

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861133

研究課題名(和文) 外部放射線照射との相乗効果に基づくがん治療を目的とした内用放射線治療薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of internal radiation therapy anticancer agent that amplifies the therapeutic effects when combined with external radiation therapy

研究代表者

萩森 政頼 (Hagimori, Masayori)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40446125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、外部放射線治療との相乗効果を狙った治療応用を可能にする新たながん内用放射線治療薬剤の開発をすることである。本研究では、多くの固形がんで高い発現が見られ、放射線により比較的短時間で誘導されるNAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)に着目し、その放射性ヨウ素標識誘導体を設計・合成した。これまでにヨウ素の電子求引性によりp-ヨードフェノールが脱離し易く代謝安定性が悪かったため、電子供与基であるメトキシの導入による安定性の向上を期待した。NQO1高発現細胞溶解液において安定性の向上が見られたことから、がん内用放射線治療薬剤としての可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) is highly expressed in many human solid cancers. Because NQO1 can be induced immediately after exposure to ionizing radiation, we aimed to develop an NQO1-targeted radioiodinated agent to establish a novel internal radiation therapy that amplifies the therapeutic effects when combined with external radiation therapy. The metabolic stability of NQO1-targeted radioiodinated compounds previously reported was low because of the electron withdrawing effect of iodine atom. Then, we designed and synthesis of a new NQO1-targeted radioiodinated derivative having methoxy group as a electron donating group. As a result, radioiodinated derivative exhibited good metabolic stability in NQO1-expressing HT-29 cell lysates.

研究分野：医歯薬学

キーワード：放射線 がん がん内用放射線療法 NQO1

1. 研究開始当初の背景

がんの放射線治療は、がん細胞が正常細胞に比べて放射線感受性が高いことを利用し、低侵襲的にがんの殺傷が可能であることから、がんの治療法において重要な選択肢の一つとなっている。放射線治療は体外から放射線照射する外部放射線治療と放射性物質を体内に投与する内用放射線治療に大きく分けられるが、内用放射線治療ではがんの内部や近傍に放射性物質を集積させ、選択的にがん細胞に放射線照射が可能であるため、正常細胞への影響を最小限に単回の投与により長期間効果を持続させることが可能であり、患者のQOLの向上が期待される。また、外部放射線治療では身体の限られた一部を治療するため、多転移性のがんでは治療は困難であるが、内用放射線治療では全身に広がったがんに対しても高い治療効果が得られる。治療効果の高い内用放射線治療を達成するには、放射性物質をがん組織のみに集積させるターゲティング(標的化)が最も重要であると考えられる。現在、臨床において、ヨウ化ナトリウム(1-131)による甲状腺がんの放射性ヨード内用療法や塩化ストロンチウム(Sr-89)による多発性骨転移の疼痛緩和などの内用放射線治療が行われ、その有用性が認識されているが、これらの病巣部への集積性は元素自体の物性に因るところが大きい。核医学イメージングを目的とした放射性薬剤は、病変の特性に基づき精密に設計され、画像診断において大きく貢献をしているが、内用放射線療法に適用するにはさらに高いがんへの集積性、特異性が求められる。そのため、この点を考慮し、モノクローナル抗体を用いた放射免疫療法などが開発されている。このような背景の下、放射線の外部照射により誘導された酵素を標的にした放射性薬剤を開発することにより治療効果の高い新たな内用放射線治療を達成できるのではないかと考えた。つまり、外部放射線治療によりがん細胞において誘導された酵素を特異的に認識する放射性薬剤を用いることにより、放射性薬剤はがん組織に高集積し、がん細胞への選択的な放射線照射が可能となる(図1)。この手法によって、外部放射線治療単独もしくは内用放射線治療単独に比べて非常に高い治療効果が期待できると考えた。

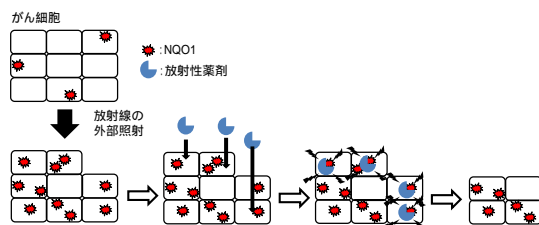


図1 放射線の外部照射により誘導されたNQO1をターゲットとした内用放射線療法の概念図

2. 研究の目的

キノン系化合物の二電子還元を行う酵素であるNAD(P)H:quinone oxidoreductase 1(略称NQO1、別名DT-diaphorase)は、肝がんや結腸がんなどの多くの固形がんにおいて高発現しており、放射線により比較的短時間で誘導されることが明らかとなっている。したがって、NQO1を特異的に認識する放射性薬剤を開発できれば、放射線の外部照射によりNQO1を高発現したがん組織特異的に放射性薬剤を集積させることが可能であり、高い治療効果が得られる。さらに、放射性薬剤から放出される放射線によるNQO1の発現も考えられることから、その相乗効果が期待できる。

これまでに研究代表者の所属研究室ではNQO1のmechanism-based inhibitorであるES936のニトロ基を放射性ヨウ素原子に置換した化合物1を設計・合成し、その評価を行ってきたが、代謝安定性に問題があることが明らかとなっている。NQO1を発現しているヒト結腸がん細胞HT29を用いて、集積性を検討したところ、早期には取り込みが確認されたが、その後、細胞外への放射能の流出が認められた。代謝物を検討したところ、エーテル部位が開裂し、*p*-ヨードフェノキシ基が脱離していることがわかった。つまり、代謝分解が起こったことより、がん細胞での低い集積が起こったと考えられる。一方、NQO1発現の低いヒト肺腺がん細胞A549において細胞への取り込みが低かったこと、また、非放射性の化合物1によって放射性ヨウ素標識体の細胞への取り込みが阻害されたことから、がん細胞への集積はNQO1特異的であることが明らかとなった。したがって、放射性ヨウ素標識体の生体内における代謝安定性を高める分子設計により、特異的にがん細胞へ集積し、新たな内用放射線療法薬剤となることが期待される。

そこで、代謝安定性の向上を目指した分子設計を行うことにした。フェニル基上の電子求引性置換基の存在が*p*-ヨードフェノキシ基の脱離に大きく影響している考え、フェニル基の置換基の検討として電子供与性置換基を導入した<sup>[125I]</sup>2を設計・合成した(図2)。そして、インビトロ系で安定性の評価を行うことにした。

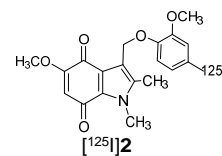


図2

3. 研究の方法

ヨウ素標識体の合成

放射性ヨウ素標識体の代謝安定性を向上させる分子設計として、代謝部位であるエーテル鎖をアルキル鎖またはチオエーテル

にかえる方法、ヨウ素原子の電子求引性を下げるために電子供与基を導入する方法の2つの方法を考えた。ES936によるNQ01の阻害活性は、ES936の*p*-ニトロフェノールが脱離した後に発生する reactive iminium 種がNQ01の活性部位のチロシン残基に結合することにより生じる。そのため、NQ01の阻害活性には reactive iminium 種の発生が必要であるが、一方、NQ01への結合については、*p*-ニトロフェノールの脱離は必要ないことが明らかとなっている。したがって、エーテル部位をアルキル鎖やチオエーテルにかえても、NQ01に対する結合性を保持していると考えられるが、結合の強さに全く影響がないとは言い切れない。そこで、ヨウ素原子の電子求引性を下げるために電子供与基を導入する方法を選択し、導入する電子供与基としては、NQ01との結合性に影響が少なく、合成のし易さを考慮し、メトキシ基を導入することにした。合成は、5-ヒドロキシ-2-メチル-1*H*-インドール-3-カルボン酸エチルより5ステップの反応を行った。

### ホット体の合成

標識前駆体としては、放射性ヨウ素の導入が容易であり、その後の分離精製に有利であると考えられるトリブチルスズ体の合成を行うことにした。得られたコールド体のヨウ素をトリブチルスズ体の標識前駆体とした後に、放射性ヨウ素を導入し、HPLCにより分離精製した。

### 細胞系による安定性の評価

NQ01 高発現細胞として HT29 ヒト結腸腺癌細胞を用い、細胞溶解液を作製した後に、放射性ヨウ素標識体を加え、37 で 60 分間インキュベートし、経時的に逆相 TLC および HPLC にて分析した。

### 4. 研究成果

#### コールド体の合成

コールド体 2 の合成は、図 3 に示すように 3-(hydroxymethyl)-5-methoxy-1,2-dimethylindole-4,7-dione (7) を合成した後に 4-iodo-methoxyphenol を結合させる合成経路を計画した。アルコール体 7 を 3 から 4 ステップで得た後に、室温にて DMF 中で 4-iodo-methoxyphenol と反応させることにより 7 から収率 69% で得ることに成功した。コールド体 1 も同様に 7 と *p*-iodophenol より収率 62% で得ることができた。

### ホット体の合成

トリブチルスズ基の導入はパラジウム触媒存在下、ヘキサブチルチンを反応させ  $[^{125}\text{I}]2$  の標識前駆体を収率 25% で、 $[^{125}\text{I}]1$  の標識前駆体を収率 38% でそれぞれ得ることができた。標識条件としては、酸化剤、pH 等を検討したところ、酸化剤としては *N*-クロロスクシンイミド、室温の条件で、 $[^{125}\text{I}]2$  を放射

化学的収率 50%、 $[^{125}\text{I}]1$  を放射化学的収率 51% で得ることができた。

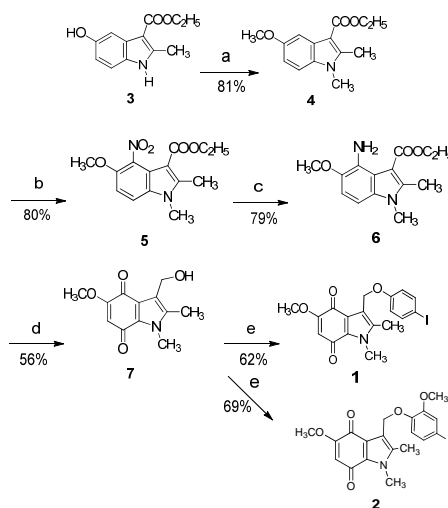


図 3

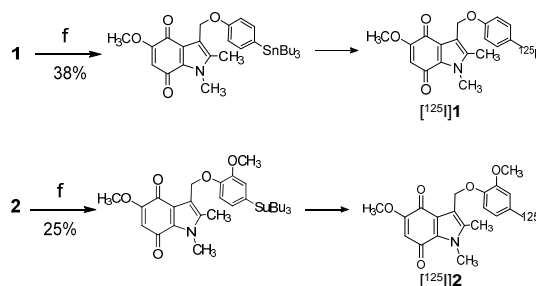


図 4

### 細胞系による安定性の評価

$[^{125}\text{I}]1$  および  $[^{125}\text{I}]2$  が細胞溶解剤中で安定であることを確認した後に、HT29 ヒト結腸腺癌細胞溶解液を作製し安定性を評価した。その結果、 $[^{125}\text{I}]1$  は 60 分後において 50%以上が  $[^{125}\text{I}]p$ -iodophenol に分解されたが、 $[^{125}\text{I}]2$  は 67%以上が未変化体として存在いた (図 5,6)。以上のことから電子供与基であるメトキシ基の導入により安定性が向上することが示された。

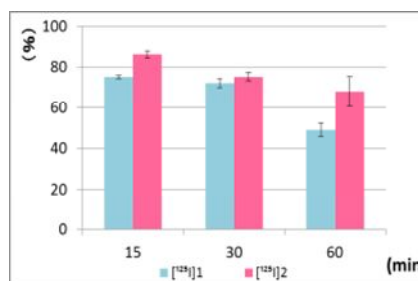


図 5 HT29 細胞溶解液での  $[^{125}\text{I}]1$  および  $[^{125}\text{I}]2$  の安定性

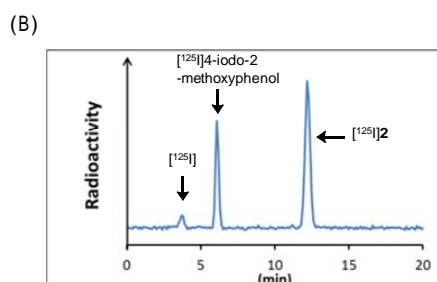
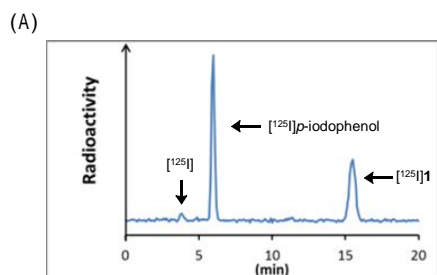


図6 HPLC chromatograms for analysis of  $[^{125}\text{I}]1$  (A) and  $[^{125}\text{I}]2$  (B) after 60 min incubation

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

J. Sasaki, K. Sano, M. Hagimori, M. Yoshikawa, M. Maeda, T. Mukai: Synthesis and in vitro evaluation of radioiodinated indolequinones targeting NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 for internal radiation therapy, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22, 6039-6046 (2014)

〔学会発表〕(計1件)

杉本 理紗、萩森 政頼、吉川 麻衣、向 高弘: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 標的放射性薬剤 安定性の向上を目指した電子供与基の導入、第135回日本薬学会年会 2015.3.27 神戸サンボーホール(神戸)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

萩森 政頼 (HAGIMORI MASAYORI)  
神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 40446125

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし