

—3-Iodo-4-hydroxyphenylcysteamine—

98-230 西村 恭子

(指導教官：川井 恵一 教授)

要旨

黒色腫細胞ではメラニン形成が異常に亢進していることから、これを標的とする抗腫瘍薬剤の開発が行われてきた。本研究では新規診断・内用治療薬剤の開発の一端として、メラニン形成において必須の酸化酵素であるチロシナーゼとの基質親和性が高いと期待される 4-hydroxyphenylcysteamine (4-PCA) を合成し、その有用性を評価した。4-PCA の放射性ヨウ素標識体(I-PCA)は、クロラミン T 法により高収率で得られた。また B16 黒色腫細胞を移植した C57BL6 マウスにおける体内分布では、血中からの消失が非常に速い一方、黒色腫組織への集積は軟部組織と比較して高く、滞留性も認められた。その結果、画像化に必要な対周辺組織比はすでに臨床利用されている腫瘍診断薬と同等か上回っていた。よって I-PCA は黒色腫画像診断薬としての高い可能性を有していると考えられた。

I. はじめに

悪性黒色腫は早期より転移を起こし、極めて予後不良の疾患であり、その特異的診断法および治療法の開発が切に望まれている。黒色腫細胞ではメラニン形成が異常に亢進しており、酸化酵素であるチロシナーゼが必須である。フェノール環を有する一連の含硫アミノ酸・アミン誘導体はチロシナーゼとの基質親和性が高く、黒色腫細胞内に滞留することが報告されている^{1,2)}。当研究室では、腫瘍で特異的に亢進する代謝活性を指標とした新規ヨウ素標識アミノ酸開発を目的として、チロシナーゼ基質類似体を化学修飾した 4-hydroxyphenyl-L-cystein を標識母体化合物として選択し、その 3 位放射性ヨウ素標識体(I-PC)の黒色腫細胞への集積性およびその機序を検討した。その結果、I-PC は黒色腫組織への集積が高く滞留性も認められ、さらにチロシナーゼ阻害剤による集積低下が顕著であることから、I-PC とチロシナーゼとの相互作用が示唆された。しかしその集積にアミノ酸輸送機構の関与は少なく、ヨウ素および硫黄原子の導入により増加した脂溶性のため細胞膜を透過するものと考えられた³⁾。

本研究では、チロシナーゼとの親和性に関してはアミン化合物の利用が有利であると考え、より親和性が高いと期待される 4-hydroxyphenylcysteamine (4-PCA) の合成を試みた。得られた 4-PCA を標識母体化合物として、その放射性ヨウ素標識体、3-iodo-4-hydroxyphenylcysteamine (I-PCA) を合成するとともに、I-PCA の黒色腫細胞への集積性を検討し、画像診断薬としての有用性を評価した。

II. 実験方法

1. 4-PCA の合成

4-PCA の合成は Miura らの方法⁴⁾に準じて行った。試薬は全て特級品を用いた。

フェノール 28.2g (300mmol) とシスタミン二塩酸塩(和光) 16.9g (75mmol) を 47% HBr 溶液に溶かし、約 120°C の油浴で 2 時間還流した。その後、反応溶液を乾固するまで減圧留去した。残渣を 50ml の蒸留水に溶かし、28% アンモニア水を加えて pH8.0 にあわせた後、一週間冷却攪拌した。その溶液をろ過し、粗結晶とろ液に分画した。ろ液は 28% アンモニア水で pH10.0 に調整し、3 日間冷却静置した。結晶生成

後にろ過し、無色、針状結晶の 4-PCA を得た。一方、粗結晶を希塩酸に溶かし、28%アンモニア水で pH10.0 とし、3 日間冷却静置した。生成した結晶をろ取し、淡桃色、針状結晶の 2-hydroxyphenylcysteamine (2-PCA) を得た。

4-PCA および 2-PCA の反応の進行は以下の溶媒系によるシリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC, Merck; Art. 5554)を用い、254nm の UV 吸収で検出することにより確認した。

メタノール：酢酸=100：1

(Rf 値 4-PCA 0.50~0.60、シスタミン 0.10~0.20、フェノール 0.65~0.75)

メタノール：10%酢酸アンモニウム=10：1

(Rf 値 4-PCA 0.50~0.60、シスタミン 0.10~0.20、フェノール 0.65~0.75)

今回用いた反応では、目的とする 4-PCA とともに位置異性体である 2-PCA も生成する(図 1)ことから、上記の結晶法により分離精製した。4-PCA の構造と異性体純度については、融点を測定するとともに、元素分析、¹H-NMR および質量分析(MS)にて確認した。

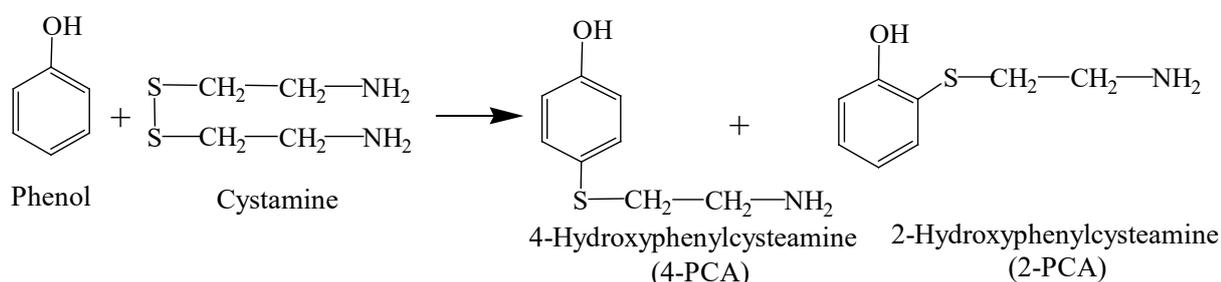


図 1. 4-PCA の合成反応式

2. 4-PCA の ¹²⁵I 標識

4-PCA の ¹²⁵I 標識は、クロラミン T による酸化法を用いて無担体条件下で行った。

4-PCA 1.0×10⁻⁷mol をリン酸緩衝液 (pH 6.2, 0.4M) 200μl に溶かし、無担体 ¹²⁵I-NaI (18.5MBq)を加えた。得られた混合液にクロラミン T 1.0×10⁻⁸mol/30μl リン酸緩衝液(pH6.2, 0.05M)を加えることで標識を開始した。反応開始後 15 分にピロ亜硫酸ナトリウム 1.0×10⁻⁸mol/20μl リン酸緩衝液(pH6.2, 0.05M)を加え、反応を停止した。

精製は Sep-Pak C-18 カートリッジ(Waters)で行った⁵⁾。予め、コンディショニングを行ったカートリッジに反応液をアプライし、リン酸緩衝生理液を充分に通水して未標識 4-PCA、NaI を洗浄した。その後、20%エタノールにて ¹²⁵I-PCA を溶出した。¹²⁵I-PCA の標識率、放射化学的純度は以下の溶媒系の TLC にて確認した。

メタノール：酢酸=100：1 (Rf 値 ¹²⁵I-PCA 0.40-0.50、¹²⁵I⁻ 0.75-0.85)

メタノール：10%酢酸アンモニウム=10：1 (Rf 値 ¹²⁵I-PCA 0.50-0.60、¹²⁵I⁻ 0.70-0.80)

3. 担がんマウス体内分布実験

腫瘍細胞は B16 melanoma を、動物は C57/BL6 系雄性マウス(6 週令)を使用した。培養して増殖させた後、5×10⁶個/0.1ml DMEM (10% Fatal Calf Serum)の腫瘍細胞をマウス大腿皮下に移植し、約 10 日後腫瘍径が 1cm 程になったものを実験に使用した。

上記の担がんマウスに ¹²⁵I-PCA 溶液および ⁶⁷Ga-citrate 溶液(第一ラジオアイソトープ研究所)をそれぞれ 37kBq 含む生理食塩溶液 100μl を尾静脈より投与した。投与後一定時間にエーテル麻酔した後、へパリン処理した注射器を用い、心臓採血して屠殺した。速やかに臓器を摘出し、重量を測定した後放射能を測定した。放射能の測定には、オートウェルγカウンター(Aloka; ARC-380)を用い、予め ⁶⁷Ga のγ線が ¹²⁵I 測定ウィンドウに与える影響を評価した校正曲線により補正した。求めた放射能と測定

した組織の重量から、 ^{125}I -PCA および ^{67}Ga -citrate の集積率を求めた。 ^{125}I -3-Iodo- α -methyl-L-tyrosine (^{125}I -AMT)、 ^{123}I -*m*-iodobenzylguanidine (^{123}I -MIBG) についても同様に検討した。

III. 結果と考察

1. 4-PCA の合成

得られた収率と機器分析の結果は以下のとおりである。

4-PCA 収率 8.7% (文献値 26%)

融点 (3 回測定) 116~119°C (文献値 118~121°C)

元素分析 計算値 C:56.78, H:6.55, N:8.28 測定値 C:56.41, H:6.50, N:8.41

$^1\text{H-NMR}$ δ 2.69-2.72 (t, -CH₂-NH₂), 2.83-2.86 (t, -S-CH₂-),

6.71-6.74 (d, aromatic), 7.26-7.29 (d, aromatic)

MS (C₈H₁₁NOS) 計算値 [M+H]=170 測定値 [M+H]=170

2-PCA 収率 1.1% (文献値 13%)

融点 (3 回測定) 140~142°C (文献値 142~144°C)

元素分析 計算値 C:56.78, H:6.55, N:8.28 測定値 C:56.68, H:6.34, N:8.34

$^1\text{H-NMR}$ δ 2.72-2.75 (t, -CH₂-NH₂), 2.87-2.90 (t, -S-CH₂-), 6.72-6.75 (d, aromatic),

6.79-6.81 (dd, aromatic), 7.10-7.14 (dd, aromatic), 7.35-7.38 (d, aromatic)

MS (C₈H₁₁NOS) 計算値 [M+H]=170 測定値 [M+H]=170

どの分析結果も計算値、文献値とよく一致しており、4-PCA および 2-PCA の構造と分離精製後の高純度が確認された。

2. 4-PCA の ^{125}I 標識

標識法において酸化剤のモル比などを種々検討、最適化した結果、73%と高い標識率が得られた。精製は Sep-Pak C-18 カートリッジで短時間に簡便に行い、放射化学的純度 90%以上の ^{125}I -PCA を無担体状態で得た。

3. 担がんマウス体内分布実験

臓器組織 1g あたりの集積率を図 2 に示す。投与後 5 分では、腎臓や肺、肝臓への集積が高いものの、その後速やかに低下した。また血液中の放射能も、経時的に低下した。一方、腫瘍には滞留の傾向が認められた。

図 3 に画像化する上で重要な対周辺組織比を示す。ここでは ^{125}I -PC の他に、 ^{125}I -AMT, ^{123}I -MIBG, ^{67}Ga -citrate の値とも比較した。 ^{125}I -PCA は、他の診断薬と比べてどちらも高い値を示した。特に対筋肉比では、時間につれて上昇し、60 分後には 8 倍となった。この値は既存の腫瘍診断薬、 ^{67}Ga -citrate を大きく上回っており、 ^{125}I -PCA の悪性黒色腫診断薬としての可能性が確認された。

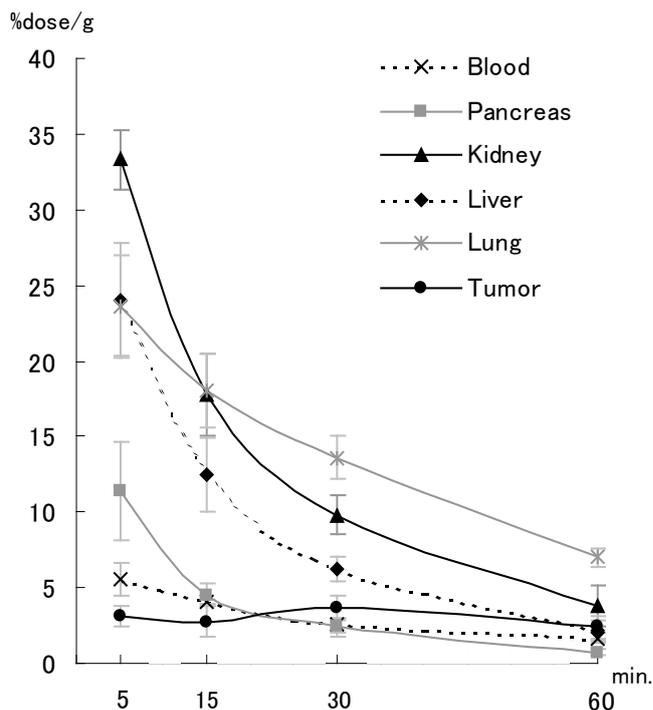


図 2. ^{125}I -PCA の集積率

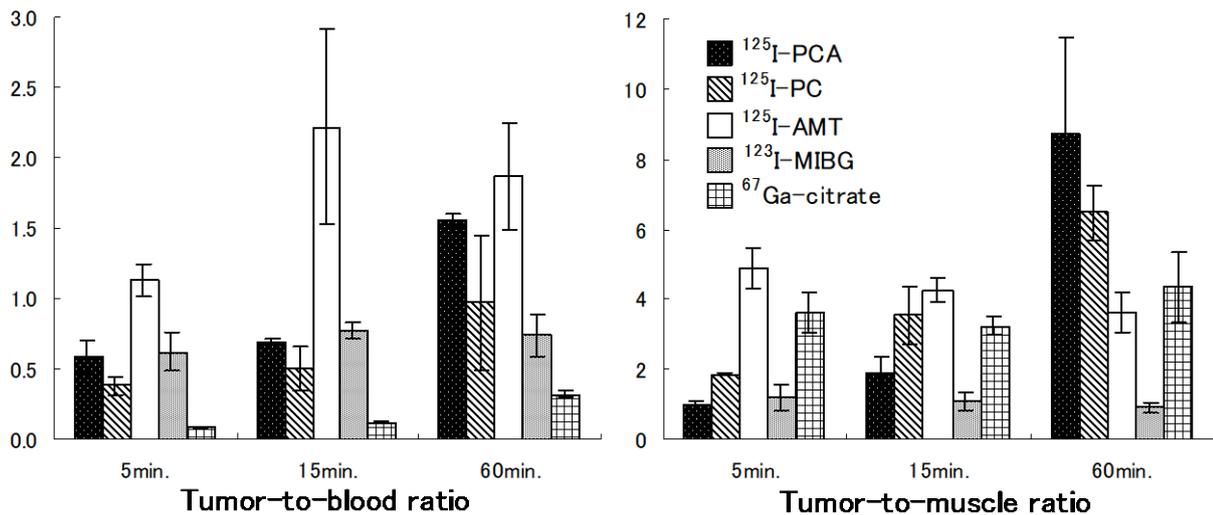


図 3. B16 melanoma 担がんマウスにおける対周辺組織比

IV. 結語

4-PCA は合成により容易に得ることができ、分離精製後における異性体純度の高さも確認できた。4-PCA を標識原料化合物とし、簡便に高い標識率及び放射化学的純度で無担体標識体が得られる標識条件も確立した。その標識体である $^{125}\text{I-PCA}$ は、黒色腫に対する高い集積性を示し滞留性も認められた。その結果、画像化に必要な対周辺組織比は、既に臨床利用されている腫瘍診断薬と同等か上回っていた。よって、 $^{125}\text{I-PCA}$ は、悪性黒色腫画像診断薬剤としての高い可能性を有していると考えられる。

謝辞

今回の実験を行うにあたり、本学医学研究科の絹谷先生には大変お世話になりました。心より感謝いたします。

参考文献

- 1) Ito S., Inoue S., Yamamoto Y., Fujita K. Synthesis and antitumor activity of cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanines and related compounds. *J. Med. Chem.* 24: 673-677, 1981.
- 2) Ito S., Kato T., Ishikawa K., Kasuga T., Jimbow K. Mechanism of selective toxicity of 4-S-cysteinylphenol and 4-S-cysteaminyphenol to melanocytes. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2007-2011, 1987.
- 3) Nishii R., Kawai K., Flores II L. G., Jinnouchi S., Nagamachi S., Tamura S. Synthesis and preliminary biodistribution of 3-iodo-4-hydroxyphenyl-L-cystein. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 42: S795-797, 1999.
- 4) Miura S., Ueda T., Jimbow K., Ito S., Fujita K. Synthesis of cysteinylphenol, cysteaminyphenol, and related compounds, and in vivo evaluation of antimelanoma effect. *Arch. Dermatol. Res.* 279: 219-225, 1987.
- 5) Juhlke S., Biersack H. J. Simple preparation of L-3-iodo- α -methyl tyrosine suitable for use in kit preparations. *Appl. Radiat. Isot.* 46: 177-179, 1995.