

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19527

研究課題名（和文）核医学・蛍光デュアルイメージングを可能とするトリファンクショナルキレートの開発

研究課題名（英文）Development of a tri-functional chelate for nuclear/fluorescence dual imaging

研究代表者

向 高弘（Mukai, Takahiro）

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30284706

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：がんの画像診断において、核医学診断は術前の全身スクリーニングを可能とする一方で、蛍光イメージングは術中のリアルタイム診断を可能とする。核医学診断と蛍光イメージングを同時に達成しうる薬剤骨格を開発できれば、がんの術前診断と術中診断をシームレスに行うことが出来るため、高精度の外科的治療へと繋ぐことが可能となる。本研究では、放射性ガリウム-67/68と配位子であるDOTAの錯体が6座配位であることに着目し、DOTAの一つのカルボキシ基に蛍光色素を導入し、さらに、DOTA骨格の向かい合うもう一つのカルボキシ基に葉酸を導入した薬剤を合成し、葉酸受容体を高発現する卵巣がんの検出に有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核医学診断と蛍光イメージングを同時に達成しうる薬剤骨格を開発できれば、がんの診断から治療への効率的ワークフローを構築でき、高効率な確定診断と、それに基づく効果的な治療法の迅速な選択・決定が可能になると考えられる。それにより、がんの早期における治療戦略決定が可能となり、最適な治療法選択と実施推進により治療効果の向上、必要な治療法の絞込みによる医療経済効果への寄与が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The imaging probes applicable to both nuclear medical imaging and fluorescence imaging could provide identical information for both pre- and intra-operative diagnoses of cancers, leading to precise surgical therapy. In this study, since two free carboxylate groups of the radiogallium-DOTA complex could be used for coupling to functional moieties that recognize cancer-specific molecular targets, we introduced a fluorescence dye to a carboxylate group on DOTA, and furthermore, a folate derivative to another carboxylate group. The new compound could detect ovarian cancers highly expressing folate receptors in vivo.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射性医薬品 イメージング ガリウム 蛍光 薬学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Positron Emission Tomography (PET) は、ポジトロン放出核種 (^{11}C , ^{18}F 等) によって標識された生理活性物質や薬剤を生体内に投与することにより、分子レベルでの機能画像を提供できるという点で、他の画像診断技術の追随を許さず、医療分野のみならず生命科学分野の発展にも大きく寄与してきた。しかし、PET 核種は極めて短寿命であり、PET カメラの他にポジトロンを製造するサイクロトロンを設置した大型施設を必要とするために、臨床応用や基礎研究等への広範な利用が制約を受けてきたのも実情である。一方、ガリウムの放射性同位体である ^{68}Ga は、 $^{68}\text{Ge} - ^{68}\text{Ga}$ の放射平衡を利用したジェネレータより得られるため、サイクロトロンを必要とせず、汎用性が高く、今後の利用の拡大が期待されている。Ga と安定な錯体を結合する配位子のひとつに、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸 (DOTA) がある。図 1 に示すように、DOTA は Ga だけでなく、イットリウム (Y) やインジウム (In) と安定な錯体を形成するが、In-DOTA や Y-DOTA では DOTA の 4 つの N 原子と 4 つの O 原子とが配位している (8 座配位) が、Ga-DOTA では DOTA の 4 つの N 原子と向かい合う 2 つの O 原子とが配位している (6 座配位) ことが、X 線構造解析により明らかとなった。即ち、Ga-DOTA 錯体では、COOH 基は 2 つ余っていることになる。

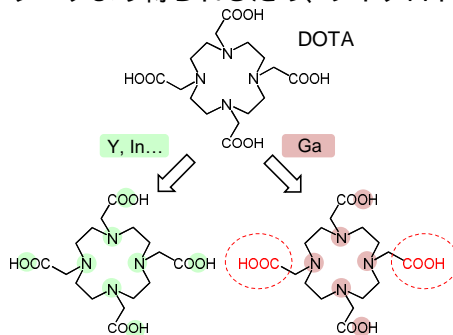


図 1 金属と DOTA のキレート形成

そこで、これまでに研究代表者らが構築してきた分子設計法である、標的組織の認識部位と放射性金属核種結合部位とを一分子内に独立して有するバイファンクショナルキレートという分子設計概念 (図 2 左) の基に、安定な Ga-DOTA 錯体において 2 つの COOH 基が錯体形成に関与していないことに着目して、この COOH 基に、機能性分子を導入するという薬剤設計を提唱してきた^{1,2}。これまでの検討結果から、バイファンクショナルキレートの薬剤設計に基づき、標的分子への親和性向上に伴う標的部への高い集積性と ^{68}Ga 錯体の生体内安定性とが両立できたと考えている。

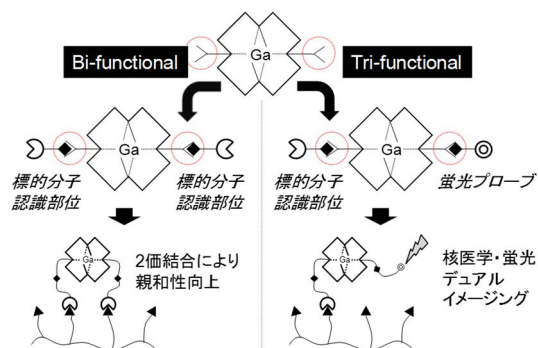


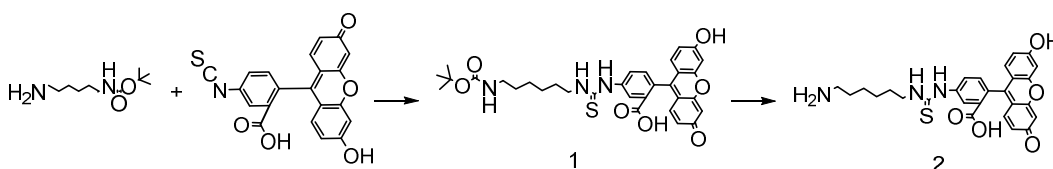
図 2 バイファンクショナルキレート及びトリファンクショナルキレートの分子設計

2. 研究の目的

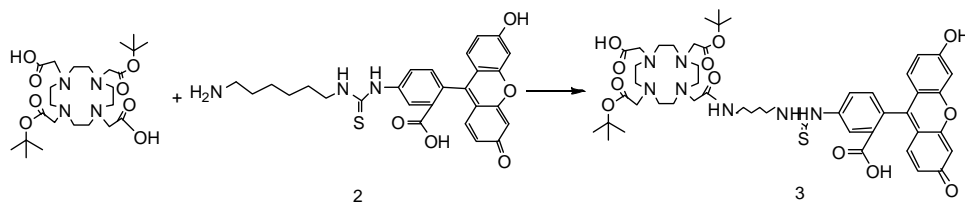
本研究では、Ga-DOTA 錯体において、錯体形成に関与していない一方の COOH 基に蛍光色素を導入すれば、核医学診断と蛍光イメージングのためのトリファンクショナルキレートとして機能するのではないかと考えた (図 2 右)。本薬剤設計により、がん診断において、術前における非侵襲的な核医学診断と術中における蛍光イメージングの 2 つを同時に達成できることから、診断から治療への効率的なワークフローを構築し、効率的な確定診断とそれに基づく効果的な治療 (手術) を可能にすると考えられる。具体的には、DOTA 骨格に蛍光色素 (FITC) を 1 分子導入した DOTA-FITC 骨格を設計・合成し、それに生体機能分子認識ユニットを導入した核医学/蛍光デュアルイメージング用プラットフォームの開発を目的とした。本研究では生体機能分子として葉酸を選択した。葉酸は水溶性ビタミンの一種で、DNA の生成、修復にも大きく関与している、細胞の成長に不可欠な栄養素である。そのため、正常細胞と比較して、多くのがん細胞に葉酸受容体が高発現していることから、この葉酸受容体を画像化することでがん部位の特定ができるのではないかと考え、生体機能分子認識ユニットとして葉酸を導入した化合物 (葉酸結合 DOTA-FITC) を設計し、合成した。

3. 研究の方法

A. 蛍光ユニットの合成：以下の経路に従って、合成した。2 段階の反応で収率 69% で化合物 2 を得た。



B. DOTA-FITC 骨格の合成：以下の経路に従って、化合物 **3** を収率 20% で合成した。



C. 蛍光特性の評価：2 (蛍光ユニット)、3 (DOTA-FITC 骨格) について蛍光特性を調べた。

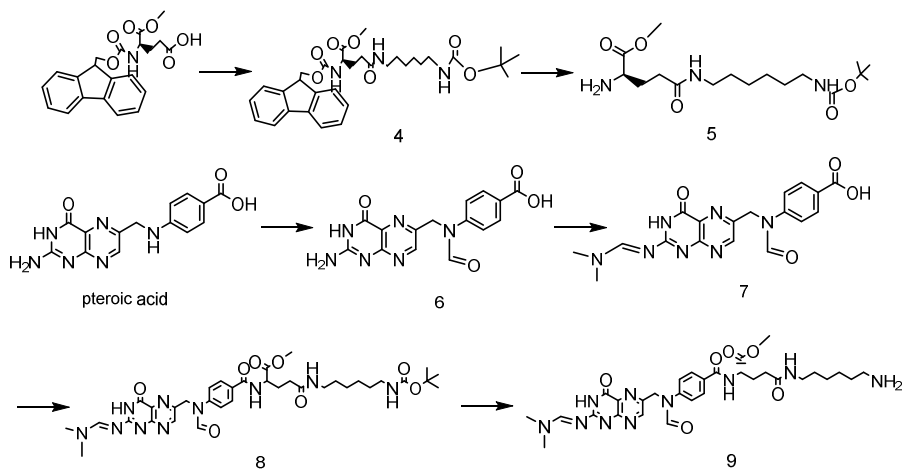
(i) 蛍光スペクトルの測定：2、3 をエタノールに溶解し、段階希釈溶液を調製した。蛍光分光光度計 (F-2500) により測定した (励起波長：503 nm、蛍光波長：460-650 nm)。

(ii) 蛍光量子収率 () の測定：2、3 および Fluorescein をエタノールに溶解し、段階希釈溶液を調製した。それぞれ分光光度計 (UV-2450) により吸収スペクトルを測定し (300-600 nm)、次に蛍光分光光度計 (F-7000) を用いて蛍光ピーク面積を測定した (励起波長：450 nm、蛍光波長：460-650 nm)。検量線 (x 軸：吸光度、y 軸：ピーク面積) を作成し、次式により蛍光量子収率を算出した。

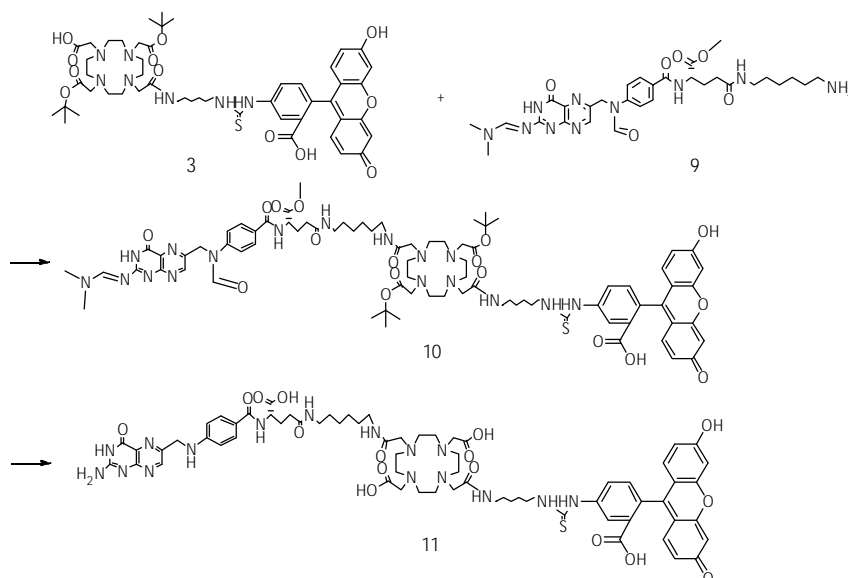
$$x = st \times (x \text{ のグラフの傾き} / st \text{ のグラフの傾き}) \quad (x: 2 \text{ or } 3, st: \text{Fluorescein}, st = 0.97)$$

D. 葉酸受容体認識部位の分子設計、合成：葉酸にはカルボキシ基が 2 つ存在し、 γ 位修飾体は α 位修飾体と比べて、葉酸受容体への高い親和性を持つことが報告されている³。葉酸の γ 位

カルボキシ基へ選択的に DOTA-FITC 骨格を導入するために、原料に Fmoc-Glu-OMe を使用し、 α 位のカルボキシ基を保護したスペーサー-5 を合成した (収率 52%)。また、既報⁴ に従って、pteroic acid の 2 位と 10 位の N を保護した 7 を合成した後 (収率 75%)、5 と 7 を反応させ⁵、 γ 位修飾体 9 を得た (収率 50%)。



E. DOTA-FITC 骨格への導入：上記の反応により得られた化合物 3 および 9 を反応させ、葉酸骨格を DOTA-FITC 骨格へと導入した後、順次脱保護することにより、目的化合物 11 を得ることに成功した (収率 8%) (MS m/z calcd. for $C_{68}H_{83}N_{16}O_{16}S$ [M-H]⁻ 1411.5899, found.1411.5891)



F. 卵巣がん腹膜播種モデルを用いた蛍光イメージング実験：ヒト卵巣がん細胞（SKOV3）を Balb/c-*nu/nu* マウスの腹腔内に移植し、腹膜播種モデルを作製した。化合物 **11**（13 nmol）を腹腔内に投与し、投与 2 時間後に、マルチスペクトル蛍光イメージングカメラを用いて撮像した。（カメラ：Nuance EX、Excitation：460-495 nm、Emission：510 nm long-pass）

4. 研究成果

蛍光特性の評価

蛍光ユニット **2** の蛍光波長は 524 nm であり、DOTA-FITC 骨格 **3**（524 nm）と違いがなかった。また、蛍光量子収率に関しても、化合物 **2** と **3** で同程度であったことから（化合物 **2**: 34.5%、化合物 **3**: 31.4%）、FITC に DOTA 骨格を導入しても蛍光特性に大きな変化が生じないことが示された。

卵巣がん腹膜播種モデルを用いた蛍光イメージング実験

ヒト卵巣がん腹膜播種モデルマウスに、葉酸結合 DOTA-FITC を投与し、その 2 時間後に蛍光イメージングにより観察した結果を図 3 に示す。腸管膜に形成された、複数の微小ながんを検出することに成功した。

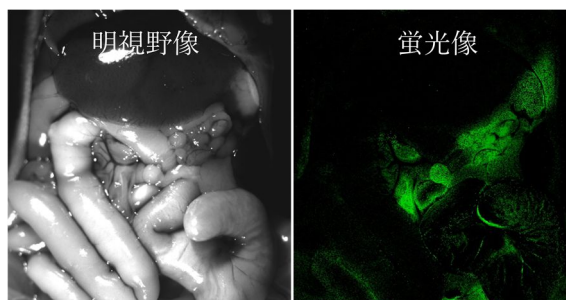


図3
トリファンクシ
ヨナルキレート
(葉酸結合
DOTA-FITC)を
用いた、卵巣がん
腹膜播種の蛍光
イメージング

考察

本研究では生体機能分子を標的とする核医学/蛍光デュアルイメージング用プラットフォームの開発を目的に、DOTA-FITC 骨格の設計・合成、葉酸受容体認識部位の合成経路の設計・合成、さらに葉酸受容体認識部位の DOTA-FITC 骨格への導入を行った。DOTA-FITC の蛍光波長および蛍光量子収率は、FITC 誘導体と比較してほぼ同等であったことから、FITC への DOTA 骨格の導入は蛍光シグナル特性に大きな影響を与えないことが示唆された。最終目的物である **11** の合成に成功したが、今後は合成収率の改善が必要である。しかしながら、ヒト卵巣がん細胞を移植したマウスにおいて、葉酸結合 DOTA-FITC は卵巣がん腹膜播種の検出を可能としたことから、本薬剤の有用性の一部を示すことが出来た。今後、放射性 Ga 標識体を合成し、細胞実験、動物実験を行うことで、術前術中診断用プローブとしての有用性を評価する必要がある。

参考文献

1. Mukai T., *et al.*, Design of Ga-DOTA-based bifunctional radiopharmaceuticals: two functional moieties can be conjugated to radiogallium-DOTA without reducing the complex stability, *Bioorganic & Medical Chemistry* **17**: 4285-4289 (2009).
2. Sano K., *et al.*, A radiogallium-DOTA-based bivalent peptidic ligand targeting a chemokine receptor, CXCR4, for tumor imaging, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* **24**: 1386-1388 (2014).
3. Wang S., *et al.*, Design and synthesis of indium-111-DTPA-folate for use as a tumor-targeted radiopharmaceutical, *Bioconjugate Chemistry* **8**: 673-679 (1997).
4. Rudolf M., *et al.*, Folate-conjugates and corresponding metal-chelate complexes for use in diagnostic imaging and radiotherapy, EP2146995 (2008).
5. Boss S.D., *et al.*, Comparative studies of three pairs of α - and γ -conjugated folic acid derivatives labeled with fluorine-18, *Bioconjugate Chemistry* **27**: 74-86 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 原史子, 佐野紘平, 三浦拓, 野沢治加, 宗兼将之, 山崎俊栄, 萩森政頼, 向高弘 |
| 2. 発表標題 葉酸受容体を標的とした核医学 / 蛍光デュアルイメージングプローブの開発 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第139年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ホームページ https://www.kobepharma-u.ac.jp/biophys/index.html |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

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 |
|-------|---------------------------------------------|------------------------------------------|----|
| 連携研究者 | 佐野 紘平 (SANO KOHEI) (00546476) | 神戸薬科大学・薬学部・講師 (34512) | |