

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591445

研究課題名（和文） ストレス応答を標的とした腫瘍画像診断薬の開発

研究課題名（英文） Development of tumor imaging agent which assumed stress response a target.

研究代表者

氏名（ローマ字）：豊原 潤（TOYOHARA JUN）

所属機関・部局・職：千葉大学・社会精神保健教育研究センター・講師

研究者番号：50425659

研究成果の概要：チミジンホスホリラーゼの酵素活性を測定可能な放射性医薬品の開発を目的として、5'-デオキシ-5'-ヨードチミジン (1) および 5'-デオキシ-5'-ヨードウリジン (2) をデザインし、その合成および評価を実施した。化合物 (1)、(2) はともにチミジンホスホリラーゼによって、代謝を受けた。放射性ヨウ素で標識した (1) は、標的組織における放射能の滞留傾向と、他の臓器での放射能消失を認めた。一方、生体内での脱ヨウ素反応も認められた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：核医学（PETを含む）、放射性医薬品・造影剤

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍は、発がん物質や低酸素、低グルコースなどのストレスに対して生存能力を獲得した細胞と捉えることができる。したがって、これらのストレスに応答する分子を標的とした放射性画像診断薬は、腫瘍の病態機能を解明する上で重要であると考えられる。

(2) チミジンホスホリラーゼ（TP）はミトコンドリア機能の正常化や細胞の病的なストレスからの回復に関連した、ヌクレオシド代

謝を掌る酵素である。TP は血管新生活性を有する血小板由来内皮細胞増殖因子と同一の分子であり、その血管新生作用は TP によるチミジンの代謝産物である 2'-デオキシ-D-リボースによることが明らかとなっている。

(3) TP は広い範囲の腫瘍組織で選択的に高発現していることが知られている。また、TP はアポトーシス抑制作用を示すことが知られている。特に、低酸素などの生理的なストレスや抗がん剤などの化学的なストレスに

対して誘導され、ヌクレオシド代謝を亢進させることによって細胞の生存に寄与していると考えられている。これが TP 過剰発現の患者予後を悪くしている理由であるとも考えられている。加えて TP 発現の誘導は、化学療法や放射線治療などによっても亢進することから、TP はこれらの治療による細胞ダメージの回復に寄与していると考えられている。したがって、TP 阻害効果を持つ薬剤は腫瘍の抗がん剤や放射線からの細胞ダメージの回復を抑制させる効果があると期待され、選択的な TP 阻害剤の研究が盛んに行われている。また、ドキソフルリジンなどのフルオロウラシル系抗がん剤の代謝活性化に TP が深く関与することから、感受性規定因子としても注目されている。

(4) このような背景から、TP の酵素活性を非侵襲的に画像化する放射性薬剤は、悪性腫瘍の病態機能解明だけでなく、治療マネジメントにも有用な情報を与えると考えられる。

(5) TP は、チミジンをチミンと 2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸に分解する反応およびその逆反応を触媒する。TP を画像化するアプローチとしては、酵素活性を測定する方法と酵素の発現量を測定する方法が考えられる。後者については、近年、TP の阻害剤である 5-クロロ-6-(2-イミノピロリジン-1-イル)メチル-2,4(1H, 3H)-ピリミジンジオンを母体として、画像化に適した薬物動態を示す化合物をデザインする方向性が考えられている。酵素活性を測定する方法としては、逆反応の酵素活性を測定する方法が考えられている。チミンあるいは 5-ハロゲン化ウラシルを用いて、TP による同化反応を測定する可能性が検討されている。一方で、異化作用による方法では、分解された塩基が速やかに細胞から排泄されるため、有効なアプローチではないとされている。しかしながら、生体内では、同化反応に必要な 2-デオキシ-D-リボース-1-リン酸の存在量は少なく TP 酵素反応の平衡は異化反応へ大きく傾いていることから、同化反応による方法では検出に十分耐えうる放射エネルギーを組織に集積させ得るか疑問が残る。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、これらの状況を踏まえ、新たな発想の下で TP の酵素活性を非侵襲的に画像化する放射性薬剤の設計を行い、その可能性を基礎的に検証することを目的とした。すなわち、新たに代謝補足変換型の測定原理を考案し、そのプラットフォーム化合物を用いてコンセプトの証明実験を行い、さらにリード化合物の最適化を行うことによって、実用的に使用可能な放射性薬剤の創製を

目指した。

(2) 本研究では、代謝補足変換型の測定原理を達成する放射性薬剤を得る目的で、新たに放射性標識を塩基ではなく糖部分へ導入することを計画した。糖部分はリン酸化を受けて細胞内に滞留することが予想されることから、これは有効なアプローチとして考えることが出来る。これに加えて天然の基質であるチミジンは異化作用と同時に チミジンキナーゼ (TK) によるリン酸化を受け DNA 合成経路へ進むことから、こちらの反応を抑える薬剤デザインも必要である。以上の点を考慮し、TP 活性を測定可能な薬剤に必要な性質として、以下の要件に合致すると思われるオリジナル化合物をデザインした。

TP によってグリコシド結合が代謝分解される。

TK によるリン酸化を受けない。

代謝産物が組織に滞留する。

代謝分解されない化合物は速やかに組織から洗い出される。

適度な代謝分解速度を有する。すなわち、分解速度が速すぎたはいけない (血流依存性) し、また遅すぎ (集積量の低下) てもいけない。

(3) 以上の条件と、標識合成の容易さを考慮し、チミジン 5 位への放射性ヨウ素の導入による TK リン酸化の排除と TP による反応の結果生じた 1 位リン酸化体の組織滞留を期待して、5'-デオキシ-5'-ヨードチミジン(1)をデザインした。さらに、インピボにおいて TP 活性を計測するためには、TP による代謝分解速度 (k3) と化合物の組織移行性 (K1, k2) とのバランスが重要であると考えられるため、TP 活性に影響を与えると思われる 2 位への水酸基を導入した、5'-デオキシ-5'-ヨードウリジン(2)をデザインした。

3. 研究の方法

(1) 合成

5'-デオキシ-5'-ヨードチミジン(1)

チミジン(3) (0.98 g; 4.0 mmol), トリフェニルホスフィン (2.22 g; 8.4 mmol), ヨウ素 (1.01 g; 4.0 mmol) を脱水ピリジン(50 mL) 中 30°C で 4 時間攪拌した。続いて、5.0 mL のメタノールを加えることにより反応を停止させ、濃縮後、シリカゲルカラム (ジクロロメタン : メタノール = 19 : 1) にて目的物 (1) (図 1) を精製した。

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), 11.3 (1H, s), 7.52 (1H, s), 6.22 (1H, t, J = 7.1 Hz), 5.48 (1H, d, J = 4.2 Hz), 4.17 (1H, s), 3.80 (1H, d, J = 2.8 Hz), 3.52 (1H, q, J = 4.2 Hz), 3.39 (1H, q, J = 4.0 Hz), 2.29 (1H, m), 2.08 (1H, m), 1.80 (3H, s); MS (FAB) m/z [M+H]

calcd for C₁₀H₁₄IN₂O₄ 353, found 353.

5 -デオキシ-5 -ヨードウリジン (2)

5-メチルウリジン (4) (1.05 g; 4.1 mmol), トリフェニルホスフィン (2.25 g; 8.5 mmol), ヨウ素 (1.02 g; 4.0 mmol) を脱水ピリジン (50 mL) 中 30 °C で 4 時間攪拌した。続いて, 5.0 mL のメタノールを加えることにより反応を停止させ, 濃縮後, シリカゲルカラム(ジクロロメタン : メタノール = 19 : 1) にて目的物 (2) (図 1) を精製した。

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), 11.4 (1H, s), 7.51 (1H, s), 5.81 (1H, d, J = 6.1 Hz), 5.40 (2H, dd, J = 5.2, 26.3 Hz), 4.20 (1H, q, J = 5.5 Hz), 3.81-3.97 (2H, m), 3.57 (1H, dd, J = 6.0, 10.4 Hz), 3.40 (1H, dd, J = 6.6, 10.5 Hz), 1.80 (3H, s); MS (FAB) m/z [M+H]⁺ calcd for C₁₀H₁₄IN₂O₅ 369, found 369.

(2) 化合物 (1) の標識合成

[¹²⁵I]NaI (37 MBq) 溶液を乾燥した蓋つきバイアルに取り, 窒素ガスで濃縮した。濃縮後のバイアルに化合物 (1) (1.0 mg) の *N,N*-ジメチルフォルムアミド (DMF) 溶液 (0.2 mL) を加え, 70 °C で 3.5 時間加熱した。反応終了後, 1.3 mL の水を加えて希釈の後, HPLC にて目的物 (5) (図 1) を精製した。

HPLC の分離条件: カラム; YMC-Pack Pro C18 RS, 5 μm, 250 × 10 (i.d.) mm, 溶離液; アセトニトリル-50 mM 酢酸-50 mM 酢酸アンモニウム (25 : 37.5 : 37.5, v/v); 流速: 4.5 mL/min。

目的物 (5) (保持時間 = 6.3 min) を分取し, 濃縮後, 残渣を 2 mL of 生理食塩液に溶解して滅菌フィルタ-にて濾過することにより調剤化した。放射化学的純度は, HPLC にて検定した。

HPLC の分離条件: カラム; YMC-Pack Pro C18 RS, 5 μm, 250 × 4.6 (i.d.) mm, 溶離液; アセトニトリル-水-トリフルオロ酢酸 (10 : 90 : 0.1, v/v), 流速; 1.0 mL/min, 保持時間: 12.5 分。

比放射能の測定は, HPLC 測定時における化合物 (5) の放射能濃度及び 270 nm における紫外吸収値を既知濃度の化合物 (1) の 270 nm における紫外吸収値と比較することにより算出した。

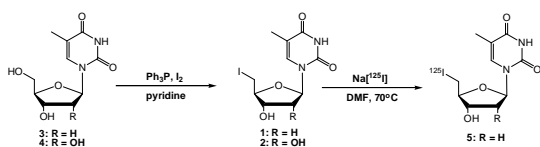


図 1. 合成スキーム: Ph₃P; トリフェニルホスフィン, DMF: *N,N*-ジメチルフォルムアミド

(3) 酵素アッセイ

目的の化合物が, TP によってグリコシド

結合が代謝分解されるか否かを検討する目的で, 組換え大腸菌由来の TP を用いて酵素アッセイを実施した。

反応混合液(終容量 0.2 mL) は, 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4), 化合物 (1) もしくは (2) (20 nmol), および 0.01-1 単位のチミジンホスホリラーゼから構成された。反応は, 25 °C で行い, 経時的 (5, 15, 30 および 60 分) に 2N 過塩素酸 (終濃度 4%) を加えることにより反応を停止させた。水酸化カリウムで中和の後, 生じた沈殿物を遠心によって取り除き, 上清をフィルタ-濾過後, HPLC によって分析した。

HPLC の分離条件: カラム; 150 × 4.6 (i.d.) mm, Mightysil RP-18 GP Aqua, 溶離液; メタノール-水-トリフルオロ酢酸 (10 : 90 : 0.1, v/v), 流速; 0.8 mL/min, 検出; 270 nm。

保持時間: チミン, 4.8 分; チミジン (4), 8.4 分; 化合物 (1), 12.5 分; 化合物 (2), 10.9 min。

(4) 体内分布

37 KBq の (5) (1.9 nmol) を含む生理食塩液 0.1 mL を 8 週齢の ddY 雄性マウスに尾静脈内に急速投与した。投与, 10, 30, 60, および 180 後にマウスを断頭により犠牲死させ, 採血および主要な臓器を解剖法により摘出し, 重量を測定した。各時間点で 3~4 匹の動物を使用した。摘出した臓器は, 甲状腺, 血液, 肺, 心臓, 脾臓, すい臓, 十二指腸, 腎臓, 肝臓及び筋肉であった。臓器および血液の放射能はオートウエルタイプのガンマカウンターにて計測した。

組織への放射能集積は, percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g) および percentage of the injected dose per organ (%ID) にて評価した。

4. 研究成果

(1) 合成

ヌクレオシド 5 位第一級アルコールのヨウ素化は, 三ヨウ素化リンを用いることで, ヨウ化物イオンによって容易に置換される脱離基 (ヨウ化亜リン酸基) をもった中間体へとアルコールを変換することによって合成可能であった。化合物 (1) および (2) の収率は, それぞれ 33% と 34% であった。HPLC 分析の結果, いずれの化合物も >99% の純度で得ることが可能であった。

(2) 標識合成

化合物 (5) の合成は, 坦体無添加の Na[¹²⁵I]I を用いた, 化合物 (1) のヨウ素同位体交換反応によって得た。化合物 (5) の収率は 21%, 放射化学的純度は >99%, 比放射能は 20 MBq/μmol であった。

(3) 酵素アッセイ

化合物 (1), (2) は, ともに TP によって, それぞれ 23.2 ± 0.5 pmol/units/min, 20.7 ± 1.4 pmol/units/min の速さで代謝を受け

た。しかしながら、その速度はチミジンの 1/1000 以下であった。

(4) 体内分布

表 1. に体内分布の結果を示す。標的組織である肝臓および小腸への放射能滞留は認めなかった。他の臓器においても甲状腺以外では、血液中の放射能の消失と一致した組織からの放射能消失が認められた。僅かではあるが小腸からの放射能消失は遅かった。一方、甲状腺への放射能集積は経時的に増大し、生体内での脱ヨウ素反応が示唆された。

表 1. 化合物 (1) の体内分布

	% Injection dose/g tissue*			
	10 min	30 min	60 min	180 min
Blood	2.37 ± 0.51	1.30 ± 0.39	0.72 ± 0.09	0.26 ± 0.07
Heart	1.90 ± 0.35	0.78 ± 0.21	0.40 ± 0.07	0.25 ± 0.10
Lung	2.18 ± 0.51	1.18 ± 0.28	0.65 ± 0.13	0.46 ± 0.20
Liver	4.89 ± 1.39	1.61 ± 0.32	0.66 ± 0.02	0.28 ± 0.17
Pancreas	1.65 ± 0.50	0.77 ± 0.21	0.44 ± 0.08	0.28 ± 0.15
Spleen	1.70 ± 0.41	0.66 ± 0.08	0.42 ± 0.05	0.31 ± 0.12
Kidney	6.16 ± 0.89	2.19 ± 0.46	0.92 ± 0.06	0.30 ± 0.08
Small intestine	4.18 ± 2.54	2.92 ± 1.23	1.68 ± 0.10	0.69 ± 0.55
Muscle	1.46 ± 0.25	0.61 ± 0.13	0.33 ± 0.12	0.27 ± 0.25
Thyroid [†]	0.46 ± 0.56	0.84 ± 0.18	1.20 ± 0.45	2.52 ± 0.96

*Mean ± S.D. (n = 4).

[†]% Injected dose/organ

(5) 考察

本研究では TP の酵素活性を SPECT で測定可能な放射性医薬品を開発する目的で、ヨウ素 123 で標識可能な化合物をデザインし、その合成および基礎的な評価を実施した。薬剤デザインは代謝補足変換型の手法を用い、TP によって生成するリン酸化体の組織内での滞留を目指した。しかしながら、今回デザインした 5 -デオキシ-5 -ヨードチミジン (1) および 5 -デオキシ-5 -ヨードウリジン (2) の TP に対する反応性は低く、生体内でのヨウ素 125 標識も不安定であることから、体内分布では標的臓器への明らかな代謝トラッピングにより放射能集積を認めなかった。しかしながら、TP が豊富に存在する小腸への放射能集積の滞留傾向を認められたことは、TP の酵素活性を非侵襲的に画像化するアプローチとして、代謝補足変換型の測定原理に可能性があることを意味しており、目的を達成するためには、さらなる化合物デザインの必要性が示唆された。

関連する 5 -デオキシヌクレオシドの生物活性に関する報告は少ないが、以下の報告は我々の薬剤デザインのアプローチを支持するものではあっても否定する材料にはならない。

5 -デオキシ-5 -フルオロチミジンは、ピリミジンホスホリラーゼによって分解され、その割合はチミジンの 1/6 である。

5 -アジド-5 -デオキシチミジンのヒト赤血球における膜輸送は、ヌクレオシド・トランスポーターおよび単純拡散を介しており、5 -デオキシ化によって Km 値はチミ

ジンの 1/3 程度まで減弱するものの、リズナブルな値である。また、5 -Deoxy 化により octanol/buffer が大きく向上し、5 -デオキシチミジンと 5 -アジド-5 -デオキシチミジンの Log P 値はそれぞれ 0.7 と 1.0 である。

一方、最近、我々と同じ代謝補足変換型の手法を用いて TP によって生成するリン酸化体の組織内での滞留を目指す化合物として 5 -デオキシ deoxy-5 -[¹⁸F]フルオロチミジン ([¹⁸F]DFT) が合成され、細胞実験結果が報告されている。 [¹⁸F]DFT では、細胞における TP 酵素活性と [¹⁸F]DFT の細胞への集積の間には乖離が有り、その原因は、生成したリン酸化体 5-[¹⁸F]フルオロ-2,5-ジデオキシ-D-リボース-1-リン酸 ([¹⁸F]FddR-1P) の細胞内での不安定さに由来すると報告されている。すなわち、生成したリン酸化体が次のステップの代謝に進み、デオキシヌクレオシドへと代謝されたのちに細胞から洗い出されると考えられる。フッ素より原子半径の大きいヨウ素で置換されたリン酸化体 5-[¹²⁵I]ヨード-2,5-ジデオキシ-D-リボース-1-リン酸が、 [¹⁸F]FddR-1P と同様に次のステップの代謝に進み、デオキシヌクレオシドへ変換されるか否かは未知である。しかしながら、仮に、生成したリン酸化体が細胞内で安定であるならば、TP による分解速度を上げるアプローチをすることで、目的を達成できる。ヌクレオシド 5 位への電子吸引性基の導入はグリコシド結合の TP による代謝速度を上げることが知られているため、塩基の 5 位を I, Br, Cl, F などに置換した誘導体での検討には意味があると思われる。

以上、今回の我々の知見とこれまでの報告を合わせて考察すると、TP の酵素活性をシングルフォトン断層撮像 (SPECT) で測定可能な放射性薬剤を開発する目的で、代謝補足変換型の手法を用い、TP によって生成するリン酸化体の組織内での滞留を目指すためには、代謝速度の向上と生成したリン酸化体の細胞内での安定性を克服する必要が有ると結論される。

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)

[学会発表](計 1 件)

豊原 潤, ストレス応答を標的とした腫瘍画像診断薬の開発, 第 48 回日本核医学会総会, 2008 年 10 月 26 日, 幕張。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

豊原 潤 (TOYOHARA JUN)

千葉大学・社会精神保健教育研究センター・講師

研究者番号 : 5 0 4 2 5 6 5 9

(2)研究分担者

(3)連携研究者