

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

新規 γ ・ β 線核種によるがん診断・治療の開発研究

(H17-ナノ-016)

平成19年度総括研究報告書

主任研究者 藤林 康久

平成20(2008)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

新規 γ ・ β 線核種によるがん診断・治療の開発研究

藤林 康久 ----- 3

II. 分担研究報告

1. 放射性同位元素の製造に関する研究

藤林 康久 ----- 11

(別添資料 1、2)

2. 薬剤設計、合成に関する研究

徳永 雄次、藤林 康久 ----- 15

3. 分子生物学的評価に関する研究

清野 泰 ----- 25

4. 動物体内分布評価研究

森 哲也 ----- 29

5. 臨床診断に関する研究

岡沢 秀彦 ----- 33

(別添資料 3, 4, 5, 6)

6. 婦人科腫瘍診断に関する研究

子宮体癌術前におけるFDG-PET検査の有用性についての研究

富樫 かおり ----- 41

7. 微細電子飛跡検出器に関する研究

谷森 達、身内賢太朗、窪 秀利 ----- 45

(別添資料 7, 8, 9)

8. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 51

9. 別添資料 ----- 55

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

（主任）研究報告書

新規 γ ・ β 線核種によるがん診断・治療の開発研究

（主任）研究者 藤林 康久 福井大学高エネルギー医学研究センター・教授

研究要旨：超小型サイクロトロンによる新規放射性同位元素製造技術の確立，コンピュータシステムによるがん親和性分子設計と合成技術の開発，放射性薬剤の製造・品質管理に関する技術開発，NEDOプロジェクトによる超高感度放射線イメージング機器コンプトンCT（CPT）開発を融合することにより，新規 γ ・ β 線放出核種によるがん診断・治療に有用な薬剤ならびに医療技術を開発する。

A. 研究目的

新しい概念に基づく位置検出型放射線検出装置であるコンプトンCT（CPT）の開発により，従来の核医学用放射性核種に加えて，高エネルギーガンマ線，中半減期核種が標識核種として利用可能となると考えられる。このようなCPT検査では，

- ① 高感度であるため，少量投与で被ばく線量を安全な範囲に維持しながら，
- ② 広いガンマ線エネルギー範囲にわたって必要十分な分解能を確保し，
- ③ かつ，中半減期核種も利用できるため長時間にわたる動態を追跡できる可能性が高い。

また，上記放射性核種の中の多くがガンマ線とともにベータ線を放出することからがん選択性を有するイメージング薬剤がそのまま内部放射線治療薬剤としても利用可能となる可能性が高い。CPTとの併用により，標的となるがん部位ならびに副作用発現の可能性が高い部位における薬剤量（すなわち放射線量）を直接モニタリングできることが期待される。

本研究では，FDG-PETの保険適用により本邦に急速に普及しつつある超小型サイクロトロンを利用し，各病院・センターで実施可能な種々の放射性核種（RI）の製造技術を確認するとともに，それらを用いた新規な概念に基づくがん親和性薬剤の設計開発を行う。これにより，新しいがんの高感度診断法を確認するとともに，非侵襲的かつ最適化されたがん治療技術へと展開していく。

B. 研究方法

CPTの特性ならびに診断・治療同時進行型薬剤標識に適した放射性核種の文献調査から，比較的高エネルギーのガンマ線ならびにがん内部照射治療に適したベータ線を放出する核種として，Cu-64 ならびに Br-77 を選択した。超小型サイクロトロンと固体ターゲットシステムを用いた Cu-64 の製造技術の改良を行うとともに，製造された大量のCu-64 を安全かつ高収率に回収・精製するための自動化装置を開発した。これと並行して Br-77 の製造に必要な Se-77

固体ターゲットならびにターゲットからBr-77を回収・精製するシステムの製造開発と評価を行った。一方、これまでの研究において放射性Cu標識薬剤Cu-ATSMによるがんイメージングと治療の可能性を明らかにしてきたが、特に Cu-ATSM 高集積部位の特性について治療効果との関連でがん幹細胞との関連について検討を加えた。昨年度導入した分子設計システムにより RDG 配列をリードとして設計された新規ペプチド型および非ペプチド型分子について、引き続き合成検討を行った。

これらと並行して、がんへの移行性を有するF-18、Br-77 標識薬剤について、薬剤製造技術の確立ならびにそれらを用いた基礎、臨床検討を行い、診断から治療への展開の可能性を基礎的に考察した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、福井大学動物実験指針等に従い、実験内容についての承認を受けた上で実施した。

開発された放射能標識分子プローブを人体に適用するにあたっては、状況に応じて学内倫理委員会あるいは治験委員会に諮り、承認を得た上で実施した。被験者からは十分なインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果ならびに考察

がん内部照射治療に適した放射性核種であるCu-64の大量製造においては、従来のPET薬剤の標識核種が液体あるいは気体ターゲットであるのに対して固体を取り扱う必要があり、従来のPET用施設では治療に必要な大量放射能を取り扱うためのシステム開発が不可欠となる。本年度は、昨年度まで

に作成された自動化Cu-64精製装置をさらに改良し、人体適用可能な溶液として無菌的に標識から製剤化までを行えるシステムを構築した。これにより、作業者の被曝を軽減しながら十分な量の放射能を製造することが可能となった。

これと並行して、Br-77製造技術の開発を行った。Br-77は、半減期が適度に長く大量のβ線を放出すること、有機化合物の標識に共有結合が利用できることから多くの生理活性物質を標識の対象とできることが期待される。Se-77を銅含有化合物としてタングステンディスク上に溶着させたターゲットを超小型サイクロトロンにてプロトン照射し、生成したBr-77を加熱昇華によって精製・回収するシステムを構築した。製造実験において180 μCi/μAh の収率でBr-77を製造・回収できることが明らかとなった。

がん細胞に対して特異的に結合する薬剤として、細胞膜インテグリンに対する結合性を有するRGDペプチドならびにその誘導体について検討を行った。複数個のRGDを分子内に持ち放射性金属標識部位あるいは蛍光部位を同時に有する分子を設計し合成した。また構造計算による分子設計にしたがって、数種の化合物群の合成を行った。

低酸素がん親和性薬剤のCu-ATSMの集積が高い領域が、増殖していない細胞が集まっているユニークな領域であることから、がん幹細胞との関連を検討したところ、Cu-ATSM高集積部位にがん幹細胞マーカーのひとつである、CD133陽性細胞が特異的に見出されることが明らかとなった。がん幹細胞rich部位は、治療抵抗性があると考えられ、当該部位への選択的治療を考える上でCu-ATSMの有用性が期待された。

腫瘍において膜合成基質として集積することが知られるC-11標識酢酸の誘導体であるF-18標識フルオロ酢酸 (FA) は、代謝過程でメタボリックトラッピングが生じると考えられていることから、ポジトロン断層撮影 (PET) 用腫瘍イメージングトレーサーとしての利用が期待されている。そこで、F-18標識酢酸及びその誘導体の自動合成化を行った。

臨床検討として、婦人科領域疾患におけるFES-PETの有用性を引き続き検討した。子宮内膜肥厚患者において、両性である子宮内膜過形成症と悪性腫瘍との鑑別は非常に困難であり、摘出手術適応とされることが多いが、FES-PETとFDG-PETの併用により良悪性鑑別が可能であることが見いだされた。このことは、今後内部放射線治療対象となる患者を的確に選択する上で有用な情報と考えられる。

これらの基礎ならびに臨床医学研究と並行して、コンプトンCT (CPT) によるCu-64、Br-77等の新規放射性核種検出実験を行い、良好な結果を得た。

D. 結論

放射性同位元素の製造、その利用から検出技術の開発にいたる、一連の研究体制が構築され、Cu-64、Br-77について、製造から検出に至る一連の検討を行うことができた。また新しい概念に基づくプローブ設計・合成と評価を行い、がんの特性診断や治療対象の鑑別、遺伝子発現レベルでの標的検出について方向性を示すことができた。

E. 健康危険情報

特になし

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

（分担）研究報告書

放射性同位元素の製造に関する研究

（分担）研究者 藤林 康久 福井大学高エネルギー医学研究センター・教授

研究要旨： PET検査の保険適用に伴い急速に普及しつつある超小型サイクロトロンを用いた新しい放射性同位元素製造は、内部照射治療用放射性同位元素の供給の途を開きその普及に資するのみでなく、高価なサイクロトロンの効率的運用に非常に有用である。本年度は、Cu-64 の安定かつ高収率な製造・回収プロセスに加えて、人体投与可能な製剤調製までを加えた自動化システムを開発するとともに、Br-77 の製造に必要な Se-77固体ターゲットならびに Br-77 精製装置の開発とその機能評価を行った。

A. 研究目的

F-18-フロオロデオキシグルコース (FDG) ならびにポジトロンCT (PET) を用いた検査が保険適用となり、FDG-PETの普及が急速に進んでいる。F-18の半減期は焼く2時間と短いため、製薬企業による全面的供給は難しく、現在本邦のみでも120程度のPET検査施設では超小型サイクロトロンを設置して自らFDGの製造を行っている。ほとんどの施設では、F-18製造のみに超小型サイクロトロンが利用されており、その稼働時間は一日あたり数時間以内と高額で基本的に多機能であるにもかかわらず有効利用されていないのが現状である。

共同研究者らによりコンプトン散乱を原理とする新たな γ 線検出装置 (CPT) が開発された。CPTは、非常に感度が高くかつ高エネルギー γ 線でも位置弁別できることから、従来利用が難しいと思われてきた放射性同位元素にも適用可能である。それらの中には、 β 線を同時放出することによりがんの内部放射線照射治療に適すると考えられる

らのいくつかは、超小型サイクロトロンによって製造可能であると考えられる。

本研究では、超小型サイクロトロンを用いてCPTによる検出ならびにがんの内部放射線照射治療に適すると考えられる放射性同位元素であるCu-64およびBr-77の製造技術を確立することを目的とする。

B. 研究方法

Cu-64について、ロボット制御システムを用いたCu-64標識薬剤自動調製装置を完成させた。装置は、臨床使用目的に市販されている無菌三方バルブ、シリンジを接液部とし、イオン交換樹脂カラム等もプレパックされた市販製品を用いるなど、安全性と簡便性を兼ね備えたものである。これにより、治療に用いられる大量の放射能を作業者が被曝することなく安全に取り扱うことが可能となる。

Br-77 の製造にあたっては、Se-77 を Cu-63と混合・加熱しCopper selenide としたものをタングステン円盤上に溶着させた

ターゲットを製作し、固体ターゲットシステムを装着した超小型サイクロトロンにてプロトン照射した。照射後、ターゲットを石英ガラス管内で電気炉により加熱し、Br-77を昇華させることにより回収・精製した。

C. 研究結果、D. 考察

図1に開発されたCu-64標識薬剤自動調製装置の概要を示す。種々の条件設定を経て完成されたプログラムでは、作業者はターゲットを反応容器に投入するのみで、再現性良くCu-64を回収し、人体投与可能な無菌溶液への調製までを自動化することができた。

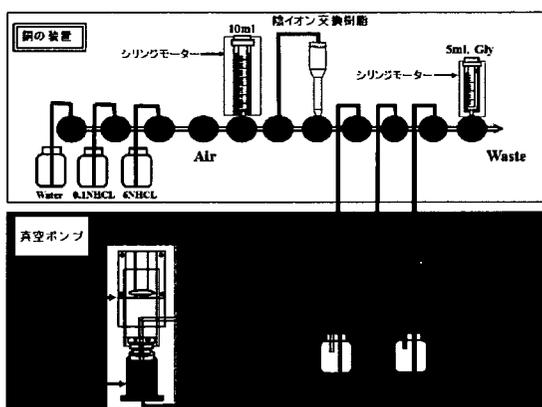


図1. Cu-64標識薬剤自動調製装置の概要

本システムは、非常に柔軟な構築が可能であり、まったくソフトウェアに知識がなくてもプログラミングが可能であるため、多くの自動化システムの開発に応用可能である。今後はハロゲン化合物合成装置の開発を予定している。

