

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08241

研究課題名（和文）脳内のチオシアン酸イオン排出速度の非侵襲的定量測定法の開発とその排出機構解明

研究課題名（英文）Development of a noninvasive and quantitative method for measuring the efflux rate of thiocyanate from the brain and elucidation of its efflux mechanism

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・量子医科学研究所 先進核医学基盤研究部・主任研究員

研究者番号：80443068

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）：脳内のチオシアン酸イオン(SCN⁻)の排出システムを定量的に測定することができれば、SCN⁻の毒性の評価や脳疾患の病態解明に貢献することが期待される。本研究で開発した6-[11C]thiocyanatopurine誘導体([11C]TP)は、血液脳関門を通過後、脳内で[11C]SCN⁻に速やかに変換された。また、脳からの[11C]SCN⁻の排出速度は阻害剤により投与量依存的に減少することが明らかとなった。以上、[11C]TPを用いることによって、脳内のSCN⁻の排出速度を非侵襲的・定量的に推定することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発されたトレーサを用いることによって、脳内のSCN⁻排出速度の測定が可能となった。これにより、脳内にSCN⁻を直接投与することなく、SCN⁻排出システムがどのように機能しているかを定量的に評価できるようになった。今後は、SCN⁻排出能に対する環境汚染物質の影響や、脳疾患におけるSCN⁻排出能を定量評価することで、脳の防御機構や病気の発症機構の解明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 develop a noninvasive and quantitative method for measuring the efflux rate of thiocyanate from the brain and to elucidate its efflux mechanism. A 11C-labeled 6-thiocyanatopurine derivative ([11C]TP), designed as a candidate, entered the brain after intravenous administration and was converted to [11C]thiocyanate, which was then cleared from the brain. After the complete conversion of [11C]TP to [11C]thiocyanate, the decrease in brain radioactivity can be considered to reflect [11C]thiocyanate efflux from the brain. Perchlorate inhibited the efflux rate of [11C]thiocyanate in a dose-dependent manner, and the highest dose resulted in a markedly decrease in the efflux rate. Furthermore, the efflux rate of [11C]thiocyanate in the sodium iodide symporter (NIS) knockout mice was significantly lower than that of wild-type mice. Thus, the efflux rate of thiocyanate from the brain can be noninvasively and quantitatively measured by [11C]TP.

研究分野：放射線科学

キーワード：PET チオシアン酸イオン 脳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シアン化物はよく知られている有毒物質のひとつであり、身近なシアン化物の発生源としてはシアン配糖体を含む果実や野菜、タバコの主流煙および副流煙、降圧薬のニトロプルシド等が挙げられる。生体内に取り込まれたシアン化物イオン(CN⁻)は酵素ロダネーゼを介して、チオシアン酸イオン(SCN⁻)に変換され、尿中に排泄される。一方で、SCN⁻はグルタミン酸受容体 (AMPA受容体)とグルタミン酸との親和性を上昇させる作用が報告されており、両者の結合が過剰になると神経障害が誘発される。シアン配糖体を含むキャッサバを主食とする中央アフリカでは、キャッサバの長期摂取と神経障害に明らかな相関があり、CN⁻に加えてCN⁻由来のSCN⁻が原因物質と考えられている。日本においても、スギヒラタケ摂取で起こる原因不明急性脳症について、シアン化物および代謝物SCN⁻の蓄積の可能性が指摘されている。

生理条件下の脳組織におけるSCN⁻の濃度は非常に低く、脳内濃度は血液中の濃度と比べわずか数%に過ぎない。要因の一つとして血液脳関門により血液から脳へのSCN⁻の流入が物理的に妨げられていることが考えられる。さらに、脳からSCN⁻を輸送するための排除システムの関与も予測される。実際、脳にはSCN⁻を能動的に排出する担体輸送システムが存在するということが報告されている。従って、SCN⁻の排出機能は脳内のSCN⁻濃度、ひいては毒性発現に重要な役割を果たしていると考えられることから、中枢神経系におけるSCN⁻の毒性評価あるいは脳疾患との関連性の評価には濃度だけでなく、SCN⁻の排出機能も測定することが必要である。しかし、SCN⁻の脳移行性は低いいため、脳内に直接微量投与するという侵襲的な方法を除いて、脳から血液中へのSCN⁻の排出速度を定量的に測定することは極めて難しい。

2. 研究の目的

上述の背景から、脳内のSCN⁻排出速度の定量測定は毒性評価に重要な役割を果たすと考えられるものの、脳内に直接微量投与するという侵襲的な方法を除いて、SCN⁻排出能の評価法は未だに開発されていない。そこで本研究では、ポジトロン断層撮像法(PET)を用いて、脳組織におけるSCN⁻の排出速度を非侵襲的かつ定量的に測定するための方法の開発を行った。

3. 研究の方法

(1)測定原理

PET用薬剤である[¹¹C]SCN⁻はこれまでに開発されているが、[¹¹C]SCN⁻そのものを静脈内投与した場合、血液脳関門透過性が非常に低く、脳内に放射能が蓄積されないため[¹¹C]SCN⁻の排出輸送に関する情報は得ることができない。そこで、この欠点を解決するため、図1に示すmetabolite extrusion method (MEM) (文献)による脳内のSCN⁻排出能の評価を試みた。MEMでは、静脈内投与した脂溶性の親化合物が血液脳関門を通過し、脳内で代謝により、目的とする水溶性の[¹¹C]SCN⁻を速やかに遊離することが必要である。投与直後の脳内放射能は親化合物と[¹¹C]SCN⁻に依存して変化するが、親化合物が消失した後の脳内放射能の減少は[¹¹C]SCN⁻の排出のみに依存することから、この減少過程をPETにより測定することで、脳からの[¹¹C]SCN⁻の排出速度の非侵襲的定量測定が可能となる。本研究では、細胞内でグルタチオンと反応し[¹¹C]SCN⁻を遊離する候補化合物として9-pentyl-6-[¹¹C]thiocyanatopurine ([¹¹C]TP)を設計した。

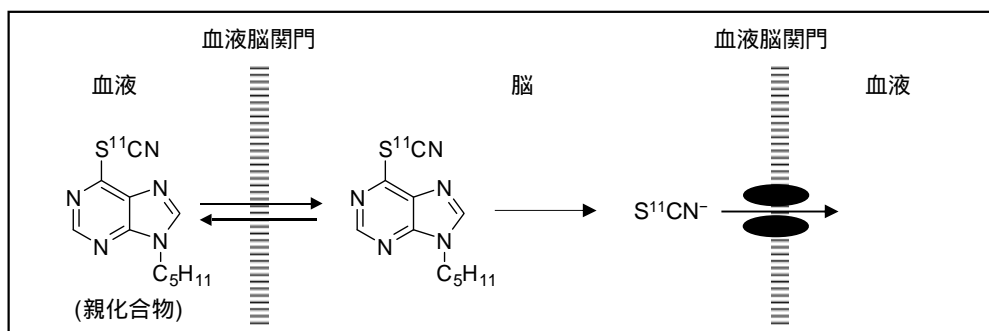


図1. Metabolite extrusion method (MEM)

(2)標識合成

[¹¹C]TPは2通りの方法で合成した。1)硫酸銅()存在下、前駆体である6-iodo-9-pentylpurineと[¹¹C]SCN⁻をDMF中で反応させることにより目的とする化合物を得た。2)前駆体であるbis(9-pentylpurin-6-yl)disulfideと[¹¹C]NH₄CNをメタノール中で反応させることにより目的とする化合物を得た(図2)。

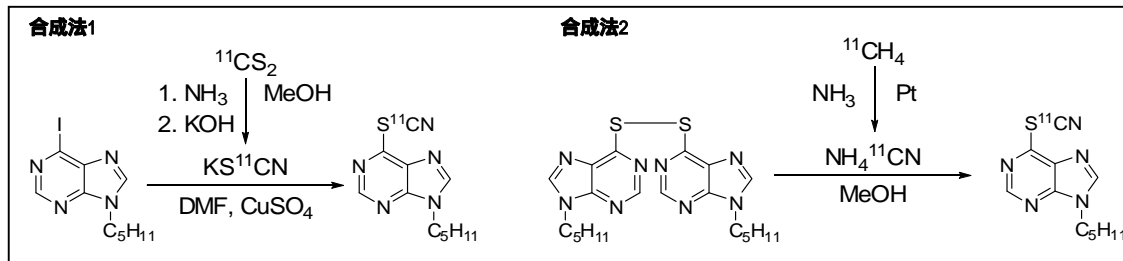


図2. $[^{11}\text{C}]$ TPの合成

(3) 脳内化学形の評価

本測定法では、 $[^{11}\text{C}]$ TP が脳内でグルタチオンと反応し、速やかに $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ を遊離することが必要である。このことを確認するため、リン酸緩衝液/マウス脳ホモジネート中での $[^{11}\text{C}]$ TP とグルタチオンとの反応後の化学形および、 $[^{11}\text{C}]$ TP 投与後の脳内化学形をHPLCにより分析した。

(4) $[^{11}\text{C}]$ TP の動態の評価

脳移行性の評価については、 $[^{11}\text{C}]$ TP あるいは $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ をマウスに静脈内投与後の脳内放射能濃度を測定した。また、 $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ の排出速度の測定は、未変化体($[^{11}\text{C}]$ TP)消失後の脳内放射能濃度の変化をPETにより測定し、その動態から $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ の排出速度を算出した。

4. 研究成果

(1) 標識合成

$[^{11}\text{C}]$ TP は、ヨード前駆体と $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ との反応では、放射化学的収率 $3.9 \pm 1.7\%$ ($n = 11$)、放射化学的純度 95%以上、比放射能 5.2–24 GBq/ μmol 、合成時間(照射終了時から)48分で得られた。一方、ジスルフィド前駆体と $[^{11}\text{C}]$ NH $_4$ CNとの反応では、放射化学的収率 $13 \pm 6.1\%$ ($n = 20$)、放射化学的純度 95%以上、比放射能 9.4–200 GBq/ μmol 、合成時間(照射終了時から)28分で得られた。

(2) $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ の脳への送達

$[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ の排出速度を正確に推定するには、脳内で速やかに $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ が生成することが必要である。リン酸緩衝液中では、 $[^{11}\text{C}]$ TP は1分以内に消失したが、その生成物は $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ だけでなく複数の未知の化合物が認められた(図3)。一方、マウス脳ホモジネート中では、未知の代謝物はほとんど生成せず、放射性代謝物は主として $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ であった(図4)。これらの結果から、 $[^{11}\text{C}]$ TP は非酵素的には $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ を含む複数の代謝物が生成されるのに対して、酵素的には単一の代謝物($[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$)に変換されることが示唆された。インビトロの結果と一致して、インビボでは投与後5分までに、未変化体の $[^{11}\text{C}]$ TP はほとんど消失し、脳内の代謝物の大部分が $[^{11}\text{C}]$ SCN $^-$ であった(図5)。

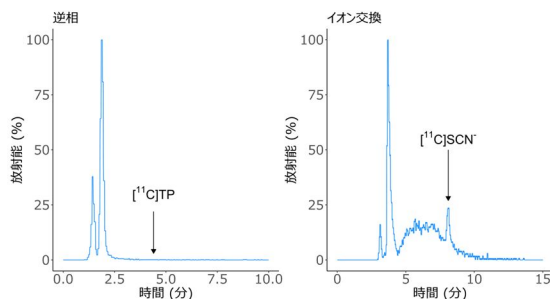


図3. リン酸緩衝液中におけるGSHと反応後のクロマトグラム

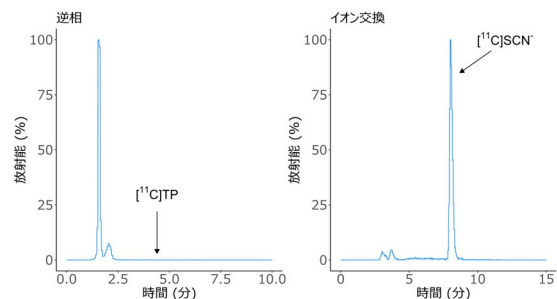


図4. 脳ホモジネート中におけるGSHと反応後のクロマトグラム

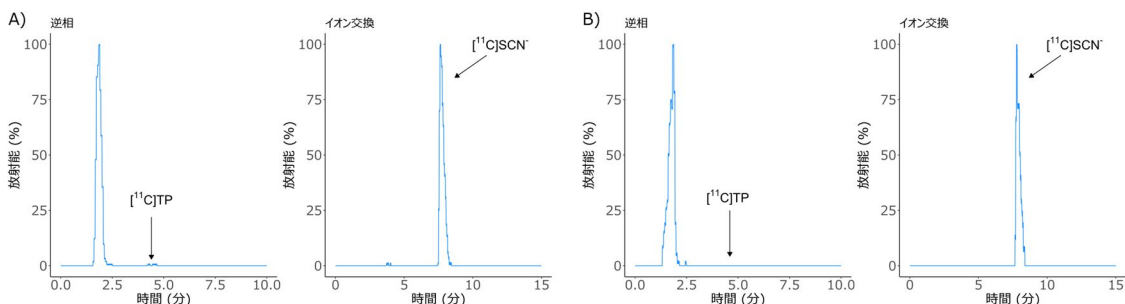


図5. 脳内化学形の分析 ($[^{11}\text{C}]$ TP投与後5分)

A) 対照群マウス, B) 過塩素酸ナトリウム投与マウス

(3) [^{11}C]TP の脳内動態 (阻害剤を用いた評価)

[^{11}C]TP をマウスに静脈内投与したところ、投与後 1 分で脳内放射能は高値を示し、その後速やかに減少した。これに対して、SCN 排出システムの阻害剤(過塩素酸ナトリウム)を前投与したマウスでは、脳内放射能の減少は非常に緩やかであった(図 6)。また、[^{11}C]SCN $^{-}$ 投与後の脳内放射能は低値を示した。脳内化学形の分析結果を考慮すると、5 分から 15 分の脳内放射能の減少は脳からの [^{11}C]SCN $^{-}$ の排出を反映していることから、この間の脳内動態から [^{11}C]SCN $^{-}$ の排出速度を推定できる。その排出速度は対照群では 0.092 min^{-1} であったが、SCN 排出システムの阻害剤を投与したマウスでは投与量依存的に減少し、最大投与量(3 mmol/kg)で 82%の阻害率を示した。

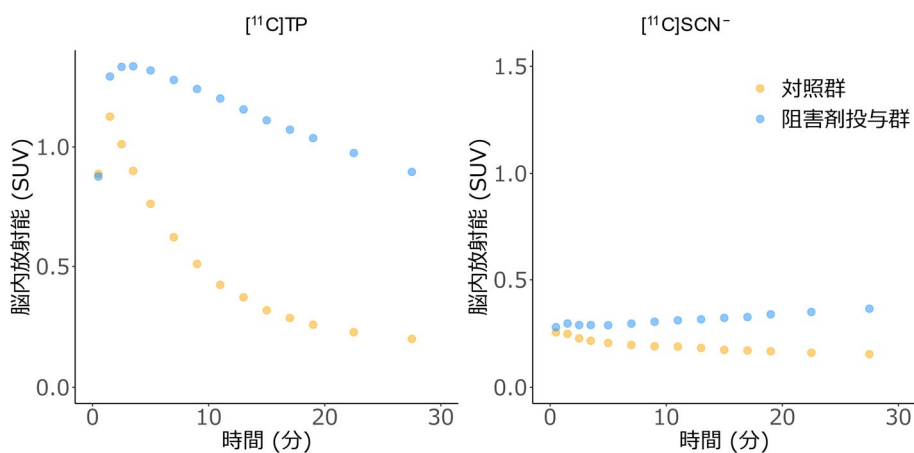


図6. 時間—放射能曲線

(4) [^{11}C]TP の脳内動態 (NIS 欠損マウスを用いた評価)

ナトリウム・ヨードシンポータ(NIS)欠損マウスにおける脳内動態は過塩素酸イオンを前投与したマウスと同様であった。すなわち、[^{11}C]TP は正常マウスおよび NIS 欠損マウスともに高い初期取り込みを示した。しかしながら、その後の動態に顕著な違いが認められた(図 7)。また、[^{11}C]TP と比較すると、[^{11}C]SCN $^{-}$ の血液から脳への移行性は極めて低いことが明らかとなった。上述のように [^{11}C]SCN $^{-}$ の排出速度を算出すると、正常マウスの排出速度は 0.058 min^{-1} であったのに対して、NIS 欠損マウスでは 0.013 min^{-1} であった。これらの結果から、SCN の脳からの排出には NIS が介在していることが示された。

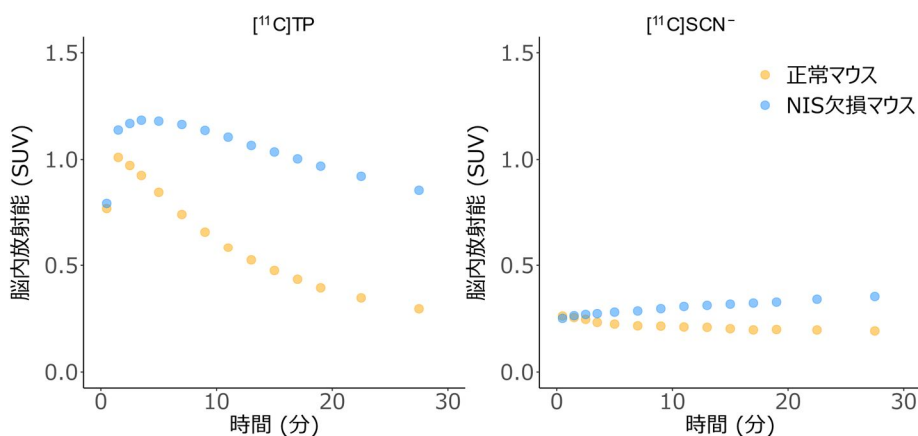


図7. 時間—放射能曲線

以上、本研究で開発した [^{11}C]TP を用いることによって、脳からの SCN $^{-}$ の排出速度を非侵襲的・定量的に測定することが可能となった。よって、[^{11}C]TP は SCN 排出システムに対する環境汚染物質の影響の評価や脳疾患の発症機構の解明に役立つものと考えられる。

< 引用文献 >

Okamura, T.; Kikuchi, T.; Fukushi, K.; Arano, Y.; Irie, T. A novel noninvasive method for assessing glutathione-conjugate efflux systems in the brain. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 3127–3133.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Okamura Toshimitsu, Tsukamoto Satoshi, Okada Maki, Kikuchi Tatsuya, Aizawa Ryutaro, Wakizaka Hidekatsu, Nengaki Nobuki, Ogawa Masanao, Ishii Hideki, Zhang Ming-Rong	4. 巻 33
2. 論文標題 11C-Labeled Radiotracer for Noninvasive and Quantitative Assessment of the Thiocyanate Efflux System in the Brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 1654 ~ 1662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.bioconjchem.2c00277	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡村敏充、塚本智史、岡田真希、菊池達矢、相澤竜太郎、脇坂秀克、念垣信樹、小川政直、石井英樹、張明栄
2. 発表標題 脳内のNIS活性イメージングプローブの開発
3. 学会等名 第62回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡村敏充、岡田真希、脇坂秀克、菊池達矢、張明栄
2. 発表標題 チオシアネート排出系を定量評価するためのPETトレーサの開発
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 岡村敏充、小川政直、菊池達矢、張明栄
2. 発表標題 脳内のチオシアン酸イオンの排出システムを定量評価するためのプローブの開発
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Toshimitsu Okamura, Tatsuya Kikuchi, and Ming-Rong Zhang (他)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 1144
3. 書名 PET and SPECT of Neurobiological Systems	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------