

# 放射線により誘導される酵素を標的とする治療薬剤

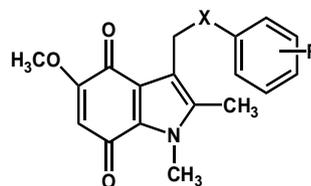
神戸薬科大学 薬品物理化学研究室  
向 高弘

## 1. 緒言

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)は、生体内でキノン類をヒドロキノンに2電子還元する酵素であり、多くの固形腫瘍でその発現が亢進していることから<sup>1)</sup>、抗癌剤の標的や腫瘍マーカーとして注目を集めている。また、NQO1は電離放射線照射により発現が増加することも知られている<sup>2)</sup>。したがって、NQO1を標的とした放射性薬剤は、外部放射線治療との併用による腫瘍への高い集積性と、それに基づく高い治療効果を達成しうる新たな放射性薬剤へと展開できると考え、本研究ではNQO1に選択的に結合する放射性ヨウ素標識リガンドの開発を計画した。

リガンドの分子設計は、NQO1のX線結晶構造解析を基にデザインされ、NQO1に選択的に結合するとされているES936及びES1340を参考にして行った<sup>3)</sup>。ES936は、NQO1の活性部位にスタッキング後、電子求引性のニトロ基の影響でニトロフェノール部分が脱離するが、ES1340は電子求引性基をもたないため脱離は起こらないとされている。そこで、ベンゼン環に比較的電子求引性の弱いヨウ素原子を導入することで、NQO1との結合性とフェノール部分の安定性を保持できると期待し、エーテル結合をもつ**1**と**2**、及びチオエーテル結合をもつ**3**を設計した。

本研究では**1**、**2**及び**3**を合成し、半減期が長く、取り扱いの容易な<sup>125</sup>Iで標識することで、NQO1を標的とするがん内用放射線治療薬剤としての有用性を基礎的に検証した。



<b>ES936</b>	: R= <i>p</i> -NO <sub>2</sub>	X=O
<b>ES1340</b>	: R=H	X=O
<b>1</b>	: R= <i>p</i> -I	X=O
<b>2</b>	: R= <i>m</i> -I	X=O
<b>3</b>	: R= <i>p</i> -I	X=S
<b>4</b>	: R= <i>p</i> -Br	X=S
<b>11</b>	: R= <i>p</i> -Sn(n-Bu) <sub>3</sub>	X=O
<b>12</b>	: R= <i>m</i> -Sn(n-Bu) <sub>3</sub>	X=O
<b>13</b>	: R= <i>p</i> -Sn(n-Bu) <sub>3</sub>	X=S

## 2. 方法

### 非放射性ヨウ素標識体と標識前駆体の合成

Ethyl 5-hydroxy-2-methylindole-3-carboxylateを出発物質とし、4段階の反応を経て3-(hydroxymethyl)-5-methoxy-1,2-dimethyl-indole-4,7-dione (**8**)を合成した後、*p*-iodophenolまたは*m*-iodophenolと反応させることで**1**及び**2**を合成した。標識前駆体**11**及び**12**は、**1**または**2**をトリブチルスズ化することで合成した。**3**は、**8**と*p*-bromobenzenthioilを反応させることで**4**を合成し、**4**からトリブチルスズ体**13**を合成した後、ヨウ化ナトリウムとクロラミンTを用いた求電子置換反応により合成した。

### 標識合成

<sup>125</sup>I標識はトリブチルスズ体を標識前駆体とし、酸化剤を用いた求電子置換反応により行った。分離精製は逆相HPLC (Nacalai Tesque COSMOSIL 5C18-PAQ 4.6×250 mm、流速: 0.7 ml/min、移動相: メタノール/水)で行った。また放射化学的純度、比放射能の測定には逆相HPLC (Nacalai Tesque COSMOSIL 5C18-AR II 4.6×250 mm、流速: 0.7 ml/min、移動相: 0.1%トリフルオロ酢酸を含むメタノール/水)を用いた。

### *In vitro*安定性評価

[<sup>125</sup>I]**1**、[<sup>125</sup>I]**2**及び[<sup>125</sup>I]**3**をマウス血漿中で、37°C、24時間インキュベートし、経時的に逆相Radio TLCにて放射化学的純度を求めた。TLCとしてMerck Silica gel 60 Rp-18 F254S、展開溶媒としてメタノール/水を用いた。

また、NQO1を発現したヒト結腸癌細胞HT-29の細胞溶解液を作製し、その溶解液中で[<sup>125</sup>I]**1**及び[<sup>125</sup>I]**3**を37°Cにてインキュベートし、逆相Radio TLCで放射化学的純度を求めた。

### 細胞取り込み実験

対数増殖期の HT-29 細胞もしくは A549 細胞をトリプシン処理し、6 ウェルプレートの各ウェルに接種した。放射性化合物の取り込み実験は、細胞接種 24 時間後に実施した。18.5 kBq の各放射性化合物を含む 1 ml の培地を、それぞれのウェルに加えて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で一定時間静置後、放射性化合物を含む培地を除き、1 ml の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 3 回洗浄した。洗浄後、細胞を 1 ml の 0.2 N NaOH で溶解し、溶解液の放射能をガンマカウンタで測定した。また、可溶化物中のタンパク濃度を BSA protein assay kit で測定した。別途、細胞内の化学形を調べるため、上記と同様の操作を行い、リン酸緩衝液で洗浄後の細胞を 0.15 ml の氷冷 Passive lysis buffer に懸濁し、懸濁液を氷冷中超音波破碎した。これを遠心分離し、その上清を逆相 Radio TLC にて分析した。

### 3. 結果

#### 非放射性ヨウ素標識体と標識前駆体の合成

非標識体である **1** 及び **2** はそれぞれ収率 27%、13% で合成することができた。また Br 体である **4** は収率 21% で合成した。標識前駆体 **11**、**12** 及び **13** はそれぞれ収率 17%、13%、20% で合成した。非標識体 **3** はトリブチルスズ体 **13** から収率 82% で合成した。

#### 標識合成

標識合成は酸化剤として *N*-クロロスクシンイミドを用いた求電子置換反応により行い、**11** から [<sup>125</sup>I]**1** を放射化学的収率 82%、放射化学的純度 99% 以上、比放射能 2.1 GBq/μmol 以上で、**12** から [<sup>125</sup>I]**2** を放射化学的収率 69%、放射化学的純度 99% 以上、比放射能 1.7 GBq/μmol 以上で合成した。また、酸化剤としてクロラミン T を用い、**13** から [<sup>125</sup>I]**3** を放射化学的収率 69%、放射化学的純度 99% 以上、比放射能 1.1 GBq/μmol で合成した。

#### *In vitro* 安定性評価

[<sup>125</sup>I]**1**、[<sup>125</sup>I]**2** 及び [<sup>125</sup>I]**3** をマウス血漿中でインキュベートしたところ、[<sup>125</sup>I]**1**、[<sup>125</sup>I]**2** の 24 時間後の未変化体の割合はともに 85% 以下であったのに対して、[<sup>125</sup>I]**3** では 97% 以上であり、マウス血漿中で [<sup>125</sup>I]**3** は、[<sup>125</sup>I]**1**、[<sup>125</sup>I]**2** と比較して安定であることが確認された。

また、NQO1 を発現したヒト結腸癌細胞 HT-29 の細胞溶解液中で 2 時間インキュベートしたところ、[<sup>125</sup>I]**1** の未変化体の割合は 25% 以下で、70% 以上の放射能が *p*-iodophenol の画分に認められた。一方、[<sup>125</sup>I]**3** は 90% 以上が未変化体として存在し、分解物はほとんど確認されなかった。以上の結果から、NQO1 を含む細胞溶解液中でも、[<sup>125</sup>I]**1** のエーテル結合に比べて、[<sup>125</sup>I]**3** のチオエーテル結合が安定であることが示された。

### 細胞取り込み実験

HT-29 細胞への [<sup>125</sup>I]**1**、[<sup>125</sup>I]**2** 及び [<sup>125</sup>I]**3** の取り込みを調べた結果、[<sup>125</sup>I]**1** 及び [<sup>125</sup>I]**2** は早期に細胞内に取り込まれた後、徐々に細胞外へ放射能が流出した。一方、[<sup>125</sup>I]**3** は [<sup>125</sup>I]**1** 及び [<sup>125</sup>I]**2** と比較して細胞内へ高く取り込まれ、その後の細胞外流出も少なかった (Fig. 1)。細胞内での化学形を調べるため、インキュベート 1 時間後の細胞を溶解し、逆相 Radio TLC にて分析した結果、[<sup>125</sup>I]**1** と [<sup>125</sup>I]**2** の未変化体の割合は 10% 以下であったが、[<sup>125</sup>I]**3** では 85% 以上が未変化体として存在した。

HT-29 に比べて NQO1 の発現が約 5 倍高い A549 への [<sup>125</sup>I]**3** の取り込みを調べた結果、HT-29 への集積に比べて有意に高い集積を示した。またこの集積は非標識体 **3** の存在下で有意に阻害された。これらの結果から、[<sup>125</sup>I]**3** の細胞集積は、NQO1 に特異的で、その発現量に依存することが示された。

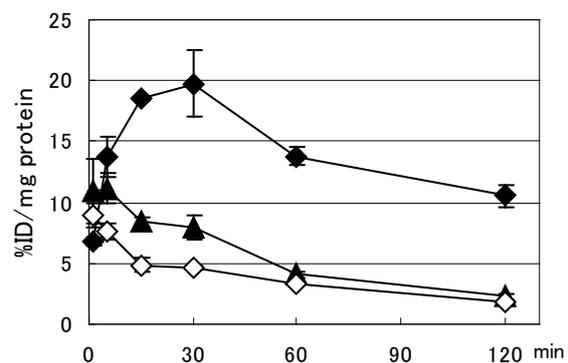


Fig. 1 Uptake of [<sup>125</sup>I]**1**, [<sup>125</sup>I]**2** and [<sup>125</sup>I]**3** into HT-29 cell line ([<sup>125</sup>I]**1**, ▲; [<sup>125</sup>I]**2**, ◇; [<sup>125</sup>I]**3**, ◆)

#### 4. まとめ

本研究では、NQO1 を標的とする放射性ヨウ素標識リガンドとして、 $[^{125}\text{I}]$ 1、 $[^{125}\text{I}]$ 2、 $[^{125}\text{I}]$ 3 を設計し、その合成に成功した。エーテル結合をもつ $[^{125}\text{I}]$ 1 及び $[^{125}\text{I}]$ 2 は、マウス血漿中では比較的安定であったが、NQO1 を発現した細胞中では、エーテル結合部位が解離することが示された。一方、 $[^{125}\text{I}]$ 3 はいずれの場合も比較的安定で、未変化体として細胞内に保持されることが示された。また、 $[^{125}\text{I}]$  3 の細胞集積は、NQO1 に特異的で、その発現量に依存することが示された。以上の結果は、NQO1 を標的とする放射性薬剤の開発に有用な知見を与えるものとする。

#### 5. 参考文献

- 1) Cresteil T., et al. *Biochem. Pharmacol.* **42**:1021-1027 (1991)
- 2) Park H. J., et al. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **61**:212-219 (2005)
- 3) Winski S. L., et al. *Biochemistry* **40**:15135-15142 (2001)