

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08088

研究課題名(和文) COX-2の画像化を可能とするニメスリド誘導体の病態モデル評価

研究課題名(英文) Nimesulide derivatives for COX-2 imaging; in/ex vivo evaluation

研究代表者

山本 由美 (Yamamoto, Yumi)

東北医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70613446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、COX-2イメージング剤候補化合物として開発中のニメスリド誘導体の、一連の研究の次の段階として、新たに設計したパラ置換体2化合物を候補に加え、病態モデル動物を用いたin vivo評価を行うことで、COX-2イメージング剤としての有用性を評価した。

当該研究期間全体を通して、新たに設計した2つのニメスリド誘導体は、生体内での安定性に難があり、COX-2イメージング剤として適していないことを明らかにした。その一方で、以前から評価を継続している2つの誘導体は、病態モデル動物を用いた評価においても、COX-2イメージング剤として良好な挙動を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シクロオキシゲナーゼ(COX-2)は、がん(腫瘍)や炎症において高発現するほか、脳においてはパーキンソン病やアルツハイマー病などとの関与が示唆されているが、これら病態におけるCOX-2の働きは未だ解明されていない。

各種病態におけるCOX-2の働きを解明するために、COX-2の画像化を可能とするイメージング剤の研究開発が国内外で進められてきたが、いまだ成功例はない。

本研究において、2つのニメスリド誘導体が、病態モデルマウスの腫瘍や炎症に集積することを明らかにしたことは、COX-2が関与する病態の診断や治療の発展の一助となるだろう。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop nimesulide derivatives as COX-2 imaging agents. We designed two novel nimesulide derivatives and evaluated them in vivo in a mouse model of the disease.

In vivo evaluation revealed that the two novel nimesulide derivatives were not suitable as COX-2 imaging agents because they were rapidly metabolized in vivo. On the other hand, two previous nimesulide derivatives were found to be useful as COX-2 imaging agents in evaluations using mouse models of inflammation and tumors.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：COX-2 イメージング PET ニメスリド 炎症モデル 腫瘍モデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シクロオキシゲナーゼ(COX)は、アラキドン酸から生理活性物質であるプロスタグランジン類を産生する酵素である。COXには2つのアイソザイムが存在しており、COX-1及びCOX-2とに大別される。このうちCOX-2は炎症により誘導されるだけでなく、アルツハイマー病などの中枢神経系疾患や、肺がん・乳がん・結腸がんなどの各種がんにおいて高発現することが知られている。しかし、これら病態におけるCOX-2の働きは未だ解明されていない。

各種病態におけるCOX-2の働きを解明するために、生体内COX-2分布を時間的・空間的かつ定量的にトレース可能なPETやSPECTなどのCOX-2イメージング剤の研究開発が国内外で進められてきた。しかしながら、未だ成功例はない。

代表者が大学院時代より継続してCOX-2イメージング剤の研究開発に取り組んできた中で、科学研究費補助金若手研究(B)および基盤研究(C)を受けて実施した一連の研究において、広く世界で使用されている医薬品ニメスリド(日本では未認可)を母体骨格とした、新規ニメスリド誘導体を見出した(Yamamoto Y. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 23, 6807-6814(2015), Yamamoto Y. et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 24, 3727-3733(2016))。これらは*in vitro*および*in vivo*ともにCOX-2イメージング剤として望ましい挙動を示し、特にベンゼン環パラ位に官能基を有する化合物は、マウスを用いた*in vivo/ex vivo*評価において、COX-2を定常的に発現する大脳皮質に局所分布し、脳におけるCOX-2分布を良好に反映している可能性を示唆した(Yamamoto Y. et al., *核医学*, 55, S228(2018))ほか、COX-2を発現する炎症部位にCOX-2特異的な集積を認めたと(日本薬学会第139年会, 要旨集2, 285(2019))ことから、これらニメスリド誘導体は有力なCOX-2イメージング剤候補化合物であると考えられる。

そこで代表者は、これら一連の研究の次の段階として、新たに設計したパラ置換体2化合物を候補に加え、病態モデル動物(炎症モデル、腫瘍モデルなど)を用いた*in vivo*評価を行うことで、COX-2イメージング剤としての有用性を評価するとともに、臨床使用への可能性を探りたいという考えに至った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、COX-2イメージング剤を開発することである。

COX-2を発現する様々な病態モデルに対する4種のニメスリド誘導体の挙動を評価し、比較検討することによって、これらニメスリド誘導体のCOX-2イメージング剤としての有用性を評価する。評価に使用する4種のニメスリド誘導体は、既に正常マウスで良好な結果が得られているうえに、予備実験では病態モデルにおいても良い傾向を示している貴重な化合物である。これまで積み重ねてきた評価の次の段階として、本研究では、ニメスリド誘導体が臨床使用可能なCOX-2イメージング剤となり得るか判断できると考えた。

### 3. 研究の方法

本研究は、(1)新たに設計したニメスリド誘導体の基礎的評価、(2)中枢を標的とした*in vivo/ex vivo*評価、(3)末梢を標的とした病態モデル動物による評価の3つの研究項目に分けられる。

#### (1) 新たに設計したニメスリド誘導体の基礎的評価

評価に使用する新規ニメスリド誘導体の合成は、予備実験にて既に成功しているSchemeに従って行った。

*p*-メチル誘導体の<sup>11</sup>C標識は、-SnBu<sub>3</sub>体に対する[<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTfを用いた[<sup>11</sup>C]メチル化反応により行い、*p*-フルオロエチル誘導体の<sup>18</sup>F標識は、-OH体に対する[K/222]<sup>+</sup><sup>18</sup>Fを用いたフッ素イオン法により行った。

標識合成後は、これまで評価してきたニメスリド誘導体同様、正常マウスを用いた*in vivo*生体内分布、阻害実験、代謝物分析などの基礎的評価を行った。

#### (2) 中枢を標的とした*in vivo/ex vivo*評価

4つのニメスリド誘導体を用いて、中枢を標的とした*in vivo/ex vivo*評価を行った。

マウス頭部PETを撮像し、*ex vivo*評価として脳切片を用いたARG(オートラジオグラフィ)を行い、画像化してその分布を精査した。*Ex vivo*ARGと並行して、切り出した切片を用いて免疫組織化学染色を行うことで、COX-2を含めた様々なタンパクの発現を調べ、各種病態に関連するタンパクとニメスリド誘導体の分布との相関を精査した。

#### (3) 末梢を標的とした病態モデル動物による評価

中枢を標的とした*in vivo/ex vivo*評価と並行して、末梢を標的とした病態モデル動物による評価を行う。

病態モデルとして、代表者が既に確立したテレピン油惹起炎症モデル(日本薬学会第139年会, 要旨集2, 285(2019))のほか、HCA-7 colony29細胞(COX-2高発現)あるいはHT-29細胞(COX-

2 低発現) を植えた腫瘍モデル ( *ChemMedChem.*, 10, 1635 (2015) ) を用いて、 *in vivo* 生体内分布評価、および代謝物分析を行った。

以上 3 つの研究項目にて各種評価を行い、得られた結果から、ニメスリド誘導体が COX-2 イメージング剤として臨床使用可能かという観点で考察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新たに設計したニメスリド誘導体の基礎的評価

標品として使用するニメスリド誘導体および、放射性同位元素標識のための標識前駆体としての -SnBu<sub>3</sub> 体および -OH 体の合成に成功し、十分な収量および収率にて目的物を得ることができた。

*p*-メチル誘導体の <sup>11</sup>C 標識は、-SnBu<sub>3</sub> 体に対する [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>OTf を用いた [<sup>11</sup>C]メチル化反応により行い、*p*-フルオロエチル誘導体の <sup>18</sup>F 標識は、-OH 体に対する [K/222]<sup>+</sup><sup>18</sup>F<sup>-</sup> を用いたフッ素イオン法により行った。 [<sup>11</sup>C]メチル体は放射化学的収率 11-35%、放射化学的純度 > 99.4% にて得られ、 [<sup>18</sup>F]フルオロエチル体は放射化学的収率 16-18%、放射化学的純度 > 95.3% にて得られた。

正常マウスを用いた *in vivo* 生体内分布および阻害実験の結果、 [<sup>11</sup>C]メチル誘導体は速やかに生体内から排出され、脳への集積や COX-2 特異的結合は認められなかった。その一方で、 [<sup>18</sup>F]フルオロエチル誘導体は、血中滞留性が高く、骨に対する集積が認められる結果であった。

両化合物の代謝物分析を行った結果、正常マウス投与 15 分後の血漿中未変化体の割合が、 [<sup>11</sup>C]メチル誘導体で 12.6%、 [<sup>18</sup>F]フルオロエチル誘導体で 3.5% と非常に低く、いずれの化合物も投与後速やかに代謝され、非常に不安定であることが明らかになった。

##### (2) 中枢を標的とした *in vivo/ex vivo* 評価

4 つのニメスリド誘導体を用いて、中枢を標的とした *in vivo/ex vivo* 評価を行った。

[<sup>11</sup>C] および [<sup>18</sup>F] 標識体 3 種類に関して、マウス頭部 PET を撮像した結果、 [<sup>11</sup>C]メトキシ誘導体および [<sup>11</sup>C]メチル誘導体はいずれも、投与後まもなく頭部から放射能が消失しているのに対し、 [<sup>18</sup>F]フルオロエチル誘導体は経時的に頭部へと集積していることが明らかになった。これらの結果はいずれも、 *in vivo* 生体内分布評価結果を反映しており、 [<sup>18</sup>F]フルオロエチル誘導体の頭部への集積は、代謝によって生じた遊離の <sup>18</sup>F が頭蓋骨に集積しているものと推測される。

4 つのニメスリド誘導体の *ex vivo* 評価として、脳切片を用いた ARG を行った結果、 [<sup>11</sup>C]メトキシ誘導体が正常マウスの大脳皮質付近に分布していることが明らかとなり、その分布は、免疫組織化学染色によって画像化された COX-2 の発現・分布と一致した。ほか 3 化合物に関しては、いずれも正常マウス脳に対して均一な分布を示したことから、脳組織に対して非特異的に結合しているものと考えられる。

##### (3) 末梢を標的とした病態モデル動物による評価

中枢を標的とした *in vivo/ex vivo* 評価と並行して、末梢を標的とした病態モデル動物による評価を行った。

テレピン油惹起炎症モデルおよび、HCA-7 colony29 細胞 (COX-2 高発現) あるいは HT-29 細胞 (COX-2 低発現) を植えた腫瘍モデルを用いて、 *in vivo* 生体内分布評価を行った結果、 [<sup>11</sup>C]メトキシ誘導体は投与 15 分後から 90 分後にかけて、少ないながらも炎症部位への集積が認められ、炎症/筋肉比が 1.2-2.1 倍であるという結果が得られた。 [<sup>125</sup>I]ヨウ素誘導体は、炎症モデルおよび腫瘍モデルいずれも、投与 6 時間後において炎症あるいは腫瘍部位へと高い集積を示し、特に炎症への集積は各種 COX-2 阻害剤によって有意に阻害されることが明らかとなった。さらに、病態モデル動物を用いた代謝物分析の結果、正常マウス投与時と同様に、 [<sup>125</sup>I]ヨウ素誘導体の生体内安定性は非常に高く、投与 24 時間後においても血漿中 85.8%、炎症中に 78.2% の未変化体の存在が確認された。なお、 [<sup>11</sup>C]メチル誘導体および [<sup>18</sup>F]フルオロエチル誘導体に関しては、(1)の基礎的評価によって生体内で不安定であることが明らかとなったため、病態モデル動物を用いた評価は実施していない。

当該研究期間全体を通して、新たに設計した 2 つのニメスリド誘導体である、 [<sup>11</sup>C]メチル誘導体および [<sup>18</sup>F]フルオロエチル誘導体はいずれも、生体内での安定性に難があり、COX-2 イメージング剤として適していないことを明らかにした。その一方で、当該研究期間以前から評価を継続している [<sup>11</sup>C]メトキシ誘導体および [<sup>125</sup>I]ヨウ素誘導体は、病態モデル動物を用いた評価においても、COX-2 イメージング剤として良好な挙動を示すことを明らかにした。

今後は、 [<sup>125</sup>I]ヨウ素誘導体の評価を継続するとともに、今回明らかになった生体内での安定性に関する情報をもとに、 *in vivo* において代謝されにくい新たな化合物を設計し、評価を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Yumi, Tago Tetsuro, Toyohara Jun, Saito Yohei, Yamamoto Fumihiko	4. 巻 45
2. 論文標題 Radiosynthesis and in Vivo and ex Vivo Evaluation of Isomeric [11C]methoxy Analogs of Nimesulide as Brain Cyclooxygenase-2-Targeted Imaging Agents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 94 ~ 103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b21-00608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saito Yohei, Miura Hiromasa, Takahashi Nozomi, Kuwahara Yoshikazu, Yamamoto Yumi, Fukumoto Manabu, Yamamoto Fumihiko	4. 巻 61
2. 論文標題 Involvement of APOBEC3B in mutation induction by irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 819 ~ 827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rraa069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 あすか、小玉 優育、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 Ex vivo ARG in the brain of 125I-labeled-m-nimesulide derivative for COX-2 imaging
3. 学会等名 第62回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小玉 優育、齋藤 あすか、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 Evaluation of specific binding of 125I-labeled p-nimesulide derivative in the brain for COX-2 imaging
3. 学会等名 第62回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部 浩司、池田 岳紡、稲田 晋宣、北 実、谷口 真、中島 裕美子、牧 大介、安井 博宣、山本 由美
2. 発表標題 企画専門委員会の活動 - 令和4年度 教育訓練講習会アンケート調査結果とその考察 -
3. 学会等名 令和4年度 放射線安全取扱部会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 由美
2. 発表標題 脳の病変診断を目指した新規COX-2イメージング剤開発に関する研究
3. 学会等名 令和4年度 日本薬学会東北支部 第44回東北薬学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 陽平、齋藤 百花、福嶋 恵莉奈、山本 由美、山本 文彦
2. 発表標題 Analysis of subcellular localization of APOBEC3B after DNA damage
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本 由美
2. 発表標題 COX-2選択的阻害薬ニメスリドのパラ置換誘導体の研究開発
3. 学会等名 第18回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム PPF2020/2021（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	馬田 敏幸、池田 岳紡、稲田 晋宣、北 実、小山 由起子、安井 博宣、山本 由美、和田 真由美、渡部 浩司
2. 発表標題	シンポジウム2-2「コロナ禍や法令改正における放射線施設のチャレンジング」 企画専門委員会の活動 - 令和3年度 教育訓練講習会アンケート調査結果とその考察 -
3. 学会等名	令和3年度 放射線安全取扱部会年次大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	今井 健太郎、大野 梓、山本 由美、安藤 真祐子、植野 ひより、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題	In vivo stability of nimesulide [125I] iodine analogs as COX-2 imaging agent
3. 学会等名	第61回日本核医学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	大野 梓、今井 健太郎、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題	In vivo stability of [125I]nimesulide p-I derivatives in plasma and brain for COX-2 imaging
3. 学会等名	第61回日本核医学会学術総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	今井 健太郎、小野 夏実、柴田 達郎、佐々木 遼、山本 由美、齋藤 陽平、牧野 顕、清野 泰、山本 文彦
2. 発表標題	Biodistribution of In-111 labeled AB type Lactosome in tumor-bearing mice
3. 学会等名	日本薬学会第142年会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 齋藤 あすか、小玉 優育、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 Local distribution in the brain of 125I-labeled-m-nimesulide derivative for COX-2 imaging
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小玉 優育、齋藤 あすか、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 Ex vivo autoradiography of [125I]nimesulide p-I derivative in brain for COX-2 imaging
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 陽平、今野 里香、福嶋 恵莉奈、山本 由美、山本 文彦
2. 発表標題 Analysis of subcellular localization of APOBEC3B after DNA damage
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 陽平、山本 由美、山本 文彦
2. 発表標題 Involvement of APOBEC3B in mutation induction by irradiation
3. 学会等名 第63回日本放射線影響学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 由美、長内 亜有子、大石 陽平、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 計算科学を用いた新規COX-2イメージング剤候補化合物の設計
3. 学会等名 第59回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬田 敏幸、池田 岳紘、稲田 晋宣、北 実、小山 由起子、安井 博宣、山本 由美、和田 真由美、渡部 浩司
2. 発表標題 企画専門委員会の活動 - 令和2 年度 教育訓練講習会アンケート調査結果とその考察 -
3. 学会等名 令和2年度 放射線安全取扱部会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 針生 怜、岡田 美桜、牧野 顕、山本 由美、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 葉酸修飾ラクトソームの構造最適化と腫瘍認識能評価
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 由美、多胡 哲郎、豊原 潤、齋藤 陽平、山本 文彦
2. 発表標題 COX-2イメージングを目的としたニメスリド[ <sup>11</sup> C]Me/[ <sup>18</sup> F]OFEt誘導体の開発
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本 由美
2. 発表標題 物理系薬学会シンポジウム 新進気鋭の研究者による物理系薬学分野の最先端研究 新規NSAIDs誘導体によるCOX-2イメージング
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>令和4年度 日本薬学会東北支部 奨励賞 受賞（2022.12.17.） 「脳の病変診断を目指した新規COX-2イメージング剤開発に関する研究」</p> <p>東北医科薬科大学 薬学部 放射薬品学教室 <a href="https://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/hosya/index.html">https://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/hosya/index.html</a></p> <p>放射性医薬品開発研究への招待 <a href="https://www.jrias.or.jp/report/cat1/312.html">https://www.jrias.or.jp/report/cat1/312.html</a></p>
--

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
研究協力者	豊原 潤 (TOYOHARA Jun)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所  (82674)	
研究協力者	多胡 哲郎 (TAGO Tetsuro)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所  (82674)	
研究協力者	大野 梓 (ONO Azusa)	東北医科薬科大学・薬学部  (31305)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	今井 健太郎  (IMAI Kentaro)	東北医科薬科大学・薬学部  (31305)	
研究協力者	小玉 優育  (KODAMA Yui)	東北医科薬科大学・薬学部  (31305)	
研究協力者	斎藤 あすか  (SAITO Asuka)	東北医科薬科大学・薬学部  (31305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関