

機関番号：34413

研究種目：基板研究 (C)

研究期間：2007~2010

課題番号：19591437

研究課題名 (和文) 癌の早期発見と抗癌剤の薬効予測可能な新規シグナル伝達分子イメージング薬剤の開発

研究課題名 (英文) Development of signal transduction imaging probe for early tumor diagnosis and prediction of drug efficacy using SPECT

研究代表者 平田 雅彦 (HIRATA MASAHIKO)

大阪薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00268301

研究成果の概要 (和文)：腫瘍の血管新生に重要な役割を果たしている VEGF 受容体チロシンキナーゼ (VEGFR-TK) の活性診断が可能な新規癌診断用薬剤の開発を目的に、5 種の新規アントラニル酸誘導体を合成した。得られた新規誘導体は、VEGFR-TK に対する高い阻害活性を示した。新規誘導体を比較した結果、 $[^{125}\text{I}]p\text{-NPAM}$ を見出した。 $[^{125}\text{I}]p\text{-NPAM}$ は、VEGFR-TK 活性を反映した明瞭な癌の画像が描出できた。

研究成果の概要 (英文)：VEGF receptor tyrosine kinase (VEGFR-TK) plays an important role in tumor growth and metastasis. For the imaging of VEGFR-TK in tumor tissue, we synthesized five anthranilic acid derivatives. Among of them, $[^{125}\text{I}]p\text{-NPAM}$ gave clear image of tumor. Thus, $[^{125}\text{I}]p\text{-NPAM}$ showed good characteristics for tumor imaging as a VEGFR-TK ligand.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：放射性医薬品化学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：VEGF、チロシンキナーゼ、SPECT、放射性ヨウ素、アントラニル酸誘導体、血管新生、癌診断、分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

核医学診断法は、テーラーメイド医療を実現可能とする、方法の一つである。しかしながら、核医学診断に用いるプローブの開発は不十分であり、その開発が期待されている。

2. 研究の目的

シグナル伝達分子を標的とする新規プローブの開発を目的に VEGFR-TK 阻害剤であるアント

ラニル酸誘導体に着目し、新規 SPECT 用放射性分子イメージング薬剤の開発を計画した。

3. 研究の方法

新規アントラニル酸誘導体の合成

新規アントラニル酸誘導体の合成は以下の方法で行った。まず、アントラニル酸メチ

ル(1)とイソニコチンアルデヒドをメタノールに溶解後、少量の酢酸を加え室温で18時間反応させた。冷後、シアノトリヒドロホウ酸ナトリウムを加え、室温で2時間攪拌することで2を得た(収率53.3%)。さらに、2をアルカリ加水分解することで3を得た(収率98.1%)。

続いて、 σ ヨードフェノールをクロロホルムに溶解後、塩基として4-ジメチルアミノピリジンを加え、さらにDCCと3を加え、24時間室温で攪拌することにより、目的化合物4aを得た(収率66.0%)。同様に *m*、*p*ヨードフェノールあるいは *m*、*p*ヨードアニリンを用いて、同様に合成し、4b-eを得た。以下4a、4b、4c、4d、4eをそれぞれ σ -NPAE、*m*-NPAE、*p*-NPAE、*m*-NPAM、*p*-NPAMと表記する。

新規アントラニル酸誘導体の VEGFR-TK 阻害活性

新規アントラニル酸誘導体の VEGFR-TK 活性を HUVECs(ヒト臍帯静脈内皮細胞)を用いて調べた。

放射性ヨウ素標識化合物の合成

ヨウ素標識は、有機スズ-放射性ヨウ素交換反応により行った。また、HPLCを用い、 ^{125}I 標識体のリテンションタイムを調べ、それぞれ対応する非標識体のリテンションタイムと一致することを確認し、目的の標識体であることを確認した。

^{125}I 標識体の細胞による取り込みと特異性

新規 ^{125}I 標識新規化合物の細胞による取り込みについて測定した。また、各種シグナル伝達酵素選択的阻害剤を前処理し、各シグナル分子の特異性について検討した。

^{125}I 新規アントラニル酸誘導体の生体内分布

ddY 雄性マウスに ^{125}I 標識誘導体を尾静脈より投与し、経時的に屠殺後、採血し各臓器を取出し、その重量及び放射能を測定した。

^{125}I 新規アントラニル酸誘導体のインビトロでの安定性

新規誘導体の安定性を調べるため、新規標識誘導体と BSA(final0.1%)をそれぞれ加え、1、4、24 時間インキュベートした。インキュベート終了後、酢酸エチルで抽出し、TLC法で測定した。各標識誘導体の Rf 値を基に、未変化体の放射能割合を算出した。

^{125}I 新規アントラニル酸誘導体の癌集積量

インビボでの癌集積性を調べるため、PC-3 担癌モデルマウスを作成し、 ^{125}I 標識アントラニル酸誘導体をそれぞれマウスに尾静脈より投与後、0.5、2 時間で屠殺し、癌組織と血液の重量及び放射能を測定した。

インビトロ、インビボにおける ^{125}I p-NPAM の VEGFR-TK に対する選択性

VEGFR-TK は細胞膜内に存在するため、 ^{125}I p-NPAM は細胞内に取込まれた後、VEGFR-TK に対して選択的に結合する必要がある。そこで、PC-3 癌細胞を用いて ^{125}I p-NPAM の VEGFR-TK に対する結合選択性について調べた。VEGFR-TK 選択的阻害剤である SU5614、VEGFR-TK inhibitor II を前処理した際の ^{125}I p-NPAM の PC-3 癌細胞内取込み量の変化を観察した。また PC-3 担癌モデルマウスを用い、同様に調べた。

^{125}I p-NPAM の SPECT/CT 撮像

PC-3 担癌モデルマウスに、SU5614(1mg/kg)を尾静脈より投与した。投与5分後、さらに ^{125}I p-NPAM(11100kBq/100 μ L)を尾静脈より投与し、24時間後に SPECT 画像を撮像した。また ^{125}I p-NPAM のみを投与したものをコントロールとした。

4. 研究成果

新規アントラニル酸誘導体の VEGFR-TK 阻害活性

新規に合成した誘導体の中で、*m*-NPAE、*p*-NPAE、*m*-NPAM、*p*-NPAM は VEGF により刺激された HUVECs の増殖に対し高い阻害活性を有し、代表的な VEGFR-TK 阻害剤である SU5614 とほぼ同等の活性が見られた。 σ -NPAE では、大幅な活性の低下が見られた。

Table1. VEGF による増殖刺激に対する各種新規誘導体の阻害活性

No.	構造式	IC ₅₀ (nM)
4a	σ -NPAE	217.9□2.17
4b	<i>m</i> -NPAE	9.0□1.20
4c	<i>p</i> -NPAE	3.3□0.29
4d	<i>m</i> -NPAM	6.6□0.14
4e	<i>p</i> -NPAM	9.7□2.30
	SU5614	8.4□0.63

^{125}I 標識化合物の合成

各化合物の ^{125}I 標識体は、塩酸条件下、過酸化水素を酸化剤として用い、前駆体 5a-e と ^{125}I ヨウ化ナトリウムを室温で15分間反応させ、HPLC で分離精製することにより得た。反応液を HPLC で分析した結果、 ^{125}I 標識体のリテンションタイムは、それぞれに対応する非標識体のリテンションタイムと一致したことから、目的標識体であることを確認した。なお、全ての標識体の放射化学的純度は95%以上、無担体の標識体が得られた。

[¹²⁵I]新規アントラニル酸誘導体の生体内分布

新規誘導体の体内動態は、肝臓、腎臓、肺などの主要組織において、ほぼ同様の体内動態を示し、いずれも投与後早期に高い集積が観察されたものの、その後、緩やかに排泄され、投与 24 時間後では、いずれも低い集積であった。一方、血中放射能には、差異が認められ、[¹²⁵I]*o*-NPAAE、[¹²⁵I]*m*-NPAM、[¹²⁵I]*p*-NPAM においては、比較的低い値であったが、[¹²⁵I]*m*-NPAAE と [¹²⁵I]*p*-NPAAE では、高い血中放射能が観察された。また、腸では緩やかな蓄積傾向がみられ、胃においては投与直後から高い集積が確認され、脱ヨウ素化が認められた。

