

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249073

研究課題名(和文) 抗がん剤耐性分子を標的とする核酸医薬のロボティック送達とイメージングの統合医療

研究課題名(英文) Multimodal medical strategies by means of robotic technology according with molecular target imaging

研究代表者

若林 俊彦 (Wakabayashi, Toshihiko)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50220835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：難治性脳神経疾患、特に悪性脳腫瘍に対してナノテクノロジーを駆使した様々な基礎及び臨床研究が試みられている。我々は、以前に、リポソームにインターフェロンベータ遺伝子を包埋し、定位的なロボティクスを駆使して、極めて精度の高いナビゲーション下に悪性脳腫瘍の遺伝子治療の臨床応用を2000年に実施した。今回の研究は、リポソームに包埋する因子を替えることで、脳や脊髄の病変部位への分子標的診断法及び治療法の開発を手掛けている。今年度は、脳腫瘍に誘導される各種遺伝子異常が、そのように構築されて腫瘍進展や悪性転化を進めるかのメカニズムを解明し、その分子標的因子の一部を解明し、核酸医薬療法の応用が広がりつつある。

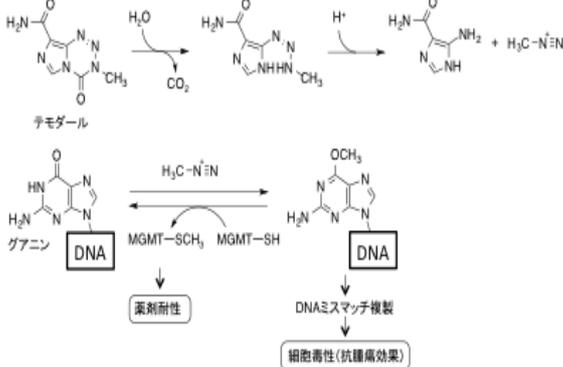
研究成果の概要(英文)：We will describe the development of nanotechnology for treatment against several progressive neuronal diseases towards clinical applications, especially for malignant brain tumors which is still fatal diseases. We have developed gene therapy for glioblastoma which is most aggressive and progressive tumors, using with interferon-beta genes entrapped with nano-liposomes for clinical trial since 2000. Nowadays, numerous diseases will be a candidate for the treatment of cell-therapy, immunotherapy, and regenerative therapy using with several kind of factors, for example, siRNA, toxin, immunoadjuvant materials, entrapped with nano-particles as a targeted materials by stereotactic robotics for the brain and spinal cord. We have now gotten several new factors expressing on malignant brain tumors, especially, astrocytoma, and using with such a molecular targeting, we will develop new treatment strategies by tumor specific attack as a new tools for fatal diseases to prolong survival life.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳神経疾患 脳腫瘍 分子標的 核酸医薬 ナノテクノロジー ロボティクス 創薬 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍において治療予後因子となっている代表的なものには、O⁶-methylguanine DNA-methyltransferase (MGMT)がある。これは標準治療薬であるアルキル化抗がん剤の効果を減弱するため、その発現は予後不良因子となっており (New England Journal of Medicine, 2005) 治療成績向上の為の主たる標的分子として注目されている。



アルキル化抗がん剤(テモダール)の生体内でのメチル化の生成と抗癌剤耐性に関する脱メチル化酵素の働き

さらにこれまでの基盤研究「新規抗腫瘍効果判定を目指した分子標的イメージング治療薬の開発と臨床応用」において、我々が開発中の分子間相互作用解析テクノロジーおよび HPLC-質量分析を用いて、高速炭素-炭素結合技術を利用した合成化合物を選定し、診断に適用可能な PET プローブを開発して、MGMT を非侵襲的に定量し、効果判定に役立つ画像診断技術を確認しつつある。

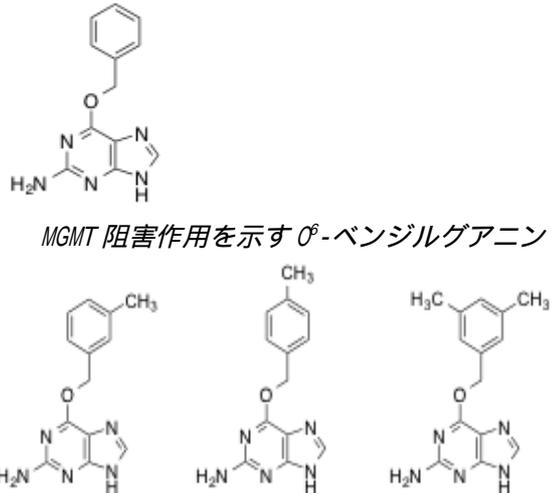
2. 研究の目的

一般に、薬剤の 98%は血液脳関門 (BBB) 透過性に欠けているといわれている。BBB を単純拡散により透過する化合物においては、BBB 透過性と化合物の脂溶性とは相関関係にあり、脂溶性が高まるほど BBB 透過性が高くなる傾向にあるが、BBB に発現している P 糖タンパクなどの排出輸送系の基質となれば、その化合物の脳内移行性は制限される。このように、脳をターゲットとする薬剤開発は困難を極めるが、これまでに、研究分担者の一人である古山らは、中枢型プロスタサイクリン受容体 (IP₂) の基質であり、顕著な神経保護活性を示す 15R-TIC の合成に成功し、さらに短寿命放射核 ¹¹C で標識した 15R-¹¹C TIC メチルエステルの PET トレーサーを用いてサルおよびヒト脳内への移行性を明らかにするとともに、IP₂ 受容体の画像化に成功した実績をもつ (Stroke, 2006) 本研究で目的とする MGMT イメージングは、PET 法を用いた O⁶-ベンジルグアニン (誘導体) の脳内移行性の評価結果に基づき、BBB 透過特性をもつ化合物の獲得により実現される。加えて、上記中枢系薬剤の PET 画像化の成功は、古山らによる「高速 C-メチル化」

という画期的な手法の実現が鍵となった (Trends Anal. Chem., 2004) 本手法は、従来の PET トレーサー合成の化学的基盤を刷新するべく、パラジウム 0 価触媒を用いた炭素-炭素結合反応を基軸とした高効率的合成法である。これまでに、sp² (アリアル) 炭素, sp² (ビニル) 炭素, sp (アルキン) 炭素, sp³ (アルキル) 炭素の四形式の C-メチル化法が開発され、本手法の適用により原理的にはほとんどすべての有機化合物への [¹¹C] 放射核導入 (PET トレーサー化) が可能となった。さらに、標識部位は炭素-炭素結合であるため代謝的に安定であり、メチル基は最小の炭素置換基であり極性の変化も最小限に留めているため親リガンドの活性を大きく変えてしまうことがない。この世界最先端 PET トレーサー技術を活用することにより、信頼性の高い PET 研究が展開できる。合成された化合物のスクリーニングにあたっては、現在我々が開発中の In vitro virus 法などの分子生物学的手法を用いて、合成された化合物と MGMT との分子間相互作用を測定し、Kinetics 解析と Affinity 解析を行う。その後、脳内移行性があり、分子イメージング剤候補として非臨床安全試験を実施する価値があるかどうかを見極めるため、動物 PET を用いた薬物動態試験を実施し、代謝や予備的な安全性評価を実施する。

3. 研究の方法

まず MGMT 阻害剤である O⁶-ベンジルグアニンのベンゼン環にメチル基を付加した O⁶-(3-メチルベンジル)グアニン, O⁶-(4-メチルベンジル)グアニン, 及び O⁶-(3,5-ジメチルベンジル)グアニン (下図) を、既に報告されている文献 (Synth. Commun, 2003) に従い合成し、続いて蛍光発光基で標識した O⁶-メチルグアニン感受性制御酵素の認識塩基配列を含むオリゴヌクレオチド基質を用いて MGMT の阻害活性評価を行う。

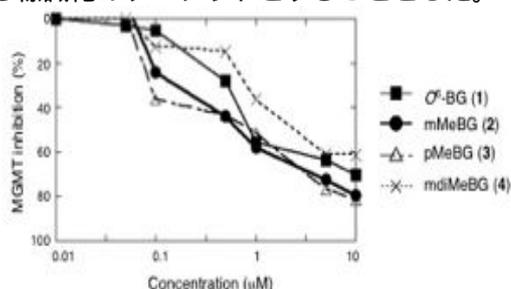


次に σ -ベンジルグアニンのベンジル基を $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3$ により標識化する方法を確立する。 ^{11}C は半減期が 20 分と短く、反応後迅速に分離精製して生体へ投与し、PET 装置での測定を行わなければならない。従って古山らが以前に開発した、放射性核種含有ヨウ化 $[^{11}\text{C}]\text{メチル}$ とヘテロ芳香環を有するスズ化合物とのカップリング反応を応用することを試みる。

上記の標識化の方法が確立した後、マウスの大腿部皮下に腫瘍組織を移植した担癌マウス (U87 MGMT 過剰発現腫瘍/U87 MGMT 非発現腫瘍) を作成し、上述の新規プロローベ候補物質を投与、PET 撮影を実施する。最終的には脳に腫瘍 (U87 MGMT 過剰発現腫瘍/U87 MGMT 非発現腫瘍) を作成したマウスにおいて PET 撮影を行い、脳内移行性を含めた評価を行う。

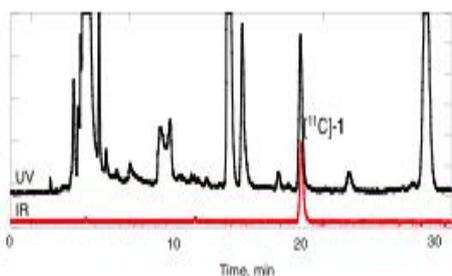
4. 研究成果

上述した 3 つの化合物 [σ -(3-メチルベンジル)グアニン, σ -(4-メチルベンジル)グアニン, σ -(3,5-ジメチルベンジル)グアニン] は、いずれも σ -BG に類似した MGMT 阻害効果を呈した。特に σ -(3-メチルベンジル)グアニン及び σ -(4-メチルベンジル)グアニンは、 σ -BG よりも若干酵素阻害活性が高いことが示された (下図)。この結果を踏まえ、 σ -(3-メチルベンジル)グアニンを $[^{11}\text{C}]$ による標識化のターゲットとすることとした。



σ -ベンジルグアニン (σ -BG, 1) およびそのメチル化誘導体 σ -(3-メチルベンジル)グアニン (2), σ -(4-メチルベンジル)グアニン (3) および σ -(3,5-ジメチルベンジル)グアニン (4) の濃度-MGMT 阻害効果の関係

$[^{11}\text{C}]$ 標識化については、古山らがこれまでに報告した「高速 C- $[^{11}\text{C}]$ メチル化反応」と脱保護反応を組み合わせることで、最終的に HPLC 分析収率 98% と高い数値を達成できた。



合成物質の HPLC 分析チャート

担癌マウスの作成においては、U87 MGMT 過剰発現系細胞、及び U87 MGMT 非発現系細胞を用いた。大腿部皮下腫瘍の作成については、上述の細胞 (1.5×10^7 個程度) を皮下に注射し、1-2 週間で適当な大きさ (径 1cm 程度) に成長することが確認された。また脳内腫瘍の作成においては、上述の細胞 (10^6 個程度) を、定位的 (bregma の 3mm 尾側, 正中より外側に 2mm, 脳表より 3.5mm 深部) に脳内注射し、2-3 週間で観測に適した腫瘍径 (径 3mm-) となることが MRI 撮影にて確認された。いずれにおいても、MGMT 非発現系腫瘍の方が速い発育傾向を認めた。

確立した担癌マウスに対して新規合成プロローベを投与、PET 撮影を実施し、解析していくのが次の課題である。

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 12 件)

1. Kurimoto M, Suzuki H, Aoki K, Ohka F, Kondo G, Motomura K, Iijima K, Yamamichi A, Ranjit M, Wakabayashi T, Kimura S, Natsume A: Rapid sensitive analysis of IDH1 mutation in lower-grade gliomas by automated genetic typing involving a quenching probe. *Cancer Invest.* 2016 2;34(1):12-5. 査読あり
2. Kuramitsu S, Ohno M, Ohka F, Shiina S, Yamamichi A, Kato A, Tanahashi K, Motomura K, Kondo G, Kurimoto M, Senga T, Wakabayashi T, Natsume A: Lenalidomide enhances the function of chimeric antigen receptor T cells against the epidermal growth factor receptor variant III by enhancing immune synapses. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(10):487-95. 査読あり
3. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Motomura K, Alim A, Tanaka I, Senga T, Harada I, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Sekido Y, Wakabayashi T: Activation of Yes-Associated Protein in Low-Grade Meningiomas Is Regulated by Merlin, Cell Density, and Extracellular Matrix Stiffness. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(7):704-9. 査読あり
4. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H,

- Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S: Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet.* 2015;47(5):458-68. 査読あり
5. Iwami K, Momota H, Fujii M, Natsume A, Yagi S, Toriyama K, Kamei Y, Wakabayashi T: Anaplastic meningioma with rapid growth after omental flap transposition: a case report and experimental study. *Brain Tumor Pathol.* 2015;32(2):137-44. 査読あり
 6. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Momota H, Kato A, Motomura K, Watabe N, Muraishi S, Nakahara H, Saito Y, Takeuchi I, Wakabayashi T: Assessment of tumor cells in a mouse model of diffuse infiltrative glioma by Raman spectroscopy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:860241. 査読あり
 7. Momota H, Fujii M, Tatematsu A, Shimoyama Y, Tsujiuchi T, Ohno M, Natsume A, Wakabayashi T: Papillary glioneuronal tumor with a high proliferative component and minigemistocytes in a child. *Neuropathology.* 2014;34(5): 484-90. 査読あり
 8. Motomura K, Fujii M, Maesawa S, Kuramitsu S, Natsume A, Wakabayashi T: Association of dorsal inferior frontooccipital fasciculus fibers in the deep parietal lobe with both reading and writing processes: a brain mapping study. *J Neurosurg.* 2014;121(1):142-8. 査読あり
 9. Ohka F, Ito M, Ranjit M, Senga T, Motomura A, Motomura K, Saito K, Kato K, Kato Y, Wakabayashi T, Soga T, Natsume A: Quantitative metabolome analysis profiles activation of glutaminolysis in glioma with IDH1 mutation. *Tumour Biol.* 2014;35(6):5911-20. 査読あり
 10. Umebayashi D, Natsume A, Takeuchi H, Hara M, Nishimura Y, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Wakabayashi T: Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitotoxicity. *J Neurotrauma.* 2014 15;31(24): 1967-74. 査読あり
 11. Efficient syntheses of ^{11}C zidovudine and its analogues by convenient one-pot palladium(0)-copper(I) co-mediated rapid C- ^{11}C methylation. Z. Zhang, H. Doi, H. Koyama, Y. Watanabe, M. Suzuki, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2014**, 57, 540-549. 査読あり
 12. Synthesis of ^{11}C -labeled retinoic acid, ^{11}C ATRA, via an alkenylboron precursor by Pd(0)-mediated rapid C- ^{11}C methylation. M. Suzuki, M. Takashima-Hirano, H. Ishii, C. Watanabe, K. Sumi, H. Koyama, H. Doi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 3622-3625. 査読あり
- [学会発表](計4件)
1. Wakabayashi T, Skull base brain tumor surgery navigation system based on updating preoperative images using positional information of surgical tools, International conference on brain tumor research and therapy(ICBTRT), 2014.7.20-23, Lake Tahoe, USA
 2. Wakabayashi T, Advanced multimodal treatment strategies for malignant gliomas, The 32nd annual spring meeting of the Korean neurosurgical society in Juju, 2014.4.18, Jeju, Korea
 3. Wakabayashi T, Advanced Multimodal Treatment Strategies for Malignant Gliomas, 15th WFNS World Congress of Neurosurgery, 8-13 September, 2013, Seoul, Korea
 4. Wakabayashi T, Interferon-beta and temozolomide combination therapy for malignant gliomas; phase study and phase clinical study(INTEGRA study), SUN meeting 2013, 19 June, 2013, Malaga, Spain.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
若林俊彦 (WAKABAYASHI, Toshihiko)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 50220835
 - (2)研究分担者
夏目敦至 (NATSUME, Atsushi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 30362255

柳川弘志 (YANAGAWA, Hiroshi)
慶應義塾大学・理工学部・訪問教授
研究者番号: 40327672

古山浩子 (KOYAMA, Hiroko)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 50402160

