

令和元年6月7日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10302

研究課題名(和文) 脳内NADPHオキシダーゼ活性測定を目的とするPETトレーサの開発

研究課題名(英文) Development of PET tracers for measuring the activity of NADPH oxidase in the brain

研究代表者

岡村 敏充 (Okamura, Toshimitsu)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 標識薬剤開発部・研究員(任常)

研究者番号：80443068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳内のNADPHオキシダーゼ(NOX)活性の測定が可能となれば、脳疾患の病態解明や早期診断に貢献すると期待される。本研究ではNADPH類似体 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ について、脳内NOX活性測定の可能性を検討した。NOX阻害剤を用いた評価では、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化にはNOXの関与が示唆されたが、NOX欠損マウスを用いた評価では動態に大きな変化は認められなかったことから、NOXトレーサとしては再設計が必要である。一方で、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化に対してチトクロームP450(CYP)阻害剤による阻害効果が認められたので、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ のCYP活性イメージングトレーサとしての可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、当初目的としたNOX活性測定用トレーサの開発までは至らなかったが、提案した測定原理でNOX活性測定は可能であり、今後トレーサを再設計し、NOXトレーサを見出す予定である。一方で、本課題で評価したNADPH類似体の $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ については、脳内のチトクロームP450(CYP)活性イメージングトレーサとしての可能性が見出された。NOXやCYPは病態生理学的に重要な役割を果たしており、これらの酵素活性を非侵襲的に測定することは、様々な脳疾患の発症機構の解明や早期診断、さらにはその治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the feasibility of measuring the activity of NADPH oxidase (NOX) in the brain using an NADPH analog ($[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$) for positron emission tomography. The previous study showed that $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ has the following properties: blood-brain barrier permeability and enzymatic oxidation to the hydrophilic metabolite in the brain. In this study, the oxidation was inhibited by several NOX inhibitors, suggesting that NOX might contribute to the oxidation of $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$. However, there was not a significant difference in the brain kinetics of $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ between NOX knockout mice and wild-type mice, showing that NOX would not contribute to the oxidation of $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ in the brain. Thus, further chemical modifications of $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ will be needed for NOX imaging, while $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ could be used as a tracer for imaging the activity of cytochrome P450 (CYP) in the brain because the oxidation of $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ was blocked by (CYP) inhibitors.

研究分野：放射性医薬品

キーワード：PET NOX 酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸(NADPH)オキシダーゼ(NOX)は補酵素の NADPH から電子を取り去り、酸素分子に渡すことによって活性酸素種(ROS)を産生し、生体内に侵入する病原体を殺菌する重要な役割を担っている。脳では適度な ROS は記憶や学習機能に必要であると考えられており、生体防御システムに加えて、NOX がこの機能に参与している。一方で、NOX による ROS の過剰な産生、すなわち、酸化ストレスは細胞を傷害し、最終的には神経細胞死を引き起こす。酸化ストレスは神経変性疾患の原因の一つとされており、神経細胞やミクログリアにおける NOX の異常な活性化や発現増加は中枢神経系の酸化ストレスの重要なメカニズムとして認識され始めている。

2. 研究の目的

上述の背景から、インビボにおける脳内の NOX 活性の測定は脳疾患の病態解明や早期診断に大きく貢献するものと考えられる。しかしながら、これまでのところ、脳内の NOX 活性を非侵襲的に測定するための方法はほとんどない。そこで、本研究では、脳内の NOX 活性を非侵襲的に測定するためのポジトロン断層撮像法(PET)用トレーサの開発を行った。

