

201011009A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐治 英郎

平成23（2011）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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐治 英郎

平成23（2011）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		
佐治 英郎	-----	1
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		
小野 正博	-----	8
2. 製剤学的アプローチによる高感度分子プローブの開発		
木村 寛之	-----	12
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		
天満 敬	-----	16
4. 分析系・評価系の確立に関する研究		
上田 真史	-----	20
5. モデル動物の作製に関する研究		
塩見 雅志	-----	23
6. 分子プローブの製剤開発に関わる情報提供		
関 育也	-----	26
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	32

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・不安定性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22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、特に酸化LDL、FPRに対する有望な分子プローブを見出すことに成功し、FPRプローブにおいてはPETを用いた炎症病変のインビボ画像化にも成功した。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
上田 真史	京都大学医学研究科	助教
木村 寛之	京都大学薬学研究科	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	日本メジフィジクス株式会社	アシスタントマネジャー

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。

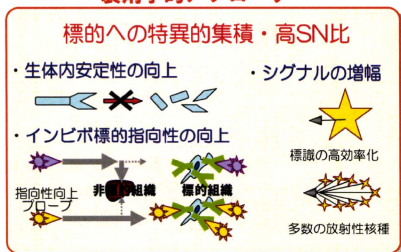
具体的には、①病態生理学的観点から動脈硬化発

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、非侵襲的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。

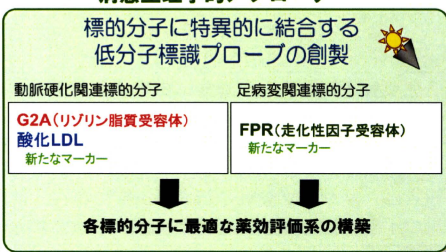
研究開発の全体構想

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



病態生理学のアプローチ



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、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、従来法および昨年度と比べ反応時間を大幅に短縮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 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 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 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 $10\ \mu\text{M}$ pH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 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。高分子量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。

3. 体内放射能分布実験

WHHLMIウサギおよび対照ウサギに ^{125}I AHP7（ $3.3 - 18.5\ \text{MBq}$ 、担体無添加）を耳静脈より投与し、30分後に屠殺して大動脈および各臓器を摘出した。上行・弓部、胸部、腹部大動脈をそれぞれ6、9、9個に分割し、血液、各臓器とともに重量および放射能を測定した。大動脈断片から $20\ \mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、ARGを行った。また、ARGに用いた切片の隣接切片に対し、Azan-Mallory染色、HE染色、およびOxLDL、マクロファージに対する免疫組織染色をそれぞれ行った。

(2) G2Aを標的とした分子プローブの開発

母体化合物リゾホスファチジルコリンの誘導化を検討した。計算化学的手法を用い、最適な位置へのI-125を導入したプローブの設計を行った。更にコールド体、標識前駆体の合成も検討した。

(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 $[^{125}\text{I}]$ WKYMVm (10 μ L)、FPRタンパク質 (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IC₅₀、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、しばしば煩雑な手法が要求される。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 11- $[^{18}\text{F}]$ fluorobenzoate ($[^{18}\text{F}]$ 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FPR発現の評価

大腸菌を接種したマウスから炎症組織と反対側の筋肉を摘出し、ホモジネートを作製後、4°C、15000 rpm、5分遠心した。上清をBCA定量し、Lysis buffer、5x sample bufferで希釈し1 mg/mLに調製後、100°Cで5分間煮沸した。得られたサンプルをゲルに20 μ Lアプラインし、90分電気泳動後、PVDF膜に転写した。ブロッッキングの後、一次抗体(anti-mouse FPR polyclonal goat IgG, α/β -Tubulin Antibody)を一晩反応させ、次に二次抗体(donkey anti-goat IgG-HRP, Polyclonal Swine anti-rabbit IgG/HRP)を45分反応させた後、ECL plus kitで発光測定した。

2. 走化性測定系の構築

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)により好中球様細胞へ分化誘導したTHP-1 (好中球THP-1)細胞を用いた。24ウェル細胞培養プレートにRPMI1640培地に溶解したFormyl Peptide類を入れ(下ウェル)、各下ウェルに走化性研究用チェンバー(上ウェル: クラボウ、

ケモタキセル8 μ mポア)をセットし、上ウェル内にCalcein-AMまたはMito Tracker[®]Redにより蛍光レベルした好中球THP-1細胞をRPMI1640培地に分散して加えた(2 x 10⁶/100 μ L/ウェル)。CO₂インキュベータ内で1.5時間培養後、上ウェルから下ウェルへ遊走した細胞の蛍光強度をプレートリーダーで測定し細胞数を算出した。細胞数の算出には、同時に蛍光標識した細胞数既知の好中球THP-1細胞の蛍光強度から作製した検量線を用いた。

(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

$[^{125}\text{I}]$ AHP7は、放射化学的収率36%、放射化学的純度98%以上で得た。

$[^{125}\text{I}]$ AHP7はLDLに比べOxLDLに対して高い結合性を示し、結合率はOxLDLの酸化度の指標として一般的なTBARS値と高い相関(R = 0.90、P < 0.0001)を示した。非標識AHP7をOxLDL溶液に前処置した後、 $[^{125}\text{I}]$ AHP7を添加し、同様に結合実験を行ったところ、 $[^{125}\text{I}]$ AHP7のOxLDLへの結合率は非標識AHP7濃度依存的に低下した。この結果から、 $[^{125}\text{I}]$ AHP7がOxLDLに対し特異的に結合する事が示された。

WHHLMIウサギを用いて $[^{125}\text{I}]$ AHP7の大動脈放射能集積を調べたところ、投与30分後において0.58 \pm 0.23 \times ID x BW / mm² x 10²となり、既報の高分子プローブの投与3時間後の値(^{99m}Tc-Annexin A5、0.64 \pm 0.18 \times ID x BW / mm² x 10²)とほぼ同等の高い集積を認め、この値は対照ウサギに比べ約3倍高かった。また放射能集積量の大動脈血液比、大動脈筋肉比を調べたところ、WHHLMIウサギにおいてそれぞれ0.41、3.47となり、この値は対照ウサギに比べてそれぞれ1.3倍、1.7倍と有意に高い値を示した。

摘出した大動脈切片におけるARGおよび隣接切片のOxLDL免疫染色の結果、 $[^{125}\text{I}]$ AHP7を投与したWHHLMIウサギ大動脈では、肥厚した内膜部位に放射能集積が強く認められ、また、OxLDLの発現も認められた。また、OxLDL発現が低い内膜部位では放射能集積も低かったことから、WHHLMIウサギ大動脈切片内において、放射能分布とOxLDLの発現分布は一致する傾向を認めた。一方、対照として用いたJWウサギ大動脈では内膜肥厚およびOxLDL発現が全く認められず、 $[^{125}\text{I}]$ AHP7による放射能集積も同様に全く認められなかった。

(2) G2Aを標的とした分子プローブの開発

1-125を導入したプローブG2A-1を設計した。まず、コールド体の合成を検討した。12-bromododecanoyl chlorideを出発原料とし、5段階でG2A-1の合成に成功した。更に直接、間接標識前駆体2種類の合成にも成功した。

(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FMLF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、FMLFを母体化合物とした誘導体を設計した。8種の誘導体の合成に成功した。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FMLFより高い親和性を示した。その中でも特に有望な化合物がいくつか ($K_i = 0.20\text{-}0.62\text{ nM}$) 見出された。

(4) 高感度分子プローブの開発

平成21年度では、 $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ のone-pot合成法の確立を報告した。本法を用いることで、放射化学的収率34%、合成時間40分で $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ を自動合成することに成功した。平成22年度では、反応条件の最適化と開発した自動合成装置での合成を検討した。自動合成装置を用いることで、放射化学的収率34%、合成時間20分で $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ を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FPR発現の評価

作製したモデルマウスでは、炎症部位は対照部位に比べてFPRが9倍高く発現していることを確認した。

2. 走化性測定系の構築

Calcein-AMプレラベルによる蛍光測定法においては、昨年度用いたリシスバッファーにより蛍光色素Calceinを抽出する方法に比較して、プレートリーダーにより遊走した細胞の蛍光強度を測定する方法では、データのエラーは小さくなった一方で、無処置コントロールの数値が高く、ポジティブコントロールであるfMLFの走化性が検出出来なかった。Calcein-AMに変えて、ミトコンドリアの蛍光マーカー色素であるMito Tracker[®]Redで好中球THP-1をラベルした場合にはfMLFの濃度に依存した細胞の遊走が認められ、データの安定性も比較的良好であった。

D. 考察

Asp-HemolysinのOxLDL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

^{[123/125]I}AHP7を設計・合成した。^{[125]I}AHP7のOxLDLへの結合はTBARS値と高い相関を示した。生体内におけるLDL、OxLDLのTBARS値はそれぞれ 0.12 ± 0.03 、 $20\text{-}30\text{ nmols malondialdehyde / mg protein}$ と推定されることから、本プローブは病変に蓄積したOxLDLを選択的に認識し画像化できる可能性を示すものである。

Ex vivo ARGと免疫染色の結果から、^{[125]I}AHP7は、生体内においてOxLDLに特異的に結合し、OxLDLの発現に応じた集積を示したと考えられる。また、OxLDLの発現はマクロファージの発現と共局在している傾向が認められた。マクロファージは酸化LDLを貪食し脂質コアを形成する事が知られていることから、本結果はそれに一致するものであり、^{[123]I}AHP7を用いることによりマクロファージが多く浸潤し脂質コアの形成された不安定性プラークを描出できる可能性を見出した。

計算科学手法を用い設計したFMLF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、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。

化合物8を用い、モデルマウスにおける体内放射能分布実験を行ったところ、炎症筋肉比は投与5分後から1を超え、時間経過とともに増加傾向が見られ、正常部位と比較して炎症部位に高い放射能の集積を確認した。

標識条件の基礎検討では、これまでに確立した $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ のone-pot合成法の最適化を行った。開発した自動合成装置を用いることで、放射化学的収率34%、合成時間20分で $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ を合成することに成功した。

昨年度構築した免疫系細胞走化性を指標とするインビトロ評価系の実験操作手順を簡素化することにより、データの安定性と再現性の向上をはかる目的で、蛍光プレートリーダーを用いてこれらの操作を一段階に集約する方法を試みた。昨年度と同様に好中球THP-1細胞をCalcein-AMにて蛍光標識してポジティブコントロールfMLFの走化性を検討したところ、測定数値のばらつきは小さくなった一方で、無処置コントロールの数値が高く、fMLFの走化性が検出出来なかった。この現象の要因として、蛍光色素CalceinがTHP-1細胞膜で発現している排出トランスポーターの基質として細胞外へ排出され、細胞の遊走とは無関係に下ウエルへ拡散している可能性が考えられたため、ミトコンドリアにトラップされて細胞外への排出を無視できる蛍光色素Mito Tracker[®]Redを用いて同様の検討を行ったところ、fMLFの好中球THP-1細胞走化性効果が確認された。

E. 結論

平成22年度は、平成21年度に引き続き各標的分子 (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 $[\text{18F}]\text{SFB}$ の効率的合成法開発を検討した。その結果、特に酸化LDL、FPRに対する有望な分子プローブを見出すことに成功し、FPRプローブにおいてはPETを用いた炎症病変のインビボ画像化にも成功した。 $[\text{18F}]\text{SFB}$ の効率的合成に関しては、反応条件を最適化することにより平成21年度と比べてさらに大幅に反応時間を短縮することに成功した。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薬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23年度は、インビトロ・インビボ評価に基づく分子プローブの最適化、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, Ishikawa M, Kimura H, Hayashi S, Matsumura K, Watanabe H, Shimizu Y, Cheng Y, Cui M, Kawashima H, Saji H. Development of dual functional SPECT/fluorescent probes for imaging cerebral β -amyloid plaques. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 3885-3888 (2010).
- Watanabe H, Ono M, Haratake M, Kobashi N, Saji H, Nakayama M. Synthesis and characterization of novel phenylindoles as potential probes for imaging of β -amyloid plaques in the brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 4740-4746 (2010).
- Ono M, Ikeoka R, Watanabe H, Kimura H, Fuchigami T, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Synthesis and evaluation of novel chalcone derivatives with $^{99\text{m}}\text{Tc}/\text{Re}$ complexes as potential probes for detection of β -amyloid plaques. *ACS Chemical Neuroscience*, 1, 598-607 (2010).
- Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, Kawashima H, Saji H. Fluorinated benzofuran derivatives for PET imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease brains. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1, 321-325 (2010).
- Ono M, Ikeoka R, Watanabe H, Kimura H, Fuchigami T, Haratake M, Saji H, Nakayama M. $^{99\text{m}}\text{Tc}/\text{Re}$ complexes based on flavone and aurone as SPECT probes for imaging cerebral β -amyloid plaques. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 5742-5748 (2010).
- Ono M, Fuchi Y, Fuchigami T, Kobashi N, Kimura H, Haratake M, Saji H, Nakayama M.

Novel benzofurans with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ complexes as probes for imaging cerebral β -amyloid plaques using single photon emission computed tomography. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1, 443-447 (2010).

- Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, Saji H. A novel ^{18}F -labeled pyridyl benzofuran derivative for imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 6141-6144 (2010).
- Temma T, Ogawa Y, Kuge Y, Ishino S, Takai N, Nishigori K, Shiomi M, Ono M, Saji H. Tissue factor detection for selectively discriminating unstable plaques in an atherosclerotic rabbit model. *J Nucl Med*. 2010;51:1979-86.
- Sano K, Temma T, Kuge Y, Kudo T, Kamihashi J, Zhao S, Saji H. Radioimmuno-detection of membrane type-1 matrix metalloproteinase relevant to tumor malignancy with a pre-targeting method. *Biol Pharm Bull*. 2010;33:1589-95.
- Sano K, Temma T, Azuma T, Nakai R, Narazaki M, Kuge Y, Saji H. A Pre-targeting Strategy for MR Imaging of Functional Molecules Using Dendritic Gd-Based Contrast Agents. *Mol Imaging Biol*. in press.
- Kuge Y, Takai N, Ogawa Y, Temma T, Zhao Y, Nishigori K, Ishino S, Kamihashi J, Kiyono Y, Shiomi M, Saji H. Imaging with radiolabelled anti-membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) antibody: potentials for characterizing atherosclerotic plaques. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37:2093-104.
- Masuda R, Oishi S, Ohno H, Kimura H, Saji H, Fujii N. Concise Site-specific DTPA Labeling of Peptides: Application to Peptide Probes for the Chemokine Receptor CXCR4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 3216-3220 (2011).
- Kudo T, Ueda M, Konishi H, Kawashima H, Kuge Y, Mukai T, Miyano A, Tanaka S, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. PET imaging of hypoxia-inducible factor-1 active tumor cells with pretargeted oxygen-dependent degradable streptavidin and a novel ^{18}F -labeled biotin derivative. *Mol Imaging Biol* (in press).
- Ueda M, Iida Y, Yoneyama T, Kawai T, Ogawa M, Magata Y, Saji H. In vivo relationship between thalamic nicotinic acetylcholine receptor occupancy rates and antiallodynic effects in a rat model of neuropathic pain: persistent agonist binding inhibits the expression of antiallodynic effects. *Synapse*. 2011 Jan;65(1):77-83.
- 上田真史、天満 敬、佐治英郎. 悪性腫瘍の分子

イメージングのための新しい分子プローブの設計. PET journal. 2010;12:32-4.

