

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：83903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21260

研究課題名(和文)特異的発現酵素を標的とした脳腫瘍イメージングPETプローブの斬新化

研究課題名(英文)Novel PET probe for brain tumor imaging targeting specifically expressed enzymes

研究代表者

鈴木 正昭(Suzuki, Masaaki)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 認知症先進医療開発センター・研究員

研究者番号：90093046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍領域において、DNAメチル化抗がん剤の薬剤耐性を誘起するメチル基転移酵素(MGMT)および悪性脳腫瘍の形成と進行に深く関わるイソクエン酸脱水素酵素1の遺伝子変異体(mIDH1)が治療効果や予後予測の因子として着目されている。本研究では、MGMT不活化剤であるO6-ベンジルグアニンおよびmIDH1の基質である α -ケトグルタル酸に着目し、これらの非侵襲的な診断用分子プローブの開発をめざしてその重要課題である脳透過性の賦活に向けた分子設計指針を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性脳腫瘍の病態を非侵襲的に評価できる新医療技術の開発に関する挑戦であり、その研究の正否を握る探索的研究段階での独創的かつ学際的な共同研究システムの構築に重点を置いた魁的研究である。とくに、独自に開発した高速炭素-炭素カップリング反応を機軸として、first-in-man試験を視野に入れた精緻かつ高品位なPETプローブの創製による直接的な脳透過性評価法を導入して、脳腫瘍特異的な分子標的イメージング法を編み出すものであり、革新的かつ大きな学術的意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：In the field of brain tumors, O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), which induces drug resistance to DNA methylating anticancer drugs, and mutant isocitrate dehydrogenase 1 (mIDH1), which is closely related to the formation and progression of malignant brain tumors, have attracted attention as potential factors to predict therapeutic efficacy and prognosis. In this study, we focused on an MGMT inactivator O6-benzylguanine (O6-BG), and mIDH1 substrate α -ketoglutaric acid, and provided guidelines for molecular design to enhance the brain permeability, which is important in the development of non-invasive molecular probes for brain disease diagnosis. Thus, we synthesized novel O6-BG derivatives with lipophilic and electrophilic substituent stably, and verified the high brain permeability by rat PET imaging with ^{11}C -labeled O6-BG derivatives. A preliminary study on ^{18}F -labeling of α -ketoglutaric acid suggested that rapid fluorination of an enolate precursor would be effective.

研究分野：生物分子化学関連

キーワード：O6-メチルグアニン-DNA-トランスフェラーゼ 06-ベンジルグアニン 遺伝子変異イソクエン酸脱水素酵素1 α -ケトグルタル酸 ^{11}C 標識プローブ 脳腫瘍PETイメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

開頭脳腫瘍手術は侵襲性を伴うが、もし、脳腫瘍の種類を予測し、適切な抗癌剤を選択して、その治療効果や浸潤状況を頭外から非侵襲的に観察・評価することができれば患者の負担を大幅に軽減することができるため、近年、生体 (*in vivo*) において分子レベルで非侵襲的に病態を評価できる革新的な医療技術の開発が強く求められている。

*O*⁶-メチルグアニン-DNA-トランスフェラーゼ (MGMT) は、悪性脳腫瘍において有力な治療予後不良因子であるとされる。悪性脳腫瘍の標準治療薬であるテモダールは DNA のメチル化により DNA ミスマッチ修復を誘因して抗癌作用を示す。一方、MGMT はメチル化された DNA 中の *O*⁶-メチルグアニンからメチル基の離脱に働き、結果、脳腫瘍は薬剤耐性となることから、MGMT の発現量は治療効果に反映すると考えられる (図 1) ①。

