

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03607

研究課題名(和文) 活性酸素の分子種の動態を区別して追跡可能な放射性プローブの開発

研究課題名(英文) Development of radiolabeled probes enabling to detect reactive oxygen species separately in living body

研究代表者

向 高弘 (Mukai, Takahiro)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30284706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：生きた個体内での活性酸素種(ROS)をそれぞれ区別して検出することを目的に、検出感度に優れた放射性同位元素の利用とメタボリックトラッピングの原理に着目し、各ROSやラジカル分子種に特異的なインビボ分子イメージングプローブを開発した。すなわち、標的とする分子種との反応により、物性変化を伴う放射性ヨウ素標識プローブの合成に成功し、病態モデルマウスにおいて、標的部位でのプローブの滞留を認めたことから、ROSやラジカルに対する生体検出プローブとしての有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素種(ROS)はがんや脳卒中、虚血性心疾患、動脈硬化、糖尿病、アルツハイマー病など多岐にわたる病態との関連性が指摘されているが、ROSの種類と疾患との関連度はいまだ明らかでない。特に、ROSやラジカルの産生機構には酸素分圧が影響することが、実態解明の課題となっている。本研究にて得られた成果は、生体そのものの測定を可能とするものであり、生体微量ラジカルと疾患との関連性解明に貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to detect reactive oxygen species (ROS) separately in living body, we have developed in vivo imaging probes for ROS and radicals, focusing on the use of radiolabels with excellent detection sensitivity and the principle of the metabolic trapping technique. In other words, we succeeded in synthesizing radioiodinated probes which can cause a dynamic change in lipophilicity upon reaction with the target ROS and radicals, and demonstrated their effectiveness as in vivo detection probes by observing probe retention at the target site in a ROS-produced mouse model.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射性医薬品 活性酸素 イメージング

1. 研究開始当初の背景

ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)やスーパーオキシドアニオンラジカル($\text{O}_2^{\cdot-}$)、過酸化水素(H_2O_2)等の活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)は、酸化力の強い化学種であり、がんや脳卒中、虚血性心疾患、動脈硬化、糖尿病、アルツハイマー病等の神経変性疾患、さらには老化等、あらゆる疾患に関連していることが提唱されている。例えば、ヒドロキシルラジカルはその強い酸化力により DNA を酸化し、細胞は異常増殖を始めることからがん化に強く関連する。また、スーパーオキシドアニオンラジカルは酸素から生成するが、虚血再灌流時の酸素濃度の急激な変動ストレスにより過剰に生成するため、循環器系疾患との関連が強く示唆されている。このように、疾患によって関連度が異なるため、ROS の種類を分けて検出する手法の開発が必要と考える。

これまでの ROS と疾患との関連性を示す根拠は、細胞実験や摘出臓器を用いた解析によるものであり、生物個体で生きたままの状態を検出された例はない。生きたまま測定する重要性は、ROS の産生機構に酸素分圧が影響することにある。例えば、先に示したスーパーオキシドアニオンラジカルは、酸素から主にミトコンドリア電子伝達系を介して産生するため、酸素分圧が直接的に寄与する。また、脂質分子からプロスタグランジンやロイコトリエンへの代謝過程では、リポキシゲナーゼやシクロオキシゲナーゼが脂質を脂質ラジカルへと酸化し、続く酸素分子との結合反応を触媒していることから、脂質の代謝も酸素分圧の影響を大きく受ける。特に、酸素分圧を変えてこの反応を行うと、生成する脂質代謝中間体の量が劇的に変化することが報告されている。培養細胞や摘出臓器では、実際の生体内の酸素分圧とは大きく異なるため、生体内で実際に産生している ROS の量、種類、挙動は、これまでの細胞実験や摘出臓器の結果と関連しているかはいまだ不明であり、疾患に寄与する ROS を正確に把握できていないといった問題があった。

