

令和 2 年 6 月 27 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10461

研究課題名（和文）モノアシルグリセロールリパーゼPETプローブの開発と病態モデルへの応用

研究課題名（英文）Visualization of monoacylglycerol lipase in ischemia rat brain using [11C] SAR127303 and development of new PET probes.

研究代表者

羽鳥 晶子（HATORI, Akiko）

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 先進核医学基盤研究部・主幹研究員（任非）

研究者番号：20531528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：MAGLのPETプローブ[11C]SAR127303を用いて脳虚血モデルラットの脳内MAGLを画像化したところ、脳虚血部への放射能の取り込み及びMAGLの発現は損傷の程度に応じて減少した。脳内MAGLのPET画像化は、脳神経損傷部を明らかにするために有用な手段である。また[11C]SAR127303をリード化合物とし、in vivoプローブとしての性質をさらに改善するため新たな[11C/18F]標識PETプローブを開発した。候補プローブの評価を行い、脳への取り込みの高いプローブはMAGLと非可逆的結合をするものが多く、可逆的結合をするものは脳への取り込みが低く抹消組織で特異的結合を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、MAGLのPETプローブを使用し、動物モデルの脳に存在するMAGLを画像化し定量化することにより、脳の疾患におけるMAGL活性の変化と疾患に伴う推移を明らかにすることができた。新しい治療薬が脳などの対象器官におけるMAGLの占有率を測定することにより、種々の疾患治療に新たな治療指針を提供することができると考えられる。将来の展望として、MAGL-PETを様々な病態の理解、治療薬の至適容量の設定、薬剤の有効性証明及び薬効の予測が行える新しいイメージングバイオマーカーとしての有用性を確立できると期待している。

研究成果の概要（英文）：PET imaging of [11C]SAR127303 and immunohistochemical staining using ischemia rat brains revealed that brain radioactivity uptake and monoacylglycerol lipase (MAGL) expression in ischemia part decreased on the degree of ischemia damage. [11C]SAR127303, a PET probe for MAGL, has considerable promise for the evaluation of brain damage.

We also developed 11C and 18F labeled new PET probes for MAGL based on [11C]SAR127303 as the lead compound in order to improve the in vivo PET probe. Candidate probes were evaluated using animals for brain permeability, binding specificity, and kinetic studies. The irreversible MAGL probes demonstrated high in vivo binding specificity in the brain, while the reversible probes showed limited brain uptake and high binding specificity to MAGL in the peripheral tissues.

研究分野：核医学、分子イメージング

キーワード：モノアシルグリセロールリパーゼ MAGL ポジトロン エミッション トモグラフィ PET PETプローブ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) モノアシルグリセロールリパーゼ(Monoacylglycerol lipase, MAGL)は、脳内マリファナ類似物質の2-アラキドノイルグリセロール(2-AG)を分解する酵素である。2-AGの作用を強めることで、抗不安作用、抗うつ作用、鎮痛作用などが得られることが知られており、MAGLを阻害して、2-AG分解を抑制することで新たな治療薬の開発が期待される。そのため、多くのMAGLに結合する化合物が開発され、神経疾患などの治療薬として期待されている。しかしながら、MAGLは広範な機能を示すあまり、MAGL化合物と具体的な疾患との関連付けが極めて難しく、臨床への適応症はまだ定められていない。

(2) 私達は近年、生体脳に存在するMAGLをPETで画像化する分子プローブの開発研究に取り組んできた。その結果、生きたラットやサルの脳に存在するMAGLを画像化できる世界初で有用なPETプローブ $^{11}\text{C}$ SAR127303( $^{11}\text{C}$ SAR1)を開発した。 $^{11}\text{C}$ SAR1はラット脳に入りやすく、MAGLが高く発現する大脳皮質、線条体、海馬などに高い放射能集積が見られ、また、これらの放射能集積は非放射性的SAR1及びMAGLに選択的なリガンドであるKML-29の前投与により著しく阻害された。サルにおいても、後頭葉皮質や線条体などに放射能集積が見られ、霊長類脳におけるMAGLの分布パターンと一致した。これらのことから、 $^{11}\text{C}$ SAR1はMAGLのin vivo PETプローブとしての有効性が証明された。

