

# 研究成果報告書

事業名（補助金名）	基盤的研究開発育成事業共同研究補助金
研究開発テーマ名	ハイポキシアを指標とするアゾマイシンヌクレオシドによる病態解析
研究代表者名	大倉 一枝【北海道医療大学薬学部生命物理科学講座／教授】
共同研究者名	関 興一【北海道大学アイソトープ総合センター／教授】 西嶋 剣一【北海道医療大学薬学部／助手】

## [背景、目的]

高齢化に伴い、増加の一途をたどるがんの早期発見と治療における画像診断の重要性はますます高まっている。なかでも、放射性薬剤により生体内の機能的、生化学的情報を画像化する核医学診断（PET, SPECT）はMRI, X線CT等の形態画像診断を凌駕している。

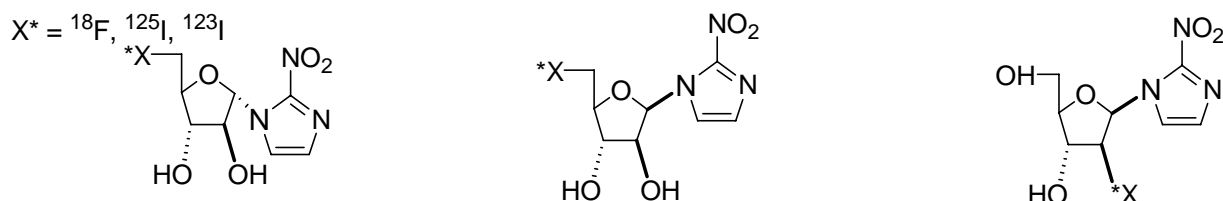
[ $^{18}\text{F}$ ]FDGを用いるPET検査は、がん診断をはじめとして脳機能、心機能診断などの診断分野において広く臨床的有用性が認められている。しかし、最近、[ $^{18}\text{F}$ ]FDGは悪性腫瘍だけでなく、炎症組織や放射線治療後の炎症にも集積することが明らかとなり、[ $^{18}\text{F}$ ]FDGを補う優れた放射性薬剤の開発が強く望まれている。

腫瘍組織はその異常細胞増殖のため、血管が破壊され孤立した細胞には酸素が十分に行き届かず低酸素状態に陥っている。悪性腫瘍に特徴的なこのような病態像を把握しうる薬剤として、ハイポキシア（低酸素）イメージング剤が期待される。腫瘍の低酸素領域は、腫瘍の悪性度・転移能を高めるとともに、放射線治療や抗癌剤に対する感受性を低下させる。したがって、ハイポキシア（低酸素領域）イメージングは、放射線治療の照射部位・照射線量の決定、化学療法剤の選択に極めて有効であると考えられる。ハイポキシアイメージングには、その放射性薬剤が低酸素状態で還元されて細胞内に滞留することが必要である。

アゾマイシン（ニトロイミダゾール）などの電子親和性の高い薬剤は低酸素細胞に集積し、酸素に類似した働きをすることにより放射線感受性を高める、すなわち放射線増感効果を有することが知られている。MISOをはじめとするアゾマイシン誘導体は、放射線増感剤として多数の研究がなされており、低酸素状態で還元されて細胞内に滞留するとされている。これらの薬剤は、放射線増感剤としての臨床使用には神経毒性が問題となっていた。我々は、低酸素細胞に高い親和性を有するアゾマイシンを開発し、低酸素領域に選択的に取り込ませることができれば、腫瘍や虚血性疾患診断のための有用なハイポキシアイメージング剤となりうるものと考えた。放射線治療に用いる増感剤と異なり、核医学診断用薬剤の必要量はピコモルからナノモル（ $10^{-12}$ – $10^{-9}$  mole）であるため、その毒性の発現を低下させることは十分可能である。

## [内容、方法]

ハイポキシアを指標とする病態診断への応用を目的として、次に示す放射性アゾマイシンヌクレオシドの標識合成を実施した。さらに、その標識体の安定性、及びハイポキシア親和性の検討を行った。



1) 非放射性アゾマイシンヌクレオシドの合成

2) 放射性アゾマイシンヌクレオシドの標識合成:

