岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

非環式レチノイドの11C標識化と脳PET分子イメージング

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2023-12-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 恵一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/0002000255

氏名（本籍）	鈴木　恵一（岐阜県）
学位の種類	博　士　（工学）
学位授与番号	甲第　６６　号
学位授与日付	令和　５　年　９　月　２５　日
専　　攻	創薬科学専攻
学位論文題目	非環式レチノイドの ^{11}C 標識化と脳 PET 分子イメージング (^{11}C-Labeling of acyclic retinoid and brain PET molecular imaging)
学位論文審査委員	（主査）教　授　　池田　将
	（副査）教　授　　田中　宏幸
	（副査）教　授　　横川　隆志
	（副査）教　授　　古山　浩子

論文内容の要旨

【背景】ビタミンAの代謝物であるall-*trans*-レチノイン酸 (ATRA)およびその人工誘導体 （レチノイドと総称）は、核内受容体との結合を介して発現する抗がん作用から、これまでがんの分化誘導療法薬として研究・開発が行われてきた。近年、中枢神経系 (CNS)疾患に対する改善効果が認められ、CNS疾患治療薬候補として注目されている。CNSにおいて候補薬が効果を発揮するためには、血管と脳の間に存在する血液脳関門 (BBB)による薬物の移行制限を緩和する必要があるが、BBB透過に適した脂溶性をもつ新たなレチノイド類の設計・標識化や脳内取り込み評価および分子機構、さらにはCNS活性の賦活に関する研究は未だ乏しい状況にある。

CNS疾患治療薬の開発過程では、候補薬を陽電子放出核種で標識したのち生体への投与により、ヒトを含めて生体丸ごとで標識候補薬の動態を低侵襲的にイメージング解析できる陽電子放射断層撮像法 (PET)の活用が有効と言える。実際、当該研究グループにおいて独自の高速炭素－炭素カップリング反応（高速*C*-[^{11}C]メチル化反応）を基にして^{11}C標識ATRAを合成し、ラット脳PETイメージングによりある程度の脳への集積を認めた。しかし、標識前駆体の多段階な合成、パラジウム0価錯体を介する^{11}C標識化反応における二重結合の容易な幾何異性化と複数生成物の煩雑な分離精製、さらにはレチノイド母核の容易な酸化的代謝などのため、今後さらなる詳細な体内動態研究を展開するためには再考を余儀なくされ、合成効率および安定性の高い新規PETプローブの開発が必要となった。また、他の研究グループによりベキサロテンなど安定な環式人工レチノイドの^{11}C標識体が合成され、脳移行性が認められているが、高い脂溶性に起因する非特異的集積が問題となっている。

非環式レチノイド （一般名 ペレチノイン）は、本邦で肝がん再発に対する予防医薬候補として開発された人工レチノイドである。ATRA と同等の脂溶性を有し (ATRA: logP = 4.8; ペレチノイン: logP = 5.2)、共役系を短縮した構造をもつことから化学的および代謝的に安定性が高いと予想され、その ^{11}C 標識体を本研究の合成対象 PET プローブとして選択した。まず、BBB 透過性を考慮して脂溶性の高いエステル体の標識化を考えた。その意図は、脳内移行した後、すばやく加水分解され、活性体であるペレチノインが再生されると推定されるからである。実際の高脂溶性構造はベキサロテン (logP = 7.00)を参考に同等の脂溶性を有するベンジルエステル体 (logP = 7.17)とした。ペレチノインのエステル体の ^{11}C 標識化は、天然物であるファルネソールの構造修飾によりビニルスズ前駆体

を合成し、そのビニル結合への高速 *C*-[^{11}C]メチル化反応を活用して ^{11}C 標識化 PET プローブを合成することを計画した。実際に、ファルネソールから合成したホスホン酸エステルとトリブチルスズ置換アルデヒド中間体とのホーナー・ワズワース・エモンズ反応により再現よく ^{11}C 標識用スズ化合物前駆体を短工程経路により合成できた。続いて、^{11}C 標識用スズ化合物前駆体と放射性ヨウ化メチルを用いた高速 *C*-[^{11}C]メチル化反応により異性化を伴うことなく、望みの ^{11}C 標識体のみを単一化合物として ^{11}C 標識メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステルプロドラッグをそれぞれ放射性化学収率（RCY）82%、66%、57%で合成した。得られた ^{11}C 標識ベンジルエステルプロドラッグのラットおよびサルへの経静脈投与後、脳内放射能濃度の経時変化の解析から、投与直後にある程度脳への取り込みが観察された後、脳内放射能濃度は下がり、かなりの時間差（10 分以上)を経て、再び放射能濃度が高くなる予想に反する現象を観測した。この測定結果は、プロドラッグによる BBB 透過機構と矛盾するため、一旦、血中および肝臓などの臓器で加水分解により生じたカルボン酸自身あるいは何らかの分子を介した新たな透過機構で脳内に移行することを想定した。そこで別途調製した ^{11}C 標識メチルエステルを素早く強塩基で加水分解し、^{11}C 標識した[^{11}C]ペレチノインを RCY13±8%（n = 3）で合成し、ラットおよびサル脳イメージング実験を行ったところ、今度は、わずかな時間差（数分)を経て脳内集積が始まり、高い脳内放射能濃度を観測した。

これまでペレチノインの脳機能に関する知見は皆無であったが、ペレチノインの高い脳移行性の発見をきっかけに、これまで行われていなかったペレチノインの CNS 機能評価を行った。実際に、幹細胞における神経細胞への分化誘導能を認め、この分化誘導した神経細胞は、カルシウムイメージングから、NMDA 型グルタミン酸受容体を発現し、これによりシナプスを形成していることが示唆された。さらに、様々な脳機能障害の抑制効果を見出した。なお、^{11}C 標識ペレチノインのラット静脈内投与後の血漿および脳ホモジネートのラジオ HPLC 分析による放射性代謝物のプロファイルの観測では、一旦、血中で ^{11}C 標識ペレチノインは高極性化合物へと変化することがわかり、脳内にも同等の極性をもつ高極性化合物が見出された。この現象は、単に、ペレチノインの受動拡散による脳への取り込み機構では説明がつかず、その代謝物である高極性化合物、すなわち「非環式レチノイド輸送体」が介在する特別な脳移行機構の存在を示唆し、その本体はジアシルグリセロリン脂質であることも推定した。

本研究では、ATRA と比較し共役系が短縮され、化学的および代謝的に安定なペレチノインに焦点を当て、脳内輸送体による高い脳移行性をもつ新規 PET プローブを創製した。実際、ラットおよびサルの脳 PET イメージングからペレチノインの高い脳移行性を観察し、さらにこの脳内への輸送には「非環式レチノイド輸送体」と考えられるジアシルグリセロリン脂質が介在すること推定している。この高い脳内移行性の観察をきっかけに、これまで行われてこなかった中枢神経系作用を探索し、幹細胞から神経細胞への分化・誘導や様々な脳機能障害の抑制効果を見出し、ペレチノインの脳移行性の重要性を裏付けることができた。本研究成果は、レチノイド類の脳移行分子機構や CNS 疾患診断・治療薬の設計・開発のための有益かつ新たな知見を与えることが期待される。

論文審査結果の要旨

ビタミンAの代謝物であるall-*trans*-レチノイン酸（ATRA)およびその人工誘導体（以下、レチノイドと総称）は、核内受容体との結合を介して発現する抗がん作用から、これまでがんの分化誘導療法薬として研究・開発が行われてきた。近年、中枢神経系（CNS)疾患に対する改善効果が認められ、

CNS疾患治療薬候補として注目されている。CNSにおいて候補薬が効果を発揮するためには、血管と脳との間に存在する血液脳関門 (BBB)による薬物の移行制限を緩和する必要があるが、BBB透過に適した脂溶性をもつ新たなレチノイド類の設計やその標識化、脳内取り込み量の評価およびその分子機構、さらにはCNS活性の賦活に関する研究は未だ乏しい状況にある。

CNS疾患治療薬の開発過程において、医薬品候補を陽電子放出核種で標識したのち生体へ投与することにより、ヒトを含めて生体全体で標識候補薬の動態を低侵襲的にイメージング解析できる陽電子放射断層撮像法 (PET)の活用が有効と考えられている。実際、当該研究グループにおいて独自の高速炭素－炭素カップリング反応 (高速*C*-[^{11}C]メチル化反応) を基にして^{11}C標識ATRAを合成し、ラット脳PETイメージングによりある程度の脳への集積を確認している。しかし、標識前駆体の多段階な合成、パラジウム0価錯体を介する^{11}C標識化反応における二重結合の容易な幾何異性化と複数生成物の煩雑な分離精製操作、さらにはレチノイド母核の容易な酸化的代謝などのため、今後さらなる詳細な体内動態研究を展開するためには再考を余儀なくされ、合成効率および安定性の高い新規PETプローブの開発が必要となっていた。

非環式レチノイド (一般名 ペレチノイン) は、本邦で肝がん再発を予防する医薬品候補として開発された人工レチノイドである。ATRA と同等の脂溶性を有し (ATRA: logP = 4.8; ペレチノイン: logP = 5.2)、共役系を短縮した構造をもつことから化学的および代謝的に安定性が高いと予想されている。本論文では、ペレチノインの ^{11}C 標識体を合成対象とし、まず、BBB 透過性を考慮して脂溶性の高いエステル体の標識化に取り組んでいる。脳移行性のあるベキサロテンの脂溶性 (logP = 7.00)を参考に同等の脂溶性を有するベンジルエステル体 (logP = 7.17)を候補化合物としている。ペレチノインのエステル体の ^{11}C 標識化は、天然物であるファルネソールの構造修飾によりビニルスズ前駆体を合成し、そのビニル結合への高速 *C*-[^{11}C]メチル化反応を活用して合成することを計画している。実際に、ファルネソールから合成したホスホン酸エステルとトリブチルスズ置換アルデヒド中間体とのホーナー・ワズワース・エモンズ反応により、再現よく ^{11}C 標識用スズ化合物前駆体を短工程経路により合成することに成功している。続いて、^{11}C 標識用スズ化合物前駆体と放射性ヨウ化メチルを用いた高速 *C*-[^{11}C]メチル化反応により、異性化を伴うことなく、望みの ^{11}C 標識体である ^{11}C 標識メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステル型ペレチノインプロドラッグをそれぞれ放射性化学収率 (RCY) 82%、66%、57%で合成している。得られた ^{11}C 標識ベンジルエステルプロドラッグのラットおよびサルへの経静脈投与後、脳内放射能濃度の経時変化の解析から、投与直後にある程度脳への取り込みが観察された後、脳内放射能濃度は下がり、10 分以上の時間差を経て、再び放射能濃度が高くなるといった予想に反する現象を見出している。この結果は、プロドラッグ化による BBB 透過機構と矛盾するため、血中および肝臓などの臓器で加水分解により生じたカルボン酸体あるいは何らかの分子を介した新たな機構で脳内に移行することを想定している。そこで、カルボン酸体である ^{11}C 標識メチルエステルを強塩基で迅速に加水分解して得られる ^{11}C 標識ペレチノイン (RCY13±8% (n = 3))をラットおよびサルに投与し、同様の脳 PET イメージング実験により、数分の短い時間差を経て脳内集積が始まり、高い脳内放射能濃度が観測されることを見出している。

^{11}C 標識ペレチノインのラット静脈内投与後の血漿および脳ホモジネートのラジオ HPLC 分析による放射性代謝物のプロファイルの解析から、高極性化合物が血漿中から見つかり、脳にも同等の極性をもつ高極性化合物が見出されている。この結果は、ペレチノインの受動拡散による脳内取り込み機構では説

明できないため、代謝物である高極性化合物が介在する脳移行機構の存在を示唆している。さらに、ペレチノインの脳内での機能に関する過去の知見はなかったため、今回のペレチノインの脳移行性の発見を契機に CNS 機能評価を行っている。その結果、ペレチノインが幹細胞に作用して神経細胞へ分化誘導する機能を有すること、この分化誘導した神経細胞は NMDA 型グルタミン酸受容体を発現することでシナプスを形成していることが示唆されている。

以上のように本研究では、化学的および代謝的に安定なペレチノインに焦点を当て、その新規 PET プローブを創製し、ラットおよびサルの脳 PET イメージングを行った結果、ペレチノインの脳移行性を見出している。その結果を契機に CNS 機能を探索し、幹細胞の神経細胞への分化誘導機能を見出している。本研究の成果は、レチノイド類の脳移行に関する分子機構や CNS 疾患に対する診断・治療薬の設計・開発のための有益かつ新たな知見の獲得につながると期待される。

したがって、本論文に含まれる研究成果には学術的な独創性、先進性が認められ、博士（工学）の学位に十分値すると判定した。

最終試験結果の要旨

審査員は申請者鈴木　恵一氏に対して、提出された論文の内容および関連する研究分野に関して口頭試問による最終試験を行った。学位論文審査会では、発表内容および関連項目についての質疑応答がなされ、申請者はいずれの事項についても適切に回答し、当該研究分野に関する専門知識と理解力が十分に備わっているものと認められた。また、申請者は主論文の研究成果をまとめた 1 編の学術論文を、審査付き学術雑誌(impact factor (IF) = 2.7）に筆頭著者として発表している。以上のことから、博士（工学）の学位に適するものと判断し、最終試験に合格と判定した。

〈論文リスト〉

Keiichi Suzuki, Hiroko Koyama, Narumasa Nakamura, Yasuyuki Kimura, Aya Ogata, Hiroshi Ikenuma, Hideki Ishii, Ming-Rong Zhang, Kazunori Kawamura, Takafumi Minamimoto, Yuji Nagai, Hiroshi Katsuki, Tetsuya Kimura, Nobuyuki Kimura, Masanori Ichise, Takashi Kato, Kengo Ito, Masaaki Suzuki, ^{11}C-Labeling of acyclic retinoid peretinoin by rapid *C*-[^{11}C]methylation to disclose novel brain permeability and central nervous system activities hidden in antitumor agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2023**, *85*, 129212. IF = 2.7, CiteScore (CS) = 5.5.