

201111005A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐治 英郎

平成24（2012）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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐治 英郎

平成24（2012）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		
木村 寛之	-----	9
2. 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	-----	13
3. 分析系・評価系の確立に関する研究		
上田 真史	-----	17
4. モデル動物の作製に関する研究		
塩見 雅志	-----	19
5. 分子プローブの製剤開発に関わる情報提供		
関 育也	-----	21
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	29



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 23 年度は、酸化LDL、FPR それぞれに対する複数の分子プローブ候補化合物の設計・合成・評価をすすめ、有望な分子プローブを見出すことに成功した。特に、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：

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	京都大学放射性同位元素総合センター	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	アシスタントマネージャー

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

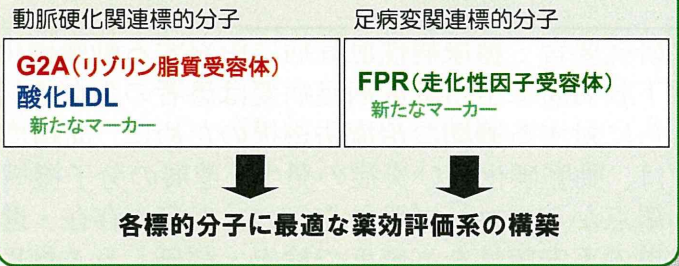
### 製剤学的アプローチ

#### 標的への特異的集積・高SN比



### 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



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、酸化LDL、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、各分子プローブの最適化・有効性評価、および、情報収集を行った。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. $[^{125}\text{I}]\text{AHP12}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP22}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$ 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 ( $[^{125}\text{I}]\text{AHP12}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP22}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$ ) を設計した。標識前駆体はFmoc固相合成法により得、逆相HPLCにより精製した。 $^{125}\text{I}$ 標識には別途合成した $[^{125}\text{I}]\text{N}-(3\text{-iodophenyl})\text{maleimide}$  ( $[^{125}\text{I}]\text{IPM}$ ) を用い、室温で30分あるいは480分反応させた。 $^{111}\text{In}$ 標識は酢酸緩衝液中常法に従って室温30分にて行った。逆相HPLCにより精製を行い、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP12}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP22}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$ を得た。分析は逆相HPLCにより行った。

#### 2. インビトロ酸化LDL結合実験

LDLは $37^\circ\text{C}$ 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。

$[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$ をRIリガンドとして用い、酸化LDLに対する競合的結合阻害実験を行った。すなわち、 $\text{AHP7}$ 、 $\text{AHP12}$ 、 $\text{AHP22}$  ( $0.175 - 175\ \mu\text{mol}$ ) を $4^\circ\text{C}$ で1時間酸化LDL溶液に処置した後 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$ を添加し $4^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした。酸化LDL結合画分 (高分子量画分) を分離し放射能を測定することで結合率を求めた。

#### 3. 体内放射能分布実験

$[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP12}$ あるいは $[^{125}\text{I}]\text{AHP22}$ をWHHLMIウサギあるいは対照ウサギに投与し、30分後に血漿を採取した。メタノール処置によりタンパク質を除いた後、逆相HPLCにより未変化体の割合を調べた。

WHHLMIウサギおよび対照ウサギに $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP12}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP22}$ あるいは $[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$  ( $3.3 - 22.9\ \text{MBq}$ 、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。

## (2) 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  $\mu$ L) 中に様々な濃度のペプチド (DMSO溶液, 10  $\mu$ L)、2 nMの $^{125}$ I]WKYMVm (10  $\mu$ L)、FPRタンパク質 (10  $\mu$ 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<sub>50</sub>、K<sub>i</sub>値を算出した。

### 3. 標識条件の検討

ペプチドやタンパクの標識試薬として有効なN-succinimidyl 14- $^{18}$ 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法の基礎検討を行った。更に、 $^{18}$ F]fMLFXyk(FB)kの合成を検討した。

### 4. 体内放射能分布実験

$^{18}$ F]fMLFXyk(FB)k をノーマルマウスあるいは炎症モデルマウスに尾静脈内投与し、5, 15, 30, 60, 120 分後に屠殺した。各臓器を摘出し、重量および放射能を測定した。炎症モデルマウスは、大腸菌を右大腿筋に、生理食塩水を左大腿筋に 10  $\mu$ L ずつ接種し、2日後に用いた。

### 5. PET撮像実験

炎症モデルマウスに $^{18}$ F]fMLFXyk(FB)k (2.22 MBq/100  $\mu$ L) を尾静脈より投与し、PET撮像を行った。

### 6. マウスを用いた拡張型単回投与毒性試験

院内臨床試験を目的とし、fMLFXyk(FB)kをマウスに単回静脈内投与し、その毒性を検討した。また、一般状態観察及び病理検査において、投与部位における被験物質の刺激性についても検討した。

## (3) 分析系・評価系の確立に関する研究

### 1. 酸化LDL標的プローブの結合性評価

$^{125}$ I]AHP7、 $^{125}$ I]IB-Lysは昨年度までに開発した方法にて合成・精製した。酸化LDLは(1) 2. 記載の方法により調製した。 $^{125}$ I]AHP7および

$^{125}$ I]IB-LysをLDL/酸化LDL溶液に添加し、4°Cで3時間インキュベート後、遠心式フィルター (Microcon, Millipore) にアプライし、50分間遠心分離 (4160 g) 後、PBSを加えて再度遠心分離した。次に、PBSを加えてMicroconを上下逆向きにして10分間遠心分離 (1000 g) を行い、タンパクを回収した。それぞれについて放射能を測定し、結合割合を、(逆遠心時のろ液の放射能) / (一回目の遠心時の放射能) + (Microconの放射能+逆遠心時の放射能) で算出した。

### (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

$^{125}$ I]AHP12、 $^{125}$ I]AHP22、 $^{111}$ In]AHP22は放射化学的収率それぞれ49%、26%、64%、放射化学的純度は何れも98%以上で得た。

$^{125}$ I]AHP7を用いたOxLDLへの競合的結合阻害実験を行ったところ、 $^{125}$ I]AHP7のOxLDLへの結合率はAHP7、AHP12、AHP22のいずれの添加においても添加濃度依存的に低下した。また、その阻害の程度はAHP7、AHP12が同程度であり、AHP22は約10倍高い阻害活性を認めた。なお、AHP7のアミノ酸配列をランダムにしたペプチドを用いた場合は $^{125}$ I]AHP7の結合を全く阻害しなかった。

WHHLMIウサギ、JWウサギを用いて $^{125}$ I]AHP7、 $^{125}$ I]AHP12、 $^{125}$ I]AHP22の体内安定性を調べたところ、 $^{125}$ I]AHP7の投与30分後において未変化体は何れのウサギにおいても5%未満であった。これに対して、 $^{125}$ I]AHP12、 $^{125}$ I]AHP22で投与30分後の未変化体の割合は38-67%と高い値を示した。このことから、 $^{125}$ I]AHP7と比して $^{125}$ I]AHP12、 $^{125}$ I]AHP22では生体内安定性が大きく改善していることが示された。

WHHLMIウサギを用いて $^{125}$ 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 $0.58 \pm 0.23 \%ID \times BW / mm^2 \times 10^2$ となり、既報の高分子プローブの投与3時間後の値 ( $^{99m}$ Tc-Annexin A5、 $0.64 \pm 0.18 \%ID \times BW / mm^2 \times 10^2$ ) 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。 $^{125}$ I]AHP12はWHHLMIウサギ大動脈への放射能集積は $^{125}$ I]AHP7と比べてわずかに低下し、一方で対照ウサギ大動脈においてはわずかに増加した。



[<sup>125</sup>I]AHP22はWHHLMIウサギ大動脈への放射能集積は[<sup>125</sup>I]AHP7と比べて約30%程度増加したが、対照ウサギ大動脈における放射能集積も増加し、両者に有意差を認めなかった。

AHP22は疎水性の高いペプチド配列であることから非特異的な集積の低減を目的として、[<sup>111</sup>In]AHP22を設計・合成した。[<sup>111</sup>In]AHP22はWHHLMIウサギ大動脈において[<sup>125</sup>I]AHP22と同程度の放射能集積を認め、一方で、対照ウサギ大動脈における放射能は[<sup>125</sup>I]AHP22と比べ大きく低減した。このことから[<sup>111</sup>In]AHP22の酸化LDL標的プローブとしての有効性が示された。

## (2) 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。10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4種の化合物 ( $K_i = 0.20-0.62$  nM) を見出した。高い親和性を示した[<sup>18</sup>F]fMLFXYk(FB)kは実際に、[<sup>18</sup>F]SFBとfMLFXYkk(Fmoc)との縮合、および脱Fmoc反応により、放射化学的収率16%、放射化学的純度95%以上で得た。

体内放射能分布実験において、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。また、炎症モデルマウスを用いたPET撮像実験の結果、本プローブは炎症を明瞭に描出した。

## (3) 分析系・評価系の確立に関する研究

### 1. 酸化LDL標的プローブの結合性評価

[<sup>125</sup>I]IB-LysはLDLおよび酸化LDLのいずれに対しても結合性を示さなかった。一方、[<sup>125</sup>I]AHP7は酸化LDLに対し、LDLよりも2倍以上高く結合した ( $P < 0.05$ )。

## D. 考察

Asp-Hemolysinの酸化LDL認識部位 (YKDG配列) を基に7残基、12残基、22残基の放射性ペプチドプローブ [<sup>123/125</sup>I]AHP7、[<sup>123/125</sup>I]AHP12、[<sup>123/125</sup>I]AHP22、[<sup>111</sup>In]AHP22を設計・合成した。

これまでの検討により[<sup>125</sup>I]AHP7の生体内での不安定性が解決すべき課題として見出されたことから、併せて酸化LDLへの親和性の向上を目指して、本検討では新たに12残基、22残基プローブを評価することとした。具体的には標識方法の変更とペプチド配

列の長鎖化を考え、アミノ末端にCysを導入し[<sup>125</sup>I]IPMによる標識法に変更した。また、Asp-Hemolysinの酸化LDL結合配列から高い疎水性が推定されたことからプローブ全体としての疎水性の低減を図るべくAHP22のアミノ末端に[<sup>111</sup>In]DTPAを導入した[<sup>111</sup>In]AHP22を新たに設計・合成した。

AHP7のコールド標品をウサギ血漿中でインキュベートしたところ、IB-Lysが生じる可能性が示された。そこで、代謝により生じたIB-Lysが病変に集積するかどうか評価する目的で、酸化LDLとの結合性を調べたところ、LDLと酸化LDLとの間で[<sup>125</sup>I]IB-Lysの結合性には差が認められず、また結合した量も非常に少なかった。[<sup>125</sup>I]AHP7の場合はLDLよりも酸化LDLに対して高い結合性を示し、結合した絶対量も[<sup>125</sup>I]IB-Lysに比べて顕著に多かったことから、病変部への放射能集積は[<sup>125</sup>I]AHP7由来である可能性が示された。

[<sup>125</sup>I]AHP7のアミノ酸配列を内包し長鎖化した[<sup>125</sup>I]AHP12、[<sup>125</sup>I]AHP22において、ウサギ生体内での安定性の大きな向上が認められた。

[<sup>125</sup>I]AHP22は[<sup>125</sup>I]AHP12と比べてわずかに高い生体内安定性を認めた。競合的阻害実験においてはAHP12はAHP7と同程度の阻害活性を示したのに対し、AHP22は10倍程度高い阻害活性を示した。[<sup>125</sup>I]AHP22において、生体内安定性・親和性が共に向上したことにより、WHHLMIウサギ大動脈への高い放射能集積が引き起こされたものと考えられる。しかしながら、[<sup>125</sup>I]AHP22は高い疎水性のため非特異的な大動脈集積も高く、対照ウサギとの有意差を認めなかった。そこで疎水性を低減する[<sup>111</sup>In]AHP22を合成し実際にWHHLMIウサギを用いて大動脈への放射能集積を調べたところ、WHHLMIウサギへの放射能集積は[<sup>125</sup>I]AHP22と同程度でありながら対照ウサギ大動脈への集積は大きく低減し、両者との間に有意差を認めた。

これらの結果は、[<sup>111</sup>In]AHP22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。

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4種の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。

[<sup>18</sup>F]fMLFXYk(FB)kは、これまでにone-pot合成・自動合成に成功している[<sup>18</sup>F]SFBとfMLFXYkk(Fmoc)との縮合、および脱Fmoc反応により、放射化学的収率16%、放射化学的純度95%以上で得た。

そこで[<sup>18</sup>F]fMLFXYk(FB)k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。実際、炎症モデルマウスを用いたPET撮像実験においても、本プローブは炎症を明瞭に描出することに成功した。さらに、院内臨床試験を目的としてマウスを用いた拡張型単回投与毒性試験を行った結果、全ての個体において異常所見は認められなかった。

#### E. 結論

平成23年度は、各標的分子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、各分子プローブの最適化・有効性評価、および、情報収集を行った。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。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。

#### 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, Hayashi S, Matsumura K, Kimura H, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Mori H, Saji H. Rhodanine and thiohydantoin derivatives for detecting tau pathology in Alzheimer's brains. *ACS Chemical Neuroscience*, 2, 269-275 (2011).
- Matsumura K, Ono M, Hayashi S, Kimura H, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Mori H, Saji H. Phenyl diazenyl benzothiazole derivatives as probes for in vivo imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Medicinal Chemistry Communications*, 2, 596-600 (2011).
- Harada N, Kimura H, Ono M, Mori D, Ohmomo Y, Kajimoto T, Kawashima H, Saji H. Effective synthesis of  $^{99m}\text{Tc}$  tricarbonyl complexes by microwave heating. *Journal of Organometallic Chemistry*, 696, 3745-3749 (2011).
- Arimitsu K, Kajimoto T, Kimura H, Ono M, Ozeki M, Node M, Ohmomo Y, Saji H, Yamashita M. Alternative synthesis of radioiodinated trisaccharide derivatives, 2-(4- $^{125}\text{I}$ iodophenyl)ethyl 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -d-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)- $\alpha$ -d-mannopyranosyl-(1  $\rightarrow$  6)- $\beta$ -d-glucopyranoside, and preparation of its

analogues having different lengths of alkyl chains instead of ethyl group: Acceptor substrates of n-acetylglucosaminyltransferase v for in vivo imaging. *Heterocycles*, 83, 2779-2802 (2011).

- Ono M, Ohgami M, Haratake M, Saji H, Nakayama M. A novel bifunctional chelating agent based on bis(hydroxamamide) for  $^{99m}\text{Tc}$  labeling of polypeptides. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 55, 71-79 (2012).
- Matsumura K, Ono M, Kimura H, Ueda M, Nakamoto Y, Togashi K, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H.  $^{18}\text{F}$ -Labeled phenyldiazenyl benzothiazole for in vivo imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3, 58-62 (2012).
- Ono M, Watanabe H, Kimura H, Saji H. BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral  $\beta$ -amyloid plaques. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(4), 319-324, 2012.
- Ono M, Saji H. Molecular Approaches to the Treatment, Prophylaxis, and Diagnosis of Alzheimer's Disease: Novel PET/SPECT Imaging Probes for Diagnosis of Alzheimer's Disease. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(3):338-44.
- Cheng Y, Ono M, Kimura H, Ueda M, Saji H. Technetium-99m labeled pyridyl benzofuran derivatives as single photon emission computed tomography imaging probes for  $\beta$ -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *J Med Chem*. 2012 Mar 8;55(5):2279-86.
- Nakase I, Konishi Y, Ueda M, Saji H, Futaki S. Accumulation of arginine-rich cell-penetrating peptides in tumors and the potential for anticancer drug delivery in vivo. *J Control Release*. 2012 Apr 30;159(2):181-8.
- Kimura H, Mori D, Harada N, Ono M, Ohmomo Y, Kajimoto T, Kawashima H, Saji H. Microwave-assisted synthesis of organometallic complexes of  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  and  $\text{Re}(\text{CO})_3$ : its application to radiopharmaceuticals. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2012;60(1):79-85.
- Ogawa K, Saji H. Advances in drug design of radiometal-based imaging agents for bone disorders. *Int J Mol Imaging*. 2011;2011:537687.
- Shimizu Y, Temma T, Hara I, Yamahara R, Ozeki E, Ono M, Saji H. Development of novel nanocarrier-based near-infrared optical probes for in vivo tumor imaging. *J Fluoresc*. 2012 Mar;22(2):719-27.
- Watanabe H, Ono M, Kimura H, Kagawa S, Nishii R, Fuchigami T, Haratake M, Nakayama M, Saji H. A dual fluorinated and



- iodinated radiotracer for PET and SPECT imaging of  $\beta$ -amyloid plaques in the brain. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011 Nov 1;21(21):6519-22.
- Ueda M, Kudo T, Mutou Y, Umeda IO, Miyano A, Ogawa K, Ono M, Fujii H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M, Saji H. Evaluation of [ $^{125}\text{I}$ ]IPOS as a molecular imaging probe for hypoxia-inducible factor-1-active regions in a tumor: comparison among single-photon emission computed tomography/X-ray computed tomography imaging, autoradiography, and immunohistochemistry. *Cancer Sci.* 2011 Nov;102(11):2090-6.
  - Shimizu Y, Temma T, Sano K, Ono M, Saji H. Development of membrane type-1 matrix metalloproteinase-specific activatable fluorescent probe for malignant tumor detection. *Cancer Sci.* 2011 Oct;102(10):1897-903.
  - Mukai T, Hagimori M, Arimitsu K, Katoh T, Ukon M, Kajimoto T, Kimura H, Magata Y, Miyoshi E, Taniguchi N, Node M, Saji H. Synthesis and evaluation of a radioiodinated trisaccharide derivative as a sensitive N-acetylglucosaminyltransferase V radioassay. *Bioorg Med Chem.* 2011 Jul 15;19(14):4312-21.
  - Cui M, Ono M, Kimura H, Liu B, Saji H. Novel quinoxaline derivatives for in vivo imaging of  $\beta$ -amyloid plaques in the brain. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011 Jul 15;21(14):4193-6.
  - Cui M, Ono M, Kimura H, Liu B, Saji H. Synthesis and evaluation of benzofuran-2-yl(phenyl)methanone derivatives as ligands for  $\beta$ -amyloid plaques. *Bioorg Med Chem.* 2011 Jul 1;19(13):4148-53.
  - Ono M, Saji H. SPECT Imaging Agents for Detecting Cerebral  $\beta$ -Amyloid Plaques. *Int J Mol Imaging.* 2011;2011:543267.
  - Masuda R, Oishi S, Ohno H, Kimura H, Saji H, Fujii N. Concise site-specific synthesis of DTPA-peptide conjugates: application to imaging probes for the chemokine receptor CXCR4. *Bioorg Med Chem.* 2011 May 15;19(10):3216-20.
  - Cui M, Ono M, Kimura H, Kawashima H, Liu BL, Saji H. Radioiodinated benzimidazole derivatives as single photon emission computed tomography probes for imaging of  $\beta$ -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Nucl Med Biol.* 2011 Apr;38(3):313-20.
  - Hirata K, Kuge Y, Yokota C, Harada A, Kokame K, Inoue H, Kawashima H, Hanzawa H, Shono Y, Saji H, Minematsu K, Tamaki N. Gene and protein analysis of brain derived neurotrophic factor expression in relation to neurological recovery induced by an enriched environment in a rat stroke model. *Neurosci Lett.* 2011 May 20;495(3):210-5.
  - Ono M, Cheng Y, Kimura H, Cui M, Kagawa S, Nishii R, Saji H. Novel  $^{18}\text{F}$ -labeled benzofuran derivatives with improved properties for positron emission tomography (PET) imaging of  $\beta$ -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *J Med Chem.* 2011 Apr 28;54(8):2971-9.
  - Cui M, Ono M, Kimura H, Liu B, Saji H. Synthesis and structure-affinity relationships of novel dibenzylideneacetone derivatives as probes for  $\beta$ -amyloid plaques. *J Med Chem.* 2011 Apr 14;54(7):2225-40.
  - Makino A, Harada H, Okada T, Kimura H, Amano H, Saji H, Hiraoka M, Kimura S. Effective encapsulation of a new cationic gadolinium chelate into apoferritin and its evaluation as an MRI contrast agent. *Nanomedicine.* 2011 Oct;7(5):638-46.
  - 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.* 2011 Dec;13(6):1196-203.
  - Shimizu S, Atsumi R, Nakazawa T, Izumi T, Sudo K, Okazaki O, Saji H. Ticlopidine-induced hepatotoxicity in a GSH-depleted rat model. *Arch Toxicol.* 2011 Apr;85(4):347-53.
  - 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  $^{18}\text{F}$ -labeled biotin derivative. *Mol Imaging Biol.* 2011 Oct;13(5):1003-10.
2. 学会発表
- 渡邊裕之、小野正博、池岡諒一、木村寛之、淵上剛志、原武衛、佐治英郎、中山守雄. アルツハイマー病における $\beta$ アミロイドタンパク質の生体イメージングを目的とした $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識カルコン誘導体の開発. 第22回日本微量元素学会、2011年7月1日、京都
  - Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono, Hiroyuki Kimura, Morio Nakayama, Hideo Saji. Development of novel diphenyloxadiazone derivatives for detecting  $\beta$ -amyloid plaques in Alzheimer's brains. The 6th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists、2011年6月3日、ソウル
  - 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. アルツハイマー病脳内タウの生体イメージングを目的とした新規フェニルジアゼニルベンゾチアゾール誘導体

の開発. 第6回日本分子イメージング学会、2011年5月26日(木)~27(金)、神戸

- 程妍、小野正博、木村寛之、上田真史、佐治英郎. アミロイドβタンパク質の生体イメージングを目的としたベンゾフラン誘導体の開発. 第9回次世代を担う若手のためのフィジカル・フォーラム、2011年9月12、13日、箱根
- 程妍、小野正博、木村寛之、上田真史、中山守雄、佐治英郎. ベンゾフランを母核とする<sup>99m</sup>Tc標識Aβイメージングプローブの開発. 第51回日本核医学会学術総会、2011年10月27-29日、つくば
- 松村憲志、小野正博、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎. アルツハイマー病における神経原線維変化を標的とした核医学イメージングプローブの開発. 第51回日本核医学会、筑波、2011年10月27日(木)~29日(土)
- 渡邊 裕之、小野 正博、松村 憲志、吉村 優志、木村 寛之、佐治 英郎. アルツハイマー病脳内における神経原線維変化の生体イメージングを目的としたオキシインドール誘導体の合成と評価. 日本薬学会第132年会、2012年3月28-31日、札幌
- 片柳 莉果子、小野 正博、渡邊 裕之、木村 寛之、佐治 英郎. アルツハイマー病脳内βアミロイドタンパク質の生体イメージングを目的とした近赤外蛍光プローブの開発. 日本薬学会第132年会、2012年3月28-31日、札幌
- 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6回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2011年5月26日(神戸)
- 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51回日本核医学会学術総会、2011年10月28日(つくば)
- 志水陽一、天満 敬、原 功、山原 亮、小関英一、小野正博、佐治英郎. Lactosomeを基盤とした標的依存性蛍光off-on制御型インビボ近赤外蛍光イメージングプローブの開発. 第6回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2011年5月26日(神戸)
- 西郡寛太郎、天満 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. 第43回日本動脈硬化学会、2011年7月15日(札幌)
- 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を標的とした新規単鎖抗体の開発と核医学イメージングへの応用. 第9回次世代を担う若手のためのフィジカルフォーラム、2011年9月12日(箱根)
- 尾江 悟、天満 敬、志水陽一、小野正博、佐治英郎. 腫瘍のインビボ蛍光イメージングを目的としたシアニン系近赤外蛍光プローブの開発. 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会、2011年10月22日(神戸)
- 尾江 悟、牧野 颯、天満 敬、佐野紘平、志水陽一、山内文生、矢野哲哉、青木裕之、伊藤紳三郎、小野正博、佐治英郎. 超音響マンモグラフィ(PAM)による乳がんの性状診断を目的とし

たポリマーナノ粒子プローブの開発. 第51回日本核医学会学術総会、2011年10月28日(つくば)

- 西郡寛太郎、天満 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剤の開発: 酸化LDL結合ペプチドプローブに関する検討. 第51回日本核医学会学術総会、2011年10月28日(つくば)
- 依田敬子、天満 敬、西郡寛太郎、小野正博、佐治英郎. 不安定性動脈硬化核医学分子イメージングのための酸化LDL結合Asp-Hemolysin誘導ポリペプチドの開発. 第11回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2011年12月3日(京都)
- 志水陽一、天満 敬、原功、牧野颯、山原亮、小関英一、小野正博、佐治英郎. がんの質的診断のためのナノキャリアを基盤とする蛍光オフオン制御型近赤外蛍光プローブの開発. 第2回Vivid Workshop、2012年3月1日(金沢)
- 尾江悟、天満 敬、志水陽一、小野正博、佐治英郎. シアニン骨格を用いた腫瘍標的インビボ近赤外蛍光イメージング剤の開発. 日本薬学会第132年会、2012年3月30日(札幌)
- 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を標的とする核医学分子イメージングプローブ: <sup>111</sup>In標識抗MT1-MMP抗体誘導体. 日本薬学会第132年会、2012年3月30日(札幌)
- 志水陽一、天満 敬、原 功、牧野 颯、山原 亮、小関英一、小野正博、佐治英郎. ナノキャリアを基盤とした標的特異的蛍光活性化型近赤外蛍光プローブの開発: 蛍光off-on制御によるHER2発現がん組織のインビボ可視化に関する検討. 日本薬学会第132年会、2012年3月30日(札幌)
- Yoichi Shimizu, Takashi Temma, Isao Hara, Akira Makino, Ryo Yamahara, Eiichi Ozeki, Masahiro Ono, Hideo Saji. An Activatable Nanocarrier-Based Probe for In Vivo Near-Infrared Fluorescence Imaging of Tumor Biomolecules. 2011 World Molecular Imaging Congress, Sep 9th 2011 (San Diego)
- Ueda M, Ogawa K, Hirata T, Oshima J, Ono M, Nakamoto Y, Togashi K, Saji H. Distinction between 2 different hypoxic regions in the same tumor with the use of <sup>125</sup>I-IPOS and <sup>18</sup>F-FMISO. 2011 World Molecular Imaging Congress. 2011.9.7, San Diego, USA.

#### 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、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)
- 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(特願 2012-91394: 特願 2011-90476 の日本、米国(出願番号 13/434722)、カナダ(出願番号未受領)への優先権主張)
- 佐治英郎、天満 敬、小野正博、関 育也: 不安定プラークへの選択的集積性に優れる化合物、

特許出願済み（出願番号未受領）

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 放射性同位元素総合センター 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。非侵襲的な診断法として有用である核医学診断において、自己の白血球を放射標識し診断に用いる標識白血球が最も汎用されているが、操作が煩雑で、患者の血液を扱うため医療従事者の感染などの危険を伴う診断法である。そこで本研究では、新たな糖尿病足病変イメージングプローブを開発することを目的として、細菌感染性炎症である糖尿病足病変の炎症応答において、白血球の中でも炎症部位に最初に到達する好中球に高発現している Formyl Peptide Receptor (FPR)を標的とする、<sup>18</sup>F標識 FPR 結合プローブ (fMLF (formyl-Met-Leu-Phe) 誘導体) を創製し、その感染性炎症イメージングプローブとしての可能性を検討した。

## 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23年度は、開発した分子プローブの最適化を行ったので、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  $\mu$ L) 中に様々な濃度のペプチド (DMSO溶液, 10  $\mu$ L) と、2nMの<sup>125</sup>I]WKYMVm (10  $\mu$ L) と、FPR (10  $\mu$ 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 $\gamma$ 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<sub>50</sub>、K<sub>i</sub>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-[<sup>18</sup>F]fluorobenzoate ([<sup>18</sup>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。更に、[<sup>18</sup>F]fMLFXYk(FB)kの合成を検討した。

### 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  $\mu$ 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,  $\alpha/\beta$ -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 10 の標識体 ( $^{18}\text{F}$ fMLFXYk(FB)k) 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  $\mu\text{L}$  ずつ接種し、2 日後に用いた。

### 6. PET撮像実験

モデルマウスに精製、希釈後の  $^{18}\text{F}$ fMLFXYk(FB)k (2.22 MBq/100  $\mu\text{L}$ ) を尾静脈より投与し、PET撮像を行った。

### 7. マウスを用いた拡張型単回投与毒性試験

院内臨床試験を目的とし、fMLFXYk(FB)k をマウスに単回静脈内投与し、その毒性を検討した。また、一般状態観察及び病理検査において、投与部位における被験物質の刺激性についても検討した。

(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 (Fig. 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。

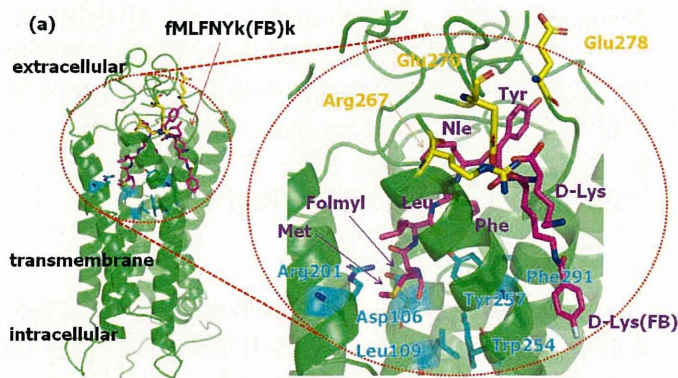


Fig. 1. Docking mode prediction for fMLFXYk(FB)k binding site.

下記に示す (化合物 1 ~10) 10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Table 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 2、7、9、10 ( $K_i = 0.20 \sim 0.62 \text{ nM}$ ) が有望な化合物として見出された。

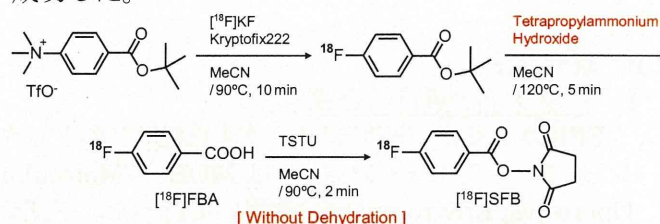
Table 1. Inhibition of [ $^{125}\text{I}$ ]WKYVM binding to FPR.

Compound	Peptide sequence	$K_i$ (nM) <sup>a</sup>
1	fMLF	4.85 $\pm$ 2.24
2	fXLFXYK(FB)	0.65 $\pm$ 0.26
3	fXLFXYK(FB)kkk	21.3 $\pm$ 2.21
4	fXLFXYkkkk(FB)	86.7 $\pm$ 33.8
5	fXLFXYkkk(FB)	15.8 $\pm$ 4.40
6	fXLFXYkk(FB)	1.05 $\pm$ 0.30
7	fMLFMYK(FB)	0.27 $\pm$ 0.08
8	fXLFMYK(FB)	1.03 $\pm$ 0.18
9	fMLFXYK(FB)	0.20 $\pm$ 0.04
10	fMLFXYk(FB)k	0.62 $\pm$ 0.13

<sup>a</sup> Values are means  $\pm$  standard error of the mean of three independent experiments.

### 3. 標識条件の基礎検討

H 2 1 年度では、 $^{18}\text{F}$ SFBのone-pot合成法の確立を報告した (Scheme 1)。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。H 2 2 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。



Scheme 1. Radiosynthesis of [ $^{18}\text{F}$ ]SFB

更に、 $^{18}\text{F}$ fMLFXYk(FB)k は  $^{18}\text{F}$ SFB と fMLFXYkk(Fmoc) との縮合、および脱Fmoc反応により、放射化学的収率16%、放射化学的純度95%以上で得た。



#### 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 (Fig. 2)。

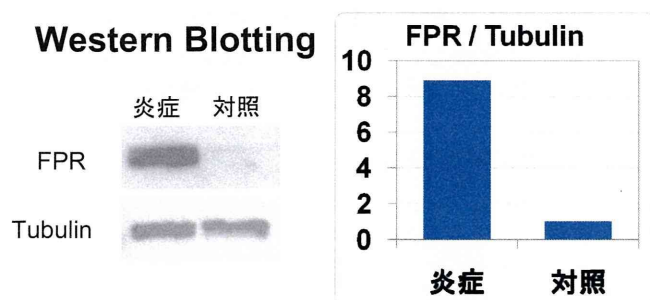


Fig. 2.

FPR protein expression in inflammation and muscle tissues excised from mice.

#### 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 (Fig. 3)。

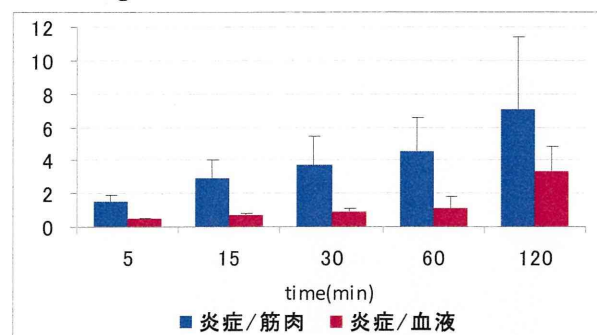


Fig. 3. Biodistribution of radioactivity after injection of  $[^{18}\text{F}]\text{fMLFNYk}(\text{FB})\text{k}$  in inflammation-bearing mice.

#### 6. PET撮像実験

モデルマウスを用いたPET撮像実験の結果、本プローブは炎症を明瞭に描出することを認めた (Fig. 4)。

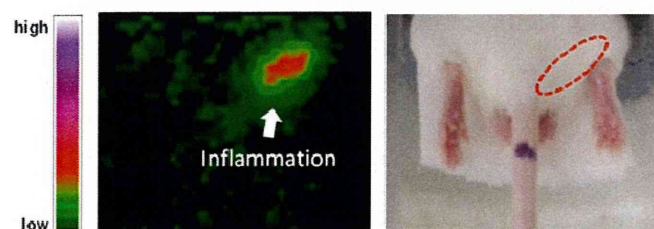


Fig. 4. PET image acquired at 1 hr after injection of  $[^{18}\text{F}]\text{fMLFXYk}(\text{FB})\text{k}$ .

#### 7. マウスを用いた拡張型単回投与毒性試験

院内臨床試験を目的とし、毒性試験を実施した。試験項目として、拡張型単回投与毒性試験を行い、2週間の経過観察および全臓器の剖検を行った結果、全ての個体において異常所見は認められなかった。

本試験条件下では、 $\text{fMLFXYk}(\text{FB})\text{k}$  を単回静脈内投与した場合の無毒性量は、 $400 \mu\text{g}/\text{kg}$  以上であると結論した。また、局所刺激性 (静脈刺激性) は認められなかった。

#### D. 考察

計算科学手法を用い設計した、 $\text{fMLF}$ 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 2、7、9、10 ( $K_i = 0.20\sim 0.62 \text{ nM}$ ) 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。

そこで $[^{18}\text{F}]\text{fMLFXYk}(\text{FB})\text{k}$ 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。 $[^{18}\text{F}]\text{fMLFXYk}(\text{FB})\text{k}$ は $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ と $\text{fMLFXYk}(\text{Fmoc})$ との縮合、および脱Fmoc反応により、放射化学的収率16%、放射化学的純度95%以上で得た。

更に、モデルマウスを用いたPET撮像実験の結果、本プローブは炎症を明瞭に描出することに成功した。

最後に、院内臨床試験を目的とし、マウスを用いた拡張型単回投与毒性試験を行い、2週間の経過観察および全臓器の剖検を行った結果、全ての個体において異常所見は認められなかった。

#### E. 結論

本研究で開発された $[^{18}\text{F}]\text{fMLFXYk}(\text{FB})\text{k}$ は、FPRを標的とした感染性炎症イメージングPETプローブとして有効である可能性が示され、糖尿病足病変の診断に用いるための基礎的な性質を有していることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kimura H, Mori D, Harada N, Ono M, Ohmomo Y, Kajimoto T, Kawashima H, Saji H. Microwave-assisted Synthesis of Organometallic Complexes of  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$  and  $\text{Re}(\text{CO})_3$ : Its Application to Radiopharmaceuticals. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 60(1) 79-85 2012

Arimitsu K, Kajimoto T, Kimura H, Ono M, Ozeki M, Node M, Ohmomo Y, Saji H,



Yamashita M. Alternative Synthesis of Radioiodinated Trisaccharide Derivatives, 2-(4-<sup>125</sup>I-iodophenyl)ethyl 2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-mannopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside, and Preparation of its Analogs Having Different Lengths of Alkyl Chains instead of Ethyl Group: Acceptor Substrates of N-Acetylglucosaminyltransferase V for *In Vivo* Imaging. *Heterocycles* . Vol. 83, No.12, 2011, 2779-2802

Harada N, Kimura H, Ono M, Mori D, Ohmomo Y, Kajimoto T, Kawashima H, Saji H. Effective Synthesis of <sup>99m</sup>Tc Tricarbonyl Complexes by Microwave Heating. *Journal of Organometallic Chemistry*. 696 (2011) 3745-3749

Mukai T, Hagimori M, Arimitsu K, Katoh T, Ukon M, Kajimoto T, Kimura H, Magata Y, Miyoshi E, Taniguchi N, Node M, Saji H. Synthesis and evaluation of a radioiodinated trisaccharide derivatives as a synthetic substrate for a sensitive N-acetylglucosaminyltransferase V radioassay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.19 (2011) 4312-4321

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 (2011) 3216-3220

## 2. 学会発表

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 6 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2011 年 5 月 26 日（神戸）

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 51 回日本核医学会学術総会、2011 年 10 月 28 日（つくば）

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許出願

- 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）

- 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（特願2012-91394：特願2011-90476の日本、米国（出願番号13/434722）、カナダ（出願番号未受領）への優先権主張）

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（酸化 LDL）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）を母体として新規放射性プローブ  $[^{123/125}\text{I}]\text{AHP7}$ 、 $[^{123/125}\text{I}]\text{AHP12}$ 、 $[^{123/125}\text{I}]\text{AHP22}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$  を設計・合成した。これらの新規プローブは何れも十分な放射化学的収率、かつ、高い放射化学的純度で得られた。 $[^{125}\text{I}]\text{AHP22}$  は  $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP12}$  と比べ高い酸化 LDL 結合阻害活性、生体内安定性と、自然発症動脈硬化モデルウサギ（WHHLMI ウサギ）大動脈病変への高い集積性を示したが、正常血管への非特異的集積も高かった。 $[^{125}\text{I}]\text{AHP22}$  の疎水性を低減した  $[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$  を用いることにより正常血管への非特異的集積を低減することに成功し、動脈硬化病変への集積性との間に有意差を認めた。以上より、 $[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$  は酸化 LDL 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。

## 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低比重リポタンパク質（酸化LDL）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。

これまでに、7残基の放射性ヨウ素標識ペプチドプローブである Lys( $[^{123/125}\text{I}]\text{IB}$ )TrpTyrLysAspGlyAsp ( $[^{123/125}\text{I}]\text{AHP7}$ 、ただしIBは3-iodobenzoyl基)を設計・合成し酸化LDL標的分子プローブとしての有効性を示してきた。しかしながら $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$ は生体内での安定性に課題を有していたことから、これの改善を目指して12残基プローブ ( $[^{123/125}\text{I}]\text{AHP12}$ )、22残基プローブ ( $[^{123/125}\text{I}]\text{AHP22}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$ )を新たに設計・合成し、その有効性を調べた。

## B. 研究方法

### 1. $[^{125}\text{I}]\text{AHP12}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP22}$ 、 $[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$ の合成

$[^{123/125}\text{I}]\text{AHP12}$ 、 $[^{123/125}\text{I}]\text{AHP22}$ の標識核種には半減期が長く取り扱いの容易な $^{125}\text{I}$ 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 $[^{125}\text{I}]\text{N}(3\text{-iodophenyl})\text{maleimide}$  ( $[^{125}\text{I}]\text{IPM}$ )を用いた。水・アセトニトリル中、あるいは、酢酸アンモニウム緩衝液・アセトニトリル中に標識前駆体300-500  $\mu\text{g}$ を溶解し、 $[^{125}\text{I}]\text{IPM}$ を加えた。その後、室温で30分あるいは480分反応させた。逆相HPLCにより精製および分析を行った。非標識体 (I-AHP7、I-AHP12、I-AHP22) はほぼ同様の方法で合成した。

$[^{111}\text{In}]\text{AHP22}$ の合成においては固相合成法により前駆体ペプチドを合成した後、アミノ末端に $\epsilon$ -アミノカプロン酸を介して

-SCN-Bz-DTPAを導入した。 $^{111}\text{In}$ 標識は酢酸緩衝液中常法に従って室温30分にて行い、逆相HPLCにより精製および分析を行った。

### 2. 酸化LDLの調製

LDL溶液 (1.82 mg/mL、600  $\mu\text{L}$  PBS) を37°Cで0-29時間硫酸銅 (14.3  $\mu\text{mol}$ ) 処理する事で種々の酸化度の酸化LDLを得た。反応の停止は過剰量のEDTA添加により行った。酸化LDL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. インビトロ結合阻害実験

$[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$ をRIリガンドとして用い、酸化LDLに対する競合的結合阻害実験を行った。すなわち、I-AHP7、I-AHP12、I-AHP22 (0.175 - 175  $\mu\text{mol}$ )

を4 °Cで1時間酸化LDL溶液に処置した後<sup>[125I]</sup>AHP7を添加し4 °Cで1時間インキュベートした。酸化LDL結合画分(高分子量画分)を分離し放射能を測定することで結合率を求めた。

#### 4. 実験動物

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

#### 5. 生体内安定性試験

<sup>[125I]</sup>AHP7、<sup>[125I]</sup>AHP12あるいは<sup>[125I]</sup>AHP22をWHHLM ウサギあるいは対照ウサギに投与し、30分後に血漿を採取した。メタノール処置によりタンパク質を除いた後、逆相HPLCにより未変化体の割合を調べた。

#### 6. 体内放射能分布実験

WHHLM ウサギおよび対照ウサギに<sup>[125I]</sup>AHP7、<sup>[125I]</sup>AHP12、<sup>[125I]</sup>AHP22あるいは<sup>[111In]</sup>AHP22(3.3 – 22.9 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。

(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. <sup>[125I]</sup>AHP12、<sup>[125I]</sup>AHP22、<sup>[111In]</sup>AHP22の合成

<sup>[125I]</sup>AHP12、<sup>[125I]</sup>AHP22、<sup>[111In]</sup>AHP22は逆相HPLCによる精製を経て、放射化学的収率はそれぞれ49%、26%、64%、放射化学的純度は何れも98%以上で得た。

#### 2. インビトロ結合阻害実験

<sup>[125I]</sup>AHP7を用いた酸化LDLへの競合的結合阻害実験を行ったところ、<sup>[125I]</sup>AHP7の酸化LDLへの結合率はI-AHP7、I-AHP12、I-AHP22のいずれの添加においても添加濃度依存的に低下した。また、その阻害の程度はI-AHP7、I-AHP12が同程度であり、I-AHP22は約10倍高い阻害活性を認めた。なお、AHP7のアミノ酸配列をランダムにしたペプチドを用いた場合は<sup>[125I]</sup>AHP7の結合を全く阻害しなかった。

#### 3. 生体内安定性試験

WHHLM ウサギ、JW ウサギを用いて<sup>[125I]</sup>AHP7、<sup>[125I]</sup>AHP12、<sup>[125I]</sup>AHP22の体内安定性を調べたと

ころ、<sup>[125I]</sup>AHP7の投与30分後において未変化体は何れのウサギにおいても5%未満であった。これに対して、<sup>[125I]</sup>AHP12ではWHHLM ウサギで38%、JW ウサギで52%であり、<sup>[125I]</sup>AHP22ではWHHLM ウサギで59%、JW ウサギで67%であった。このことから、<sup>[125I]</sup>AHP7と比して<sup>[125I]</sup>AHP12、<sup>[125I]</sup>AHP22では生体内安定性が大きく改善していることが示された。

#### 4. 大動脈への放射能集積の比較

WHHLM ウサギを用いて<sup>[125I]</sup>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 $0.58 \pm 0.23 \%ID \times BW / mm^2 \times 10^2$ となり、既報の高分子プローブの投与3時間後の値(<sup>99m</sup>Tc-Annexin A5、 $0.64 \pm 0.18 \%ID \times BW / mm^2 \times 10^2$ )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、動脈筋肉比を調べたところ、WHHLM 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。<sup>[125I]</sup>AHP12はWHHLM ウサギ大動脈への放射能集積は<sup>[125I]</sup>AHP7と比べてわずかに低下し、一方で対照ウサギ大動脈においてはわずかに増加した。<sup>[125I]</sup>AHP22はWHHLM ウサギ大動脈への放射能集積は<sup>[125I]</sup>AHP7と比べて約30%程度増加したが、対照ウサギ大動脈における放射能集積も増加し、両者に有意差を認めなかった。

AHP22は疎水性の高いペプチド配列であることから非特異的な集積の低減を目的として、<sup>[111In]</sup>AHP22を設計・合成した。<sup>[111In]</sup>AHP22はWHHLM ウサギ大動脈において<sup>[125I]</sup>AHP22と同程度の放射能集積を認め、一方で、対照ウサギ大動脈における放射能は<sup>[125I]</sup>AHP22と比べて大きく低減した。このことから<sup>[111In]</sup>AHP22の酸化LDL標的プローブとしての有効性が示された。

#### D. 考察

Asp-Hemolysinの酸化LDL認識部位(YKDG配列)を基に7残基、12残基、22残基の放射性ペプチドプローブ<sup>[123/125I]</sup>AHP7、<sup>[123/125I]</sup>AHP12、<sup>[123/125I]</sup>AHP22、<sup>[111In]</sup>AHP22を設計・合成した。

これまでの検討により<sup>[125I]</sup>AHP7の生体内での不安定性が解決すべき課題として見出されたことから、併せて酸化LDLへの親和性の向上を目指して、本検討では新たに12残基、22残基プローブを評価することとした。具体的には<sup>[125I]</sup>AHP7の血中代謝産物として標識部位であるアミノ末端のLysが切り出された<sup>[125I]</sup>Lysが生じることが逆相HPLC分析により認められたことから、標識方法の変更とペプチド配列の長鎖化を考え、アミノ末端にCysを導入し<sup>[125I]</sup>IPMによる標識法に変更した。また、Asp-Hemolysinの酸化LDL結合配列から高い疎水性が推定されたことからプローブ全体としての疎水



性の低減を図るべくAHP22のアミノ末端に $[^{111}\text{In}]$ DTPAを導入した $[^{111}\text{In}]$ AHP22を新たに設計・合成した。なお、事前に、 $[^{125}\text{I}]$ AHP7の血中代謝産物である $[^{125}\text{I}]$ LysがWHHLMIウサギ大動脈に集積性を有していないことを示しており、生体内安定性の低い $[^{125}\text{I}]$ AHP7であっても動脈硬化病変における集積性にはプローブのペプチド配列が関与していることを示している。

$[^{125}\text{I}]$ AHP7のアミノ酸配列を内包し長鎖化した $[^{125}\text{I}]$ AHP12、 $[^{125}\text{I}]$ AHP22において、ウサギ生体内での安定性の大きな向上が認められた。このことから $[^{125}\text{I}]$ AHP7の分解に関与するのはアミノペプチダーゼの類であると推定された。

$[^{125}\text{I}]$ AHP22は $[^{125}\text{I}]$ AHP12と比べてわずかに高い生体内安定性を認めた。競合的阻害実験においてはI-AHP12はI-AHP7と同程度の阻害活性を示したのに対し、I-AHP22は10倍程度高い阻害活性を示した。 $[^{125}\text{I}]$ AHP22において、生体内安定性・親和性が共に向上したことにより、WHHLMIウサギ大動脈への高い放射能集積が引き起こされたものと考えられる。しかしながら、 $[^{125}\text{I}]$ AHP22は高い疎水性のため非特異的な大動脈集積も高く、対照ウサギとの有意差を認めなかった。そこで疎水性を低減する $[^{111}\text{In}]$ AHP22を合成し実際にWHHLMIウサギを用いて大動脈への放射能集積を調べたところ、WHHLMIウサギへの放射能集積は $[^{125}\text{I}]$ AHP22と同程度でありながら対照ウサギ大動脈への集積は大きく低減し、両者との間に有意差を認めた。

これらの結果は、 $[^{111}\text{In}]$ AHP22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、 $[^{111}\text{In}]$ AHP22は酸化LDL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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 佐治英郎, 小野正博, 天満敬, 上田真史, 木村寛之. 生体分子イメージングと創薬・臨床画像診断. トランスレーショナルリサーチを支援する遺伝子医学MOOK20号ナノバイオ技術と最新創薬応用研究 (橋田充・佐治英郎編) 2012:132-143.

2. Shimizu Y, Temma T, Sano K, Ono M, Saji H. Development of membrane type-1 matrix metalloproteinase-specific activatable fluorescent probe for malignant tumor detection. *Cancer Sci* 2011;102(10):1897-1903

3. Shimizu Y, Temma T, Hara I, Yamahara R,

Ozeki E, Ono M, Saji H. Development of novel nanocarrier-based near-infrared optical probes for in vivo tumor imaging. *J Fluoresc* 2011.

4. 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* 2011;13(6):1196-1203.

### 2. 学会発表

1. 西郡寛太郎, 天満敬, 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. 第43回日本動脈硬化学会, 2011年7月15日 (札幌)

2. 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を標的とした新規単鎖抗体の開発と核医学イメージングへの応用. 第9回次世代を担う若手のためのフィジカルファーマフォーラム, 2011年9月12日 (箱根)

3. 西郡寛太郎, 天満敬, 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剤の開発:酸化LDL結合ペプチドプローブに関する検討. 第51回日本核医学会学術総会, 2011年10月28日 (つくば)

4. 依田敬子, 天満敬, 西郡寛太郎, 小野正博, 佐治英郎. 不安定性動脈硬化核医学分子イメージングのための酸化LDL結合Asp-Hemolysin誘導ポリペプチドの開発. 第11回放射性医薬品・画像診断薬研究会, 2011年12月3日 (京都)

5. 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を標的とする核医学分子イメージングプローブ:  $^{111}\text{In}$ 標識抗MT1-MMP抗体誘導体. 日本薬学会第132年会, 2012年3月30日 (札幌)

6. Yoichi Shimizu, Takashi Temma, Isao Hara, Akira Makino, Ryo Yamahara, Eiichi Ozeki, Masahiro Ono, Hideo Saji. An Activatable Nanocarrier-Based Probe for In Vivo Near-Infrared Fluorescence Imaging of Tumor Biomolecules. 2011 World Molecular Imaging Congress, Sep 9<sup>th</sup> 2011 (San Diego)

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：  
不安定プラークへの選択的集積性に優れる化合物、特許出願済み（出願番号未受領）

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：

本分担研究では、糖尿病関連血管病である動脈硬化の発生・進展・不安定化に密接に関わる酸化 LDL、あるいは足病変の炎症反応における白血球の浸潤に関わる Formyl Peptide Receptor (FPR) を標的とした分子イメージングプローブ候補化合物をスクリーニングするための評価系構築を目的とする。今年度は他分担研究者によって開発された酸化 LDL 標的イメージングプローブ  $^{125}\text{I}$ -AHP7 の代謝物分析系を構築し、本プローブが  $^{125}\text{I}$ -IB-Lys に代謝されるものの、代謝物自体は酸化 LDL への親和性を有さず、病変部に集積した放射能は  $^{125}\text{I}$ -AHP7 に起因することを明らかとした。

A. 研究目的

本分担研究では、糖尿病関連血管病である動脈硬化の発生・進展・不安定化に密接に関わる酸化 LDL、あるいは足病変の炎症反応における白血球の浸潤に関わる Formyl Peptide Receptor (FPR) を標的とした分子イメージングプローブ候補化合物をスクリーニングするための評価系構築を目的とする。昨年度までに、既存の細菌性感染症イメージングプローブである  $^{123}\text{I}$ -FIAU の問題点（長い血中滞留性と低い生体内安定性）を抽出し、免疫系細胞走化性を指標とする FPR 標的のプローブ候補化合物のアゴニスト活性評価系を確立した。そこで今年度は、酸化 LDL を標的とした分子イメージングプローブ候補化合物の評価実験を行った。

B. 研究方法

標識合成

$^{125}\text{I}$ -AHP7 の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  $^{125}\text{I}$ -N-succinimidyl-3-iodobenzoate ( $^{125}\text{I}$ )-SIB) を用いた。標識前駆体 500  $\mu\text{g}$  に DMF : 0.2 M ホウ酸緩衝液 (pH = 7.8) = 1 : 1 混合溶液 40  $\mu\text{L}$  を加え、次いで  $^{125}\text{I}$  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  $\mu\text{L}$  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。 $^{125}\text{I}$ -IB-Lys は同様の方法により合成し、精製を行った。

血漿中代謝物分析

I-AHP7 のコールド標品を PBS に溶解し、正常ウサギより採取した血漿中で 37°C、2 時間インキュベートした。インキュベート終了後、2 倍量のメタノールを添加して振盪混和後遠心し、除タンパクを行った。上清をフィルターろ過後、HPLC と ESI-MS にて分析した。

HPLC 分析条件：Cosmosil 5C18-AR-II, 4.6  $\times$  150mm、流速 1 mL/min、UV 検出波長 220 nm、移動相  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA 含有) = 20/80  $\rightarrow$  95/5 (40 分)

酸化 LDL の調製

LDL 溶液 (1.82 mg/mL, 600  $\mu\text{L}$  PBS) を 37°C で硫酸銅 (14.3  $\mu\text{mol}$ ) 処理する事で酸化 LDL を得た。反応の停止は過剰量の EDTA 添加により行った。酸化 LDL 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。

酸化 LDL との結合性評価

$^{125}\text{I}$ -AHP7 および  $^{125}\text{I}$ -IB-Lys を LDL/酸化 LDL 溶液に添加し、4°C で 3 時間インキュベート後、遠心式フィルター (Microcon, Millipore) にアプライし、50 分間遠心分離 (4160 g) 後、PBS を加えて再度遠心分離した。次に、PBS を加えて Microcon を上下逆向きにして 10 分間遠心分離 (1000 g) を行い、タンパクを回収した。それぞれについて放射能を測定し、結合割合を、(逆遠心時のろ液の放射能) / (一回目の遠心時の放射能) + (Microcon の放射能 + 逆遠心時の放射能) で算出した。