病態機能解析の基礎的検討のためには、長半減期核種である  $^{125}\text{I}$  導入法を検討することが必須である。ヒト臨床に応用する際には、 $^{123}\text{I}$  標識化として充分適用可能である。

3) 標識体の安定性の検討

病態機能解析、特に腫瘍イメージングのみならず、心筋虚血等の他の病態への応用を考える上では、高比放射能標識体の安定性の検討が必要である。

4) ハイポキシア集積性の検討

## [結果、成果]

### 1) $\alpha$ 型アゾマイシンアラビノシド(IAZA)の立体選択的合成

#### i) グリコシル化反応の検討

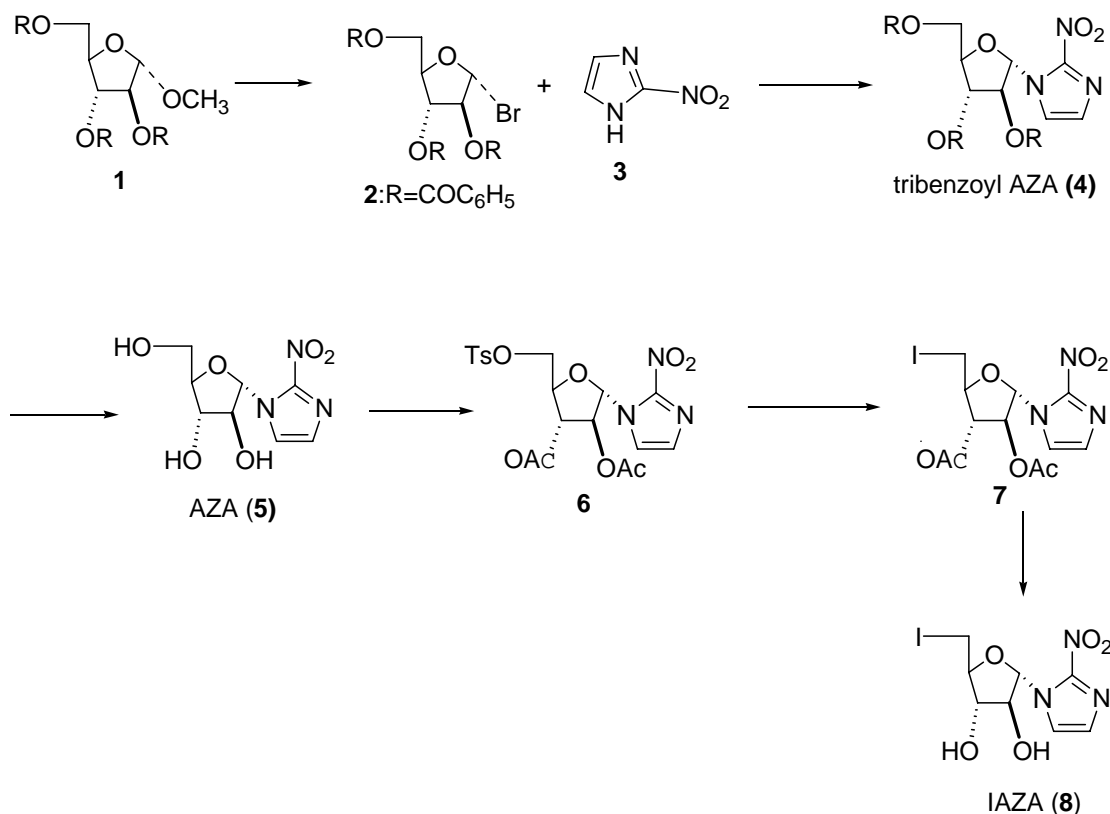
すでにベンゾイル基を保護基として有する 1-ブロモアラビノースとイミダゾールのカップリング反応による AZA の合成について反応が報告されているが、それらは反応条件の微妙な差異により、立体選択性や収率に大きな差が認められ、その再現性は悪いものであった。そこで、 $\alpha$  選択的で、効率の良いカップリング反応を詳細に検討した。

a) イミダゾールを N-シリル体として活性化、b) イミダゾールをカリウム塩として活性化、c) 水銀塩を用いて、ハロゲン化糖を活性化、d) ブロモアラビノース誘導体を *in situ* で反応させるなど、ハロゲン化糖 (**2**) とイミダゾール (**3**) とのカップリング反応について、種々の条件を検討した。

その結果、炭酸カリウム共存下の **3** のアセトニトリル溶液に、単離したアラビノース誘導体 **2** をゆっくり滴下することにより、 $\alpha$  選択的で効率よく、再現性のよいカップリング反応が達成され、化合物 **4** を経て、AZA (**5**) を得ることができた。

#### ii) ヨード化反応

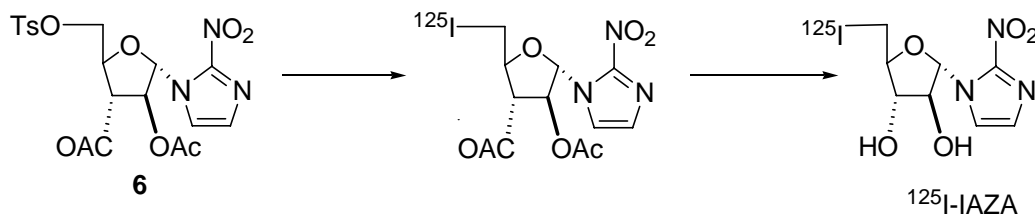
AZA の 5 位の選択的ヨード化反応を検討した。直接トリフェニルホスフィン-ヨードによる反応よりは、トシル化、アセチル化を含む多段階の反応 (化合物 **5**—**8**) のほうが、収率良く円滑に進行することがわかった。(Scheme 1)



Scheme 1

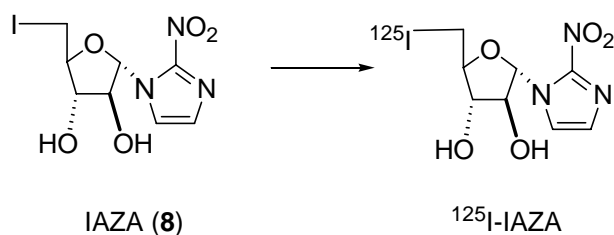
## 2) [ $^{125}\text{I}$ ] IAZAの合成

非放射性ヨード化に準じた放射性ヨード標識化 (Scheme2)と、ヨード交換反応による標識化(Scheme 3)の二つの方法を検討した。



Scheme 2

i) 直接ヨード化 (Scheme 2) では、トシル体**6**から放射性ヨードの導入は、非常に効率よく進行するが、2'、3'のアセチル基を脱保護する際に副反応が起こり、目的物の収量は極度に低下した。



Scheme 3

ii) ヨード交換反応 (Scheme 3)

ヨード交換反応には、 $^{125}\text{I}$ NaI存在下、化合物**8**のヨードを溶媒中で交換する方法と、熔融法とが考えられる。

a) 溶媒中の交換反応

化合物**8**をDMF中、 $^{125}\text{I}$ NaIと加熱したが、殆ど目的物を得ることはできなかった。

b) 熔融法

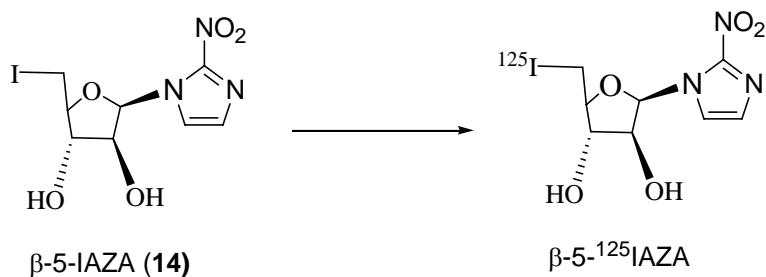
化合物**8**にピバル酸を加え、 $^{125}\text{I}$ NaIと加熱すると、比較的よい収量で、目的物を得ることができた。 $^{125}\text{I}$ NaIは微量のNaOHを含む状態で保存されているものであり、これをピバル酸で中和し、非放射性化合物と熔融する方法が最も良い結果を示すことがわかった。反応終了後の目的物の単離、精製を詳細に検討し、逆相HPLC 分離により、高純度の $^{125}\text{I}$  IAZAを得ることができた(化学的、放射化学的純度:99%以上、比放射能: ca. 200 GBq/mmol)。放射性ヨードへの変換率は、約 30-40%であった。

## 3) $\beta$ 型アゾマイシンアラビノシドの立体選択的合成

アゾマイシン  $\alpha$ -リボシド(AZR)から 2'-OH の配位を反転させ、 $\text{C}_1'$ - $\text{C}_2'$ -cis ヌクレオシドに変換する方法 (Scheme 4)により、次のように合成した。アゾマイシン  $\alpha$ リボシド(AZR)の 3'OH、5'OH はシリル基で保護し、トリフレート **10**を合成した。トリフレート **3**に対して、酢酸アンモニウムを作用させると、2'位の  $\alpha$ -トリフルオロメタンスルフォニル基に対する親核的置換反応により 2'- $\beta$ -O-アセチル体(**11**)を生成した。

化合物 **11** の 2'- $\text{OCOCH}_3$ を加水分解して、化合物 **12**とし、さらに KF-benzoic acid により脱保護すると、 $\beta$ -AZA(**13**)を合成した。これをIAZAの場合と同様に、多段階で、あるいは、トリフェニルホスフィン-ヨードによる一段階反応で、 $\beta$ -5-IAZA(**14**)に変換した。

#### 4) $[^{125}\text{I}]\beta\text{-5-IAZA}$ の合成

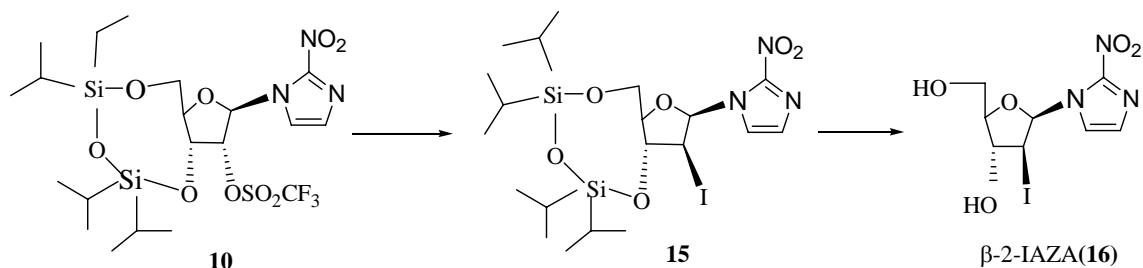


Scheme 5

$[^{125}\text{I}]\beta\text{-5-IAZA}$  は、ヨード交換反応による合成を検討した。標識化の条件は、IAZA の場合と同様に実施し、好収量で標識体を得ることができた。

#### 5) $\beta\text{-2-IAZA}$ の合成

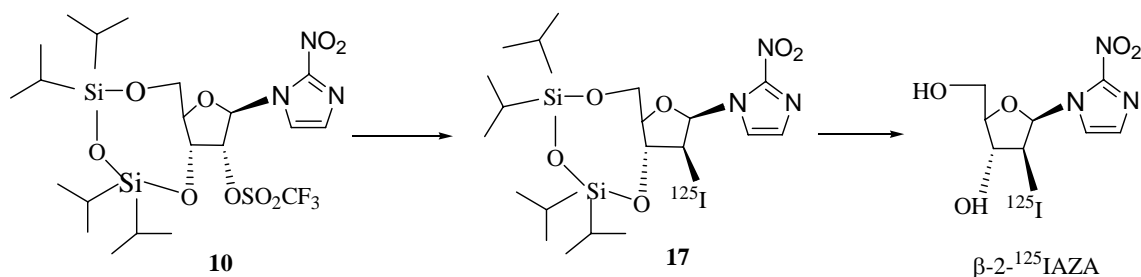
アラビノシドの2-ヨード体 ( $\beta\text{-2-IAZA}$ ) は、化合物 **10** に対するヨードの置換反応により、容易に合成することができた。



Scheme 6

#### 6) $[^{125}\text{I}]\beta\text{-2-IAZA}$ の合成

$[^{125}\text{I}]\beta\text{-2-IAZA}$  の標識化は、化合物 **10** に対する  $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$  の反応により化合物 **17** を経て達成された。しかしながら、その収率は、12%と低レベルであった。今後、至適条件の検討が必要であることが示された。



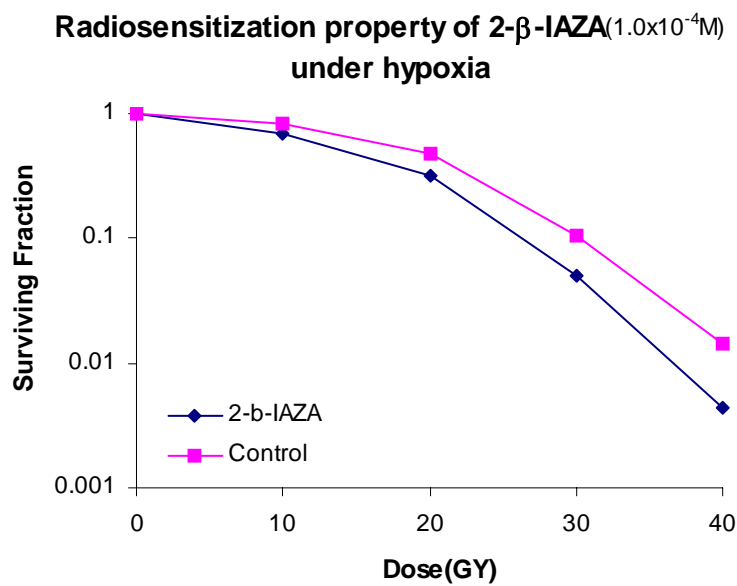
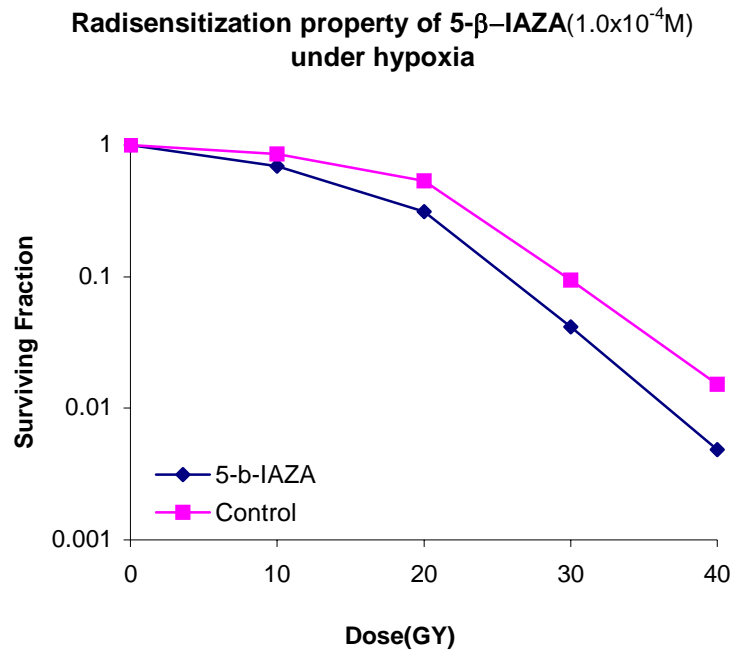
Scheme 7

#### 7) 標識体 IAZA の安定性の検討

標識体 IAZA は、フィルム状、MeOH あるいは EtOH 溶液、生理食塩水溶液の状態とし、その純度を BAS により測定した。フィルム状よりはアルコール溶液中・ $-80^{\circ}\text{C}$  で保存するのがよく、14 日後で 82 から 91% の純度であった。また、標識体 IAZA の再精製は、Sep-Pak を通すことにより可能であることが示された。

