

平成21年 5月15日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790853  
 研究課題名（和文）マトリックスメタロプロテアーゼを標的とした低酸素病態の分子イメージング  
 研究課題名（英文）Molecular imaging of Matrix Metalloproteinase related to pathology of hypoxia  
 研究代表者  
 古本 祥三（FURUMOTO SHOZO）  
 東北大学・加齢医学研究所・助教  
 研究者番号：00375198

## 研究成果の概要：

低酸素病態で悪性化に深く関与する MMP-2 について、生体画像化を目的とした  $^{18}\text{F}$ -標識 MMP-2 イメージングプローブ (SAV49) の設計・合成とその生物学的評価を行った。 $^{18}\text{F}$ -SAV49 は高収率、高純度で標識合成でき、生体内で脱フッ素代謝を受けず安定であることが確認された。また、SAV49 はマウスで血球画分に滞留する性質が明らかになり、生物評価実験ではウサギなどのモデル動物を用いる必要性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：PET、低酸素、MMP、腫瘍、心虚血

## 1. 研究開始当初の背景

低酸素は、難治性癌の悪性化や心臓・脳の虚血性疾患の病態進行に深く関与する重要な因子である。近年、低酸素に起因する病態の分子生物学的研究が急速に進展し、低酸素による転写因子 (Hypoxia-Inducible Factor-1; HIF-1 など) の活性化を介した様々な生体機能分子 (酵素、受容体、生体因子など) の発現や活性の上昇が病態の進行に深く関わっていることが明らかされてきた。特に、細胞外マトリックス分解酵素のマトリックスメタロプロテアーゼ-2 (MMP-2) は、低酸素

病態の悪性化と密接に関連する分子として非常に高い注目を集めている。

MMP-2 は、通常、生体組織が正常にある状態ではほとんど産生されないが、組織の破壊や再構築が進行する病的状態で過剰に発現し、病態の進行に直接関与する。MMP-2 の過剰発現を誘発する重要な要因の一つが組織の低酸素化で、例えば、癌細胞・組織への低酸素刺激は MMP-2 の過剰発現・活性化を誘導し、浸潤・転移性の亢進や血管新生を誘発することで悪性化に寄与する (Clin Exper Metastasis 20, 237, 2003)。また、心臓組織に低酸素負荷をもたらす虚血性心筋症に

においても、主要な病態である心筋リモデリングのプロセスで MMP-2 の過剰発現・活性化が誘導され、心筋線維化機序に大きく関与している (Cardiovasc Res 69, 604, 2006)。このように、MMP-2 は低酸素応答の病態と密接に関連することから疾患の診断・治療戦略において重要な標的と見なされている (CurrTopMedChem 6, 289, 2006)。

## 2. 研究の目的

前述のように、低酸素病態の悪性化に MMP-2 が深く関与していることから、そのような低酸素状態が誘発されている病変における MMP-2 の発現状態・活性化状態をイメージングにより非侵襲的に評価するための技術基盤を確立できれば、その病態進行度や予後の予測的評価手段として利用できると期待され、新しい診断・治療法の開発研究の発展に大きく資すると考えられる。

これまでも低酸素が関与する病態の核医学的分子イメージング研究は数多く行われてきたが、いずれも低酸素状態におかれた生存細胞内に代謝補足される薬剤 (例: [<sup>18</sup>F]FMISO) を使用しており、低酸素細胞の存在割合を指標とした病態の評価しか行えなかった。しかし、本研究では低酸素病態の進行に直接関与する生体機能分子 (MMP-2) をイメージング対象として、関与分子の発現量を指標とした病態の評価を目指している。このように、従来の研究とは異なる切り口からの低酸素病態に対するアプローチが本研究の大きな特色である。

本研究では、低酸素が関与する疾患で過剰発現・活性化される MMP-2 の分子イメージングを目指した PET 用標識薬剤の開発と疾患モデル動物を使用した MMP-2 イメージングの有効性評価を目的とする。

## 3. 研究の方法

MMP-2 イメージングの実現するために必要となるプローブについては、MMP-2 阻害剤を基盤とした <sup>18</sup>F 標識化合物を合成することとした。これまでの研究から、アルキル鎖末端にフッ素 18 を導入したプローブは、生体内で脱フッ素代謝を受けてしまうことが明らかになっていた。そこで本研究では脱フッ素代謝に耐性があることで知られている 2-フロロピリジン骨格を有する新規 MMP-2 (図 1) を設計し、合成することとした。