3. 研究の方法

(1)測定原理

本研究では、図1に示す代謝変換捕捉原理を用いて、脳内の NOX 活性を測定する。本原理では、まず、PET トレーサを静脈内投与し、血液脳関門(BBB)を通過させ、脳内に移行させる。その後、NOX を介した酸化により水溶性代謝物に変換させ、脳組織内に捕捉させる。NOX 活性(k_3)が高ければ、脳内により多くの放射性的酸化体が蓄積されることになり、逆に、NOX 活性が低い場合は、その PET トレーサは酸化されることなく血液中に洗い出され、脳内放射能は低値を示すことになる。これまでに本原理の基づく酸化還元トレーサとして 1- $[^{11}\text{C}]$ methyl-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide ($[^{11}\text{C}]$ DHQ1)を評価してきた。その結果、 $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 は高い脳移行性を有し、酸化代謝を受け、 $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 による酸化還元イメージングの可能性が示唆された(文献)。この酸化は酵素を介した反応であることが判明し、さらに NOX 阻害剤としてしばしば用いられているジフェニレンヨードニウム(DPI)およびアポシニンにより脳ホモジネート中の $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 の酸化速度の低下が認められた。また、インビボにおいてもアポシニンによる $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 の酸化代謝の阻害が認められた。これらの結果から、 $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 あるいはこの類似化合物を用いて脳内の NOX 活性を測定できるのではないかと考え、本研究では、 $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 および類似化合物による脳内 NOX 活性測定の可能性を検討した。

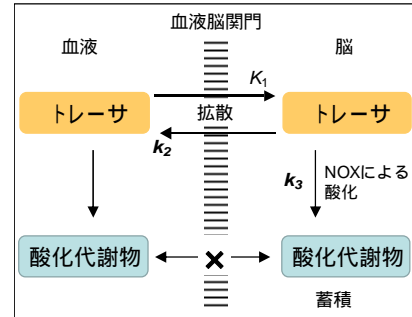


図1 代謝変換捕捉原理に基づくコンパートメントモデル。 k_1 および k_2 は血液脳関門を通過するトレーサの移行速度定数、 k_3 はNOXによる酸化速度定数を表す。

$[^{11}\text{C}]$ DHQ1 類似化合物としては *N*-(cyclohexylmethyl)-1- $[^{11}\text{C}]$ methyl-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide、1- $[^{11}\text{C}]$ methyl-*N*-phenyl-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide、methyl 1- $[^{11}\text{C}]$ methyl-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylate を設計し、評価した

(2)標識合成

$[^{11}\text{C}]$ DHQ1 および類似化合物は先行研究と同様な方法で合成した(文献)。即ち、前駆体と $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ を反応させ、四級塩とし、その後 NADPH あるいは 1-ベンジル-1,4-ジヒドロニコチンアミドを用いて還元し、目的とする化合物を得た。

(3)正常マウスにおける $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 類似化合物の動態の評価

$[^{11}\text{C}]$ DHQ1 類似化合物をマウスに投与し、脳内放射能の経時的変化を PET により測定し、得られた動態から脳移行性と酸化体の保持率(初期相と後期相の取り込みの比)を酸化速度の指標として用い、各候補トレーサの速度バランスを評価した。

(4) $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 の酸化速度に対する NOX 阻害剤の影響

マウス脳ホモジネート中における $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 の酸化速度に対する NOX 阻害剤(DPI、アポシニン、ML171、VAS2870、プルンバギン)の影響を検証した。酸化速度は、NOX 阻害剤存在下あるいは非存在下において、脳ホモジネートに $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 を加え反応を開始、経時的に酸化体と未変化体の割合を HPLC により分析した。未変化体の割合と $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 の初濃度から、各点における濃度を算出し、直線の傾きから酸化速度(nM/min)を求めた。

(5)NOX 欠損マウスを用いた $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 のインビトロおよびインビボ評価

NOX1 および NOX2 欠損マウスの脳ホモジネートにおける酸化速度を測定し、 $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 の酸化速度に対するこれら NOX の影響を検証した。さらに、NOX1 および NOX2 欠損マウスを用いて、 $[^{11}\text{C}]$ DHQ1 が NOX 特異的な動態を示すかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 正常マウスにおける $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ 類似化合物の動態の評価

$[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ とその類似化合物の脳内動態を比較検討した結果、類似化合物は $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ よりも高い脳内取り込みが認められた。しかしながら、脳内放射能は最大値に達した後、酸化されることなく速やかに減少し、代謝変換捕捉原理に従った動態を示さなかったことから、類似化合物は NOX トレーサとして不相当であると判断し、インビトロにおける特異性の評価には $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ のみを用いて行った。

(2) $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化速度に対する NOX 阻害剤の影響

マウス脳ホモジネート中での $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化速度に対する NOX 阻害剤の影響を調べた結果、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化速度はアポシニンおよび ML171 により濃度依存的に低下したが、VAS2870 およびプルンバギンでは対照群と同程度であり酸化速度の低下は認められなかった(図 2)。アポシニンは非選択的な NOX 阻害剤であり、ML171 は NOX1 に対する特異性が高いことから、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ はマウス脳内に取り込まれた後、NOX1 により特異的に酸化されていることが予想された。

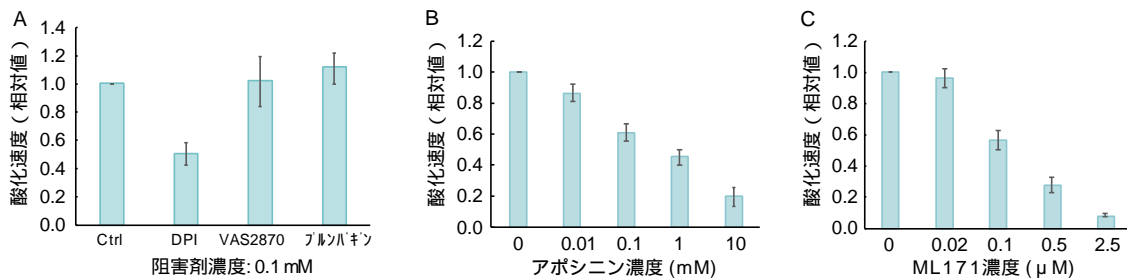


図2. $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化速度に対する NOX 阻害剤の影響 (マウス脳ホモジネート)

(3) NOX 欠損マウスを用いた $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ のインビトロおよびインビボ評価

4-(2)の結果を踏まえ、さらに、NOX1 および NOX2 欠損マウスを用いて、脳ホモジネート中における $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化速度および脳内動態の評価を行い、NOX に対する特異性を検証した。その結果、NOX1 および NOX2 欠損マウスの脳ホモジネート中における酸化速度は対照群の野生型マウスと有意な差は認められなかった(図 3)。また、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の脳内動態に関しても、NOX1 および NOX2 欠損マウスと野生型マウスとの間に大きな変化はなく(図 4A, 4B)、インビボにおける酸化速度の指標である保持率に有意な差は認められなかった。これらのことから、脳内の $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ 酸化に対する NOX1 および NOX2 の寄与は低いと考えられる。

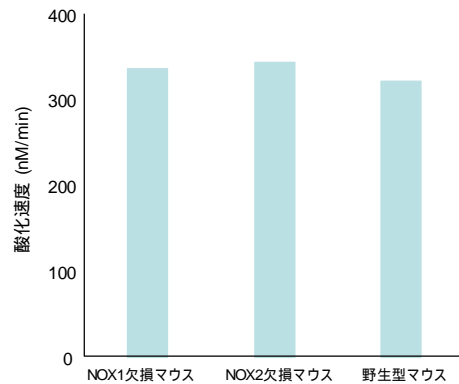


図3. NOX欠損マウスにおける $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化速度

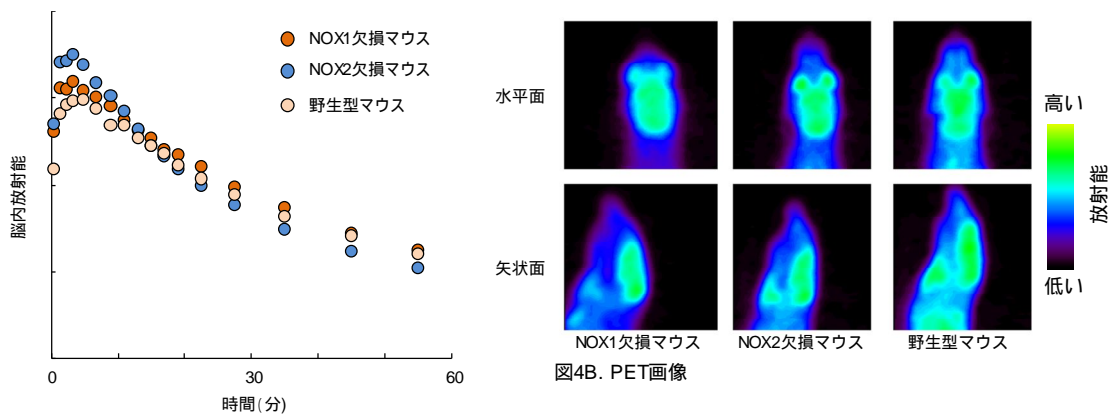


図4A. 時間 - 放射能曲線

図4B. PET画像

以上、NOX 阻害剤を用いた評価では、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化には NOX の関与が示唆されたものの、NOX 欠損マウスを用いた評価では酸化速度および脳内動態に大きな変化は認められなかったことから、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ は NOX 活性測定用トレーサとしては適当ではないと考えられる。本研究では、

当初目的とした NOX 活性測定用トレーサの開発までは至らなかったが、提案した測定原理で NOX 活性測定は可能であり、今後トレーサを再設計し、NOX トレーサを見出す予定である。一方で、¹¹C]DHQ1 については、脳内のチトクローム P450(CYP)活性イメージングトレーサとしての可能性が見出されたので、このことに関して以下に述べる。

(4)¹¹C]DHQ1 の CYP 活性イメージングトレーサとしての可能性

¹¹C]DHQ1 の酸化速度に対する CYP 阻害剤の影響

フェノチアジン系抗精神病薬は主に CYP2D6 により代謝され、一部は CYP3A4 でも代謝されることが知られている。一方、NOX1 阻害剤の ML171 もフェノチアジン骨格を有する化合物であることから、本研究で認められたマウス脳ホモジネート中での ML171 による ¹¹C]DHQ1 の酸化速度の低下は、NOX1 の阻害によるものではなく、CYP2D6 あるいは CYP3A4 の阻害によるものであることが予想された。そこで、¹¹C]DHQ1 の酸化速度に対する CYP2D6/3A4 阻害剤のキニジンおよび CYP3A4 阻害剤のケトコナゾールの影響を調べた結果、両阻害剤とも ¹¹C]DHQ1 の酸化速度を低下させることが判明し、¹¹C]DHQ1 による脳内 CYP 活性の非侵襲的定量測定の可能性が見出された。今後、¹¹C]DHQ1 については、CYP 活性イメージングトレーサとしての可能性を検証する予定である。

<引用文献>

Okamura T, Okada M, Kikuchi T, Wakizaka H, Zhang MR. A ¹¹C-labeled 1,4-dihydroquinoline derivative as a potential PET tracer for imaging of redox status in mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2015, 35(12):1930-1936.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Toshimitsu Okamura, Maki Okada, Tatsuya Kikuchi, Hidekatsu Wakizaka, Ming-Rong Zhang. Kinetics and metabolism of apocynin in the mouse brain assessed with positron-emission tomography. *Phytomedicine.* 査読有. 2018, 38, 84-89.
DOI: 10.1016/j.phymed.2017.05.006

[学会発表](計3件)

岡村 敏充, 岡田 真希, 菊池 達矢, 脇坂 秀克, 張 明栄. 脳内 NADPH オキシダーゼ活性イメージングプローブの開発、日本薬学会第 138 年会、金沢、2018/03/27
Toshimitsu Okamura, Maki Okada, Tatsuya Kikuchi, Hidekatsu Wakizaka, Ming-Rong Zhang. Evaluation of kinetics of acetovanillone in the brain by PET. The 22nd International symposium on radiopharmaceutical sciences (ISRS), Dresden, 2017/05/18,
岡村 敏充, 岡田 真希, 脇坂 秀克, 菊池 達矢, 張 明栄. アポシニンの脳内動態の評価および代謝物分析、第 56 回日本核医学会学術総会、名古屋、2016/11/04

[その他]

量子科学技術研究開発機構学術機関リポジトリ
<https://repo.qst.go.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし