

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 5 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713046

研究課題名(和文) 原発性アルドステロン症診断のためのCYP11B2標的イメージングプローブの開発

研究課題名(英文) Development of a novel CYP11B2-specific imaging agent for detection of unilateral subtypes of primary aldosteronism

研究代表者

木村 寛之 (KIMURA, HIROYUKI)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50437240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,700,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧は、患者数が3500～4000万人もいる国民病のひとつである。その分類は、原因が明らかでない本態性高血圧とホルモン異常などによって生じる二次性高血圧に分類される。二次性高血圧の原因疾患のひとつとして、アルドステロン産生腺腫が引き起こす原発性アルドステロン症(PA)の割合が高いことが明らかとなってきた。PAの原因病変としてのアルドステロン産生腺腫においてCYP11B2が特徴的に発現していることに着目し、CYP11B2を標的とするPET/SPECT用分子イメージングプローブの開発を行ったところ、放射性フッ素キノリン誘導体の中で有望な化合物を見出した。

研究成果の概要(英文)：Primary aldosteronism (PA) is the most common and surgically curable form of endocrine hypertension, accounting for 5%-10% of all patients with hypertension. Approximately 60% of patients with PA exhibit bilateral form causing aldosterone hypersecretion and require medical treatment with mineralocorticoid receptor antagonists. The remaining 40% exhibit the unilateral form causing hypersecretion, e.g., aldosterone-producing adenoma (APA); in these patients, hypertension and hyperaldosteronism can be cured by unilateral laparoscopic adrenalectomy. Therefore, an accurate method for distinguishing unilateral from bilateral adrenal disease is critical for patients who wish to pursue the surgical option. Aldosterone synthase (CYP11B2) is responsible for the majority of cases clinically diagnosed as primary aldosteronism. CYP11B2 is highly homologous to 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1). In this study, we have developed a PET/SPECT imaging probe with higher selectivity for CYP11B2 than CYP11B1.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：原発性アルドステロン症 アルドステロン産生腺腫 PET/SPECT用分子イメージングプローブ CYP11B2 選択的化合物

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧は、患者数が 3500~4000 万人もいる国民病のひとつである。その分類は、原因が明らかでない本態性高血圧とホルモン異常などによって生じる二次性高血圧に分類される。二次性高血圧の原因疾患のひとつとして、アルドステロン産生腺腫が引き起こす原発性アルドステロン症 (PA) の割合が高いことが明らかとなってきた。最近、薬も減塩も効果の無い謎の高血圧が急増していたが、その原因が PA にあると言われている。その潜在患者数は 200~400 万人とも言われ、脳卒中・心不全のリスクが本態性高血圧よりもはるかに高い。PA は年齢や生活習慣に関係無く、副腎の異常により発症するが、病巣が片側性の場合には手術により根治できる。しかし現在の診療では手術方針の決定に、高度な技術を要し高価で侵襲性の高いカテーテル検査 (AVS) を必要とするため、実施可能な施設も限られており診断も治療も満足に実施されていないのが現状である。そこで、多施設で実施可能な非侵襲的かつ高精度な PA 診断法の開発が急務となっている。重要なのは、PA の啓発活動が進めば非侵襲的検査の社会的ニーズは益々高くなり、PA が common disease であることを考慮した場合に、どうすれば全国レベルでより多くの患者に対応できるかである。

現在、CT、MRI を用いた形態学的な診断が試みられているが、副腎の大きさだけでは診断できず、さらに CT 陰性でもアルドステロンを産生している場合があるため、AVS との比較では正診率が 6 割程度と満足いく結果が得られていない。そこで、PET、SPECT を用いた機能診断が今後増加する患者に対応できる唯一の診断法となり得ると考えた。

本研究の目的は、PA の発症に関わる分子機構を標的として、医薬品化学および薬物動態学的な観点から分子設計を行い、副腎での PA 責任病変を高感度で検出・評価しうる PET/SPECT 用分子イメージングプローブの開発を行うところにある。

これまでに、有効な PA 分子イメージングプローブは開発されておらず、本研究の成果は、慢性疾患である PA の世界初の非侵襲的な診断法の開発となるとともに、更に、PA に伴う脳卒中・心不全のリスクの低減や高血圧症治療薬の減薬につながり、患者の予後改善や医療経済効果の向上にも寄与しうる。

## 2. 研究の目的

PA の原因病変としてのアルドステロン産生腺腫において CYP11B2 が特徴的に発現していることに着目し、CYP11B2 を標的とする PA 分子イメージングプローブの開発を行う。具体的には、CYP11B2 に親和性を示すファドラゾール、イミダゾール系化合物を母体として、CYP11B2 への結合に関する計算化学 (親和性と他の副腎疾患に発現する CYP11B1 に対する特異性とをポイントに) 医薬品化学、

薬物動態学的考察により分子を設計し、CYP11B2 への高親和性、高選択性を有し、体内分布において副腎と周辺臓器との高い放射能集積比を示す化合物の創製を目指す。更に本研究におけるイメージングプローブ開発から得られた情報を創薬に応用するための基盤技術の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、PA の責任病変のひとつであるアルドステロン産生腺腫に関連する酵素 CYP11B2 を標的分子として選択し、これに対する分子イメージングプローブを設計・合成・評価した。

### 1) 分子設計と合成

In silico モデルを用いた標的特異性の向上および生体内代謝耐性化技術によるインビボ標的指向性技術を導入し、高感度化プローブの開発を行った。具体的には、PA に特有の CYP11B2 に高い親和性、特異性を有する R-Fadrazole について、酵素中の化合物結合に関与する部位の三次元情報の解析を行った。加えて、CYP11B1 に結合性を示す R-Etomidate、S-Fadrazole との結合に関する計算化学的手法を用い検討を行い、CYP11B2 及び CYP11B1 への結合性の観点からその違いを認識し、CYP11B2 に親和性および特異性が高いファドラゾール、イミダゾール系化合物の設計を行った。設計した分子の合成経路を、標識合成も意識しながら合成経路を確立した。

### 2) CYP11B2 への親和性、特異性の評価

インビトロ評価系を利用して標的への親和性・選択性の評価を行った。これまでの分子プローブ設計における経験を基に、スクリーニングの指標として CYP11B2 への親和性が数 nM レベル、更に CYP11B2/CYP11B1 の選択性が 10 倍以上の化合物を選択し、それらの化合物についてインビボで評価を行った。具体的には、ヒト副腎皮質由来癌細胞 (NCI-H295R) を用いたアッセイ法の確立、さらには CYP11B1 又は CYP11B2 のみを発現させた細胞株の樹立とそれを用いたアッセイ法を確立した。非特異的結合を考慮する必要があるため、影響のあると考えられる CYP17、CYP19 に対する親和性の評価も実施した。

### 3) 動物での体内分布動態の評価

正常マウス、ラットにプローブを投与して経時的に屠殺し、各臓器の重量および集積した放射能を測定した。副腎への集積性、血液副腎比、副腎肝臓比、副腎腎臓比を指標にプローブの選別を行った。また、標的部位に結合する既知の化合物あるいはプローブの非標識体を投与してインビボブロッキング実験も行い、副腎に集積した放射能の標的特異性について検討した。

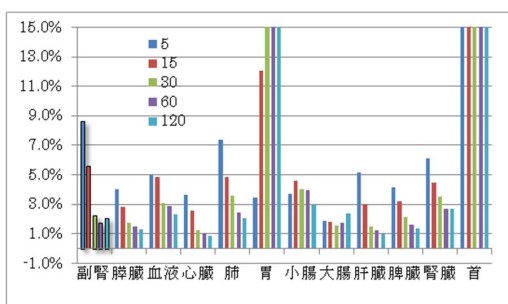
### 4) 病態モデル動物の作製とイメージングでの評価

CYP11B1、CYP11B2 を強制発現した細胞を用いて、担癌モデル動物の作製を検討した。

さらに、作製したモデル動物を用いて、開発した化合物の PET あるいは SPECT でイメージングを行い、副腎腫瘍が描出可能かどうかを検討した。

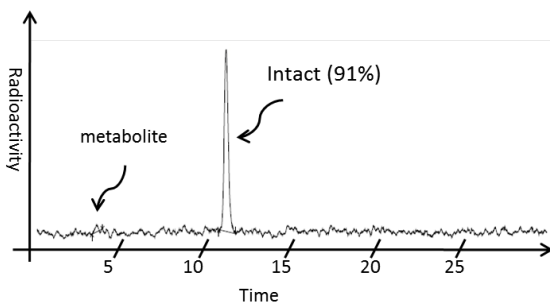
#### 4. 研究成果

キノリン誘導体を 3 種設計・合成し、インビトロの系で CYP11B1、CYP11B2 に対する親和性と選択性を評価したところ、放射性ヨウ素キノリン誘導体の中で CYP11B2 への親和性が  $IC_{50} = 0.63 \text{ nM}$  と高く、さらに CYP11B2 への選択性 (Selectivity Factor (S.F.) =  $IC_{50CYP11B1} / IC_{50CYP11B2}$ , S.F. = 223) も高い化合物 1 を見出すことに成功した。正常マウスを用いて基礎体内動態を検討したところ、化合物 1 は副腎への速やかな移行を確認した。しかしながら化合物 1 は、生体内での安定性が悪く、脱ヨウ素の指標となる甲状腺への集積が投与後早期から高かった。

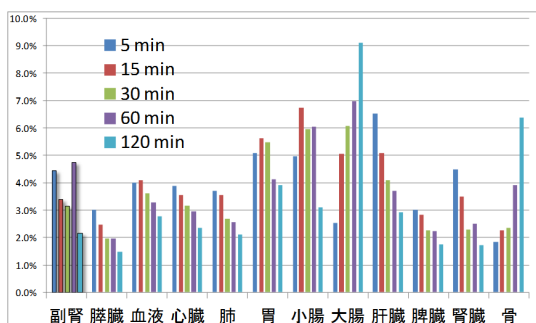


そこで次に、生体内での安定性の向上を目指した化合物の開発に着手した。放射性フッ素キノリン誘導体を新たに 2 種設計・合成し、インビトロの系で評価したところ、CYP11B2 への親和性が  $IC_{50} = 0.81 \text{ nM}$  と高く、さらに CYP11B2 への選択性 (S.F. = 81) も化合物 1 には及ばないが、インビボ評価に値する化合物 2 を見出すことに成功した。

化合物 2 のマウス血漿中での安定性をインビトロで評価したところ、2 時間で少し分解物が確認されたが、概ね安定であることが分かった。



正常マウスを用いて基礎体内動態を検討したところ、化合物 2 は副腎への速やかな移行を確認した。脱フッ素の指標となる骨への集積は、投与後 1 時間までは比較的低い値であった。



PA モデル動物として、CYP11B1、CYP11B2 を導入した V79 細胞を、マウスの腎皮下に移植したモデルマウスの作製を検討した。腎被膜下移植後に、HE 標本で生着の確認、免疫染色で CYP11B1、CYP11B2 の発現を確認した。現在は、モデルマウスを用いて、PET での評価を行っている。

#### 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 4 件)

- 1) Continuous-flow synthesis of *N*-succinimidyl 4- $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzoate using a single microfluidic chip. Hiroyuki Kimura, Kenji Tomatsu, Hidekazu Saiki, Kenji Arimitsu, Masahiro Ono, Hidekazu Kawashima, Ren Iwata, Hiroaki Nakanishi, Eiichi Ozeki, Yuji Kuge, Hideo Saji. *PLOS ONE*, 11, e0159303 (2016)
- 2) Synthesis and Biological Evaluation of Novel  $^{18}\text{F}$ -Labeled Probes Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen for Positron Emission Tomography of Prostate Cancer. Naoya Harada, Hiroyuki Kimura, Satoru Onoe, Hiroyuki Watanabe, Daiko Matsuoka, Kenji Arimitsu, Masahiro Ono, Hideo Saji. *Journal of Nuclear Medicine*, 57, 1978-1984 (2016)
- 3) Development of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled Asymmetric Urea Derivatives that Target Prostate-Specific Membrane Antigen for Single-photon Emission Computed Tomography Imaging. Hiroyuki Kimura, Sotaro Sampei, Daiko Matsuoka, Naoya Harada, Hiroyuki Watanabe, Kenji Arimitsu, Masahiro Ono, Hideo Saji. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2251-2256 (2016)
- 4) A novel CYP11B2-specific imaging agent for detection of unilateral subtypes of primary

aldosteronism. Tsutomu Abe, Mitsuhide Naruse, William F Young Jr., Nobuya Kobashi, Yoshihiro Doi, Akihiro Izawa, Kei Akama, Yuki Okumura, Miho Ikenaga, Hiroyuki Kimura, Hideo Saji, Kuniaki Mukai, Hiroki Matsumoto. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(3):1008-1015 (2016)

〔学会発表〕(計1件)

Tsutomu Abe, Mitsuhide Naruse, William F Young, Nobuya Kobashi, Yoshihiro Doi, Akihiro Izawa, Kei Akama, Yuki Okumura, Miho Ikenaga, Hiroyuki Kimura, Hideo Saji, Kuniaki Mukai, and Hiroki Matsumoto: A novel CYP11B2-specific imaging agent for detection of aldosterone-producing adenomas. Endocrine Society's 98<sup>th</sup> Annual Meeting and Expo (Boston, USA), 2016.4.

〔講演等〕(計4件)

- 1) 木村寛之: ユニットカップリング型分子プローブの開発戦略. 創薬科学フロンティア研究センター講演会 (京都), 2017.2.
- 2) 木村寛之: 分子イメージング技術を用いた新しい診断法の開発. 第7回 KPU シンポジウム (京都), 2016.4.
- 3) 木村 寛之: 臨床応用を目指した腫瘍イメージングプローブの開発研究. 創薬科学フロンティア研究センター講演会 (京都), 2016.3.
- 4) 木村寛之: 放射性医薬品の標的臓器への集積. 新規医療イノベーションのためのシンポジウム 2015 (大阪), 2015.10.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: 2-(3-ピリジニル)-1H-ベンズイミダゾール誘導体化合物、これを含む放射性医薬品  
発明者: 佐治英郎、木村寛之、松本博樹  
権利者: 佐治英郎、木村寛之、松本博樹  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-071255  
出願年月日: 2014年3月31日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
京都薬科大学 代謝分析学分野 研究業績  
<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/taisya/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

京都薬科大学・薬学部・准教授  
木村 寛之 (KIMURA HIROYUKI)  
研究者番号: 50437240

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し