- 佐治英郎、天満 敬. 冠動脈プラークの分子イメージング. Annual Review 循環器 2011. 2011:120-9.
- 2. 学会発表
- A. Yan Cheng, Masahiro Ono, Hiroyuki Kimura, Shinya Kagawa, Ryuichi Nishii, Hidekazu Kawashima, Hideo Saij, Fluorinated Benzofuran Derivatives for PET Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Brains, World Molecular Imaging Congress, 2010年9月9日、京都
- B. 林瞬、小野正博、松村憲志、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、アルツハイマー病診断を目的とした新規タウイメージングプローブの開発、第50回日本核医学会、2010年11月11日、大宮
- C. 程妍、小野正博、木村寛之、加川信也、西井龍一、佐治英郎、 ^{18}F Labeled Benzofuran Derivatives as PET Probes for Detection of β -Amyloid Plaques, 第50回日本核医学会、2010年11月11日、大宮
- D. 松村憲志、小野正博、林瞬、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、タウ結合性化合物の探索とその分子イメージングプローブへの応用、第29回メディスナルケミストリーシンポジウム、2010年11月17日、京都
- E. 松村憲志、小野正博、林瞬、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、タウ結合性化合物の探索とその分子イメージングプローブへの応用、第131回日本薬学会、2011年3月30日、静岡
- F. 程妍、小野正博、木村寛之、上田真史、中本裕士、富樫かおり、中山守雄、佐治英郎、Auroneを母核とする新規 ^{18}F 標識 β イメージングプローブの開発、第131回日本薬学会、静岡
- G. 西郡寛太郎、天満 敬、木村寛之、小野正博、佐治英郎. 不安定動脈硬化プラークの核医学診断を目的とした放射性ヨウ素標識酸化LDL結合性ペプチドプローブの開発と基礎的評価. 第50回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2010年5月23日 (ピアサザン海、滋賀)
- H. Yoichi Shimizu, Takashi Temma, Fumio Yamauchi, Satoshi Ogawa, Kengo Kanazaki, Tetsuya Yano, Masahiro Ono, Hideo Saij. Development of a novel iron oxide nanoparticle probe for photoacoustic mammography. 第20回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2010年6月25日 (徳島文理大学、徳島)
- I. Takashi Temma, Masahiro Ono, Hideo Saij. Noninvasive in vivo Imaging for Functional Tumor Diagnosis with Nanocarrier-based Molecular Probes. 第49回日本生体医学工学会大会、2010年6月27日 (大阪国際交流センター、大阪)
- J. 西郡寛太郎、天満 敬、依田敬子、小野正博、佐治英郎. 不安定動脈硬化プラークイメージングのための酸化LDL結合性放射性プローブの開発. 第50回日本核医学会学術総会、2010年11月12日 (大宮ソニックシティ、埼玉)
- K. 近藤直哉、天満 敬、日向野桂一、高木陽子、小野正博、佐治英郎. MT1-MMPを標的とした単鎖抗体の開発及び核医学イメージングプローブとしての有効性評価. 第10回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2010年12月4日 (京都テルサ、京都)
- L. 志水陽一、天満 敬、原 功、山原 亮、小関英一、小野正博、佐治英郎. 蛍光off-on制御による標的の特異的なイメージングを旨としたナノキャリア型近赤外蛍光プローブの開発. 日本薬学会第131年会、2011年3月30日 (静岡)
- M. Ueda M, Kudo T, Kuge Y, Mukai T, Miyano A, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saij H. Tumor pretargeting in mice using an oxygen-dependent degradable streptavidin and a radioiodinated biotin: comparison between autoradiography and hypoxia-inducible factor-1 α -immunohistochemistry. 2010 SNM Annual Meeting. 2010.6.7, Salt Lake City, USA.
- N. Ueda M, Kudo T, Konishi H, Kawashima H, Kuge Y, Mukai T, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Saij H. Pretargeted PET imaging of hypoxia-inducible factor-1-active tumors with an oxygen-dependent degradable streptavidin and a ^{18}F -labeled biotin derivative. 2010 World Molecular Imaging Congress. 2011.9.8, Kyoto, Japan.
- O. 山内 早紀、木村 寛之、河嶋 秀和、小野 正博、佐治 英郎: 糖尿病足病変のPET診断を目的とした感染性炎症イメージングプローブの開発、第131回日本薬学会、2011年3月30日、静岡
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
 - 1. 特許取得
 - 出願番号 PCT/JP2010/056538、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22年4月21日出願
 - 公開番号 WO2010/125907、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22年1月4日公開
 - 特願 2010-186701、原 功、小関 英一、佐治 英郎、木村 俊作、小野 正博、天満 敬、スイッチング型蛍光ナノ粒子プローブ及びそれを用いた蛍光分子イメージング法、京都大学/株式会社島津製作所、平成22年8月23日出願
 - 米国仮出願番号 61/371,393、佐治 英郎、小野 正博、木村 寛之、PYRIDYL BENZOFURAN DERIVATIVE、京都大学、平成22年8月6日出願
 - PCT/JP2011/001075、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/日本メジフィックス株式会社、平成23年2月24日出願
 - 特願 2011-044841、佐治 英郎、木村 俊作、小野 正博、天満 敬、原 功、小関 英一、スイッチング型蛍光ナノ粒子プローブ及びそれを用い

た蛍光分子イメージング法、京都大学/株式会社島津製作所、平成23年3月2日出願

- 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（特願 2010- 114737）
- 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（特願 2010- 226988；特願 2010- 114737 の優先権主張）
- 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（特願 2010- 230040；特願 2010- 114737 および特願 2010- 226988 の優先権主張）
- 炎症部位集積性化合物、核医学画像診断剤及び標識前駆体：佐治英郎、木村寛之、小野正博、関育也（特願2011-90476）

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 京都大学薬学研究所 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 (FMLF) 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 1, 2, 4, 8 ($K_i = 0.20\sim 0.62$ nM) を得ることに成功した。今後、より詳細にプローブの有効性を評価し、糖尿病足病変イメージング剤としての最適化を行っていく予定である。

更に、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。今後、プローブ候補化合物の I-125 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、活動性とともな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 (FMLF) 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22年度は、新たな分子プローブ候補化合物の設計・合成・*in vitro*での親和性の評価を行ったので、以下に示す。更に、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）も設計・合成の検討を行ったので合わせて報告する。

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とのドック

キングシュミレーションは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 I]WKYMVm (10 μ L) と、FPR (10 μ L) を加え、25°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IC₅₀、K_i値を算出した。

3. G2Aを標的とした分子プローブの設計・合成

母体化合物リゾホスファチジルコリンの誘導化を検討した。計算化学的手法を用い、最適な位置へのI-125を導入したプローブの設計を行った。更にコールド体、

標識前駆体の合成も検討した。

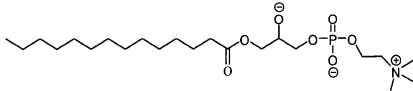


図 1 リンホスファチジルコリン(LPC)

(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FMLF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、FMLF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1~9) 9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FMLFより高
い親和性を示した。中でも特に化合物1、2、
4、8 ($K_i = 0.20\sim 0.62$ nM) が有望な化合物として
見出された。

