[6-(phenylamino)-pyrimidin-4-ylamino]-phenyl}-amides as EGFR-TK imaging agents.

The 20th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, Jeju (Korea).

4. Yoshimoto M, Kimura S, Hirata M, Ohmomo Y, Kawai K, Fujii H.

Development of novel EGFR-TK imaging agents based on anilinoimidazole structure.

The 60th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, Vancouver (Canada).

5. 朱蕙君、小川美香子、間賀田泰寛、平田雅彦、大桃善朗、阪原晴海

肺がん細胞の放射線治療とゲフィチニブ治療における<sup>125</sup>I]PYKによる効果予測  
日本分子イメージング学会 横浜 5月

6. 吉本光喜、木村禎亮、平田雅彦、大桃善朗、川井恵一、藤井博史

アニリノピリミジンを基本骨格とするEGFR-TK 阻害剤の開発  
日本分子イメージング学会 横浜 5月

7. 吉本光喜、木村禎亮、平田雅彦、大桃善朗、川井恵一、藤井博史

放射性ヨウ素標識アニリノピリミジン誘導体の合成と基礎的検討第 53 回 日本核医学会総会 福岡 11月

2012

8. 新規 <sup>99m</sup>Tc 標識 EGF 受容体イメージング剤の合成と癌診断薬としての基礎的検討

平田 雅彦, 吉本 光喜<sup>2</sup> 小川 美香子, 間賀田 泰寛, 大桃 善朗  
第 7 回分子イメージング学会 5月 (浜松)

2011

9. 平田雅彦、広沢信英、吉本光喜、小川美香子、間賀田泰寛、大桃善朗

癌画像診断における放射性ヨウ素標識 PYK の有用性に関する基礎的評価

第 6 回 日本分子イメージング学会 (神戸)

5月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 00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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 平田 雅彦 (masahiko Hirata)  
大阪薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：19591437

(2)研究分担者 ( )  
研究者番号：

(3)連携研究者 ( )  
研究者番号：