本年度開発したBr-77回収・精製システムを図2に示す。製造検討では、120 $\mu\text{Ci}/\mu\text{A}$ の収率で製造・回収することに成功した。この方法では、ターゲット円盤を加熱し昇華させることによって回収・精製する

ためターゲット自体には化学的变化を与えず、そのまま再利用できる利点が期待される。

E. 結論

内部照射治療ならびにCPTに適していると考えられるCu-64並びにBr-77を安全かつ高収率に製造・精製するシステムを構築できた。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

Br-77の製造と精製

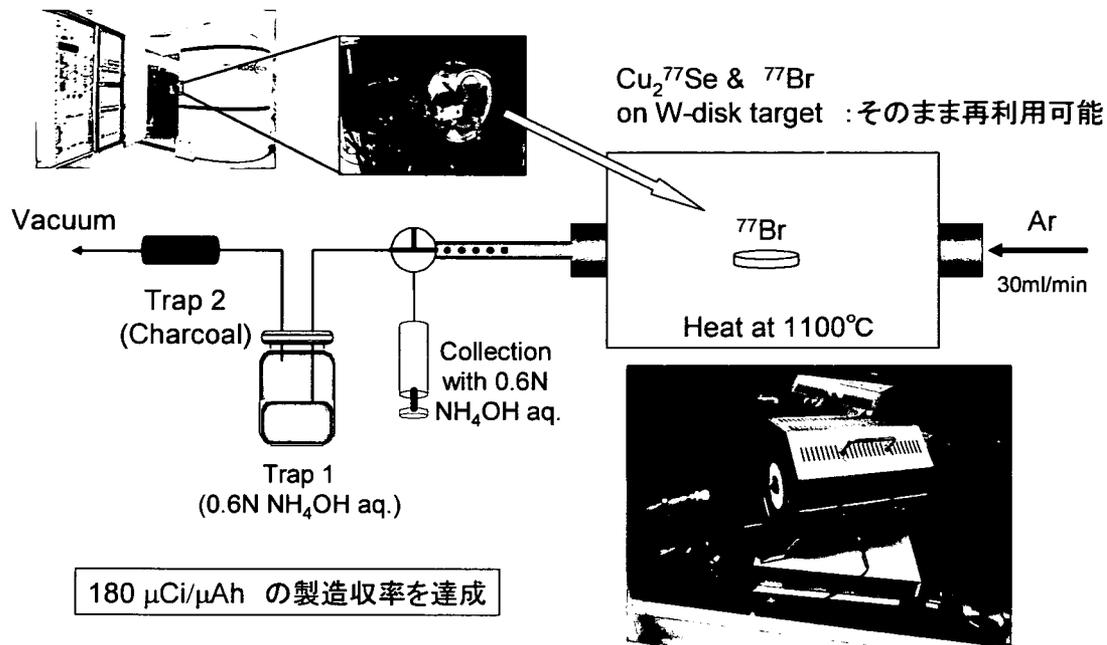


図 2. Br-77 精製・回収装置の概要

薬剤設計、合成に関する研究

（分担）研究者 徳永 雄次 福井大学大学院工学研究科材料開発工学専攻・
准教授

藤林 康久 福井大学高エネルギー医学研究センター・
センター長

研究要旨：新規癌診断・治療薬の開発を目的に、癌細胞に対し特異的に結合する化合物の分子設計とその合成を行った。細胞膜レセプターの一つとして知られているインテグリン $\alpha_v\beta_3$ に対し高い結合能を有するペプチド（H-Arg-Gly-Asp-OH）をリード化合物とし、前年度に引き続き分子計算を用いてインテグリンに対する結合能の評価を実施し、その結果を基に数種の化合物群の合成を行った。まず、非天然型アミノ酸を導入したペプチドの合成に成功し、また、体内での安定性を考慮し非ペプチド系化合物を設計し、ジフェニルメタンをスペーサー部位に、末端にグアニジン部位とカルボキシル基をそれぞれ持つ化合物を合成し、また末端にフタル酸を有する化合物の合成方法を確立した。一方、インテグリンに対する結合能を有するペプチド（H-Arg-Gly-Asp-OH）誘導体を合成し蛍光発光部位の導入を検討した。

A. 研究目的

本研究の最終的な目的は、新規癌診断・治療薬を開発することである。そのためのアプローチとして、まず、癌細胞に特異的に結合する化合物の探索を行う。特に、癌細胞レセプターへの特異的な結合能を有する化合物の選別を分子計算を用いて行い、最適化を図る。続いて、分子計算によって得られた結果を基に癌細胞認識部の候補の化合物を合成し、レセプターとの結合能について実測して認識部位の選定を行う。最後に、認識部位に放射線放出部位等の導入を行い診断薬として、さらに細胞毒性を有する部位を認識部に組み入れることによって癌治療薬への変換を実施する（Fig. 1）。

本年度は、上記研究の2段階目前半と3段階目の予備検討を実施し、癌細胞の認識部候補の化合物群の選定を行う。

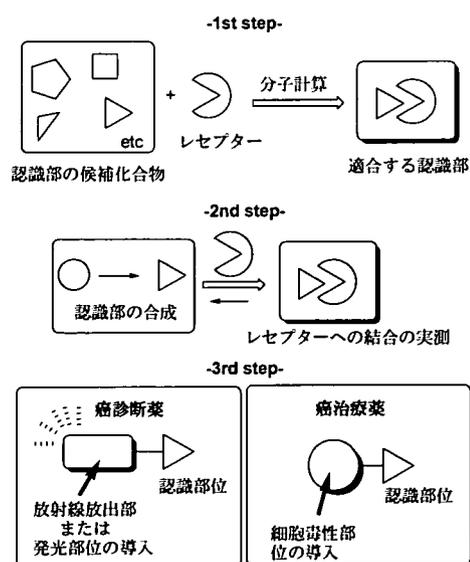


Fig. 1. 本研究のアプローチの模式図

B. 研究方法

リード化合物からの認識部位となる化合物の探索

癌細胞増殖に重要な役割を果たしている細胞膜レセプターである $\alpha_v\beta_3$ インテグリン（以下インテグリンと略す）に対し、高い結合能を有するペプチド（H-Arg-Gly-Asp-OH、以下Arg-Gly-Aspペプチドと略す）をリード化合物に新たな分子の設計を行った。Arg-Gly-Aspペプチドがインテグリンに結合する際には、N末端に存在するグアニジン部とインテグリン α_v のAsp150及びAsp218とが水素結合によって、また、C末端のカルボキシル基においては、インテグリン β_3 のSer121、Ser123、及び、Glu220との間に存在する金属イオンと配位結合により特異的に結合することが知られている。そこで、これら2種の官能基間の距離と角度を適切に固定でき、かつ微調整可能であり、また合成が容易であること、さらに、種々の置換基の変換が可能であり放射線放出部位や細胞毒性を有する部位の導入が容易である化合物を選別した。前年度より行っているように分子計算によるシミュレーションを基に、高い結合能が期待される化合物群の絞込みを行い、それら数種の化合物合成を検討した。以下、検討した化合物分について、1. 非天然型アミノ酸部位を持つペプチド、2. ジフェニルメタンをスペーサーとする化合物、3. 合成容易な非ペプチド系化合物について述べる。

1. 非天然型アミノ酸部位を持つペプチド

Arg-Gly-Aspペプチド自体は直鎖状構造を持つためにコンフォメーションが固定されず、インテグリンに対し結合能を有するも

の、本ペプチドより高い結合能を有する化合物や高特異的に結合する化合物が報告されている。例えば、Arg-Gly-Aspペプチド部を含む環状ペプチドとすることで、本トリペプチド部位のコンフォメーションを固定し、高い結合力を示している。しかしながら大環状ペプチドは合成を鑑みると、環化反応において副産物が生成し易く収率の低下を招くことや保護-脱保護を繰り返すことで工程数が多くなる欠点がある。そこで、前述の鍵となるこれら2種の官能基（グアニジン部とカルボキシル基）間の距離および角度をより適切に固定するために、Arg部位の炭素鎖をベンゼン環へと変更し、インテグリンとの結合能の向上を目指した。この際、Arg部位の変更により、2種の官能基（グアニジン部とカルボキシル基）間の距離が変わるためGly-Asp部位を変換し、設計した化合物の分子計算による妥当性を評価した。尚、Gly-Asp部位については、合成の容易さと入手原料を考慮し、天然アミノ酸から得られるジペプチドとし、その合成を行った（Fig. 2）。

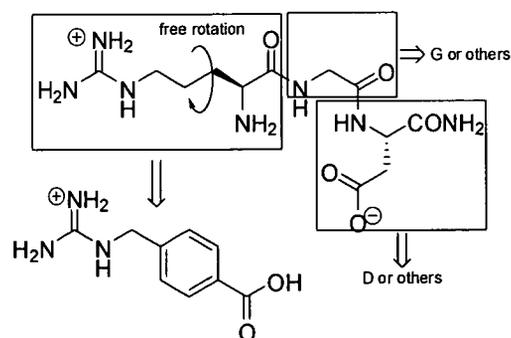


Fig. 2

2. ジフェニルメタンをスペーサーとする化合物

前年度実施したシミュレーションの結果よ

り、下記に示すジフェニルメタンをスペーサー部位に持つ化合物がインテグリンと優位に結合することが見出され、一部の誘導体合成を行った。それらの化合物合成に用いた中間体から、前年度に引き続き誘導体合成を行った。尚、本化合物群の特徴は、認識に重要な部位となるグアニジン部位とカルボキシル部位がベンゼンのパラ位に置換されているため、これら認識のための重要部位が固定されている点と、2個のベンゼン環を結ぶ部位 (C=X) を変換することで、認識部位間の距離が微調整できる点にある。前年度、導入の容易さを考慮しグアニジン部をベンゾイミダゾールへと変換した化合物の合成について行ったので、今年度はグアニジン部を持つ化合物についての合成を行った (Fig. 3)。

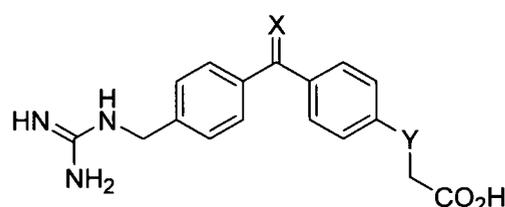


Fig. 3

3. 合成容易な非ペプチド系化合物

上記2と同様に、体内でのペプチターゼに対する安定性や器官移行性の変化を鑑み、新たな化合物の設計も行った。その結果、Fig. 4 に示した化合物群がシミュレーションより良好な結合結果が得られた。本化合物群は、鍵となる2種の官能基 (グアニジン部とカルボキシル基) 間を結ぶスペーサー一部に、単結合を1個 (ただしアミド結合部位を除いた場合) しか有さずインテグリンとの結合には、エントロピー的に有利と考えられる化合物である。また合成面におい

ても単純な構造を持つ3種のユニット、即ちグアニジン、シンナミック酸、アミノ安息香酸から構成され、またこれらの単位はベンジル位での結合やアミド化により合成が可能と予測できるため、合成面でも有利と考えられる (Fig. 4)。

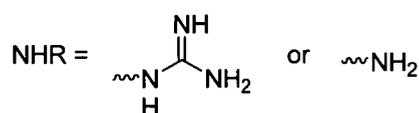
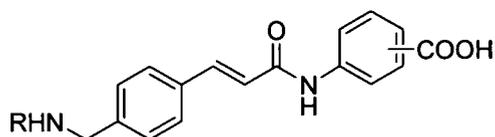


Fig. 4

また、近年グアニジン部位をアミンへと変換した化合物においても一部ではあるが、インテグリンに対して高い結合能を示す化合物も報告されている。そこで本化合物群についてもその合成を検討した。

Arg-Gly-Aspペプチドの合成、並びに本ペプチドへの蛍光発光部位導入の検討

上記に示した新規化合物群のインテグリンへの結合能を検討するため、認識部位への競合的な阻害作用を示すArg-Gly-Aspペプチドの合成を検討した。特に、分光学的な手法を用いインテグリンに対する結合能を簡便に測定するため、本ペプチドへの蛍光発光部位の導入を試みた。

(倫理面への配慮)

本段階において、倫理面への配慮は不必要である。

C. 研究結果

1. 非天然型アミノ酸部位を持つペプチド

Arg部位の炭素鎖をベンゼンに変換した化合物について、①. C末端部 (Asp部) を種々の天然アミノ酸に変換した化合物 (Table 1)、②. 中央部 (Gly部) を種々の天然アミノ酸に変換した化合物 (Table 2) のインテグリンとの結合に関するシミュレーションを実施した。分子計算には、MacroModel 9.1 を計算ソフトに、また力場には OPLS2005を用い溶媒には水を選択した。また、分子計算は設計した分子をまず単独で計算し安定コンフォメーションとその自由エネルギーを求めた後、X線結晶解析より得られたインテグリンの結合部位へ設計分子を導入し最安定化を行った。最安定化を実施する際に可動範囲を設計分子より10Åに設定し計算した。その結果、Fig. 5 に示した化合物群ではGlyを導入した化合物 (Table 1 run 2) が最も強い結合を示した。

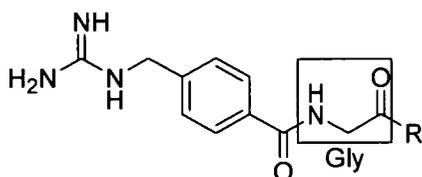


Fig. 5

Table 1. グリシンを中央部に含む化合物の計算結果

run	R	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)
1	NHCH(CH ₃)CO ₂ H	-54413
2	NHCH ₂ CO ₂ H	-54637
3	NHCH{CH ₂ CH(CH ₃) ₂ }CO ₂ H	-53409
4	NHCH(CH ₂ OH)CO ₂ H	-54520

$$\Delta \Delta G = \Delta G (\text{inhibitor-integrin complex})$$

$$- \Delta G (\text{inhibitor})$$

これらの結果を系統的に考察すると、立体

的なかさ高さが増すにつれ、結合能が低下している傾向にあると考えられる。Run 2 に示した化合物のインテグリンに対する結合様式の詳細をFig. 6 に示したが、Arg-Gly-Aspペプチドと同様に2種の認識部 (グアニジン部とカルボキシル基) がインテグリンの(鎖とⓐ鎖のそれぞれと特異的に結合し、またそれらの官能基間の距離も強い結合を示唆するものであった。またグアニジン部位のインテグリン (Asp218のカルボキシル) への水素結合についても2個存在し、その結合角は177-176度と理想に近い角度で結合している結果となった。

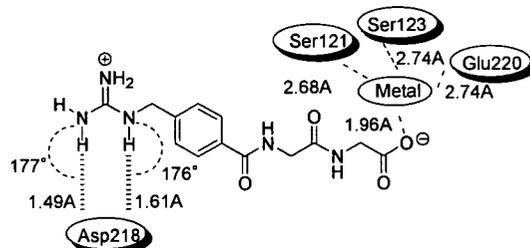


Fig. 6

一方、C末端をAspに固定した化合物 (Fig. 7) においてはAlaを中央部に有する化合物において良好であった。本結果とTable 1 より得られたことを鑑みると、トリペプチドとの結合時におけるインテグリンのトリペプチドのC末端近傍は、比較的込み入った構造であることが推測できる。

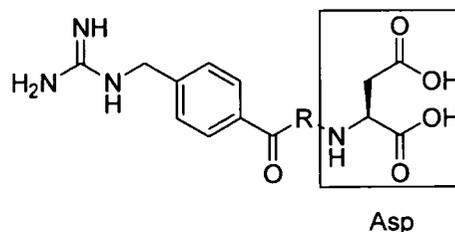


Fig. 7

Table 2. アスパラギン酸をC末端に含む化合物の計算結果

run	R	$\Delta \Delta G$ (kJ/mol)
1	NHCH(CH ₃)CO	-54600
2	NHCH(CH ₂ CO ₂ H)CO	-54518
3	NHCH(CH ₂ CH(CH ₃) ₂)CO	-53276
4	NHCH(CH ₂ OH)CO	-54109

$$\Delta \Delta G = \Delta G (\text{inhibitor-integrin complex})$$

$$- \Delta G (\text{inhibitor})$$

尚、run 1 の化合物に関する詳細をFig. 8に示した。Arg-Gly-Aspペプチドと類似の結合様式であり、グアニジン部とカルボキシル基が結合に関与している。しかしながら、カルボキシルレートと金属イオンとの結合距離が多少長くなっており、この点が危惧される。また本化合物では、Aspのカルボキシル基はアミノ基のβに存在するものであり、本結果はTable 1 の化合物と2種の官能基間の炭素の数が異なっている。この官能基間の炭素数の相違により、カルボキシルレートと金属イオン間の距離に不具合を生ずる結果となった可能性がある。

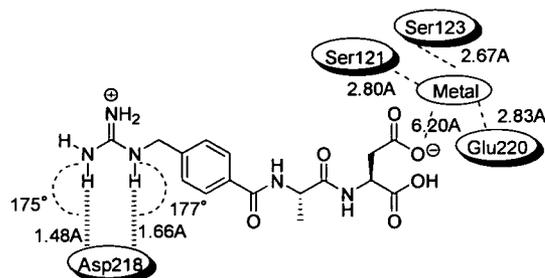
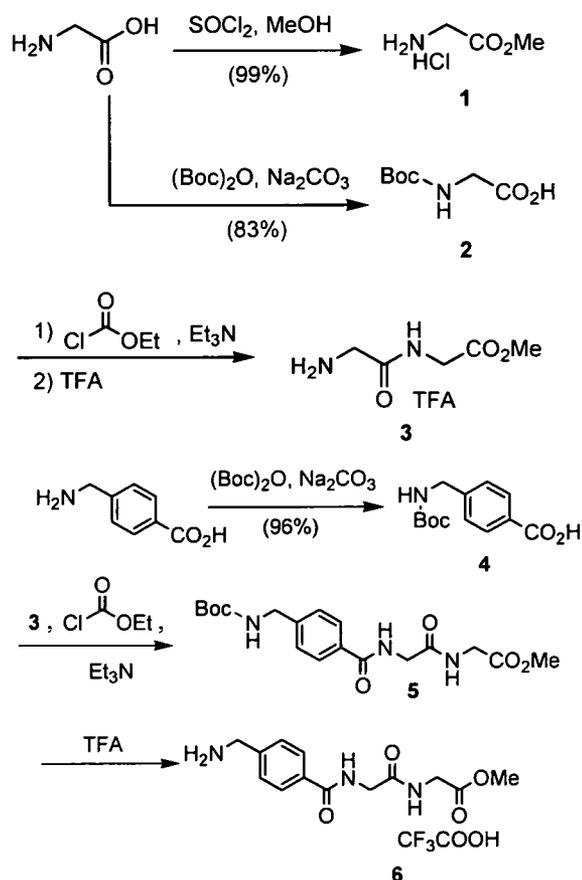


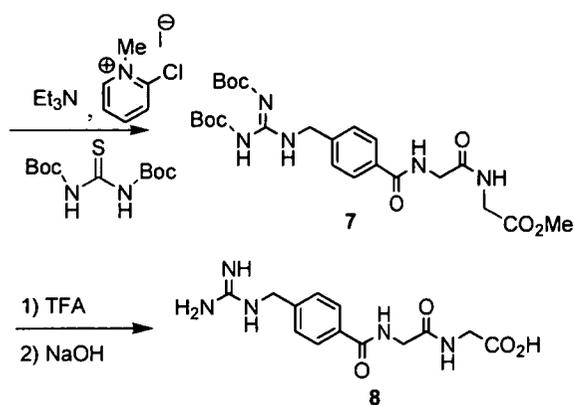
Fig. 8

以上の結果より、Fig. 6に示した化合物をこれらの化合物群の第一の候補として選択し、その合成を行った。合成法は、末端のジペプチド (H-Gly-Gly-OR) 部位をまず合成し、その後非天然型アミノ酸とのアミド

化を行った後、グアニジン部を導入する方法である。

まず、グリシンより2種の官能基 (カルボキシル基およびアミノ基) をそれぞれ別途保護し、得られたアンモニウム塩 1 とカルボン酸 2 を混合酸無水物法にてジペプチドへと導いた後、アミノ基の脱保護を酸性条件下行いジペプチド誘導体 3 へと変換した。続いて、非天然型アミノ酸のアミノ基を保護し 4 を得、3 と 4 を前述と同様に混合酸無水物法を用いトリペプチド 5 とした。さらに脱保護してアンモニウム塩 6 を経由した後、2-chloro-1-methylpyridinium iodide (向山試薬) を用いる Lipton らの方法にて、グアニジン部の構築を行い 9 へと変換後、最後に2種類の脱保護を行い目的とする化合物 8 の合成を完了した。





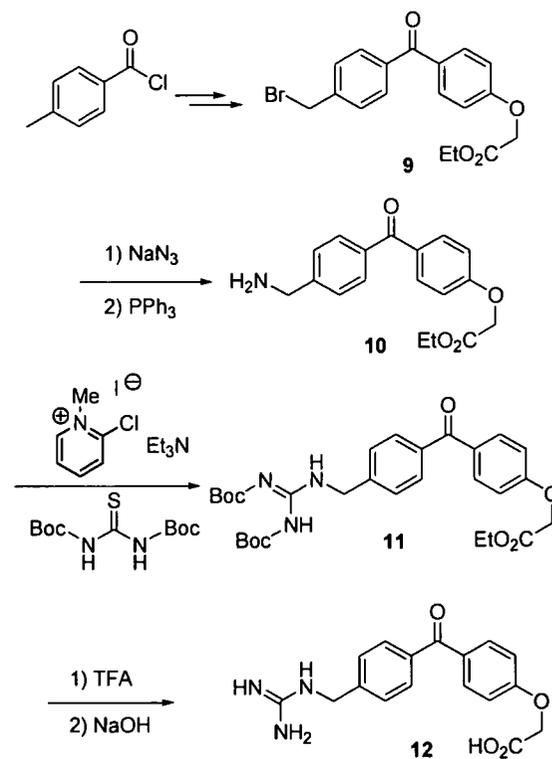
Scheme 1

2. ジフェニルメタンをスペーサーとする化合物の合成検討

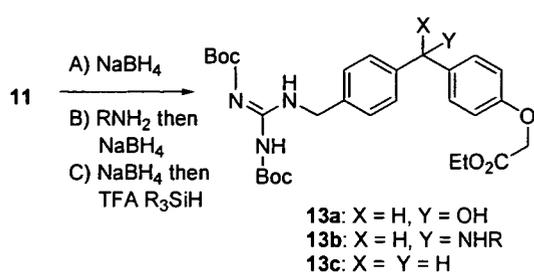
前年度合成した化合物の重要中間体である **9** をトルイルクロリドより導き、本化合物へのグアニジン部導入を検討した。グアニジンの求核的な置換反応等、種々検討したものの目的物を得るには至らなかった。そこで、ブロミド **9** をアジド化後還元してアミノ **10** へと変換後、アミノ基を *t*-ブトキシカルボニル基で保護したチオウレアを用いる方法にてグアニジン部の構築を検討した。その結果、塩化水銀を用いてチオウレア活性化する方法では反応は良好に進行しなかったものの、低収率ではあるが向山試薬にて活性化する条件にて、目的の成績体 **11** を得ることに成功した。最後に、*t*-ブトキシカルボニル基を酸性条件にて、またエステル部を塩基性条件にてそれぞれ脱保護し、ベンゾフェノンの両端にグアニジン部とカルボキシル基を持つ化合物 **12** の合成に成功した (Scheme 2)。

本化合物群の大きな特徴は、スペーサー部の 2 個のベンゼンに結合した部位の炭素の変換により、両端の官能基間の距離の微

調整を行える点にある。そこで、スペーサー一部のベンゼン環-炭素-ベンゼン環部の結合角の変換を行うため、化合物 **11** の A 法) ケトン部のアルコールへの還元、B 法) ケトン部のイミン形成とその還元によるアミンへの変換、をそれぞれ実施し、2 種の分子認識部位 (グアニジン部とカルボキシル基) 間の距離を変えた化合物合成も実施し、アルコール **13a**、およびアミン **13b** への誘導にも成功している (Scheme 3)。現在、**13a, b** の *t*-ブトキシカルボニル基の脱保護条件とその単離について検討中である。また、化合物 **11** のケトン部のアルカンへの還元を検討した。酸性条件化におけるシランを用いた還元反応では、現在まで目的のベンジル位の還元は達成されていない。今後、ヒドラジンを用いる還元等を実施する予定である。



Scheme 2



Scheme 3

3. 合成容易な非ペプチド系化合物

新規非ペプチド系化合物の分子設計を行った。種々の化合物を検討したところ、Fig. 9に示す化合物がシミュレーションにより良好な結果を与えた。分子計算は、前述と同様に、MacroModel 9.1 を計算ソフトに、また力場にはOPLS2005を用い溶媒には水を選択した。また、設計した分子を単独で計算した後、インテグリンの結合部位へ設計分子を導入し最安定化を行った。その結果の一部をFig. 5に示す。本化合物群は、2個のベンゼン環とアミド部を有し、インテグリン結合部位（グアニジン部とカルボキシル基）が固定されている構造を持つ。

Run	R ₁	R ₂	X	炭素炭素間距離(Å)	
1			C-C	15.12	16.84
2a			C-C	15.83	15.58
2b			C-C	13.52	14.19
3a			C-C	14.64	13.36
3b			C-C	12.89	12.97
4a			C-C	13.43	13.43
4b			C-C	13.56	13.49

Fig. 9

また、カルボキシル基に関しては、それぞれの化合物とも2個配し、β鎖との結合能に関し確率を増すこと、並びに新たな水素結合等を期待した分子設計である。また、インテグリン結合部位の固定化に関しては、アミド部とベンゼン環を結ぶ部位 (Fig. 9に示したX部) を炭素-炭素2重結合とするほうが有利と考えられるが、インテグリンとの結合には、距離の固定と官能基の角度についても重要であるため、自由度のある単結合を配した化合物についても計算を行った。また計算結果の指標には、設計した分子単独での安定コンフォメーションにおける2種のインテグリン結合部位の炭素-炭素間の距離を用い、X線結晶解析で得られた値 (13.7Å) と比較した。その結果、イソフタル酸を末端に、また2重結合を持つ化合物 (Run 2b) が良好な結果を与えた。そこで、本化合物をインテグリン認識部位へ導入し計算を行った。その詳細をFig. 10に示したが、グアニジン部に関し Arg-Gly-Aspペプチドと類似の結合様式であった。一方2個導入したカルボキシル基に関しては、金属イオンとインテグリンの Ser123との結合において、その結合距離が長くなり弱くなっていることが予想されたが、もう一方のカルボキシル基と Asp214との間に新たな水素結合が観察され、上記の結合を補う分子間力が期待できる結果となった。また、両官能基間の結合距離は、単独計算に比較し長くなっている。以上より、本化合物を本系の第一の合成ターゲットとした。

ところで、グアニジン部をアミンへ変換した化合物でもインテグリンに対し結合能を持つ化合物が報告されている。そこで、

本系のグアニジン部をアミンとした化合物についても計算を行った (run 3-4)。指標となる距離については、アミンの窒素-カルボキシル基の炭素間の距離を用いが、グアニジン部を持つ化合物と同様の結果であった。イソフタル酸を末端に持つ化合物 (run 4b) について、インテグリンとの結合の詳細について検討した (Fig. 11)。結合部位間の距離について、並びに β 鎖との結合に関しては、グアニジン部を有する化合物と同等の結果であったが、 α 鎖との結合に関しては、予想通り Asp150 との結合のみとなり、この点について結合が弱くなることが危惧された。

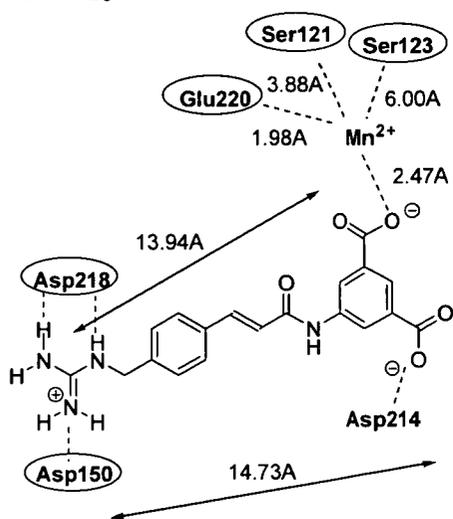


Fig. 10

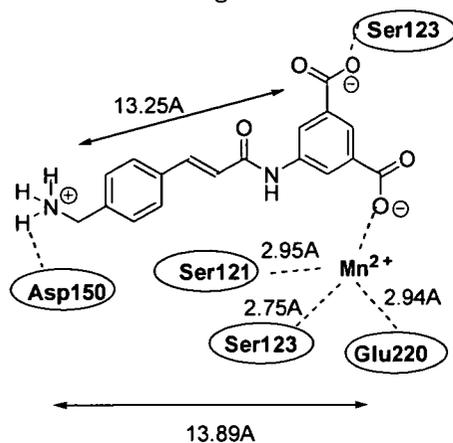
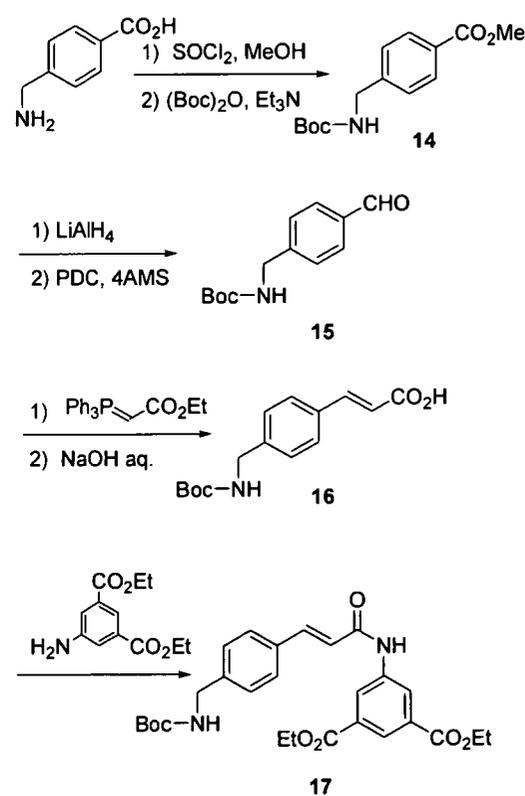


Fig. 11

しかしながら、アミンはグアニジン合成のための中間体より容易に変換可能と考えられるため、2種の化合物合成可能な合成ルートによりこれらの合成検討を開始した (Scheme 4)。

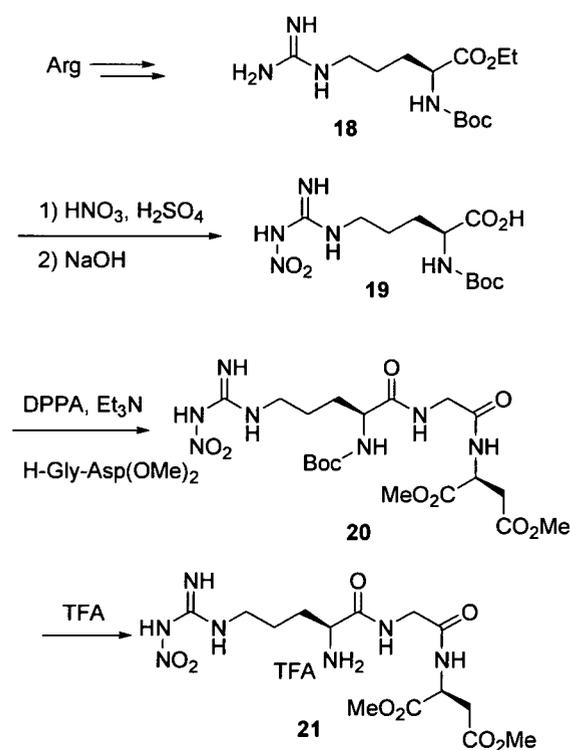
まず、アミノ安息香酸のカルボキシル基とアミノ基をそれぞれ保護し、エステル14とし、続いてエステル部をアルデヒド15へと変換した。得られた15をウィティッヒ反応に付し、2重結合部位の構築とエステル部の導入を行った後、エステル部の加水分解によりカルボン酸16へと誘導した。さらにアミド化によって17とし、Fig. 11に示した化合物の骨格合成を行った。



Scheme 4

Arg-Gly-Aspペプチド類の合成検討

前年度に引き続き、初めにGly-Aspペプチド合成後、Argとのアミド化を行う方法にて合成を検討した (Scheme 5)。前年度合成したアルギニン誘導体18のグアニジン部をニトロ基で保護し、エステル部の加水分解によってカルボン酸19へと変換した。続いて塩入試薬を用い、Gly-Aspジペプチド誘導体とのアミド化によってトリペプチド20へ誘導後、脱保護により21へ導いた。現在、アミノ基への蛍光発光部の導入を種々のアミド化によって検討している。



Scheme 5

D. 考察

1. 非天然型アミノ酸部位を持つペプチド

本化合物群の中で、シミュレーションによって良好な結果を与えた化合物の合成法を見出し、一つの目的を達成した。しかしな

がら、計算結果が実際のインテグリンに対する結合と全く同じ結果を与えるものではない。そこで今回開発した合成手法をベースに、種々のジペプチドのライブラリーと非天然アミノ酸とのアミド化を実施し、ライブラリーを合成することが、本系の有効性をすばやく評価する方法と考える。

2. ジフェニルメタンをスペーサーとする化合物の合成検討

ジフェニルメタンをスペーサー部位に持つ化合物の合成に成功した。合成面ではグアニジン部の構築工程が低収率であるため、本工程の改良法を検討することが望まれる。一方、誘導体のバリエーションを鑑みる場合、鍵となる結合角の積極的な変換について検討すべきと考えられる。今後、2個のベンゼン環をヘテロ原子にて結合した化合物へと変換すべきと思われる。

3. 合成容易な非ペプチド系化合物

本化合物群の合成方法論の確立は達成したと考えられる。今後、グアニジン部の構築、オレフィン部の還元等により類縁体合成へと展開することが望まれる。

Arg-Gly-Aspペプチド類の合成検討

Arg-Gly-Aspペプチドの骨格合成は達成された。X線結晶解析から、立体的に空いているグアニジンのアミノ基への蛍光発光部位導入が望ましいことと考えられる。しかしながら、本アミノ基への蛍光発光部位導入に難航していることからグアニジン部の関与が示唆され、保護基の変換をすべきと思われる。

E. 結論

インテグリンに対し高い結合性を示す新規化合物の探索をArg-Gly-Aspペプチドをリード化合物に行い、3種の化合物群をシミュレーションから選択し、それらの合成を行っている。非天然型アミノ酸部位を持つペプチド類合成では、第一の候補化合物合成を達成し、類縁体合成のための手法を確立した。また、ジフェニルメタンをスペーサーとする化合物の合成では、数種の化合物の合成を完了し、本系の合成のための方法論を提供した。さらに、合成容易な非ペプチド系化合物では、目的とする化合物の合成には成功していないものの、骨格構築に成功し、また計算結果だけではあるものの、中間体より容易に誘導可能なアミンでもインテグリンに対し高い結合性を示す可能性を示すことができた。

今後、Arg-Gly-Aspペプチドに発行部位等を導入し、合成を達成した化合物に対する結合評価を行う予定である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 特になし