

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15458

研究課題名(和文) 診断と治療を可能とする磁気共鳴分子イメージング用分子プローブの開発研究

研究課題名(英文) Development of nitroxide-based theranostic compounds that act both as anti-inflammatory drugs and brain redox imaging probes in MRI

研究代表者

藤井 博匡 (FUJII, HIROTADA)

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号：70209013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：分子イメージング法は、生体内での分子間の相互作用を非侵襲的に画像化する手法である。本研究では、従来型の分子プローブ研究手法を根本的に改良し、脳内移行性を示す新規分子プローブの開発研究に挑戦した。

新規分子プローブとして、治療と診断を兼ね備えた脳内移行性のセラノスティックス分子プローブを開発した。非ステロイド抗炎症薬であるイブプロフェン、ケトプロフェンと診断プローブとしてニトロキシドを持つプローブを開発し、マウス脳内においてその機能を非侵襲的に確認することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Molecular imaging is a noninvasive method to understand fundamental molecular interaction inside a living animal. In the present study, we challenged to develop a new molecular imaging probe by eliminating the fundamental problems in conventional probes. Theranostic probes provide both therapeutic and diagnostic imaging capabilities in one molecule and show significant promise for use in magnetic resonance-based imaging techniques. We have successfully developed nitroxide-based contrast agents by connecting a nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen and ketoprofen, and paramagnetic nitroxide molecules. The therapeutic capability of these theranostic probes was confirmed by small animal studies

研究分野：磁気共鳴分子イメージング

キーワード：分子イメージング theranostics 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

分子イメージングは、PET、MRI、SPECT、光などのモダリティと分子プローブを用いて、生体内で機能している分子間の相互作用を非侵襲的に画像化する新たな研究手法として開発された。この分子イメージング手法は今世紀に入り米国を中心に発展を遂げてきた研究手法である。本手法は発表から既に15年近く過ぎ、今や国内外に於いて生命科学分野での解明研究への貢献や早期画像診断法の開発、テーラーメイド医療、創薬などの幅広い分野における貢献が期待されている。(Theranostics: A treasured tailor for tomorrow. J. Pharm. Bioapplied Sci. 2014;6: S6-S8.) 一方MRIやEPR(電子常磁性共鳴、別名電子スピン共鳴; ESR)などの磁気共鳴イメージング法は、高い空間分解能を持つこと、フリーラジカルや酸素分子などの常磁性物質をセンシングして画像化出来ること、また、non-RI手法であること、などからPETと同様分子イメージング研究で期待されているモダリティである。これらの利点を生かした多くの磁気共鳴イメージング用分子プローブが開発されてきたが、より高機能な分子プローブの開発が期待されており、診断のみならず治療効果も期待できる分子プローブの開発が望まれている。このような背景から、将来活躍が期待される高機能分子プローブの開発研究に挑戦する。

2. 研究の目的

磁気共鳴分子イメージング法は、MRIなどのモダリティと分子プローブを用いて生体内での分子間の相互作用を非侵襲的に画像化する手法である。本申請では、使用上欠点のある従来型の分子プローブによる研究手法を根本的に改良し、生体内の着目分子を高感度に画像解析できる新規分子プローブの開発並びに検出手法の発掘に挑戦する。

本申請では、脳内にあるレセプターに結合可能なリガンドと常磁性ラベル剤であるニトロキシド両分子をクリック反応などを利用して脳内で結合させ、目的のプローブを脳内で合成させて機能させる手法を試みる。また、合成した目的のプローブ検出はMRIやEPRで実施するが、装置の検出感度の不足を補うため、超偏極技術を併用し、検出感度の向上に挑戦する。

さらに本申請で開発するプローブは、治療と診断を兼ね備えたセラノスティックス分子プローブであるため、脳疾患モデル動物を用い治療効果と病態モニタリングをMRIにより検証する計画である。

3. 研究の方法

分子プローブの合成について：脳内レセプターに結合して機能する分子として抗炎症剤を、プローブ検出分子としてニトロキシド分子を選択し、両分子を結合させたプローブの合成を二種類の合成法を用いて実施した。直接的なエステル結合法を用いる合成法：抗炎症剤として ibuprofen と ketoprofen (図 1

の1と2)を、ニトロキシド分子として 3-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl (HMP、下図3)を用い、両者をジクロロメタン中、カップリング剤のDCCおよびDMAP存在下で脱水縮合反応によりエステル化を行った。

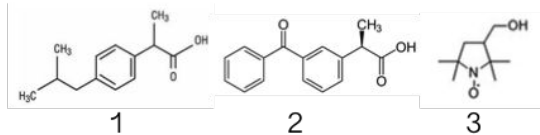


図1 ibuprofen (1), ketoprofen (2), HMP (3)の化学構造

合成物は液体クロマトグラフィー法により精製を進め、最終生成物の純度はマススペクトル、NMR(¹H,¹³C)、元素分析等により検証した。

Ibuprofen-PROXYLの検証結果：Red powder. FAB-MS (m/z) 360 (M+). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) : 2.765 (br. s, 6H, CH₃ × 2), 3.384 (br. s, 3H, CH₃), 3.728 (br. s, CH(CH₃)₂), 4.299 (br. s, 2H, CH₂), 5.543 (br. s, 1H, -COC-HCH₃-), 8.943, and 9.040 (each 2H, br. s, ArH × 2). ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) : (ibuprofen moiety) 188.6, 188.4 (C=O), 155.1 (C₆), 152.1, 151.8 (C₃), 144.7, 144.6 (C₄), 142.2 (C₅), 60.0 (C₂ and C₇), 44.9 (C₈), 37.9 (C₁₀), 33.8 (C₉). Anal. Calcd. for C₂₂H₃₄N₃O₃: C, 73.29; H, 9.51; N, 3.89%. Found: C, 73.37; H, 9.75, N, 3.81%. EPR data: g = 2.0076, aN = 1.50. Ketoprofen-PROXYLの検証結果：Red powder. FAB-MS (m/z) 408 (M+). ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) : (ketoprofen moiety) 1.58 (s, 3H, CH₃), 3.84 (br. s, 1H, >CH), 7.14, 7.44, 7.49, 7.56, 7.60, 7.67, and 7.78 (9H, ArH × 9), (PROXYL moiety) 0.98, 1.26, 2.04, 4.12 (each br. m). ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) : (ketoprofen moiety) 210.0 (C₁₀ C=O), 187.4 and 187.3 (C₃ C=O), 154.8, 154.6, 152.3 and 152.1, 151.5, 148.1, 146.6, 144.8, 144.2, 143.9, 143.4, 60.16(C₂), 33.61(C₃). Anal. Calcd. for C₂₅H₃₀N₃O₄: C, 73.50; H, 7.40; N, 3.43%. Found: C, 73.26; H, 7.53; N, 3.30%. X-band EPR data: g = 2.0075, aN = 1.50.

クリック反応を用いる合成法：IbuprofenとPROXYLを、クリック反応を利用して脳内で結合させる合成プロセスを試みた(下図)。既報に従い、Ibuprofen(下図の)にアジド基を、PROXYL(下図の)にアルキン基を結合させ目的化合物を合成した。



プローブ検出感度の向上について：

本研究では、プローブの検出に MRI と EPR を用いた。0.5Tesla MRI 装置の感度を向上させるため、超偏極技術を活用した検出法を試みた。市販の X-バンド ESR 装置を改良し、磁場 0.34Tesla、マイクロ波周波数 9.4GHz の条件下で検出すべきプローブを励起して MRI 検査による検出を試みた。

EPR イメージング装置の感度向上について：脳内に局在するプローブを従来より高感度に検出するため、EPR イメージング装置をアナログ回路からデジタル回路への変更を行い、EPR イメージング装置の感度向上を目指した。具体的には、マイクロ波ブリッジを構成しているアナログ素子をデジタル素子に変更し、回路全体をデジタル化した。

動物実験について：本研究での動物実験は、札幌医科大学動物実験規定に則り、承認された実験計画を基に実施した。実験動物としては、6～10 週齢の雄 C57BL/6 マウスを用いた。本研究で合成したプローブは、イソフルラン麻酔下、マウス尾静脈より投与した。投与量は、1.0 μ mol/g 体重であった。MRI 装置は、0.5Tesla MRmini(MR Technology 社製)を、750MHzEPR イメージング装置を自作の装置を利用した。MRI や EPR イメージング装置による画像測定時は、マウスをイソフルランにより麻酔下で実施した。

4. 研究成果

・Theranostics の開発

治療薬と画像診断プローブが一つの分子を構成する theranostics プローブの開発を以下の二通りの方法で行った。

クリック反応を活用した theranostics プローブ合成：治療薬として ibuprofen を、画像診断薬としてレドックス感受性を有するニトロキシド化合物を選択した。Ibuprofen にはアジド基を結合し、ニトロキシドにはアルキン基を結合させ、それぞれ別々にマウス尾静脈より投与し、脳内において両分子の結合を試みることにした。

まずは、in vitro 下で両成分分子を反応させてみると ibuprofen-PROXYL の生成を確認することが出来た。次に、両成分を別々に尾静脈より投与し、脳内での ibuprofen-PROXYL 合成を試みたが、マウス頭部で観測出来たニトロキシドの EPR 信号は非常に少なく、両成分がどれだけ有効に脳内へ到達しているのか、検出されたのが ibuprofen-PROXYL 分子なのかそれとも PROXYL-アルキンなのか、その判定は出来なかった。In vitro で合成した ibuprofen-PROXYL を尾静脈より投与すると、脳内へ ibuprofen-PROXYL が到達していることは画像解析から確認することが出来た。

エステル結合後、脳内へ送り込む方法について：抗炎症剤として Ibuprofen と Ketoprofen を選択し、それぞれのカルボキシ

ル基と、3-hydroxylmethyl-PROXYL (HMP) の水酸基との間でエステル結合を形成する反応を行った。Ibuprofen-PROXYL のリン酸緩衝液中での線幅は 0.12mT 程度であったが、脳内での線幅は 0.188mT と 50%以上広がっていることが観測されたが、EPR 信号値としては十分画像化が可能な量であった。精製 ibuprofen-PROXYL の水溶液中(下図の 1)および脳内(下図の 2)での EPR スペクトルを図 2 に示した。

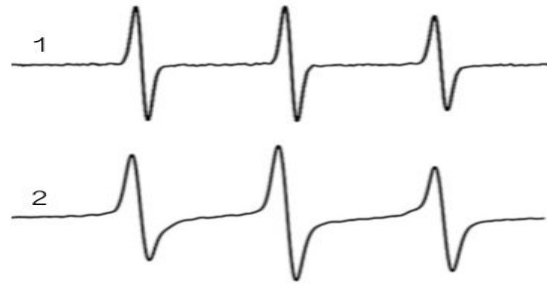


図 2 Ibuprofen-PROXYL の、リン酸緩衝液中(1)およびマウス脳内(2)での EPR スペクトル

・Theranostics プローブの検出

合成した Ibuprofen-PROXYL および Ketoprofen-PROXYL の、マウス脳内での分布を MRI と EPR イメージング法により求めた。得られた結果を以下の図 3 に示した。

実験に用いた C57BL/6 雄マウス(図 3 の A)をイソフルラン麻酔下で MRI 画像(B)を撮像した。マウス尾静脈より ibuprofen-PROXYL を 1.0 μ mol/g 体重で投与し、EPR イメージング画像(C)を測定し、マウス頭部の解剖画像(B)との重ね合わせを行った。重ね合わせた画像を D に示した。

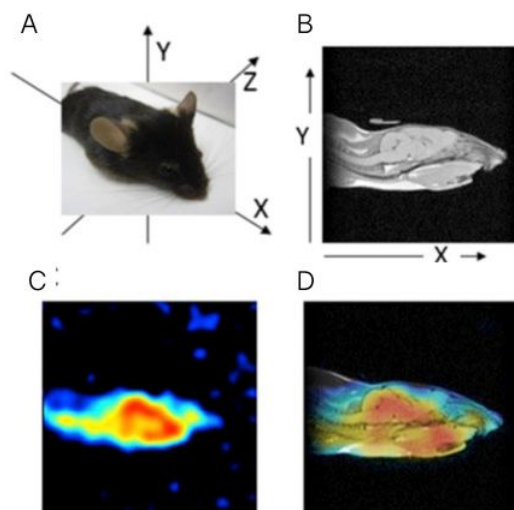


図 3 マウスに投与した Ibuprofen-PROXYL の体内分布について

A: マウス C57BL/6 B: マウス MRI 画像 C: EPR 画像 D: EPR 画像を MRI に重ね合わせた画像

得られた画像(D)より、Ibuprofen-PROXYLは頭部に達した後、脳内および舌に選択的に分布していることが分かる。また、Ketoprofen-PROXYLにおいても同様の実験を行ったところ、同じく脳内および舌への選択的な移行を確認することが出来た。

合成したプローブは常磁性を有しているため、MRI計測での造影剤として機能すると考えられる。Ketoprofen-PROXYLの脳内分布をMRIのみで検証した。結果を図4に示した。

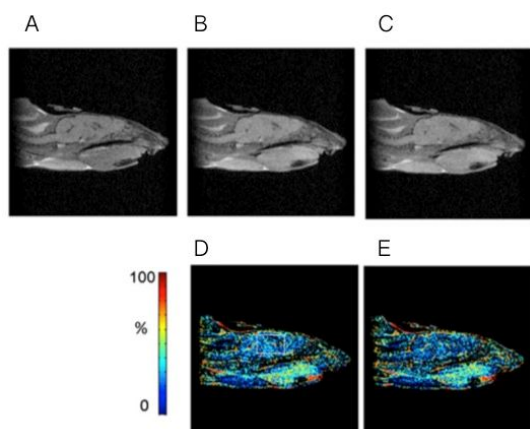
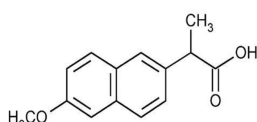


図4 Ketoprofen-PROXYL投与によるMRI画像 A:投与前の画像 B,C:投与後30秒、50秒後に撮像した画像 差画像(D,E):D=B-A E=C-A

差画像DとEを比較すると、明らかにD画像の方がプローブの脳内分布を明瞭に描写している。これらより、脳内へ移行したプローブが還元され常磁性を喪失している事を示している。このような経時変化画像から、プローブの脳内での半減時間を推定することが出来た。Ibuprofen-PROXYL, Ketoprofen-PROXYLとも半減時間は40分ほどで、HMPの10分程度に比しかなり延長されていることが分かる。一方、脳内での造影に比べ、舌での造影効果は画像Eにおいても明瞭に観測されており、脳と舌におけるプローブの安定性の差が反映されていると思われる。

・類似化合物の合成について
抗炎症性を発揮する機能性分子として、ibuprofenとketoprofen以外にnaproxenを取り上げ、PROXYLとの結合プローブの合成を試みた。Naproxenの化学構造を以下に示した。前者の化合物同様にジクロロメタン中、DCCによるカップリング反応により目的のプローブを高収率で合成することが出来た。

Naproxenは前者の化合物に比べ疎



水性が高く、得られたプローブを高濃度で水系溶媒に溶解させることが難しかった。

プローブの検出感度を上げるため、プローブ中のPROXYL部の重水素化ならびに¹⁵N化を試みた。¹⁵N化はEPR信号を単純に50%以上増加させるため、感度向上には一定の効果を示した。また、PROXYLをD化することでプローブの線幅は0.18mTから0.06mT程度へと減少し、感度向上だけでは無く、解像度向上にも寄与することが可能であった。

・Ibuprofen-PROXYL, Ketoprofen-PROXYL両プローブの抗炎症性特性について
合成した両プローブが治療薬としての機能も持ち合わせるtheranosticsとして機能するかどうか、炎症モデルマウス脳で検証した。炎症モデルマウスは、リポポリサッカライド(LPS)を腹腔内投与により炎症を誘起した。24時間後マウスより脳組織を採取し、炎症マーカーである一酸化窒素(NO)の合成量を定量化した。

脳内でのNO生成量は、脳組織内のnitrite/nitrate総量から見積もった。得られた結果を図5に示した。

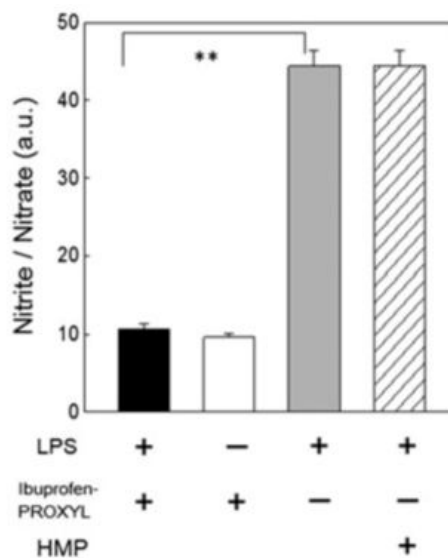


図5 LPS投与による炎症モデルマウスにおけるNO合成量の変動
Ibuprofen-PROXYLあるいはHMPを投与したマウスにLPSを投与して実験した。

LPSの投与により脳内には多量のNOが精製されるため、nitrite/nitrate総量は非常に高い。今回合成したibuprofen-PROXYLを投与したマウスにLPSを投与し24時間後のnitrite/nitrate総量を計測すると、LPSを投与していないネガティブコントロールマウスと同程度の値となり、ibuprofen-PROXYLの投与によりNO生成を80%以上阻害していることが明らかとなった。

ニトロキシドは一般に抗酸化特性を持って

いるので、HMP 単独ではどの程度 NO 生成を抑制するか調べたところ、HMP の抑制率はほぼゼロであった。以上の結果から、今回合成した ibuprofen-PROXYL は非常に高い抗炎症性を有していることが分かった。Ketoprofen-PROXYL でも同様の検討を行ったところ、ibuprofen-PROXYL 同様、非常に高い阻害率を示すことが確認出来た。以上の結果から、両プローブとも theranostic プローブとしての機能を有していることが確認出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1 Emoto MC, Sato S, Fujii HG. Development of nitroxide-based theranostic compounds that act both as anti-inflammatory drugs and brain redox imaging probes in MRI. Magn Reson Chem. 2016;54:705-711.

doi: 10.1002/mrc.4431.

2 Wang X, Emoto M, Miyake Y, Itto K, Xu S, Fujii H, Hirata H, Arimoto H. Novel blood-brain barrier-permeable spin probe for in vivo electron paramagnetic resonance imaging. Bioorg Med Chem Lett. 2016;26:4947-4949.

doi:10.1016/j.bmcl.2016.09.010.

[学会発表](計 7 件)

1 Emoto M, Sato S, Fujii H. Development of Theranostics Imaging Probe for MRI and EPR Imaging. 23rd International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) June 1-5 2015, Toronto, Canada.

2 江本美穂、佐藤慎吾、藤井博匡 抗炎症薬とニトロキシド化合物による Theranostics イメージングプローブの開発 第 43 回日本磁気共鳴医学会大会(2015) 9 月 10 ~ 12 日@東京

3 Emoto MC, Sato S, Fujii HG. Novel theranostics work as therapeutic drug and imaging probe for MRI and EPR imaging ESMRMB2015(2015)October 1-3, Edinburgh, UK.

4 Emoto MC, Sato S, Fujii HG. Development of nitroxide-based theranostics probe for brain research by MRI. 24th International Society for Magnetic Resonance in Medicine. (2016) May 5-13, Singapore.

5 Fujii HG, Emoto MC, Sato S. Bain Redox imaging using nitroxide-based theranostic probes in septic mice. 17th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and

Antioxidants (2016) June 13-15, Paris, France.

6 Fujii HG, Emoto MC, Sato S. Development of blood-brain Barrier permeable nitroxide-based theranostics probes. Drug Discovery and Therapy World Congress 2016 August 22-25 Boston, USA.

7 藤井博匡、江本美穂、佐藤慎吾 マウス脳内 REDOX イメージング用 Theranostics プローブの開発 第 44 回日本磁気共鳴医学会大会(2016) 9 月 9 日 ~ 11 日@大宮ソニックシティ

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 博匡 (FUJII, Hirotada)
札幌医科大学・医療人育成センター・教授
研究者番号：70209013

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

佐藤 慎吾 (SATO, Shingo)
山形大学・理工学研究科・教授
研究者番号：30215793

(4)研究協力者

()