

令和元年6月22日現在

機関番号：34306

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19670

研究課題名(和文)がんTheranosticsを可能にする化合物創製とその高度化利用

研究課題名(英文)Development and application of novel chemical compounds to materialize the cancer theranostics

研究代表者

安井 裕之(Yasui, Hiroyuki)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20278443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子受容体(EGFR)、繊維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)、及びチロシンキナーゼ型受容体の1つであるEphA2を標的とした分子プローブ候補物質として、数種類の低分子化合物の非標識体を設計・合成することに成功した。特に開発が進んだのは、EGFRを標的とした化合物Aであり、F-18で標識してPET/CT撮像を実施したところ、投与後速やかに肝代謝を受け、継時的に脳頭蓋骨と骨へ集積した。肺がんを対象疾患とする際、正常肺組織への集積はバックグラウンドが高くなるため、投与120分後のPET撮像が腫瘍を最も明瞭に検出できると結論した。これらの結果を踏まえ、化合物Aの特許出願を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療を目的とした新規化合物の開発については、腫瘍細胞に対する増殖抑制効果や細胞死誘導効果をインビトロ実験系により解析を進める必要や、薬理効果をインビボ実験系で評価する検討も必要ではあるが、最優先課題であった、がんTheranosticプローブとして有望なリード化合物を以下の様に創製することに成功した。

1) EGFRを標的とした低分子化合物A(肺がんのPET撮像に有効)、2) EGFRを標的としたTheranosticプローブであるモノクローナル抗体-キレート化合物(In-111、Y-90によるRI標識が可能)、3) EphA2を標的とした新規の低分子化合物B(乳がんのPET撮像に有効)。

研究成果の概要(英文)： We have succeeded to design and synthesize several kinds of low molecular-weight organic RI-unlabeled compounds as potential candidates of imaging probes and therapeutic ligands targeted for the receptors such as EGFR, FGFR, and EphA2 as one of the tyrosine kinase type-receptor. Especially, the research and development of compound A as an imaging probe targeted for EGFR were most proceeded among this project, where the PET/CT imaging with F-18-labeled compound A indicated the faster hepatic metabolism and gradual distribution in the bones of brain skull and whole-body. If we use compound A for diagnosis of lung cancer, its distribution and accumulation in normal lung tissues will lead to the false positive diagnosis by the higher background levels and unclear contrasts. Then, we decided that the optimum time points for PET/CT imaging of lung cancer would be 120 min after i.v. injection of compound A. In conclusion, we have planned to carry out a patent application of compound A.

研究分野：薬学

キーワード：がんTheranostics フレキシブルTheranosticsプローブ EGFR EphA2 PET/SPECTイメージング EGFRv III Fzd3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が所属する京都薬科大学では、単科の薬系大学であるにもかかわらず、教員数当たりの文部科学省科学研究費の採択件数は国内でも上位に位置し、その高い研究力は長年に渡り国内外から高い評価を受けている。研究力の最大の強みの1つに、新規化合物の化学合成や生体内の薬物動態解析を専門とする研究者、分子及び生体イメージングを専門とする研究者、生物学的視点から疾患の発症・進展の本質を追求する病態解析・疾患治療に特化した研究者が、新たな医薬品及び製剤技術の開発という目的を共有して、同一施設に共存していることである。

この特徴を最大限に活用することを基盤として、腫瘍組織に特異的に集積する生体内診断用化合物と、この化合物特性をフレキシブルに応用して標的組織にターゲット化した治療薬剤を同時に開発することで、京都薬科大学オリジナルの化合物の創製とその利用法の研究を展開できると考えた。すなわち、現在までに本学内で集積した生体内の特定組織に集積する体内動態特性を有するプローブ化合物の開発と、それらを自在に化学的改変するための有機合成技術、モデル動物自身の正常細胞を起源として自発的に発がんする悪性腫瘍モデル動物の作製技術、及び疾患治療技術 (RI 内用療法、抗がん性無機医薬品、光線力学療法) を組み合わせることにより、他の研究グループでは実現が困難な、診断技術研究と治療薬開発研究を融合した新しい研究領域である“がん Theranostics”を構築できるのではないかと研究構想に至った。

本申請内容の参考となる外部の研究成果として、がん治療の例が挙げられる。近年のがん治療に対する分子標的治療薬や抗体医薬の発展は、特にコンパニオン診断薬と組み合わせることによって、がんの分子生物学的研究の成果に立脚した新規の個別化医療が大きな可能性と具体的な実現性を有することを示している。そこで、本研究の成果からも、低侵襲な診断および腫瘍組織の特性に関する医療情報を取得し、同時にシームレスな手法で効果判定に関する予測情報が付加される治療薬のセット開発を目指すことにする。本学の研究グループが保有するダイナミックで、一見して判断しやすい研究技術を結集し、核医学的な診断技術と化学療法的な分子標的薬物治療学を融合したような、オリジナルな個別化診断治療戦略の開発に挑戦することは、大きな意義をもつはずである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん Theranostics (診断と治療の融合) を可能にする化合物創製とその高度化利用にある。具体的には、分子イメージング技術を用いてがんの早期発見、性状の特異的・効率的な把握を行い、有効な治療法へと結びつけるワークフローの構築を行うことである。そのため、依然として予後が不良である肺がんや脳腫瘍を対象疾患として、臨床に应用可能な画像診断法・治療法に有用な新規化合物を創製することにより、画像診断と治療を融合させた、新しいがん治療の個別化及び効率化を提案すること、すなわち、がんの診断と治療を一体と捉えた“がん Theranostics”を可能にする化合物創製とその高度化利用を当面の優先課題とした。

悪性腫瘍はわが国における死因の第1位を占め、肺がんや膠芽腫などの脳腫瘍の予後は依然として極めて不良である。様々な分子標的治療薬が登場している現在、個々の症例に応じて適切な治療法を選択することの重要性は飛躍的に増している。一方、画像診断の技術進歩は、個体への低侵襲に腫瘍組織の性状を把握できる可能性を広げている。また、ゲノム解析の進歩により、同一の悪性腫瘍であっても、症例毎に変異を受けている遺伝子セットが異なり、発がんのメカニズムが異なることが明らかになってきている。そこで我々は、診断と治療を一体のプロセスと捉え、シームレスな画像診断から治療へのワークフローの構築を実現する、フレキシブル Theranostics プローブの開発を計画した。

フレキシブル Theranostics プローブの特徴は、標的認識ユニット (標的分子特異的)、リンカーユニット、キレートユニット [イメージング用・治療用放射性同位元素、蛍光団 (外科的手術の術中診断用) 金属元素 (無機医薬品用・光線力学療法用薬剤) など] を有すること、

診断、治療の目的に合わせてユニットを自由に組換え可能、同一の母体骨格を有する化合物で診断と治療を同時に行うため、薬剤開発の効率性が高いことなどが挙げられる (図1)。

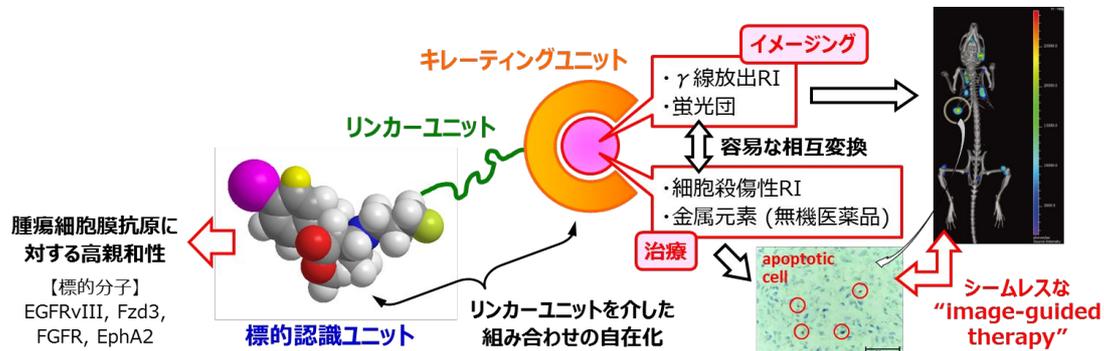


図1 フレキシブル Theranostics プローブ

3. 研究の方法

本研究では、肺がん及び脳腫瘍に重点を置き、フレキシブル Theranostics プローブの創製

を行う。これまでに研究グループが具体的に検討を進めてきた実績を有する、以下に挙げた膜タンパク質を標的分子として選択する。

肺がん (EGFR, FGFR, EphA2) : FGFR は繊維芽細胞増殖因子受容体と言われる受容体型チロシンキナーゼであり、FGFR1~4 までのサブタイプがある。扁平上皮がんでは FGFR1 が過剰発現していると報告されているが、FGFR を標的とした医薬品開発は未だ発展途上段階である。EphA2 は、チロシンキナーゼ型受容体の 1 つであり、悪性度の高いがん細胞に過剰に発現しており、創薬の重要な標的分子となっている。EphA2 の過剰発現は悪性転換、予後不良、転移性進行、及び p53 誘導アポトーシスと関連すると報告されている。

脳腫瘍 (EGFRvIII, Fzd3) : EGFRvIII はヒト脳腫瘍の約 30%にみられる EGFR の異常活性化変異体であり、重要な治療標的分子候補の筆頭である。分担研究者の中田らが確立してきたトランスポゾンシステムを用いたモデルマウスは、新生児マウス脳室内にヒト EGFRvIII 変異体、Ras 変異体、shTP53 といった発がん遺伝子をコードしたトランスポゾン対応型 DNA プラスミドを投与することで脳室周囲の神経幹細胞にがん原生変異を来し、生後 10-12 週後にヒト膠芽腫に酷似した脳腫瘍を発生させる技術である。すなわち、このモデルマウスでは、ヒト臨床検体でみられる EGFRvIII にドライブされる脳腫瘍細胞が発生するため、直接的な生体評価系として最適である。また、Fzd3 は Wnt リガンドに対する受容体であり、脳腫瘍幹細胞における高発現と本モデルマウス脳腫瘍組織で高発現することを確認している細胞膜タンパク質である。従って、Wnt シグナルを阻害する新規標的分子としての可能性が期待できる。

2 年間の研究期間のうち最初の 1 年目は、EGFR、FGFR、EphA2 に関しては、それぞれの低分子プローブを既に木村・有光・河嶋が開発中であるため、速やかに RI 標識プローブの合成を達成し、標的分子への結合性をインビトロ実験系にて評価する。インビトロ系での有用性が確認された化合物については、健常動物を用いて基礎的な体内動態特性を解析し、血液クリアランスや臓器分布、体内安定性に関する知見を集積し、イメージング及び治療に適した候補化合物をインビボ実験系により絞り込む。また、より詳細な解析を目的としたモデル動物の作製も進める。一方で、治療を目的とした化合物については、腫瘍細胞に対する増殖抑制効果や細胞死誘導効果をインビトロ実験系で詳細に解析する。安井は、B16/BL6 メラノーマ細胞に対して臨床で用いられる白金錯体であるシスプラチンよりも遥かに高い抗腫瘍効果を示す新規の Cu-Zn 複核錯体を見出しており、新たに発見された細胞死 (パラポトーシス) を誘導するこれらの新規概念を本申請課題にも適用する。EGFRvIII、Fzd3 に関しては、既に蓄積しているトランスポゾンシステムを用いたマウスモデル脳腫瘍組織を適用し、発現解析を中心とした病理学的な検討を進めると共に、蛍光もしくは RI 標識した抗体由来のプローブを合成し、培養脳腫瘍幹細胞画分を用いたインビトロ実験によりその標的分子への結合性を評価する。

続いて 2 年目は、イメージングプローブの最適化と、治療実験を実施する。特に脳腫瘍に関しては、標的分子とプローブの集積度合いの評価に加え、EGFRvIII もしくは Fzd3 の機能を阻害した際の抗腫瘍活性を定量的に評価する。また、近年、脳腫瘍幹細胞の浸潤能制御に関わり治療標的として着目されている EphA2 に関しても抗腫瘍効果の確立を目指す。また、抗体プローブに対する抗体依存的な細胞介在性細胞障害作用の活性評価や、RI 内用療法用プローブの効果判定の確立を目指す。肺がんに関しては、低分子化合物を母体としたプローブのイメージングと治療効果の有用性を脳腫瘍と同様に評価する。河嶋は、186/188-Re や 90-Y を用いた RI 内用療法の研究をこれまでに進めており、加えて安井は Cu もしくは Zn を用いたポルフィリン系金属錯体による光線力学治療法の開発を行っているため、それらを組み合わせることで Theranostics 用分子プローブの創製が可能になるかを検討する。フレキシブル Theranostics プローブの創製に成功すれば、画像診断と治療を融合させた、がん治療の個別化、効率化を目指した新しいワークフローの構築が可能となり、当初の目的を達成することになる。

4. 研究成果

上皮成長因子受容体 (EGFR)、繊維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR)、及びチロシンキナーゼ型受容体の 1 つである EphA2 を標的とした分子プローブ候補化合物として、数種類の低分子化合物の非標識体を設計・合成した。そのうちの 4 化合物が、インビトロ実験系の結合解析及びファンクショナルアッセイの結果から標的分子との高い親和性を有していることが分かった。この中で、特に開発が進んでいるのが、EGFR を標的とした化合物 A である。F-18 で標識された化合物 A を用いて PET/CT 撮像を実施したところ、肝臓への集積は、投与 30 分後が最も高く徐々に集積量の低下が見られた。肺への集積は投与 30 分後にわずかに集積が見られたが、投与 60 分後には集積は見られなかった。また、脳頭蓋骨、骨、膀胱への集積は、継続的に増加していた。得られた画像から各撮像タイムポイントでの腫瘍/筋肉比、腫瘍/肺比を算出したところ、腫瘍/筋肉の比率は、30 分後が 15.9 と最も高い結果となった。120 分後まで、一旦 2.5 まで減少したが、180 分後には 7.5 まで再び増加していた。腫瘍/肺の比率は、120 分後が 7.6 と最も高値を示した。これらの結果から、化合物 A は投与 30 分後まで肝代謝を受け、継続的に脳頭蓋骨、骨へ集積する傾向があると考えられる。本研究は、肺がんを対象疾患としているため、バックグラウンドである肺への集積が少ないことが望ましい。その点においては、投与 120 分後の撮像が最も腫瘍が明瞭に検出できると考える。これらの結果を踏まえ、現在化合物 A の特許出願を検討している。

加えて、EGFR を標的とした Theranostic プローブとして、モノクローナル抗体を用いた化

化合物を3種類開発し、In-111でRI標識して担がんモデルマウスでの体内分布実験を実施した。その結果、投与2日後に腫瘍組織に高く集積した(25~35% dose/g of organ) (図2)。本化合物は、Y-90でもRI標識可能なことからRI内用療法に向けた薬剤としても利用できる。現在は、がん治療効果の研究を進めている。

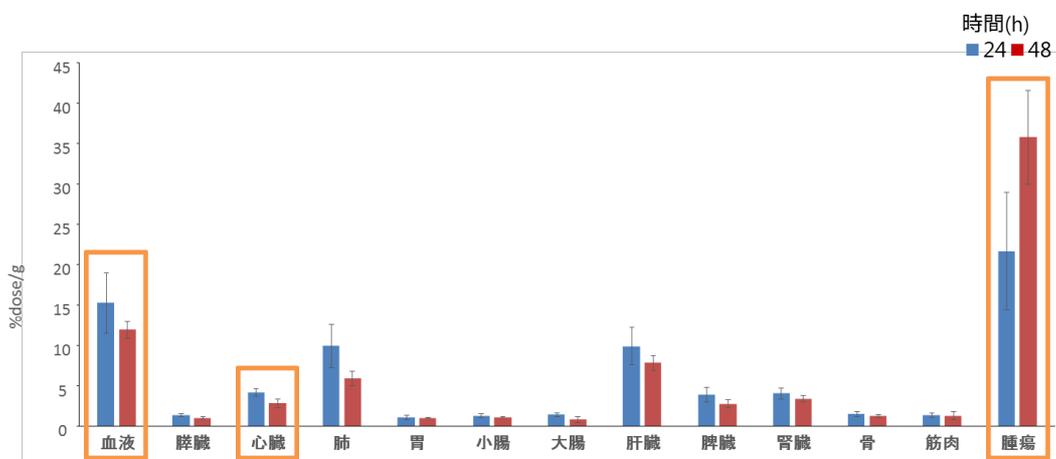


図2 EGFRを標的としたIn-111標識抗体の体内分布実験

また、EphA2を標的としたプローブとして、新規化合物Bの開発を行った。EphA2に対する阻害活性は $IC_{50} = 83 \text{ nM}$ と非常に高く、計算化学的手法を用いた薬剤設計の妥当性が証明された(図3)。先ず、健常マウスでの基礎体内動態評価を実施したところ、化合物Bは尾静脈から投与後より乳腺組織に高く移行し、経時的にクリアランスされることが分かった(図4)。次に、EphA2が高発現しているヒト乳癌細胞MDA-MB-231を移植した担がんモデルマウスでのインビボ評価を実施したところ、尾静脈から投与後60分で腫瘍/血液比=5.3、腫瘍/筋肉比=2.1、腫瘍/乳腺比=1.4と予想通りに腫瘍に高く集積することが明らかとなった。今後は、抗腫瘍効果の確立を目指していく。

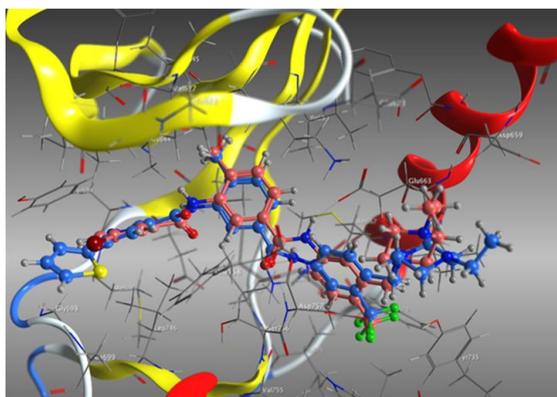


図3 化合物Bのドッキングシミュレーション

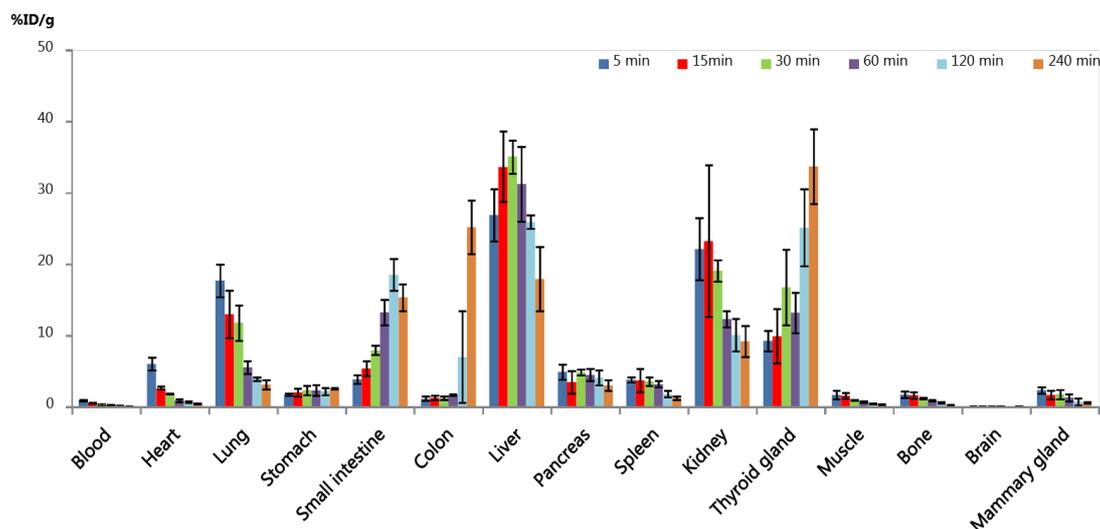


図4 健常マウスを用いた化合物Bの基礎体内分布実験

一方、脳腫瘍に関連する EGFRvIII 及び Fzd3 については、近年では脳腫瘍幹細胞の浸潤能制御に関わる治療標的としても着目されているが、これまでに蓄積しているトランスポゾンシステムを用いたマウスモデル脳腫瘍組織を適用し、発現解析を中心とした病理学的な検討を進めている途中段階である。同時に、蛍光もしくは RI 標識した抗体由来のプロープを設計しており、実際にプロープの合成が完了した後は、培養脳腫瘍幹細胞画分を用いたインビトロ実験系によりその標的分子への結合性を評価する予定である。特に、標的分子とプロープの集積度合いの評価に加え、EGFRvIII もしくは Fzd3 の機能を阻害した際の抗腫瘍活性を定量的に評価することを計画している。さらに、本システムを他の標的にも適用することで、自然発症型のモデル動物の構築を検討することも計画している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Hiroyuki Kimura, Hirokazu Matsuda, Yu Ogawa, Hiroyuki Fujimoto, Kentaro Toyoda, Naotaka Fujita, Kenji Arimitsu, Keita Hamamatsu, Yusuke Yagi, Masahiro Ono, Nobuya Inagaki, Hideo Saji: Development of ¹¹¹In-labeled exendin(9-39) derivatives for single-photon emission computed tomography imaging of insulinoma. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **25**, 1406-1412 (2017). doi: 10.1016/j.bmc.2016.12.051
- 2) Takeshi Okuda, Takayuki Tasaki, Susumu Nakata, Kimihiro Yamashita, Hiromasa Yoshioka, Shuichi Izumoto, Amami Kato, Mitsugu Fujita: Efficacy of Combination Therapy with MET and VEGF Inhibitors for MET-overexpressing Glioblastoma. *Anticancer Research*, **37**, 3871-3876 (2017). doi: 10.21873/anticancer.11767
- 3) Atushi Nakano, Hidekazu Kawashima, Yoshinori Miyake, Tsutomu Zeniya, Akihide Yamamoto, Kazuhiro Koshino, Takashi Temma, Tetsuya Fukuda, Yoshiko Fujita, Akemi Kakino, Shigehiko Kanaya, Tatsuya Sawamura, Hidehiro Iida: ¹²³I-Labeled oxLDL is widely distributed throughout the whole body in mice. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **52**, 144-153 (2018). doi: 10.1007/s13139-017-0497-2
- 4) Daiko Matsuoka, Hiroyuki Watanabe, Yoichi Shimizu, Hiroyuki Kimura, Yusuke Yagi, Ryoko Kawai, Masahiro Ono, and Hideo Saji: Structure - activity relationships of succinimidyl-Cys-C(O)-Glu derivatives with different near-infrared fluorophores as optical imaging probes for prostate-specific membrane antigen. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **26**, 2291-2301 (2018). doi: 10.1016/j.bmc.2018.03.015
- 5) Akira Makino, Anna Miyazaki, Ayaka Tomoike, Hiroyuki Kimura, Kenji Arimitsu, Masahiko Hirata, Yoshiro Ohmomo, Ryuichi Nishii, Hidehiko Okazawa, Yasushi Kiyono, Masahiro Ono, and Hideo Saji: PET probe detecting non-small cell lung cancer susceptible to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **26**, 1609-1613 (2018). doi: 10.1016/j.bmc.2018.02.007
- 6) Ryo Masuda, Risa Hayashi, Hiroshi Nose, Akihiro Taguchi, Yoshio Hayashi, Hiroyuki Yasui, and Takaki Koide: Development of a carboplatin derivative conjugated with a collagen-like triple-helical peptide. *Future Medicinal Chemistry*, **10**, 619-629 (2018). doi:10.4155/fmc-2017-01830
- 7) Hiroyuki Kimura, Yu Ogawa, Hiroyuki Fujimoto, Eri Mukai, Hidekazu Kawashima, Kenji Arimitsu, Kentaro Toyoda, Naotaka Fujita, Yusuke Yagi, Keita Hamamatsu, Takaaki Murakami, Atsushi Murakami, Masahiro Ono, Yuji Nakamoto, Kaori Togashi, Nobuya Inagaki, and Hideo Saji: Evaluation of ¹⁸F-labeled exendin(9-39) derivatives targeting glucagon-like peptide-1 receptor for pancreatic β -cell imaging. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **26**, 463-469 (2018). doi: 10.1016/j.bmc.2017.12.007

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 二木珠希、平内孝典、中川結稀、内藤行喜、安井裕之：銅および亜鉛を含有する多核金属錯体の B16/BL6 細胞への殺細胞活性および抗腫瘍効果。日本薬学会第 137 年会 (宮城), 2017.3.
- 2) 茂山千愛美、藤田貢、飯居宏美、谷口恵香、吉貴達寛、中田晋：Stat5b は発がんマウスモデル由来膠芽腫幹細胞の増殖促進に寄与している。第 76 回 日本癌学会学術総会(横浜), 2017.9.
- 3) 林 梨沙、増田 亮、能勢 博、田口晃弘、林 良雄、小出隆規、安井裕之：コラーゲン様 3 重らせんペプチド結合型白金錯体の体内動態解析と腹膜播種担がんマウスにおける抗腫瘍効果。第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (兵庫), 2017.10.
- 4) 東馬智未、茂山千愛美、小島直人、岩崎仁志、安藤翔太、藤田貢、谷口恵香、飯居宏美、吉貴達寛、中田晋：脳腫瘍幹細胞マウスモデルを用いたアセトゲニン誘導体新規がん治療薬開発。日本薬学会第 138 年会 (石川), 2018.3.
- 5) 有光健治、木村寛之、屋木祐亮、佐治英郎、安井裕之：¹⁸F 標識 STZ 誘導体の体内分布に関する基礎的評価。日本薬学会第 138 年会 (石川), 2018.3.
- 6) 屋木祐亮、有光健治、平野圭市、安井裕之、木村寛之：F-18 標識ボロン酸誘導体を用い

- た新規 F-18 標識法の開発. 第 41 回フッ素化学討論会 (青森), 2018.10.
7) 屋木祐亮、有光健治、平野圭市、安井裕之、木村寛之: F-18 標識ボロン酸誘導体による鈴木カップリング反応を用いた新規 F-18 標識法の開発. 第 58 回日本核医学会学術総会 (沖縄). 2018.11.

〔図書〕(計 3 件)

- 1) 木村寛之、河嶋秀和、有光健治: 臨床放射薬学 薬学領域における放射化学の理論と実践, 河嶋秀和, 木村寛之 編著, 京都廣川書店 (2017).
- 2) Hiroyuki Yasui and Yutaka Yoshikawa: Chapter 16. Frontier of development for metallodrugs on the basis of metallomic pharmacology and medicinal inorganic chemistry, Metallomics-Recent Analytical Techniques and Applications-, edited by Yasumitsu Ogra and Takafumi Hirata, 341-364, Springer Japan KK (2017).

〔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: <http://labo.kyoto-phu.ac.jp/taisya/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 戸崎 充男

ローマ字氏名: Tozaki Mitsuo

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 環境安全保健機構放射性同位元素総合センター

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 70207570

研究分担者氏名: 中田 晋

ローマ字氏名: Nakata Susumu

所属研究機関名: 京都薬科大学

部局名: 薬学部 臨床腫瘍学分野

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 80590695

研究分担者氏名: 河嶋 秀和

ローマ字氏名: Kawashima Hidekazu

所属研究機関名: 京都薬科大学

部局名: 薬学部 放射線同位元素研究センター

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 70359438

研究分担者氏名: 有光 健治

ローマ字氏名: Arimitsu Kenji

所属研究機関名: 京都薬科大学

部局名: 薬学部 代謝分析学分野

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 50707693

研究分担者氏名: 木村 寛之

ローマ字氏名: Kimura Hiroyuki

所属研究機関名: 京都薬科大学

部局名: 薬学部 代謝分析学分野

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 50437240

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。