### 2. 研究の目的

MAGLは、脳内の2-AGおよび中性脂肪の分解過程のモノアシルグリセロールをそれぞれ分解する酵素であり、神経炎症及び代謝障害等との関連が示唆されている。本研究課題は $^{11}\text{C}$ SAR1及び新たに開発される $^{18}\text{F}$ -標識誘導体-PETを用い、数種の小動物疾患モデルに対し、MAGLと神経炎症及び代謝障害等との関連を画像化、定量解析することを目的とした。

(1)  $^{11}\text{C}$ SAR1を用いて神経炎症モデルの脳内MAGLを画像化し、病態進行とMAGLの活性変化との関連を明らかにする。また、治療薬による治療効果の評価と判定を行う。

(2)  $^{11}\text{C}$ SAR1をlead compoundとして、in vivoプローブとしての性質をさらに改善した新たな $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -標識PETプローブを開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 脳虚血モデルラットを用いたPETプローブ $^{11}\text{C}$ SAR1による脳内MAGLの画像化

$^{11}\text{C}$ SAR1を安定的に合成し、動物試験に提供した。

脳虚血モデルの作製およびPET試験：中大脳動脈の一時結さつにより脳虚血モデルラットを作製した。 $^{11}\text{C}$ SAR1を用いて、手術後の動物の脳内MAGLをPETで画像化し、病態の進行とMAGL活性変化との関連を明らかにした。また、神経保護作用のあるミノサイクリンおよびMAGL阻害剤KML29を用いて処置した場合の評価と判定を行った。併せて、グリア細胞を対象としたPETプローブ[トランスローケータープロテイン18kDa(TSPO)のイメージング剤]を用いた実験を行い、脳内放射能分布の比較を行った。

組織を用いた評価：実験終了後の動物を屠殺し、脳組織を採取した。脳切片を作製し、組織染色および免疫組織化学染色によりMAGL、TSPOの発現分布および脳損傷との関連を明らかにした。

(2) MAGLの新規PETプローブの開発

新規PETプローブの設計、化学合成、評価： $^{11}\text{C}$ SAR1のin vivoプローブとしての性質をさらに改善できる新たなPETプローブ候補として、 $^{11}\text{C}$ だけでなく、 $^{18}\text{F}$ で標識できる化合物候補を設計した。これらの化合物に対して、物理化学的性質やMAGLに対する親和性を調べ、脂肪酸アミド加水分解酵素(FAAH)などに対する選択性も調べた。

新規プローブの標識合成：有望な化合物候補に対し、所属施設で使用できる標識合成中間体である $^{11}\text{C}$ MeI、 $^{11}\text{C}$ COCl<sub>2</sub>、 $^{18}\text{F}$ F<sup>-</sup>、 $^{18}\text{F}$ FETBr、 $^{18}\text{F}$ FPrBrなどを駆使して $^{11}\text{C}$ もしくは $^{18}\text{F}$ による標識を行った。

新規PETプローブの評価、in vitro ARG：正常ラット脳の凍結切片を作製し、バッファ中で $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ 候補プローブとインキュベートし、脳切片中の放射能分布を測定するため、in vitro ARGを行った。また、MAGLの阻害剤を用いて、候補プローブのMAGLに対する特異結合の有無を求めた。

新規PETプローブの評価、in vivo試験：正常動物に $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ 候補プローブを投与し、PET試験により脳及び末梢組織のMAGLを可視化した。また体内放射能分布を測定して、候補プローブのin vivoプローブとしての性質を評価した。

(3) 結果総括・成果の発表

データの処理・解析を行い、研究成果を学会や雑誌等に発表した。

### 4. 研究成果

(1) 脳虚血モデルラットを用いたPETプローブ $^{11}\text{C}$ SAR1による脳内MAGLの画像化

[<sup>11</sup>C]SAR1 を用いて脳虚血モデルラットの脳内 MAGL を画像化し、病態と MAGL の活性変化との関連を明らかにすることを目的とした。

術後 4 日後の脳虚血ラットを用いて [<sup>11</sup>C]SAR1 の PET イメージングを行ったところ、正常側に対し虚血側への [<sup>11</sup>C]SAR1 の取り込みが 0.67 に減少していた。神経保護作用のあるミノサイクリンまたは MAGL の阻害剤 KML29 を用いて処置した場合、虚血側の放射能の取り込みは 0.88 および 0.85 に改善された。

炎症マーカーである TSPO の PET プローブ [<sup>18</sup>F]FEBMP を用いたイメージングでは、虚血部位への放射能の取り込みが正常側に対し 1.74 に増加したが、ミノサイクリンおよび KML29 処置群では取り込みが 1.39 および 1.33 に減少し、炎症の程度が軽減していた。

MAGL, TSPO, NeuN などの抗体を用いた免疫化学染色およびクレシルバイオレット染色を行ったところ、虚血により神経細胞が損傷を受けた箇所 MAGL の発現が減少し、TSPO が増加していることが明らかとなった。

[<sup>11</sup>C]SAR1 を用いて脳虚血モデルラットの脳内 MAGL を画像化したところ、脳虚血部への放射能の取り込み及び MAGL の発現は損傷の程度に応じて減少した。脳内 MAGL の PET 画像化は、脳神経損傷部を明らかにするために有用な手段であると示された。

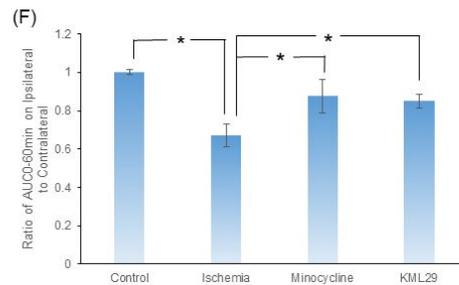
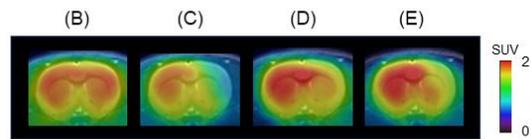


図 1 (A) [<sup>11</sup>C]SAR1 の構造式、(B-E) ラット脳 PET 画像(冠状面) (B) コントロール (C) 脳虚血 (D) ミノサイクリン投与した脳虚血 (E) KML29 投与した脳虚血 (F) PET による [<sup>11</sup>C]SAR1 取り込み比 (虚血側 / 正常側: 各脳半球における時間×放射能濃度曲線面積比)

## (2) MAGL の新規 PET プローブの開発

今回新規に開発し、評価に用いた <sup>11</sup>C もしくは <sup>18</sup>F 標識 MAGL の PET プローブを図 2 に示した。

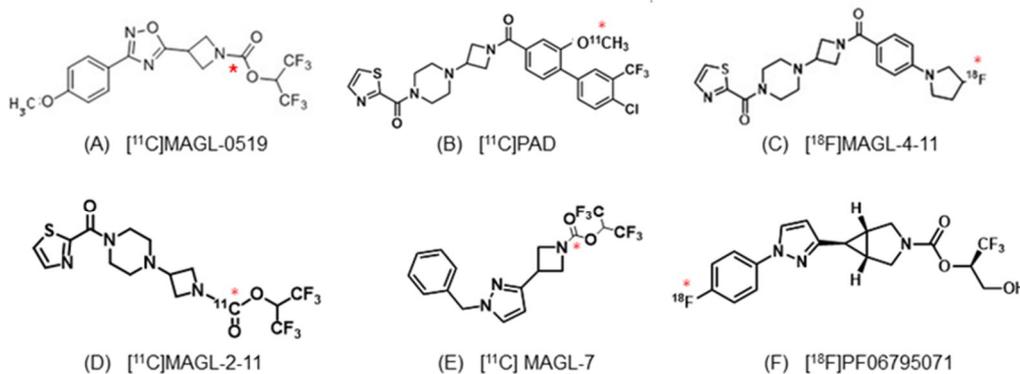


図2 MAGL の新規PETプローブ

[<sup>11</sup>C]MAGL-0519(A) : アゼチジンカルボン酸塩(A)を <sup>11</sup>C 標識合成し評価を行った。In vitro では MAGL と選択的に非可逆的な結合をするが、生体内 では初期における脳への取り込みは高いものの、投与後の時間経過により徐々に脳内の放射能濃度は減少し、アゼチジンカルボニルと MAGL に解離が認められた。

[<sup>11</sup>C]PAD(B), [<sup>18</sup>F]MAGL-4-11(C), [<sup>11</sup>C]MAGL-2-11(D) : Piperiziny azetidone 骨格を持ち MAGL と非可逆的結合をする [<sup>11</sup>C]MAGL-2-11(D), および可逆的結合をする [<sup>11</sup>C]PAD(B) および [<sup>18</sup>F]MAGL-4-11(C) を合成し、ラット・マウスの体内動態について比較した。(D) は脳への取り込みも高く、MAGL と特異的な結合を示した。(B) および (C) は、脳内への取り込みは低く、末梢組織で MAGL と特異的な結合を示した。

[<sup>11</sup>C]MAGL-7(E) : Pyrazol azetidone 骨格を持ち、MAGL と非可逆的結合をする (E) を合成し、小動物を用いた評価を行った。カルバメート構造を有する目的化合物 (E) は、(A) および (D) と同様、標識中間体である [<sup>11</sup>C]COCl<sub>2</sub> とアルコールを反応させたのち、アゼチジン誘導体と反応させることにより合成した。(E) の PET イメージングでは、初期の取り込みののち脳の放射能は緩やかに減少した。また [<sup>11</sup>C]MAGL-7 投与後の脳を用いた代謝物分析より求めた脳組織との結合率は 93% 以上であり、PET 画像は大部分 MAGL との結合分を表していた。

[<sup>18</sup>F]PF06795071(F) : Azabicyclo[3.1.0]hexane scaffold を有する MAGL 阻害剤である PF06795071 は、神経炎症の治療薬として有力と報告され、この化合物の <sup>18</sup>F 標識を行いラッ

ト、マウスを用いて評価を行った。合成は Spirocyclic iodonium ylide 前駆体に対し、求核置換反応によりベンゼン環に  $^{18}\text{F}$  を導入したのち、脱保護基を行い  $^{18}\text{F}$ PF06795071 (F) を合成した。(F) を用いたラット脳切片の *in vitro* ARG により、大脳皮質や線条体などの領域に MAGL に対する特異的結合が確認された。また、PET による *in vivo* 試験では脳への高い透過性および結合特異性を明らかにした。(F) を投与後の脳の代謝物分析を行って求めた脳組織との結合率が 72 - 75% であった。

非可逆的結合タイプのプローブを用いた *in vivo* 試験の結果を表 1 に示した。 $^{11}\text{C}$ MAGL-2-11 (D) は、脳内への取り込みが最も高く高濃度を保ち、脳内での安定性も高かった。 $^{11}\text{C}$ MAGL-0519 (A) および  $^{11}\text{C}$ MAGL-7 (E) は、初期における脳への取り込みは高いが徐々に減少していた。これらは、MAGL と非可逆的結合をしたのちに脳内 MAGL と解離するため、徐々に脳から放射能が消失する。これらのプローブの代謝ルートや解離率を明らかにすることにより、非可逆的結合する MAGL プローブの新たな利用が期待できると考えている。

表1 MAGLの新規PETプローブを用いた小動物*in vivo*試験結果

非可逆的結合タイプ 新規PETプローブ	脳内放射能濃度 <sup>1)</sup>			脳組織との結合率		cLogD	IC <sub>50</sub> <sup>2)</sup> (nM)
	C <sub>2.5min</sub> (SUV)	C <sub>60min</sub> (SUV)	C <sub>2.5min</sub> /C <sub>60min</sub>	5min (%)	30min (%)		
$^{11}\text{C}$ SAR127303 <sup>3)</sup>	1.50	1.50	1.00	—	—	4.33	39.3
(A) $^{11}\text{C}$ MAGL-0519	1.48	0.76	1.93	92.8	91.6	2.80	8.4
(D) $^{11}\text{C}$ MAGL-2-11	2.25	2.00	1.13	97.2	95.8	1.87	0.88
(E) $^{11}\text{C}$ MAGL-7	1.47	0.45	3.20	93.5	87.3	3.29	0.41
(F) $^{18}\text{F}$ PF06795071	1.75	1.10	1.58	75.6	73.3	2.70	2.3

1) PETにより求めた投与後2.5分および60分における全脳の放射能濃度(SUV: standardized uptake value)

2) *in vitro*でのMAGL結合親和性

3) 対照PETプローブとして記載

#### < 引用文献 >

Wang L, Mori W, et al. Synthesis and preclinical evaluation of sulfonamido-based  $^{11}\text{C}$ -carbonyl]carbamates and ureas for imaging monoacylglycerol lipase. *Theranostics*, 2016, 6:1145-1159.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ran Cheng, Wakana Mori, Longle Ma, Mireille Alhouayek, Akiko Hatori, Yiding Zhang, Daisuke Ogasawara, Gengyang Yuan, Zhen Chen, Xiaofei Zhang, Hang Shi, Tomoteru Yamasaki, Lin Xie, Katsushi Kumata, Masayuki Fujinaga, Yuji Nagai, Takafumi Minamimoto, Ming-Rong Zhang, Steven H Liang	4. 巻 61
2. 論文標題 In vitro and in vivo evaluation of 11C-labeled azetidincarboxylates for imaging monoacylglycerol lipase by PET imaging studies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 2278-2291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.7b01400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tomoteru Yamasaki, Wakana Mori, Yiding Zhang, Akiko Hatori, Masayuki Fujinaga, Hidekatsu Wakizaka, Yusuke Kurihara, Lu Wang, Nobuki Nengaki, Tomoyuki Ohya, Steven H Liang, Ming-Rong Zhang	4. 巻 176
2. 論文標題 1. First demonstration of in vivo mapping for regional brain monoacylglycerol lipase using PET with [11C]SAR127303	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 NeuroImage	6. 最初と最後の頁 313-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroimage.2018.05.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhen Chen, Wakana Mori, Xiaoyun Deng, Ran Cheng, Daisuke Ogasawara, Genwei Zhang, Michael A. Schafroth, Kenneth Dahl, Hualong Fu, Akiko Hatori, Tuo Shao, Yiding Zhang, Tomoteru Yamasaki, Xiaofei Zhang, Jian Rong, Qingzhen Yu, Kuan Hu, Masayuki Fujinaga, Lin Xie, Katsushi Kumata, Ming-Rong Zhang, Steven H. Liang	4. 巻 62
2. 論文標題 Design, synthesis, and evaluation of reversible and irreversible monoacylglycerol lipase positron emission tomography (PET) tracers using a "Tail Switching" strategy on a piperazinyl azetidine skeleton	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3336-3353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.8b01778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wakana Mori, Akiko Hatori, Yiding Zhang, Yusuke Kurihara, Tomoteru Yamasaki, Lin Xie, Katsushi Kumata, Kuan Hu, Masayuki Fujinaga, Ming-Rong Zhang	4. 巻 27
2. 論文標題 Radiosynthesis and evaluation of a novel monoacylglycerol lipase radiotracer: 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-yl-3-(1-benzyl-1H-pyrazol-3-yl)azetidine-1-[11C]carboxylate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3568-3573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.06.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Zhen Chen, Wakana Mori, Hualong Fu, Michael A. Schafroth, Akiko Hatori, Tuo Shao, Genwei Zhang, Richard S. Van, Yiding Zhang, Kuan Hu, Masayuki Fujinaga, Ming-Rong Zhang, Steven H. Liang	4. 巻 62
2. 論文標題 Design, synthesis, and evaluation of 18F-labeled monoacylglycerol lipase inhibitors as novel positron emission tomography probes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 8866-8872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.9b00936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 羽鳥 晶子、張 一鼎、森 若菜、栗原 雄祐、脇坂 秀克、張 明栄
2. 発表標題 脳虚血モデルラットを用いたPETプローブ[11C]SAR1による脳内MAGLの画像化
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiko Hatori, Yiding Zhang, Wakana Mori, Yusuke Kurihara, Hidekatsu Wakisaka, Ming-Rong Zhang
2. 発表標題 Visualization of MAGL in ischemia rat brain using PET probe11C-SAR127303
3. 学会等名 Brain & Brain PET 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 羽鳥 晶子、森 若菜、張 一鼎、藤永 雅之、張 明栄
2. 発表標題 Monoacylglycerol lipaseのPETプローブ[18F]PF06795071の評価
3. 学会等名 第59回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 若菜, 栗原 雄祐, 羽鳥 晶子, 張 一鼎, 藤永 雅之, 張 明栄
2. 発表標題 [11C]で標識したMAGLに選択的な新規PETリガンドの合成及び動物評価
3. 学会等名 第59回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	謝 琳 (XIE Lin)  (30623558)	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 先進核医学基盤研究部・主任研究員(定常)  (82502)	
研究分担者	藤永 雅之 (FUJINAGA Masayuki)  (70623726)	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 先進核医学基盤研究部・主任研究員(定常)  (82502)	
研究分担者	張 明栄 (ZHANG Ming-Rong)  (80443076)	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 先進核医学基盤研究部・部長(定常)  (82502)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山崎 友照  (YAMASAKI Tomoteru)  (80627563)	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 先進核医学基盤研究部・主任研究員（定常）    (82502)	