

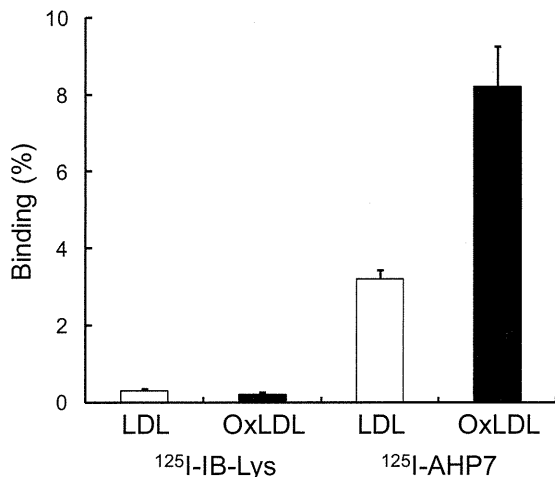
C. 研究結果

血漿中代謝物分析

I-AHP7のコールド標品の保持時間は24分であったが、2時間インキュベート後のメインピークの保持時間は23分であった。そのピークのMSを測定したところ、 $m/z = 377$ のピークが観察された。

酸化LDLとの結合性評価

^{125}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、 ^{125}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

I-AHP7のコールド標品をウサギ血漿中で2時間インキュベートしたところ、 $m/z = 377$ のフラグメントに代謝を受けることが明らかとなった。IB-Lysの分子量は375であることから、このフラグメントはIB-Lysであ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 ^{125}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。 ^{125}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 ^{125}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 ^{125}I -AHP7由来である可能性が示された。

E. 結論

^{125}I -AHP7は ^{125}I -IB-Lysへと代謝されるものの、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}I -AHP7に起因することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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..

2. 学会発表

- 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 ^{125}I -IPOS and ^{18}F -FMISO. 2011 World Molecular Imaging Congress. 2011.9.7, San Diego, USA.

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

モデル動物の作製に関する研究

研究分担者 塩見 雅志 神戸大学医学部附属動物実験施設 准教授

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、動脈硬化病変が破綻する要員について解析した。平成23年度は、WHHLMI ウサギを242匹生産し、研究代表者にWHHLMI ウサギを提供した。また、動脈硬化病変の破綻については、動脈硬化病変の不安定化が必要条件であるが、破綻するためには機械的な刺激が必要であることを明らかにした。

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、とくに動脈硬化病変の破綻について解析した。

（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。

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。

C. 研究結果

1. WHHLMIウサギの増産

116ペアの交配を実施し、56匹が出産（妊娠率82.4%）し、産仔数464匹（平均同腹産仔数5.2）、離乳仔242匹（平均2.8匹）を得た（離乳率55.6%）。

2. 動脈硬化病変の破綻に関する解析

1) 動脈硬化病変の構成成分の解析

他の実験で無処置で安楽死した10月齢以上のWHHLMIウサギについて、冠動脈病変について病理組織標本を作成した。冠動脈の切片は、HE染色、elastic van Gieson 染色、Azan 染色、RAM-11免疫染色、1A4免疫染色、MMP-9免疫染色、CD31免疫染色を実施した。

2. 動脈硬化病変の破綻

1) 無処置 WHHLMI ウサギの冠動脈病変の特性

線維性の動脈硬化病変はほぼ全例に認められた。ヒトの破綻した冠動脈病変で認められる病変中の大きな脂質蓄積部位を覆う線維性皮膜が部分的に菲薄化したThin-caped fibroatheromaは46%に認められた。これらのThin-caped fibroatheromaでは、MMP陽性のマクロファージが菲薄化した線維性皮膜に州属していたが、破綻した例は検出できなかった。

2) 機械的刺激による動脈病変の破綻の誘発

ノルエピネフリンとエルゴノビンの併用投与により、冠動脈スパズムを誘発し、冠動脈病変の破綻誘発を試みた。スパズムの誘発は、心電図、冠動脈造影で確認した。心電図は四肢誘導および胸部誘導でモニターした。

2) 冠動脈スパズムの誘発

冠動脈スパズムは77%のウサギで誘発した。心電図では、ST上昇/下降、T波の増高/逆転、R波の減高、心室性期外収縮が認められた。

3) 機械的刺激が冠動脈病変に及ぼす影響の解析

冠動脈スパズムが20分以上継続したウサギについて、ニトログリセリンで回復させた後、安楽死し、冠動脈病変について病理組織学および免疫組織学的に解析した。

3) スパズム誘発による冠動脈病変への影響

スパズムの誘発により83%のウサギで冠動脈病変に影響が認められた。内皮細胞の損傷が61%、

動脈硬化病変からのマクロファージの噴出が59%、冠動脈病変の破綻が9%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242匹の一部を研究代表者に提供し、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）」の推進に貢献した。

冠動脈病変の破綻については、ヒトで破綻しやすい病変といわれているThin-capped fibroatheromaは、WHHLMIウサギでは46%で認められ、Thin-capped fibroatheromaでは、MMP陽性のマクロファージが菲薄化した線維性皮膜に集属していたが、破綻した例は認められなかった。この結果は、MMP陽性のマクロファージは動脈硬化病変の不安定化には関与するが、動脈硬化病変の破綻には直接関係しないことを示唆している。冠動脈スパズムの誘発によって、一部のThin-capped fibroatheromaが破綻した。この結果は、冠動脈病変の破綻には機械的な刺激が必要であることを示唆している。

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242匹生産することができ、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）」の遂行のために京都大学(研究代表者)にWHHLMIウサギを供給することができた。また、冠動脈病変の破綻には、冠動脈病変の不安定化のみでは不十分であり、スパズム等の機械的な刺激が直接的な原因であることが示唆された。

F 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwata A, Miura SI, Zhang B, Imaizumi S, Uehara Y, Shiomi M, Saku K: Antiatherogenic effects of newly developed apolipoprotein A-I mimetic peptide/phospholipid complexes against aortic plaque burden in Watanabe-heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*. 2011 Jun 1. [Epub ahead of print]
- 2) Takahashi S, Ito T, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Takahashi M, Takahashi M, Ishida T, Ishida T, Hirata K, Yamamoto TT, Iwasaki T, Hattori H, Shiomi M:

Species differences of macrophage very low-density-lipoprotein (VLDL) receptor protein expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 22;407(4):656-62.

- 3) Kobayashi T, Ito T, Shiomi M: Roles of the WHHL rabbit in translational research on hypercholesterolemia and cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:406473.
- 4) Shiomi M, Kobayashi T, Kuniyoshi N, Yamada S, Ito T: WHHLMI rabbits with mesenteric fat accumulation are a novel animal model for metabolic syndrome. *Pathobiology* 2012 (in press)

2. 学会発表

- 1) Kobayashi T, Ito T, Ishida T, Nitta N, Sonoda A, Kuniyoshi N, Yamada S, Murata K3, Hirata K, Shiomi M: CORONARY SPASM INJURES CORONARY LESIONS OF WHHLMI RABBITS. 9th International Congress on Coronary Artery Disease, Oct 23-26, 2011 (Venice, Italy)
- 2) Kobayashi T, Ishida T, Nitta N, Sonoda A, Ito T, Kuniyoshi-Hirayama N, Yamada S, Kobayashi S, Miyagawa K, Murata K, Hirata K, Shiomi M: WHHLMI Rabbits with Coronary Lesions are a good Animal Model for Coronary Spastic Angina. 4th International Rabbit Biotechnology Meeting, June 30-July 1, 2011 (Budapest, Hungary)
- 3) Ito T, Yamada S, Kuniyoshi-Hirayama N, Shiomi M: Relation of Matrix Metalloproteinases (MMPs)-Positive Macrophages to Coronary Plaque Fragility and Coronary Arterial Outward Remodeling. 79th EAS Congress, June 26-29, 2011 (Gothenburg, Sweden)

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 アシスタントマネージャー

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-Leprdb/Leprdb 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. 健常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. Et al. , *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.

2. 脂肪酸結合タンパク質の FABP4 の阻害はプラークを縮小化し、血糖値やインスリン抵抗性の低減する効果を有する

2-1. Furuhashi M, et al., "Treatment of diabetes

and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid binding protein aP2.” *Nature* vol447, 21/June 2007.

2-2. Suhre K, et al., Identification of a potential biomarker for FABP4 inhibition: the power of lipidomics in preclinical drug testing. *J Biomol Screen*. 2011 Jun;16(5):467-75.

3. 脂肪酸結合タンパク質の FABP4 は、動脈硬化病変の不安定性に、マクロファージ浸潤と炎症を反映して関連する

3-1. Agardh HE, et al., Expression of fatty acid-binding protein 4/aP2 is correlated with plaque instability in carotid atherosclerosis. *J Intern Med*. 2011 Feb; 269(2):200-10.

4. 脂肪酸結合タンパク質の FABP4 は、虚血性脳梗塞患者の頸動脈プラークの不安定性に関連する

4-1. Holm S, et al., Fatty Acid binding protein 4 is associated with carotid atherosclerosis and outcome in patients with acute ischemic stroke. *PLoS One*. 2011;6(12):e28785.

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。また、新たな標的分子として検討すべき生体分子として、脂肪酸結合タンパク質のFABP4が挙げられると判断される。FABPはマクロファージにも発現するため、動脈硬化巣で問題となる不安定プラークに特徴的なマクロファージの浸潤を評価しうる標的分子であると考えられる。FABP4標的阻害剤が動脈硬化巣の改善に効果を示す事が確認され、画像化のための標的分子としても可能性を十分に考えることができると判断される。

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、およびマクロファージに集積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、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

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 |
|---|------------------------------|--------------|---|-------------|-----|------|---------|
| 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 | 橋田充、佐治 英郎 | 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 | メディカル ドゥ | 日本 | 2012 | 132-143 |

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, 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. | Phenyldiazenyl 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} 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 iodophenyl)ethyl 2-acetamido-2-deoxy- β - D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β - D-glucopyranoside, and preparation of its analogs having different lengths of alkyl chains instead of ethyl group: Acceptor substrates of n-acetylglucosaminyltran sferase v for in vivo imaging. | Heterocycles | 83 | 2779-2802 | 2011 |
| Ogawa K, Saji H. | Advances in drug design of radiometal-based imaging agents for bone disorders. | Int J Mol Imaging. | 53 | 7687 | 2011 |
| 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 β -amyloid plaques in the brain. | Bioorg Med Chem Lett. | 21(21) | 6519-22 | 2011 |

| | | | | | |
|---|--|-----------------------|---------|----------|------|
| 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 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. | 102(11) | 2090-6 | 2011 |
| 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. | 102(10) | 1897-903 | 2011 |
| 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 synthetic substrate for a sensitive N-acetylglucosaminyltransferase V radioassay. | Bioorg Med Chem. | 19(14) | 4312-21 | 2011 |
| Cui M, Ono M, Kimura H, Liu B, Saji H. | Novel quinoxaline derivatives for in vivo imaging of β -amyloid plaques in the brain. | Bioorg Med Chem Lett. | 21(14) | 4193-6 | 2011 |
| Cui M, Ono M, Kimura H, Liu B, Saji H. | Synthesis and evaluation of benzofuran-2-yl(phenyl)methanone derivatives as ligands for β -amyloid plaques. | Bioorg Med Chem. | 19(13) | 4148-53 | 2011 |
| Ono M, Saji H. | SPECT Imaging Agents for Detecting Cerebral β -Amyloid Plaques. | Int J Mol Imaging. | 67 | 5432 | 2011 |
| 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. | 19(10) | 3216-20 | 2011 |
| 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 β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. | Nucl Med Biol. | 38(3) | 313-20 | 2011 |
| 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. | 495(3) | 210-5 | 2011 |

| | | | | | |
|--|---|--|--------|----------|------|
| Ono M, Cheng Y, Kimura H, Cui M, Kagawa S, Nishii R, Saji H. | Novel ¹⁸ F-labeled benzofuran derivatives with improved properties for positron emission tomography (PET) imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. | J Med Chem. | 54(8) | 2971-9 | 2011 |
| Cui M, Ono M, Kimura H, Liu B, Saji H. | Synthesis and structure-affinity relationships of novel dibenzylideneacetone derivatives as probes for β -amyloid plaques. | J Med Chem. | 54(7) | 2225-40 | 2011 |
| 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. | 7(5) | 638-46 | 2011 |
| 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. | 13(6) | 1196-203 | 2011 |
| 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. | 85(4) | 347-53 | 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. | 13(5) | 1003-10 | 2011 |
| Iwata A, Miura S, Zhang B, Imaizumi S, Uehara Y, Shiomi M, Saku K. | Antiatherogenic effects of newly developed apolipoprotein A-I mimetic peptide/phospholipid complexes against aortic plaque burden in Watanabe-heritable hyperlipidemic rabbits. | Atherosclerosis. | 218(2) | 300-7 | 2011 |
| Takahashi S, Ito T, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Takahashi M, Takahashi M, Ishida T, Ishida T, Hirata K, Yamamoto TT, Iwasaki T, Hattori H, Shiomi M. | Species differences of macrophage very low-density-lipoprotein (VLDL) receptor protein expression. | Biochem Biophys Res Commun. | 407(4) | 656-62 | 2011 |
| Kobayashi T, Ito T, Shiomi M. | Roles of the WHHL rabbit in translational research on hypercholesterolemia and cardiovascular diseases. | J Biomed Biotechnol. | 2011 | 406473 | 2011 |
| Ono M, Ohgami M, Haratake M, Saji H, Nakayama M. | A novel bifunctional chelating agent based on bis(hydroxamamide) for ^{99m} 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 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 b-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. | 118(3) | 338-44 | 2012 |
| 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 β-amyloid plaques in Alzheimer's brains. | J Med Chem. | 55(5) | 2279-86 | 2012 |
| 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. | 159(2) | 181-8 | 2012 |
| Kimura H, Mori D, Harada N, Ono M, Ohmomo Y, Kajimoto T, Kawashima H, Saji H. | Microwave-assisted synthesis of organometallic complexes of ^{99m} Tc(CO) ₃ and Re(CO) ₃ : its application to radiopharmaceuticals. | Chem Pharm Bull (Tokyo). | 60(1) | 79-85 | 2012 |
| 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. | 22(2) | 719-27 | 2012 |
| Shiomi M, Kobayashi T, Kuniyoshi N, Yamada S, Ito T. | WHHLMI rabbits with mesenteric fat accumulation are a novel animal model for metabolic syndrome. | Pathobiology. | | | 2012 印刷中 |

1. 生体分子イメージングと創薬・臨床画像診断

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は、生体での細胞/分子レベルの生理的・生化学的・分子生物学的なプロセス（事象）の空間的・時間的分布をインビボで画像化し、評価する方法であり、医薬品開発、臨床画像診断、さらに広くライフサイエンス研究などへの貢献が期待されている。生体分子イメージングにはいくつかの方法があるが、その中で、PET、SPECTなどの放射線を利用する方法は生体透過性、感度および定量性に優れる特徴をもつ。本稿では、この放射線を利用した生体分子イメージングの基盤となる、標的分子の分布や変化を体外から評価・イメージングできるPET/SPECT分子イメージング用分子プローブの創製とその医薬品開発、臨床画像診断への応用展開に関して、われわれの最近の研究成果を含めながら述べる。

はじめに：生体分子イメージングとは

生体は多くの分子が相互作用することによって多様な機能を営んでいる。したがって、生体の機能を解明するためには、生きて機能している状態（インビボ）の生体を対象として、その中で起こっている分子レベルでの作用を解析することが必要である。

最近進歩が著しい生体画像工学と分子・細胞生物学の成果を融合させて、生体での細胞/分子レベルの生理的・生化学的・分子生物学的なプロセス（事象）の空間的・時間的分布をインビボで画像化し、評価する方法が開発されつつある。この領域は「生体分子イメージング」と呼ばれており、ライフサイエンスの基礎研究、生体機能や病因の解明研究、臨床画像診断、生体での薬効評価、創薬研究などの分野への貢献が期待されている¹⁾²⁾（図1）。すなわち、生体分子イメージング研究

は生物学研究を具現化することによって新たな切り口で生物の体内現象を読み解く、今世紀の医学生物学の1つの大きな方向性を開拓する方法論として、活発に研究が行われている。

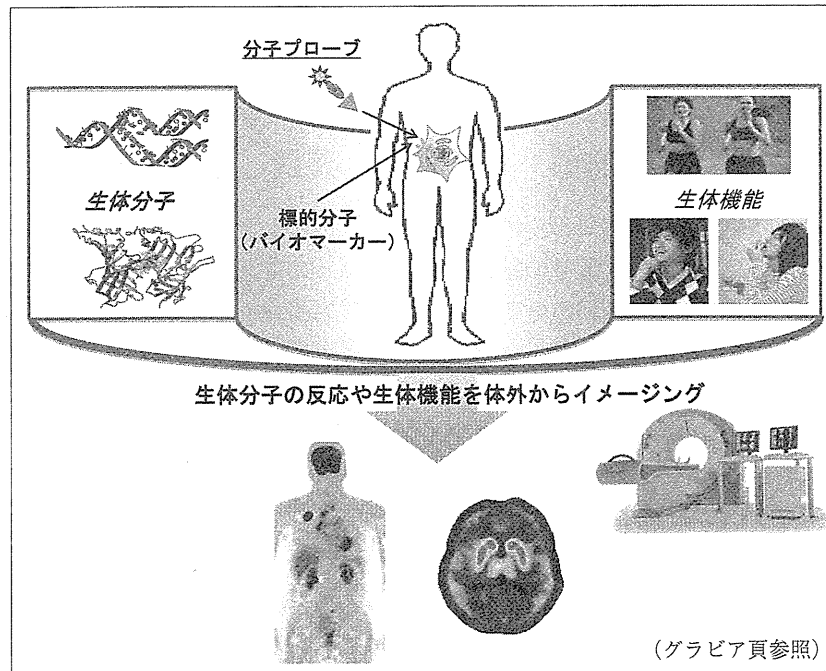
この生体分子イメージングには、PET（陽電子放射型断層撮影 positron emission tomography）、SPECT（単一光子放射断層撮影 single photon emission computed tomography）などの放射線を利用する方法（核医学分子イメージング）、核磁気共鳴現象を利用するMRI（磁気共鳴映像法 magnetic resonance imaging）、可視光、蛍光、近赤外光などの光を利用する方法（光イメージング）が主な方法として用いられている。

本稿では、放射線であるガンマ線やX線のもつ高い物質透過性、感度および定量性を活かしたPET/SPECTイメージング（分子核医学イメージング）を対象とした生体分子イメージング法の開発、特に分子プローブの創製と医薬品開発、臨床画像

key words

生体分子イメージング、分子プローブ、PET、SPECT、分子設計法、マイクロドーズ臨床試験、画像バイオマーカー、機能性ユニット結合型分子プローブ、中枢ニコチン受容体、脳βアミロイド、膵 glucagon-like peptide-1 受容体、HIF-1α

図① 生体分子イメージングの概要



診断への応用展開に関して、概要とわれわれの最近の研究成果のいくつかについて述べる。

I. 生体分子イメージングの医薬品開発、臨床画像診断への応用

1. 薬の生体内薬物動態評価

薬自身の標識体を用いて、その体内分布挙動を調べることができれば、薬の分布・動態に関するファーマコダイナミック（薬力学）、代謝プロファイルなどの情報が直接得られるとともに、作用点が明確でない場合には薬の作用点に関する情報も得ることができる。これらの情報は第1相臨床試験に入る前に、医薬品開発の最終目標であるヒトでの薬効や安全性を裏づける基礎データを直接確認することができるため、新薬候補化合物の選択の意思決定、薬の最適投与計画の設定などに有効な情報を与えることができ、医薬品開発が時間と費用の観点から効率的に進むことが期待されている。このために、候補化合物自身のPET/SPECT核種標識体を合成し、それが物質的に微量なものであることを利用して、これをヒトに投与し、その体内動態情報を得る方法が用いられて

いる。この方法はマイクロドーズ臨床試験（ヒューマンマイクロドージング）と呼ばれ、2008年に厚生労働省からこの試験のためのガイダンスが出され、開始されている。

2. 製剤の生体内薬物動態評価

核医学イメージング法によりDDSを評価する方法はdrug delivery imaging (DDI)と呼ばれている。この方法は、上記の薬自身の標識体を用いる代わりに、製剤の標識体を用いるものであり、DDSを含めて、製剤の分布動態の評価を可能とする。特に、現在ナノ材料を用いたDDSが注目されていることも関係して、従来よりも微細なレベルでの動態に関する情報を得ることができる分子イメージング法の利用が注目される場所である。

3. 作用点への薬の分布、作用状態のインビボ評価

薬は、その作用点である酵素、トランスポーター、レセプターなどと相互作用して、その薬理効果を示す。そのため、対象となる酵素、トランスポーター、レセプターなどへの分布・結合などの分子間相互作用のインビボでの測定は、薬の作用をインビボ、分子レベルで評価でき、それは薬物の効果を理解し、また最適投与量を設定するうえ

で非常に有効な情報となる。

そこで、薬理効果を起こす標的となる分子と特異的に相互作用する分子プローブを指標（画像バイオマーカー）として用いれば、医薬品あるいはその候補化合物を投与した場合に、それらが分子プローブと標的分子との結合を競合し、その結果、分子プローブの標的分子存在部位での集積率が低下するので、その低下状態から医薬品あるいはその候補化合物の標的分子への結合の有無、さらにその結合状態を知ることができる。これにより、薬の受容体占有率の把握、薬効評価、さらには新しい標的部位の発見などにもつながることが期待される。

4. 生理機能のインビボ評価

対象とする生理・生化学・薬理学的な反応に関与する放射性化合物を解析用プローブとして用いれば、その体内挙動を測定することによって、関与する生体機能を定量的に評価できる。これは後述の核医学画像臨床診断の基本であるが、このプローブを指標（画像バイオマーカー）として用いることにより、薬投与時の生体機能の変化を測定でき、薬による治療効果をインビボで直接定量的に評価できる。

5. 疾患の質的診断のための臨床画像診断

対象とする生理・生化学・薬理学的な反応に関与する放射性化合物を解析用プローブとして用いれば、その体内挙動を測定することによって、関与する生体機能を定量的に評価でき、その変化から疾患の質的診断（機能診断）が可能となる。臨床画像診断において、X線診断、MRI、超音波診断などの形態的診断法とは異なり、この機能診断を可能とすることが核医学画像診断法の特徴である。

II. 生体分子イメージングプローブの創製

1. PET/SPECT分子イメージング用放射性分子プローブの基本的条件

生体分子イメージングの研究を展開していくためには、①イメージングの標的となる、生理作用および病態に関わる生命現象のプロセスに重要な役割を果たす分子（バイオマーカー）の探索、②この標的に特異的に相互作用して、標的分子の分

布や変化を体外からイメージングできる化合物（分子プローブ）の創製、③生体内での分子プローブの分布や変化を高感度・高解像力でイメージングできるイメージング機器の開発の3つが基本構成要素として必要であり、各基本構成要素にはそれぞれ必要条件がある。

その中で、分子プローブ、特にPET/SPECT核医学イメージングのための分子プローブに対する基本的な必要条件には、①短半減期で適切なエネルギーをもつガンマ線（X線）のみ放出する核種を標識核種とすること、②イメージングの対象となる標的への高い親和性・特異性を有すること、③放射性核種の半減期に応じて、短時間内に合成でき、収率（放射化学的収率）が高いこと、④高い検出感度が得られ、生体への生化学・薬理作用を発現しないように比放射能が高いこと、⑤放射性核種の半減期に応じて、短時間内に標的部位への移行を達成すること、⑥標的部位以外の部位にはできる限り分布または残存せず、高い標的/非標的比が得られること、⑦標的の評価対象機能を分布動態のデータから定量評価ができること、などがある。

基本となる放射性核種に関しては、体外からの効率よい放射能検出と被験者への被曝低減の観点から、体外から高感度で検出できるガンマ（X）線を放出し、生物学的影響の強い α 線や β 線を放出しないこと、信頼性あるデータが収集できる範囲内で半減期は短いこと、高感度測定に適した放出放射線のエネルギーを有すること（SPECT：100～200keV、PET：511keV）が基本条件である。実際に核医学イメージングに用いられている放射性核種は、上記の基本条件に加え、元素の特性、化合物合成の時間的な観点、使用現場での製造を含めた入手の容易性・経済性などから、 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を中心に、 ^{111}In 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga などが対象となっている（表1）。ただし、これら核種は、それぞれの元素の性質が異なるため、分子プローブを設計するうえでは、それぞれの核種の特徴を生かしたプローブの創製が必要である。

2. 機能性ユニット結合型分子プローブ

従来のイメージングプローブという概念は、目的とする性質を有する化合物の構成元素の1つを

表① 放射性分子プローブに用いられている主な放射性核種の物理的性質

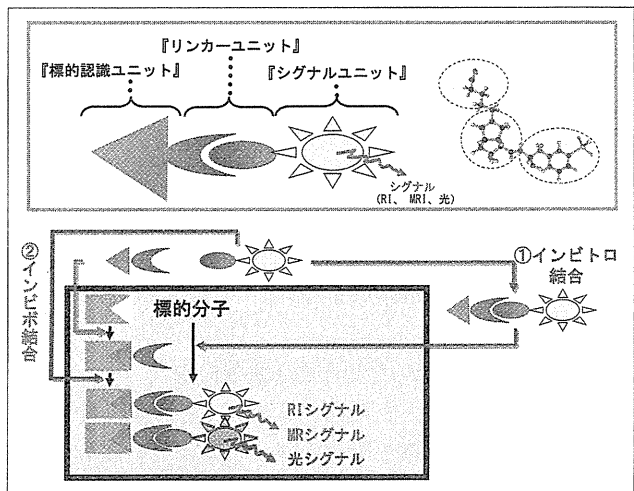
| 核種 | 半減期 | 崩壊形式 | 主なγ線エネルギー (keV) | 断層画像撮影装置 |
|-------------------|--------|---------------------|-----------------|----------|
| ¹¹ C | 20.4 m | β ⁺ | 511 | PET |
| ¹³ N | 9.96 m | β ⁺ | 511 | PET |
| ¹⁵ O | 122 s | β ⁺ | 511 | PET |
| ¹⁸ F | 110 m | β ⁺ | 511 | PET |
| ⁶⁴ Cu | 12.7h | β ⁺ , EC | 511 | PET |
| ⁶⁷ Ga | 77.9 h | EC | 93,185,300 | SPECT |
| ^{99m} Tc | 6.01 h | IT | 141 | SPECT |
| ¹¹¹ In | 2.81 d | EC | 172,247 | SPECT |
| ¹²³ I | 13.2 h | EC | 159 | SPECT |
| ²⁰¹ Tl | 73.6 h | EC | 135,167* | SPECT |

β⁺: β⁺壊変 (ポジترون壊変), EC: 軌道電子捕獲, IT: 核異性体転移, s: 秒, m: 分, h: 時間, d: 日
*測定の対象となる放射線は Hg の特性 X 線 (69,70,80 keV) である。

放射性同位元素で置換したという、単に標識化合物として捉えられるのが一般的であった。これに対しわれわれは、イメージングプローブは新たに設計する分子であり、合理的に効率よく設計できるものであるという観点に立って、1つのプローブ(分子)を「標的認識ユニット」、「リンカーユニット」、「シグナルユニット」の各ユニットの集合体として捉える「機能性ユニット結合型分子プローブ」という新概念に基づいて分子プローブ設計を行っている⁹⁾(図②)。この方法では、「標的認識ユニット」、「シグナルユニット」に対して、それぞれイメージング対象に発現している標的分子、利用する撮像装置に応じて、最適な各ユニットを選択することで、種々の標的分子およびイメージング装置に対応可能な汎用性の高い分子プローブ設計が可能となる。さらに、血液を含めて非標的臓器・組織からのシグナルのクリアランスが遅い場合、あるいは標的分子、組織への移行が遅い場合には、「標的認識ユニット」と「クリアランスの速いシグナルユニット」のカップリングをインビボで行うことにより体内動態を制御し、シグナルユニット分子の投与早期での高コントラスト画像の取得を実現することもできる。

この分子設計の概念は、最近注目されている抗体などのタンパク質や生理活性ペプチドを母体と

図② 機能性ユニット結合型分子プローブの概念



する分子プローブの設計に有効であることは勿論、概念として有機低分子化合物の場合にも有効である。以下に4つの代表的な例を示すが、それ以外に、この分子設計の概念を用いて、不安定性動脈プラークや腫瘍などを対象とした低分子から抗体などの高分子までの多くの分子プローブの開発にも成功している⁹⁾⁻¹⁵⁾。

3. 生体分子イメージングプローブの開発

(1) 脳内ニコチン様アセチルコリン受容体 (nAChR) イメージング用放射性分子プローブの創製と nAChR のインビボ解析

脳内に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (ニコチン受容体: nAChR) は、記憶・学習・

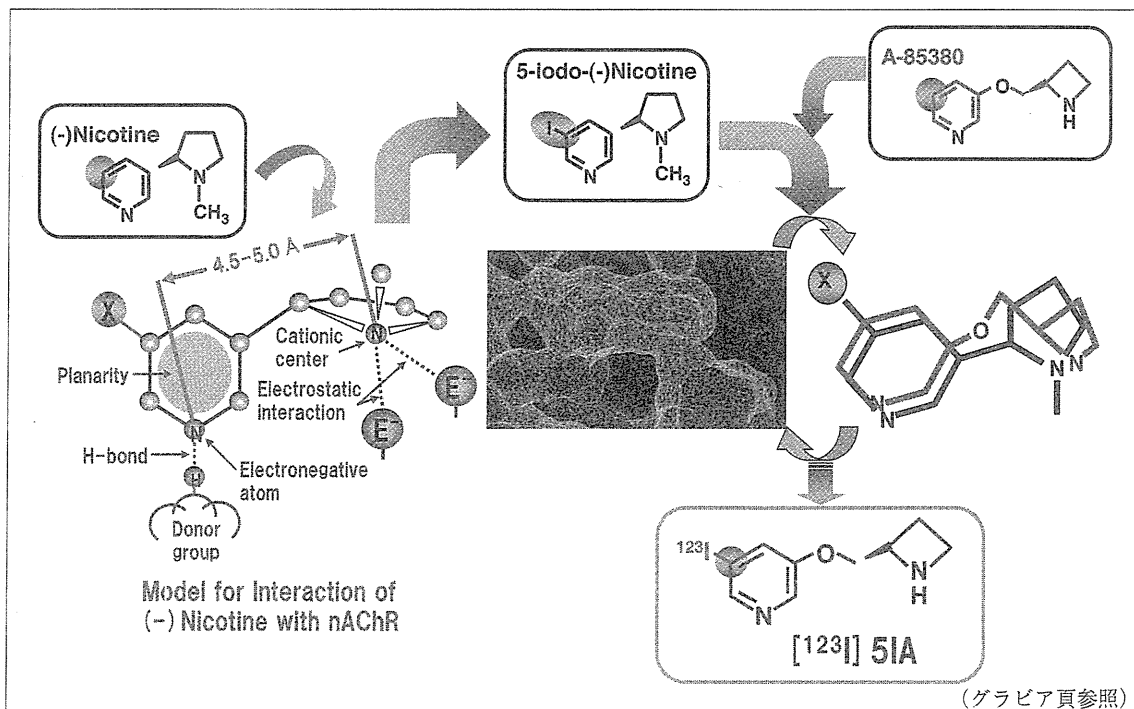
認知などの高次脳機能に関与するのみならず、抗不安・鎮痛・神経保護作用発現にも関わることから、脳nAChの果たす生理機能、脳神経疾患や喫煙との関連性などを解明するために、ヒトの脳内nAChRの非侵襲的な生体イメージング解析に興味をもたれている。

そこでわれわれは、上記のII, 1に記した条件を考慮し、さらにニコチンおよびヨード誘導体（ヨードニコチン）に関するnAChR親和性の検討、脳移行性を含めた体内分布動態に関する検討、ニコチン、ヨードニコチン、A85380の三次元的な構造の重ね合わせ、それらの化合物のnAChRへの結合に関する立体化学的考察などをもとに、A85380を母体化合物（標的認識ユニット）として、そのピリジン環の5位の炭素の部分（ポケット）があることを認め、このA85380のピリジン環の5位の炭素に¹²³I（シグナルユニット）をC-I結合形成（リンカーユニット）により導入した5-iodo-A85380 (5IA)を設計した（図⑤）。そこで、5IAを合成し、そのnAChRへの親和性をイ

ンビトロのラジオレセプターアッセイで評価したところ、5IAはA-85380と同等、ニコチンよりも10倍程度高い親和性を有することを認めるとともに（Ki(nM)：A-85380=0.38, 5IA=0.37, ニコチン=2.71）、その結合は $\alpha_4\beta_2$ サブタイプへの選択性にも優れることを見出した。さらに、トリプチルス誘導体と¹²³I]NaIとの反応により、高い比放射能体（数Ci・mol以上）を高収率で合成することに成功した¹⁶⁾。

生成した¹²³I]5IAをマウス、ラットおよびコモンマーモセットに投与して体内での分布を検討した結果、種差なく、脳へ高く取り込まれ、また脳内ではnAChR密度の高い視床への集積が最も高く、受容体密度の低い小脳への集積が最も低くなり、脳内での局所集積量はnAChRの密度分布と高く相関することを認めた。そこで安全性を確かめた後、健常人に¹²³I]5IAを投与して脳のイメージングを行ったところ、投与後速やかに血流に応じて脳内に移行し、その後時間とともにnAChRに結合していない部分から放射能が消失し、次第にニコチン受容体密度に応じたイメージとなり、

図⑤ 脳ニコチン様アセチルコリン受容体 (nAChR) イメージング用放射性分子プローブ [¹²³I]5IA の分子設計



投与約1時間以降に明瞭な nAChR のイメージを得ることに成功した¹⁷⁾⁻¹⁹⁾ (図④ A)。

この放射能の脳内各部位での集積を定量解析するために「血管」と「脳の各領域」にコンパートメントを設定し、血中放射能と脳の各領域の放射能のデータをもとに2コンパートメント2パラメータモデルに基づく速度論解析を行い、¹²³I]5IA の分布容積を算出した。その結果、イメージングから定量解析して得られた分布容積 (k_1/k_2) は剖検脳で測定されたヒト脳ニコチン受容体密度と非常に高い正の相関を示し、¹²³I]5IA イメージの定量解析により求めた分布容積はニコチン受容体密度を定量的に評価できることが示された¹⁸⁾ (図④ B)。

喫煙が与えるニコチン受容体密度への影響については、動物実験や剖検脳での検討において、喫煙によりニコチン受容体密度が増加し、禁煙によって元のレベルに回復することが報告されているが、生きたヒトでの変化についてはこれまで明らかとなっていなかった。そこで、喫煙者に対して

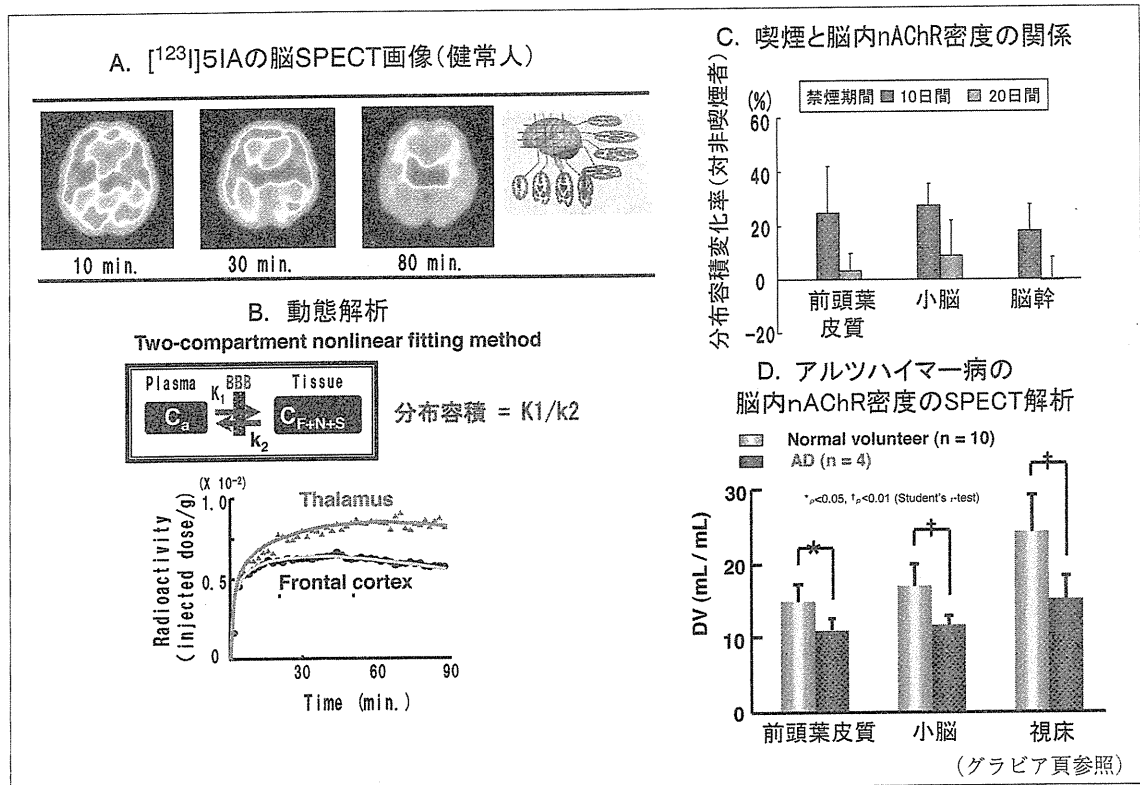
脳の ¹²³I]5IA の核医学イメージングを行い、得られたデータに基づいて上記のコンパートメント解析により喫煙者の脳内ニコチン受容体密度を定量し、非喫煙者と比較した。その結果、喫煙者(1日平均15本以上、喫煙歴6年以上)では脳内ニコチン受容体密度が約25%増加していること、また3週間程度の一定期間の禁煙により脳内ニコチン受容体密度は非喫煙者と同等のレベルに戻ることを見出した¹⁹⁾ (図④ C)。

また、¹²³I]5IA を用いて、疾患での AChR の変化についても検討し、アルツハイマー病では視床を中心に脳全体で、またパーキンソン病では脳幹や前頭葉を中心に AChR の密度が低下していることを見出した²⁰⁾ (図④ D)。

(2) 脳 β アミロイドイメージング用分子プローブの創製

近年の急速な高齢化に伴い、アルツハイマー病 (AD) をはじめとする認知症患者の増加が大きな社会問題の1つになっている。現在、ADの確定

図④ ¹²³I]5IA によるヒトでの nAChR イメージングとそれによる nAChR 機能の *in vivo* 解析



診断は死後脳の病理学的所見に委ねられており、重篤な脳障害が生じる前の早期段階でADを診断することは困難となっている。このような状況下、ADの早期診断に対する社会的要求は高く、その早急な開発が望まれている。

ADの特徴的病理学的変化として、老人斑の沈着と神経原線維変化の出現が知られている。前者の主構成成分は β シート構造をとったアミロイド β タンパク質(A β)であり、後者は過剰リン酸化されたタウタンパク質である。特にA β の蓄積はAD発症過程の最も初期段階より始まることから、脳内A β の検出がADの早期診断につながる可能性がある。さらにA β 生成・沈着の過程と神経細胞毒性発現との関係についてもまだ不明である。そこで、このようなAD発症とA β との関係の解明、非侵襲的かつ信頼性と再現性に優れたADの早期診断、さらにはA β 生成・沈着阻害あるいはA β 除去を標的とするAD治療薬開発のための画像バイオマーカーとしての利用などを目的として、AD脳内に沈着する老人斑アミロイドを体外から検出する放射性分子プローブの開発を計画した。

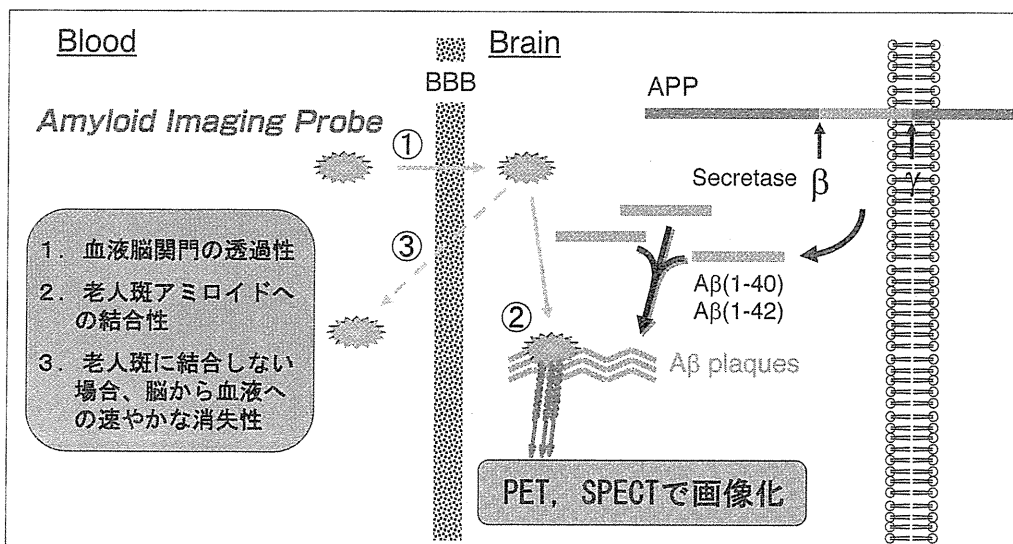
脳内に蓄積したA β を体外より画像化するための放射性分子プローブには、①生体内に投与されたプローブが血液脳関門を透過し、脳組織内へ移

行すること、②脳移行後にA β へ選択的に結合すること、③A β の画像精度を向上させるために、脳内移行後に正常脳部位から血液中に可能な限り速やかに消失すること、が必要である(図⑤)。

これまでにA β 蛍光染色試薬であるコンゴレッドおよびチオフラビンTの誘導体を中心に検討され、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{GE-067}$ (flutemetamol)、 $[^{18}\text{F}]\text{BAY94-9172}$ (florbetaben)、 $[^{18}\text{F}]\text{AV-45}$ (florbetapir)が開発され、臨床検討がなされている。

われわれも、チオフラビンTの類似構造を有するフェニルベンゾフラン、自然界に広く存在するフラボノイドを基本骨格とするPET用分子プローブの開発評価を行ってきた^{21) - 28)}。その結果、これらの化合物はいずれもA β への高い結合性とマウス脳への移行性を示した。さらに、A β 結合性と動態に関する最適化研究を行った結果、ピリジルベンゾフランを母核(標的認識ユニット)とする ^{18}F 標識プローブ($[^{18}\text{F}]\text{FPYBF-2}$)(^{18}F はシグナルユニット)の開発に成功し、それは現在最も有効性が高いと評価されている $[^{18}\text{F}]\text{AV-45}$ と同等あるいはそれ以上の性質を有することを見出した²⁸⁾(図⑥A)。すなわち、 $[^{18}\text{F}]\text{FPYBF-2}$ は、A β (1-42)凝集体を用いた結合実験を行ったところ、阻害定数が2.4 nMと非常に高い結合性を有することが示された。 ^{18}F 標識を行い、正常マウスにおける体内放

図⑤ 脳 β アミロイドイメージング用分子プローブの分子設計の条件



射能分布を検討したところ、投与早期の高い脳移行性とその後の速やかなクリアランスを示した。さらに、アミロイド前駆タンパク質を過剰発現させたトランスジェニックマウス (Tg2576マウス) に投与後、脳切片を作製し、切片上の放射能をオートラジオグラフィ法により検出したところ、野生型マウスには確認されない多くの放射能スポットが観察された。また、この放射能スポットは、A β の蛍光染色試薬であるチオフラビンSの蛍光染色位置とも一致したことから、 $[^{18}\text{F}]\text{FPYBF-2}$ は生体内に静脈投与後、A β へ結合することが明らかとなった (図⑥B)。また、AD患者の脳切片を用いたインキュベーション実験でも同様な結果が得られた (図⑥C)。これらの結果から、今後本プローブの臨床展開が期待される。

(3) 膵 β 細胞イメージング用放射性分子プローブの創製

日本国内の糖尿病患者とその予備群は2006年の段階で合計1870万人と推計されており、罹患者数は増加し続けている。現在のところ、糖尿病は空腹時高血糖と経口糖負荷試験 (OGTT) での慢性高血糖の持続を確認して診断されているが、血糖

値の判定そのものは糖尿病という病気の診断とは異なるとされ、境界型と呼ばれる値を示す場合、糖尿病と確定的な診断が下せず、早期診断ができない。さらに近年、軽度の高血糖時にインスリンを分泌する膵 β 細胞量が減少していること、および膵 β 細胞は過度の障害を受けない限り再生する機構があることが報告されており、膵 β 細胞数が減りはじめた直後にそれを捉え、適切な介入を行うことができれば、膵 β 細胞数の回復・維持による糖尿病発症予防が可能となりうる。

そこでわれわれは、京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科の稲垣暢也教授と共同して、膵 β 細胞イメージング様分子プローブの開発を試みた。このために、イメージングの標的として、膵 β 細胞で高密度に発現し、膵臓の近傍でイメージング上の障害となる肝臓や胃での発現がみられない glucagon-like peptide-1 受容体 (GLP-1R) を選択し、この GLP-1R に高い親和性が報告されているペプチド性リガンドである Exendin-4 を母体 (標的認識ユニット) とする ^{18}F 標識 Exendin (9-39) 誘導体を分子プローブとして設計することとした²⁹⁾ (図⑦)。すなわち、Ex (9-39) において、ア

図⑥ $[^{18}\text{F}]\text{FPYBF-2}$ (分子プローブ) による脳 β アミロイドイメージング

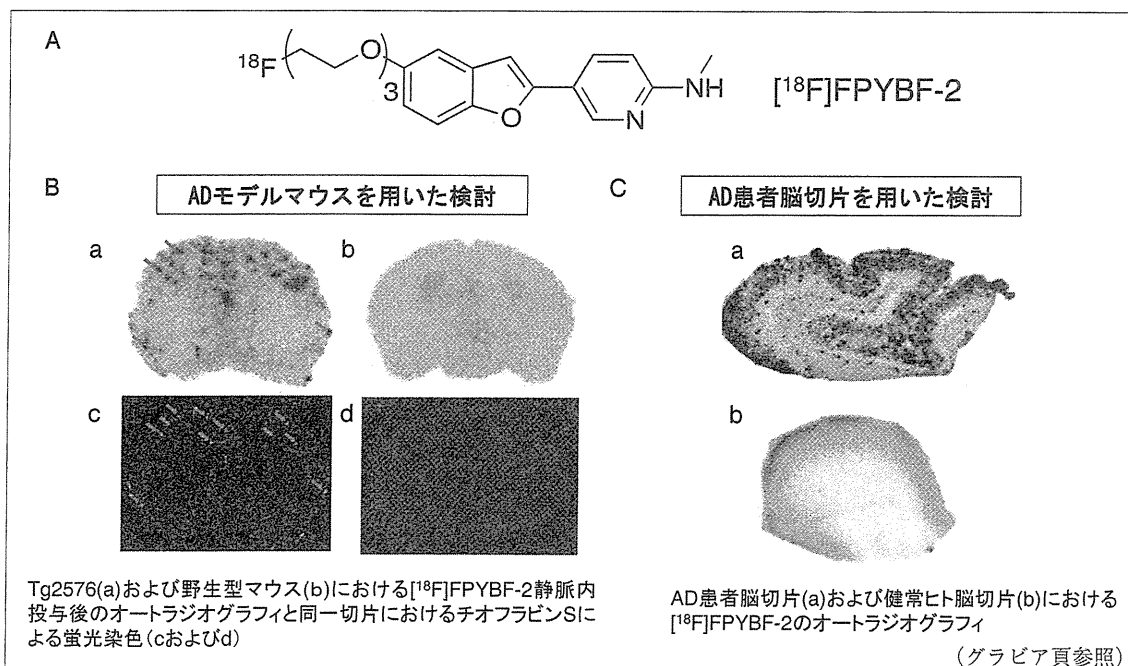
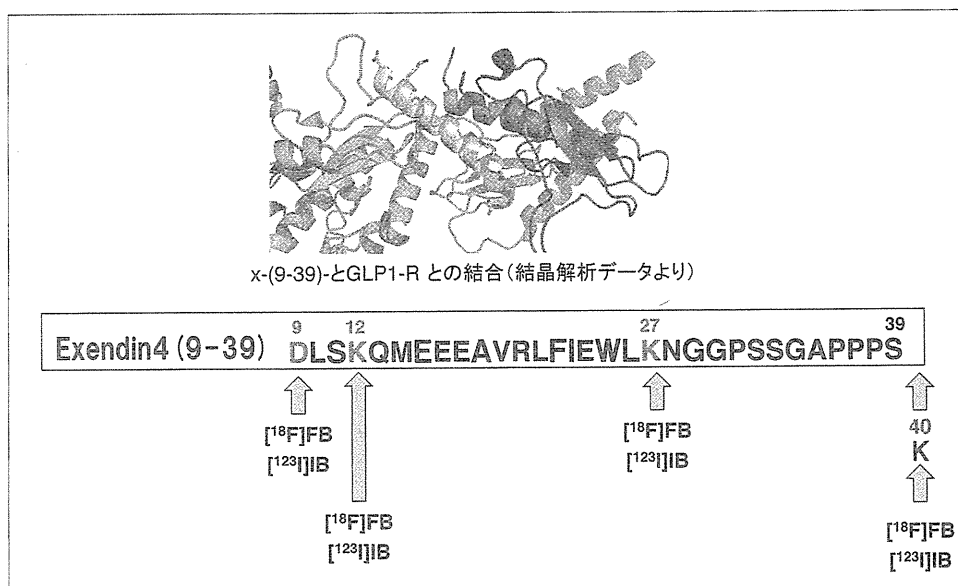


図7 GLP-1Rを標的とする膵β細胞イメージング用放射性分子プローブ¹⁸F-, ¹²³I- Exendin (9-39)誘導体の分子設計



ミノ基がある N 末端, 12 位リジン残基, 27 位リジン残基, さらに 39 位の C 末端にリジンを導入した 40 位リジンへは, ¹⁸F, ¹²³I を効率よく結合できる ¹⁸F-fluorobenzoyl ([¹⁸F]FB) 基, ¹²³I-iodobenzoyl ([¹²³I]IB) (シグナルユニット) がアミド結合 (リンカーユニット) を介して導入できること, また Exendin-4 の 9~39 残基を Ex (9-39) の GLP-1R への結合に関する計算化学の結果から 27 位のリジン残基は結合に重要であるが, 他の N 末端, 12 位リジン残基, C 末端には FB や IB を導入しても影響が少ないことが予測されたことから, N 末端, 12 位リジン残基, C 末端リジン残基に FB や IB を導入した各 Ex 誘導体を合成し, それらの GLP-1R への親和性を膵β細胞を用いて評価した。また, 上記の分子設計の妥当性を確かめるために, 27 位リジン残基に FB や IB を導入した誘導体も同時に合成し, 親和性を比較した。その結果, 予測どおり, N 末端, 12 位リジン残基, C 末端リジン残基に FB や IB を導入した各 Ex 誘導体は GLP-1R へ高い親和性を示したが, 27 位リジン残基に FB や IB を導入した誘導体はこれらの化合物に比べて GLP-1R へ親和性は低いことを認めた [IC₅₀ 値: Ex(9-39) = 1.5 nM, FB9-Ex(9-39) = 1.4 nM, FB12-Ex(9-39) =

6.0 nM, FB27-Ex(9-39) = 23.6 nM, FB40-Ex(9-39) = 10.7 nM, IB9-Ex(9-39) = 1.4 nM, IB12-Ex(9-39) = 1.6 nM, IB40-Ex(9-39) = 3.5 nM]。

また, これらの [¹⁸F]FB-Ex (9-39) および [¹²³I]IB-Ex (9-39) 誘導体の正常マウスにおける経時的な放射能の体内分布を評価した結果, 特に [¹⁸F]FB40-Ex (9-39) および [¹²³I]IB12-Ex (9-39) が高い膵臓集積性を示した。そこで, これらの 2 つの化合物をマウスに投与し, PET あるいは SPECT を用いてイメージングを行ったところ, 明瞭な膵臓のイメージを得ることに成功した (図 7)。さらに, 過剰量の Ex (9-39) を前投与したところ, [¹⁸F]FB40-Ex (9-39) および [¹²³I]IB12-Ex (9-39) の膵臓集積率は有意に低下したこと, またインスリン I 遺伝子のプロモーター領域に enhanced GFP の遺伝子を導入した MIP-GFP マウス (インスリンを作る細胞を GFP で標識するものであり, インスリンを作る細胞は膵β細胞しかないことから, MIP-GFP マウスは膵β細胞を GFP で標識したマウスとなる) を用いて膵臓標本の *ex vivo* autoradiography を行ったところ GFP で可視化された β 細胞の位置と放射能の分布は一致したことから, [¹⁸F]FB40-Ex (9-39) および [¹²³I]IB12-Ex