

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：17301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21791180
 研究課題名（和文）：腫瘍選択的な核医学診断の実現を目指した新規 Survivin イメージング剤の開発
 研究課題名（英文）：Development of survivin imaging agents for the realization of tumor specific nuclear medicine diagnosis
 研究代表者
 淵上 剛志 (FUCHIGAMI TAKESHI)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号 30432206

研究成果の概要（和文）：

本研究では、腫瘍選択的な核医学診断の実現を目指し、Survivinを標的とした新規放射性薬剤の開発を目的とした。そこで、Survivin蛋白のダイマー形成部位へ高親和性を示す 4,6-ジアリールピリジノン誘導体をリード化合物として、種々の誘導体の合成を行った。これらの新規リガンドは、Survivinが高発現しているがん細胞への良好な膜透過性を示し、さらにSurvivin蛋白発現部位と類似した結合挙動を示した。また、¹²⁵I標識 4,6-ジアリールピリジノン誘導体を合成し、正常マウスを用いた生体内分布評価を行ったところ、適度な血中滞留性と正常組織からの速やかな消失が確認された。従って、本研究課題にて開発した新規 4,6-ジアリールピリジノン誘導体は、Survivinを標的とした腫瘍イメージング剤としての可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we aimed to develop survivin targeting radiopharmaceuticals for the realization of tumor specific nuclear medicine diagnosis. Because 4,6-diaryl pyridinones have been reported to possess high affinity for dimer site of survivin protein, several derivatives were synthesized and evaluated. In the binding assay using the cancer cells with high expression of survivin, these 4,6-diaryl pyridinone derivatives showed high membrane permeability and similar accumulation pattern with survivin expression site. Furthermore *in vivo* biodistribution study revealed that [¹²⁵I]4,6-diaryl pyridinones showed moderate blood retention and rapid clearance by normal tissues. The results of this study illustrate that these 4,6-diaryl pyridinones might be promising tumor imaging agents for survivin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：Survivin、放射性医薬品、核医学、腫瘍

1. 研究開始当初の背景

今日における腫瘍の核医学診断では、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ を用いた PET や $[^{67}\text{Ga}]\text{クエン酸ガリウム}$ 、 $[^{201}\text{Tl}]\text{塩化タリウム}$ を用いた SPECT が主流であるが、これらの画像診断法では正常部位への生理的集積があるため、腫瘍の正確な診断が困難になることがしばしば問題となる。そこで、より高精度な腫瘍の診断を行うため、腫瘍選択的な画像化ができる核医学イメージング薬剤の開発が望まれている。

Survivin は抗アポトーシス蛋白である IAP family の一つであり、抗アポトーシス作用と細胞周期の促進に深く関与しており、多くの癌細胞に高発現している一方、正常細胞ではほとんど発現が見られないことが分かっている。また、Survivin は放射線療法や化学療法などに抵抗性を示す原因の一つと考えられており、Survivin が高いレベルで存在している癌患者の予後は悪いことが報告されている。このため、現在新たな抗癌剤の標的蛋白として注目を集めている。近年、Survivin を標的としたアンチセンス治療薬が開発され、動物を用いた評価にてその有用性が認められており、現在臨床試験へと進んでいる (Call, *Lancet Oncol.*, 2008)。従って、Survivin を標的とした核医学イメージング剤は腫瘍選択的な診断に有用であるのみならず、治療薬選択等の治療計画の指針としても大変有用であると考えられる。これまでに Survivin の mRNA を標的とした SPECT イメージング剤としての展開を目的とした $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識アンチセンスオリゴヌクレオチドの開発が報告されている (Wang, *Nucl. Med. Biol.*, 2007)。しかしながら、これらのアンチセンスイメージング剤は、代謝安定性や核内への輸送に問題点が残る。また、機能している蛋白を直接的には描出できない。

2. 研究の目的

上記背景の下、本研究ではこれまでのアンチセンス法とは違うアプローチとして、核医学的手法にて Survivin 蛋白を特異的に画像化できる低分子イメージング剤の開発を目指すこととした。

Survivin は図 1 のリボンダイアグラムに示すように、二量体を形成することが報告されている。図中に青で示されている Peptide binding site は、他の IAP と相同性が高く、Survivin に選択的に結合するリガンドは未だ開発されていない。一方、オレンジで示された Dimer site は、低分子化合物が結合できる Cavity が存在しており、近年、結合親和性を示す低分子化合物がいくつか報告された (Wendt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007)。この部位の詳細な機能は未だはつき

りとは明らかにされておらず、抗癌剤の標的となるかは定かではないが、他の IAP には存在しない Survivin 固有の部位であるため、Survivin を特異的に認識する腫瘍イメージング剤の標的としての可能性は大いに期待ができるものと考えられる。