FMLF 誘導体	K_i [nM]
fMLF	4.85 ± 2.24
化合物1	0.27 ± 0.08
化合物2	0.20 ± 0.04
化合物3	1.03 ± 0.18
化合物4	0.65 ± 0.26
化合物5	86.7 ± 33.8
化合物6	15.8 ± 4.40
化合物7	1.05 ± 0.30
化合物8	0.62 ± 0.13
化合物9	4.85 ± 2.24

表 1

3. G2Aを標的とした分子プローブの設計・合成

I-125を導入したプローブG2A-1を設計した。先ず、
コールド体の合成を検討した。12-bromododecanoyl
chlorideを出発原料とし、5段階でG2A-1の合成に成
功した。更に直接、間接標識前駆体2種類の合成に
も成功した。

D. 考察

計算科学手法を用い設計した、FMLF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1、2、4、8 ($K_i = 0.20\sim 0.62$ nM)
は有望な化合物として見出された。

G2Aを標的とした分子プローブの設計を行い、プ
ローブ候補化合物のコールド体、標識前駆体の合成
に成功した。

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1、2、4、8 (K_i
 $= 0.20\sim 0.62$ 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、ARG、免
疫組織染色、PET撮像実験などを検討し、本プロー
ブの有効性を評価していく予定である。

更にG2Aを標的とした分子プローブのコールド体、
標識前駆体の合成に成功した。今後はI-125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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ono M, Ishikawa M, Kimura H, Hayashi S,
Matsumura K, Watanabe H, Shimizu Y,
Cheng Y, Cui M, Kawashima H, Saji H.
Development of dual functional
SPECT/fluorescent probes for imaging
cerebral β -amyloid plaques. *Bioorganic &*
Medicinal Chemistry Letters, 20, 3885-3888
(2010).

Watanabe H, Ono M, Haratake M, Kobashi N,
Saji H, Nakayama M. Synthesis and
characterization of novel phenylindoles as
potential probes for imaging of β -amyloid
plaques in the brain. *Bioorganic & Medicinal*
Chemistry, 18, 4740-4746 (2010).

Ono M, Ikeoka R, Watanabe H, Kimura H,
Fuchigami T, Haratake M, Saji H, Nakayama
M. Synthesis and evaluation of novel chalcone
derivatives with $^{99m}\text{Tc}/\text{Re}$ complexes as
potential probes for detection of β -amyloid
plaques. *ACS Chemical Neuroscience*, 1,
598-607 (2010).

Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii
R, Kawashima H, Saji H. Fluorinated

benzofuran derivatives for PET imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease brains. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1, 321-325 (2010).

Ono M, Ikeoka R, Watanabe H, Kimura H, Fuchigami T, Haratake M, Saji H, Nakayama M. $^{99m}\text{Tc}/\text{Re}$ complexes based on flavone and aurone as SPECT probes for imaging cerebral β -amyloid plaques. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 5742-5748 (2010).

Ono M, Fuchi Y, Fuchigami T, Kobashi N, Kimura H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Novel benzofurans with ^{99m}Tc complexes as probes for imaging cerebral β -amyloid plaques using single photon emission computed tomography. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1, 443-447 (2010).

Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, Saji H. A novel ^{18}F -labeled pyridyl benzofuran derivative for imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 6141-6144 (2010).

2. 学会発表

Yan Cheng, Masahiro Ono, Hiroyuki Kimura, Shinya Kagawa, Ryuichi Nishii, Hidekazu Kawashima, Hideo Saji, Fluorinated Benzofuran Derivatives for PET Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Brains, World Molecular Imaging Congress, 2010年9月9日、京都

林瞬、小野正博、松村憲志、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、アルツハイマー病診断を目的とした新規タウイメージングプローブの開発、第50回日本核医学会、2010年11月11日、大宮

程妍、小野正博、木村寛之、加川信也、西井龍一、佐治英郎、 ^{18}F Labeled Benzofuran Derivatives as PET Probes for Detection of β -Amyloid Plaques, 第50回日本核医学会、2010年11月11日、大宮

松村憲志、小野正博、林瞬、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、タウ結合性化合物の探索とその分子イメージングプローブへの応用、第29回メディスナルケミストリーシンポジウム、2010年11月17日、京都

松村憲志、小野正博、林瞬、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、タウ結合性化合物の探索とその分子イメージングプローブへの応用、第131回日本薬学会、2011年3月30日、静岡

程妍、小野正博、木村寛之、上田真史、中本裕士、富樫かおり、中山守雄、佐治英郎、Aurone を母核とする新規 ^{18}F 標識 $\text{A}\beta$ イメージングプローブの開発、第131回日本薬学会、静岡

山内 早紀、木村 寛之、河嶋 秀和、小野 正博、佐治 英郎：糖尿病足病変の PET 診断を目的とした感染性炎症イメージングプローブの開発、第131回日本薬学会、2011年3月30日、静岡

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

出願番号 PCT/JP2010/056538、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22年4月12日出願

公開番号 WO2010/125907、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22年11月4日公開

特願 2010-186701、原 功、小関 英一、佐治 英郎、木村 俊作、小野 正博、天満 敬、スイッチング型蛍光ナノ粒子プローブ及びそれを用いた蛍光分子イメージング法、京都大学/株式会社島津製作所、平成22年8月23日出願

米国仮出願番号 61/371,393、佐治 英郎、小野 正博、木村 寛之、PYRIDYL BENZOFURAN DERIVATIVE、京都大学、平成22年8月6日出願

PCT/JP2011/001075、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/日本メジフィックス株式会社、平成23年2月24日出願

特願 2011-044841、佐治 英郎、木村 俊作、小野 正博、天満 敬、原 功、小関 英一、スイッチング型蛍光ナノ粒子プローブ及びそれを用いた蛍光分子イメージング法、京都大学/株式会社島津製作所、平成23年3月2日出願

特願2011-90476、佐治英郎、木村寛之、小野正博、関育也、炎症部位集積性化合物、核医学画像診断剤及び標識前駆体、京都大学/日本メジ

フィジックス株式会社

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 木村 寛之 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 (FMLF) 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1, 2, 4, 8 ($K_i = 0.20\sim 0.62$ nM) を得ることに成功した。更に化合物8を用い *in vivo* での基礎評価を行った。今後、より詳細にプローブの有効性を評価し、糖尿病足病変イメージング剤としての最適化を行っていく予定である。

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 (FMLF) 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22年度は、開発した分子プローブの基礎評価を行ったので、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FMLF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 I]WKYMVm (10 μ L) と、FPR (10 μ L) を加え、25°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 (セルハバスタ) 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IC₅₀、K_i値を算出した。

3. 標識条件の検討

プローブの合成においては、しばしば煩雑な手法が要求される。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 F]fluorobenzoate ([18 F]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化の基礎検討を行った。

4. Western Blotting

大腸菌を接種したマウスから炎症組織と反対側の筋肉を摘出し、ホモジネートを作製後、4°C、15000 rpm、5分遠心した。上清をBCA定量し、Lysis buffer、5x sample buffer で希釈し1 mg/mLに調製後、100°Cで5分間煮沸した。得られたサンプルをゲルに20 μ L アプライし、90分電気泳動後、PVDF膜に転写した。

ブロッキングの後、一次抗体(anti-mouse FPR polyclonal goat IgG, α/β -Tubulin Antibody)を一晩反応させ、次に二次抗体(donkey anti-goat IgG-HRP, Polyclonal Swine anti-rabbit IgG/HRP)を45分反応させた後、ECL plus kitで発光測定した。

5. 体内放射能分布実験

化合物8の標識体を5.3 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$ (ノーマルマウス)、6.2 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{L}$ (モデルマウス)ずつ投与し、5, 15, 30, 60, 120分後に断頭した。各臓器を摘出し、重量および放射能を測定した。炎症モデルは、大腸菌を右大腿筋に、生理食塩水を左大腿筋に10 μL ずつ接種し、2日後に用いた。

(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FMLFのドッキングシミュレーションを行った(図1)。複合体の結合情報を基に、FMLFを母体化合物とした誘導体を設計した。

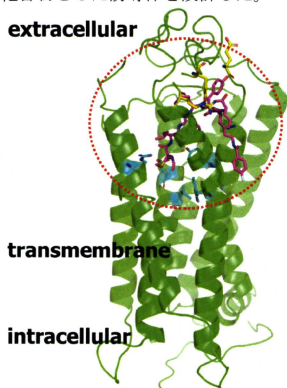


図1 ドッキングモデル

下記に示す(化合物1~9)9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FMLFより高い親和性を示した。その中でも特に化合物1、2、4、8 ($K_i = 0.20\sim 0.62 \text{ nM}$)が有望な化合物として見出された。

FMLF 誘導体	K_i [nM]
fMLF	4.85 ± 2.24
化合物1	0.27 ± 0.08
化合物2	0.20 ± 0.04
化合物3	1.03 ± 0.18
化合物4	0.65 ± 0.26
化合物5	86.7 ± 33.8
化合物6	15.8 ± 4.40
化合物7	1.05 ± 0.30
化合物8	0.62 ± 0.13
化合物9	4.85 ± 2.24

表1

3. 標識条件の基礎検討

H21年度では、 $[^{18}\text{F}]$ SFBのone-pot合成法の確立を報告した(図2)。本法を用いることで、放射化学的収率34%、合成時間40分で $[^{18}\text{F}]$ SFBを自動合成することに成功した。H22年度では、反応条件の最適化と開発した自動合成装置での合成を検討した。自動合成装置を用いることで、放射化学的収率34%、合成時間20分で $[^{18}\text{F}]$ SFBを合成することに成功した。

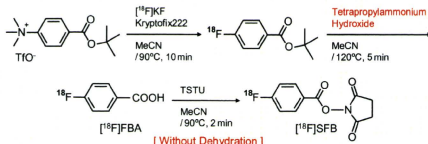


図2

4. Western Blotting

作製したモデルマウスでは、炎症部位は対照部位に比べてFPRが9倍高く発現していることを確認した(図3)。

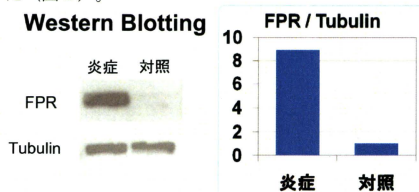


図3

5. 体内放射能分布実験

炎症筋肉比は投与5分後から1を超え、時間経過とともに増加傾向が見られた。炎症血液比については投与60分後以降から1を超え、120分で3.3まで増加

した (図4)。

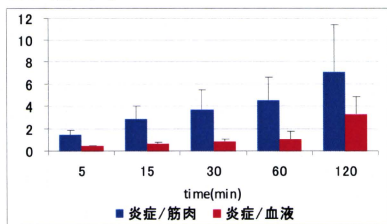


図4

D. 考察

計算科学手法を用い設計した、FMLF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1、2、4、8 ($K_i = 0.20\sim 0.62$ nM)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。

更に化合物8を用い、in vivoでの基礎評価を行った。モデルマウスを用いて体内放射能分布実験を行ったところ、炎症筋肉比は投与5分後から1を超え、時間経過とともに増加傾向が見られ、正常部位と比較して炎症部位に高い放射能の集積を確認した。

標識条件の基礎検討では、これまでに確立した $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ のone-pot合成法の最適化を行った。開発した自動合成装置を用いることで、放射化学的収率34%、合成時間20分で $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ を合成することに成功した。

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1、2、4、8 ($K_i = 0.20\sim 0.62$ nM)を得ることに成功した。化合物8を用い、モデルマウスでの体内放射能分布実験を行ったところ、正常部位と比較して炎症部位に高い放射能の集積を確認した。標識条件の最適化を行ったところ、より短時間での $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ の合成法に成功した。今後、より詳細にプローブの有効性を評価し、糖尿病足病変イメージング剤としての最適化を行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Masuda R, Oishi S, Ohno H, Kimura H, Saji H, Fujii N. Concise Site-specific DTPA Labeling of Peptides: Application to Peptide Probes for the Chemokine Receptor CXCR4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19, 3216-3220 (2011).

Ono M, Ishikawa M, Kimura H, Hayashi S, Matsumura K, Watanabe H, Shimizu Y, Cheng Y, Cui M, Kawashima H, Saji H. Development of dual functional

SPECT/fluorescent probes for imaging cerebral β -amyloid plaques. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 3885-3888 (2010).

Ono M, Ikeoka R, Watanabe H, Kimura H, Fuchigami T, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Synthesis and evaluation of novel chalcone derivatives with $^{99\text{m}}\text{Tc}/\text{Re}$ complexes as potential probes for detection of β -amyloid plaques. *ACS Chemical Neuroscience*, 1, 598-607 (2010).

Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, Kawashima H, Saji H. Fluorinated benzofuran derivatives for PET imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease brains. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1, 321-325 (2010).

Ono M, Ikeoka R, Watanabe H, Kimura H, Fuchigami T, Haratake M, Saji H, Nakayama M. $^{99\text{m}}\text{Tc}/\text{Re}$ complexes based on flavone and aurone as SPECT probes for imaging cerebral β -amyloid plaques. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 5742-5748 (2010).

Ono M, Fuchi Y, Fuchigami T, Kobashi N, Kimura H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Novel benzofurans with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ complexes as probes for imaging cerebral β -amyloid plaques using single photon emission computed tomography. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1, 443-447 (2010).

Cheng Y, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, Saji H. A novel ^{18}F -labeled pyridyl benzofuran derivative for imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 6141-6144 (2010).

2. 学会発表

Yan Cheng, Masahiro Ono, Hiroyuki Kimura, Shinya Kagawa, Ryuichi Nishii, Hidekazu Kawashima, Hideo Saji、Fluorinated Benzofuran Derivatives for PET Imaging of β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Brains, World Molecular Imaging Congress, 2010年9月9日、京都

林瞬、小野正博、松村憲志、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、アルツハイマー病診断を目的とした新規タウイメージングプローブの開発、第50回日本核医学会、2010年11月11日、大宮

程妍、小野正博、木村寛之、加川信也、西井龍一、佐治英郎、¹⁸F Labeled Benzofuran Derivatives as PET Probes for Detection of β -Amyloid Plaques、第50回日本核医学会、2010年11月11日、大宮

松村憲志、小野正博、林瞬、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、タウ結合性化合物の探索とその分子イメージングプローブへの応用、第29回メディシナルケミストリーシンポジウム、2010年11月17日、京都

松村憲志、小野正博、林瞬、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、タウ結合性化合物の探索とその分子イメージングプローブへの応用、第131回日本薬学会、2011年3月30日、静岡

程妍、小野正博、木村寛之、上田真史、中本裕士、富樫かおり、中山守雄、佐治英郎、Auroneを母核とする新規¹⁸F標識A β イメージングプローブの開発、第131回日本薬学会、静岡

山内 早紀、木村 寛之、河嶋 秀和、小野 正博、佐治 英郎：糖尿病足病変のPET診断を目的とした感染性炎症イメージングプローブの開発、第131回日本薬学会、2011年3月30日、静岡

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

炎症部位集積性化合物、核医学画像診断剤及び標識前駆体：佐治英郎、木村寛之、小野正博、関育也（特願2011-90476）

米国仮出願番号61/371,393、佐治 英郎、小野正博、木村 寛之、PYRIDYL BENZOFURAN DERIVATIVE、京都大学、平成22年8月6日出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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低比重リポタンパク質 (OxLDL) を選択し、これを標的としたペプチド性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 OxLDL 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 OxLDL 認識部位 (YKDG 配列) を母体として新規放射性プローブ^{[125I]AHP7}を設計・合成した。^{[125I]I}-AHP7 は放射化学的収率約 36%、放射化学的純度 98%以上で得られた。^{[125I]AHP7} はインビトロ結合実験により LDL に比べ OxLDL に対して高い結合性を示し、結合率は OxLDL の酸化度の指標として一般的な TBARS 値と高い相関を示した。自然発症動脈硬化モデルウサギ (WHHLMI ウサギ) を用いて体内分布を調べたところ、^{[125I]AHP7} は対照ウサギに比べ WHHLMI ウサギの血管に高い集積性を認めた。また、摘出大動脈切片における放射能分布は OxLDL 分布と高い関連性を示した。今後、分子構造を修飾し、不安定性動脈硬化ブランクイメージング剤としての最適化を行っていく予定である。

A. 研究目的

糖尿病由来の動脈硬化は心筋梗塞を高頻度で惹起し、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低比重リポタンパク質 (OxLDL) 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 OxLDL 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 OxLDL 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22年度は、構造中に YKDG 配列を有し長さの異なる有望な3種類の放射性ヨウ素標識ペプチドプローブを設計した。以下には、7残基の放射性ヨウ素標識ペプチドプローブである Lys^{[123I/125I]IB}TrpTyrLysAspGlyAsp^{[123I/125I]AHP7}、ただし IB は 3-iodobenzoyl 基) の検討結果について記す。

B. 研究方法

1. ^{[125I]AHP7}の合成

標識核種には半減期が長く取り扱いの容易な^{125I}を用いた。標識前駆体は島津製作所製ペプチド自動合成装置 PSSM-8 を用いた Fmoc 固相合成法により得、逆相 HPLC により精製した。ESI-MS により分析し目的物であることを確認した。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% ヒドロジン 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 により精製および分析を行った。

2. OxLDL の調製

LDL 溶液 (1.82 mg/mL, 600 μL PBS) を 37 °C で 0 - 29 時間硫酸銅 (14.3 μmol) 処理する事で種々の酸化度の OxLDL を得た。阻害群では、OxLDL 中の lysophosphatidylcholine (lysoPC) の生成に関与する platelet activating factor acetylhydrolase の阻害剤 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, hydrochloride (Pefabloc SC) (6 mM) を同時に処置した。反応の停止は過剰量の EDTA 添加により行った。OxLDL 調製後、酸化度の指標として一般的な thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 値を測定した。

3. OxLDL 結合実験

^{[125I]AHP7} (1.1 kBq) を OxLDL 溶液 (184 μg/mL, 250 μL PBS, TBARS: 0.85 - 44.9 μM) に添加し 4 °C で 3 時間インキュベートした後、高分子量画分と低分子量画分の放射能を測定する事で結合率を求めた。Pefabloc SC 処置 OxLDL についても同様に結合率を求め、非処置群と比較した。

4. インビトロ結合阻害実験

非標識AHP7 (0.35-175 μmol) を4 $^{\circ}\text{C}$ で2時間OxLDL溶液に前処置した後 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ を添加し、同様に結合実験を行った。

5. 実験動物

動脈硬化モデル動物として、myocardial infarction prone Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHLMI) ウサギを用いた。また、対照としてJapanese White (JW) ウサギを用いた。

6. 体内放射能分布実験

WHHLMIウサギおよび対照ウサギに $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ (3.3 - 18.5 MBq、担体無添加)を耳静脈より投与し、30分後に屠殺して大動脈および各臓器を摘出した。上行・弓部、胸部、腹部大動脈をそれぞれ6、9、9個に分割し、血液、各臓器とともに重量および放射能を測定した。

7. インビボ阻害実験

非標識AHP7 (2 μmol) を $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ と同時に投与し、同様に体内分布実験を行った。

8. オートラジオグラフィ (Ex vivo ARG) および組織学的検討

大動脈断片から20 μm の凍結切片を作製し、ARGを行った。また、ARGに用いた切片の隣接切片に対し、Azan-Mallory染色、HE染色、およびOxLDL、マクロファージに対する免疫組織染色をそれぞれ行った。

(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による精製を経て、放射化学的収率35.8%、放射化学的純度98%以上で得た。

2. OxLDL結合実験

$^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ はLDLに比べOxLDLに対して高い結合性を示し、結合率はOxLDLの酸化度の指標として一般的なTBARS値と高い相関 ($R = 0.90$, $P < 0.0001$)を示した。

3. AEBSF処置OxLDLに対する $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ の結合性

LDLの酸化の過程においてLDL中のphosphatidylcholine (PC) はリポタンパク粒子と結合して存在するPAF-AHの基質として認識され、加水分解を受けてlysoPCを生成する事が知られて

おり、Asp-hemolysinはこの結果LDL粒子中に増加するlysoPCに結合することが報告されている。そこで、PAF-AHの阻害剤であるAEBSFを処置しlysoPCの生成を抑制したOxLDLと $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ の結合率を調べたところ、AEBSF処置OxLDLへの $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ 結合率は、AEBSF非処置群に比べ有意に低下した ($P < 0.05$)。一方、両者のTBARS値は同等であったことから、 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ は母体分子であるAsp-hemolysinと同様に酸化LDL中のlysoPCに結合している可能性が明らかとなった。

4. インビトロ結合阻害実験

非標識AHP7をOxLDL溶液に前処置した後、 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ を添加し、同様に結合実験を行ったところ、 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ のOxLDLへの結合率は非標識AHP7濃度依存的に低下した。この結果から、 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ がOxLDLに対し特異的に結合する事が示された。

5. 体内放射能分布実験

$^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ をWHHLMIウサギ及び対照ウサギに投与後30分における血液及び主要臓器の放射能分布を調べた結果、 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ は速やかに血中から消失し、主に腎臓へ移行していることが示された。胃への放射能集積が低いことから、 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ が生体内脱ヨウ素反応に対し安定であることが示された。また、心臓、肝臓への放射能集積が低いことから、 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ の冠動脈イメージングへの利用に際して問題となりうるバックグラウンドが低い可能性を示した。

6. 大動脈への放射能集積の比較

WHHLMIウサギを用いて $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ の大動脈放射能集積を調べたところ、投与30分後において $0.58 \pm 0.23\% \text{ID} \times \text{BW} / \text{mm}^2 \times 10^2$ となり、既報の高分子プローブの投与3時間後の値 ($^{99\text{m}}\text{Tc-Annexin A5}$, $0.64 \pm 0.18\% \text{ID} \times \text{BW} / \text{mm}^2 \times 10^2$) とほぼ同等の高い集積を認め、この値は対照ウサギに比べ約3倍高かった。また放射能集積量の動脈血液比、大動脈筋肉比を調べたところ、WHHLMIウサギにおいてそれぞれ0.41、3.47となり、この値は対照ウサギに比べてそれぞれ1.3倍、1.7倍と有意に高い値を示した。

7. インビボ阻害実験

2 μmol の非標識体を同時投与したところ、大動脈への放射能集積は通常群の約60%と有意に低下した。この結果から、 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ がインビボにおいても特異的にOxLDLを認識している可能性が示された。

8. $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ の集積とOxLDL発現との関連性

抽出した大動脈切片におけるARGおよび隣接切片のOxLDL免疫染色の結果、 $^{[125]\text{I}}\text{AHP7}$ を投与したWHHLMIウサギ大動脈では、肥厚した内膜部位に