## 8) アゾマイシンヌクレオシドの放射線増感作用

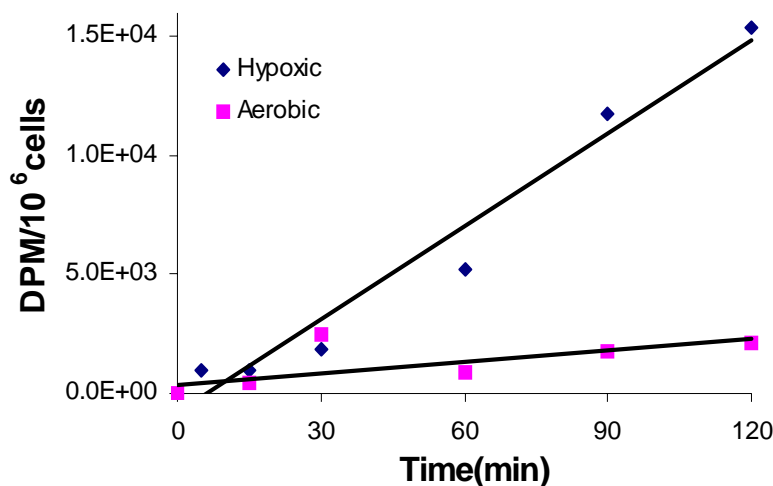
病態診断の基礎となるハイポキシア親和性の指標として、まず、放射線増感作用を検討した。すでに報告されているIAZAと同様に $\beta$ -5-IAZA および $\beta$ -2-IAZA について検討したところ、下図のような結果を得た。これらは、IAZA とほぼ同様に、放射線効果を増強する作用を有していることが示された。



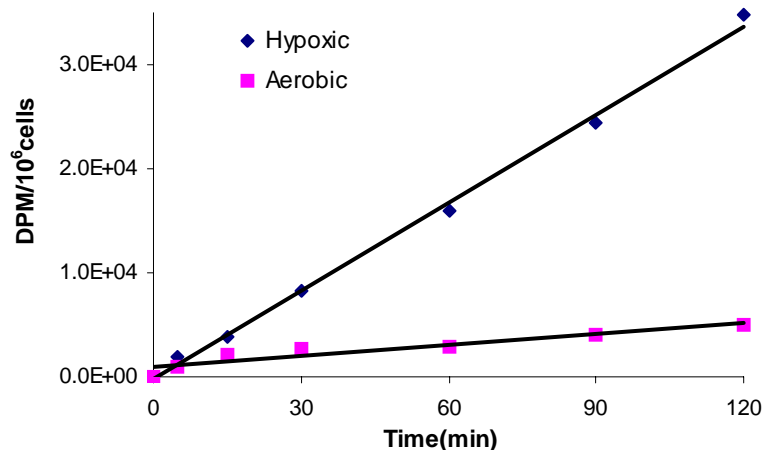
## 9) ヨード標識アゾマイシンヌクレオシドの腫瘍細胞取り込み実験

すでに報告されている $^{125}\text{I}$ IAZA と同様に  $^{125}\text{I}$  $\beta$ -5-IAZA および $^{125}\text{I}$  $\beta$ -2-IAZA について、腫瘍細胞取り込み実験を実施した。下図に示すように、いずれも $^{125}\text{I}$ IAZA とほぼ同様の集積性を示し、ハイポキシアを指標とする病態診断への応用が充分可能であることがわかった。

The course of  $^{125}\text{I}$ -5-IAZA uptake by EMT-6 cell under hypoxia



The course of  $^{125}\text{I}$ -2- $\beta$ -IAZA uptake by EMT-6 cell under hypoxia



### [結語]

放射性ヨード標識化、およびその標識体の安定性に関する詳細な実験により、再現性の良い臨床応用可能なヨード標識アゾマイシンアラビノシドの合成が達成されたものと考えられる。このことにより新規薬剤 $\beta$ -ヨードアゾマイシンアラビノシドに関するハイポキシア親和性が確認され、腫瘍細胞取り込み実験の結果からハイポキシアを指標とする病態診断薬剤としての有用性が期待されるものとなった。

### [今後の展望]

本研究により、アゾマイシンアラビノシドの放射性 $^{125}\text{I}$ 標識体合成が成功し、これを $^{123}\text{I}$ 標識体に変えればSP ECT用薬剤の供給が達せられることとなったが、しかしながら、予定していた心筋虚血病態への応用に関する実験を行うにはいたらなかった。今後、ハイポキシアを指標とする病態への応用を進めるとともに、 $^{18}\text{F}$ 標識体を合成し、PET用薬剤の開発を目指したいものと考えている。