

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、^[125I]AHP7による放射能集積も同様に全く認められなかった。

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 ^[123/125I]AHP7を設計・合成した。

^[125I]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・30 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。

LDLの酸化の過程において、脂質成分に含まれる高度不飽和脂肪酸は活性酸素、金属イオンによる過酸化反応を受け、脂質ヒドロペルオキシド、脂質フリーラジカルを生成し、自動酸化が開始する。続いてマロンジアルデヒド、酸化PCなどの種々のアルデヒドを含む脂質過酸化体の生成や、アポBタンパク質の変性的な経路を経て、酸化LDLとなる。この中で、酸化PCはPAF-AHに基質として認識され、sn-2位の脂肪酸が酵素的に切断されることでlysoPCを生じる。一方、TBARS値はこれらの酸化反応過程において生じるマロンジアルデヒド量を主に検出するものである。通常の酸化条件下ではTBARS値とlysoPC生成量は正の相関関係にあると考えられることから、^[125I]AHP7のOxLDLへの結合率がTBARS値と有意な正の相関関係を示したものと考えられる。

Ex vivo ARGと免疫染色の結果から、^[125I]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、^[123I]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。

これらの結果は、^[123I]AHP7を用いることにより投与早期に動脈硬化プラークの不安定性を非侵襲的に評価できる可能性を示し、急性冠症候群の予防・治療効果判定に貢献できるものと期待される。

E. 結論

本検討で得られた結果より、^[123I]AHP7はOxLDLを標的とした不安定性動脈硬化プラークイメージン

グプローブとして有効である可能性が示された。今後、分子構造を修飾し、不安定性動脈硬化プラー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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.

5. 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.

6. 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

1. 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5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 (ピアザ淡海、滋賀)

2. Yoichi Shimizu, Takashi Temma, Fumio

- Yamauchi, Satoshi Ogawa, Kengo Kanazaki, Tetsuya Yano, Masahiro Ono, Hideo Saji. 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）
2. 実用新案登録
なし
3. Takashi Temma, Masahiro Ono, Hideo Saji. Noninvasive in vivo Imaging for Functional Tumor Diagnosis with Nanocarrier-based Molecular Probes. 第49回日本生体医工学会大会、2010年6月27日（大阪国際交流センター、大阪）
3. その他
なし
4. 西郡寛太郎、天滿 敬、依田敬子、小野正博、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）
5. 近藤直哉、天滿 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回放射線医薬品・画像診断薬研究会、2010年12月4日（京都テルサ、京都）
6. 天滿 敬. がんのインビボ分子イメージングのためのナノキャリア型近赤外蛍光プローブの開発. 第1回Vivid Workshop、2011年3月11日（アートランドホテル蓼科、長野）
7. 志水陽一、天滿 敬、原 功、山原 亮、小関英一、小野正博、佐治英郎. 蛍光off-on制御による標的特異的なインビボイメージングを目指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）
- 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、天滿 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、天滿 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、天滿 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）

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：

本分担研究では、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の確立を目指す。本年度は、昨年度開発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を簡素化することにより、データの安定性、再現性を向上させることを目的に研究を行った。適切な蛍光色素を用いた蛍光プレートリーダー分析を導入することにより、スループットの高い定量的評価によるスクリーニングが可能な実験系に最適化しうることを見出した。

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。前年度の本分担研究において免疫系細胞走化性を指標とするインビトロ評価系を開発し、これ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類がFPRアゴニスト活性を持つことを確認したが、実験操作が煩雑でデータの安定性、再現性は必ずしも十分ではなかった。本年度の研究は、操作の簡素化によりデータの安定性、再現性の向上を目的として、定量的評価によるスクリーニングが可能な実験系に最適化するための項目を検討した。

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ー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、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。

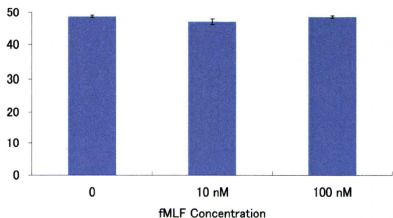
走化性測定

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 μm ポア）をセットし、上ウェル内に Calcein-AM または Mito Tracker®Red により蛍光プレラベルした好中球 THP-1 細胞を RPMI1640 培地に分散して加えた (2 x 10⁵/100 μL/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。

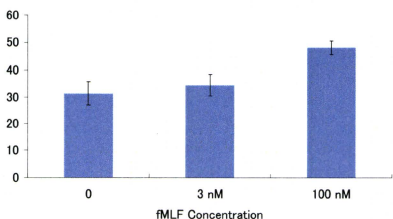
C. 研究結果

細胞走化性

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

今年度の本分担研究は、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実施した。昨年度の方法では、遊走後の細胞の回収、洗浄、溶解、蛍光色素の抽出、蛍光測定と多段階の操作を必要としたため、測定数値のばらつきが大きかった。本年度は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。この現象の一因として、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ェ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。

以上、今年度の研究成績より、適切な蛍光色素を

用いた蛍光プレートリーダー分析により、手順を簡素化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最適化が可能であることが示された。

E. 結論

本年度の検討により、FPR結合性化合物のインビトロスクリーニング系の確立に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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 ¹⁸F-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.

2. 学会発表

- Ueda M, Kudo T, Kuge Y, Mukai T, Miyano A, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. Tumor pretargeting in mice using an oxygen-dependent degradable streptavidin and a radioiodinated biotin: comparison between autoradiography and hypoxia-inducible factor-1 immunohistochemistry. 2010 SNM Annual Meeting. 2010.6.7, Salt Lake City, USA.
- Ueda M, Kudo T, Konishi H, Kawashima H, Kuge Y, Mukai T, Ono M, Kizaka-Kondoh S, Saji H. Pretargeted PET imaging of hypoxia-inducible factor-1 active tumors with an oxygen-dependent degradable streptavidin and a ¹⁸F-labeled biotin derivative. 2010 World Molecular Imaging Congress. 2011.9.8, Kyoto, Japan.

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

研究要旨：神戸大学では、研究分担者として動脈硬化病変の分子イメージングプローブ開発における動脈硬化モデル動物（WHHLMI ウサギ）の生産およびその特性の解析を担当した。本年度の研究では、WHHLMI ウサギを用いて選抜交配を実施し、研究代表者が開発する分子イメージングプローブの有用性を検討するためのウサギ疾患モデルを生産するとともに、糖尿病に関連するメタボリックシンドロームの発症について解析した。その結果、WHHLMI ウサギを 116 匹生産し、空腹時に血清インスリン値高値を示す WHHLMI ウサギは耐糖能異常、内臓脂肪の蓄積を示し、耐糖能異常が大動脈の動脈硬化病変の拡大と関連することを明らかにした。これらの結果から、高インスリン血症を示す WHHLMI ウサギはメタボリックシンドローム類似の病態を示すことを明らかにした。今年度の研究成果より、京都大学（研究代表者）が開発する動脈硬化病変の分子イメージングプローブの有用性について、来年度に WHHLMI ウサギを用いて解析することが可能となった。

A. 研究目的

神戸大学では、研究代表者が開発する分子イメージングプローブを *in vivo* で評価するための疾患モデル動物（WHHLMIウサギ）の生産とその特性、とくにメタボリックシンドロームに関連する病態について解析を実施した。

B. 研究方法

1. WHHLMIウサギの増産

冠動脈に不安定な動脈硬化病変が発生した WHHLMIウサギの次世代で、12月齢における血清総コレステロール値が700 mg/dl 以上の WHHLMI ウサギを用いて自然交配によって WHHLMIウサギの生産を実施した。

2. メタボリックシンドロームに関連する病態の解析

1) インスリン抵抗性の確認

経口糖負荷試験、静脈内糖負荷試験、インスリン負荷試験を実施し、糖代謝異常について確認した。

2) 糖代謝異常の遺伝性の確認

メタボリックシンドロームの指標となる HOMA-IR が高値(>10.0)の両親とも中間値(3.0-10.0)、片親が中間値で片親が低値(<3.0)を示す場合の仔ウサギの HOMA-IR を比較し、糖代謝異常の遺伝性について確認した。

3) 動脈硬化と内臓脂肪蓄積に関する相関解析

12-15月齢のWHHLMIウサギ40匹を用いて、内臓脂肪の蓄積量と大動脈動脈硬化病変の面積について相関解析を実施した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、動物実験計画書を神戸大学学長に提出し、神戸大学動物実験委員会の審査を受け、神戸大学学長の許可の下に、「神戸大学動物実験実施規則」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」等の関連する法規等を遵守して実施した。

C. 研究結果

1. WHHLMIウサギの増産

68ペアの交配を実施し、56匹が出産（妊娠率82.4%）し、産仔数242匹（平均同腹産仔数4.3）、離乳仔116匹（平均2.1匹）を得た（離乳率43.4%）。

2. メタボリックシンドロームに関連する病態の解析

1) 内臓脂肪（腸間膜脂肪）の蓄積

内臓脂肪の蓄積量は、2007年生まれの

WHHLMI ウサギが10-14月齢で 39.1 ± 9.4 g、17-24月齢で 58.2 ± 7.9 gであったが、選抜交配後の2009年生まれのウサギWHHLMI ウサギでは、それぞれ 78.9 ± 8.8 g、 93.9 ± 14.6 gに増加した。

2) インスリン抵抗性の確認

インスリン抵抗性の指標として空腹時の血糖値と血清インスリン値からHOMA-IRを算出した。ヒトにおいては、HOMA-IRが3.0以上の場合にインスリン抵抗性の可能性があると診断されているが、75%(258/346)のWHHLMI ウサギで

HOMA-IR が 3.0 以上であった。また、WHHLMI ウサギ(2.78±0.8 ng/ml)と対照の日本白色種ウサギ(0.23±0.16 ng/ml)について経口糖負荷試験、静脈内糖負荷試験、静脈内インスリン負荷試験を実施し、インスリン抵抗性の指標となる Matsuda-DeFronzo index (MDFI)あるいは血糖消失率(Kitt)を算出した。その結果、経口糖負荷試験における MDFI は、それぞれ 1.6±0.4、24.3±8.8、インスリン負荷試験における Kitt は、それぞれ 1.8±0.3、3.8±0.2 であり、WHHLMI ウサギでいづれも有意な低値であった。これらの結果は、WHHLMI ウサギがインスリン抵抗性であることを強く示唆している。

3) 糖代謝異常の遺伝性の確認

メタボリックシンドロームの指標となる HOMA-IR が高値(>10.0)の仔ウサギの頻度は、両親ともに HOMA-IR が高値の場合に 0.476、両親ともに中間値の場合に 0.346、低値と中間値の場合が 0.130 であり、HOMA-IR が低値(<3.0)のウサギの頻度は、両親とも HOMA-IR が高値の場合が 0.095、両親とも中間値の場合が 0.166、低値と中間値の場合が 0.217 であった。これらの頻度は統計的に有意であり、WHHLMI ウサギにおける糖代謝異常は遺伝性を示すことが示唆された。

4) 内臓脂肪の蓄積に関する相関解析

17-19 月齢の WHHLMI ウサギ 11 匹の相関解析において、内臓脂肪は、体重 ($r=0.711$)、腹囲長 ($r=0.830$)、Body-mass index ($r=0.846$)、空腹時インスリン値 ($r=0.683$)、HOMA-IR ($r=0.739$)、血清中性脂肪 ($r=0.813$)、超低比重リポタンパク中性脂肪 ($r=0.869$)、低比重リポタンパク中性脂肪 ($r=0.708$) と有意な相関を示した。しかしこれらの相関は、15 月齢以下の WHHLMI ウサギでは認められなかった。この結果は、内臓脂肪の蓄積が少ない段階では各種パラメーターとの相関が得られないことを示唆しており、各種パラメーターの変動が内臓脂肪の蓄積に依存している可能性があることを示唆していると考えられる。

5) 動脈硬化と内臓脂肪蓄積に関する相関解析

12-15 月齢の WHHLMI ウサギでは、内臓脂肪の蓄積量は動脈の動脈硬化病変の面積 ($76.5±3.6$) と正の相関 ($r=0.323$, $P=0.042$) を示したが、18-24 月齢では有意な相関は認められなかった。18 月齢以上になると大動脈内膜全面に動脈硬化病変が拡大 ($86.8±1.1$) するため内臓脂肪蓄積の影響を評価することが困難であったと考えられる。

6) 内臓脂肪の免疫組織解析

死亡した WHHLMI ウサギについて、内臓脂肪を採取し、ホルマリン固定して、免疫組織標本を作製した。脂肪細胞は脂肪を蓄積して肥大し、脂肪細胞の間隙に RAM-11 陽性の単球/マクロファージが認められ、炎症反応のマーカーである CRP

及び単球/マクロファージを誘引する MCP-1 が陽性であった。

D 考察

WHHLMI ウサギの繁殖能力は正常ウサギに比較して著しく低下していた。今年度生産した 116 匹の一部を用いて、来年度の本研究課題「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(H32・ナノ・一般・003)」において、京都大学(研究代表者)が開発したプローブの有用性を検討することが可能になると期待できる。

空腹時血清インスリン値が高値を示す WHHLMI ウサギでは、耐糖能異常、内臓脂肪の蓄積が認められ、低 HDL 血症、高中性脂肪血症と合わせて、メタボリックシンドローム類似所見を示すことが確認できた。内臓脂肪の蓄積は大動脈の動脈硬化と相関を示したことから、空腹時血清インスリン値が高い WHHLMI ウサギは、メタボリックシンドロームの新しいモデル動物として期待できる。

E 結論

WHHLMI ウサギは正常ウサギに比較して繁殖能力が低いが、選抜交配により一定の形質を維持した WHHLMI ウサギを年間 116 匹生産することができ、来年度の本研究課題「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(H32・ナノ・一般・003)」を遂行するために京都大学(研究代表者)に WHHLMI ウサギを供給することができる。また、メタボリックシンドローム関連形質の解析結果から、京都大学(研究代表者)が開発する高感度分子イメージングプローブの有効性の解析に、WHHLMI ウサギが有用であることが強く示唆される。

F 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ko AC, Ridsdale A, Smith MS, Mostaco-Guidolin LB, Hewko MD, Pegoraro AF, Kohienberg EK, Schattka B, **Shiomi M**, Stolow A, Sowa MG: Multimodal nonlinear optical imaging of atherosclerotic plaque development in myocardial infarction-prone rabbits. *J Biomed Opt* 15(2):020501-3 (2010).
- 2) Yoshida M, Masunaga K, Nagata T, Satoji Y, **Shiomi M**: The effects of chronic hyperlipidemia on bladder function in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHLMI)

rabbits. *Neurorol Urodyn* 29(7):1350-4 (2010)

- 3) 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* 37(11):2093-104 (2010).
- 4) Nitta-Seko A, Nitta N, **Shiomi M**, Sonoda A, Ota S, Tsuchiya K, Takahashi M, Fujimiya M, Murata K: Utility of contrast-enhanced ultrasonography for qualitative imaging of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: initial experimental study. *Jpn J Radiol* 28(9): 656-62 (2010).
- 5) 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 (2010).
- 6) Mostaco-Guidolin LB, Sowa MG, Ridsdale A, Pegoraro AF, Smith MS, Hewko MD, Kohlenberg EK, Schattka B, **Shiomi M**, Stolor A, Ko AC: Differentiating atherosclerotic plaque burden in arterial tissues using femtosecond CARS-based multimodal nonlinear optical imaging. *JBiomed Opt Express*. 1(1):59-73 (2010).

2. 学会発表

- 1) Kobayashi T, Ito T, Yamada T, Hirayama N, Hirata K, Ishida T, **Shiomi M**: WHHLMI rabbit is an animal model for angina and/or coronary spasms. 78th European Atherosclerosis Society Congress, June 20-23, 2010 (Hamburg, Germany)
- 2) Kobayashi T, Ishida T, Nitta N, Sonoda A, Ito T, Hirayama N, Yamada S, Kobayashi S, Miyagawa K, Murata K, Hirata K, **Shiomi M**: The WHHLMI Rabbit as a Model Animal for Coronary Spastic Angina. "4th Congress of Asian Federation of Laboratory Animal Science (AFLAS), November 9-11, 2010 (Taipei, Taiwan)
- 3) **Shiomi M**: The Role of WHHLMI rabbits in translational researches for Human Hypercholesterolemia and Atherosclerosis "4th Congress of Asian Federation of

Laboratory Animal Science (AFLAS), November 9-11, 2010 (Taipei, Taiwan)

- 4) 小林 努, 石田 達郎, 平山 信恵, 山田 悟士, 伊藤 隆, 平田 健一, **塩見 雅志**: 心電図による WHHLMI ウサギにおける心筋虚血の観察. 第 57 回日本実験動物学会総会. 2010 年 5 月 12-14 日 (京都テルサ, 京都)
- 5) 伊藤 隆, 小林 努, 平山 信恵, 山田 悟士, **塩見 雅志**: 内臓脂肪が蓄積した WHHLMI ウサギはメタボリックシンドロームのモデル動物である. 第 57 回日本実験動物学会総会. 2010 年 5 月 12-14 日 (京都テルサ, 京都)
- 6) Kobayashi T, Ishida T, Miyagawa K, Hirayama N, Yamada S, Ito T, Hirata K, **Shiomi M**: The WHHLMI Rabbit Is a Suitable Animal Model for Human Unstable Angina. 第 42 回日本動脈硬化学会総会. 2010 年 7 月 15-16 日 (長良川国際会議場, 岐阜)
- 7) 小林 努, 石田 達郎, 新田哲久, 園田明永, 伊藤 隆, 平山信恵, 山田悟士, 小林成美, 宮川 和也, 村田喜代史, 平田 健一, **塩見雅志**: 不安定狭心症のモデル動物としての WHHLMI ウサギの有用性. 第4回ウサギフォーラム。2010年7月24日(秋田大学, 秋田)

G 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

分子プローブの製剤開発に関わる情報提供

研究分担者 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

研究要旨：日本メジフィジックス社は、研究分担者として糖尿病足病変に関連する分子である走化性ペプチド FMLF に関する情報、不安定プラークにおいて病態の中心的分子とされる酸化 LDL に関する情報、製剤開発における一般的な技術情報の提供を行った。

FMLF に関する情報調査により、FMLF の標的細胞の一つである好中球は、糖尿病では非糖尿病と比べて炎症部位への浸潤数が多いとする報告を見出し、糖尿病足病変を画像化する目的に、FMLF を利用した分子プローブが有効であることが考えられた。さらにこの FMLF を利用した分子プローブは、先行技術として Tc-99m などの SPECT 核種を用いた炎症のイメージングへの検討がなされているものの、糖尿病足病変に対する PET 用分子プローブとして開発した前例が無く、新規性がある技術であると考えられた。また不安定プラークに対する酸化 LDL に関する情報調査では、酸化 LDL を検出するためのペプチドが、先行技術として報告されているものの、不安定プラークを画像化するための分子プローブとして開発されていないため、本研究で見出されたペプチドを用いた分子プローブは新規の技術であると考えられた。

A. 研究目的

わが国の糖尿病患者数は、年々増加傾向にあるとされている。またその合併症は、患者のQOL低下や生命予後を悪化させ、特に動脈硬化による心筋梗塞や心不全は突然死に至らしめ、また糖尿病足病変は足切断に至る例も少なくない。糖尿病足病変では合併症の神経障害のため、足に感染が起きても痛みが無く、また血液中の高濃度の糖は、細菌の栄養となるため、治りづらくなり、重症化して潰瘍・壊疽、そして足切断に至る。現在の診療において、感染が深部まで達しているか（骨髄炎）否かが足切断の是非を決めるため、この判断に画像診断が必要である。一方プラークの不安定性評価には、不安定性に大きく影響を与えているとされる炎症反応（マクロファージの浸潤）を画像化することが求められている。

この研究では、こうした要求を満たす分子イメージング剤の開発を進めるために必要な、関連する文献調査および開発に必要な技術情報の提供を行った。具体的には、糖尿病足病変では感染症に関連する分子である走化性ペプチドFMLFに関する情報、不安定プラークでは病態の中心的分子とされる酸化LDLに関する情報、製剤開発における一般的な技術情報の提供を行った。

B. 研究方法

走化性ペプチドFMLFに関する情報は、京都大学における化合物デザインや、薬効評価検討の参考と

なる情報を見出すため、糖尿病足病変におけるFMLFの関与を示す文献調査を、MEDLINEおよびPubMedを利用して実施した。また、動物実験を行うにあたり、感染症動物モデルの作製手技、および動物PETによるイメージング撮像条件に関する技術情報の提供を行った。さらに特許申請を行うにあたり、先行技術の調査を行い、その情報提供を行った。

酸化LDLに関する情報においても同じように、京都大学における化合物デザインや、薬効評価検討の参考となる情報を見出すため、MEDLINEおよびPubMedを利用したオンライン調査を実施した。さらに特許申請を行うにあたり、先行技術の調査を行い、その情報提供を行った。

C. 研究結果

走化性ペプチドFMLFに関する情報は、下記文献を抽出し情報の提供を行った。

1. 白血球浸潤による糖尿病足病変の核医学診断

1-1. Newman LG et al.; Leukocyte scanning with ¹¹¹In is superior to magnetic resonance imaging in diagnosis of clinically unsuspected osteomyelitis in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 1992 Nov;15(11):1527-30.

1-2. Simon WH et al.; Clinical imaging with indium 111 oxine-labeled leukocyte scan: review

and case report.: *Clin Podiatr Med Surg.* 1988 Apr;5(2):329-40.

1-3. 酒井直彦ら；慢性骨髄炎の診断における白血球シンチグラフィの臨床的有用性の検討：日本形成外科学会誌, 21: 5~13, 2000.

1-4. Filippi L et al.; Diabetic foot infection: usefulness of SPECT/CT for ^{99m}Tc-HMPAO-labeled leukocyte imaging.: *J Nucl Med.* 2009 Jul;50(7):1042-6. Epub 2009 Jun 12.

1-5. Sella EJ et al.; Imaging modalities of the diabetic foot.: *Clin Podiatr Med Surg.* 2003 Oct;20(4):729-40.

1-6. Palestro CJ et al.; Nuclear medicine and diabetic foot infections.: *Semin Nucl Med.* 2009 Jan;39(1):52-65.

1-7. Strobel K et al.; PET/CT in musculoskeletal infection.: *Semin Musculoskelet Radiol.* 2007 Dec;11(4):353-64.

2. 血中ブドウ糖は好中球活性酸素生成を抑制する

2-1. Ortmeyer J et al.; Glucose suppresses superoxide generation in normal neutrophils: *Am J Physiol.* 1993 Feb;264(2 Pt 1):C402-10.

2-2. Fóris G et al.; Altered postreceptor signal transduction of formyl-Met-Leu-Phe receptors in polymorphonuclear leukocytes of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.: *Clin Immunol Immunopathol.* 1998 Jan;86(1):95-101.

3. 糖尿病炎症モデルマウスにおいて、好中球浸潤は野生種よりも多いが、抗菌能力が低い

3-1. Park S et al.; Defects in innate immunity predispose C57BL/6J-Lep^{prdb}/Lep^{prdb} mice to infection by *Staphylococcus aureus*.: *Infect Immun.* 2009 Mar;77(3):1008-14. Epub 2008 Dec 22.

4. 糖尿病足病変患者好中球の活性酸素産生は、血中亜鉛濃度に相関（炎症悪化の理由）

4-1. Larijani B et al.; Polymorphonuclear leukocyte respiratory burst activity correlates with serum zinc level in type 2 diabetic patients with foot ulcers.: *Br J Biomed Sci.* 2007;64(1):13-7.

5. 健康人ボランティア血液におけるFMLP受容体発現レベルの確認(恒常的な発現)

5-1. Allen CA 1.; Flow cytometry analysis of the expression of neutrophil FMLP receptors.: *J Immunol Methods.* 1992 May 18;149(2):159-64.

また、特許申請に関する先行技術情報として下記を抽出し情報提供した。

【特許文献】

- 【特許文献 1】 特許第2931097号明細書
- 【特許文献 2】 米国特許第4,986,979号明細書
- 【特許文献 3】 米国特許第5,792,444号明細書
- 【特許文献 4】 国際公開第2004/029080号パンフレット

【非特許文献】

- 【非特許文献 1】 Day, AR. *FEBS Lett.* 77,291-294 (1977)
- 【非特許文献 2】 Jiang, MS. *Et al.* , *Nuklearmedizin*, 21,110-113 (1982)
- 【非特許文献 3】 Verbeke, K. *et al.* , *Nuclear Medicine & Biology* , 27,769-779 (2000)
- 【非特許文献 4】 Baidoo, K. E. *et al.* , *Bioconjugate Chemistry* , 9,208-217 (1998)

また動物実験に必要な感染症モデルの作製に関し、Splague-Dowley (SD)ラットを用いた感染症モデルの作製法として、黄色ブドウ球菌である *Staphylococcus aureus* を大腿部筋肉内に注入することによって作製する手技の情報提供を行った。さらに、京都大学においても同型機を所有するため、日本メジフィジックス社が所有するGE社製動物PET機であるVista eXploreによるイメージングを検討し、京都大学において実施するために必要な撮像条件等の情報提供を行った。

さらに不安定プラークに関する情報では、下記文献を抽出し情報の提供を行った。

1. 酸化LDL結合性を示すたんぱく質

1-1. Kumagai T et al.; [Effects of low density lipoprotein and oxidized low density lipoprotein on the cytotoxic activity of Asp-hemolysin to murine macrophages] *Yakugaku Zasshi.* 2001 Apr;121(4):277-81.

また、特許申請に関する先行技術情報として下記を抽出し情報提供した。

【特許文献】

- 【特許文献 1】 特開2002-53598号公報

D. 考察

走化性ペプチドFMLFに関する文献調査を行った結果、FMLFの標的分子であるFPRを多数発現する好中球の炎症部位への浸潤能は、糖尿病でも非糖尿病と同等かそれ以上であるものの、活性酸素放出能は低下しており、抗菌能力が低下していることが、動物レベルながら報告されていた。このことは糖尿病足病変が難治性でかつ重症化しやすい理由を示していると共に、糖尿病においても、FMLFを利用した分子プローブにて炎症を画像化することが可能であることが推察される。つまりFMLFを利用した分子プローブが多く炎症部位に集積するためには、その分子プローブが結合する好中球等の白血球が炎症部位に多く存在しなければいけないが、糖尿病のマウスモデルで野生種よりも多く好中球が浸潤していることが報告されていることは、FMLFを利用した分子プローブが糖尿病足病変の診断に有効であることが考えられる。またFMLFを利用した分子プローブの開発は、先行技術としてTc-99mなどのSPECT核種を用いた技術が報告されているものの、これまでF-18などのPET核種を用いた糖尿病足病変に対する分子プローブの技術は見出せなかったため、本研究の分子プローブは新規な技術であると考えられた。

不安定プラークに対する分子プローブの開発においては、本研究の成果を元にした特許の出願に必要な先行技術情報を調査した結果、酸化LDLを検出するためのペプチドの情報を見出した（特開2002-53598号公報）。しかしながらこの技術は不安定プラークを画像化するための分子プローブとして開発されていないため、本研究で見出されたペプチドを用いた分子プローブは新規の技術であると考えられた。

E. 結論

糖尿病足病変に対する分子プローブとして、走化性ペプチドFMLFは適切な対象分子であると判断された。また先行技術においても、糖尿病足病変のイメージングを念頭に置いた検討は無く新規な技術と考えられた。また不安定プラークに対する分子プローブとして、酸化LDLに結合性を示す分子が適切な対象分子であり、新規な技術と判断された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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（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）
- 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及び核医学画像診断剤、特許出願済み（特願2010-133386）
- 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、特許出願済み（特願2011-90476）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|------|---------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
| | | | | | | | |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|--|----|-----------|------|
| 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 |
| 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 | 51 | 1979-1986 | 2010 |
| Sano K, Temma T, Kuge Y, Kudo T, Kamihashi J, Zhao S, Saji H. | Radioimmunodetection of membrane type-1 matrix metalloproteinase relevant to tumor malignancy with a pre-targeting method. | Biol Pharm Bull | 33 | 1589-1595 | 2010 |
| 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 | | | 印刷中 |
| 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 | 37 | 2093-2104 | 2010 |
| 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 | | | 印刷中 |
| 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 | 65 | 77-83 | 2011 |

| | | | | | |
|---|---|----------------------------------|-------|-----------|------|
| 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 |
| 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 | 12 | 32-34 | 2010 |
| 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 | | 120-129 | 2011 |
| Ko AC, Ridsdale A, Smith MS, Mostaco-Guidolin LB, Hewko MD, Pegoraro AF, Kohienberg EK, Schattka B, Shiomi M, Stolow A, Sowa MG | Multimodal nonlinear optical imaging of atherosclerotic plaque development in myocardial infarction-prone rabbits. | J Biomed Opt | 15(2) | 020501-3 | 2010 |
| Yoshida M, Masunaga K, Nagata T, Satoji Y, Shiomi M | The effects of chronic hyperlipidemia on bladder function in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHLMI) rabbits. | Neurorol Urodyn | 29(7) | 1350-4 | 2010 |
| Nitta-Seko A, Nitta N, Shiomi M, Sonoda A, Ota S, Tsuchiya K, Takahashi M, Fujimiya M, Murata K | Utility of contrast-enhanced ultrasonography for qualitative imaging of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: initial experimental study. | Jpn J Radiol | 28(9) | 656-62 | 2010 |
| Mostaco-Guidolin LB, Sowa MG, Ridsdale A, Pegoraro AF, Smith MS, Hewko MD, Kohlenberg EK, Schattka B, Shiomi M, Stolow A, Ko AC | Differentiating atherosclerotic plaque burden in arterial tissues using femtosecond CARS-based multimodal nonlinear optical imaging. | JBiomed Opt Express | 1(1) | 59-73 | 2010 |
| | | | | | |



Development of dual functional SPECT/fluorescent probes for imaging cerebral β -amyloid plaques

Masahiro Ono^{a,*}, Manami Ishikawa^a, Hiroyuki Kimura^a, Shun Hayashi^a, Kenji Matsumura^a, Hiroyuki Watanabe^a, Yoichi Shimizu^a, Yan Cheng^a, Mengchao Cui^a, Hidekazu Kawashima^b, Hideo Saji^{a,*}

^a Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

^b Graduate School of Medicine, Kyoto University, Shogoin Kawahara-cho, Kyoto 606-8507, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 April 2010

Revised 7 May 2010

Accepted 11 May 2010

Available online 16 May 2010

Keywords:

Alzheimer's disease

β -Amyloid plaque

Positron emission tomography

Single photon emission computed

tomography

Fluorescence

Dual imaging

ABSTRACT

The imaging of β -amyloid (A β) aggregates in the brain may lead to the early detection of Alzheimer's disease (AD) and monitoring of the progression and effectiveness of treatment. The purpose of this study was to develop dual modality SPECT and fluorescent probes based on boron dipyrromethane (BODIPY) as a core structure. We designed and synthesized an ¹²⁵I-labeled derivative of BODIPY (BODIPY7). BODIPY7 had a *K_d* value of 108 nM for A β (1–42) aggregates and exhibited peaks of absorption/emission at 606/613 nm. It detected A β plaques in sections of brain tissue from an animal model of AD and displayed low uptake in the brain and high uptake in the liver in normal mice. Although additional modifications of the BODIPY scaffold are necessary to improve brain uptake, these results should aid the development of dual functional SPECT/fluorescent probes for the imaging of A β plaques in the brain.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The formation of β -amyloid (A β) plaques is a key neurodegenerative event in Alzheimer's disease (AD).^{1,2} Since the imaging of these plaques in vivo may lead to the presymptomatic diagnosis of AD, many molecular probes, including positron emission tomography (PET)^{3–6} and single photon emission computed tomography (SPECT)^{7,8} tracers labeled with a radioisotope (RI), have been developed. The PET ligand [¹¹C]-2-(4-(methylamino)phenyl)-6-hydroxybenzothiazole (PIB) with a benzothiazole backbone has shown particular promise in early clinical trials and is currently being used in a number of human studies.^{9,10} Nuclear imaging with PET/SPECT probes is an established clinical modality that offers good sensitivity deep in tissue, which permits whole body quantitative imaging not only in small animals but also in humans. However, it is limited by factors such as a time-consuming data acquisition process, expensive equipment, exposure to radioactivity, the need for highly skilled personnel, and a relatively poor spatial resolution.¹¹

In addition to PET/SPECT probes, much attention has focused on the development of near-infrared fluorescent (NIRF) probes targeting A β plaques.^{12–14} Optical imaging with NIRF probes is a rela-

tively new modality that offers real-time, nonradioactive, and, depending on the technique, high-resolution imaging. Among NIRF probes reported to date, NIAD-4¹³ and CRANAD-2¹⁵ cross the blood–brain barrier, selectively bind A β with high affinity, clear quickly from the brain, and absorb and emit within the near-infrared region (650–900 nm), often called the 'optical window'.¹⁶ Optical imaging techniques are not quantitative, especially when the object is located deep to the skin because of significant signal attenuation in tissue, but NIRF imaging has the potential to provide a rapid, inexpensive, and nonradioactive drug screening system for AD.

Currently, in vivo imaging of A β plaques in AD brains is primarily performed using nuclear imaging techniques such as SPECT and PET. We hypothesize that the development of dual functional nuclear/fluorescent imaging probes not only can provide complementary information that may lead to improve diagnosis and management of AD patients, but also can facilitate the validation of optical imaging by standard nuclear imaging techniques. Although several recent papers demonstrate the usefulness of dual nuclear and fluorescent imaging probes targeting tumor,^{17,18} such dual functional probes for A β plaques have not been reported. Here, we propose a design strategy for the development of a dual SPECT/fluorescent probe for A β plaques in the brain. In this study, we selected boron dipyrromethane (BODIPY), one of the most useful fluorophores,^{19–23} and introduced the radiolabeled moiety

* Corresponding authors. Tel.: +81 75 753 4608; fax: +81 75 753 4568 (M.O.); tel.: +81 75 753 4556; fax: +81 75 753 4568 (H.S.).

E-mail addresses: ono@pharm.kyoto-u.ac.jp (M. Ono), hsaji@pharm.kyoto-u.ac.jp (H. Saji).

NIAD-4, 2-(4-[¹²⁵I]iodophenyl)-5-thiophene, at the 3-position. Described herein is the synthesis and characterization of this radioiodinated derivative of BODIPY. To our knowledge, this is the first time dual SPECT/fluorescent probes have been proposed as probes for imaging Aβ plaques in the brain.

The target BODIPY derivative was prepared as shown in Scheme 1. The compound **1** was synthesized in a yield of 21.4% by the Suzuki coupling reaction. After reduction of the aldehyde to an alcohol by NaBH₄, the desired Wittig reagent **3** was readily prepared from **2** and triphenylphosphine. The compound **3** was produced by a Wittig reaction between **3** and pyrrolealdehyde. The key step in the formation of the BODIPY backbone was accomplished by the condensation of pyrrole-2-carboxylaldehyde and **4** at low temperature, followed by the addition of BF₃·OEt₂. The bromo compound (**5**) was reacted with bis(tributyltin) using Pd(0) as a catalyst, and the corresponding tributyltin derivative (**6**) was obtained in a yield of 17.0%. The tributyltin derivative (**6**) was readily reacted with iodine in chloroform at room temperature to give the iodo derivative (**7**) in a yield of 20.0%. The radioiodination was achieved by the same iododestannylation reaction using hydrogen peroxide as the oxidant, which produced the desired radioiodinated ligand, [¹²⁵I]BODIPY7, in a yield of 25% and with greater than 95% radiochemical purity. It is anticipated that the no-carrier-added preparation resulted in the final product bearing similar theoretical specific activity to ¹²⁵I.

To quantify the affinity of BODIPY7 for Aβ plaques, we carried out inhibition assays on the binding to Aβ(1–42) aggregates with

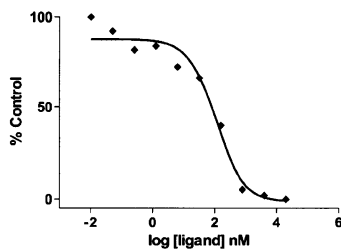
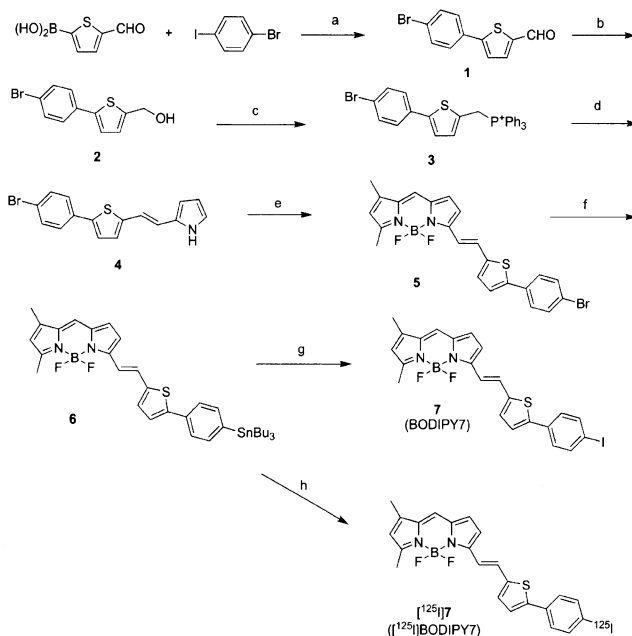


Figure 1. Curve of BODIPY7's inhibition of the binding of [¹²⁵I]IMPY to Aβ(1–42) aggregates.

[¹²⁵I]IMPY as a competing radioligand. BODIPY7 inhibited the binding of [¹²⁵I]IMPY in a dose-dependent manner, indicating that it has affinity for Aβ(1–42) aggregates (Fig. 1). This result suggests that the binding sites of BODIPY7 and IMPY partly overlap. BODIPY7 had a K_i value of 108 nM, indicating sufficiently high affinity for Aβ aggregates. A recent paper reported that the introduction of the triazole moiety into the BODIPY scaffold afforded dyes that allowed for the unambiguous differentiation of an unordered conformation, which is mostly a benign form, from an ordered



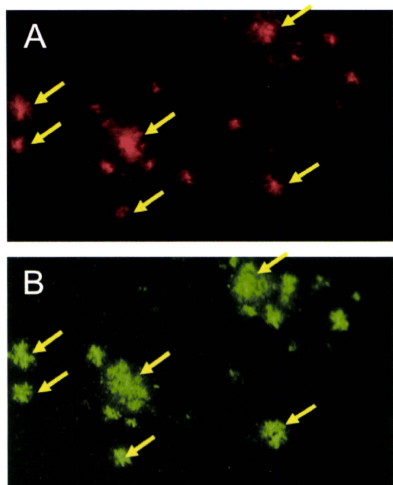


Figure 2. Neuropathological staining of BODIPY7 (A) in a 10- μ m section from a Tg2576 mouse brain. Labeled plaques were confirmed by staining of the adjacent section with thioflavin S (B).

conformation, largely a neurotoxic form, of A β (1–42) soluble oligomers.²⁴ Although this Letter did not report the K_i value of the triazole-containing BODIPY, we consider BODIPY7 to potentially be suitable for monitoring conformational transitions of amyloid species *in vitro*. Also, these results support the validity of using BODIPY as a scaffold for probes to image A β plaques *in vivo*.

Next, the usefulness of BODIPY7 for neuropathological staining of A β plaques was investigated in an animal model of AD, the Tg2576 mouse, specifically engineered to overproduce A β plaques in the brain.²⁵ BODIPY7 clearly stained the plaques as reflected by its high affinity for A β aggregates in *in vitro* inhibition assays (Fig. 2A). The labeling pattern was consistent with that observed with thioflavin S (Fig. 2B). In contrast, wild-type mice displayed no remarkable accumulation of BODIPY7 in brain sections (data not shown). These results suggest that BODIPY7 can function as a probe for detecting A β plaques in the brain and deserves further investigation as a potential dual A β imaging probe.

Radioiodinated BODIPY7 was tested in normal mice to assess its ability to cross the blood–brain barrier (BBB) (Table 1). The uptake of [¹²⁵I]BODIPY7 in the brain was 0.4%ID/g at 2 min postinjection, and most radioactivity had been washed out from the brain by 30 min postinjection (0.14%ID/g). Biodistribution experiments also demonstrated high and persistent levels of radioactivity in the liver and spleen, and a decrease in uptake into the lung with time. Despite its suitable lipophilicity ($\log P = 2.2$) and reasonable molecular size (mol wt 363),¹⁰ the compound's uptake in the brain was relatively low, which may be explained by its rapid trapping in the liver. An initial brain uptake higher than 0.5%ID/organ at 2 min postinjection is preferred for A β imaging probes, and this initial uptake should remain at less than 30% at 30 min in normal mouse brain because of the absence of A β plaques. Although its initial uptakes fell short of these criteria, [¹²⁵I]BODIPY7 showed a rapid washout (30 min) with a value equal to 35% of the initial brain uptake. Despite good affinity for synthetic A β (1–42) aggregates

Table 1
Biodistribution of radioactivity after injection of [¹²⁵I]BODIPY7 in normal mice^a

| Tissue | Time after injection (min) | | | |
|----------------------|----------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 2 | 10 | 30 | 60 |
| Blood | 11.67 (1.70) | 4.09 (0.25) | 3.09 (0.17) | 2.44 (1.25) |
| Liver | 35.51 (3.62) | 46.02 (1.80) | 45.87 (2.60) | 45.78 (3.58) |
| Kidney | 5.39 (0.34) | 4.79 (0.50) | 4.46 (0.41) | 4.43 (0.41) |
| Intestine | 0.48 (0.07) | 0.93 (0.16) | 1.91 (0.17) | 3.04 (0.18) |
| Spleen | 16.12 (3.89) | 26.90 (3.98) | 28.21 (3.79) | 21.52 (8.99) |
| Pancreas | 1.19 (0.35) | 0.74 (0.17) | 0.72 (0.15) | 0.92 (0.28) |
| Heart | 5.59 (1.74) | 2.95 (0.50) | 2.31 (0.53) | 2.30 (0.35) |
| Stomach ^b | 1.40 (0.10) | 4.73 (1.86) | 4.79 (1.12) | 5.50 (0.51) |
| Brain | 0.40 (0.05) | 0.19 (0.02) | 0.14 (0.01) | 0.14 (0.01) |

^a Expressed as% injection dose per gram. Each value represents the mean (SD) for 4–6 animals.

^b Expressed as% injected dose per organ.

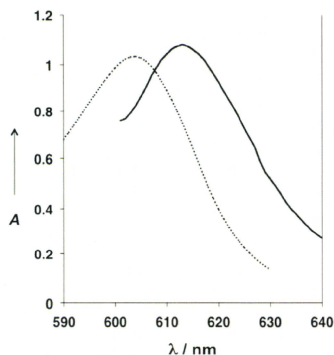


Figure 3. Absorption (dotted line) and emission (line) spectra of BODIPY7.

and the clear labeling of A β plaques in mouse brain sections, the radioiodinated BODIPY did not have characteristics for the imaging of A β plaques. Recently, it was reported that CRANAD-2 can penetrate the BBB and bind to A β plaques in the brain *in vivo*, though it possesses a difluoroboron core like BODIPY and a larger molecular weight than BODIPY.¹⁵ Therefore, additional structural changes may modify the properties of BODIPY derivatives to improve their suitability for imaging.

Although BODIPY7 had a high fluorescent quantum yield ($\phi = 0.36$), it exhibited shorter wavelengths of absorption/emission at 606/613 nm than are appropriate for optical imaging *in vivo* (Fig. 3). Recent papers have reported the development of BODIPY derivatives with absorption/emission bands in the near-infrared region.²⁶ By introducing additional structural changes to extend the near-infrared wavelength simultaneously with modifications to improve penetration for the BBB, more useful SPECT/fluorescent probes may be developed in the future.

In conclusion, we designed and synthesized a radioiodinated BODIPY derivative as a dual SPECT/fluorescent probe for imaging A β plaques in the brain. In binding experiments *in vitro*, the BODIPY derivative showed high affinity for A β (1–42) aggregates. BODIPY7 clearly stained A β plaques in mouse brain, reflecting its affinity for A β aggregates *in vitro*. These findings suggest that additional structural changes to the BODIPY backbone may be applied to potential dual SPECT/fluorescent probes for the imaging of A β plaques.

Acknowledgments

This study was supported by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), a Health Labour Sciences Research Grant, and a Grant-in-aid for Young Scientists (A) and Exploratory Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

Supplementary data

Supplementary data (procedure for the preparation of new BODIPY derivatives, in vitro binding assay, in vitro fluorescent staining using Tg2576 mouse brain sections, and biodistribution studies) associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmcl.2010.05.027.

References and notes

- Klunk, W. E. *Neurobiol. Aging* **1998**, *19*, 145.
- Selkoe, D. J. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741.
- Mathis, C. A.; Wang, Y.; Holt, D. P.; Huang, G. F.; Debnath, M. L.; Klunk, W. E. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2740.
- O'Keefe, G. J.; Saunder, T. H.; Ng, S.; Ackerman, U.; Tochon-Danguy, H. J.; Chan, J. C.; Gong, S.; Dyrks, T.; Lindemann, S.; Holl, G.; Dinkelborg, L.; Villemagne, V.; Rowe, C. C. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 309.
- Johnson, A. E.; Jeppsson, F.; Sandell, J.; Wensbo, D.; Neelissen, J. A.; Jureus, A.; Strom, P.; Norman, H.; Farde, L.; Svensson, S. P. *J. Neurochem.* **2009**, *108*, 1177.
- Choi, S. R.; Golding, G.; Zhuang, Z.; Zhang, W.; Lim, N.; Hefti, F.; Benedum, T. E.; Kilbourn, M. R.; Skovronsky, D.; Kung, H. F. *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 1887.
- Newberg, A. B.; Wintering, N. A.; Clark, C. M.; Plossl, K.; Skovronsky, D.; Seibyl, J. P.; Kung, M. P.; Kung, H. F. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 78P.
- Kung, M. P.; Hou, C.; Zhuang, Z. P.; Zhang, B.; Skovronsky, D.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.; Kung, H. F. *Brain Res.* **2002**, *956*, 202.
- Scheinin, N. M.; Aalto, S.; Koikkalainen, J.; Lotjonen, J.; Karrasch, M.; Kemppainen, N.; Viitanen, M.; Nagren, K.; Heilin, S.; Scheinin, M.; Rinne, J. O. *Neurology* **2009**, *73*, 1186.
- Mathis, C. A.; Wang, Y.; Klunk, W. E. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1469.
- Weissleder, R.; Mahmood, U. *Radiology* **2001**, *219*, 316.
- Hintersteiner, M.; Enz, A.; Frey, P.; Jaton, A. L.; Kinzy, W.; Kneuer, R.; Neumann, U.; Rudin, M.; Staufenbiel, M.; Stoeckli, M.; Wiederhold, K. H.; Gremlich, H. U. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 577.
- Nesterov, E. E.; Skoch, J.; Hyman, B. T.; Klunk, W. E.; Bacskai, B. J.; Swager, T. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 5452.
- Raymond, S. B.; Skoch, J.; Hills, I. D.; Nesterov, E. E.; Swager, T. M.; Bacskai, B. J. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 593.
- Ran, C.; Xu, X.; Raymond, S. B.; Ferrara, B. J.; Neal, K.; Bacskai, B. J.; Medarova, Z.; Moore, A. J. *Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15257.
- Weissleder, R. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316.
- Li, C.; Wang, W.; Wu, Q.; Ke, S.; Houston, J.; Sevic-Muraca, E.; Dong, L.; Chow, D.; Charnsangavej, C.; Gelovani, J. G. *Nucl. Med. Biol.* **2006**, *33*, 349.
- Bhushan, K. R.; Misra, P.; Liu, F.; Mathur, S.; Lenkinski, R. E.; Frangioni, J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17648.
- Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891.
- Nagai, A.; Miyake, J.; Kokado, K.; Nagata, Y.; Chujo, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15276.
- Sun, Z. N.; Liu, F. Q.; Chen, Y.; Tam, P. K.; Yang, D. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2171.
- Lee, J. S.; Kang, N. Y.; Kim, Y. K.; Samanta, A.; Feng, S.; Kim, H. K.; Vendrell, M.; Park, J. H.; Chang, Y. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10077.
- Ojida, A.; Sakamoto, T.; Inoue, M. A.; Fujishima, S. H.; Lippens, G.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6543.
- Smith, N. W.; Alonso, A.; Brown, C. M.; Dzyuba, S. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *391*, 1455.
- Hsiao, K.; Chapman, P.; Nilsen, S.; Eckman, C.; Harigaya, Y.; Younkin, S.; Yang, F.; Cole, G. *Science* **1996**, *274*, 99.
- Umezawa, K.; Matsui, A.; Nakamura, Y.; Citterio, D.; Suzuki, K. *Chemistry* **2009**, *15*, 1096.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Synthesis and characterization of novel phenylindoles as potential probes for imaging of β -amyloid plaques in the brain

Hiroyuki Watanabe^a, Masahiro Ono^{a,b,*}, Mamoru Haratake^a, Nobuya Kobashi^a, Hideo Saji^b, Morio Nakayama^{a,*}

^a Department of Hygienic Chemistry, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

^b Department of Patho-Functional Bioanalysis, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida Shimodachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2010

Revised 1 May 2010

Accepted 4 May 2010

Available online 13 May 2010

Keywords:

Alzheimer's disease

β -amyloid

Imaging

Phenylindole

ABSTRACT

We synthesized a novel series of phenylindole (PI) derivatives and evaluated their biological activities as probes for imaging β plaques in vivo. The affinity for β plaques was assessed by an in vitro-binding assay using pre-formed synthetic β aggregates. 2-Phenyl-1*H*-indole (2-PI) derivatives showed high affinity for A β 42 aggregates with K_d values ranging from 4 to 32 nM. 2-PI derivatives clearly stained β plaques in an animal model of AD. In biodistribution experiments using normal mice, 2-PI derivatives displayed sufficient uptake for imaging, ranging from 1.1% to 2.6% ID/g. Although additional modifications are necessary to improve uptake by and clearance from the brain, 2-PI derivatives may be useful as a backbone structure to develop novel β imaging agents.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder of the elderly and is characterized clinically by dementia, cognitive impairment, and memory loss. Postmortem brains of AD patients reveal neuropathological features: the presence of senile plaques and neurofibrillary tangles, which contain β -amyloid (β) peptides and highly phosphorylated tau proteins.^{1,2} The formation and deposition of β plaques is considered one of the most significant factors in AD. Currently, the only definitive diagnosis of AD is by pathological examination of postmortem staining of affected brain tissue. Therefore, non-invasive techniques such as positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT) are useful for the diagnosis of AD and new anti-amyloid therapies.^{3–5}

Many radiolabeled probes based on the core structure of Congo Red (CR) and thioflavin T (ThT) have been developed as imaging agents for β plaques. Although CR has large molecular size, some truncated CR type molecules such as stilbene and styrylpyridine derivatives have been reported.^{6–8} Because ThT has a lower molecular weight than CR, implying greater blood–brain penetration and easier organic synthesis, a number of groups have worked to

develop probes for PET/SPECT derived from ThT including [¹¹C]PIB,^{9,10} [¹¹C]AZD2184,^{11,12} TZDM,¹³ IBOX,¹⁴ [123I]JMPY,^{15,16} phenylbenzofuran derivatives,^{17,18} phenylbenzothioephene derivatives,¹⁹ imidazopyridine derivatives,^{20,21} and imidazopyridazine derivatives.²² (Fig. 1). Clinical trials in AD patients have been conducted with [¹¹C]PIB and [¹¹C]AZD2184, and indicated the PET-based imaging of β plaques in the living human brain to be useful for the diagnosis of AD. Radioiodinated probes for SPECT such as TZDM, IBOX, and phenylbenzofuran derivatives have shown high affinity for β aggregates in vitro and high initial uptake, but a slow washout from the brain.^{13,14,17} Since the slow washout leads to a low signal/noise ratio in the imaging of β plaques in vivo, a molecular design that facilitates the clearance of the radiolabeled probes from normal areas of the brain is needed. Several reports have shown the lipophilicity of probes to play an important role in uptake by and clearance from brain tissue.^{9,23} As this may partly explain the slow washout from the brain, we planned to select a ThT-derived scaffold with less lipophilicity. In the search for such a scaffold, we focused on phenylindole, never before applied to the development of β imaging probes, and calculated its log *D* value to be 3.97, lower than that of phenylbenzofuran (4.34) or phenylbenzothioephene (4.94) (calculated with the Sparc On-Line Calculator).

In the present study, we synthesized a novel series of 2-phenyl-1*H*-indole (2-PI) and 1-phenyl-1*H*-indole (1-PI) derivatives and evaluated their potential as probes for imaging β in vivo. This is the first time that PI derivatives have been used for SPECT to detect β plaques.

* Corresponding authors. Tel.: +81 75 753 4608; fax: +81 75 753 4568 (M.O.); tel./fax: +81 95 819 2441 (M.N.).

E-mail addresses: ono@pharm.kyoto-u.ac.jp (M. Ono), morio@nagasaki-u.ac.jp (M. Nakayama).

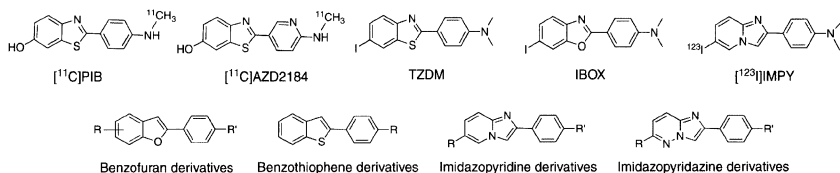
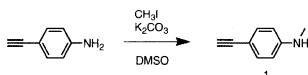


Figure 1. Chemical structure of thioflavin T analogs.

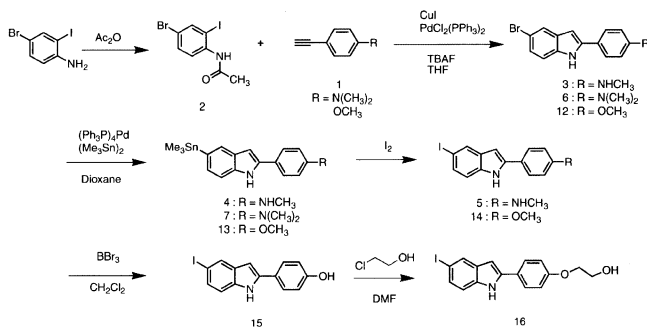


Scheme 1.

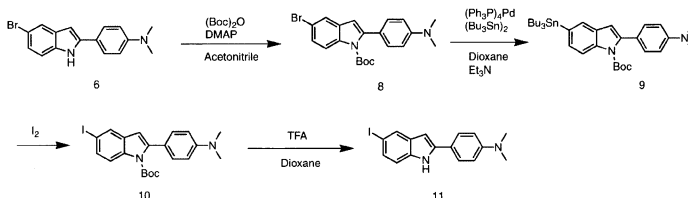
2. Results and discussion

The synthesis of 2-PI derivatives is outlined in Schemes 1–4. We used a one-pot method producing 2-PI.²⁴ Compounds **3**, **6**, and **12** were prepared from **2** and terminal alkynes (**1**, 4-ethynyl-*N,N*-dimethylaniline and *p*-ethynylanisole) using a palladium catalyst in the presence of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) (27.2–49.5% yields). Trimethyltin derivatives (**4**, **7**, and **13**) were prepared from the corresponding bromo compounds (**3**, **6**, and **12**) using a

bromo-to-trimethyltin exchange reaction catalyzed by Pd(0). Trimethyltin derivatives (**4** and **13**) were readily reacted with iodine in ethyl acetate at room temperature to give the iodo derivatives, **5** and **14**. The tributyltin derivative **9** was prepared from the corresponding bromo compound by protecting the *tert*-butoxycarbonyl (Boc) group. Compound **9** was readily reacted with iodine in ethyl acetate at room temperature to give the iodo derivative **10** and deprotected by TFA. Compounds **12** and **14** were converted to **17** and **15** by demethylation with BBr_3 in CH_2Cl_2 (13.0% and 19.5% yields), respectively. Direct alkylation of **17** and **15** with ethylene chlorohydrin and potassium carbonate in DMF resulted in **18** and **16**, respectively. The synthesis of 1-PI derivatives is outlined in Scheme 5. Compound **20** was prepared by the copper-mediated coupling of a substituted indole with 4-(dimethylamino)phenylboronic acid in a yield of 44.2%.²⁵ The tributyltin derivative **21** was readily reacted with iodine in ethyl acetate at room temperature to give the iodo derivative **22**. The trimethyltin derivatives were



Scheme 2.



Scheme 3.