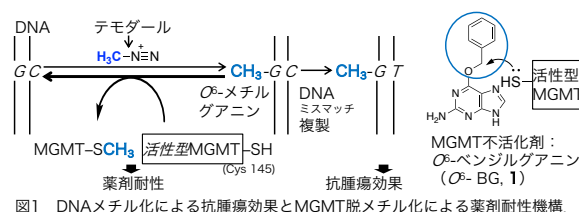


図1 DNAメチル化による抗癌効果とMGMT脱メチル化による薬剤耐性機構。

悪性脳腫瘍の一つである神経膠腫 (グリオーマ) のグレード II-III の約 8 割で認められるクエン酸回路に関わるイソクエン酸脱水素酵素 1 (IDH1) に遺伝子変異体である mIDH1 の存在が明らかになり、本酵素は新たな診断・治療の標的分子として着目されている (図 2) ②。最近、この変異に起因する α -ケトグルタル酸 (α KG, 2) から異常代謝産物である 2-ヒドロキシグルタル酸 (3) への異常代謝がグリオーマの形成と悪性進行に深く関わっていることが報告され、新たな癌診断・治療の標的として注目されている。

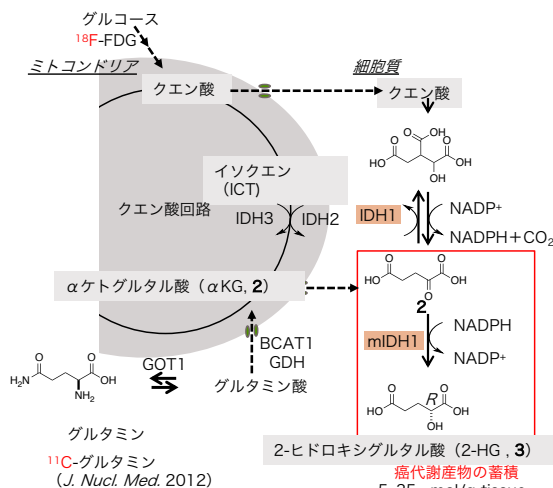


図2 グリオーマ細胞での遺伝子変異イソクエン酸脱水素酵素 (mIDH1) による異常代謝プロセス。

一方、陽電子放射断層画像撮像法 (positron emission tomography, PET) は短寿命放射性核種 (^{11}C , ^{18}F など) で標識化された化合物の生体内での動きや分布を小動物からヒトまで生体丸ごと非侵襲的に測定できる優れた分子イメージング (画像化) 技術である。これまでに MGMT の非侵襲的定量化に向けて、本研究者らが独自に開発した高速 ^{11}C 標識合成法の一般化において見出した新たな「ヘテロ芳香環上への高速 C - ^{11}C メチル化」の反応条件を活用して、MGMT 不活化剤である *O*⁶-ベンジルグアニン (*O*⁶-BG, 1) の ^{11}C 標識体の合成を達成した③。しかし、PET イメージングを試みた結果、実用的な脳腫瘍診断用プローブとしての開発を進めるには ^{11}C 標識 *O*⁶-BG (^{11}C 5) の脳内移行性の低さが問題となった (図 3)。また、内在性代謝産物である α KG は細

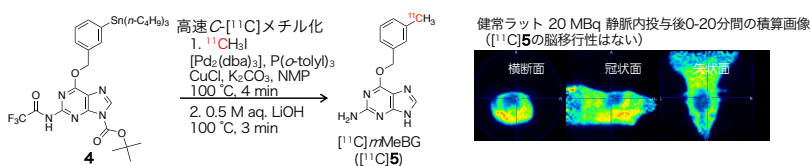


図3 ^{11}C 標識 *O*⁶-(3-メチルベンジル)グアニン (^{11}C 5) の合成とPET脳イメージング図。

胞膜透過性が低いことから、脳内移行性も非常に低いことが予想される^④。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、抗癌剤耐性の分子機構 (図 1) に着目し、PET 技術を有効に活用できる脳腫瘍特異的分子プローブの開発である。具体的には、MGMT 不活化剤である θ -BG の構造母核へ短寿命放射性核種を導入した高脳透過性 PET 分子プローブの創製と活用である。また、本研究の第二の目的は、異常代謝プロセス (図 2) に関わる mIDH1 を画像化できる高脳透過性 α -ケトグルタル酸 PET プローブの開発である。いずれにおいても、脳内の薬物動態の解析には血液と脳との間に存在する脳血液関門 (BBB) の高い透過性を実現する必要があり、このような高い脳移行性をもつ PET プローブの開発が本研究の重点課題である。

3. 研究の方法

(1) MGMT の脱メチル不活化および高脳透過性を兼備した θ -BG の PET プローブの設計

化合物の脳内移行性に必要と考えられる親油性の向上を意図して、 ^{11}C θ -BG に含まれる極性の高いグアニン部位 (具体的にはグアニン 9 位) をベンジルオキシカルボニル (Z) で保護した ^{11}C 標識 θ -ベンジルグアニン (図 4, ^{11}C $m\text{MeBG-Z}$, ^{11}C **6**) を設計した。 ^{11}C **6** はプロドラッグとして働き、脳に移行したのち加水分解を受け、親化合物 ^{11}C $m\text{MeBG}$ (^{11}C **5**) が再生されると想定した。

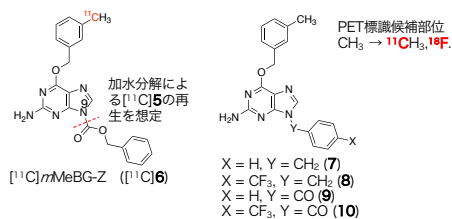


図4 ^{11}C $m\text{MeBG}$ の Z 保護体 (^{11}C **6**, プロドラッグを想定)。

図5 MGMT 不活化活性と高い脳移行性を兼ね備えた θ -ベンジルグアニン (θ -BG) 誘導体の設計。

また、 θ -BG の 9 位 NH の保護を目的にアルキル基を導入した θ -BG 誘導体は MGMT の脱メチル不活化能を低下させる^⑤という情報を念頭に、この不活化効果の賦活のためには、本位置に安定な求電子置換基の導入が効果的ではないかとの考え、さらに、親油性置換基の導入による高い脳移行性と MGMT 不活化活性を兼備した θ -ベンジルグアニン誘導体 **7-10** を新たに設計した (図 5)。なお、Wager らにより提案された CNS 系に対して臨床応用までを考慮した最適候補薬選択のための指標である物理化学的パラメーターに基づく CNS MPO 値^⑥を、これらの設計分子に対して算出したところ、4.1 が得られ、分子構造の妥当性が評価された。

まずは、 θ -BG の脳移行性の向上に対する 9 位 NH への脂溶性基置換の効果を評価するために、 ^{11}C **5** の合成を参考にして、 θ -BG 誘導体のスズ化合物標識用前駆体を合成し、続いて、放射性ヨウ化 ^{11}C メチルを用いた高速クロスカップリング反応により ^{11}C 標識体を合成、最後に、実験用ラットを用いた ^{11}C 標識体の PET 動態撮像により脳内移行性を評価する。

(2) グリオーマの形成と悪性化に関わる異常代謝に働く mIDH1 をイメージングするための α KG の PET プローブの設計

α KG の脳透過性 PET プローブは、酸性の高い 1 位カルボン酸を保護してエステルプロドラッグ体 (^{11}C **11**, ^{18}F **11**) として設計した (図 6)。 ^{11}C **11**, ^{18}F **11** は、静脈内投与後、脳に取り込

まれたのち、脳内で加水分解をうけて α KG 誘導体 ($[^{11}\text{C}]$ **12**, $[^{18}\text{F}]$ **12**) が再生すると考えた。プロドラッグ体の $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ 標識化は、 α KG の混合エステル体 **14** のカルボニル α 位 (3 位) の高い酸性度に着目し、別途、抗炎症剤 PET プローブの合成研究で開発された塩基性条件での高速 C - $[^{11}\text{C}]$ メチル化反応⁷⁾ の応用した金属エノラート **15** が介在する $[^{11}\text{C}]$ メチル化剤あるいは $[^{18}\text{F}]$ 求電子的フッ素化剤の捕獲により行うことを計画した (図 7)。

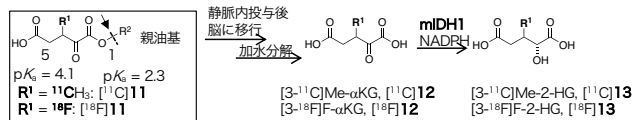


図6 標識化 α KGエステルプロドラッグのPETプローブの想定する生体内での代謝機構。

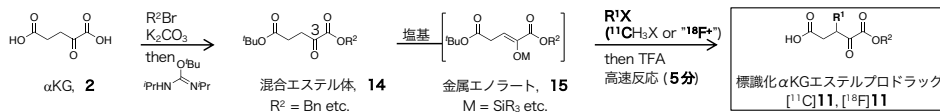


図7 α KG金属エノラートを介した高速 C - $[^{11}\text{C}]$ メチル化/ ^{18}F 化による α KGエステルプロドラッグPETプローブの合成。

4. 研究成果

(1) 設計した β -BG の ^{11}C 標識したプロドラッグ $[^{11}\text{C}]$ **6** は図 8 により合成した。具体的には、 O -[3-(トリブチルスタニル)]ベンジルグアニン³⁾を、エタノール中、当量の *tert*-ブトキシカリウムで処理したのち、クロロギ酸ベンジルを作用させることによりグアニン構造の 9 位 NH 選択的に Z 保護を行なった (**17**, 75%)。17 を標識用前駆体とし、ヨウ化 $[^{11}\text{C}]$ メチルを使用して NMP 溶媒中 $[\text{Pd}_2(\text{dba})_3]/\text{P}(\text{o-tolyl})_3/\text{CuCl}/\text{K}_2\text{CO}_3$ (モル比 1:10:3.6:10) 条件による高速 C - $[^{11}\text{C}]$ メチル化反応により、総放射能 2.26 GBq, 比放射能 145 GBq/ μmol , 放射化学的純度 >99% で合成し、小動物 PET イメージング実験を行った。その結果, $[^{11}\text{C}]m\text{MeBG-Z}$ ($[^{11}\text{C}]$ **6**) は血中代謝物分析により、投与後 30 分後には 75% が加水分解され (図 9), かなり代謝不安定であることが分かり、本目的の達成には不十分な結果となったが、未代謝体 $[^{11}\text{C}]$ **6** に関しては、もとの $[^{11}\text{C}]m\text{MeBG}$ ($[^{11}\text{C}]$ **5**) と比べてより高い脳移行性が観察され、極性部位 (グアニン 9 位) への親油性置換基の導入は脳移行性の向上に有効であることがわかり、本研究によって、PET プローブの高い脳移行性の賦活のための新たな分子設計の方向性が暗示された。

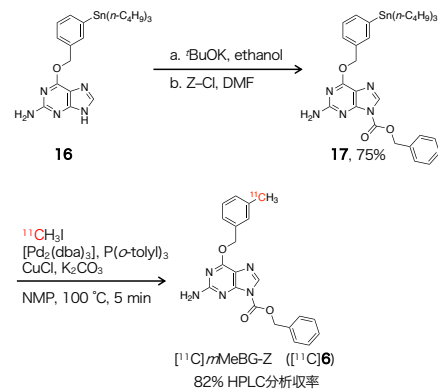


図8 ^{11}C 標識 O -ベンジルグアニンエステルプロドラッグの合成。

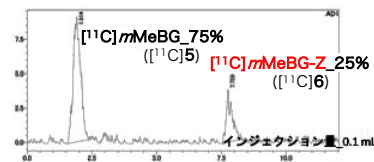


図9 $[^{11}\text{C}]$ **6**ラット静脈内投与30分後の血漿ラジオHPLC分析結果。

(2) 高い脳移行性と MGMT 不活化活性を兼備した O -ベンジルグアニン誘導体 **7-10** のうち、*p*-トリフルオロメチルベンジル誘導体 (**8**, 非放射化体) は、2-アミノ-6-クロロプリン (**18**) を出発原料にして、4-(トリフルオロメチル)ベンジルブロミドによるアルキル化により得られる位

置異性体から目的の9位置換体 **19** を分離・精製し、つづく3-メチルベンジルアルコキシドによる求核的置換反応により合成した (図10)。加えて、設計したベンゾイル *O*-BG 誘導体 **9** および **10** は、塩化ベンゾイル/トリエチルアミン条件下でグアニン9位をベンゾイル化し、順に31%および39%収率で合成した (図11)。今後、遺伝子プロモーター部位のMGMTによる脱メチル化に対応したMGMT不活化の *in vitro* 試験評価を行い、最適誘導体の¹¹C 標識化および脳 PET イメージング研究を行いたい。

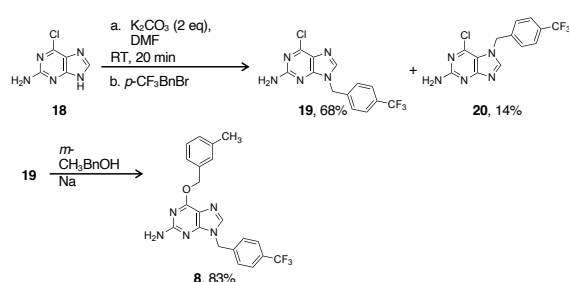


図10 *O*-ベンジルグアニン誘導体 (非放射化体) **8** の合成。

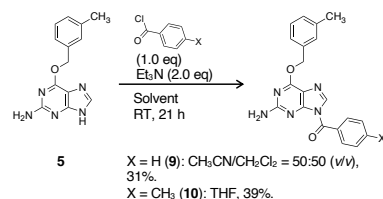


図11 ベンゾイル *O*-BG誘導体**9**および**10**の合成。

(3) 3-メチル- α KG(**12**, 非放射化体)は、クロトン酸メチルとニトロ酢酸メチルとの Michael 付加, つづく Neff 反応により合成した^⑧。標識用前駆体である混合エステルのエノールシリルエーテル体 **23** は、安息香酸ナトリウムを塩基とした α KG の1位カルボン酸の選択的ベンジル化により **21** を44%収率で得たのち、*O*-*tert*-ブチル-*N,N*-ジイソプロピルイソ尿素による5位カルボン酸の *tert*-ブチル化により α KG の混合エステル体 **22** の合成 (70%) を経て、リチウムジイソプロピルアミドにより生じるリチウムエノラートのトリフェニルクロロシランによる捕獲により合成した (16%, 図12)。今後は、実際の PET プローブ合成で、極微量に生成されるヨウ化[¹¹C]メチル(約 100 nmol)

の使用を念頭に置き、メチル化剤/捕捉基質のモル比を 1:40 (大過剰) に設定し、3-メチル- α KG エステルプロドラッグ **11** の収率が 90%以上、かつ 5

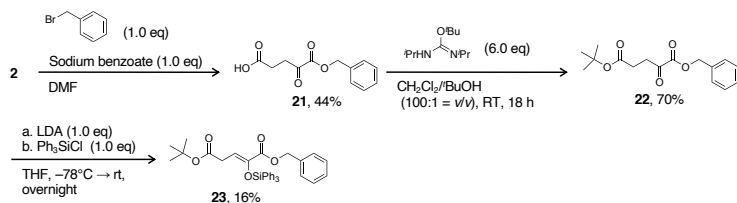


図12 標識用前駆体 *tert*-ブチル, ベンジルエステル α KG エノールシリルエーテル **23** の合成。

分で反応が完結する反応条件を探索したい。なお、予備的ではあるが、温和な塩基性条件下で発生するエノラート活性種の高速度[¹¹C]メチル化および ¹⁸F 化法の開発に着手し、有効な手がかりを得ている。並行して、*in vitro* 系でメチル化誘導体の mIDH1 による還元活性評価を行い、mIDH1 の基質になりうることを示唆され、PET プローブの分子構造の設計指針の有効性が示唆された。

<引用文献>

- ① Kaina, B., et al., *DNA Repair*. **2007**, *6*, 1079-1099.
- ② Dang, L., et al., *Nature* **2009**, *462*, 739.
- ③ Koyama, H., Natsume, A., Suzuki, M., et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1892-1896.
- ④ Thomas et al., *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2326.
- ⑤ Moschel et al., *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4486.
- ⑥ Wager et al., *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 435.
- ⑦ Tahashima-Hirano et al., *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4250.
- ⑧ Milne C., et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11250.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	古山 浩子 (Koyama Hiroko) (50402160)	岐阜大学・工学部・准教授 (13701)	
研究分担者	木村 泰之 (Kimura Yasuyuki) (20423171)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 認知症先進医療開発センター・副部長 (83903)	
研究分担者	夏目 敦至 (Natsume Atsushi) (30362255)	名古屋大学・未来社会創造機構・特任教授 (13901)	

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