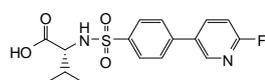


図 1 新規 MMP-2 阻害剤 SAV49

新規 MMP-2 阻害剤 SAV49 は、図 2 に示した合成ルートで全合成を行った。

まず、バリリン *t*-ブチルエステル塩酸塩を出発原料とした。まず、*N*-メチルモルホリンを塩基としてバリリン *t*-ブチルエステルを 2-プロモチオフェンスルホニルクロリドと反応させてアミド結合を構築し、ついで Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を触媒としてフルオロピリジンボロン酸と反応させ基本骨格を合成した。最後にトリフルオロ酢酸を用いて脱エステル化を行い、目的化合物 SAV49 を得た。

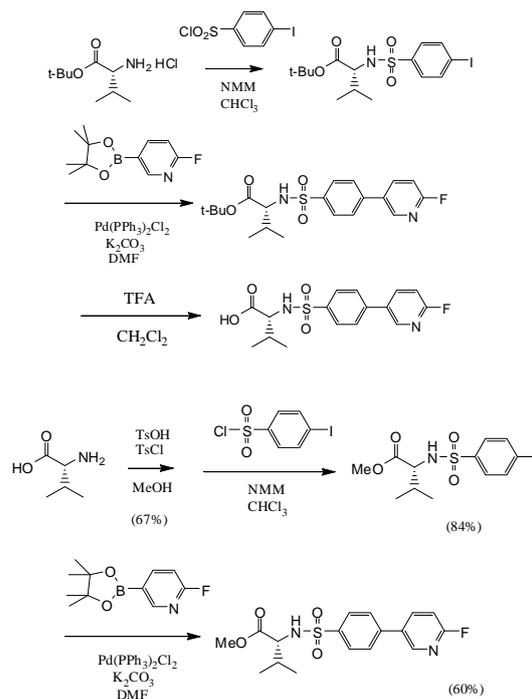


図 2 SAV49 及びその Me エステル体 (SAV49M) の合成

SAV49 のメチルエステル体 SAV49M については、*D*-バリリンからメチルエステルを合成し、後は SAV49 と同様の合成ルートによって目的化合物の合成を達成した (図 2)。

合成した SAV49 の MMP-2 阻害活性については、*in vitro* で MMP-2 活性によって分解されると吸光度が増すペプチドを利用した酵素反応系を利用して SAV49 の MMP-2 に対する活性阻害率をしらべ、IC<sub>50</sub> 値を算出した。

以前の研究から、バリリンアミド誘導体をイメージングプローブとして利用する場合、プロドラッグ的にメチルエステル体が有効であることを明らかにしている。そこで SAV49 についても、F-18 標識プローブについてはメチルエステル体の合成を行うことにした。その標識前駆体としては、フッ素 18 導入部位に脱離基としてニトロ基を有するものが有効であると考え、図 3 に示す方法でニトロ誘導体を合成した。

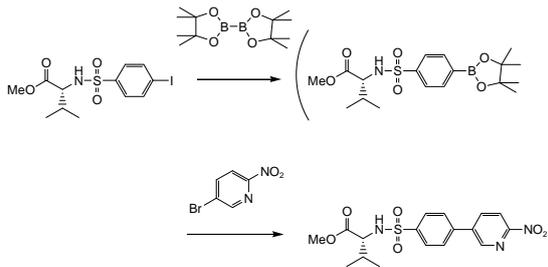


図3 SAV49Mの標識前駆体合成

このニトロ誘導体を用いた標識合成では、相間移動触媒のクリプトフィックス 222 で活性化した $[^{18}\text{F}]\text{KF}/\text{K}_2\text{CO}_3$ を、DMSO中、 $150^\circ\text{C}$ の条件下で10分間反応させることで、ピリジン2位にフッ素の導入を行った。(図4)。



図4  $[^{18}\text{F}]\text{SAV49M}$ の標識合成反応

標識反応後は、逆相セミ分取高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製を行った。最終生成物については分析 HPLC で放射化学的純度を検定した。

疾患モデル動物による評価実験では、ヒト線維肉腫 HT1080 細胞の皮下移植腫瘍モデルを利用した。HT1080 はマウス皮下に移植すると早い成長速度で腫瘍塊を形成して組織内に低酸素領域を形成し、その低酸素刺激で MMP の発現が亢進することが知られている。そこで、この HT1080 で MMP イメージング剤  $[^{18}\text{F}]\text{SAV49M}$  の腫瘍集積性を評価した。

評価実験では、HT1080 細胞移植 10 日後に体内分布法にて各種臓器組織、腫瘍組織の放射能集積率を測定した。放射能集積率は、投与放射エネルギーに対する各組織重量あたりのパーセンテージ(%ID/g)で求めた。血液中のプローブ代謝物についてラジオ薄層クロマトグラフィー(TLC)により調べた。

#### 4. 研究成果

SAV49 の合成は、3 段階の反応よりなるが、それぞれの反応収率は、80、68、84%となった。2 段階目の鈴木カップリング反応は収率が若干低かったが、その他は良好な収率であった。SAV49M についても同様に、3 段階の反応それぞれについて収率は、67、84、60%となった。

合成に成功した SAV49 を用いて、MMP-2 に対する阻害活性を調べたところ、SAV49 の濃度依存的に MMP-2 活性が阻害され(図 5)、そ

の濃度阻害活性曲線から、 $\text{IC}_{50}$  値は、 $0.61 \mu\text{M}$  と算出された。

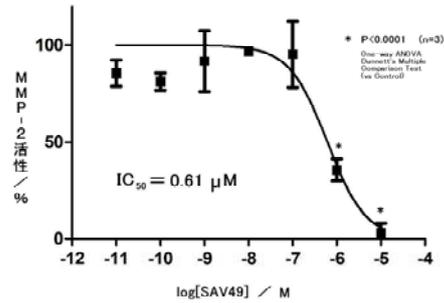


図5 SAV49 の MMP-2 活性阻害曲線

$[^{18}\text{F}]\text{SAV49M}$  の標識合成では、分取後の放射化学的収率で約 60%となり、芳香族環への求置換反応としては良好な結果となった。放射化学的純度は 99%以上で、十分生物評価実験に使用できる結果となった。

体内分布法で評価した各種臓器組織の放射能集積率は、図 6 のようになった。

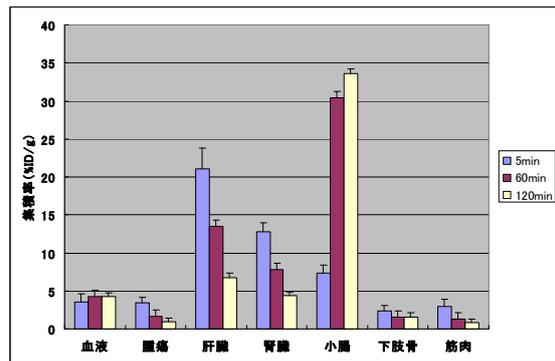


図6 各種臓器組織の放射能集積率の分布

図 6 の結果から明らかなように、下肢骨の放射能集積率は時間が経過しても変化せず、生体内でフッ素イオンの生成が起きていないことを強く示唆した。すなわち、SAV49 は生体内において脱フッ素代謝に対して耐性があることが確認できた。これは、当初の分子設計の基本戦略である代謝安定性を実現できたことになる。

しかし、腫瘍組織の放射能集積率の動態は筋肉とほぼ同じであり、特異的集積性はほとんど認められなかった。その原因としては、血液の放射能集積率が時間の経過に依存せずほぼ一定である点にあると考えられた。可能性としては、プロドラッグとして投与した SAV49M のメチルエステル体が生体内でカルボン酸型に変換していないことが考えられた。

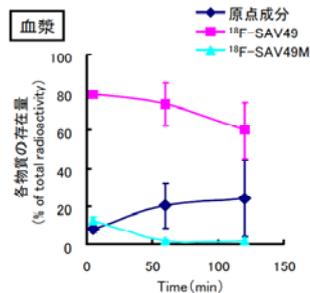


図7 血液中の SAV49/SAV49M 存在比

そこで血漿中の代謝分析を行ったところ、投与後 120 分までは 60~80% が SAV49 型に変換されていることが明らかになった(図 7)。ところが、血球画分と血漿画分の放射能分布比を調べたところ、投与直後で約 60%、その後はほぼ 100% の割合で放射能が血球画分に存在することが明らかになった(図 8)。すなわち、このことが原因でプローブはいくら血液にのって全身を循環していても、血漿画分にプローブが移行しないために、MMP-2 発現組織に対して有効な集積性を示さなかったと考えられた。

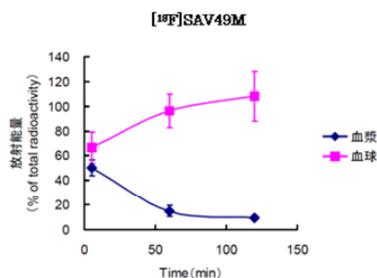


図8 マウス血液中の放射能分配比

このような血球画分への SAV49 の分配が動物種に依存するのかそれとも一般的性質なのかを探るために、ウサギを用いて同様に血液中の放射能分配比を調べたところ、マウスの場合とは逆に投与後 120 分まで常に血漿中に多く SAV49 が存在することが明らかになった(図 9)。この結果から、SAV49 はマウス血球画分に滞留しやすい性質を有することが推察され、従ってマウス疾患モデルでは MMP-2 イメージングプローブとしての性能の評価には適していない可能性が示唆された。

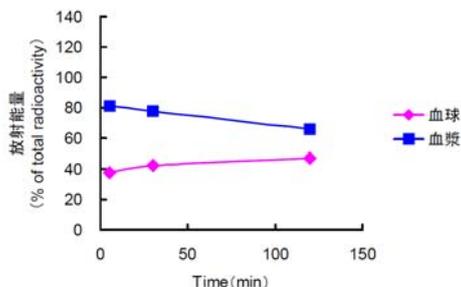


図9 ウサギ血液中の放射能分配比

以上、本研究において MMP-2 イメージングプローブの開発を目的として、新規 MMP-2 阻害剤 SAV49 を合成した。分子設計コンセプトとして生体内における脱フッ素代謝耐性を設定したが、実際にそのフッ素 18 標識体を用いたマウス体内動態実験では、脱フッ素代謝耐性を示すことが明らかになった。MMP-2 発現腫瘍モデルマウスでは SAV49 の腫瘍特異的集積性は確認されなかったが、その原因として、マウスの場合 SAV49 は血球画分に特異的に滞留してしまい、MMP-2 イメージングプローブとして生体内で有効に利用されなかった可能性が示唆された。今後の方向性として、マウス以外の MMP-2 発現疾患モデル(ウサギ、ラットなど)を用いた実験を展開することにより、SAV49 の MMP-2 イメージング剤としての有用性を正確に評価できると考えられる。

## 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

(1) Hori K, Furumoto S, Kubota K. “Tumor blood flow interruption after radiotherapy strongly inhibits tumor regrowth.” *Cancer Sci.* 99: 1485-1491, 2008. 査読有

(2) S. Furumoto, Hori K, Honda Y, Yoshioka T, Yamaura G, Ishikawa Y, Kubota K, Fukuda H, Kudo Y, Iwata R. “Assessment of tumor hypoxia induced by vascular targeting therapy.” *Journal of Nuclear Medicine* 48(S2): P76, 2007. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

(1) 古本祥三、本田芳雄、堀勝義、石川洋一、工藤幸司、岩田錬、“血管標的薬剤 AVE8062 により誘発される腫瘍低酸素状態の評価”、第 47 回日本核医学会、仙台、2007 年 11 月 5 日。

(2) 古本祥三、渋間祐太朗、金田朋洋、石川洋一、工藤幸司、岩田錬、“マトリックスメタロプロテアーゼ-2 のイメージングを目指した PET 用標識薬剤の開発”、第 47 回日本核医学会、仙台、2007 年 11 月 5 日。

(3) S. Furumoto, Hori K, Honda Y, Yoshioka T, Yamaura G, Ishikawa Y, Kubota K, Fukuda H, Kudo Y, Iwata R. “Assessment of tumor hypoxia induced by vascular targeting therapy.” *The 54th Society of Nuclear Medicine Annual Meeting, Washington DC (USA)*, June 4 2007.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

古本 祥三 (FURUMOTO SHOZO)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号 : 00375198