2. 研究の目的

上記の問題を解決できない根本的な課題として、インビボで種々の ROS を測定する手法が存在しないことが挙げられる。これまでに開発された ROS 検出プローブは蛍光を検出原理としている。蛍光は、生体透過性が低く生物個体での定量的な測定には適さない。また、ROS は生体内の存在量が極めて微量であることから、高感度で検出する必要がある。放射性プローブの一つである ^{18}F -FDG は、トランスポーターを介して細胞内に取り込まれた後、酵素代謝を受けて化学形を変えることで細胞内に滞留するメタボリックトラッピング型プローブとして知られる。本研究においても、メタボリックトラッピングの原理を利用したプローブ開発を進める。そこで、各 ROS 分子種に対して特異的に反応する脂溶性置換基に着目し、放射性プローブに導入した置換基が細胞内に移行した後に各 ROS 分子と反応することでプローブ分子の水溶性が増加し、細胞膜透過性を低下させることができれば、細胞内 ROS 分子の量と関連した放射線量が細胞内に蓄積し、その結果、高感度、定量的に各 ROS 分子種を検出できるのではないかと着想した(図1)。本研究では、生きたままの生物個体で ROS 分子種を区別して測定する核医学イメージングの達成を目的としたメタボリックトラッピング型放射性プローブの開発を行うこととした。

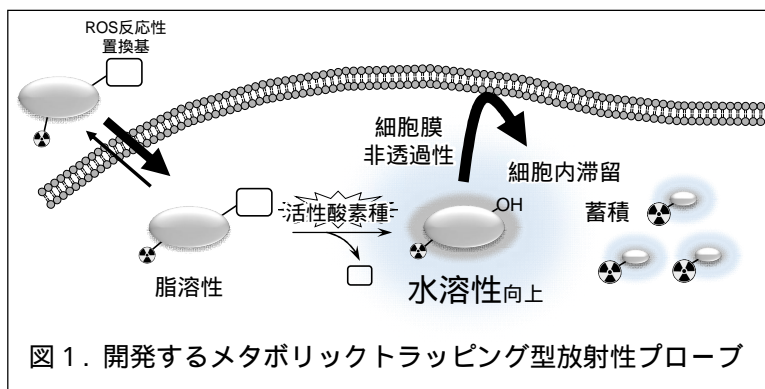


図1. 開発するメタボリックトラッピング型放射性プローブ

3. 研究の方法

本研究では、スーパーオキシドアニオンラジカル($\text{O}_2^{\cdot-}$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル($\cdot\text{OH}$)および ROS 生成の起点となる脂質ラジカル($\text{L}\cdot$)を対象とした核医学イメージングプローブの開発により、これらの ROS 分子種が生体内のどこで、いつ、どの程度生成しているかについて病態モデル動物を用いて明らかにする。そのために、以下3点を計画した。

(1) $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{L}\cdot$ 反応性核医学イメージングプローブの合成 標識前駆体、非標識体の合成

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ に対する反応特異的な脂溶性置換基(反応性置換基)を水溶性化合物に導入することにより脂溶性および膜透過性を向上させ、これらを放射性同位元素により標識する。母核として用いる水溶性化合物には、細胞内滞留性が求められる。即ち、ROS との反応後に膜

透過性が大きく低下する化合物が好ましい。そこで良好な細胞内滞留性が知られているフルオレセインを水溶性化合物の母核に用い、放射性ヨウ素を導入するため、母核化合物へスズ置換基を導入し(標識前駆体) 既知の手法であるスズ-ヨウ素交換反応によりまずは非標識体を合成検討した。また、メタボリックトラッピング機構の関与を検証するため、反応前後の化合物の脂溶性を評価した。そのために、反応後に生成する化合物(標品)を別途合成した。また、L[•]については、脂質分子とのラジカル結合による脂溶性の増大に伴って脂溶性環境へプローブが滞留することを期待して、炭素ラジカルとの鋭敏な反応性を示す安定ラジカル(ニトロキシド)を活用し、放射性同位元素を標識するためのスズ置換基の導入(標識前駆体) および非標識体の合成を検討した。さらに、ラジカルとの反応を検証するため、ラジカルとの反応性を消失させた対照化合物を合成した。

標識実験

スズ-ヨウ素交換反応により標識前駆体を取り扱いの容易な ¹²⁵I にて標識し、分離精製を行った。得られた標識化合物は、非標識体との同時分析により同定した。

(2) 合成プローブの機能性評価

反応性評価

合成した化合物の各種 ROS やラジカル種に対する反応選択性について、それぞれの非標識体を用いて評価した。評価にあたって、反応性置換基を導入した化合物は、スピロラクトン構造を有するため、蛍光を示さないが、反応により置換基が脱離し開環構造となり蛍光を発することから、蛍光強度の変化を指標とした。また、ラジカルとの反応の追跡には、電子スピン共鳴(ESR)を用いてラジカル量を経時的に測定した。各 ROS の実験的産生法については既報の方法に基づき、O₂^{•-}はキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系、•OH は Fenton 反応等を用いて行った。

溶解性および安定性評価

生体系での有用性評価に向けて、投与に適した注射液作成条件を検討するため、溶解性および安定性を評価した。

健常動物実験

体内動態特性を把握するため、ddY マウス(雄、5週齢)に放射性標識体(1 μCi/100 μL)を尾静脈より投与し、投与 2, 5, 10, 30 min, 1, 3, 6, 24 hr 後に各臓器を摘出し、γ カウンタにより体内放射能分布を測定した。具体的には、一定時間後に屠殺し、各臓器を採取し、重量を測った後に γ カウンタを用いて放射エネルギーを測定した。

(3) 病態動物モデルを用いた生物個体での検証

病態動物モデルの作製

各種 ROS は炎症性疾患に関与しており、本研究ではリポポリ多糖(LPS)による炎症性モデルや四塩化炭素(CCl₄)投与による急性炎症モデル、脳虚血再灌流(I/R)モデルを作製し評価を行った。LPS 投与モデルでは、LPS(10 mg/kg)を生理食塩水に溶解し、C57BL/6N マウス(雄、8週齢)に腹腔内投与し、24時間後に体内分布評価に供した。CCl₄投与モデルでは、CCl₄(1 mg/kg)をオリーブ油に溶解し(50% (v/v)) ddY マウス(雄、5週齢)に腹腔内投与し、24時間後に体内分布評価に供した。I/R モデルは、総頸動脈から内頸動脈に栓子を挿入することで中大脳動脈を閉塞し、一定時間後、栓子を取り除き再灌流させ作製した。

病態動物モデルでの評価

放射性標識体を病態動物モデル動物に投与し、体内放射能分布を調査した。ROS との反応による集積性を評価するため、LPS 投与モデルでは、ROS 消去剤として *N*-アセチルシステイン(150 mg/kg)を LPS 投与 30 分後に腹腔内投与した群を作製し、比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) O₂^{•-}、H₂O₂、•OH、L[•]反応性核医学イメージングプローブの合成

標識前駆体、非標識体の合成

レゾルシノールおよび 4-プロモ無水フタル酸を原料に、6'-プロモフルオレセインを合成した。次いで、クロスカップリング反応による臭素のトリブチルスズ基への置換、および、O₂^{•-}、H₂O₂、•OH それぞれに対して特異的に反応する脂溶性置換基のキサンチン水酸基への導入を適宜行い、標識前駆体を合成した。さらに、それぞれのスズ置換基を安定同位体であるヨウ素で置換した非標識体を合成した。L[•]に対するプローブについては、脂質ラジカルとの反応性を示すニトロキシドに放射性ヨウ素を導入するため、*p*-プロモベンゼンをラジカルとの反応点から離れた位置に導入し、この臭素をトリブチルスズ基に置換することで標識前駆体を合成した。

続いて、スズ-ヨウ素交換反応により、標識前駆体を ¹²⁵I で標識し、非標識体との同時分析により同定することで、高い放射化学的収率および放射化学的純度で目的とする放射性ヨウ素を標識した各種 ROS およびラジカル反応性プローブの合成に成功した。

各プローブの脂溶性評価を行ったところ、O₂^{•-}、H₂O₂、•OH に対するそれぞれのプローブの logP 値は 2.90、2.40、2.45 であり、反応後生成物である 6'-ヨードフルオレセインの logP 値(-0.25)と比べ脂溶性が増大しており、当初の計画どおり、各 ROS との反応による脂溶性から水溶性への物性変化が期待される結果が得られ、メタボリックトラッピング機構が活用でき

る可能性が示された。

(2) 合成プローブの機能性評価

反応性評価

合成した化合物が各種 ROS・ラジカルに対して反応選択性を示すかを蛍光あるいは ESR により評価した。その結果、各プローブは、それぞれの標的分子種に対して高い反応性および選択性を示した(図 2)。H₂O₂ 標的プローブについては、H₂O₂ のほか、peroxynitrite に対しても高い反応性を示した。

溶解性・安定性評価

各プローブの溶解性および安定性を評価した結果、O₂^{•-}、H₂O₂ および L[•] 標的プローブは 1% EtOH および 0.1% Tween80 を含む PBS に対して、また、•OH 標的プローブは 0.1% DMF および 0.1% Tween80 を含む PBS に対して良好な溶解性を示すとともに、数日

間は安定に存在することを確認した。動物実験に向けた予備検討として、血漿中での安定性を評価したところ、O₂^{•-} 標的プローブは、数分で反応後生成物である 6'-ヨードフルオレセインに分解した。一方、H₂O₂ 標的プローブは、24 時間後でも分解せず安定であった。

健常動物実験

健常動物に O₂^{•-}、H₂O₂ および L[•] 標的プローブおよび別途合成した反応後生成物 ([¹²⁵I]6'-ヨードフルオレセイン) を尾静脈より投与し体内放射能分布評価を行った結果、投与直後から代謝臓器である肝臓や腎臓への高い集積が見られた。また、甲状腺や胃への集積はほとんど見られず、ヨウ素原子の化合物からの脱離は起こっていないものと考えられた。O₂^{•-} 標的プローブは、反応後生成物の体内動態の結果とほぼ同じ結果となった。血漿中安定性の評価から、投与後すぐに反応後生成物に分解するという結果を反映しているものと考えられる。一方、H₂O₂ 標的プローブは、反応後生成物と比べ、血中や臓器への滞留性が見られ、異なる挙動を示した。

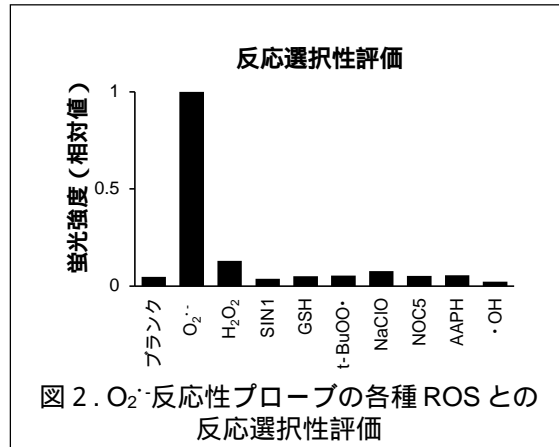


図 2. O₂^{•-} 反応性プローブの各種 ROS との反応選択性評価

(3) 病態動物モデルを用いた生物個体での検証

LPS 誘発炎症モデル

健常動物での検討から、O₂^{•-} 標的プローブについては、血中安定性が低いと考えられたため、腹腔内投与による LPS 誘発炎症モデル動物での検討を試みた。その結果、プローブ投与 1 時間後において、LPS 処置マウスでは、LPS 非処置群と比べて肝臓に優位に高い集積を示した。一方、N-アセチルシステイン処置群では、集積が減少する傾向が見られ、本プローブが ROS との反応を介して滞留していると考えられた。

CCl₄ 誘発急性炎症モデル

L[•] 標的プローブの有用性を検証するため、脂質過酸化亢進モデルとして知られる CCl₄ 誘発急性炎症モデルに本プローブを投与したところ、脂質ラジカルの産生が亢進している腎臓や肝臓、膵臓、肺などへ高い放射能集積を示し、これは L[•] 反応性を消失させた対照化合物に比べて優位に高かった(図 3)。したがって、本プローブが L[•] と反応することでその場に滞留し、検出を可能としていると考えられた。

I/R モデル

L[•] 標的プローブのさらなる有用性の検証として、脳虚血再灌流モデルでの評価を行った。その結果、非梗塞巣に比べて梗塞巣に優位な放射能集積が見られた。

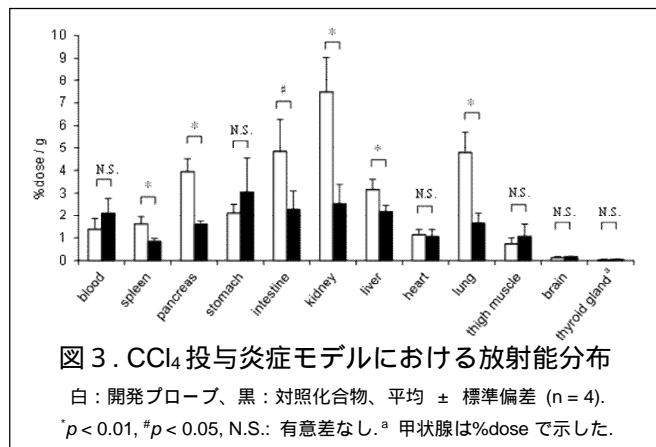


図 3. CCl₄ 投与と炎症モデルにおける放射能分布

白: 開発プローブ、黒: 対照化合物、平均 ± 標準偏差 (n=4). *p<0.01, #p<0.05, N.S.: 有意差なし。^a 甲状腺は%dose で示した。

以上より、本研究では、各種 ROS、ラジカルに対する放射性ヨウ素標識プローブを合成し、それぞれの標的分子に対して高い選択性および反応性を有することを示した。また、開発した ROS 標的プローブの logP は 2.4~2.9 であり、高い脂溶性を示した一方で、ROS 分子との反応後生成物の logP は -0.25 と水溶性が増大しており、開発のコンセプトとした、ROS との反応による脂溶性から水溶性への物性変化が期待される結果を得た。さらに、ROS 産生を生じる LPS 誘発炎症モデルマウスを用いて、インビボでの ROS 検出を評価したところ、LPS 非投与群や ROS 消去剤投与群と比較して、高い放射能集積を認めたことから、開発プローブがインビボにおいても機能することを見出した。さらに、L[•] を標的とするプローブについても、脂質ラジカル誘発モデルにおいて、その有用性を検証することができた。これらの結果は、生体内で産生

する ROS やラジカルを標的とした核医学イメージングプローブ開発の設計コンセプトを実証するものであり、各種病態における ROS 関連分子の機能を解明するツールとして有用であると考えらる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Azuma Risa, Yamasaki Toshihide, Sano Kohei, Munekane Masayuki, Matsuoka Yuta, Yamada Ken-ichi, Mukai Takahiro	4. 巻 163
2. 論文標題 A radioiodinated nitroxide probe with improved stability against bioreduction for in vivo detection of lipid radicals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 297 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.028	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 Yamasaki Toshihide, Azuma Risa, Sano Kohei, Munekane Masayuki, Matsuoka Yuta, Yamada Ken-ichi, Mukai Takahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Radioiodinated Nitroxide Derivative for the Detection of Lipid Radicals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 45 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.9b00416	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Azuma Risa, Yamasaki Toshihide, Sano Kohei, Munekane Masayuki, Mukai Takahiro
2. 発表標題 Effect of Relative Configuration at C2 and C4 position of TEMPO-type Nitroxide on Ascorbate Reduction.
3. 学会等名 ISMAR APNMR NMRSJ SEST 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamasaki Toshihide, Matsuda Yuto, Sano Kohei, Munekane Masayuki, Mukai Takahiro
2. 発表標題 Substituent Effect of Benzene Ring at C2 Position of TEMPO-type Nitroxide for Ascorbate Reduction and Redox Potential.
3. 学会等名 ISMAR APNMR NMRSJ SEST 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 里沙、山崎俊栄、佐野紘平、宗兼将之、向 高弘
2. 発表標題 脂質ラジカルを選択的に検出する放射性プローブの開発と脳虚血/再灌流モデルでの評価
3. 学会等名 第4回日本核医学会分科会 放射性薬品科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎俊栄、東 里沙、佐野紘平、宗兼将之、向 高弘
2. 発表標題 脂質ラジカルを生体検出する放射性プローブの開発 脳虚血再灌流モデルマウスでの評価
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 里沙、山崎俊栄、佐野紘平、宗兼将之、向 高弘
2. 発表標題 脳虚血再灌流障害と脂質ラジカルとの関連性解明に向けた放射性プローブの開発
3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東 里沙、山崎俊栄、佐野紘平、宗兼将之、向 高弘
2. 発表標題 生体内脂質ラジカルを追跡するための放射性プローブの開発および一過性脳虚血モデルを用いた評価
3. 学会等名 第64回日本脳循環代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東里沙、山崎俊栄、佐野紘平、宗兼将之、松岡悠太、山田健一、向高弘
2. 発表標題 生体内脂質ラジカルを非侵襲検出する放射性プローブの合成及び脂質過酸化誘発モデルマウスでの評価
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東里沙、山崎俊栄、佐野紘平、宗兼将之、松岡悠太、山田健一、向高弘
2. 発表標題 脂質ラジカルの核医学イメージングを目的とした新規放射性プローブの開発
3. 学会等名 電子スピンサイエンス学会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田優斗、山崎俊栄、佐野紘平、宗兼将之、向高弘
2. 発表標題 位置換基にベンゼン環を含むTEMPO型ニトロキシドの還元反応性の評価
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎俊栄、坂本麻緒、佐野紘平、宗兼将之、向高弘
2. 発表標題 アルコキシアミンの結合開裂反応におけるニトロキシド部分構造の置換基効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamasaki Toshihide, Sano Kohei, Munekane Masayuki, Mukai Takahiro.
2. 発表標題 Synthesis and evaluation of radioiodinated nitroxide probe for lipid alkyl radicals.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東里沙、山崎俊栄、佐野紘平、宗兼将之、向高弘
2. 発表標題 脂質炭素ラジカルの生体内検出を目的とした放射性ヨウ素標識ニトロキシドプローブの合成と物性・集積性評価
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎俊栄、東里沙、佐野紘平、宗兼将之、向高弘
2. 発表標題 生体内脂質炭素ラジカルの機能解明を指向した放射性ニトロキシドプローブの開発
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎俊栄、東里沙、佐野紘平、宗兼将之、向高弘
2. 発表標題 脂質アルキルラジカルを標的とする放射性ヨウ素標識ニトロキシドプローブの合成と評価
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 山崎俊栄、東里沙、佐野紘平、宗兼将之、松岡悠太、山田健一、向高弘
2. 発表標題 生体内の脂質アルキルラジカルを検出する放射性ヨウ素標識ニトロキシドプローブの開発
3. 学会等名 第3回日本核医学会分科会放射薬品科学研究会 / 第19回放射性医薬品・画像診断薬研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東里沙、山崎俊栄、佐野紘平、宗兼将之、松岡悠太、山田健一、向高弘
2. 発表標題 脂質ラジカルの生体内検出に向けた放射性ヨウ素標識ニトロキシドの開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ https://www.kobepharma-u.ac.jp/biophys/index.html

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	佐野 紘平 (Sano Kohei) (00546476)	神戸薬科大学・薬学部・准教授 (34512)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山崎 俊栄 (Yamasaki Toshihide) (60636710)	神戸薬科大学・薬学部・助教 (34512)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関