そこで本研究では、Survivin に対して高親和性を示す 4,6-ジアリールピリジノン誘導体(図 2) を母体化合物として、新規 Survivin イメージング剤 (図 3) の開発を目指した。

図 1 Survivin のリガンド結合部位

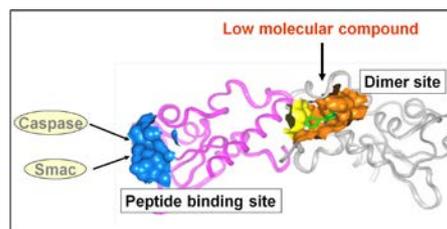


図 2 高親和性 Survivin リガンド (4,6-ジアリールピリジノン誘導体)

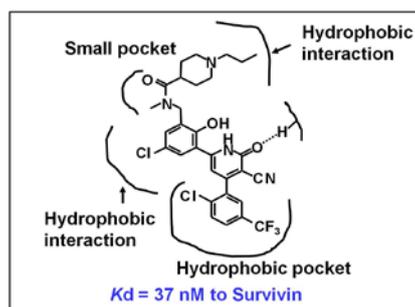
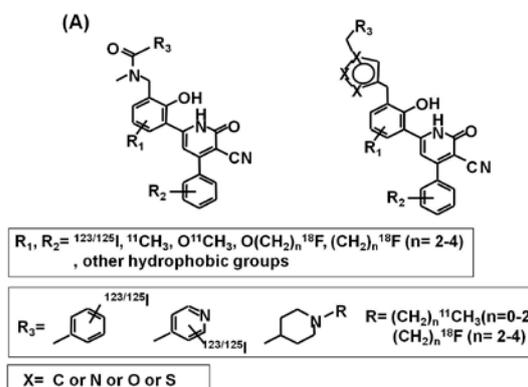


図 3 新規 Survivin イメージング剤の設計



3. 研究の方法

(1) 4,6-ジアリールピリジノン誘導体の合成は、Wendt らによって報告されているが

(Wendt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007)、OH基のオルト位へホルミル基を導入する反応で、特殊な装置を使用する一酸化炭素を使用しているため、まず初めに、より簡便な合成法の確立を行った。

(2) 4,6-ジアリールピリジノン誘導体の細胞膜透過性及び集積の局在を評価するため、HeLa細胞を用いた取り込み評価を行った。細胞の蛍光イメージングは、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-8100(KEYENCE)及び共焦点レーザー顕微鏡{LSM 710 (Carl Zeiss 製)}を用いて行った。

(3) ^{125}I 標識 4,6-ジアリールピリジノン誘導体は、定法に従い ^{125}I NaIと酸化剤を用いて合成を行った。得られた ^{125}I 標識体に関して、正常マウスを用いた生体内分布評価を行った。

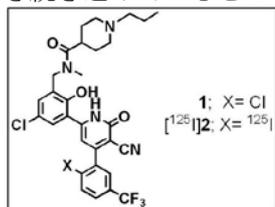
4. 研究成果

(1) 4,6-Diarylpiridone 誘導体の合成法検討

設計した分子プローブの合成において、6位アリール基の3'位に種々の置換基を有するアミド基を導入する際に、従来までの手法では、ピリジノン骨格を構築後、3'位にアルデヒド基を導入する際に、一酸化炭素を使用する必要があるため、より簡便な合成法を経由して開発を進めた。

まず初めに、5'位にハロゲン原子を導入した2'-ヒドロキシアセトフェノン誘導体を出発物質として、ピリジノン骨格を構築した後、種々の手法にてオルト位へのホルミル化を行ったところ、Vilsmeier-Haack 反応、Reimer-Tiemann 反応、Duff 反応のいずれの反応においても目的物は得られなかった。

そこで、5'-クロロ-2'-ヒドロキシ-3'-メチルアセトフェノンを合成した後、メチル基のブロム化、メチルアミンを反応させることにより3'位にメチルアミノ基を導入した。その後、別途合成したピペリジんカルボン酸誘導体と反応させアミド結合を形成させ、アセチル基とベンズアルデヒド誘導体の環化反応を行い、2-ピペリジノン環を構築した後、メトキシ基を脱保護することによって目的化合物である、4,6-ジアリールピリジノン誘導体(1)の合成に成功した。また、同様の合成手法にて、非放射性ヨウ素置換体(2)を合成した。さらに、図3に記した種々の誘導体の合成を現在も引き続き進めているところである。



(2) 4,6-ジアリールピリジノン誘導体の HeLa 細胞を用いた蛍光イメージング評価

化合物 1 の HeLa 細胞への取り込み評価を行ったところ、濃度依存的に化合物 1 の細胞内への集積が上昇することが確認された (図 5)。また、化合物 2 についても同様の結果が得られた。従って、4,6-ジアリールピリジノン誘導体は、良好な膜透過性を備えていることが示唆された。また、HeLa 細胞に対する化合物 1 と Survivin 抗体の二重染色を行ったところ、化合物 1 は Survivin 蛋白の存在部位と一致した集積を示し、Survivin への結合性を有することが示された。また、これらの化合物は、細胞内においてその蛍光特性が変化することも明らかになった。従って、4,6-ジアリールピリジノン誘導体は、Survivin を標的とした核医学診断薬剤のみならず、蛍光イメージング剤としても有用であることが示唆された。

図 5 化合物 1 の膜透過性評価

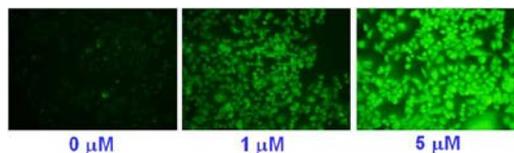
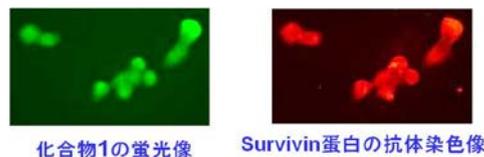


図 6 化合物 1 と Survivin 抗体の二重染色

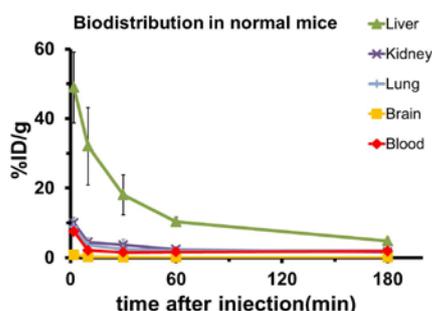


(3) ^{125}I 標識合成及び *in vivo* 評価

^{125}I 標識合成は、トリメチルスズ前駆体と ^{125}I NaI をクロラミン T 存在下に反応させることにより行い、 ^{125}I 2 の合成に成功した。

続いて、正常マウス (ddY mouse, male, 5W) を用いて、 ^{125}I 2 の生体内分布評価を行ったところ、適度な血中滞留性があることが明らかになった。また、投与初期より肝臓への高集積が見られたが、180 分後には血液と同レベルまで低下した。さらに、脳移行性は非常に低いことも明らかになった。従って、 ^{125}I 2 は、脳腫瘍を含めた FDG-PET にて診断が困難ながん診断薬剤としての展開の可能性も見出された。今後は腫瘍モデルマウスを用いた *in vivo* イメージング評価を遂行していく予定である。

図 7 ^{125}I 2 のマウス生体内分布評価



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 14 件, すべて査読有り)

- S. Yoshida, M. Haratake, T. Fuchigami, M. Nakayama; Characterization of Selenium Species in Extract from Niboshi (a Processed Japanese Anchovy).; *Chem Pharm Bull.* **60**, 348-353 (2012).
- S. Yoshida, M. Haratake, T. Fuchigami, M. Nakayama : Selenium in Seafood Materials.; *J. Health Sci.*, **53**, 215-224 (2011).
- T. Fuchigami, M. Haratake, Y. Magata, T. Haradahira, M. Nakayama : Synthesis and characterization of [¹²⁵I]2-Iodo-N-[(S)-{(S)-1-methylpiperidin-2-yl}(phenyl)methyl]3-trifluoromethylbenzamide as novel imaging probe for glycine transporter 1.; *Bioorg Med Chem.*, **19**, 6245-6253 (2011).
- H. Watanabe, M. Ono, H. Kimura, S. Kagawa, R. Nishii, T. Fuchigami, M. Haratake, M. Nakayama, H. Saji : A dual fluorinated and iodinated radiotracer for PET and SPECT imaging of β -amyloid plaques in the brain.; *Bioorg Med Chem Lett.*, **21**, 6519-6522 (2011).
- M. Haratake, K. Koga, M. Inoue, T. Fuchigami, M. Nakayama : Absorption and retention characteristics of selenium in dorsal root ganglion neurons.; *Metallomics*, **3**, 1019-1026 (2011).
- M. Haratake, T. Sakano, T. Fuchigami, M. Nakayama; Thiol-targeted introduction of selenocysteine to polypeptides for synthesis of glutathione peroxidase mimics. ; *Metallomics*, **3**, 702-709 (2011).
- T. Fuchigami, H. Yamaguchi, M. Ogawa, L. Biao, M. Nakayama, M. Haratake, Y. Magata, Synthesis and biological evaluation of radio-iodinated benzimidazoles as SPECT imaging agents for NR2B subtype of NMDA receptor.; *Bioorg Med Chem.*, **18**, 7497-7506 (2010).
- M. Ono, Y. Fuchi, T. Fuchigami, N. Kobashi, H. Kimura, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama; Novel benzofurans with ^{99m}Tc complexes as probes for imaging cerebral β -amyloid plaques using single photon emission computed tomography.; *ACS Med Chem Lett.*, **1**, 443-447, (2010).
- M. Ono, R. Ikeoka, H. Watanabe, H. Kimura, T. Fuchigami, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama; ^{99m}Tc/Re complexes based on flavone and aurone as SPECT probes for imaging cerebral β -amyloid plaques.; *Bioorg Med Chem Lett.*, **20**, 5743-5748 (2010).
- M. Ono, R. Ikeoka, H. Watanabe, H. Kimura, T. Fuchigami, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama; Synthesis and evaluation of novel chalcone derivatives with ^{99m}Tc/Re complexes as potential probes for detection of β -amyloid plaques.; *ACS Chem Neurosci.*, **1**, 598-607 (2010).
- S. Osei-Asante, M. Haratake, T. Fuchigami, M. Nakayama; One-step direct reconstitution of biomembranes onto cationic organic polymer bead supports.; *J Colloid Interface Sci.*, **351**, 96-101 (2010).
- S. Osei-Asante, M. Haratake, T. Fuchigami, M. Nakayama; An ionic polymer bead-supported lipid system using naturally occurring phospholipids.; *J Bioact Compat Polym.*, **25**, 455-464 (2010).
- M. Ogawa, S. Nishiyama, H. Tsukada, K. Hatano, T. Fuchigami, H. Yamaguchi, Y. Matsushima, K. Ito, Y. Magata; Synthesis and evaluation of new imaging agent for central nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subtype.; *Nucl Med Biol.*, **37**, 347-355, (2010).
- T. Fuchigami, T. Haradahira, N. Fujimoto, Y. Nojiri, T. Mukai, F. Yamamoto, T. Okauchi, J. Maeda, K. Suzuki, T. Suhara, H. Yamaguchi, M. Ogawa, Y. Magata, M. Maeda; Development of N-[¹¹C]methylamino 4-hydroxy-2(1H)-quinolone derivatives as PET radioligands for the

glycine-binding site of NMDA receptors.; *Bioorg Med Chem.*, **17**, 5665–5675, (2009).

[学会発表] (計 4 件)

1. T. Fuchigami, A. Takano, Gulyas, Balazs, Jia Zhisheng, Finnema, Sjoerd, J., Andersson Jan D., Y. Magata, M. Haratake, M. Nakayama, and Halldin Christer : Synthesis and preliminary evaluation of a C-11 labeled *N*-(phenyl(piperidin-2-yl)methyl) benzamide derivative for visualization of glycine transporter 1 with PET. The 19th International Symposium on Radiopharmaceutical Science. 2011 年 8 月 (アムステルダム、オランダ)
2. 淵上剛志, 原武衛, 間賀田泰寛, 原田平輝志, 中山守雄 : Glycine Transporter 1 の機能イメージングを目的とした 125I 標識 SSR-504734 誘導体の開発. 第 50 回日本核医学会学術総会, 2010 年 11 月 (埼玉)
3. 淵上 剛志, 山口 博司, 小杉 睦, 楽 ひょう, 小川 美香子, 間賀田 泰寛; NMDA 受容体 NR2B サブタイプの機能イメージングを目的とした放射性ヨウ素標識ベンズイミダゾール誘導体の開発; 第 49 回日本核医学会学術総会, 2009 年 10 月 (旭川)
4. T. Fuchigami, H. Yamaguchi, M. Kosugi, L. Biao, M. Ogawa, Y. Magata; Synthesis and biological evaluation of radioiodinated benzimidazole derivative for SPECT imaging of NMDA receptor NR2B subtype; 2009 World Molecular Imaging Congress, 2009 年 9 月 (モントリオール、カナダ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : ^{68}Ge - ^{68}Ga ジェネレータ用の Ge 吸着剤
発明者 : 中山守雄、原武 衛、淵上剛志、岩竹真弓
権利者 : 長崎大学
種類 : 特願
番号 : 2011-232213
出願年月日 : 2011(H23)年 10 月 21 日
国内外の別 : 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/hygiene/index-j.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

淵上 剛志 (Fuchigami Takeshi)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号 30432206