[¹²⁵I]新規アントラニル酸誘導体のインビトロでの安定性

新規誘導体のうち [¹²⁵I]*o*-NPAAE、[¹²⁵I]*m*-NPAM、[¹²⁵I]*p*-NPAM においては、24 時間後においてもほとんどが未変化体として残り、インビトロにおいて安定であることが確認された。一方、[¹²⁵I]*m*-NPAAE と [¹²⁵I]*p*-NPAAE においては、インキュベート直後から分解が確認され、24 時間後ではそれぞれ 32.2%、54.1%となり、インビトロでは不安定であることが確認された。この二つの化合物は生体内でも不安定であると推察され、放射性薬剤として不適であると考えられた。

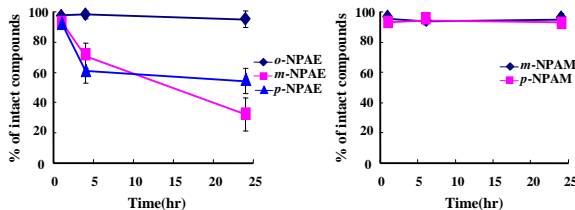


Figure 2. 各種新規誘導体のインビトロにおける安定性

[¹²⁵I]新規アントラニル酸誘導体の癌集積量

新規誘導体のうち、[¹²⁵I]*m*-NPAAE が、最も高い癌集積性を示した。また、癌対血液比では、[¹²⁵I]*o*-NPAAE が最も良好な値を示した。しかし、[¹²⁵I]*m*-NPAAE においては、生体内の安定性、[¹²⁵I]*o*-NPAAE では、癌への集積量が低く、共に癌診断薬剤としては、不適と考えられた。一方、[¹²⁵I]*m*-NPAM、[¹²⁵I]*p*-NPAM は、比較的高い癌集積性を示すと共に、投与 30 分後で良好な癌対血液比を示した。また、両者のうち、[¹²⁵I]*p*-NPAM の方が、癌集積性、癌対血液比共に高い値を示した。これらの結果より、安定性、体内動態、癌集積性の観点から新規誘導体の癌診断用分子イメージング薬剤の可能性について検討した結果、[¹²⁵I]*p*-NPAM に癌画像診断薬としての可能性を見出した。

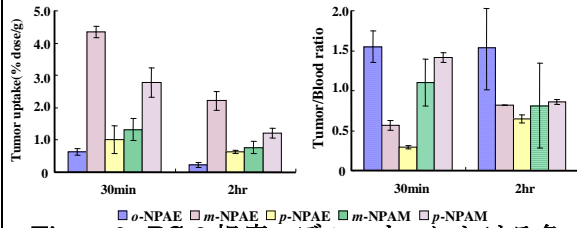


Figure 3. PC-3 担癌モデルマウスにおける各種化合物の癌集積量(右)と癌対血液比(左)

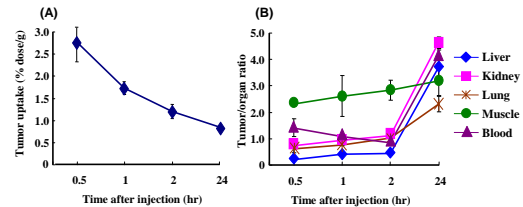


Figure 4. (A) PC-3 担癌モデルマウスにおける癌集積量の変化 (B) PC-3 担癌モデルマウスにおける癌対組織比

インビトロ、インビボにおける [¹²⁵I]*p*-NPAM の VEGFR-TK に対する選択性

インビトロにおいて PC-3 癌細胞に SU5614 と VEGFR-TK inhibitor II を前処置した場合、PC-3 癌細胞への [¹²⁵I]*p*-NPAM の取り込み量は control に対して有意に低下した。また、PC-3 担癌モデルマウスを用いた検討においても同様に、[¹²⁵I]*p*-NPAM は SU5614 と VEGFR-TK inhibitor II の前投与により有意な癌集積量の低下を示した。

