

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 30 日現在

機関番号：82110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591829

研究課題名(和文) テクネチウムに替わる銅標識 PET 薬剤の創製

研究課題名(英文) Synthesis of novel copper-labeled agents for PET imaging as an alternative to technetium radiopharmaceuticals

研究代表者

須郷 由美 (SUGO, Yumi)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究副主幹

研究者番号：90354836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円、(間接経費) 1,140,000 円

研究成果の概要(和文)：国内外での核医学診断に最も多く用いられているテクネチウム-99m (Tc-99m) の親核種であるモリブデン-99 (Mo-99) は、現在我が国では100%輸入に頼っておりその安定した供給が危惧されている。本研究では、Tc-99mの供給不足による医療現場での深刻な事態を回避すべく、Tc-99mに替わり得る核種として医療用小型サイクロトロンでも製造可能な銅-64 (Cu-64) を標識した新規PETイメージング薬剤の合成研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Technetium-99m (Tc-99m) is most commonly used as diagnostic radiopharmaceuticals. Tc-99m is generated by decay of molybdenum-99 (Mo-99), of which supply depends fully on the import from foreign countries. Recently, the supply shortage is the serious problem in the hospital. Copper-64 (Cu-64) is a useful radionuclide in nuclear medicine, and can be produced by the cyclotron using (p,n) nuclear reaction from nickel-64 (Ni-64). In this study, we designed and synthesized some novel Cu-64 labeled agents for positron emission tomography (PET) imaging as an alternative to the Tc-99m radiopharmaceuticals.

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：放射性同位元素 ポジトロン Cu-64 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

シングルフォトン放出核種のテクネチウム-99m (^{99m}Tc 、半減期 6.0 時間) は、モリブデン-99 (^{99}Mo 、半減期 65.9 時間) を親核種とした $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ジェネレータによって簡単に製造できることから、国内外での核医学診断に最も多く用いられている。原料となる ^{99}Mo は、高濃縮ウランの核分裂反応により製造され、我が国では現在 100% 輸入に頼っている。近年、供給国における原子炉の度重なるトラブルにより ^{99}Mo の安定した供給が危惧されている。

臨床で用いられている ^{99m}Tc 製剤によるシングルフォトン断層撮影法 (SPECT) 検査による診断部位は、心筋血流、脳血流、骨、腎臓など多岐にわたる。これは、Tc が多様な化学形をとることから、様々な配位子と結合するためである。医療現場では、 ^{99m}Tc 製剤が供給不足に陥った際、別の放射性核種を用いた核医学検査や CT など別の検査へと切り替えることで対応せざるを得ない。

2008 年 7 月の日本学術会議による「我が国における放射性同位元素 (RI) の安定供給体制について」の提言にはじまり、2010 年 10 月には「 $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ の安定供給のための官民検討会」が設けられ、国内の研究用原子炉や加速器を利用して国産の ^{99}Mo を製造する計画が進められている。

我々は、 ^{99}Mo 国産化計画とは異なる視点から ^{99m}Tc 供給問題を解決し新たな展開を図るべく、 ^{99m}Tc に替わる新たな核種を用いた核医学診断薬の創製に関する研究を本研究課題で提案した。

2. 研究の目的

^{99m}Tc 供給不足による医療現場での深刻な事態を回避すべく、 ^{99}Mo の国産化計画とは全く違った切り口から代替製剤を開発することが本研究の目標である。代替核種としては、 ^{99m}Tc を用いる SPECT 検査よりも感度や定量性の点で優れたポジトロン断層撮影法 (PET) による診断が可能で、半減期が比較的長くデリバリー輸送も可能なポジトロン放出核種である銅-64 (^{64}Cu 、半減期 12.7 時間) を選択した。 ^{64}Cu は、安定同位体のニッケル-64 (^{64}Ni) を原料として製造できるので、海外に依存せず国内での生産が十分可能であるのに加え、製薬会社からの供給だけでなく、病院内に設置された小型サイクロトロンでも製造可能である。さらには、治療に適した線を放出する ^{67}Cu (半減期 61.8 時間) の標識薬剤開発への展開も多いに期待できる。

3. 研究の方法

分子プローブの設計・有機合成：既に体内動態が明らかで臨床利用されているテクネチウム製剤の構造をベースとして、錯体化学的な見地から分子設計を行い、新規な ^{64}Cu 標

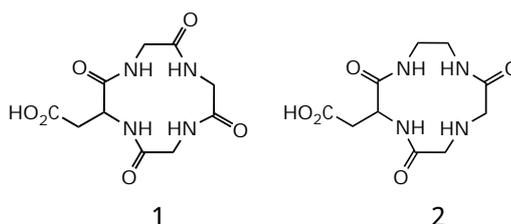
識分子プローブの合成実験を行った。また、別のアプローチとして鎖状ペプチドに銅と安定な錯体を形成するキレーターを導入した新規分子プローブの合成も並行して行った。

^{64}Cu の製造・標識化：原子力機構高崎量子応用研究所イオン照射研究施設において、 $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$ 反応を利用した ^{64}Cu の製造実験を行うとともに、合成により得られた分子プローブへの標識実験を行った。

in vitro 実験：生理食塩水および血漿中の標識化合物の安定性を、液体クロマトグラフィーにより分析した。

4. 研究成果

まず、銅と安定なキレート形成する新規環状ペプチド化合物を数種類設計し、有機合成実験を行った。その一例として、メルカプトアセチルグリシルグリシルグリシン (MAG3) のペプチド骨格とサイクレンのテトラアザ環をあわせもつ新規環状ペプチド化合物として設計した 3-カルボキシメチル-2,5,8,11-テトラオキソ-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン (1) および 3-カルボキシメチル-2,5,9-トリオキソ-1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン (2) の構造を以下に示す。MAG3 に共通して 1 つのカルボキシル基と 3 つ以上のアミド基をそれぞれ配置させた。



4 つのアミノ酸から構成される化合物 1 は、3 つのグリシンとアスパラギン酸を順にペプチド結合させた後に環化させることで合成した。化合物 2 は、アスパラギン酸、エチレンジアミン、無水イミノ二酢酸から合成した鎖状化合物を環化させて得ることができた。

特に構造的な制約から鎖状ペプチドの環化における反応性が低かったことから、各種の縮合剤を用いて質量分析計により反応を追跡しながら反応条件の最適化を試みた。その結果、ジメチルホルムアミド (DMF) 中ジイソプロピルエチルアミン共存下で、鎖状ペプチドとペンタフルオロフェニルジフェニルホスフィネートをそれぞれ DMF で十分に希釈した溶液をマイクロシリンジポンプでゆっくりと混和することで、図 1 に示す環化反応を室温のもと効率よく進行させることができた。

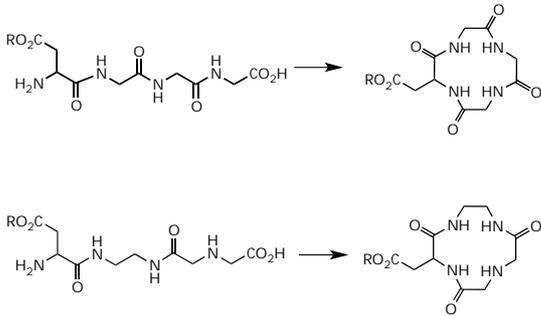
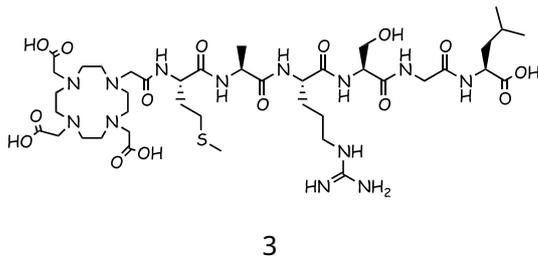


図1 環化反応(R:シクロヘキシル基またはベンジル基)

また、別のアプローチとしてヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) に親和性のあるペプチド H-Met-Ala-Arg-Ser-Gly-Leu-OH (MARSGL) を ^{64}Cu で標識するためのリガンド部位として、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸 (DOTA) を導入した二官能性化合物 DOTA-MARSGL (3) の合成実験も行った。固相合成法により伸長した MAR(Pbf)S(*t*-Bu)GL-Trt(2-Cl)樹脂の N 末端に DOTA-トリス (*t*-ブチルエステル) を縮合させた後、脱保護および樹脂からの切り出しを同時に行うことで、化合物 3 を高収率で得ることができた。



^{64}Cu の製造実験では、(*p*, *n*) 反応を利用して、 ^{64}Ni で濃縮された酸化ニッケルをターゲットとし、AVF サイクロトロンから生じる約 10 MeV の入射エネルギーをもつプロトンビームを電流値 5 μA で一定時間照射した。照射後のターゲットを塩酸水溶液に溶解した後、キレート交換樹脂を用いた分離精製を行い、高純度の無担体 ^{64}Cu を得ることができた。

合成した分子プローブへの ^{64}Cu 標識実験では、温度、溶媒、反応時間などを変化させて反応条件の最適化を行った。標識化合物の同定は、非放射性的の CuCl_2 を用いて合成した非放射性的化合物の薄層クロマトグラフィー (TLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) との比較により行った。

その一例として、図 2 に非放射性 Cu-DOTA-MARSGL の TLC および HPLC クロマトグラムを示す。化合物の UV 吸収が認められなかったため、ここでは液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC/MS) を用いて測定したトータルイオン強度を HPLC クロマトグラムの縦軸とした。図 3 には、放射性的の $^{64}\text{CuCl}_2$ を用いた標識反応前後の TLC および HPLC クロマトグラムを示す。ここではガンマ線検出器により測定した放射エネルギーを HPLC クロマトグラムの縦軸とした。

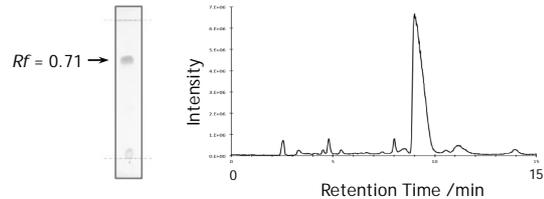


図2 非放射性 Cu-DOTA-MARSGL の TLC、HPLC クロマトグラム

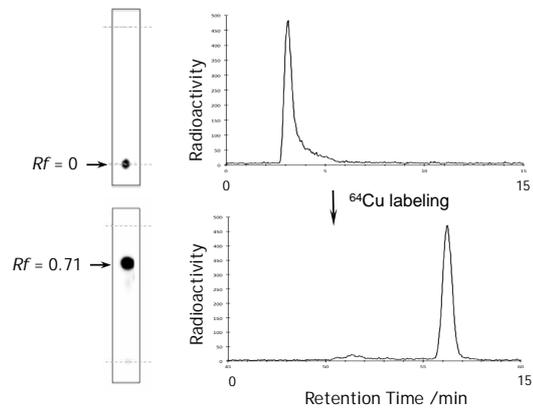


図3 $^{64}\text{CuCl}_2$ および ^{64}Cu -DOTA-MARSGL の TLC、HPLC クロマトグラム

図 3 から、標識反応前後で明らかに TLC スポットと HPLC ピークの位置が変化したことから、ほぼ定量的に標識反応が進行したことがわかる。また、下段に示す標識反応後の分析結果と、図 2 に示す非放射性的の Cu-DOTA-MARSGL の分析結果とが一致したことから、目的とする ^{64}Cu -DOTA-MARSGL が得られたことが明らかとなった。

次に、得られた標識化合物の *in vitro* での安定性を、HPLC を用いて分析した結果、生理食塩水や緩衝液中では長時間経過後でも安定であったのに対し、マウスおよびヒトの血漿中では、 ^{64}Cu は遊離しないものの血漿中に含まれる加水分解酵素の働きで特定のペプチド部位が選択的に切断されてしまうことを、非放射性的化合物の LC/MS 分析から明ら

かにした。薬剤としての有用性を評価する上で重要な条件でもある生体内での安定性をより向上させるためには、生体内で代謝されにくいD体アミノ酸や保護基を導入するとともに、環状構造さらには架橋構造をとることが重要であると考えられる。

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)

Yumi Sugo, Ichiro Sasaki, Shigeki Watanabe, Yasuhiro Ohshima, and Noriko S. Ishioka; Synthesis and *in vitro* Evaluation of ^{64}Cu -Labeled Peptide for Tumor Imaging, *Peptide Science* 2013, 355-358 (2014). 査読有

[学会発表](計4件)

Yumi Sugo, Ichiro Sasaki, Shigeki Watanabe, Yasuhiro Ohshima, and Noriko S. Ishioka; Synthesis and *in vitro* Evaluation of ^{64}Cu -Labeled Peptide for Tumor Imaging, APIPS 2013 (4th Asia-Pacific International Peptide Symposium), Nov. 6-8, 2013, Osaka, Japan.

Yumi Sugo, Ichiro Sasaki, Shigeki Watanabe, Yasuhiro Ohshima, and Noriko S. Ishioka; Synthesis of ^{64}Cu -Labeled MARSGL Peptide as an Imaging Probe for HER2/neu Overexpressing Tumors, APSORC'13 (5th Asia-Pacific Symposium on Radiochemistry), Sept. 22-27, 2013, Kanazawa, Japan.

6. 研究組織

(1)研究代表者

須郷 由美 (SUGO, Yumi)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究副主幹
研究者番号：90354836

(2)研究分担者

渡辺 茂樹 (WATANABE, Shigeki)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・原子力科学研究部門 量子ビーム応用研究センター・研究員
研究者番号：10450305