

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591457

研究課題名(和文) ポジトロンCT - 血管新生イメージング剤の開発

研究課題名(英文) Development of a radiolabeled uracil derivative as a potential PET tracer for angiogenesis imaging.

研究代表者

大倉 一枝 (OHKURA KAZUE)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：60094827

研究成果の概要(和文):

本研究では腫瘍の増殖に伴う血管新生をイメージングすることを目的として、ポジトロンCT薬剤の開発を実施した。血管新生因子の一つであり、腫瘍に高発現するチミジンホスホリラーゼ(TP)を標的とするポジトロン標識体を設計合成した。C-11 標識 TP 阻害剤は良好な腫瘍対正常組織比を示し、TP 阻害剤に基づく薬剤設計がポジトロンCT腫瘍イメージングに有用であることを示した。さらに F-18 標識 TP 阻害剤の合成研究を進め、その標識前駆体を得ることができた。

研究成果の概要(英文): The expression of thymidine phosphorylase (TP) is closely associated with angiogenesis and invasiveness of tumors. We evaluated  $^{11}\text{C}$  labeled 5-bromo-6-oxoimidazolidinyl-methyluracil having TP-inhibitory potency, as a new radiotracer for PET targeting TP expression in tumors. *In vivo* distribution of the radiotracer in A431 tumor bearing mice revealed tumor/blood and tumor/muscle activity uptake ratios of 5 and 12, respectively, at 1 h post-injection. To develop novel potential PET tracers having longer half-life, the synthesis of the precursor of  $^{18}\text{F}$ -labeled uracil derivative was performed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：放射薬品化学

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：放射線・核医学診断・ポジトロンCT・腫瘍・血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍の成育には腫瘍細胞の増殖能と血管新生能が不可欠である。そこで腫瘍の増殖に不可欠な血管新生をターゲットとする治療法が注目されるようになってきた。すなわち、現在では数多くの血管新生因子および抑制因子が判明し、これらの知見を応用し、癌細胞を直接攻撃するのではなく、腫瘍に酸素と

栄養を供給する新生血管を攻撃する抗血管新生療法剤の研究が活発に行われている。チミジンをチミンと 2-デオキシリボース-1-リン酸へ可逆的な変換を触媒する酵素であるチミジンホスホリラーゼ(TP)は、正常組織に比べ腫瘍組織に高濃度に発現していることが知られている。さらには、血管新生因子である血小板由来血管内皮細胞増殖因子

(PD-ECGF) と同一蛋白質であることが明らかになり、その酵素活性は、腫瘍での血管新生、浸潤、転移との関係が深いことが示された。また、TP の酵素活性阻害剤が血管新生を阻止しアポトーシスを誘導して腫瘍の増殖、浸潤、転移を抑制することが期待されている。

近年、ピリミジンを基本骨格とし6位にメチレンを架橋した誘導体に、強力な TP 阻害作用を有することが明らかにされ、治療薬として注目を浴びている。報告者らはこれまで TP 阻害活性を有する SPECT 用薬剤の開発・研究を行い、腫瘍診断薬としての有用性を検討してきた。この研究成果を進展させ TP 阻害活性を有する化合物を  $^{11}\text{C}$  や  $^{18}\text{F}$  といったポジトロン放出 RI 核種により標識すれば、SPECT 用薬剤による画像化に比べより感度、空間分解能、定量性の点で優れた PET 画像が得られることが期待される。

腫瘍において観察される血管新生を標的としたポジトロン標識新規腫瘍診断薬剤の開発は、腫瘍の診断、治療方針の決定に対し重要な手段となりうるものと考え、“ポジトロン CT - 血管新生イメージング剤の開発研究”を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は、血管新生を標的とする新規イメージング剤の開発を目的とし“血管新生因子を標的とする高感度分子プローブ”として、ポジトロン標識 TP 阻害薬を開発するものである。本研究はがん治療における早期発見を可能にし、早期に抗がん剤の適切な選択、適切な治療法の選択へとつながることが期待される。本研究により創出される臨床上的利点を具体的に次に示す。

診断：腫瘍血管は癌化の非常に早期からまた、微小な腫瘍伸展部でも誘導される。本法は腫瘍の診断、質的評価ばかりでなく、腫瘍伸展範囲の描出が手術適応決定の際の重要な指標となりうる。予後因子：乳、脳、頭頸部、肺、胃、大腸、腎、膀胱、前立腺、卵巣がんなどで、血管新生と腫瘍の予後が関連しているとされる。TP は特に大腸がん、乳がんなどで強力な予後因子である。治療応用：血管新生阻害療法では、このときアポトーシスが誘導され、腫瘍が退縮するとされているが、どのようにアポトーシスが誘導されるのか、血管新生を抑制することによりほかの生体防御機構はどのような影響を受けるのかなどの未解明の問題を明らかにする手段となりうる。また、血管新生のスイッチとなる低酸素と血管新生の両イメージングのコンビネーションにより、腫瘍増殖過程を明らかにし、治療戦略に資する。

## 3. 研究の方法

### (1) C-11 標識 TP 阻害剤の評価

既に我々が合成法を開発した、C-11 標識 TP 阻害剤  $^{11}\text{C}$  BOMU について、TP を高発現しているヒト扁平上皮癌 A431 細胞を用い、*in vitro* でその取り込みを検討した。また、A431 細胞移植ヌードマウスの尾静脈より放射性標識化合物を投与し、その生体内分布を調べた。

### (2) F-18 標識 TP 阻害剤の合成のための直接標識法による6位置換ウラシル誘導体の合成検討

6位置換ウラシルをモデル化合物として、直接フッ素化法による、ウラシル誘導体のフッ素化法の検討を行った。ウラシル誘導体フッ素化のために必要な保護基の導入や合成経路の検討を行った。

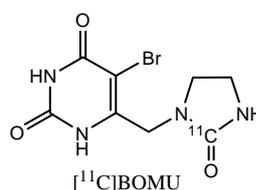
### (3) F-18 標識 TP 阻害剤の合成のための間接標識法による含フッ素ウラシル誘導体、および標識前駆体の合成

間接標識法によるフッ素化法として、標識前駆体として有機金属化合物を用いる方法を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) C-11 標識 TP 阻害剤の評価

近年我々が開発した C-11 ホスゲンを用いる簡便迅速な標識法により、C-11 標識ウラシル誘導体 5-bromo-6-oxoimidazolidinylmethyluracil ( $^{11}\text{C}$  BOMU) を高収率で合成することができた。



TP 阻害性ウラシル化合物  $^{11}\text{C}$  BOMU について、イメージング剤としての有用性を基礎的に評価した。

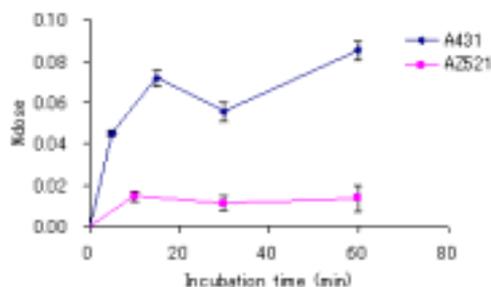


Fig.1 Uptake of  $^{11}\text{C}$  BOMU into A431 tumor cells and AZ521 tumor cells

$^{11}\text{C}$  BOMU の TP 発現腫瘍細胞への集積性を

*in vitro* で検討した。TP の発現が高い A431 細胞と TP 発現が殆ど認められないヒト胃がん細胞 AZ521 を対照的な腫瘍細胞として用い、放射性ウラシルの取り込み実験に供した。その結果、AZ521 細胞では取り込みの増加は認められなかったのに対し、A431 細胞とインキュベートした場合には [<sup>14</sup>C]BOMU の取り込みは増加する傾向が認められ、TP の発現に対応して細胞に取り込まれることが示された (Fig. 1)。

次に *in vivo* で体内分布および腫瘍移行性を調べた。腫瘍細胞を移植した担がんモデルマウスに [<sup>14</sup>C]BOMU を尾静脈内投与し、経時的に放射能の体内分布を測定し、[<sup>14</sup>C]BOMU の腫瘍移行性を調べた結果を Table 1 に示す。

[<sup>14</sup>C]BOMU は血液中から速やかに消失し、各組織に分布した。腫瘍では投与 5 分後から、他の組織と比べて比較的高い放射能集積が観察され、その集積量は 60 分後でも維持された。また、腫瘍で放射能集積量が維持されたのに対し、小腸、大腸を除いたその他の組織においては放射能集積量が時間と共に減少したことから、イメージングに重要な、放

Table 1. Biodistribution of [<sup>14</sup>C]BOMU following intravenous administration in balb/c mice bearing A431 tumors

Tissue	Time after injection (min)			
	5	15	30	60
Blood	7.09 ± 1.02	3.55 ± 1.37	1.67 ± 0.83	0.99 ± 0.72
Plasma	9.46 ± 1.13	4.82 ± 1.69	2.16 ± 1.02	1.28 ± 0.87
Tumor	3.58 ± 0.16	3.10 ± 0.85	2.95 ± 0.52	4.21 ± 1.54
Heart	2.98 ± 0.44	1.50 ± 0.57	0.76 ± 0.38	0.47 ± 0.33
Lungs	4.72 ± 0.68	2.50 ± 0.90	1.24 ± 0.56	0.80 ± 0.52
Liver	8.15 ± 1.11	4.07 ± 1.11	1.95 ± 0.92	1.42 ± 0.99
Spleen	2.24 ± 0.39	1.36 ± 0.57	0.64 ± 0.28	0.52 ± 0.43
Kidney	46.87 ± 21.43	14.15 ± 4.99	9.89 ± 11.89	3.35 ± 3.27
Stomach	2.28 ± 0.65	1.09 ± 0.48	0.88 ± 0.81	0.72 ± 0.38
Small intestine	6.51 ± 0.69	6.81 ± 0.69	8.87 ± 2.66	11.92 ± 2.00
Large intestine	2.28 ± 0.16	2.39 ± 0.58	3.05 ± 0.99	4.86 ± 0.23
Muscle	1.37 ± 0.25	0.92 ± 0.32	0.52 ± 0.18	0.44 ± 0.26
Brain	0.17 ± 0.02	0.10 ± 0.04	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02

射能の腫瘍対正常組織比が時間とともに向上することが示された。

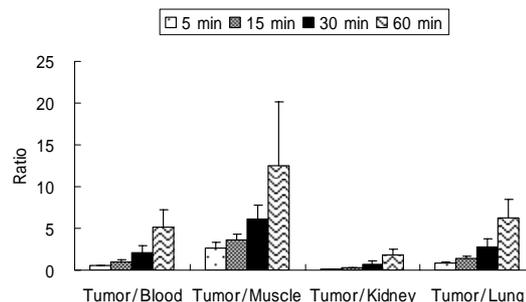


Fig.2 Tumor - normal tissue ratio of radioactivity after intravenous [<sup>14</sup>C]BOMU

Fig. 2 にはいくつかの主な組織についての腫瘍対正常組織比を示すが、いずれの組織においても放射能の腫瘍対正常組織比は時間とともに増大した。60 分後において血液では平均で 5.2、筋肉では 12.5 と、イメージングに十分な良好な比が得られた。以上のことから、TP 阻害剤に基づく薬剤設計は、TP 標的イメージングに有用であると考えられる。

一方で、腎臓では 60 分後ではイメージングに十分な比は得られなかった。しかし、今回得られた結果は、時間の経過とともに腫瘍対正常組織比が更に向上する可能性が高いことを示していることから、この問題点は、より半減期の長い放 F-18 などの放射性核種で標識した薬剤を用いて、より遅い時間点で観察することにより解決できる可能性が高いと考えられた。

このように、C-11 標識 TP 阻害剤の実験結果から、TP 阻害剤に基づく薬剤設計がポジトロン CT 腫瘍イメージングに有用であることを示すことができた。

## (2) F-18 標識 TP 阻害剤の合成のための直接標識法による 6 位置換ウラシル誘導体の合成検討

6 位置換ウラシルをモデル化合物として、ウラシルの効率的なフッ素化法を検討した。フッ素導入可能な官能基として、ヒドロキシル基のウラシル誘導体への導入を行った。その後の F-18 標識化で課題となるウラシル誘導体の NH の保護基の導入を種々検討したところ、ベンジル基の利用が良好な結果を示すものであることを見出した。詳細は次の通りである。

ヒドロキシル基の導入: 収率 16%

ヒドロキシル基のベンジルによる保護:  
収率 73%

ウラシル環の NH 基のベンジル基による保護: 収率 38%

臭素化：収率 38%  
アセチル化：収率 26%  
加水分解：収率 90%

本合成経路は新たな含フッ素ウラシル誘導体の合成に関する多くの知見を与え、今後のウラシル誘導体の合成研究に非常に有用であることが示唆された。

本研究期間においてフッ素化反応までは実施することはできなかったが、引き続き研究を行う予定である。

(3) F-18 標識 TP 阻害剤の合成のための間接標識法による含フッ素ウラシル誘導体及び標識前駆体の合成

間接標識法によるフッ素化のため、標識前駆体として有機金属化合物を用いる方法を検討し、標識前駆体としてスズ化合物の合成が達成された。6-クロロメチルウラシルを出発原料として 5 段階の反応を経て、TP 阻害性ウラシル誘導体の標識前駆体を得ることができた。詳細を次に示す。

ヨウ素化反応。収率91%  
アミノ基導入反応：78%  
N-複素環の導入 収率：99%  
NH基の保護：収率：30%

ヨウ素-金属交換反応：ジオキサソ中、テトラトリフェニルホスフィンパラジウム(0)とヘキサメチルニスズと反応させることで、スズ前駆体を得た。収率：30%

本研究では、腫瘍に高発現する TP に対する親和性を示す化合物のポジトロン標識体をイメージング剤として設計し、腫瘍における新規血管新生イメージング剤の開発を目指した。C-11 標識 TP 阻害剤は担がんマウスを用いる *in vivo* 実験において、良好な腫瘍対正常組織比を示し、TP 阻害剤に基づく薬剤設計がポジトロン CT 腫瘍イメージングに有用であることを示唆する成果を得た。これは世界に先駆けて TP 標的 PET イメージング剤開発が可能であることを実証したものである。

さらに、F-18 標識 TP 阻害剤の合成は、直接フッ素化と間接フッ素化の両方法で検討を進めた結果、間接フッ素化の標識前駆体の合成まで達成することができた。これらの合成経路は、新規化合物を含む興味深い知見を含んでおり、今後の検討により新たな反応開発や有用な標識化合物の合成に繋がるものである。

今後さらに本研究成果を活用し、F-18標識 TP阻害性ウラシル誘導体を用いて、腫瘍細胞および担がん動物モデルにおける標識薬剤の集積性を明らかにすることにより、有用なポジトロン - CT 血管新生イメージング剤を開発し、がん治療戦略に資することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

### (1) 雑誌論文

- 1) Takahashi M., Seki K., Nishijima K., Kuge Y., Tamaki N., and Ohkura K., Synthesis of <sup>11</sup>C-labeled uracil derivative for a pet tracer targeting thymidine phosphorylase, *Heterocycles*, 76, 237-241 (2008).
- 2) Seki K., Nishijima K., Sanoki K., Kuge Y., Takahashi M., Akizawa H., Tamaki N., Wiebe L.L., and Ohkura K., New [<sup>11</sup>C] phosgene based synthesis of [<sup>11</sup>C]- pyrimidines for positron emission tomography, *Heterocycles*, 77, 1307- 1321(2009).

### (2) 学会発表

関興一・西嶋剣一・高橋正幸・趙 松吉・向田理恵・秋澤宏行・久下裕司・玉木長良・大倉一枝, [<sup>11</sup>C]phosgene を用いる oxoimidazolidinylmethyluracil の合成とがんイメージングプローブへの応用  
日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 28 日, 大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大倉 一枝 (OHKURA KAZUE)  
北海道医療大学・薬学部・教授  
研究者番号：60094827

### (2) 研究分担者

久下 裕司 (KUGE YUJI)  
北海道大学・アイソトープ総合センター・教授  
研究者番号：70321958  
秋澤 宏行 (AKIZAWA HIROMICHI)  
北海道医療大学・薬学部・准教授  
研究者番号：90311795