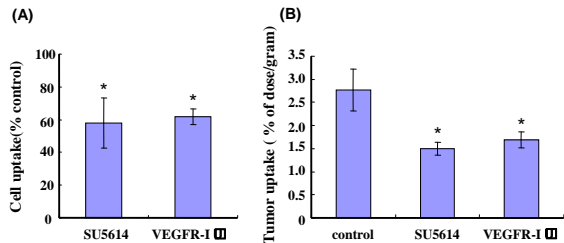


Figure 5. (A) PC-3 癌細胞における [¹²⁵I]*p*-NPAM の細胞内取り込み量の選択性 (B) PC-3 担癌モデルマウスにおける VEGFR-TK 阻害剤前投与による [¹²⁵I]*p*-NPAM の癌集積量の変化 *p<0.01 vs. control

[¹²⁵I]*p*-NPAM の SPECT/CT 撮像

[¹²⁵I]*p*-NPAM の SPECT 用癌画像診断薬としての可能性を評価するため、PC-3 担癌モデルマウスを用いて、投与 24 時間後の [¹²⁵I]*p*-NPAM の SPECT/CT 画像を撮影した。

[¹²⁵I]*p*-NPAM により、癌を明瞭に描出する SPECT/CT 画像が得られた。また、VEGFR-TK 阻害剤である SU5614 の前投与によって、[¹²⁵I]*p*-NPAM の癌への集積はほとんど認められなかった。この結果、[¹²⁵I]*p*-NPAM を用いることで、VEGFR-TK

を反映した明瞭な SPECT/CT 画像を得られることが確認された。

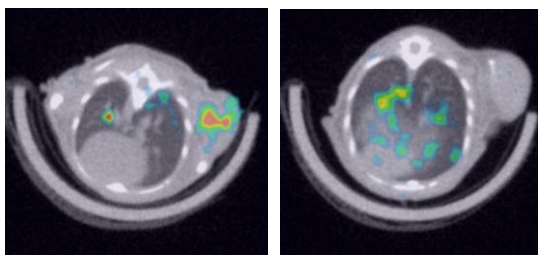


Figure 6. $[^{125}\text{I}]p\text{-NPAM}$ の SPECT/CT 画像

以上、5つの新規アントラニル酸誘導体のうち $p\text{-NPAM}$ に放射性薬剤としての可能性を見出した。放射性ヨウ素標識 $p\text{-NPAM}$ は、VEGFR-TK を反映する明瞭な癌 SPECT 画像を与える放射性分子イメージング薬剤となる可能性が示唆された。

まとめ

- ① VEGFR-TK 阻害作用を有する AAL-993 を基に、新規アントラニル酸誘導体をドラッグデザインし、合成した。得られた新規誘導体は、VEGFR-TK に対する高い阻害作用を有した。
- ② 安定性、癌集積量、癌対血液比の観点から新規誘導体を比較して $[^{125}\text{I}]p\text{-NPAM}$ の癌画像診断薬としての可能性を見出した。さらに、インビトロ、インビボにおける VEGFR-TK 阻害剤前処置による検討から、 $[^{125}\text{I}]p\text{-NPAM}$ は VEGFR-TK への結合を介して癌に集積していることが示唆された。
- ③ SPECT/CT 画像撮像の結果、 $[^{125}\text{I}]p\text{-NPAM}$ を用いて、VEGFR-TK 活性を反映する癌画像を描出することが出来た。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 平田 雅彦、浅野 旭彦、今西 美紗、大桃 善朗
放射性ヨウ素標識 VMO を用いた癌の血管新生能把握による癌特性診断の可能性
日本薬学会 第 128 年会 (横浜) 2008 年 3 月 28 日
ハイライトに採択「がんの兵量攻めをみる」

- ② 平田 雅彦、大桃善朗
VEGF 受容体を指標とする新規癌診断用アントラニル酸誘導体の合成と基礎的検討
日本薬学会 130 年会 2010 年 3 月 29 日 岡山

- ③ 平田雅彦、北村直之、奥野あゆみ、吉本光喜、山口博司、間賀田泰寛、大桃善朗
吉本光喜、VEGF チロシンキナーゼを指標とする新規 SPECT 用アントラニル酸誘導体の合成と基礎的検討
第 5 回 日本分子イメージング学会 (滋賀) 2010 年 5 月 25 日

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

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。助教

研究者番号: 00268301

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: