

200912027A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

糖尿病関連血管病（動脈硬化・足病変）の早期診断・治療のための
高感度分子イメージングプローブの開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐治 英郎

平成22（2010）年 5月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

糖尿病関連血管病（動脈硬化・足病変）の早期診断・治療のための
高感度分子イメージングプローブの開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐治 英郎

平成22（2010）年 5月

目 次

I. 総括研究報告		
糖尿病関連血管病（動脈硬化・足病変）の早期診断・治療のための 高感度分子イメージングプローブの開発	-----	1
佐治 英郎		
II. 分担研究報告		
1. 製剤学的アプローチによる高感度分子プローブの開発	-----	7
小野 正博		
2. 分析系・評価系の確立に関する研究	-----	10
天満 敬		
3. 病態生理学的アプローチによる高感度分子プローブの開発	-----	13
河嶋 秀和		
4. 分析系・評価系の確立に関する研究	-----	17
上田 真史		
5. モデル動物の作製に関する研究	-----	21
塩見 雅志		
6. 分子プローブの製剤開発に関わる情報提供	-----	24
関 育也		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	31

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総括研究報告書

糖尿病関連血管病（動脈硬化・足病変）の早期診断・治療のための
高感度分子イメージングプローブの開発

研究代表者 佐治 英郎 京都大学薬学研究科 教授

研究要旨：糖尿病性血管病に由来する動脈硬化は心筋梗塞を高頻度に引き起こし、さらに、下肢切断に至る糖尿病足病変は患者の生命予後・QOLを著しく低下させる。従って、これらに対する適切な治療法選択のために、高精度な診断法の開発が急務である。本研究の目的は、動脈硬化及び炎症の発生・進展の分子機構を標的として、病態生理学的観点と製剤学的観点からプローブ設計を行い、炎症の存在・進展範囲・活動性のみならず、微細な動脈硬化巣の不安定性を高感度で検出・評価しうる核医学分子イメージングプローブの開発を行い、糖尿病性炎症による合併症の高精度診断・治療に資することにある。そこで、本研究では、①病態生理学的観点から動脈硬化の発生・進展・不安定化に密接に関わる分子として酸化LDL およびリゾリン脂質受容体（G2A）を、さらに感染症の炎症反応における白血球の浸潤に密接に関わる分子として、Formyl Peptide Receptor (FPR)を選択し、これらを標的とする分子イメージングプローブを設計することを計画した。また、②製剤学的な観点から、生体内代謝耐性化技術および分子電荷制御によるインビボ標的指向性技術を構築すると共に、プローブ内に複数の放射性同位元素（RI）を導入するシグナル増幅法と高効率の標識法を設計することで高感度画像化を目指すこととした。平成21年度の検討により、酸化LDL、G2A、FPR それぞれに対する複数の分子プローブ候補化合物を設計するとともに、それらの標品化合物の合成に成功し、さらにその一部についてはRI標識にも成功した。さらに、候補化合物のインビトロ・インビボ評価系も確立することができた。これらのことから、糖尿病性血管病に由来する炎症および動脈硬化巣の不安定性を高感度で検出しうる核医学分子イメージングプローブの開発の可能性が示された。

研究分担者：

小野 正博	京都大学薬学研究科	准教授
天満 敬	京都大学薬学研究科	助教
河嶋 秀和	京都大学医学研究科	助教
上田 真史	京都大学医学研究科	助教
塩見 雅志	神戸大学医学部附属動物実験施設	准教授
関 育也	日本メジフィジックス株式会社	アシスタントマネジャー

具体的には、①病態生理学的観点から動脈硬化発生・進展に関与する酸化LDLおよびリゾリン脂質受容体（G2A）、感染性炎症反応における白血球浸潤に関与するFormyl Peptide Receptor (FPR)を選択し、これらを標的とする分子プローブを設計する。また、②製剤学的観点から、代謝耐性化およびインビボ標的指向性技術を構築すると共に、プローブ内に複数RIを導入するシグナル増幅法と高効率標識法を設計し、従来比3～5倍の高感度化を目指す（図1）。

A. 研究目的

糖尿病由来の動脈硬化は心筋梗塞を高頻度に惹起し、下肢切断に至る糖尿病足病変は患者の生命予後を著しく低下させる。従って、適切な治療の実施のために、高精度な診断法の開発が急務である。本研究の目的は、疾患の分子機構を標的として、病態生理学的観点と製剤学的観点からプローブ設計を行い、炎症の存在・進展範囲・活動性、および、動脈硬化巣の不安定性を高感度で評価しうる分子プローブの開発を行い、糖尿病性合併症の高精度診断・治療に資することにある。

2型糖尿病では、個人の特徴に応じた予防・治療の研究開発及び普及の重要性が指摘されている。動脈硬化巣の検出と性状把握、糖尿病足病変の炎症範囲把握、感染の鑑別は、治療方針の決定等に必須である。本研究の成果は、非侵襲な分子イメージング手法により、個人の病態を反映した画像情報を提供し、早期標的治療の基盤となると共に、病期に応じた適切な治療の実現につながり、患者の社会復帰促進や医療経済効果の向上にも寄与しうる。

研究開発の全体構想

分子イメージングプローブ開発研究

製剤学的アプローチ

標的への特異的集積・高SN比

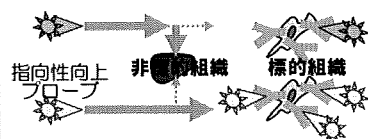
・生体内安定性の向上



・シグナルの増幅



・インビボ標的指向性の向上



標識の高効率化



多数の放射性核種

病態生理学的アプローチ

標的分子に特異的に結合する
低分子標識プローブの創製



動脈硬化関連標的分子

足病変関連標的分子

G2A(リゾリン脂質受容体)

FPR(走化性因子受容体)

酸化LDL

新たなマーカー

新たなマーカー

各標的分子に最適な薬効評価系の構築

両アプローチを高次元に
両立した分子プローブ設計

選択的高感度分子イメージングプローブ

標的分子の分布や密度を反映した分子イメージング

糖尿病関連血管病の早期診断・治療に必要な情報の獲得

図 1. 研究開発の全体構想

そこで今年度は、各標的分子（酸化LDL、G2A、FPR）に対する複数の分子プローブ候補化合物の設計・合成・評価を行うとともに、各分子プローブの有効性評価のための評価系構築、および、情報収集を行った。また、高感度プローブの開発では、 ^{18}F 標識試薬である ^{18}F SFBの効率的合成法を開発し、従来法と比べ反応時間を半減することに成功した。以下にこれらの研究成果の概要を述べる。

B. 研究方法

(1) 酸化LDLを標的とした分子プローブの開発

1. ^{125}I I-AHP7の合成

酸化LDL結合性タンパク質 (Asp-Hemolysin) の酸化LDL結合部位に関する知見を基に、酸化LDL標的放射性プローブ (^{125}I I-AHP7) を設計した。標識前駆体はFmoc固相合成法により合成した。放射標識には別途合成した ^{125}I N-succinimidyl-3-iodobenzoate (^{125}I SIB) を用い、室温で1時間反応させた。逆相HPLCにより精製を行い、 ^{125}I I-AHP7を得た。分析は逆相HPLCにより行った。

2. 酸化LDL結合実験

LDLは 37°C で $10\ \mu\text{M}$ 硫酸銅処理し、種々の時間酸化反応させることで酸化度の異なる酸化LDLを得た。

酸化反応の停止は、過剰量のEDTAを添加することにより行った。酸化度の確認はTBARS Assay Kitを用いてチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) 量を測定することにより行った。

^{125}I I-AHP7を種々の酸化度のLDL溶液に添加し 4°C で3時間インキュベートした。タンパク質画分の放射能を測定することにより、酸化LDL結合率を求めた。また、非放射性I-AHP7 (8.77、87.7、292.3、877、1754 μM) を ^{125}I I-AHP7添加の2時間前に添加する結合阻害実験を行い、阻害率を算出した。

3. 体内分布実験

6週齢のddYマウスに ^{125}I I-AHP7 (21 kBq / 100 μl) を尾静脈投与し、経時的(5、30分、1、3、6時間)に血液、大動脈及び各臓器を摘出し、それぞれの重量及び放射能をガンマカウンタを用いて測定した。

(2) G2Aを標的とした分子プローブの開発

G2Aを標的とした分子プローブの開発のため、天然リガンド (リゾリン脂質) を母体とした分子プローブ候補化合物 (I-125標識体) を設計・合成した。

(3) FPRを標的とした分子プローブの開発

1. ペプチドの設計・合成

FPRの特異的リガンドであるFormyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (FMLP) を母体化合物とし、PET核種であるF-18を導入したペプチド性PETプ

ローブの設計・合成を計画した。FPRのホモロジーモデリングとFMLPとのドッキングシミュレーションはMOE (Molecular Operating Environment) を用いて行った。ペプチド合成は、ペプチド自動合成機を用い固相合成法により行った。化合物の確認は、ESI-MSを用いて行った。

2. FPRに対する結合親和性の評価

得られた非放射性ハロゲン含有化合物について、次の方法によりFPRに対する結合親和性を評価した。Binding buffer (170 μ L) 中に様々な濃度のペプチド (DMSO溶液, 10 μ L)、2 nMの $[^{125}\text{I}]\text{WKYVMm}$ (10 μ L)、FPR (10 μ L) を加え、25°Cで1時間インキュベートした。GF/Cフィルターを用いて濾取し、wash後、フィルター上に残った放射能を測定した。得られた阻害曲線から IC_{50} 、 K_i 値を算出した。

(4) 高感度分子プローブの開発

プローブの合成においては、しばしば煩雑な手技が要求される。そこで、短半減期のRIを用いるプローブの合成においては、系の簡略化が必須となる。今回、ペプチドやタンパクの標識試薬として有効な *N*-succinimidyl 4- $[^{18}\text{F}]\text{fluorobenzoate}$ ($[^{18}\text{F}]\text{SFB}$) について、中間体の精製や脱水という複雑な実験操作を必要とする従来の合成法を改良し、これらを系に組み込まない迅速なone-pot合成法の最適化と自動合成法の基礎検討を行った。

(5) 評価系構築に関する研究

1. 感染症モデル動物の作製

大腸菌を37°Cで48時間培養し、SDラット (雌性、6週齢) の右大腿部筋肉内にシリンジを用いて菌を投与した。HE染色、FPR免疫染色を行った。

2. 対照としての $[^{125}\text{I}]\text{FIAU}$ の評価

新たに開発されるプローブの有効性を明らかにするためには、既存プローブとの比較検討も必要であることから、細菌感染性炎症のイメージング例が報告されたプローブ2'-fluoro-2'-deoxy-1- β -D-arabinofuranosyl-5- $[^{123/125}\text{I}]\text{iodouracil}$ ($[^{123/125}\text{I}]\text{FIAU}$) の標識合成・基礎的な体内分布を評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験は事前に京都大学動物実験委員会の承認を受けた計画に従い、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」および「京都大学における動物実験の実施に関する規程」を遵守して実施した。

C. 研究結果

(1) 酸化LDLを標的とした分子プローブの開発

$[^{125}\text{I}]\text{I-AHP7}$ は、放射化学的収率22%、放射化学的純度99%以上で得た。

$[^{125}\text{I}]\text{I-AHP7}$ は未酸化LDLに比べ酸化LDLに6倍と有意に高く結合し、その結合は酸化度の指標であるTBARS値との高い相関 ($r = 0.91$) を認めた。また、結合阻害実験を行ったところ、 $[^{125}\text{I}]\text{I-AHP7}$ の酸化LDLに対する結合はI-AHP7標準品の添加濃度に依存して減少した。

正常マウス投与1時間後の血液、血管の放射能は0.53、0.98 %ID/gと低く、体内からの速やかなクリアランスと、低い非特異的集積性を認めた。また、放射性ヨウ素が集積することが知られている胃において顕著な放射能集積が認められなかったことから、体内脱ヨウ素化反応に対する安定性が示された。

(2) G2Aを標的とした分子プローブの開発

不安定プラークに集積するマクロファージは、酸化LDLより遊離するリゾリン脂質に対する受容体 (G2A) を発現しており、リゾリン脂質を母体とする放射性プローブはG2Aとの結合を介してマクロファージの不安定プラークへの集積をイメージングできると期待される。そこで、リゾホスファチジルコリンを母体としたI-125標識プローブを設計し、候補化合物の標識前駆体および標識化合物標品の合成に成功した。

(3) FPRを標的とした分子プローブの開発

過去に報告のあるFPRのアミノ酸配列情報を基にホモロジーモデリングを行い、得られた立体構造に対してFMLPのドッキングシミュレーションを行った。複合体の結合情報を基に、FMLPを母体化合物とした誘導体を設計した。7種の誘導体 (化合物A~H) の合成に成功した。粗精製ペプチドは逆相HPLCにより分取精製し、トリフルオロ酢酸塩として得た。

設計した化合物のほとんどは、母体化合物であるFMLPより高い親和性を示した。その中でも特に化合物A、B、C ($\text{K}_i = 0.36\sim 0.74$ nM) が有望な化合物として見出された。

(4) 高感度分子プローブの開発

$[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ の合成は標識前駆体の ^{18}F 標識、加水分解、TSTU (*O*-(*N*-succinimidyl)-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate) との縮合という3段階の工程を踏むが、一般的に、中間体である $[^{18}\text{F}]\text{fluorobenzoic acid}$ を合成した後、固相抽出による精製とアセトニトリルを用いた共沸・脱水操作が行われている。これまでの検討で、加水分解にtetrapropylammonium hydroxideを用い、さらに脱水操作を排除した方法を採用することにより、放射化学的収率47%、合成時間45分で $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ をone-pot合成した。この収率はこれまでに報告されたSFB合成法によるものと同様であり、さらに、合成時間の大幅な短縮に成功した。そこで次に、本反応を用い自動合成法の基礎検討を行った。市販の合成

装置を改良したものをを用い標識合成を行ったところ、放射化学的収率34%、合成時間40分で ^{18}F SFBを自動合成することに成功した。

(5) 評価系構築に関する研究

1. 感染症モデル動物の作製

大腸菌を投与した右脚で、炎症細胞の浸潤を確認した。コントロールである左脚には、炎症部位は存在しなかった。

ヘマトキシリンとの対比染色を行った。大腸菌を投与した右脚がヘマトキシリンにより染色され、菌塊であると判断した。菌塊のまわりに炎症細胞の浸潤部位を確認でき、さらに同一部位にFPRの染色を確認した。コントロールである左脚には、FPRの陽性部位は認められなかった。

2. 対照としての ^{125}I FIAUの評価

^{123}I FIAU を放射化学的収率：36.5%、放射化学的純度：94%以上、 ^{125}I FIAU を放射化学的収率：93.6%、放射化学的純度：99%以上で得た。

体内動態を検討したすべてのタイムポイントにおいて、 ^{125}I FIAU は正常肢への集積性を示さなかった。経時的にプラナー画像を撮像したところ、体内分布実験の結果と同様、正常肢への放射能集積は低かった。

D. 考察

Asp-Hemolysinの酸化LDL認識部位を基に7残基の放射性ペプチドプローブ ^{125}I I-AHP7を設計・合成した。 ^{125}I I-AHP7は、酸化LDLへの高い結合性を示し、その結合は非放射性I-AHP7の添加により濃度依存的に阻害されたことから、 ^{125}I I-AHP7の酸化LDLへの結合の特異性が示された。 ^{125}I I-AHP7は速やかに腎排泄を受けることが示され、同時に、速やかな血中クリアランスが認められた。また、正常大動脈血管への放射能集積は低い結果となった。インビボイメージングにおいては標的・非標的組織比が画像化の重要な指標であることから、標的（不安定性動脈硬化病変）の周辺組織である正常血管および血液における低集積性は今後の病態モデル動物を用いた検討を支持する有効な結果であると考えられる。

計算科学手法を用い設計したFMLP誘導体は、母体化合物よりも高い親和性を有することが示された。特に、化合物A、B、Cは有望な化合物として、現在in vivoでの評価を進めている。

標識条件の基礎検討では、これまでに確立した ^{18}F SFBのone-pot合成法の最適化を行った。さらに、自動合成化にも成功し、本one-pot合成法の有用性を示すことが出来た。現在、自動合成の最適化を計るとともに、大量合成にも対応出来る手法の開発を進めている。

大腸菌 (XL1blue) を用い、感染症モデルラットの作製を検討したところ、菌投与部位に炎症細胞の浸潤とFPRの集積が確認された。炎症部位へのFPRの集積を、免疫組織化学的に証明することに成功した。

新規プローブの対照として $^{123/125}\text{I}$ FIAUの合成・評価に成功した。次年度以降、病態モデルを用いて病変部への集積量を ^{125}I FIAUと比較することで、本プロジェクトで開発されるプローブの有効性を明らかにする。

E. 結論

平成21年度の検討により、酸化LDL、G2A、FPRそれぞれに対する複数の分子プローブ候補化合物を設計するとともに、それらの標品化合物の合成に成功し、さらにその一部についてはRI標識にも成功した。さらに、候補化合物のインビトロ・インビボ評価系も確立することができた。これらのことから、糖尿病性血管病に由来する炎症および動脈硬化巣の不安定性を高感度で検出する核医学分子イメージングプローブの開発の可能性が示された。平成22年度以降は、インビトロ・インビボ評価に基づく分子設計の最適化、複数RI標識部位の導入・生体内DDSの最適化による高感度化、モデル動物を用いたインビボ研究による有効性評価を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

本研究では臨床研究を行っておらず、本研究に起因すると思われる副作用を経験していない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Kawai T, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. ^{18}F -labeled flavones for *in vivo* imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 2069-2076 (2009).
- Watanabe H, Ono M, Ikeoka R, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazoles for detecting β -amyloid plaques in the brain. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 6402-6406 (2009).
- Ono M, Hayashi S, Kimura H, Kawashima H, Nakayama M, Saji H. Push-pull benzothiazole derivatives as probes for detecting β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 7002-7009 (2009).
- Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Haratake M, Saji H,

- Nakayama M. Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 6394-6401 (2009).
- Kuge Y, Obokata N, Kimura H, Katada Y, Temma T, Sugimoto Y, Aita K, Seki K, Tamaki N, Saji H. Synthesis and evaluation of a radioiodinated lumiracoxib derivative for the imaging of cyclooxygenase-2 expression. *Nucl Med Biol*. 36(8):869-76:2009.
 - Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, Watabe H, Saji H, Magata Y. Quantification of regional myocardial oxygen metabolism in normal pigs using positron emission tomography with injectable $^{15}\text{O-O}_2$. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 37(2):377-85:2010.
 - Aita K, Temma T, Shimizu Y, Kuge Y, Seki K, Saji H. Synthesis of a new NIR fluorescent Nd complex labeling agent. *J Fluoresc*. 20(1):225-34:2010.
 - Aita K, Temma T, Kuge Y, Seki K, Saji H. NIR fluorescent ytterbium compound for in vivo fluorescence molecular imaging. *Luminescence*. 25(1):19-24:2010.
 - 天満敬, 佐治英郎. 不安定性動脈硬化プラークイメージングのための分子プローブ開発研究. *PET journal*. 7:10-1:2009.
 - Temma T, Sano K, Kuge Y, Kamihashi J, Takai N, Ogawa Y, Saji H. Development of a radiolabeled probe for detecting membrane type-1 matrix metalloproteinase on malignant tumors. *Biol Pharm Bull*. 32(7):1272-7:2009.
 - Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, Inagaki N. GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun*. 389(3):523-6:2009.
 - Ogawa K, Kawashima H, Kinuya S, Shiba K, Onoguchi M, Kimura H, Hashimoto K, Odani A, Saji H. Preparation and evaluation of $^{186/188}\text{Re}$ -labeled antibody (A7) for radioimmunotherapy with rhenium(I) tricarbonyl core as a chelate site. *Ann. Nucl. Med.* (2009) 23: 843-8.
 - Ueda M, Kudo T, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S, Konishi H, Miyano A, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. Rapid detection of hypoxia-inducible factor-1-active tumours: pretargeted imaging with a protein degrading in a mechanism similar to hypoxia-inducible factor-1 α . *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (in press).
 - Ueda M, Iida Y, Tominaga A, Yoneyama T, Ogawa M, Magata Y, Nishimura H, Kuge Y, Saji H. Nicotinic acetylcholine receptors expressed in the ventral posterolateral thalamic nucleus play an important role in anti-allodynic effects. *Br J Pharmacol*. 2010 Mar;159(6):1201-10.
 - Kudo T, Ueda M, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S, Masutani M, Kiyono Y, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. Imaging of HIF-1-active tumor hypoxia using a protein effectively delivered to and specifically stabilized in HIF-1-active tumor cells. *J Nucl Med*. 2009 Jun;50(6):942-9.
2. 学会発表
- 石川真奈美、小野正博、木村寛之、河嶋秀和、佐治英郎、アルツハイマー病脳内 β アミロイド蛋白を標的としたインビボ蛍光イメージングプローブの開発、第4回日本分子イメージング学会、2009年5月14-15日（東京）
 - 石川真奈美、小野正博、木村寛之、河嶋秀和、佐治英郎、 β アミロイドデュアルイメージングプローブの開発を目的としたBODIPY誘導体の合成と評価、第49回日本核医学会学術総会、2009年10月1-3日（旭川）
 - 林瞬、小野正博、木村寛之、河嶋秀和、佐治英郎、タウイメージングプローブの開発を目的としたローダニン、チオヒダントイン誘導体の合成と評価、第130年会、日本薬学会、2010年3月28-30日（岡山）
 - 西郡寛太郎、小川侑記、久下裕司、天満 敬、石野誠悟、塩見雅志、小野正博、佐治英郎、動脈硬化プラークの不安定性診断のための分子イメージングプローブ開発：Tc-99m標識抗Tissue Factor抗体の有効性評価研究、第4回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2009年5月14-15日（学術総合センター、東京）
 - 天満 敬、正木悠紀子、佐野紘平、木村寛之、東 高志、中井隆介、相田一樹、久下裕司、小野正博、佐治英郎、インビボ機能分子イメージングのためのon/offスイッチング型機能性MRIプローブの開発に関する基礎的検討、第4回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2009年5月14-15日（学術総合センター、東京）
 - 志水陽一、天満 敬、佐野紘平、上田真史、小野正博、佐治英郎、腫瘍インビボ分子イメージングのための標的特異的活性化蛍光プローブの開発、第4回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2009年5月14-15日（学術総合センター、東京）
 - Takashi TEMMA, Yukiko MASAKI, Kohei SANO, Hiroyuki KIMURA, Takashi AZUMA, Ryusuke NAKAI, Kazuki AITA, Yuji KUGE, Masahiro ONO, Hideo SAJI, Development of an on/off signal-switchable MRI probe for in

vivo molecular imaging、第19回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2009年6月11日（大阪）

- 志水陽一、天満 敬、佐野紘平、上田真史、小野正博、佐治英郎、MT1-MMPを標的とした腫瘍特異的活性化蛍光プローブの開発、第9回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2009年11月14日（京都）
- 志水 陽一、天満 敬、原 功、峯松 秀希、大谷 敬亨、天野 博夫、平井 政彦、小関 英一、小野 正博、佐治 英郎、新規近赤外蛍光剤内包ナノキャリアを用いた腫瘍標的蛍光イメージングに関する検討、日本薬学会第130年会、2010年3月29日（岡山）
- 渡邊 裕之、天満 敬、志水 陽一、近藤 直哉、佐野 紘平、日向野 桂一、高木 陽子、小野 正博、佐治 英郎、MT1-MMP標的核医学分子イメージングを目的とした抗MT1-MMP抗体の作製および有効性評価、日本薬学会第130年会、2010年3月30日（岡山）
- 利川香衣、河嶋秀和、森大輔、木村寛之、小野正博、佐治英郎、ペプチドトランスポーターによる取込みを介した新規¹⁸F標識ペプチド性腫瘍イメージングプローブの合成と評価。日本薬学会(2010. 3)
- Kawashima H, Hirasawa M, Kimura M, Ono M, Saji H. Synthesis and evaluation of ^{99m}Tc-introduced biotin as a labeling agent for antibodies. Society for Molecular Imaging (World Molecular Imaging Congress) (2009. 9)
- Kawashima H, Kawai T, Kimura H, Kuge Y, Ono M, Saji H. A novel radioiodinated hydroxyethylamine dipeptide isoster derivative as potential SPECT imaging probe for β -secretase detection in Alzheimer's disease brain. Society of Nuclear Medicine (2009. 6)
- Ueda M, Kudo T, Kizaka-Kondoh S, Miyano A, Ono M, Mukai T, Kuge Y, Hiraoka M, Saji H. Characterization of a cell-penetrating, oxygen-dependent degradable streptavidin as a hypoxia-inducible factor-1-active tumor imaging agent. 2009 World Molecular Imaging Congress. September 23-26, 2009, Montreal, Canada.
- 上田真史、工藤喬、宮野梓、小川京、小野正博、近藤科江、向高弘、久下裕司、平岡眞寛、佐治英郎。酸素依存的分解タンパク質のプレターゲットイングによる腫瘍内HIF-1存在領域イメージングの妥当性評価。日本薬学会第130年会。2010年3月28-30日（岡山コンベンションセンター他、岡山）
- 上田真史、工藤喬、近藤科江、宮野梓、小川京、小野正博、向高弘、久下裕司、平岡眞寛、佐治英郎。ストレプトアビジン融合酸素依存的分解タン

パク質のHIF-1存在領域イメージング剤としての評価。第49回日本核医学会学術総会。2009年10月1-3日（旭川市民文化会館・旭川グランドホテル、旭川）

- 宮野梓、上田真史、工藤喬、小野正博、近藤科江、平岡眞寛、佐治英郎。腫瘍内HIF-1存在領域のイメージング剤の開発：チミジンキナーゼ融合酸素依存的分解プローブに関する検討。第49回日本核医学会学術総会。2009年10月1-3日（旭川市民文化会館・旭川グランドホテル、旭川）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

- 佐治英郎、天満 敬、小野正博、関 育也：動脈硬化診断用分子イメージングプローブ、特許出願済み（整理番号 1004-J）
- 佐治英郎、木村寛之、小野正博、関 育也：炎症性部位集積性化合物の合成と評価、特許出願予定
- 特願 2009-107457、佐治 英郎、小野 正博、コンフォメーション病診断用組成物、京都大学、平成21年4月27日
- 特願 2009-222156、佐治 英郎、小野 正博、木村 寛之、河嶋 秀和、コンフォメーション病診断のための組成物、京都大学、平成21年9月28日
- 特願 2009-228646、佐治英郎、木村寛之、小野正博、河嶋秀和、森大輔、原田直弥、アゼチジニルメトキシピリジン誘導体の製造方法及びその使用、京都大学、平成21年9月30日
- 特願 2010-61477、佐治英郎、小野正博、関育也、タウタンパク質親和性化合物およびタウオパチー診断剤、京都大学／日本メジフィジックス株式会社、平成22年3月1日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

製剤学的アプローチによる高感度分子プローブの開発

研究分担者 小野 正博 京都大学薬学研究科 准教授

研究要旨：糖尿病足病変とは、糖尿病患者の下肢に生じる、主に感染症を起因とした、潰瘍、深部組織の破壊性病変であり、神経障害や種々の程度の末梢血流障害を合併している病変である。糖尿病足病変が進行すると、病変部組織に壊死が発生し、足を切断する必要が生じるという重大な事態に陥る。したがって、糖尿病足病変を早期に発見して治療し、治療の効果を追跡しつつ、効果的な治療を行う必要がある。本研究では、感染症の炎症反応における白血球の浸潤に密接に関わる分子として、Formyl Peptide Receptor (FPR) を選択し、このFPRの特異的リガンドである Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (FMLP) を母体化合物とし、PET核種であるF-18を導入したペプチド性PETプローブの設計・合成を計画した。合成ペプチドのFPRに対する親和性を評価したところ、高い親和性を有する化合物A、B、C ($K_i = 0.36\sim 0.74$ nM) を得ることに成功した。今後、プローブ候補化合物のF-18での標識、正常動物もしくは病態モデル動物を用いた体内分布実験、Autoradiography (ARG)、免疫組織染色などを検討し、本プローブの有効性を評価していく予定である。

A. 研究目的

糖尿病性血管病として、下肢切断に至る糖尿病足病変（末梢神経・血流障害と細菌感染性炎症）に対する適切な治療法選択のために、高精度な診断法の開発を目的としたPETプローブの開発を行う。これにより、炎症の進展範囲、活動性ととともに微細な動脈硬化巣の不安定性の高感度検出が実現可能なため、糖尿病性炎症による合併症の高精度診断と治療に資する。具体的には、感染症の炎症反応における白血球の浸潤に密接に関わる分子として、Formyl Peptide Receptor (FPR) を選択し、このFPRの特異的リガンドである Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (FMLP) を母体化合物とし、PET核種であるF-18を導入したペプチド性PETプローブの設計・合成を計画した。平成21年度は、分子プローブ候補化合物の設計・合成・*in vitro*での親和性の評価、標識条件の基礎検討を行ったので、以下に示す。

B. 研究方法

1. ペプチドの設計・合成

FPRのホモロジーモデリングとFMLPとのドッキングシミュレーションはMOE (Molecular Operating Environment) を用いて行った。ペプチドは、ペプチド自動合成機 (433A型: Applied Biosystems社製) を用い、樹脂に固定したアミノ酸誘導体に、1個ずつアミノ酸をカルボキシル末端側

から結合させていく方法（固相合成法）により各ペプチドを合成した。化合物の確認は、ESI-MSを用いて行った。

2. FPRに対する結合親和性の評価

得られた非放射性ハロゲン含有化合物について、次の方法によりFPRに対する結合親和性を評価した。Binding buffer (170 μ L) 中に様々な濃度のペプチド (DMSO溶液, 10 μ L) と、2nMの $[^{125}\text{I}]\text{WKYMVm}$ (10 μ L) と、FPR (10 μ L) を加え、25 $^{\circ}\text{C}$ で1時間インキュベート後、ポリリシンbufferによりコーティングしたGF/Cフィルターを用いて濾取（セルハーベスタ）し、wash後、フィルター上に残った放射能を γ カウンターで測定した。得られた阻害曲線からGraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Ver 4.03) を用いて IC_{50} 、 K_i 値を算出した。

3. 標識条件の基礎検討

プローブの合成においては、しばしば煩雑な手技が要求される。そこで、短半減期のRIを用いるプローブの合成においては、系の簡略化が必須となる。今回、ペプチドやタンパクの標識試薬として有効な *N*-succinimidyl 14- $[^{18}\text{F}]\text{fluorobenzoate}$ ($[^{18}\text{F}]\text{SFB}$) について、中間体の精製や脱水という複雑な実験操作を必要とする従来の合成法を改良し、これらを系に組み込まない迅速なone-pot合成法の最適化と自動合成法の基礎検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は事前に研究実施機関の動物実験委員会の承認を受けた上で、各機関の動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

1. ペプチドの設計・合成

文献で報告されているFPRのアミノ酸の配列情報を基にホモロジーモデリングを行い、得られた立体構造に対してFMLPのドッキングシミュレーションを行った。複合体の結合情報を基に、FMLPを母体化合物とした誘導体を設計した。

下記に示す(化合物A~H)7種の誘導体の合成に成功した。得られた粗精製ペプチドを島津製LC-8A-1のHPLC分取装置を用いて0.1%トリフルオロ酢酸を含む水-アセトニトリルの系で分取精製し、目的のペプチドの分画を得、アセトニトリルを留去した後、凍結凍結乾燥粉末とし、目的物をトリフルオロ酢酸塩として得た。

2. FPRに対する結合親和性の評価

親和性の評価のまとめを表1に示す。設計した化合物のほとんどは、母体化合物であるFMLPより高い親和性を示した。その中でも特に化合物A、B、C ($K_i = 0.36\sim 0.74$ nM)が有望な化合物として見出された。

FMLP 誘導体	K_i [nM]
化合物 A	0.74
化合物 B	0.36
化合物 C	0.60
化合物 D	1.37
化合物 E	1.03
FMLP	2.54
化合物 G	54.6
化合物 H	33.28

表 1

3. 標識条件の基礎検討

[^{18}F]SFBの合成は標識前駆体の ^{18}F 標識、加水分解、TSTU (*O*-(*N*-succinimidyl)-*N,N,N,N'*-tetramethyluronium tetrafluoroborate)との縮合という3段階の工程を踏むが、一般的に、中間体である[^{18}F]fluorobenzoic acidを合成した後、固相抽出による精製とアセトニトリルを用いた共沸・脱水操作が行われている。これまでの検討で、加水分解にtetrapropylammonium hydroxideを用い、さらに脱水操作を排除した方法を採用することにより、放射化学的収率47%、合成時間45分で[^{18}F]SFBをone-pot合成した(図1)。この収率はこれまでに報告されたSFB合成法によるものと同様であり、さらに合成時間は従来の4分の3から3分の1となり、大幅な

合成時間の短縮に成功した。そこで次に、本反応を用い自動合成化の基礎検討を行った。市販の合成装置を改良したものをを用い標識合成を行ったところ、放射化学的収率34%、合成時間40分で[^{18}F]SFBを自動合成することに成功した。

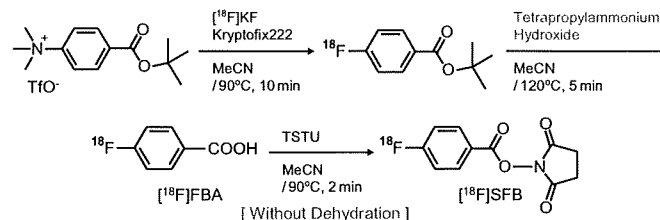


図 1

D. 考察

計算科学手法を用い設計した、FMLP誘導体を合成・評価したところ、母体化合物よりも高い親和性を有する化合物を見出すことに成功した。計算科学手法を用いた本薬剤設計の有用性を示すことが出来た。特に、化合物A、B、C ($K_i = 0.36\sim 0.74$ nM)は有望な化合物として、現在*in vivo*での評価を進めている。

標識条件の基礎検討では、これまでに確立した[^{18}F]SFBのone-pot合成法の最適化を行った。さらに、自動合成化にも成功し、本one-pot合成法の有用性を示すことが出来た。現在、自動合成の最適化を計るとともに、大量合成にも対応出来る手法の開発を進めている。

E. 結論

合成ペプチドのFPRに対する親和性を評価したところ、高い親和性を有する化合物A、B、C ($K_i = 0.36\sim 0.74$ nM)を得ることに成功した。標識条件の基礎検討より、[^{18}F]SFBのone-pot合成法を確立し、さらに自動合成化にも成功した。今後、プローブ候補化合物のF-18での標識、正常動物もしくは病態モデル動物を用いた体内分布実験、ARG、免疫組織染色などを検討し、本プローブの有効性を評価していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Kawai T, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. ^{18}F -labeled flavones for *in vivo* imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 2069-2076 (2009).

Watanabe H, Ono M, Ikeoka R, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazoles for detecting β -amyloid plaques in the brain. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 6402-6406 (2009).

Ono M, Hayashi S, Kimura H, Kawashima H, Nakayama M, Saji H. Push-pull benzothiazole derivatives as probes for detecting β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 7002-7009 (2009).

Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 6394-6401 (2009).

2. 学会発表

石川真奈美、小野正博、木村寛之、河嶋秀和、佐治英郎、アルツハイマー病脳内 β アミロイド蛋白を標的としたインビボ蛍光イメージングプローブの開発、第4回日本分子イメージング学会、2009年5月14-15日（東京）

石川真奈美、小野正博、木村寛之、河嶋秀和、佐治英郎、 β アミロイドデュアルイメージングプローブの開発を目的としたBODIPY誘導体の合成と評価、第49回日本核医学会学術総会、2009年10月1-3日（旭川）

林瞬、小野正博、木村寛之、河嶋秀和、佐治英郎、タウイメージングプローブの開発を目的としたローダニン、チオヒダントイン誘導体の合成と評価、第130年会、日本薬学会、2010年3月28-30日（岡山）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

特願 2009-107457、佐治英郎、小野正博、コンフォメーション病診断用組成物、京都大学、平成21年4月27日

特願 2009-222156、佐治英郎、小野正博、木村寛之、河嶋秀和、コンフォメーション病診断のための組成物、京都大学、平成21年9月28日

特願 2009-228646、佐治英郎、木村寛之、小野正博、河嶋秀和、森大輔、原田直弥、アゼチジニルメトキシピリジン誘導体の製造方法及びその使用、京都大学、平成21年9月30日

特願 2010-61477、佐治英郎、小野正博、関育也、タウタンパク質親和性化合物およびタウオパチー診断剤、京都大学/日本メジフィジックス株式会社、平成22年3月1日

佐治英郎、天満 敬、小野正博、関 育也：動脈硬化診断用分子イメージングプローブ、特許出願済み（整理番号 1004-J）

佐治英郎、木村寛之、小野正博、関 育也：炎症性部位集積性化合物の合成と評価、特許出願予定

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分析系・評価系の確立に関する研究

研究分担者 天満 敬 京都大学薬学研究科 助教

研究要旨：糖尿病足病変とは、糖尿病患者の下肢に生じる、主に感染症を起因とした、潰瘍、深部組織の破壊性病変であり、神経障害や種々の程度の末梢血流障害を合併している病変である。糖尿病足病変が進行すると、病変部組織に壊死が発生し、足を切断する必要があるという重大な事態に陥る。したがって、糖尿病足病変を早期に発見して治療し、治療の効果を追跡しつつ、効果的な治療を行う必要がある。本研究では、共同研究者によって開発される糖尿病足病変をターゲットとしたプローブを評価するための、炎症モデル動物の作製を検討した。糖尿病足病変では、感染症の有無が重要であることから、感染症モデル動物の作製を検討した。具体的には、大腸菌（XL1blue）をSDラットの右大腿筋内に筋肉注射し、24時間後組織を取り出しHE染色、FPRの免疫染色により評価したところ、菌投与部位に炎症細胞の浸潤とFPRの集積が見られたことから、本モデル動物の作製法を確立したと考えている。今後はモデル動物の安定した供給体制を確立するとともに、今後開発される多くのプローブを評価することを考慮し、取り扱いが容易なマウスを用いたモデルの確立を検討する。

A. 研究目的

糖尿病足病変とは、糖尿病患者の下肢に生じる、主に感染症を起因とした、潰瘍、深部組織の破壊性病変であり、神経障害や種々の程度の末梢血流障害を合併している病変である。糖尿病足病変が進行すると、病変部組織に壊死が発生し、足を切断する必要があるという重大な事態に陥る。したがって、糖尿病足病変を早期に発見して治療し、治療の効果を追跡しつつ、効果的な治療を行う必要がある。糖尿病足病変の診断において、非侵襲的な方法として有用である核医学分野での研究が行われているが、低侵襲的で、特異性の高いプローブが無く、また、SPECT用プローブしか開発されていないのが現状である。そこで、病変部位を特異的に画像化する、より感度の高いプローブの開発がのぞまれている。糖尿病足病変の診断が可能になれば、早期診断による早期治療の開始、病変部位の正確な診断による適切な切断範囲の決定、また、治療効果判定や再発診断が可能となる。

本研究課題として、共同研究者によって開発される、糖尿病足病変をターゲットとしたプローブを評価するための、感染症モデル動物の作製を検討したので、以下に示す。

B. 研究方法

感染症モデル動物の作製

大腸菌（XL1blue）を48時間37度で培養し、菌

を回収し、SDラット（♀、6週齢）の右大腿部筋肉内にシリンジを用い投与した（20 μ L）。

HE染色

1日後組織を取り出し凍結させ、凍結切片を作製した。その切片をエタノールによる親水化、流水洗後、ヘマトキシリンで10分染色し、流水洗による色出し後、エオジンで2分染色した。軽く水洗し、エタノールによる脱水（79%,90%,100% \times 2）、キシレンによる透徹（2分,1分）を行った。

FPRの免疫染色

ABC法を用いた。

一次抗体…FPR（M-20）：sc-13198（Santa Cruz社）

ブロッキング溶液…アミロイド β -プロテイン免疫組織染色キット（コードNo. 299-56701）（和光純薬）に入っている「ブロッキング用血清」

ABC溶液…同キットの「ABC溶液（ストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体溶液）」

二次抗体…同キットの「抗マウスIgG（H+L）、ヤギ、ビオチン結合」

（倫理面への配慮）

動物実験は事前に研究実施機関の動物実験委員会の承認を受けた上で、各機関の動物実験指針に基づいて行った。

C. 研究結果

HE染色

大腸菌を投与した右脚で、炎症細胞の浸潤が確認された(図1)。コントロールである左脚には、炎症部位は存在しなかった(図2)。

菌接種側(×10, 1/80s)

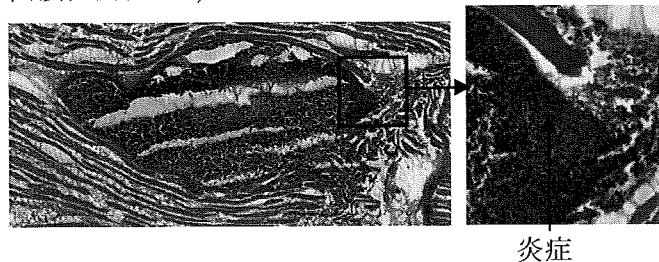


図1

対照側(×10, 1/70s)



図2

FPRの免疫染色

ヘマトキシリンとの対比染色を行った。大腸菌を投与した右脚がヘマトキシリンにより染色され、菌塊であると判断した(図3)。菌塊のまわりに炎症細胞の浸潤部位が確認でき、さらに同一部位にFPRが集積していることが確認された。コントロールである左脚には、FPRの集積部位は存在しなかった(図4)。

菌接種側(×10, 1/70s)

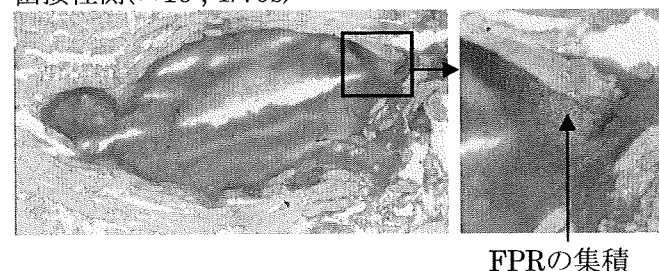


図3

対照側(×10, 1/70s)



図4

D. 考察

大腸菌(XL1blue)を用い、感染症モデルラットの作製法を検討した。大腸菌(XL1blue)をSDラットの右大腿筋肉に筋肉注射し、24時間後組織を取り出しHE染色、FPRの免疫染色により評価したところ、菌投与部位に炎症細胞の浸潤とFPRの集積が確認された。炎症部位へのFPRの集積を、免疫組織化学的に証明することに成功した。

E. 結論

大腸菌を用いて、感染症モデルラットの作製法を確立した。今後はモデル動物の安定した供給体制を確立するとともに、今後開発される多くのプローブを評価することを考慮し、取り扱いが容易なマウスを用いたモデルの確立を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kuge Y, Obokata N, Kimura H, Katada Y, Temma T, Sugimoto Y, Aita K, Seki K, Tamaki N, Saji H. Synthesis and evaluation of a radioiodinated lumiracoxib derivative for the imaging of cyclooxygenase-2 expression. *Nucl Med Biol.* 36(8):869-76:2009.
- 天満敬. PETと静脈内投与型O-15標識O₂剤による脳酸素代謝率の測定. *分子脳血管病.* 9(1):51-7:2010.
- Temma T, Iida H, Hayashi T, Teramoto N, Ohta Y, Kudomi N, Watabe H, Saji H, Magata Y. Quantification of regional myocardial oxygen metabolism in normal pigs using positron emission tomography with injectable ¹⁵O-O₂. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 37(2):377-85:2010.
- Aita K, Temma T, Shimizu Y, Kuge Y, Seki K, Saji H. Synthesis of a new NIR fluorescent Nd complex labeling agent. *J Fluoresc.* 20(1):225-34:2010.
- Aita K, Temma T, Kuge Y, Seki K, Saji H. NIR fluorescent ytterbium compound for in vivo fluorescence molecular imaging. *Luminescence.* 25(1):19-24:2010.
- 天満敬, 佐治英郎. 不安定性動脈硬化プラークイメージングのための分子プローブ開発研究. *PET journal.* 7:10-1:2009.
- Temma T, Sano K, Kuge Y, Kamihashi J, Takai N, Ogawa Y, Saji H. Development of a radiolabeled probe for detecting membrane type-1 matrix metalloproteinase on malignant tumors. *Biol Pharm Bull.* 32(7):1272-7:2009.
- Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, Inagaki N. GLP-1

receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. *Biochem Biophys Res Commun.* 389(3):523-6:2009.

2. 学会発表

- 西郡寛太郎、小川侑記、久下裕司、天満 敬、石野誠悟、塩見雅志、小野正博、佐治英郎、動脈硬化プラークの不安定性診断のための分子イメージングプローブ開発：Tc-99m標識抗Tissue Factor抗体の有効性評価研究、第4回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2009年5月14-15日（学術総合センター、東京）
- 天満 敬、正木悠紀子、佐野紘平、木村寛之、東 高志、中井隆介、相田一樹、久下裕司、小野正博、佐治英郎、インビボ機能分子イメージングのためのon/offスイッチング型機能性MRIプローブの開発に関する基礎的検討、第4回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2009年5月14-15日（学術総合センター、東京）
- 志水陽一、天満 敬、佐野紘平、上田真史、小野正博、佐治英郎、腫瘍インビボ分子イメージングのための標的特異的活性化蛍光プローブの開発、第4回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2009年5月14-15日（学術総合センター、東京）
- Takashi TEMMA, Yukiko MASAKI, Kohei SANO, Hiroyuki KIMURA, Takashi AZUMA, Ryusuke NAKAI, Kazuki AITA, Yuji KUGE, Masahiro ONO, Hideo SAJI, Development of an on/off signal-switchable MRI probe for in vivo molecular imaging, 第19回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2009年6月11日（大阪）
- 常俊 顕三、天満 敬、東 高志、中井 隆介、土井 健人、今村 博敏、太田 剛史、高木 康志、菊田 健一郎、ラット脳虚血モデル慢性期におけるNifedipineの脳血流改善効果、日本脳神経外科学会 第68回学術総会、2009年10月15日（東京）
- 志水陽一、天満 敬、佐野紘平、上田真史、小野正博、佐治英郎、MT1-MMPを標的とした腫瘍特異的活性化蛍光プローブの開発、第9回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2009年11月14日（京都）
- 志水 陽一、天満 敬、原 功、峯松 秀希、大谷 敬亨、天野 博夫、平井 政彦、小関 英一、小野 正博、佐治 英郎、新規近赤外蛍光剤内包ナノキャリアを用いた腫瘍標的蛍光イメージングに関する検討、日本薬学会第130年会、2010年3月29日（岡山）
- 渡邊 裕之、天満 敬、志水 陽一、近藤 直哉、佐野 紘平、日向野 桂一、高木 陽子、小野 正博、佐治 英郎、MT1-MMP標的核医学分子イメージングを目的とした抗MT1-MMP

抗体の作製および有効性評価、日本薬学会第130年会、2010年3月30日（岡山）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

- 佐治英郎、天満 敬、小野正博、関 育也：動脈硬化診断用分子イメージングプローブ、特許出願済み（整理番号1004-J）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

病態生理学的アプローチによる高感度分子プローブの開発

研究分担者 河嶋 秀和 京都大学医学研究科 助教

研究要旨：動脈硬化の発生・進展・不安定化に密接に関わる分子として酸化 LDL（低比重リポタンパク質）を選択し、これを標的とした低分子核医学分子プローブを開発した。すなわち、*Aspergillus fumigatus* Fresenius-村松株から精製された Asp-Hemolysin が酸化 LDL 結合性タンパク質であることに着目し、このタンパク質内の酸化 LDL 認識部位（YKDG 配列：Tyr-Lys-Asp-Gly）を母体として新規放射性プローブ^[125I]I-AHP7 を設計・合成した。^[125I]I-AHP7 は放射化学的収率 22%、放射化学的純度 99%以上で得られた。^[125I]I-AHP7 はインビトロ結合実験により酸化 LDL への特異的結合を示し、正常マウスを用いた体内分布実験により非標的組織（正常大動脈血管、血液）への低集積性を認めた。今後、動脈硬化モデル動物（WHHLMI ウサギ）を用いた検討により、本プローブの不安定性動脈硬化プラークイメージング剤としての有効性を評価していく予定である。

A. 研究目的

糖尿病由来の動脈硬化は心筋梗塞を高頻度に惹起し、下肢切断に至る糖尿病足病変は患者の生命予後を著しく低下させる。従って、適切な治療の実施のためには、動脈硬化・足病変の高精度な診断法の開発が急務である。そこで、動脈硬化の発生・進展・不安定化に密接に関わる分子として酸化 LDL（低比重リポタンパク質）を選択し、これを標的とした低分子核医学分子プローブを開発する。具体的には、*Aspergillus fumigatus* Fresenius-村松株から精製された Asp-Hemolysin が酸化 LDL 結合性タンパク質であることに着目し、このタンパク質内の酸化 LDL 認識部位（YKDG 配列：Tyr-Lys-Asp-Gly）を母体として放射性プローブの設計・合成を計画した。平成 21 年度は、構造中に YKDG 配列を有し長さの異なる 5 種類のペプチドを設計した。その中の 1 種類（Lys(1B)TrpTyrLysAspGlyAsp (I-AHP7)、1B：3-iodobenzoyl 基）について放射性ヨウ素標識を行い、有効性を調べたので以下に記す。

B. 研究方法

1. ^[125I]I-AHP7 の合成

標識前駆体は島津製作所製ペプチド自動合成装置 PSSM-8 を用い、Fmoc 固相合成法により合成した。放射標識には別途合成した ^[125I]N-succinimidyl-3-iodobenzoate (^[125I]SIB) を用いた。標識前駆体 500 μg に DMF : 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH = 7.8) = 1 : 1 混合溶液 40 μL を加え、次いで ^[125I]SIB 溶液を加えた。トリエチルアミンで pH = 8.5 に調整した後、室温で 1 時間反応させた。次いで、10% ヒドラジン 1 水和物 DMF 溶液 30 μL を加え、室温で 15 分間反応させた。逆相 HPLC (カ

ラム：COSMOSIL (ナカライテスク株式会社) 5C18-AR-II 4.6×150、流速：1.0 mL/min、検出器：UV 検出器 (検出波長：220 nm)、移動相：メタノール(0.1% TFA) : 水(0.1% TFA) = 20 : 80 (0 min) → 95 : 5 (30 min)) により精製を行い、^[125I]I-AHP7 を得た。分析は逆相 HPLC (カラム：COSMOSIL (ナカライテスク株式会社) 5C18-AR-II 4.6×150、流速：1.0 mL/min、検出器：UV 検出器 (検出波長：220 nm)、移動相：メタノール(0.1% TFA) : 水(0.1% TFA) = 20 : 80 (0 min) → 95 : 5 (30 min)) により行った。

2. 酸化 LDL 結合実験

LDL (Biomedical Technologies Inc.) は限外濾過フィルターにより PBS (0.1 M, pH = 7.4) 溶液 (1.78 mg/ml) に調製後、37°C で 10 μM 硫酸銅処理し、種々の時間酸化反応させることで酸化度の異なる酸化 LDL を得た。酸化反応の停止は、過剰量の EDTA を添加することにより行った。酸化度の確認は TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Company) を用いてチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) 量を測定することにより行った。

^[125I]I-AHP7 を種々の酸化度の LDL 溶液に添加し 4°C で 3 時間インキュベートした。MICROCON (MILLIPORE YM-30) を用いて遠心分離し、タンパク質画分の放射能を測定することにより、酸化 LDL 結合率を求めた。

また、非放射性 I-AHP7 (8.77、87.7、292.3、877、1754 μM) を ^[125I]I-AHP7 添加の 2 時間前に添加する結合阻害実験を行い、阻害率を算出した。

3. 体内分布実験

6週齢のddYマウスに $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ (21 kBq / 100 μl)を尾静脈投与し、経時的(5、30分、1、3、6時間)に血液、大動脈及び各臓器を摘出し、それぞれの重量及び放射能をガンマカウンタ (1480 Wizard 3[®]、パーキンエルマー社製)を用いて測定した。動物は、各時間点につき3匹(1時間点のみ4匹)を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は事前に所属施設の動物実験委員会の承認を受け、当該施設の動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1. $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ の合成

$[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ は逆相HPLCによる精製(図1)を経て、放射化学的収率22%、放射化学的純度99%以上で得た。

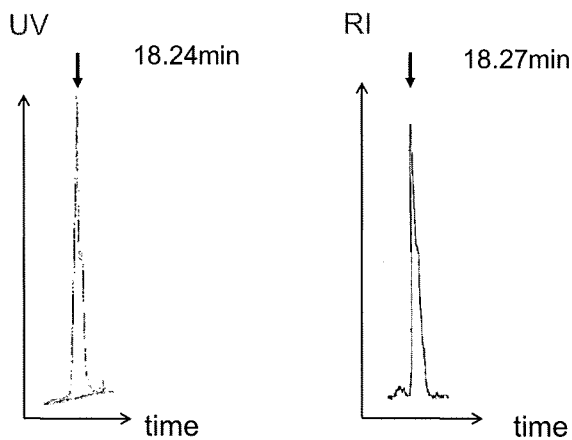
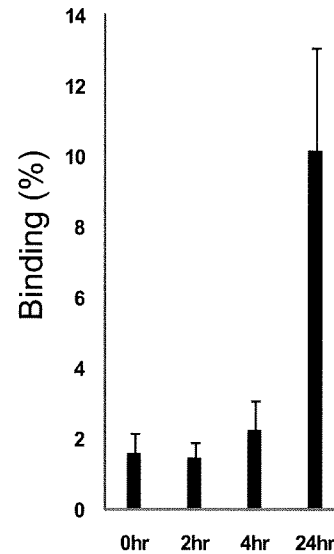


図1 HPLC結果

2. 酸化LDL結合実験

図2および図3に示すように、 $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ は未酸化LDLに比べ24時間酸化処理したLDLに6倍高く結合し、その結合は酸化度の指標であるTBARS値との高い相関($r = 0.91$)を認めた。

また、結合阻害実験を行ったところ、図4に示すように、 $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ の酸化LDLに対する結合はI-AHP7標準品の添加濃度に依存して減少した。



Oxidation time of LDL

図2 $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ の酸化LDL結合率

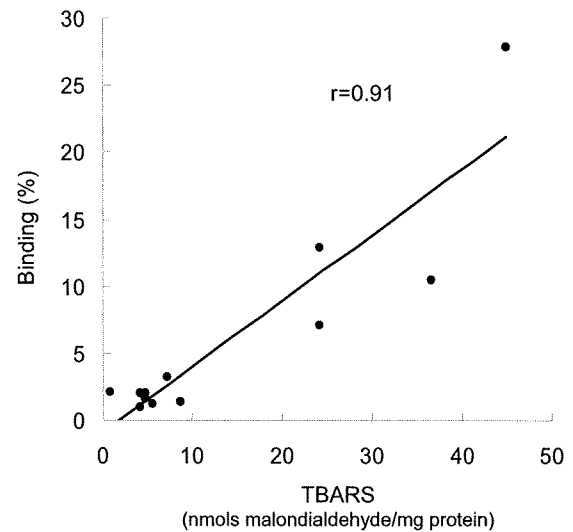


図3 TBARS値 vs $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ 結合率

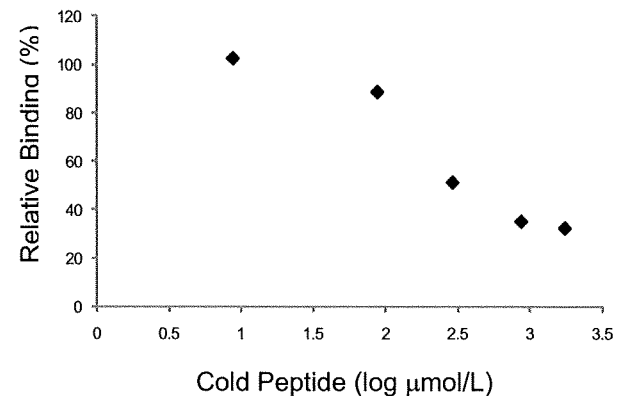


図4 結合阻害実験結果

3. 体内分布実験

図5に示すように、正常マウス投与1時間後の血液、血管の放射能は0.53、0.98 %ID/gと低く、体内からの速やかなクリアランスと、低い非特異的集積性を認めた。また、放射性ヨウ素が集積することが知られている胃において顕著な放射能集積が認められなかったことから、体内脱ヨウ素化反応に対する安定性が示された。

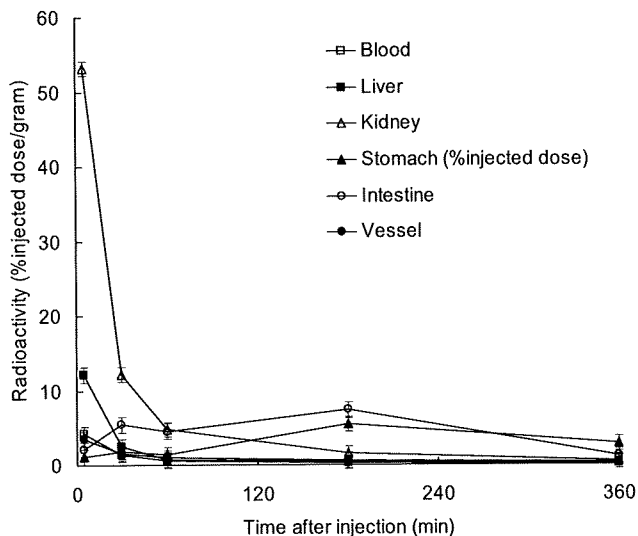


図5 体内分布実験結果

D. 考察

Asp-Hemolysinの酸化LDL認識部位(YKDG配列)を基に7残基の放射性ペプチドプローブ $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ を設計・合成した。 $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ は、インビトロ結合実験において酸化LDLへの高い結合性を示し、その結合は非放射性I-AHP7の添加により濃度依存的に阻害されたことから、 $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ の酸化LDLへの結合の特異性が示された。

正常マウスを用いたインビボ体内動態実験において、 $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ は速やかに腎排泄を受けることが示され、同時に、速やかな血中クリアランスが認められた。また、正常大動脈血管への放射能集積は低い結果となった。放射性プローブを用いたインビボイメージングにおいては標的・非標的組織比が画像化の重要な指標となるため、標的となる動脈硬化病変(不安定性動脈硬化プラーク)の周辺組織である正常血管・血液における低集積性は今後の病態モデル動物を用いた検討を支持する有効な結果であると考えられる。

E. 結論

Asp-Hemolysinの酸化LDL認識配列を基に設計・合成した $[^{125}\text{I}]\text{-AHP7}$ は酸化LDLへの特異的結合、非標的組織への低集積性を認めた。今後、動脈硬化モデル動物(WHHLMIウサギ)を用いた検討により、本プローブの不安定性動脈硬化プラークイメージング剤としての有効性を評価していく予定で

ある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Higashi T, Hatano E, Ikai I, Nishii R, Nakamoto Y, Ishizu K, Suga T, Kawashima H, Togashi K, Seo S, Kitamura K, Takada Y, Uemoto S. FDG PET as a prognostic predictor in the early post-therapeutic evaluation for unresectable hepatocellular carcinoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* (2010) 37: 468-82.

2. Ogawa K, Kawashima H, Kinuya S, Shiba K, Onoguchi M, Kimura H, Hashimoto K, Odani A, Saji H. Preparation and evaluation of $^{186/188}\text{Re}$ -labeled antibody (A7) for radioimmunotherapy with rhenium(I) tricarbonyl core as a chelate site. *Ann. Nucl. Med.* (2009) 23: 843-8.

3. Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* (2009) 52: 6394-401.

4. Ono M, Hayashi S, Kimura H, Kawashima H, Nakayama M, Saji H. Push-pull benzothiazole derivatives as probes for detecting β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorg. Med. Chem.* (2009) 17: 7002-7.

5. Mukai E, Toyoda K, Kimura H, Kawashima H, Fujimoto H, Ueda M, Temma T, Hirao K, Nagakawa K, Saji H, Inagaki N. GLP-1 receptor antagonist as a potential probe for pancreatic beta-cell imaging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009) 389: 523-6.

6. 河嶋秀和. post-FDG: 放射性薬剤の未来, 核医学分科会誌. (2009) 58: 34-44.

2. 学会発表

1. 利川香衣, 河嶋秀和, 森大輔, 木村寛之, 小野正博, 佐治英郎. ペプチドトランスポーターによる取込みを介した新規 ^{18}F 標識ペプチド性腫瘍イメージングプローブの合成と評価. 日本薬学会 (2010. 3)

2. Kawashima H, Hirasawa M, Kimura M, Ono M, Saji H. Synthesis and evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -introduced biotin as a labeling agent for antibodies. Society for Molecular Imaging (World Molecular Imaging Congress) (2009. 9)

3. Kawashima H, Kawai T, Kimura H, Kuge Y, Ono M, Saji H. A novel radioiodinated hydroxyethylamine dipeptide isoster derivative as potential SPECT imaging probe for β -secretase detection in Alzheimer's disease brain. Society of Nuclear Medicine (2009. 6)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分析系・評価系の確立に関する研究

研究分担者 上田 真史 京都大学医学研究科 助教

研究要旨：糖尿病の主たる合併症である動脈硬化および慢性感染性炎症反応に関連する生体分子であるリゾリン脂質受容体（G2A）および Formyl Peptide Receptor（FPR）を標的とする分子イメージングプローブ候補化合物のスクリーニングを目的として、免疫系細胞走化性を指標とするインビトロ評価系を確立した。本法を用いて、本プロジェクトにおいて新たに合成された Formyl Peptide 類のうち 4 化合物が FPR アゴニスト活性を持つことが確認された。

また、研究代表者および他分担研究者によって開発される新規プローブと比較するため、既存プローブである 2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabino-furanosyl-5-[^{123/125}I]iodouracil（[^{123/125}I]FIAU）の標識合成・基礎的な体内分布を評価した。その結果、正常肢への集積は低かったものの、血中放射能の消失半減期が 4 時間以上と長く、甲状腺への放射能集積が経時的に増大することを認めた。すなわち [^{123/125}I]FIAU は血液クリアランスと生体内代謝安定性に難があることを見出した。

A. 研究目的

糖尿病を原因疾患とする炎症性合併症病巣のイメージングには、¹⁸F-FDGによる病巣の代謝活性ラベル、放射ラベル白血球（in vitroラベリング）、白血球・顆粒球のin vivoラベリング、生菌のラベル等の方法が考えられる。本プロジェクトにおいては、炎症巣に集積する免疫担当細胞の標的分子をin vivoラベリングする手法をとるが、プローブ候補化合物のスクリーニングにはin vitro評価系が必須である。本分担研究は、貪食細胞の走化性を指標として、動脈硬化および慢性感染性炎症反応に関連する生体分子リゾリン脂質受容体（G2A）およびFormyl Peptide Receptor（FPR）を標的とする分子イメージングプローブ候補化合物のin vitro評価系の構築を目的として実施した。

さらに研究代表者および他分担研究者によって開発される新規プローブの有効性を明らかにするためには、既存プローブとの比較検討も必要であることから、細菌感染性炎症のイメージング例が報告されたプローブ 2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabino-furanosyl-5-[^{123/125}I]iodouracil（[^{123/125}I]FIAU）の標識合成・基礎的な体内分布を評価した。

B. 研究方法
細胞

走化性の測定には THP-1 細胞を用いた。この細胞はヒトの急性単球性白血病由来で肺胞マクロファ-

ジ類似の性質を示しかつ特定の条件下に好中球様細胞へと分化することが報告されている。この性質を利用して、G2A アゴニスト活性評価には通常培養条件下の THP-1（単球 THP-1）を、FPR アゴニスト活性の評価にはジブチリル cAMP（0.5 mM、72 時間）により分化誘導した THP-1（好中球 THP-1）をそれぞれ用いた。

走化性測定

24 ウェルプレートに RPMI1640 培地（0.1%脂肪酸不含ウシ血清アルブミン添加）に溶解したリゾフォスファチジルコリン（LysoPC）または Formyl Peptide 類を入れ、各ウェルに走化性研究用チェンバー（クラボウ、ケモタキセル 8 μm ポア）をセットし、チェンバー内に Calcein-AM（5 μM、37°C、15 分）で蛍光ラベルした細胞を加えた。CO₂ インキュベータ内で培養後、ポアを通してウェル内へ遊走した細胞を回収し、リシスバッファーに抽出した Calcein の蛍光を測定した（λ_{ex} = 490 nm, λ_{em} = 515 nm）。細胞遊走はチェンバー内に加えた細胞に対する遊走細胞の%数として換算した。

[^{123/125}I]FIAUの合成

標識前駆体である 2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabinofuranosyl-5-(tri-n-butyltin)-uracil をメタノールに溶解し、Na¹²⁵I あるいは NH₄¹²³I および 30% H₂O₂/酢酸（1/3）混合溶液を順に加え、室温で 30 分間反応させた。その後