

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10355

研究課題名(和文) 固形腫瘍の画像診断及びホウ素中性子捕捉療法を目的とした α -2受容体標的薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of a new sigma-2 receptor ligand for imaging and BNCT

研究代表者

小阪 孝史 (Kozaka, Takashi)

金沢大学・学際科学実験センター・助教

研究者番号：50579836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍の画像診断とホウ素中性子捕捉療法の融合を目的として、 α -2受容体に高い親和性と選択性をもつホウ素含有イメージング剤の開発研究を行った。様々なvesamicol類縁体のデザインと有機化学合成、in vitroスクリーニングを行い、 α -2受容体に高い親和性を示したホウ素含有化合物とヒト悪性黒色腫A375細胞を用い、in vitro薬物細胞内取り込み実験を行ったが、残念ながら全てのサンプルにおいてホウ素の含有量は10 ng/mL未満であった。しかしながら、limonene骨格を有する新規化合物が α -1受容体と比べて14倍以上という高い α -2受容体選択性を示すことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

α -2受容体は、乳がんや悪性黒色腫など多様な固形腫瘍細胞において高い発現が認められる上、増殖状態ではその発現が著しく増加していることが知られている。その機構はまだ不明な点が多いが、 α -2受容体アンタゴニストが抗がん作用を示すことも報告されている。今回開発したlimonene骨格を有する新規化合物は高い α -2受容体選択性を示すことから、PETやSPECTによる腫瘍イメージング剤や抗がん剤のリード化合物として更なる研究を行う価値があると考えている。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of the fusion of tumor image diagnosis and the boron neutron capture therapy, I had studied the development of the boron-containing imaging agent to have high affinity and selectivity to α -2 receptor. Various new designed vesamicol relatives showed high affinity to α -2 receptor in in vitro screening. The boron-containing compound were performed the in vitro cellular uptake test using human malignant melanoma A375 cells, but the content of boron in all samples were 10 ng/mL. However, I found that new compounds having limonene frame showed 14 times more α -2 receptor affinity than α -1 receptor affinity.

研究分野：放射線化学

キーワード：vesamicol

1. 研究開始当初の背景

現在、がん(悪性腫瘍)は日本で死因の約3割を占めており、高齢化が急速に進む我が国において、がんの早期診断・早期治療法の開発はニーズの高い喫緊の課題である。近年、がん克服の新たな手法として、PET(Positron Emission Tomography; ポジトロン断層法)や SPECT(Single Photon Emission Computed Tomography; 単一光子放射断層撮影)を用いた画像診断法と BNCT(Boron Neutron Capture Therapy; ホウ素中性子捕捉療法)という治療法の融合が注目されている。PET や SPECT は、被検者もしくは患者に投与した放射性医薬品から放出されるガンマ線を検出することで、生体の機能や疾患を観察する手法であり、身体への負担が少なく(非侵襲的)、小さな早期がん細胞でも見つけることが出来るという特長を有する。また BNCT は、腫瘍細胞に取り込まれたホウ素(^{10}B)に対して、体外からエネルギーの低い中性子を照射することにより、発生したアルファ線が腫瘍細胞のみを選択的に破壊する治療方法である。エネルギーの低い中性子は、正常な細胞に対して殆ど影響も与えず通過する為、がん患者の身体への負担が少ない。また、以前は中性子源としては原子炉を使用しなくてはならず、がん治療法として普及する上での制約となっていたが、近年では加速器を用いた中性子源が開発され、一般の医療機関への導入が可能となった。以上のように、PET/SPECT と BNCT の融合は、がんの早期診断・治療に有力な手法となりうる可能性をもつが、腫瘍細胞に特異的に結合するホウ素薬剤の開発が必要不可欠であり、本手法の臨床応用において大きな制約となっている。

2. 研究の目的

本研究では増殖期の固形腫瘍細胞の重要なバイオマーカーである α -2(シグマ-2)受容体に着目し、 α -2 受容体が高い親和性と選択性をもつホウ素含有イメージング剤の開発及びその治療法への応用の可能性を検討する。 α -2 受容体は、乳がんや悪性黒色腫など多様な固形腫瘍細胞において高い発現が認められる上、増殖状態ではその発現が著しく増加していることが知られている。即ち、 α -2 受容体は増殖期の固形腫瘍細胞の重要なバイオマーカーであり、 α -2 受容体イメージングは、がんの早期発見や増殖能診断に有効な手段となる可能性を意味している。申請者はこれまでの研究で α -2 受容体と小胞アセチルコリントランスポーター(VAChT)に親和性を有する化合物 vesamicol に着目し、 α -2 受容体に対して高い親和性と選択性を示す新規 vesamicol 類似体 PIDV (*p*-iodo-*trans*-decalinvesamicol)の合成に成功し、その放射性ヨウ素標識や動物実験、SPECT-CT 撮像実験により、PIDV の分子評価を行ってきた。本研究は、有機合成化学や放射性核種での標識や動物実験など、申請者の多岐にわたる専門知識・技術を生かして、PIDV をリード化合物とした複数のホウ素化合物を合成および生物学的評価を行い、がんの画像診断(α -2 受容体イメージング)と治療(BNCT)の両方に応用可能なホウ素薬剤の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

がんの画像診断と治療の両方に応用可能なホウ素薬剤を開発するにあたり、合成した新規化合物が以下の4つの性質を全て満たしているか評価する必要がある。

-) 分子内を SPECT/PET 用放射性核種で標識可能
-) 分子内にホウ素を有する
-) 固形腫瘍細胞への高い親和性と選択性
-) 画像診断及び治療に適した腫瘍細胞内の滞留時間とクリアランス

受容体は、 α -1 と α -2 の二つのサブタイプが確認されており、種々の癌細胞において過剰発現していることが報告されている。固形腫瘍細胞における結合部位の標的には α -2 受容体を選択し、以下の工程で研究を進める計画を立てた。

1) 高い α -2 受容体親和性・選択性を示す PIDV の化学構造を基に構造活性相関を考察して、様々な類似構造体や誘導体を合成する。本研究では、フェニルピペリジン骨格を維持したまま、脂溶性や立体的高さが異なる様々な構造変換やベンゼン環上オルト位、メタ位への水酸化ホウ素基を導入した PIDV 類似構造ホウ素化合物群の合成を試みる。

2) 上記の新規化合物群を *in vitro* 薬物阻害実験によりスクリーニングし、より選択性の高い α -2 受容体リガンドを絞り込んでいく。

3) α -2 受容体の過剰発現が知られているヒト乳がん細胞株 MCF-7 やヒト悪性黒色腫 A375 細胞を用いて、*in vitro* 薬物腫瘍細胞内取り込み実験を行う。

4) 得られた高選択的 α -2 受容体リガンドの SPECT 用放射性核種による標識(tracer 化)として [^{125}I]標

識を行う。

5)上記の腫瘍細胞(MCF-7 もしくは A375)を移植した担癌マウスに¹²⁵I]標識体を投与し、腫瘍細胞への集積や体内動態を明らかにする。

6)担癌マウスに¹²³I]標識体を投与し、標識体が増殖期の固形腫瘍細胞に特異的に集積するかをSPECT-CT 撮像実験で明らかにする。標識体の集積を画像で確認することが出来れば、増殖期の固形腫瘍細胞に特異的なホウ素薬剤の集積を確認したことになる。

上記 1~6 を行うことにより、増殖期の固形腫瘍細胞の画像診断を可能にし、がんの効果的な治療法を新たに開発する。

4. 研究成果

1) PIDV の化学構造を基にベンゼン環上に F(フッ素)と B(ホウ素)の両方の元素を含む新規含ホウ素化合物群のデザインと合成を行った。PIDV のデカリン骨格を vesamicol 本来のシクロヘキサン骨格に戻し、オルト位とパラ位にそれぞれ F と Br(臭素)を有する化合物を合成した。続いて Br を B で置換してホウ素化合物へと誘導した。その他、(+)-limonene oxide (mixture of *cis* and *trans*), -pinene oxide, exo-2,3-epoxynorbornane などの epoxy 体と 4-phenylpiperidine のカップリング反応を行い、様々な構造の vesamicol 類縁化合物群を合成した。エポキシ体の立体構造が大きくなるほど反応性は鈍化したので、マイクロウェーブ合成装置 (Initiator+™, Biotage 社) で長時間加熱するなど工夫を行った。しかしそれでも目的とするカップリング反応生成物は得られないことが多々あり、有機化学合成における制限が研究進行のボトルネックとなった。

2) Vesamicol は、受容体 (-1 受容体, -2 受容体)と小胞アセチルコリントランスポーター (VACHT) の3つに親和性を示す為、in vitro 薬物阻害実験により、合成した新規 vesamicol 類縁化合物群についてスクリーニングを行った。実験に使用した組織およびラジオリガンドは、-1 受容体親和性が評価対象の場合はラット脳ホモジネートと³H](+)-pentazocine, -2 受容体の場合はラット肝ホモジネートと³H]DTG (-1 受容体のマスキングに(+)-pentazocine を加えた)、また VACHT の場合ではラット脳ホモジネートと³H](-)-vesamicol (受容体のマスキングに DTG を加えた)を用いた。それぞれの試薬・組織と阻害剤(試験化合物)10 濃度を試験管にとり、37 °C でインキュベーションした(受容体: 90 分間, VACHT: 60 分間)。その結果、パラ位に F を、オルト位に Br もしくは B を有する vesamicol 類縁体は、いずれも -1 受容体に高い親和性を示し、-2 受容体にも vesamicol より高い親和性を示した。また、limonene 骨格を有する vesamicol 類縁体は、-2 受容体に対して vesamicol と同程度の親和性を示す一方、-1 受容体親和性は低く、-2 受容体選択性は 14 倍以上あることが分かった。

3) 次に、受容体を高発現していることが知られているヒト悪性黒色腫 A375 細胞を用い、ベンゼン環上にホウ素を有する vesamicol 類縁体の in vitro 薬物細胞内取り込み実験(30, 60, 120, 240 分)を行った。6-well plate に細胞数 4×10^5 [個/well] / 1.5 [mL of 培地] を巻き、実験 24 時間前に培養(37 °C, 5% CO₂)した。実験では、まず培養液を除去した後、ホウ素化合物(0.3 mM, DMSO 1% 添加) RPMI-1640 メディウムを加え、30, 60, 120 および 240 分間、反応させた(37 °C, 5% CO₂)。反応終了後、反応液を除去した後、水酸化ナトリウム水溶液で細胞を溶解させた。得られたサンプルにおけるホウ素含有量を調べるべく、ICP 質量分析法で測定 (Agilent Technologies 社 7700x, JAPAN TESTING LABORATORIES 株式会社に送付して依頼)したが、残念ながら全てのサンプルにおいてホウ素の含有量は 10 ng/mL 未満であった。即ち、BNCT に必要なホウ素の集積は見られなかった。

4) しかしながら実験の過程において、新規に合成した limonene 骨格を有する vesamicol 類縁体が高い -2 受容体親和性及び選択性を有することが分かった。以前開発した PIDV は基質合成に多くの手間と費用が必要なのに対し、limonene 誘導体は合成が容易であるという利点もあり、-2 受容体選択的リガンドのリード化合物として、更なる応用研究を行う価値を見出した。-2 受容体の腫瘍細胞における働きなどについてはまだ不明な点が多いが、固形がんの増殖を亢進することが明らかになっており、またそれらのアンタゴニストが抗がん作用を示すことも報告されている。しかしながら、未だ -2 受容体選択的リガンドは開発段階に留まっている。-2 受容体選択性が 14 倍以上ある新規化合物を合成したことは、本研究の成果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuma Ogawa, Ryohei Masuda, Yoshiaki Mizuno, Akira Makino, Takashi Kozaka, Yoji Kitamura, Yasushi Kiyono, Kazuhiro Shiba, Akira Odani	4. 巻 61
2. 論文標題 Development of a novel radiobromine-labeled sigma-1 receptor imaging probe	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 28-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nucmedbio.2018.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shigeno T, Takahashi M, Kozaka T, Kitamura Y, Kamide M, Hamamoto M, Yoshida K, Ogawa K, Shiba K.
2. 発表標題 Usefulness of radioiodinated 2-[4-(2-iodophenyl)piperidino]cyclopentanol(OI5V) for early diagnosing neurodegenerative disorder caused by stress.
3. 学会等名 12th World Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology. (Melbourne, Australia) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋茉衣夏、茂野泰貴、小阪孝史、北村陽二、上出茉歩、濱本萌凧、吉田楓、小川数馬、柴 和弘
2. 発表標題 ストレス性精神疾患の早期診断用新規イメージング剤の開発
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会（沖縄コンベンションセンター，沖縄）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小阪孝史、高橋茉衣夏、北村陽二、池田朝海、小川数馬、柴 和弘
2. 発表標題 VAChTイメージング剤(OIDV)の脳内移行性におけるP糖蛋白の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会（幕張メッセ，千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋茉衣夏, 小阪孝史, 北村陽二, 池田朝海, 小川数馬, 柴 和弘
2. 発表標題 [125I]0I5Vによる15q重複Tgマウス(自閉症マウス)の脳内 -1受容体密度測定
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会(幕張メッセ, 千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴 和弘, 高橋茉衣夏, 北村陽二, 小阪孝史, 池田朝海, 小川数馬
2. 発表標題 ストレス負荷マウスにおけるコリン作動性神経系(VAChT)の変化
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会(幕張メッセ, 千葉)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 茂野泰貴, 小阪孝史, 北村陽二, 小川数馬, 柴 和弘
2. 発表標題 新規SPECT用シグマ-1受容体イメージング剤の開発研究
3. 学会等名 第12回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Taiki Shigeno, Takashi Kozaka, Yoji Kitamura, Rina Ishiyama, Kazuma Ogawa, Kazuhiro Shiba
2. 発表標題 Characteristics of 2-[4-(2-iodophenyl)piperidino]cyclopentanol(0I5V) as a new sigma-1 receptor imaging agent
3. 学会等名 2017 SNMMI 64th annual meeting(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 茂野泰貴、小阪孝史、北村陽二、小川数馬、柴 和弘
2. 発表標題 [123I]0I5Vの新規シグマ-1受容体イメージング剤としての評価
3. 学会等名 第15回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----