

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10372

研究課題名(和文) COX-2イメージング剤開発を目的とした新規ニメスリド誘導体のin vivo評価

研究課題名(英文) in vivo evaluation of novel nimesulide derivatives for COX-2 imaging

研究代表者

山本 由美 (YAMAMOTO, Yumi)

東北医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70613446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、COX-2イメージング剤として開発途上であった新規ニメスリド誘導体の、これまでの評価結果をふまえて、放射性同位元素で標識し、in vivo評価を行うことで、COX-2イメージング剤としての有用性を評価した。

研究期間全体を通して、パラ位にヨウ素を導入したニメスリド誘導体の¹²⁵I標識化合物が、有力なCOX-2イメージング剤候補化合物であることを見出した。

今後は、本研究課題で良好な候補化合物であることが明らかとなった化合物に関する評価をさらに進めていくことで、臨床応用への可能性を探る予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)は、がん(腫瘍)や炎症において高発現するほか、脳においてはパーキンソン病やアルツハイマー病などの関与が示唆されているが、これら病態におけるCOX-2の働きは未だ解明されていない。

各種病態におけるCOX-2の働きを解明するために、COX-2の画像化を可能とするイメージング剤の研究開発が国内外で進められてきたが、未だ成功例はない。

本研究において、¹²⁵I標識ニメスリドヨウ素誘導体が、有力なCOX-2イメージング剤候補化合物であることを明らかにしたことは、COX-2が関与する病態の診断や治療の発展に寄与するだろう。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to radiolabel and evaluate nimesulide derivatives as suitable radioligands for PET/SPECT studies which are targeted COX-2.

We found out I-¹²⁵ labeled nimesulide-para-I derivative as potential COX-2 imaging agent.

Future studies will aim to develop this radioligand for further in vivo evaluation.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：COX-2 イメージング 画像化 ニメスリド 炎症モデル 病態モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シクロオキシゲナーゼ(COX)は、アラキドン酸からプロスタグランジン類を産生する酵素である。COXには2つのアイソザイムが存在しており、COX-1及びCOX-2とに大別される。このうちCOX-2は炎症により誘導されるだけでなく、脳、腎臓などに構成的に発現し、特に脳において、パーキンソン病やアルツハイマー病等の神経変性性疾患との関与が示唆されている。しかし、これら病態におけるCOX-2の働きは未だ解明されていない。

各種病態におけるCOX-2の働きを解明するために、生体内COX-2分布を時間的・空間的かつ定量的にトレース可能なPETやSPECTなどのCOX-2イメージング剤の研究開発が国内外で進められてきた。しかしながら、未だ成功例はない。

代表者が大学院時代より継続して取り組んできたCOX-2イメージング剤の研究開発において、様々な骨格を有する¹¹C標識リガンドの合成に成功している。このうち、科学研究費補助金若手研究(B)を受け、取り組んだ研究において、広く世界で使用されている医薬品ニメスリド(日本では未認可)を母体骨格とした、新規ニメスリド誘導体の合成に成功し、これらの*in vitro*評価結果を論文(Yamamoto Y. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 6807-6814(2015), Yamamoto Y. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 24, 3727-3733(2016))として発表した。合成したニメスリド誘導体6化合物の物理化学的性質および*in vitro*単層膜輸送評価結果はいずれも、良好な生体内分布を示す可能性を強く示唆したうえ、*in vitro*において安定であることが明らかとなったことから、これらニメスリド誘導体は有力なCOX-2イメージング剤候補化合物であると結論づけた。

そこで代表者は、COX-2イメージング剤として開発途上であるこれら新規ニメスリド誘導体の*in vitro*評価結果をふまえ、放射性同位元素で標識し、*in vivo*評価を行うことで、COX-2イメージング剤としての有用性を評価するとともに、臨床使用への可能性を探る方向に発展させたいという考えに至った。

2. 研究の目的

本研究期間内において、ニメスリド誘導体の標識合成法を確立し、標識合成した各誘導体の*in vivo*における挙動を評価する。正常マウスを用いた生体内分布評価やCOX阻害剤との同時投与による阻害実験、P糖タンパク質阻害剤存在下生体内分布実験、代謝物分析などにより、*in vivo*での安定性や薬物動態、COX-2に対する特異的結合を評価し、COX-2イメージング剤としての有用性を明らかにする。続いて、正常マウスにおけるニメスリド誘導体の挙動を基に、病態モデル動物を用いた*in vivo*評価を行う。COX-2発現に深く関与する、炎症モデルおよび腫瘍モデル動物に各誘導体を投与し、その生体内分布を調べることにより、これら新規ニメスリド誘導体の臨床使用への可能性を探る。

並行して、得られた*in vivo*評価結果と、代表者が既に求めたニメスリド誘導体の*in vitro*評価結果と照らし合わせることにより、*in vivo*と*in vitro*間の違いを精査することで、より効率的なCOX-2イメージング剤の開発手法を模索する。

以上の方法により、新規ニメスリド誘導体のCOX-2イメージング剤としての有用性および今後の方向性を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は(1)化合物の標識合成条件の確立、(2)正常マウスを用いた*in vivo*評価、(3)病態モデル動物を用いた*in vivo*評価の3つの研究項目に分けられる。

(1) 化合物の標識合成条件の確立

放射性同位元素標識のための標識前駆体として、-OCH₃誘導体の場合、脱メチル化したフェノール体の合成を行い、-I誘導体の場合、-SnBu₃体の合成を行った。

¹¹C標識に関して、代表者が既に確立した[¹¹C]CH₃OTfによる¹¹C標識合成法(Yamamoto Y. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 59, 938-946(2011))を用いて¹¹C標識を行った。

¹²⁵I標識に関して、-SnBu₃体を標識前駆体とした標識合成を行った。

(2) 正常マウスを用いた*in vivo*評価

*In vivo*評価として、合成した標識化合物を正常マウスに投与する生体内分布実験、COX阻害剤との同時投与による阻害実験、および代謝物分析を行った。生体内分布評価は剖検法や*ex vivo* ARGなどを中心に評価し、¹¹C標識化合物に関してはPET撮像も行った。

(3) 病態モデル動物を用いた*in vivo*評価

正常マウスを用いた*in vivo*評価結果を基に、病態モデルマウスを用いた評価を行った。炎症モデルとして、代表者の所属研究室において作成手法を確立しているテレピン油惹起炎症モデルマウスを用いた。

腫瘍モデルマウスは、HCA-7 colony29細胞(COX-2高発現)および、HT-29細胞(COX-2低発現)を殖えることで作製した。

以上3つの研究項目にて標識合成および*in vivo*評価を行い、得られた結果から、ニメスリド誘導体のCOX-2イメージング剤としての可能性について考察を行った。

4. 研究成果

(1) 化合物の標識合成条件の確立

放射性同位元素標識のための標識前駆体として、 $-OCH_3$ 誘導体は脱メチル化反応により、定量的な収率にて $-OH$ 体を得ることに成功し、 $-I$ 誘導体はスズ化反応により、33 ~ 50% の収率にて $-SnBu_3$ 体を得ることに成功した。

これら標識前駆体を用いた ^{11}C 標識合成は、 $[^{11}C]CH_3OTf$ によるメチル化により行い、放射化学的収率 20 ~ 30% にて成功し、十分な放射エネルギーと放射化学的純度の ^{11}C 標識体を得ることに成功した。また、 ^{125}I 標識合成は、 $[^{125}I]NaI$ を用いた反応において、様々な酸化剤を比較検討したところ、Chloramine-T を用いた条件が最も副生成物が少なく、かつ 70 ~ 80% の高い放射化学的収率にて得られることを明らかにした。

(2) 正常マウスを用いた *in vivo* 評価

^{11}C 標識ニメスリド誘導体を用いた PET 撮像の結果、正常マウス頭部への集積は、化合物の COX-2 阻害とは関係なく集積が低いという結果が得られた。また、代謝物分析を行ったところ、 ^{11}C 標識ニメスリド誘導体 3 種すべて、正常マウス生体内において、投与 15 分 ~ 30 分後にはその大半が代謝されており、未変化体はあまり存在していないという結果となった。すなわち、 ^{11}C 標識ニメスリド誘導体は安定性の低い化合物であるといえる。これら化合物の非標識体を用いた *in vitro* 安定性評価では、添加 120 分後においても非常に安定であったことから、 ^{11}C 標識を行ったことで不安定性が増した可能性や、*in vivo* にて関与する酵素等の影響が大きかった可能性が考えられる。

しかしながら、COX-2 に対する選択的阻害活性が最も高い $[^{11}C]$ ニメスリド-*p*- OCH_3 に関して、各種 COX-2 阻害剤の併用により、脳への集積が有意に低下するという結果が得られたほか、脳の *ex vivo* ARG によって、COX-2 高発現部位である大脳皮質への局所分布が明らかとなった。このことから、 $[^{11}C]$ ニメスリド-*p*- OCH_3 は安定性の課題さえ解決すれば、良好な COX-2 イメージング剤となり得ると推測される。

^{125}I 標識ニメスリド誘導体を用いた生体内分布評価の結果、全体的に血中滞留性が高いという結果が得られた。また、代謝物分析を行ったところ、 ^{125}I ニメスリド誘導体は 2 種とも、正常マウス生体内において、投与 6 時間後においてもほとんどが未変化体であることが明らかとなり、安定性の高い化合物であると考えられる。

なお、COX-2 選択的阻害活性の高い $[^{125}I]$ ニメスリド-*p*- I に関して、COX-2 が定常的に発現するとされる胃や腸において高い集積が認められたことから、末梢に存在する COX-2 をイメージングできる可能性が示唆された。

(3) 病態モデル動物を用いた *in vivo* 評価

炎症モデルマウスに対して COX-2 選択的阻害活性の高い $[^{11}C]$ ニメスリド-*p*- OCH_3 を投与し、その生体内分布を評価したところ、全体的に washout 傾向にあり、炎症への集積は認められなかった。これは正常マウスを用いた代謝物分析の結果、安定性が低いことに由来するものと推測される。

同様に、炎症モデルマウスに対して COX-2 選択的阻害活性のない $[^{125}I]$ ニメスリド-*m*- I を投与し、その生体内分布を評価したところ、炎症への集積が認められなかった一方で、COX-2 選択的阻害活性の高い $[^{125}I]$ ニメスリド-*p*- I を投与したところ、炎症部位への集積が認められたうえに、各種 COX-2 阻害剤と併用することによって、投与 6 時間後の $[^{125}I]$ ニメスリド-*p*- I の炎症部位への集積は有意に低下した。すなわち、 $[^{125}I]$ ニメスリド-*p*- I は COX-2 特異的に炎症部位へと集積していることが分かる。

さらに、COX-2 を高発現する HCA-7 colony29 細胞を殖えた腫瘍モデルマウスに対して、COX-2 選択的阻害活性の高い $[^{125}I]$ ニメスリド-*p*- I を投与し、その生体内分布を評価したところ、投与 6 時間後の $[^{125}I]$ ニメスリド-*p*- I の腫瘍への集積は非常に高く、腫瘍/筋肉比が 3.21 という結果が得られた。

これらのことから、COX-2 選択的阻害活性が高く、かつ *in vivo* において安定な $[^{125}I]$ ニメスリド-*p*- I は、有力な COX-2 イメージング剤候補化合物であるといえる。

当該研究期間全体を通して、パラ位にヨウ素を導入したニメスリド誘導体の ^{125}I 標識化合物が、有力な COX-2 イメージング剤候補化合物であることを見出すとともに、COX-2 イメージング剤として求められる性質は、COX-2 への選択的阻害活性に加えて、生体内安定性が非常に重要な要素となることを明らかにした。

今後は、本研究課題で良好な候補化合物であることが明らかとなった $[^{125}I]$ ニメスリド-*p*- I に関する評価をさらに進めていくことで、臨床応用への可能性を探っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yohei Saito, Yoshikazu Kuwahara, Yumi Yamamoto, Masatoshi Suzuki, Manabu Fukumoto, Fumihiko Yamamoto	4. 巻 16
2. 論文標題 ddY Mice Fed 10% Fat Diet Exhibit High p27KIP Expression and Delayed Hepatocyte DNA Synthesis During Liver Regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metabolic Syndrome and Related Disorders	6. 最初と最後の頁 305-313
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/met.2017.0131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡部 俊彦, 伊藤 邦郎, 八木 朋美, 成田 紘一, 中林 悠, 青木 空眞, 山本 由美, 生田 和史, 林 もゆる, 山本由似, 高井 淳, 佐藤 厚子, 諸根 美恵子, 亀岡 淳一, 大野 勲, 米澤 章彦	4. 巻 65
2. 論文標題 An objective evaluation and analysis of the ability to generate and to ask questions regarding presentations -A survey involving 1st-year medical and pharmacy students of FY 2018-	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Tohoku Medical and Pharmaceutical University	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 由美
2. 発表標題 炎症関連病態のPET/SPECTイメージングを目指したNSAIDs誘導体の開発研究
3. 学会等名 東北医科薬科大学 第498回 集談会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿嶋 美杜, 針生 怜, 綾部 祐希, 佐々木 遼, 山本 由美, 齋藤 陽平, 山本 文彦
2. 発表標題 放射性ラクトソーム安定性評価のための125I-PLLAの生体内分布の検討
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綾部 祐希、佐々木 遼、山本 由美、齋藤 陽平、小関 英一、木村 俊作、山本 文彦
2. 発表標題 In-111標識A3B型ラクトソームの血液中における放射能分布
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 針生 怜、鳥井 唯花、菊地 綾乃、牧野 顕、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 ラクトソームの葉酸修飾率最適化の検討
3. 学会等名 第3回放射性薬品科学研究会 / 第19回放射性医薬品・画像診断薬研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 針生 怜、岡田 美桜、佐々木 遼、牧野 顕、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 葉酸修飾ラクトソームの細胞取り込みと生体内分布評価
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 由美
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的とした新規NSAIDs誘導体の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 物理系薬学部会シンポジウム 物理系薬学における研究と教育の展望（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yumi Yamamoto, Tetsuro Tago, Jun Toyohara, Yohei Saito, Fumihiko Yamamoto
2. 発表標題 Isomeric [¹¹ C]methoxy analogs of nimesulide: radiosynthesis and in/ex vivo evaluation
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumi Yamamoto, Rie Midoriyama, Yohei Saito, Fumihiko Yamamoto
2. 発表標題 In vivo biodistribution of meta- and para- ¹²⁵ I nimesulides as novel COX-2 imaging agents
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryo Sasaki, Yumi Yamamoto, Yohei Saito, Isao Hara, Ei-ichi Ozeki, Shunsaku Kimura, Fumihiko Yamamoto
2. 発表標題 Biodistribution of In- ¹¹¹ labeled Lactosome in tumor-bearing mice
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 陽平、山本 由美、山本 文彦
2. 発表標題 放射線照射による突然変異パターンに対するAPOBEC3Bの影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡部 俊彦、伊藤 邦郎、八木 朋美、成田 紘一、中林 悠、青木 空眞、山本 由美、生田 和史、林 もゆる、山本 由似、高井 淳、佐藤 厚子、諸根 美恵子、亀岡 淳一、大野 勲、米澤 章彦
2. 発表標題 質問生成力と質問発信力を客観的に評価できる教育カリキュラムの立案
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 針生 怜、鳥井 唯花、伊澤 悠香、菊地 綾乃、佐々木 遼、高橋 静由、牧野 顕、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 葉酸修飾ラクトソームの開発及び腫瘍認識能の初期評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 遼、高橋 静由、綾部 祐希、山本 由美、齋藤 陽平、小関 英一、木村 俊作、山本 文彦
2. 発表標題 In-111標識ラクトソームの脳腫瘍への集積機序の検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 茉優子、山本 由美、石田 麗歌、虻川 郁、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的とした炎症モデルマウスにおけるニメスリド-p-ヨウ素誘導体のin vivo阻害評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 麗歌、山本 由美、虻川 郁、小林 茉優子、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的としたニメスリドヨウ素誘導体の炎症モデルにおけるin vivo評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川 陽子、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的とした新規ニメスリドp-置換誘導体の合成及び評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 涼太、築瀬 友希、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的としたnimesulide-p,m位ヨウ素標識合成
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本 由美、佐々木 涼太、築瀬 友希、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的としたnimesulide-p位ヨウ素誘導体の標識合成
3. 学会等名 第57回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本 由美、築瀬 友希、佐々木 涼太、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 スズ前駆体を用いたnimesulide誘導体の放射性ヨウ素標識合成法の検討
3. 学会等名 第57回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤 陽平、山本 由美、山本 文彦
2. 発表標題 放射線照射による突然変異に対するAPOBECの関与
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤 陽平、桑原 義和、山本 由美、山本 文彦
2. 発表標題 放射線照射による遺伝子突然変異に対するAPOBEC3の影響
3. 学会等名 治療耐性がん細胞研究協議会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 陽平、石井 孝弘、山本 由美、山本 文彦
2. 発表標題 放射線照射によるがん細胞の突然変異に対するAPOBEC3の影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本薬学会 令和2年度 物理系薬学学会 奨励賞 受賞 http://bukai.pharm.or.jp/bukai_butsurikei/prize.html 第58回日本核医学会 いいね大賞5位 受賞 http://www.tohoku-mpu.ac.jp/university/prize-university/13669/ 東北医科薬科大学 放射薬品学教室 http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/hosya/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	豊原 潤 (TOYOHARA Jun) (50425659)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所 (82674)	
研究協力者	多胡 哲郎 (TAGO Tetsuro)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所 (82674)	
研究協力者	佐々木 涼太 (SASAKI Ryota)	東北医科薬科大学・薬学部 (31305)	
研究協力者	小林 茉優子 (KOBAYASHI Mayuko)	東北医科薬科大学・薬学部 (31305)	
研究協力者	石川 陽子 (ISHIKAWA Youko)	東北医科薬科大学・薬学部 (31305)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	石田 麗歌 (ISHITA Reika)	東北医科薬科大学・薬学部 (31305)	