

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861015

研究課題名(和文)ニメスリドをリード化合物としたCOX-2イメージング剤の開発

研究課題名(英文) Synthesis and evaluation of nimesulide isomeric methoxy/iodo analogs for COX-2 imaging

研究代表者

山本 由美 (YAMAMOTO, Yumi)

東北医科薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：70613446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脳への集積が向上する可能性の高いニメスリド誘導体に着目し、脳COX-2イメージング剤の開発を行うことを目的とした。ニメスリドの新規合成経路を確立したうえで、導入する官能基を変化させた6種のニメスリド誘導体を合成し、評価を行った。

研究期間全体を通じて、合成に成功した7化合物(母体化合物を含む)全てが脳移行に望ましい挙動を示すとともに、うち3化合物にCOX-2選択性および親和性があることを明らかにした。3種のメトキシ誘導体の¹⁴C標識合成にも成功しており、今後はin vivoにおける評価へと発展させてゆく予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to find suitable radioligands for PET studies which are targeted COX-2 in brain. Nimesulide derivatives are selected as a ligand expecting brain uptake.

We synthesized six isomeric methoxy-/iodo- analogs of nimesulide, and evaluated for potential as radioligands for brain COX-2 imaging. All synthesized compounds were shown suitable parameters for favorable brain penetration, and three compounds were found as potent and selective COX-2 inhibitors. Furthermore, three isomeric methoxy analogs of nimesulide have been ¹⁴C-radiolabeled. Future studies will aim to develop radiolabeled forms of this nimesulide analog for further in vivo evaluation.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：COX-2 イメージング 画像化 ニメスリド 脳 物理化学的性質

1. 研究開始当初の背景

シクロオキシゲナーゼ(COX)は、アラキドン酸から生理活性物質であるプロスタグランジン類を産生する酵素である。COXには2つのアイソザイムが存在しており、COX-1及びCOX-2とに大別される。このうちCOX-2は炎症により誘導されるだけでなく、脳、腎臓などに構成的に発現し、特に脳において、パーキンソン病やアルツハイマー病等の神経変性疾患との関与が示唆されている。しかしこれら病態におけるCOX-2の働きは未だ解明されていない。

脳におけるCOX-2の働きを解明するために、生体内COX-2分布を時間的・空間的かつ定量的にトレース可能なPETやSPECTなどのCOX-2イメージング剤の研究開発が国内外で進められてきた。しかしながら、未だ成功例はない。

申請者が大学院時代より継続して取り組んできたCOX-2イメージング剤の研究開発において、様々な骨格を有する¹¹C標識リガンドの合成に成功している。このうち、科学研究費補助金若手研究(B)を受け、取り組んだ研究において脳を標的とした5種の¹¹C標識インドメタシン誘導体の合成に成功し、その成果を論文(Yamamoto Y. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 59, 938-946(2011))として発表した。その評価の結果、(1)リガンドの脂溶性と投与後早期の脳取り込み量とに負の相関が認められること、(2)P糖蛋白質などの膜排出蛋白がリガンドのCOX-2への特異結合の低下に大きく影響することを明らかにした。

ニメスリドは世界で広く使用されているCOX-2選択的NSAIDの一種であり、ジアルルエーテルを母体骨格とするシンプルな化合物である。ニメスリドは経口投与にて吸収され、すみやかに生体内に分布するという報告(*Clin. Pharmacokin.*, 35, 247-274)があり、また上述の研究において、ニメスリド類似化合物であるNS-398はP糖蛋白質の基質とならないことを示唆したことから、申請者は、放射性同位元素で標識可能なニメスリド誘導体を合成することにより、(1)従来のCOX-2イメージング剤として検討された化合物に比べ脂溶性を低くし、かつ(2)P糖蛋白質の基質とならず、脳への集積が向上するのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究期間内において、ニメスリド誘導体の新規合成経路を確立し、合成した誘導体のCOX-2に対する阻害活性を評価する。その中で特にCOX-2に対する選択性・親和性の高い化合物を選出し、放射性炭素あるいは放射性ヨウ素によるニメスリド誘導体の標識化を検討する。ニメスリド誘導体の放射性同位元素標識合成法を確立させた後、得られた標識体の脂溶性などの物理化学的情報を求めるとともに、正常マウスを用いた生体内分布

評価などにより、安定性、薬物動態を評価し、脳におけるCOX-2イメージング剤としての有用性を明らかにする。

並行して、得られたニメスリド誘導体に関して、蛋白結合率・膜透過性試験、P糖蛋白質発現細胞を用いた輸送実験等により、導入した官能基とその*in vitro*における挙動との関係を精査することで、より効率的なCOX-2イメージング剤の開発手法を模索する。

以上の方法により、COX-2イメージング剤としての放射性同位元素標識ニメスリドの誘導体化の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は(1)化合物の合成及び阻害活性の評価、(2)*in vitro*評価、(3)放射性同位元素標識の3つの研究項目に分けられる。

(1) 化合物の合成及び阻害活性の評価

報告されている文献(*Tetrahedron Lett.*, 39, 2933-2936(1998))を元に、ニメスリドの新規合成経路の確立を試みた。ニメスリドの合成経路は既に報告(Patent, US3840597(1974))があるが、この合成経路はIが反応系に含まれている場合反応が進行しない。そのためI誘導体の合成を可能とする合成経路を計画し、様々な条件を検討することによってニメスリドの新規合成経路を確立した。

次に、確立した新規合成経路を用いて6種類のニメスリド誘導体を合成した。新規合成経路が確立されれば、原料を変化させるのみで誘導体化が可能となる。

また、阻害活性の評価に関しては、Cayman chemical社より販売されているColorimetric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay kitを使用し、本化合物のCOX-2阻害活性および選択性を評価した。

引き続き、Discovery Studio 4.0を用いたシミュレーションにより、各化合物のCOX-2活性部位における構造活性相関を評価し、実際のCOX-2阻害活性及び選択性と比較考察した。

(2) *in vitro* 評価

合成したニメスリド誘導体を用いて、P糖蛋白質等、膜排出蛋白質が多く発現しているとされるCaco-2細胞を用いたmonolayer efflux assay(*J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 312, 144-152(2005))により、ニメスリド誘導体のP糖蛋白質に対する親和性を評価した。

次に、ニメスリド誘導体の物理化学的性質として、 $\log P_{7.4}$ および酸解離定数(pK_a)を求めた。 $\log P_{7.4}$ はOECD guideline for testing of chemicals 117に従い測定し、pK_aは文献(*Int. J. Pharm.*, 176, 241(1999))に従い測定した。

また、ニメスリド誘導体の*in vitro*における安定性について、マウス血漿を用いて評価した。

(3) 放射性同位元素標識

放射性同位元素標識のための標識前駆体として、CH₃O-誘導体に対し、脱メチル化したフェノール体の合成を行った。

次に、¹⁴C 標識合成の予備実験として、[¹⁴C]CH₃I を用いて ¹⁴C 標識合成を行った。

以上3つの研究項目にて合成・評価を行い、得られた結果から、ニメスリド誘導体の COX-2 イメージング剤としての可能性について考察を行った。

4. 研究成果

ニメスリドの新規合成経路の確立を行い、メトキシおよびヨウ素の位置異性誘導体6種の合成に成功した。その後、合成したニメスリド誘導体の COX-2 に対する阻害活性評価を行ったところ、ニメスリドを含む7種の化合物のうち3種の化合物において COX-2 に対する選択性・親和性が認められた。この COX-2 阻害活性は、COX-2 結合シミュレーションによって裏付けられ、ニメスリドのベンゼン環部パラ位への置換基導入が、COX-2 活性部位に対する結合エネルギーに影響を与えるものだと考察された。

合成したニメスリドおよび誘導体の物理化学的性質(log*P*_{7.4}, p*K*_a)を測定した結果、いずれの誘導体もニメスリドと類似した値を示し、置換基の導入はニメスリドの物理化学的性質に大きな影響を与えないことを明らかにし、その生体内での挙動もニメスリド同様、良好である可能性が高いことが示唆された。

次に、ニメスリド誘導体の脳移行に対するP糖タンパク質の寄与を調べるため、Caco-2細胞を用いた*in vitro*単層膜輸送評価を行ったところ、阻害剤存在下/非存在下いずれにおいても挙動に変化はなく、P糖タンパク質の寄与はほぼないことが明らかとなった。さらに得られた透過係数値はいずれも1.71×10⁻⁵ cm/s以上であり、高い透過性、脳移行性を示すことが期待できる。これは脳に存在するCOX-2を標的としたイメージング剤の開発にとって朗報である。

また、ニメスリド誘導体の*in vitro*における安定性について、マウス血漿を用いて評価したところ、37、120分間のインキュベーション後においても95%以上の未変化体が確認され、その他代謝物の存在は認められず、ニメスリド誘導体はいずれも生体内において安定であることを示唆していると言える。

メトキシ誘導体3種に対する¹⁴C標識合成の予備実験として行った¹⁴C標識合成において、放射化学的収率は低かったものの、いずれの化合物も標識合成に成功したことから、¹⁴C標識合成も問題なく行えることが予想される。

研究期間全体を通じて、ニメスリドの新規合成経路の確立に成功し、母体化合物を含め

た7化合物を合成した。得られた7化合物に対し様々な*in vitro*評価を重ねた結果、いずれの化合物も脳移行において良好な安定性と挙動を示すことが期待されることが強く示唆された。このことから、ニメスリド誘導体の脳におけるCOX-2イメージング剤としての有用性を明らかにするための端緒を開き、今後のCOX-2イメージング剤の開発研究を進展させ得る知見を得た。

今後は、本研究課題で良好な候補化合物であることが明らかとなったニメスリド誘導体の放射性同位元素標識合成を行い、*in vivo*評価を進めていく予定である。

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5件)

放射線で誘発される細胞死:アポトーシス、オートファジー、ネクロプトーシス

Ionizing radiation induced cell death; apoptosis, autophagy and necroptosis

桑原 義和, 鈴木 正敏, 漆原 佑介, 齋藤 陽平, 山本 由美, 山本 文彦, 栗政 明弘, 福本 学

東北医科薬科大学研究誌, (2016) 58 号 63-81 査読あり

<https://tohoku-mpu.repo.nii.ac.jp/>

COX-2を標的とした新規イメージング剤の開発 NSAIDs誘導体の合成および評価 山本 由美

九州大学大学院薬学府 博士論文 (2016) 査読あり

<http://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/ja/search/browse/dissertation>

Isomeric iodinated analogs of nimesulide: Synthesis, physicochemical characterization, cyclooxygenase-2 inhibitory activity, and transport across Caco-2 cells

Yumi Yamamoto*, Jun Arai, Takuya Hisa, Yohei Saito, Takahiro Mukai, Takashi Ohshima, Minoru Maeda, Fumihiko Yamamoto

Bioorg. Med. Chem., (2016) 24, 3727-3733 査読あり

DOI: 10.1016/j.bmc.2016.06.015

Isomeric methoxy analogs of nimesulide for development of brain cyclooxygenase-2 (COX-2)-targeted imaging agents: Synthesis, *in vitro* COX-2-inhibitory potency, and cellular transport properties

Yumi Yamamoto*, Takuya Hisa, Jun Arai, Yohei Saito, Fumihiko Yamamoto, Takahiro Mukai, Takashi Ohshima, Minoru Maeda, Yasuhito Ohkubo

Bioorg. Med. Chem., (2015) 23, 6807-6814 査読あり

DOI: 10.1016/j.bmc.2015.10.007

Loss of EGF-dependent cell proliferation ability on radioresistant cell HepG2-8960-R

Yohei Saito*, Ryo Abiko, Akira Kishida, Yoshikazu Kuwahara, Yumi Yamamoto, Fumihiko Yamamoto, Manabu Fukumoto, Yasuhito Ohkubo

Cell Biochem. Funct., (2015) 33, 73-79. 査読あり

DOI: 10.1002/cbf.3090

[学会発表](計 11 件)

Transglutaminase 2 による放射線耐性への影響

齋藤 陽平、桑原 義和、鈴木 正敏、山本 由美、福本 学、山本文彦

日本分子生物学会 第 39 回年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016.11.30.

COX-2 を標的とした新規イメージング剤の開発 NSAIDs 誘導体の合成および評価 山本 由美

九州大学大学院薬学府 平成 28 年度公開講演会, 九州大学薬学部 第二講堂 (福岡県福岡市), 2016.9.12.

老化による脂肪蓄積が肝細胞に及ぼす影響の解析

齋藤 陽平、山本 由美、桑原 義和、福本 学、山本文彦

日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 要旨集 3 p145, 2016.3.29.

COX-2 イメージング剤としてのインドメタシン誘導体に対する P 糖タンパク質の寄与

山本 由美、山田 賀美、酒井 敏直、小野 瞳、亀山 文恵、齋藤 陽平、山本文彦

日本薬学会第 136 年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 要旨集 2 p276, 2016.3.28.

Nimesulide Analogs as Brain Cyclooxygenase-2 (COX-2)-targeted Imaging Agents: Synthesis and in Vitro Evaluation

Yumi Yamamoto, Takuya Hisa, Jun Arai, Yohei Saito, Takahiro Mukai, Takashi Ohshima, Minoru Maeda, and Fumihiko Yamamoto

Ninth Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, 放射線医学総合研究所 (千葉県千葉市), 26-28, 2015.11.9.

COX-2 イメージングを目的としたニメスリド誘導体の脳移行性評価

山本 由美、荒井 潤、比佐 拓矢、岡安 明日香、大岩 明代、齋藤 陽平、山本文彦、向 高弘、大嶋 孝志、前田 稔、大久保 恭仁

日本薬学会第 135 年会, 神戸学院大学・兵庫医療大学 (兵庫県神戸市), 要旨集 2 p 260, 2015.3.28.

脂肪蓄積が及ぼす肝細胞増殖への影響
齋藤 陽平、山本 由美、山本文彦、大久保 恭仁

第 37 回 日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), プログラム p328, 2014.11.25-27.

COX-2 イメージングを目的とした NSAIDs 誘導体の合成と評価 炎症に起因する病態を早期診断するために -

山本 由美

平成 26 年度日本薬学会東北支部

第 3 回 物理・分析系若手研究者セミナー (指名講演), 東北薬科大学 (宮城県仙台市), 2014.9.20.

ヨウ素 125 標識ラクトソーム放射能の生体内分布における血流の影響

木村 光晴、山本文彦、牧野 顕、原 功、小関 英一、木村 俊作、山本 由美、齋藤 陽平、大久保 恭仁

第 14 回放射性医薬品・画像診断薬研究会, みやこめっせ (京都府京都市), プログラム p2, 2014.9.13.

肝癌細胞株 HepG2 の放射線耐性獲得に対する Transglutaminase 2 の関与

安彦 亮、齋藤 陽平、桑原 義和、山本 由美、山本文彦、福本 学、大久保 恭仁

第 33 回 分子病理学研究会, 宮城蔵王ロイヤルホテル (宮城県刈田郡), プログラム集 p26, 2014.7.25-26.

Synthesis and initial evaluation of radioiodine labeled A3B-type Lactosome as an imaging probe of tumor and/or inflammation.

Fumihiko Yamamoto, Mitsuharu Kimura, Akira Makino, Yumi Yamamoto, Yohei Saito, Ei-ichi Ozeki, Shunsaku Kimura, Yasuhito Ohkubo.

SNMMI 61th Annual Meeting, St. Louis, Missouri (USA), Abstract book 203P, 2014.6.7-11.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tohoku-mpu.ac.jp/laboratory/ho-sya/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山本 由美 (YAMAMOTO, Yumi)

東北医科薬科大学・薬学部・助手

研究者番号 : 70613446