

総合論文

シグマ-1 受容体標的放射性プローブの開発

小川 数馬^{*1}, 増田 涼平², 柴 和弘³

シグマ-1 受容体は中枢^{しょう}や末梢神経系において情報伝達物質放出の調節に関係していることが判明しており, 統合失調症, ストレス性疾患, 認知症, 筋萎縮性側索硬化症 (ALS), 癩^{かみ}など多くの疾患との関係も報告されている。したがって, シグマ-1 受容体を定量化できれば, 種々の疾患の病態生理, 進行度 (重症度) の把握, 早期診断が可能と成り得ると共に治療指針決定のための情報が得られる可能性がある。放射性プローブを投与し, そのプローブから放出される放射線を専用のカメラで画像化する, いわゆる, ポジトロン断層撮影 (Positron Emission Tomography, PET) や単一光子放射断層撮影 (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT) を用いた分子イメージング (核医学診断) により, 非侵襲的に生体内の代謝や機能を定量可能であり, 現在, PET や SPECT を用いる核医学診断の手法のみがシグマ-1 受容体を定量可能である。そのため, シグマ-1 受容体を特異的に画像化する分子プローブの開発の期待は大きい。本稿では, 著者らが進めてきたシグマ-1 受容体を標的とした放射性ハロゲン標識分子プローブの開発についての研究成果を紹介する。

1 はじめに

放射性核種で標識した化合物 (放射性プローブ) を静脈内から投与し, 分布後, 標的部位に集積した放射性プローブから放出される放射線をポジトロン断層撮影 (Positron Emission Tomography, PET) や単一光子放射断層撮影 (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT) カメラで検出, 画像化し, その画像情報から診断を行う手法が核医学診断である。代表的な放射性プローブとして [フッ素-18]2-フルオロ-2-デオキシ-D-グルコース ([¹⁸F] 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, [¹⁸F]FDG) がある。 [¹⁸F]FDG はグルコースの類似体であり, グルコースと同様にグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれ, ヘキソキナーゼにより 6 位の水酸基がリン酸化される。しかしながら, グルコースとは異なりその後の酵素認識を受けないため, [¹⁸F]FDG-6-リン酸が細胞内にトラップされ, 結果, 糖代謝が進んだ組織に高集積を示す。このような性質を利用して, 主に癌^{がん}の病期診断や再発診断などに高い有用性を示し, 現在, FDG-PET は核医学診断で最も有名な検査と言っても過言ではない。

核医学画像の最も大きな特徴は, X 線コンピュータ断層撮影 (Computed Tomography, CT) 画像のような形態画

像ではなく, 機能画像であるということである。つまり, 投与する放射性プローブに依存して, 代謝機能, 血流量, 種々の受容体発現量など, 様々な生体内機能を定量評価可能であり, 病態診断に応用することができる。

2 イメージングによる受容体の定量

ポジトロン放出核種で標識した受容体リガンドを患者 (被験者) に投与し, PET イメージング後の画像解析により標的受容体の定量が可能である。その技術を応用し, 被検薬と標識した受容体リガンドを競合的に受容体へ結合させることで, 被検薬による受容体占有率を求めることができる。

受容体占有率は, 組織中の受容体に対して薬剤が結合している受容体の割合を示すものであり, 用量に応じた薬効の予測や薬物の作用機序の検証に用いられる。特に, 脳内受容体を標的とした薬剤評価への有用性は著しく高い¹⁾。

一例として, ヒスタミン H₁ 受容体に対する抗ヒスタミン薬の受容体占有率の研究があげられる²⁾³⁾。抗ヒスタミン薬はヒスタミン H₁ 拮抗薬として働き, 抗アレルギー作用や抗炎症作用を示す。しかしながら, 副作用として, 中枢のヒスタミン H₁ 受容体に抗ヒスタミン薬が結合した際に眠気, 疲労感, 認知機能障害が生じる。したがって, このような鎮静性副作用を伴わない抗ヒスタミン薬の開発が重要視され, 進められてきた。副作用の客観的評価を目的として, 放射標識ヒスタミン H₁ 受容体リガンドである [炭素-11] ([¹¹C]) ドキセピンを用いて抗ヒスタミン薬の中枢ヒスタミン H₁ 受容体占有率が測定された。上市されてい

* E-mail: kogawa@p.kanazawa-u.ac.jp

¹ 金沢大学新学術研究創成機構: 920-1192 石川県金沢市角間町

² 金沢大学大学院医薬保健総合研究科: 920-1192 石川県金沢市角間町

³ 金沢大学学際科学実験センター: 920-0842 石川県金沢市宝町 13-1

る抗ヒスタミン薬を調査した結果、受容体占有率が大きいほど鎮静性が強く誘発されており、PETによる受容体占有率測定の有用性が示された。現在も新しい抗ヒスタミン薬は開発されているが、受容体占有率を評価することで、患者の症状からではなく、客観的かつ高精度の副作用予測が可能となるため、臨床開発の迅速化が期待できる。

投与量設定、薬効・副作用予測など、臨床開発のための受容体占有率測定は有用であり、特定の受容体においては、確立された評価法の一つである。

3 シグマ受容体

3.1 シグマ受容体の特性

シグマ受容体は、1970年代にオピオイド受容体のサブタイプとして発見されたが⁴⁾、異なった特性を持つことより、後に独自の受容体として再分類された⁵⁾。シグマ受容体には、二つのサブタイプが確認されている。シグマ-1受容体は25.3 kD、233個のアミノ酸からなる膜貫通受容体であり、単離精製され多種の組織でクローニングされている⁶⁾。細胞内の主に小胞体膜上に局在する細胞内受容体であり、脳内では部位特異的に、神経細胞、グリア細胞内に発現している。そして、シャペロン分子として他の生理的に重要な機能を有するタンパク質に作用し、情報伝達物質放出などの生理機能を調節し、記憶や認識等に関係していることが報告されている⁷⁾。シグマ-2受容体は21.5 kDのタンパクであり、近年、プロゲステロン受容体膜成分1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1; PGRMC1) と相同性を示すという報告がなされている⁸⁾。本稿では、シグマ-1受容体について解説していく。

3.2 シグマ-1受容体と疾患との関連

これまでにシグマ-1受容体と様々な疾患との関連が報告されており、そのいくつかを紹介する。

統合失調症患者の死後脳ではシグマ-1受容体が減少しており⁹⁾、シグマ-1受容体アンタゴニストが統合失調症動物モデルにおいてその症状を改善することが報告されている¹⁰⁾。

また、シグマ-1受容体は学習・記憶メカニズムと密接に関係があることも知られている。シグマ-1受容体アンタゴニストは、海馬におけるグルタミン酸神経系の神経活動の亢進、大脳皮質前頭葉や海馬におけるアセチルコリンの遊離促進作用があり¹¹⁾、学習・記憶障害を改善することも報告されている¹²⁾。

ストレス性疾患との関係も報告されている。現代の社会環境では多くの人々が様々な精神的ストレスを受けており、うつ病や不安神経症などのストレス性疾患が年々増加している。ストレス性疾患の発症機序については十分に解明されていないが、シグマ-1受容体アンタゴニストが強制水泳

による無動状態や恐怖条件付けストレス反応を緩和することが報告されている¹³⁾。

また、薬物依存との関係も報告されている。依存性薬物の中でもコカインはシグマ-1受容体に対して高い親和性を有し¹⁴⁾、シグマ-1受容体アンタゴニストによりコカインの報酬効果が消失することが報告されている¹⁵⁾。したがって、シグマ-1受容体アンタゴニストはコカイン依存症の治療薬と成る可能性を有する。

近年の研究で、シグマ-1受容体と筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS) との関連も報告されている。ALSは、運動ニューロンが変性・消失していく、筋萎縮と筋力低下を主症状とする原因不明の疾患である。シグマ-1受容体とALSとの関連を示す研究として、シグマ-1受容体ノックアウトマウスにおいて、運動機能異常と運動神経の壊死が観察されること¹⁶⁾、ALS患者において、シグマ-1受容体遺伝子変異とシグマ-1受容体タンパク機能不全が生じること報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。

つまり、シグマ-1受容体をPETやSPECTで画像化・定量化することにより、アルツハイマー病を含む認知症や種々の精神神経疾患の病態生理、進行度(重症度)の把握、ALS早期診断が可能と成り得ると共に治療指針決定のための情報が得られる可能性がある。現在、PETやSPECTを用いる核医学診断的手法のみがシグマ-1受容体を定量可能である。それに加えて、薬物のシグマ-1受容体占拠率の評価も可能であり、薬効評価の新たなツールとなることも期待される。このようなPETやSPECTなどの核医学診断的手法を用いるためには、有用な分子プローブの存在が必須である。そのため、シグマ-1受容体を特異的に画像化可能な分子プローブの開発の期待は大きい。

一方、シグマ-1受容体は癌研究領域でも注目されている受容体である。シグマ-1受容体は種々の癌細胞において高密度に発現し¹⁹⁾、シグマ-1受容体アンタゴニストは腫瘍の増殖を亢進し、その効果はアンタゴニストにより阻害されることが報告されている²⁰⁾。つまり、シグマ-1受容体の活性化は腫瘍増殖を促進する可能性が示されている。一方、シグマ-1受容体アンタゴニストは強い抗癌活性を持ち、癌組織以外へは低毒性であることも報告されている²¹⁾。このことは、シグマ-1受容体が抗癌剤の標的と成り得ることを示しており、癌領域においても、シグマ-1受容体イメージングプローブの開発が熱望されている。

4 プローブ開発

4.1 シグマ-1受容体イメージングプローブ

著者らはこれまでにアセチルコリントランスポーターイメージングプローブ開発の過程で、小胞アセチルコリントランスポーター (VACHT) に対して高い親和性を持つベサミコール (vesamicol) 誘導体がシグマ受容体にも高い親和

性を持つことを見いだした。そこで, vesamicol (Fig. 1, 1) のベンゼン環の異なる位置にヨウ素を導入した化合物をそれぞれ合成し (Fig. 1, 2-4), 放射性シグマ受容体リガンドとして [水素-3]ペンタゾシン ($[^3\text{H}]$ pentazocine) と $[^3\text{H}]$ 1,3-ジ-*o*-トリルグアニジン ($[^3\text{H}]$ -1,3-*o*-di-tolylguanidine, $[^3\text{H}]$ DTG) を用いたシグマ受容体との競合阻害結合実験により受容体への親和性を調べた²²⁾²³⁾。その結果, シグマ-1 受容体リガンドであるペンタゾシンやハロペリドールより, シグマ-1 受容体への高い親和性を有する vesamicol 誘導体 $\{(+)-2-[4(4\text{-iodophenyl})\text{piperidino}] \text{ cyclohexanol } (+)-p\text{IV}\}$ (Fig. 1, 4) を見いだすことに成功した (Table 1)。この $(+)-p\text{IV}$ のシグマ-1 受容体への結合親和性 ($K_i = 1.30 \text{ nmol L}^{-1}$) はシグマ-2 受容体への結合親和性 ($K_i = 20.4 \text{ nmol L}^{-1}$) に対して 16 倍高く, VAcHT への親和性 ($K_i = 1260 \text{ nmol L}^{-1}$) は $(-)$ -vesamicol の VAcHT への親和性 ($K_i = 13.0 \text{ nmol L}^{-1}$) と比べて顕著に低かった。すなわち, $(+)-p\text{IV}$ のシグマ-1 受容体に対する高い選択性が示された²³⁾。

4.1.1 放射性ヨウ素標識シグマ-1 受容体イメージングプローブ ヨウ素には SPECT 用核種として現在臨床で多く利用されているヨウ素-123 (^{123}I), PET 用核種として研究されている ^{124}I , 治療用核種として古くから甲状腺癌治療に用いられている ^{131}I など核医学領域で有用な放射性同位元素が存在する。本研究では, 半減期が長く, 基礎研究では取り扱い易い ^{125}I を主に用いて研究を行った (Table 2)。

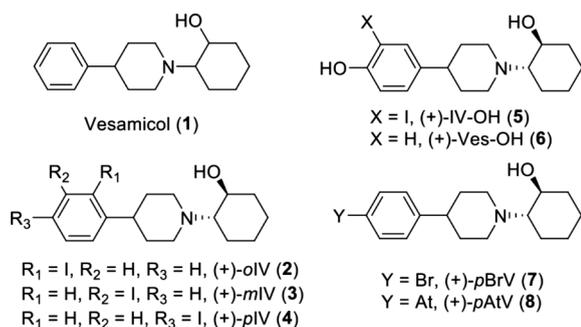


Fig. 1 Structures of vesamicol analogs

脳内シグマ-1 受容体イメージングプローブとしての有用性を確認することを目的に, $(+)-p\text{IV}$ の放射性ヨウ素標識体 $(+)-[^{125}\text{I}]p\text{IV}$ を標識合成し, 評価を行った。その結果, 体内放射能分布実験でラット脳への高い放射能集積 (約 3 % ID) が示された。阻害実験では, シグマ-1 受容体リガンドであるペンタゾシン (5.0 μmol), ハロペリドール (0.5 μmol), SA4503 (0.5 μmol) の同時投与によりラット脳への集積が有意に低減した (コントロール群の 30~59 %). $(+)-[^{125}\text{I}]p\text{IV}$ 静脈内投与 45 分後にラット脳を取り出し, 凍結切片を作製後, *ex vivo* オートラジオグラフィを行った結果, $(+)-[^{125}\text{I}]p\text{IV}$ は, 海馬, 歯状回, 梨状皮質, 小脳, 脳運動神経核といったシグマ-1 受容体が豊富な領域への高い局在を示し, それら集積はシグマ-1 受容体リガンドの同時投与により劇的に減少した (Fig. 2)。したがって, $(+)-[^{125}\text{I}]p\text{IV}$ は脳内のシグマ-1 受容体に結合し, 受容体の発現量に依存した分布を示したことから, 放射性ヨウ素標識

Table 1 Affinities (nM) of vesamicol analogs for the sigma-1 receptor

	Sigma-1 K_i (nM)
$(+)-o\text{IV}$	14.6 ± 1.7
$(-)-o\text{IV}$	62.2 ± 12.0
$(+)-m\text{IV}$	2.5 ± 0.5
$(-)-m\text{IV}$	4.5 ± 0.5
$(+)-p\text{IV}$	1.3 ± 0.5
$(-)-p\text{IV}$	2.7 ± 0.9
$(+)-p\text{BrV}$	1.7 ± 1.1
$(-)-p\text{BrV}$	4.3 ± 2.0
$(+)-\text{IV-OH}$	22.8 ± 6.3
$(-)-\text{IV-OH}$	45.5 ± 9.8
$(+)-\text{Vesamicol}$	19.1 ± 1.8
$(-)-\text{Vesamicol}$	74.9 ± 4.8
$(+)-\text{Ves-OH}$	178 ± 25
$(+)-\text{Pentazocine}$	10.0 ± 1.1
Haloperidol	6.4 ± 0.7

K_i values derived from IC_{50} values according to the equation: $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + C / K_d)$, where C is the concentration of the radioligand, and each K_d is the dissociation constant of the corresponding radioligand ($(+)-[^3\text{H}]$ pentazocine to sigma-1 ($K_d = 19.9 \text{ nM}$)). Values are means ± SEM of three or four experiments. Data from reference; 22)25)30)31).

Table 2 Characteristics of radiohalogens

Radionuclide	Half-life	Type of emission	Application	Energy of main radiation
F-18	109.8 min	β^+	PET	511 keV
I-123	13.3 h	γ	SPECT	159 keV
I-124	4.2 day	β^+	PET	511 keV
I-125	59.4 day	γ	Basic research	35.5 keV
I-131	8.0 day	γ/β^-	Therapy	364 keV (γ), 606 keV (β^-)
Br-76	16.2 h	β^+	PET	511 keV
Br-77	57.0 h	γ	Basic research	239 keV, 521 keV
At-211	7.2 h	α	Therapy	5.9 MeV, 7.4 MeV*

*Radiation from ^{211}Po , which is a daughter nuclide of ^{211}At .

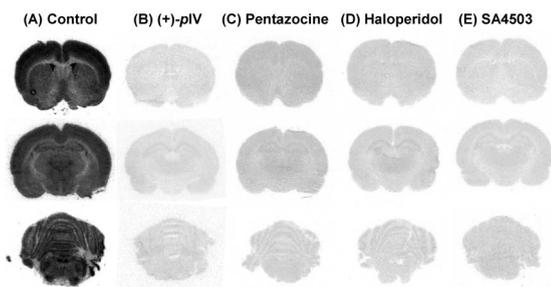


Fig. 2 *Ex vivo* autoradiograms of (+)-[¹²⁵I]pIV in the rat brain 45 min postinjection

(A) (+)-[¹²⁵I]pIV, (B) (+)-[¹²⁵I]pIV with (+)-pIV (1.0 μmol kg⁻¹), (C) (+)-[¹²⁵I]pIV with Pentazocine (5.0 μmol kg⁻¹), (D) (+)-[¹²⁵I]pIV with Haloperidol (1.0 μmol kg⁻¹), (E) (+)-[¹²⁵I]pIV with SA4503 (1.0 μmol kg⁻¹).

(+)-pIV のシグマ-1 受容体イメージングプローブとしての有用性が示唆された²⁴⁾.

一方、癌イメージングプローブとしての有用性を評価することを目的に、シグマ-1 受容体が過剰発現している DU-145 ヒト前立腺癌細胞を皮下移植することにより担癌マウスを作製し、(+)-[¹²⁵I]pIV 投与後の体内放射能分布を評価した。その結果、投与早期から癌組織へ高く集積し(投与後 1 時間で 6.27 ± 1.00 % ID/g)、癌/血液、癌/筋肉放射能集積比はそれぞれ高値を示した(癌/血液: 投与後 1, 24 時間で 26.20 ± 4.23, 12.39 ± 0.98, 癌/筋肉: 投与後 1, 24 時間で 2.72 ± 0.55, 14.30 ± 2.76)。また、シグマ-1 受容体リガンドであるハロペリドール、SA4503、(+)-pIV を過剰量 (10 μmol/kg) 同時投与することによる阻害実験を行った結果、(+)-[¹²⁵I]pIV の癌組織への集積はシグマ-1 受容体リガンドの同時投与により有意に低下し(非投与群の 37~72 %), (+)-[¹²⁵I]pIV の癌集積はシグマ-1 受容体を介していることが示唆された²⁵⁾。しかしながら、非特異的組織、特に肝臓への放射能集積も高く、その放射能は滞留したことから(投与後 1, 24, 48 時間で 16.91 ± 0.79, 15.23 ± 0.62, 5.24 ± 0.41 % ID/g)、癌イメージングの妨げになることが懸念された。一方、(+)-[¹²⁵I]pIV は、膵臓、肺、腎臓にも高い集積を示した(Fig. 3 (+)-[¹³¹I]pIV の体内放射能分布参照)。肺と腎臓におけるシグマ受容体の発現が報告されていること²⁶⁾²⁷⁾、(+)-[¹²⁵I]pIV の肺、腎臓への放射能集積はシグマ-1 受容体リガンドの過剰量同時投与により低減すること(未発表データ)から、集積の一部はシグマ-1 受容体に起因するものと考えられる。膵臓への集積は、(+)-[¹²⁵I]pIV などの vesamicol 誘導体だけではなく、他のシグマ-1 受容体高親和性放射性プローブも膵臓へ高く集積することが他の研究者からも報告されている²⁸⁾²⁹⁾。したがって、膵臓への高集積の一部もシグマ-1 受容体に起因するものであると推測していたが、著者らの研究では、

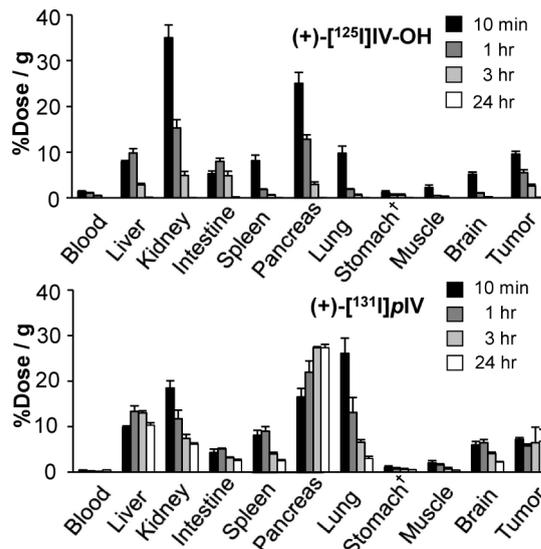


Fig. 3 Biodistribution of radioactivity after the concomitant intravenous injection of (+)-[¹²⁵I]IV-OH and (+)-[¹³¹I]pIV at 10 min, 1 h, 3 h, and 24 h in tumor-bearing mice

†Data are expressed as % injected dose.

(+)-[¹²⁵I]pIV の膵臓への放射能集積はシグマ-1 受容体リガンドの過剰量同時投与によりは低減せず、また、過去の報告においても、過剰量のリガンドによりプローブの集積が低減する報告²⁸⁾と低減しない報告²⁹⁾があり、その機序は不明である。

4・1・2 体内動態改善を目指したプローブ開発 一般的に肝臓への移行性は化合物の脂溶性が関与していると考えられており、前述の(+)-[¹²⁵I]pIV の肝臓への放射能集積も化合物の高い脂溶性に起因していると推測した。そこで、より癌特異的な集積を示す化合物の開発を目指して、水溶性を向上させるためにベンゼン環に水酸基を導入した化合物(+)-4-[1-(2-hydroxycyclohexyl)piperidine-4-yl]-2-iodophenol [(+)-IV-OH] (Fig. 1, 5) を設計、合成し、評価を試みた³⁰⁾。合成した誘導体のシグマ受容体への親和性を前述と同様のシグマ受容体との競合阻害結合実験により評価した結果、IV-OH は pIV などの vesamicol 誘導体と同様に (+) の光学異性体の方が高親和性を示したが、(+)-IV-OH は (+)-pIV に比べ親和性が低下した (Table 1)。(+)-Vesamicol に水酸基を導入した(+)-Ves-OH (Fig. 1, 6) が (+)-vesamicol に比べ著しく親和性を低下させたことから、ベンゼン環への水酸基導入が vesamicol 誘導体の受容体親和性を低下させたものと考えられる。

まず、設計の意図通り (+)-IV-OH の水溶性が向上しているかを確認するため、(+)-[¹²⁵I]IV-OH を作製し、1-オクタノール/水分配係数を測定した。その結果、log P 値は、1.13 ± 0.01 であり、(+)-[¹²⁵I]pIV の 2.08 ± 0.02 と比較して

低値であることから水溶性の向上が確認された。次いで、(+)-IV-OHの癌集積性、体内動態を評価するため、(+)-[¹²⁵I]IV-OHをDU-145 担癌マウスに投与後の体内放射能分布実験を行った。(+)-pIVの体内動態改善を目的として(+)-IV-OHを設計、合成したため、(+)-pIVと比較する必要がある。(+)-[¹²⁵I]pIVで行った実験と同様の方法で作製した担癌マウスを用いているため、取得済みのデータと比較することも可能である。しかし、NaI (TI) シンチレーションガンマカウンターは、ガンマ線のエネルギーを分離して計測することが可能であることから、ヨウ素の異なる放射性同位元素である¹³¹Iを用いて(+)-pIVを標識することにより(+)-[¹³¹I]pIVを作製し、(+)-[¹²⁵I]IV-OHとの混合溶液を同一マウスに投与するダブルトレーサー法により体内放射能分布を直接比較した。¹²⁵Iの放射能は16~71 keV、¹³¹Iの放射能は300~433 keVのエネルギーレンジを測定し、16~71 keVへの¹³¹Iの影響を考慮し、補正した。ダブルトレーサー法は、複数のトレーサーを同一マウスに投与することにより、動物の個体差による影響を排除でき、データの信頼性の向上が期待できる実験方法である。その体内放射能分布実験の結果、ヨウ素アニオンが集積することが知られていることから脱ヨウ素の指標となる胃への放射能集積は低値(それぞれ投与後10分で約1% ID、投与後1時間以降は1% ID以下)であり、(+)-[¹²⁵I]IV-OHと(+)-[¹³¹I]pIVは生体内で脱ヨウ素化がほとんど起こっていないことが示唆された(Fig. 3)。さらに、(+)-[¹²⁵I]IV-OHは(+)-[¹³¹I]pIVに比べ肝臓への集積が減少し、長時間の滞留も観察されず、速やかにクリアランスされることが示された((+)-[¹²⁵I]IV-OH; 投与後10分, 1, 3, 24時間で7.82±0.32, 9.80±0.94, 2.81±0.33, 0.06±0.03% ID/g, (+)-[¹³¹I]pIV; 投与後10分, 1, 3, 24時間で9.83±0.39, 13.31±1.25, 13.05±0.46, 10.28±0.59% ID/g)(Fig. 3)。(+)-[¹²⁵I]IV-OHは(+)-[¹³¹I]pIVに比べほぼすべての組織において速やかなクリアランスが示された。それぞれの化合物の主要組織における(+)-[¹²⁵I]IV-OHと(+)-[¹²⁵I]pIVの代謝安定性を評価した結果、(+)-[¹²⁵I]pIVの方が未代謝物の割合が多く²⁵⁾³⁰⁾、代謝の速度の相違がクリアランス速度に影響している可能性が示された。これら結果より、化合物の脂溶性、代謝物が薬物の動態に大きな影響を与えることが確認され、本薬剤設計の有用性が示された。一方、癌への放射能集積は、投与後早期において(+)-[¹²⁵I]IV-OHは(+)-[¹³¹I]pIVと同等の高い集積を示した((+)-[¹²⁵I]IV-OH; 投与後10分, 1時間で9.55±0.64, 5.45±0.70% ID/g, (+)-[¹³¹I]pIV; 投与後10分, 1時間で7.20±0.40, 5.79±0.37% ID/g)(Fig. 3)。*In vitro*における細胞取り込み実験では、初期の15分間における細胞取り込み量から、ハロペリドール存在下での取り込みを非特異的結合として差し引くと、両プローブとも同程度の値となり、体内放射能分布実験の結果と相関する

結果を示した。また、DU-145 担癌マウスを用い、シグマ-1受容体リガンドであるハロペリドール, SA4503, (+)-pIVの過剰量(10 μmol/kg)同時投与による阻害実験では、リガンド投与により(+)-[¹²⁵I]IV-OHの癌集積は有意に減少し(非投与群の26~58%), (+)-[¹²⁵I]IV-OHの癌集積はシグマ受容体を介して行われていることが示された。

一方、(+)-[¹³¹I]pIVの腫瘍集積が滞留したのに対して、(+)-[¹²⁵I]IV-OHは、他の組織と同様に、癌からの放射能消失も速やかであった{|(+)-[¹²⁵I]IV-OH; 投与後3, 24時間で2.57±0.41, 0.06±0.04% ID/g, (+)-[¹³¹I]pIV; 投与後3, 24時間で6.46±3.42, 6.81±2.60% ID/g}(Fig. 3)。この保持の違いは化合物の受容体親和性の差が影響したと考えられる。(+)-IV-OHと(+)-pIVとでは受容体親和性がK_i値として10倍程の差があり(Table 1)、投与後初期では同程度の集積が観察されたものの、時間経過に伴い親和性の低い(+)-[¹²⁵I]IV-OHはより速やかに癌から消失したと推測される。

4・1・3 放射性臭素標識シグマ-1受容体イメージングプローブ ヨウ素を導入した vesamicol 誘導体である(+)-pIVはシグマ-1受容体への高親和性と高い腫瘍集積性を示したことは前述した。現在、臨床(国内)で用いられている放射性ヨウ素には¹²³Iと¹³¹Iが存在し、核医学診断に主に用いられている放射性ヨウ素は¹²³I(SPECT用核種)である。(+)-pIVのヨウ素の代わりにPET核種である臭素-76(⁷⁶Br)を用い誘導体を作製することでPETイメージングへの応用が可能となる。PETは放出された陽電子が近傍の電子と結合し、消滅の際に180°逆方向に放出される1対の消滅放射線を同時計数することにより画像化しており、測定原理の異なるSPECT(検出器を体の周りを周回させ、様々な角度から平面画像を取得、画像の再構成を行う)に比べて感度、定量性において優れている。画像診断用モダリティとして有用なPETであるが、現在、臨床で用いられるPET核種の多くを占める¹¹Cや¹⁸Fは半減期がそれぞれ20分、110分と短く使用が限定される。対して⁷⁶Brは16時間と¹¹Cや¹⁸Fに比べ長い半減期を有するため(Table 2)、放射合成による減衰は相対的に少なく、標識後に輸送する場合も放射能の減衰は許容される程度である。さらに、時間的制約が減少するため、プローブ投与後の長時間の動態解析が可能(例えば¹¹Cや¹⁸Fではプローブ投与24時間後の分布を画像化することは現実的ではない)である有用な核種である。なお、前述したように¹²⁴IもPET核種であり、比較的長い半減期を有するため(Table 2)、¹²⁵Iを¹²⁴Iに置き換えることにより同様にPETへの応用も可能と考えられる。

臭素導入誘導体を設計する際に考慮すべきである受容体親和性の問題は、ヨウ素と臭素は同族のハロゲン元素であるため置換による受容体への親和性に大きな影響はないと

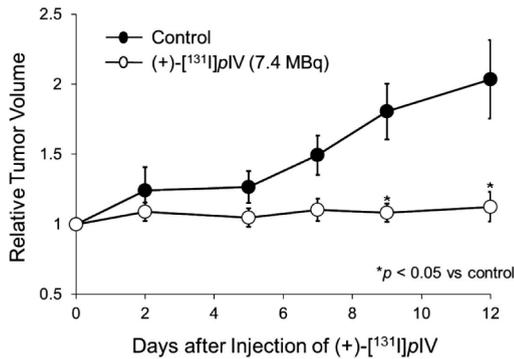


Fig. 4 Curves depicting inhibition of growth of DU-145 on therapy with (+)-[¹³¹I]pIV (circles) compared with no treatment group (squares)

Data are expressed as tumor volume relative to that on the day of treatment (mean ± SEM).

考え、(+)-pIV のヨウ素を臭素に置換した誘導体 (+)-p-bromovesamicol [(+)-pBrV] (Fig. 1, 7) を作製し評価を試みた。なお本研究では、⁷⁶Br よりも長い半減期 (57 時間) を有し、取扱いの容易な ⁷⁷Br を用いて基礎検討を行った³¹⁾。

合成した (+)-pBrV のシグマ受容体への親和性を前述と同様のシグマ受容体との競合阻害結合実験により評価した結果 (Table 1), (+)-pBrV も (+)-pIV と同様にシグマ-1 受容体に対し非常に高い親和性を示し、ヨウ素を臭素に置換したことによる受容体親和性に対する影響はほとんどなかった。放射標識反応は、(+)-[¹²⁵I]pIV と同様に、標識部位にトリブチルスズ基を導入した前駆体からのハロゲンスズ交換反応 1 ステップで行い、53 % の放射化学的収率で (+)-[⁷⁷Br]pBrV を得た。1-オクタノール/水分配係数を測定した結果、(+)-[⁷⁷Br]pBrV と (+)-[¹²⁵I]pIV の log P 値は、それぞれ 1.59 ± 0.01, 2.08 ± 0.02 であり、ヨウ素を臭素に置換することにより、予想以上の水溶性の向上が示された。次いで、(+)-[⁷⁷Br]pBrV と (+)-[¹²⁵I]pIV のダブルトレーサー法により担癌マウスにおける体内放射能分布を評価した。その結果、両プローブは類似した分布傾向を示したが、肝臓における集積は、(+)-[⁷⁷Br]pBrV の方が低値であり ((+)-[¹²⁵I]pIV; 投与後 10 分, 1, 24, 48 時間で 10.95 ± 0.57, 19.02 ± 4.64, 11.99 ± 1.13, 6.21 ± 0.54 % ID/g, (+)-[⁷⁷Br]pBrV; 投与後 10 分, 1, 24, 48 時間で 5.86 ± 0.55, 13.23 ± 2.30, 9.68 ± 0.85, 4.30 ± 0.30 % ID/g), この相違は、水溶性の向上に起因すると推測した。また、シグマ-1 受容体リガンドであるハロペリドール, SA4503 の過剰量 (10 μmol/kg) 同時投与による阻害実験では、(+)-[⁷⁷Br]pBrV の癌集積は有意に減少した (非投与群の 42 ~ 58 %)。したがって、(+)-[⁷⁷Br]pBrV の癌集積はシグマ-1 受容体を介して行われていることが示され、(+)-[⁷⁶Br]pBrV のシグマ-1 受容体標的 PET プローブとしての有用性が示された。

4・2 シグマ-1 受容体標的治療用プローブ

4・2・1 放射線内用療法 投与した放射性プローブから放出される放射線を専用のカメラで検出し、画像化・診断する核医学診断であるが、この時に用いる放射性核種は、透過性が高い γ 線を放出する核種である。細胞殺傷性が高い β 線や α 線を放出する核種を用い、標識化合物 (プローブ) を癌組織に集めることができれば、体の内側から放射線を当てて治療する放射線内用療法を行うことができる。これは、外部から放射線を照射する放射線治療とは異なる全身療法であり、抗癌剤と放射線治療を組み合わせたような治療法である。

これまで、日本国内の放射線内用療法は、β 線放出核種を用いたヨウ化ナトリウム (¹³¹I) カプセル, [ストロンチウム-89] 塩化ストロンチウム ([⁸⁹Sr]SrCl₂, メタストロン), イットリウム-90 (⁹⁰Y) 標識抗 CD20 抗体 (ゼパリン) が保険診療として用いられており、それぞれ甲状腺癌または甲状腺機能亢進症の治療、転移性骨腫瘍の疼痛緩和、B 細胞性非ホジキンリンパ腫の治療を目的としている。

4・2・2 ¹³¹I 標識シグマ-1 受容体リガンド 欧州では、ソマトスタチン受容体を標的として、神経内分泌腫瘍治療を目的とした放射線内用療法が行われている (日本の製薬企業も将来の日本での使用に向けて、2015 年にソマトスタチン受容体標的放射線内用療法用薬剤の国内開発・販売等に関わるライセンス契約を結んでいる) が、シグマ-1 受容体を標的にした放射線内用療法の試みは、臨床研究は勿論のこと、基礎研究においてもこれまでに全く行われていなかった。しかし、前述したように (+)-[¹²⁵I]pIV は担癌マウスにおいて、癌に高い集積と滞留を示したため、著者らは、治療用核種 ¹³¹I を用いた標識プローブ (+)-[¹³¹I]pIV を作製し、DU-145 担癌マウスに対し治療実験を試みた。その結果、(+)-[¹³¹I]pIV 投与群 (7.4 MBq 単回投与) は、コントロール群 (未治療群) に比べ、腫瘍の増殖を有意に阻害し (投与後 12 日で腫瘍体積の治療開始時に対する相対値がコントロール群 2.04 ± 0.28 に対し (+)-[¹³¹I]pIV 投与群 1.12 ± 0.11), (+)-[¹³¹I]pIV はシグマ-1 受容体が過剰発現している癌の治療に対して有効である可能性が示された (Fig. 4)²⁵⁾。

4・2・3 ²¹¹At 標識シグマ-1 受容体リガンド α 線は β 線に比べさらに飛程が短く (β 線の飛程は生体組織内で数 mm に対して α 線は数十 μm), その間に失うエネルギーもより大きいため、より高い線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer, LET) を持つ。そのため、細胞障害性は β 線よりさらに高く、標的部位に効率よく集積させることができれば高い治療効果が期待できるため、近年、非常に注目を集めている。

最近では、α 線放出核種であるラジウム-223 (²²³Ra) の

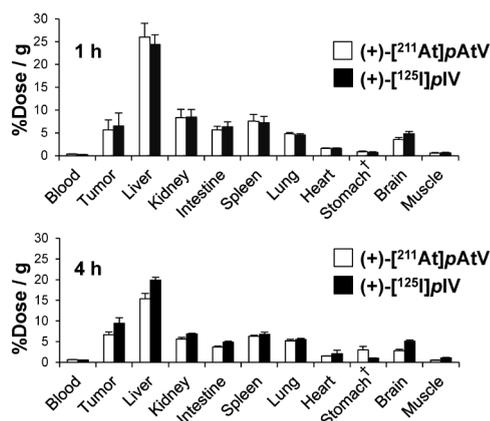


Fig. 5 Biodistribution after concomitant intravenous injection of (+)-[²¹¹At]pAtV (closed columns) and (+)-[¹²⁵I]pIV (open columns) at 1 h and 4 h in tumor bearing mice

†Data are expressed as % injected dose.

臨床試験が行われた。2008年から去勢抵抗性前立腺癌多発骨転移における大規模な第III相臨床試験(ASYMPCA試験)が全世界で実施され、²²³Ra投与群、プラセボ群での全生存期間中央値はそれぞれ14.9か月、11.3か月、骨関連事象発現期間中央値はそれぞれ15.6か月、9.8か月であり、²²³Ra投与により全生存期間及び病的骨折などの骨関連事象発現までの期間の有意な延長が確認された³²⁾。この結果を受け、 α 線を利用した初めての放射性医薬品として米国、欧州で2013年に承認され、日本でも2016年に承認された「塩化ラジウム(²²³Ra)ゾーフィゴ」。同じ転移性骨腫瘍を標的とした⁸⁹Srと²²³Raを比較すると、放出放射線の平均エネルギーはそれぞれ0.58 MeV、27.4 MeV(娘核種の放射線も含んだ累計)と²²³Raの方が数十倍高い。また、前述したように α 線はLETが高いため、DNA二重鎖切断を起こし損傷の修復がしにくく、生物学的効果比(Relative Biological Effectiveness, RBE)も高い。

本研究では α 線放出核種のひとつであるアスタチン-211(²¹¹At)に注目し、シグマ-1受容体を標的とした放射線内用療法用プローブ開発を目指した。²¹¹Atは5.9 MeV、7.4 MeVと高エネルギーの α 線を放出し、短半減期 α 線放出核種の中では比較的半減期が長い($t_{1/2}=7.2$ h)ため(Table 2)、治療用核種としての応用が期待され、現在、研究が盛んに行われている核種である。Atは原子番号85の元素であり、安定同位体は存在せず、既知の放射性同位体の中で最も寿命が長い²¹⁰Atでさえ、その半減期は8.1時間である。そのため、発見から70年以上経つにも関わらず、その特性は未だ完全には明らかになっていない。しかしながら、アスタチンは周期表上ではヨウ素の一つ下段に位置するハロゲン元素であり、他のハロゲンとある程度同様に求核反応や求電子反応を起こすことが知られている。その

ため、²¹¹Atによる放射標識反応は(+)-[^{125/131}I]pIVや(+)-[⁷⁷Br]pBrVと同様、標識部位にトリブチルスズ基を導入した標識前駆体から1ステップで進行し、放射標識が可能であると考えた。そして、標識後、生体に投与する際、(+)-pIVと類似した構造を持つ²¹¹At標識体は、安定性が担保されれば、その体内動態も(+)-[^{125/131}I]pIVと類似し、癌への高集積と保持、高い治療効果が期待できる。そこで、(+)-pIVのIを²¹¹Atに置換した誘導体(+)-[²¹¹At]p-astatovesamicol [(+)-[²¹¹At]pAtV](Fig. 1, 8)を作製し、癌の α 線治療に向けた基礎的検討を行った³³⁾。

放射性プローブの構造を確認する場合、放射標識した化合物の化学量は極めて小さいため、機器分析により評価することは困難なことが多い。そのため、非放射性元素を用いて、対応する化合物を合成、構造を同定し、それぞれの高速度液体クロマトグラフィー(HPLC)の保持時間が一致することにより放射性プローブの構造確認とする方法が一般的である。しかし、アスタチンに安定同位体が存在しないため非放射性(+)-pAtVを作製し、構造決定することができない。そこで、HPLCにおいて(+)-pIVの保持時間と類似の保持時間に(+)-[²¹¹At]pAtVの放射能ピークが出現したことにより、そのピークが(+)-[²¹¹At]pAtV由来であると推定し、評価に用いた。分配係数測定の結果、(+)-[²¹¹At]pAtVのlog P値は 2.14 ± 0.02 であり、(+)-[¹²⁵I]pIV(2.08 ± 0.02)とほぼ同等の値を示した。これは、HPLCの保持時間が類似することとも矛盾がない。(+)-[²¹¹At]pAtVと(+)-[¹²⁵I]pIVのダブルトレーサー法によるDU-145担癌マウスにおける体内放射能分布実験の結果、(+)-[²¹¹At]pAtVは投与後1時間では(+)-[¹²⁵I]pIVと類似の体内分布を示し、癌組織への高集積が観察された。その集積は、投与後4時間においても維持され、(+)-[²¹¹At]pAtVは癌組織への滞留を示すことが予想される(Fig. 5)。したがって、同様のモデルマウスを用いて治療実験を行うことで、腫瘍増殖抑制効果が期待される。一方、投与後1時間ではほとんど体内動態に差は見られなかった両標識体であるが、投与後4時間後には癌組織を含む多くの臓器で(+)-[²¹¹At]pAtVは(+)-[¹²⁵I]pIVに比べ集積は低値を示した(腫瘍において、(+)-[¹²⁵I]pIV; 投与後1, 4時間で $6.52 \pm 2.82, 9.42 \pm 1.34$ % ID/g, (+)-[²¹¹At]pAtV; 投与後1, 4時間で $5.68 \pm 2.14, 6.70 \pm 0.64$ % ID/g)(Fig. 5)。アスタチンはAt⁻として標識化合物から脱離した場合、ヨウ素と同様に胃や甲状腺へ集積することが知られている³⁴⁾。投与後4時間において(+)-[²¹¹At]pAtVは(+)-[¹²⁵I]pIVに比べ胃への集積が高く{(+)-[¹²⁵I]pIV; 0.98 ± 0.11 % ID, (+)-[²¹¹At]pAtV; 2.97 ± 0.87 % ID}、アスタチンと炭素との結合はそれほど安定ではないことが報告されていることから、割合は多くはないと推測されるが、生体内で(+)-[²¹¹At]pAtVの脱アスタチン化が起こり、各臓器での集積の低下に繋がったと考えられる。

²¹¹At は、近年、有用な核種として注目を集めている一方、 α 線全般において言えることではあるが、 α 線の飛程が短いため、腫瘍に均一に分布させなければ腫瘍全体に α 線を照射することできず、固形腫瘍への治療効果は薄いことが懸念されている。そこで、外科的手術後の残存微小腫瘍や微小転移を標的とした α 線治療が期待されており、²¹¹Atを用いた外科的手術後の残存微小腫瘍を標的とした臨床報告もされている³⁵⁾。しかし、固形腫瘍においても、化学療法との組み合わせや β 線との組み合わせにより更なる治療効果が得られる可能性もあり、今後更なる研究を進める必要がある。

謝 辞

本研究の一部は、第21回(2009年度)加藤記念研究助成、第23回(2009年度)北國がん基金研究活動助成、2011年度武田科学振興財団薬学系研究奨励、2010年度松原三郎記念精神医学育成基金研究奨励金により遂行されました。ここに謝意を表します。

文 献

- 1) V. J. Majo, J. Prabhakaran, J. J. Mann, J. S. Kumar : *Drug Discov Today*, **18**, 173 (2013).
- 2) K. Yanai, T. Watanabe, H. Yokoyama, K. Meguro, J. Hatazawa, M. Itoh, R. Iwata, K. Ishiwata, T. Takahashi, T. Ido : *Neurosci Lett*, **137**, 145 (1992).
- 3) K. Yanai, D. Zhang, M. Tashiro, T. Yoshikawa, F. Naganuma, R. Harada, T. Nakamura, K. Shibuya, N. Okamura : *Expert Opin Drug Saf*, **10**, 613 (2011).
- 4) W. R. Martin, C. G. Eades, J. A. Thompson, R. E. Huppler, P. E. Gilbert : *J Pharmacol Exp Ther*, **197**, 517 (1976).
- 5) R. Quirion, W. D. Bowen, Y. Itzhak, J. L. Junien, J. M. Musacchio, R. B. Rothman, T. P. Su, S. W. Tam, D. P. Taylor : *Trends Pharmacol Sci*, **13**, 85 (1992).
- 6) M. Hanner, F. F. Moebius, A. Flandorfer, H. G. Knaus, J. Striessnig, E. Kempner, H. Glossmann : *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 8072 (1996).
- 7) T. Hayashi, T. P. Su : *Cell*, **131**, 596 (2007).
- 8) J. Xu, C. Zeng, W. Chu, F. Pan, J. M. Rothfuss, F. Zhang, Z. Tu, D. Zhou, D. Zeng, S. Vangveravong, F. Johnston, D. Spitzer, K. C. Chang, R. S. Hotchkiss, W. G. Hawkins, K. T. Wheeler, R. H. Mach : *Nat Commun*, **2**, 380 (2011).
- 9) A. D. Weissman, M. F. Casanova, J. E. Kleinman, E. D. London, E. B. De Souza : *Biol Psychiatry*, **29**, 41 (1991).
- 10) S. Takahashi, T. Miwa, K. Horikomi : *Neurosci Lett*, **289**, 21 (2000).
- 11) T. Kobayashi, K. Matsuno, K. Nakata, S. Mita : *J Pharmacol Exp Ther*, **279**, 106 (1996).
- 12) T. Maurice, M. Hiramatsu, J. Itoh, T. Kameyama, T. Hasegawa, T. Nabeshima : *Brain Res*, **647**, 44 (1994).
- 13) H. Kamei, T. Kameyama, T. Nabeshima : *Eur J Pharmacol*, **299**, 21 (1996).
- 14) J. Sharkey, K. A. Glen, S. Wolfe, M. J. Kuhar : *Eur J Pharmacol*, **149**, 171 (1988).
- 15) P. Romieu, R. Martin-Fardon, T. Maurice : *Neuroreport*, **11**, 2885 (2000).
- 16) T. A. Mavlyutov, M. L. Epstein, Y. I. Verbny, M. S. Huerta, I. Zaitoun, L. Ziskind-Conhaim, A. E. Ruoho : *Neuroscience*, **240**, 129 (2013).
- 17) A. Al-Saif, F. Al-Mohanna, S. Bohlega : *Ann Neurol*, **70**, 913 (2011).
- 18) J. Prause, A. Goswami, I. Katona, A. Roos, M. Schnizler, E. Bushuven, A. Dreier, S. Buchkremer, S. Johann, C. Beyer, M. Deschauer, D. Troost, J. Weis : *Hum Mol Genet*, **22**, 1581 (2013).
- 19) B. J. Vilner, C. S. John, W. D. Bowen : *Cancer Res*, **55**, 408 (1995).
- 20) B. Gardner, L. X. Zhu, M. D. Roth, D. P. Tashkin, S. M. Dubinett, S. Sharma : *J Neuroimmunol*, **147**, 95 (2004).
- 21) B. A. Spruce, L. A. Campbell, N. McTavish, M. A. Cooper, M. V. Appleyard, M. O'Neill, J. Howie, J. Sampson, S. Watt, K. Murray, D. McLean, N. R. Leslie, S. T. Safrany, M. J. Ferguson, J. A. Peters, A. R. Prescott, G. Box, A. Hayes, B. Nutley, F. Raynaud, C. P. Downes, J. J. Lambert, A. M. Thompson, S. Eccles : *Cancer Res*, **64**, 4875 (2004).
- 22) K. Shiba, T. Yano, W. Sato, H. Mori, N. Tonami : *Life Sci*, **71**, 1591 (2002).
- 23) K. Shiba, K. Ogawa, H. Mori : *Bioorg Med Chem*, **13**, 1095 (2005).
- 24) N. Akhter, K. Shiba, K. Ogawa, S. Kinuya, K. Nakajima, H. Mori : *Nucl Med Biol*, **34**, 697 (2007).
- 25) K. Ogawa, K. Shiba, N. Akhter, M. Yoshimoto, K. Washiyama, S. Kinuya, K. Kawai, H. Mori : *Cancer Sci*, **100**, 2188 (2009).
- 26) S. B. Hellewell, A. Bruce, G. Feinstein, J. Orringer, W. Williams, W. D. Bowen : *Eur J Pharmacol*, **268**, 9 (1994).
- 27) P. Seth, Y. J. Fei, H. W. Li, W. Huang, F. H. Leibach, V. Ganapathy : *J Neurochem*, **70**, 922 (1998).
- 28) M. L. James, B. Shen, C. H. Nielsen, D. Behera, C. L. Buckmaster, C. Mesangeau, C. Zavaleta, P. K. Vuppala, S. Jamalapuram, B. A. Avery, D. M. Lyons, C. R. McCurdy, S. Biswal, S. S. Gambhir, F. T. Chin : *J Nucl Med*, **55**, 147 (2014).
- 29) K. Kawamura, H. Tsukada, K. Shiba, C. Tsuji, N. Harada, Y. Kimura, K. Ishiwata : *Nucl Med Biol*, **34**, 571 (2007).
- 30) K. Ogawa, H. Kanbara, K. Shiba, Y. Kitamura, T. Kozaka, T. Kiwada, A. Odani : *EJNMMI Res*, **2**, 54 (2012).
- 31) K. Ogawa, H. Kanbara, Y. Kiyono, Y. Kitamura, T. Kiwada, T. Kozaka, M. Kitamura, T. Mori, K. Shiba, A. Odani : *Nucl Med Biol*, **40**, 445 (2013).
- 32) C. Parker, S. Nilsson, D. Heinrich, S. I. Helle, J. M. O'Sullivan, S. D. Fossa, A. Chodacki, P. Wiechno, J. Logue, M. Seke, A. Widmark, D. C. Johannessen, P. Hoskin, D. Bottomley, N. D. James, A. Solberg, I. Syndikus, J. Kliment, S. Wedel, S. Boehmer, M. Dall'Oglio, L. Franzen, R. Coleman, N. J. Vogelzang, C. G. O'Bryan-Tear, K. Staudacher, J. Garcia-Vargas, M. Shan, O. S. Bruland, O. Sartor, A. Investigators : *N Engl J Med*, **369**, 213 (2013).
- 33) K. Ogawa, Y. Mizuno, K. Washiyama, K. Shiba, N. Takahashi, T. Kozaka, S. Watanabe, A. Shinohara, A.

- Odani : *Nucl Med Biol*, **42**, 875 (2015).
34) J. Spetz, N. Rudqvist, E. Forssell-Aronsson : *Cancer
Biother Radiopharm*, **28**, 657 (2013).
35) M. R. Zalutsky, D. A. Reardon, G. Akabani, R. E.

Coleman, A. H. Friedman, H. S. Friedman, R. E.
McLendon, T. Z. Wong, D. D. Bigner : *J Nucl Med*,
49, 30 (2008).

Development of Radiolabeled Probes Directed against Sigma-1 Receptors

Kazuma OGAWA^{*1}, Ryohei MASUDA² and Kazuhiro SHIBA³

* E-mail : kogawa@p.kanazawa-u.ac.jp

¹ Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-1192

² Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-1192

³ Advanced Science Research Center, Kanazawa University, 13-1, Takara-machi, Kanazawa-shi, Ishikawa 920-8640

(Received December 1, 2016; Accepted February 15, 2017)

It has been reported that sigma-1 receptors regulate the release of signaling substances in the central nervous systems and are related to various diseases, such as schizophrenia, stress disorders, dementia, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), and cancer. If the quantification of the sigma-1 receptors is possible, the pathophysiology, the stage, and the early detection of the diseases could be understandable. Molecular imaging using Positron Emission Tomography (PET) or Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) and radioactive probes makes noninvasive quantification of the *in vivo* metabolism and function possible. Currently, only nuclear medicine diagnosis using PET or SPECT can quantify the sigma-1 receptors. Therefore, there is great expectation for the development of molecular probes to image the sigma-1 receptors specifically. In this paper, we introduce our research on the development of radiohalogen-labeled molecular probes directed against the sigma-1 receptors.

Keywords: sigma receptor; imaging; radionuclide therapy; probe.