

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17283

研究課題名(和文) 生体内の脂質ラジカルを非侵襲計測する核医学分子プローブの開発

研究課題名(英文) Development of radiolabeled probe for non-invasive detection of lipid radicals

研究代表者

山崎 俊栄 (Yamasaki, Toshihide)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60636710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂質ラジカルは、脂質過酸化によって生成する反応性の高い化学種であり、脂質などを連鎖的に酸化し本来の機能を喪失させることから、動脈硬化やがんなど様々な疾患に関与すると考えられている。これまで、細胞や組織で生じた脂質ラジカルを蛍光で捉えるプローブは開発されていたが、生体レベルで非侵襲的にそれを捉えるプローブはなかった。本研究では、高感度に画像化が可能な核医学イメージングに着目し、生体内で生じた脂質ラジカルを捉える薬剤を開発することに成功した。生物個体の中で生成する脂質ラジカルの時空間的情報を得ることで、酸化ストレス疾患における脂質過酸化の寄与や機能の解明につながるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過酸化脂質は脂質代謝異常症やがんなど種々の疾患で増加していることが報告されており、生体内の過酸化脂質を測定することは健康状態の把握に有用である。本研究で開発された手法により、どのような場所で過酸化脂質が産生しているかを判別でき、過酸化脂質関連疾患の鑑別を可能とする診断法の開発に貢献できるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Lipid radicals are highly reactive species generated by lipid peroxidation, and are thought to be involved in various diseases such as atherosclerosis and cancer because they oxidize lipids and other biomolecules in a chain reaction, causing them to lose their original functions. Although fluorescent probes that capture lipid radicals generated in cells and tissues have been developed, there have been no probes that capture them non-invasively at the physiological level. In this study, we focused on nuclear medicine imaging, which allows highly sensitive imaging, and succeeded in developing an agent that captures lipid radicals generated in vivo. By obtaining spatiotemporal information on lipid radicals generated in individual organisms, it is expected to lead to the elucidation of the contribution and function of lipid peroxidation in oxidative stress diseases.

研究分野：放射化学

キーワード：脂質 ラジカル 放射性同位元素 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

脂質アルキルラジカル(以下、脂質ラジカル)は、脂質過酸化の起点となる物質であり、容易に酸化される。つづいて、周囲の脂質も次々に酸化され、毒性の高い脂質過酸化物が蓄積する。さらに、脂質過酸化物とタンパク質との複合体が疾患と密接に関連することも報告され、病態解明が複雑化していた。研究開始当初、脂質ラジカルを検出可能な蛍光検出試薬や脂質ラジカルを消去する化合物が開発され、肝がんモデル動物において脂質ラジカルの産生が増加していること、および脂質ラジカルを消去する処置により、がん化が抑制されることが実証され、脂質ラジカルの重要性が示されてきた。このことは、疾患の発症・進展に脂質ラジカルが関与している可能性があり、脂質ラジカルそのものが診断や創薬のターゲットになり得ることを示唆するものである。そのためには、脂質ラジカルの挙動を詳細に捉え、いつ、どこで、どの程度発生しているかを知る必要がある。脂質ラジカルは、周囲の酸素濃度の影響により変化するため、生体内で捉える必要もある。しかし、脂質ラジカルの挙動を捉える生体計測技術は存在していなかった。

2. 研究の目的

本研究は、生きた個体で脂質ラジカルの挙動を捉える手法の構築を最終目標とし、生体内での診断が可能な核医学検査の利用を着想した。また、その診断薬として利用されているメタボリックトラッキングにも着目した。例えば、がん診断薬である 18F-FDG は、細胞内で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。この原理を応用し、生体膜内に発生した脂質ラジカルと化合物が化学反応により、生体膜内に捕捉・蓄積されれば、プローブがその場に滞留し高感度・定量的な脂質ラジカル検出を達成できるのではないかと考え、本研究では「生体内の脂質ラジカルを非侵襲検出する核医学分子プローブの開発」を目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的のために、本研究では、(1)放射性同位元素標識脂質ラジカル反応性化合物の合成、(2)合成化合物の機能性評価、(3)病態モデル動物での検証を計画した。

(1)放射性同位元素標識脂質ラジカル反応性化合物の合成

脂質ラジカル高反応性化合物(ニトロキシド)に放射性同位元素を導入した。SPECT での利用を想定し放射性ヨウ素を標識することとし、そのためにスズ-ヨウ素交換反応を利用する分子設計、合成経路を立案した。放射性ヨウ素は実験上半減期の長く取り扱いの容易な I-125 を利用することとした。標識体は、別途合成した非放射性ヨウ素導入化合物(以下、非標識体)と HPLC 保持時間を比較することにより同定した。

(2)合成化合物の機能性評価

in vitro 評価: 非標識体について、脂質ラジカルや他の活性酸素種との反応性を電子スピン共鳴装置(electron spin resonance; ESR)により測定し、脂質ラジカルに対する反応性・特異性を評価した。脂質ラジカル産生系には、リポキシゲナーゼによる酵素的産生法を用いた。また、膜移行性を評価する指標としてオクタノール-水分配係数を求めた。

培養細胞実験: 標識体を培養細胞へ添加し、放射エネルギーを測定することで細胞への滞留性を評価した。

健常動物実験: 体内動態特性を把握するため、健常動物に標識体を投与し体内放射能分布を調べた。具体的には、一定時間後に屠殺し、肝臓、腎臓、心臓等の各臓器を採取し、重量を測った後にカウンター等を用いて放射エネルギーを測定した。

(3)病態モデル動物での検証

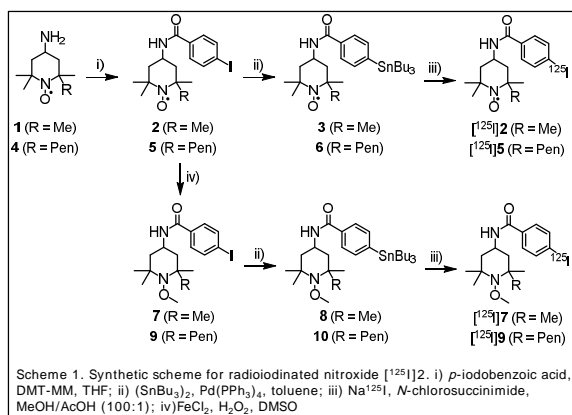
病態モデル動物の作製: 脂質過酸化亢進モデルとして、四塩化炭素誘発急性肝炎モデルを用いた。

病態モデル動物での評価: 作製した病態モデル動物に標識体を投与し、体内放射能分布を調べた。

4. 研究成果

(1)放射性同位元素標識脂質ラジカル反応性化合物の合成

ニトロキシドへの放射性ヨウ素を標識する検討の第一段階として、ニトロキシドには生物系実験に汎用され、かつ脂質ラジカル捕捉効果の報告もある TEMPO 系ニトロキシドを選択した。TEMPO は 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-N-oxyl の略であり、ピペリジン環の 4 位に化学修飾可能な置換基を持たせることが可能である。一方で、低分子化合物の放射性ヨウ素の標識法として、スズ-ヨウ素交換反応が広く知られており、芳香族スズ化合物を前駆体として合成すること



が多い。そこで、出発原料には市販品を容易に入手可能であり、アミノ基を TEMPO 化合物の 4 位に有する 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (化合物 1) を用い、これに芳香族スズ置換基を導入した化合物 3 を合成する方法を考案した (Scheme 1)。最終的には標識した $[^{125}\text{I}]2$ を同定するために、非放射性ヨウ素アナログである化合物 2 が必要となることから、まず初めに化合物 1 と p-iodobenzoic acid とを縮合させ化合物 2 を得ることとした。実際に、脱水縮合剤である DMT-MM を用いて反応を行ったところ、化合物 2 を 79% の収率で得ることができた。次に、スズハロゲン交換反応により化合物 3 の合成を試みた。パラジウム触媒とビストリブチルスズを用いてスズ化を行ったところ、化合物 2 と 3 はカラムクロマトグラフィーにて十分に分離可能であり、51% の収率で化合物 3 を得た。化合物 3 は MS 測定により同定し、MS スペクトルは、Sn に由来する典型的なピークパターンを示した。以上の結果により、放射性ヨウ素の標識前駆体の合成法を確立したことから、脂質ラジカルに対して高い反応性を示す化合物 4 についても、同様に合成を進め、化合物 5 及び化合物 6 を得た。

続いて ^{125}I 標識を検討した。条件として、N-chlorosuccinimide (NCS) を酸化剤とし、酸性条件下 (MeOH/AcOH=100:1) 室温にて 15 分混和させ、HPLC 測定をおこなったところ、約 9 分に目的物とみられるピークを確認できた。そこで、このピークを分取し、非標識体である化合物 2 と同時注入による HPLC 測定を行ったところ、約 9 分に UV と RI の両方のピークが検出され、 $[^{125}\text{I}]2$ であることを確認できた。従って、本反応条件により化合物 3 から 2 への ^{125}I 標識が可能であることが明らかとなった。このときの放射化学的収率は 82% であり、放射学的純度は >95% であった。また、同条件で反応時間を 5, 10, 15, 30 分と変化させても、その放射化学的収率はほとんど変化しなかった。さらに、NCS の代わりにクロロミン T を酸化剤として反応を行った場合も同様に高収率・高純度で標識が可能であった。以上の結果より、目的とする ^{125}I 標識化合物を高純度、高収率で得ることに成功した。これまでに、ニトロキシドの放射性ヨウ素標識は先例がなく、初めて実証することができた。

同様に、化合物 6 についても NCS を酸化剤とする条件で標識検討を行ったところ、放射化学的収率が 85%、放射化学的純度は >99% と高収率・高純度で $[^{125}\text{I}]5$ を得ることに成功した。

また、ラジカルとの反応性を喪失させた化合物 7-10 を別途合成し、以後の評価に用いた。

(2) 合成化合物の機能性評価

化合物 2 および 5 の脂質ラジカルに対する反応性を測定した。化合物 2 はリノール酸 リポキシゲナーゼ反応系において、経時的かつ顕著に ESR 信号の減衰を示した。一方で、スーパーオキシドやヒドロキシルラジカル、過酸化水素、次亜塩素酸などの活性酸素種に対しては、ESR 信号は変化せず、反応性を示さなかった。これまでも、ニトロキシドが脂肪酸トリポキシゲナーゼとの反応系において、脂質ラジカルとの付加体を形成することが報告されており、今回開発した化合物についても、同様に脂質ラジカルとの反応性を示したものと考えられる。また、化合物 5 についても化合物 2 と同様に脂肪酸 リポキシゲナーゼ系では ESR 信号の減衰が観測されたが、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素種発生系では信号の減衰が観測されなかった。以上より、開発した化合物は脂質ラジカルに対して高い選択性を示すことが確認できた。

続いて、培養細胞において開発化合物が脂質ラジカル産生時に細胞に貯留するかどうかを検討した。 $[^{125}\text{I}]5$ とともにアラキドン酸を添加した場合 (脂質ラジカル産生亢進) と添加しなかった場合とでは、15 分まで経時的に取り込み量が増大した (Figure 1)。また、アラキドン酸と同様の疎水性を示すが脂質過酸化を促進しないアラキジン酸を添加した場合と比較しても、アラキドン酸を添加した場合において、細胞取り込み量の有意な増大が見られた。このことから、化合物は添加脂肪酸の影響に依らず、脂質ラジカルの発生に応答して細胞へ貯留することが示唆された。一方、 $[^{125}\text{I}]9$ では、アラキドン酸添加の有無にかかわらず細胞取り込み量に変化は見られなかった。

以上より、開発化合物は、脂質ラジカルとの反応により、細胞内に滞留するものと考えられる。

(3) 病態モデル動物での検証

$[^{125}\text{I}]5$ の健常マウスにおける体内動態を評価したところ、投与直後では特に肝臓への集積が高かった。つづいて、四塩化炭素投与による急性肝炎モデルマウスへ $[^{125}\text{I}]5$ および $[^{125}\text{I}]9$ 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、脾臓、肺などへの $[^{125}\text{I}]5$ の集積が $[^{125}\text{I}]9$ に比べて優位に高かった。この結果より、開発化合物が生体内

化合物 2 はリノール酸 リポ

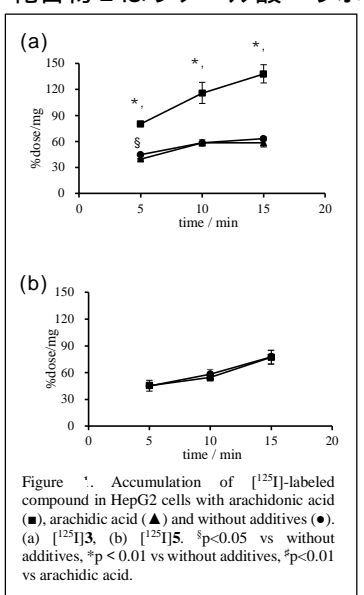


Figure 1. Accumulation of $[^{125}\text{I}]$ -labeled compound in HepG2 cells with arachidonic acid (■), arachidonic acid (▲) and without additives (●). (a) $[^{125}\text{I}]3$, (b) $[^{125}\text{I}]5$. * $p < 0.05$ vs without additives, * $p < 0.01$ vs without additives, * $p < 0.01$ vs arachidonic acid.

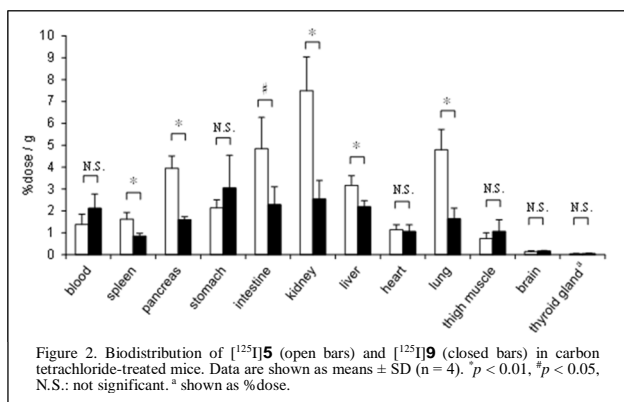


Figure 2. Biodistribution of $[^{125}\text{I}]5$ (open bars) and $[^{125}\text{I}]9$ (closed bars) in carbon tetrachloride-treated mice. Data are shown as means \pm SD ($n = 4$). * $p < 0.01$, * $p < 0.05$, N.S.: not significant. * shown as %dose.

で発生した脂質関連のラジカルと反応し、その場に滞留することで、これらのラジカルを検出できることが示唆された。昨今、活性酸素種に対する放射性プローブの開発が活発になりつつあるが、脂質由来の炭素ラジカルを標的とする放射性プローブは本研究によるものが初めてである。活性酸素やフリーラジカルは、多くの疾患との関与が示されており、疾患との関連性を解明するツールとしてこれらのプローブが活用され、新たな診断法や治療薬の創出につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 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 -

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 bio-reduction 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 無
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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toshihide Yamasaki, Kohei Sano, Masayuki Munekane, Takahiro Mukai
2. 発表標題 Synthesis and evaluation of radioiodinated nitroxide probe for lipid alkyl radicals 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78回日本癌学会学術総会
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、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大会
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 生体内脂質アルキルラジカル検出に向けた放射性ヨウ素標識ニトロキシドの開発 Development of radioiodinated nitroxide probe for in vivo imaging of lipid alkyl radicals
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性薬品科学研究会 / 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 Development of radioiodinated nitroxides for the in vivo detection of lipid radicals
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〕

-

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