

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790920
 研究課題名(和文) 脳内異物排出システムの非侵襲的定量評価を目的とするプローブおよび測定法の開発
 研究課題名(英文) Development of probes and methods for noninvasive and quantitative assessment of efflux systems in the brain
 研究代表者
 岡村 敏充 (Okamura Toshimitsu)
 独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員
 研究者番号：80443068

研究成果の概要(和文)：血液脳関門に存在する異物排出システムは有毒な異物や不要な代謝物を積極的に除去することによって脳組織を保護している。本研究では、脳内の異物排出システムをインビボで非侵襲的かつ定量的に測定するための放射性プローブの開発を行った。その結果、考案したプローブは脳内に入った後、グルタチオン抱合体に変換され、MRP1 と呼ばれるトランスポーターにより特異的に排出された。本研究成果は従来のプローブでは困難であった脳内排出システムの非侵襲的定量測定が可能となったことを示す。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop radioactive probes for noninvasive and quantitative measurement of brain efflux systems. The novel probe readily enters the brain and is converted to its glutathione conjugate, which is specifically transported by an efflux transporter MRP1. The probe can measure brain efflux systems noninvasively and quantitatively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射性医薬品、PET薬剤

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門に存在する異物排出システムは、脳内に侵入する有毒な異物や不要な代謝物を排除することによって脳組織を保護している一方で、異物として認識された中枢作用薬物の脳移行性は低下し、効果が得られない場合がある。また、排出システムの機能が神

経変性疾患の発症や進行に関与していることが報告されていることから、脳内排出システムの機能の非侵襲的・定量的測定が可能となれば、薬物治療の改善や脳疾患の早期診断や病態解明に大きく貢献することが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は脳内の排出システム機能の非侵襲的定量測定を可能とする放射性プローブおよび方法論を開発することである。

3. 研究の方法

(1)測定原理

脳内の異物排出システム機能を非侵襲的かつ定量的に測定する目的で、Metabolite Extrusion Method (MEM) という方法を考案した (図1)。MEMでは、脂溶性の放射性プローブを静脈内投与し、拡散によって脳内に取り込ませ、脳内で速やかに水溶性の基質に変換させる。投与直後の脳内放射能はプローブと基質の双方に依存して減少するが、一定時間経過後、即ち、プローブの消失後、放射能の減少は基質のみに依存し、排出システムの非侵襲的定量測定が可能となる。MEMにおけるプローブは、i)高い血液脳関門透過性、ii)速やかな水溶性基質への変換が必要である。本研究では異物排出トランスポータの多剤耐性関連タンパク質1(MRP1)を標的として、MRP1基質のグルタチオン(GSH)抱合体を脳内に送達するため6-bromo-7-methylpurine (7Br)を設計し、MRP1プローブとしての評価を行った。

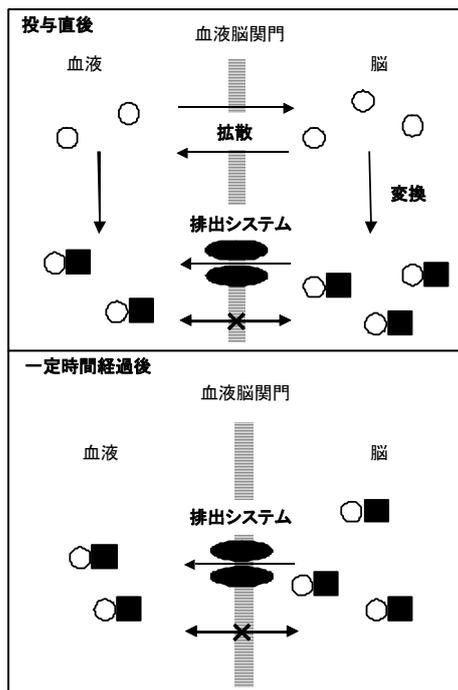
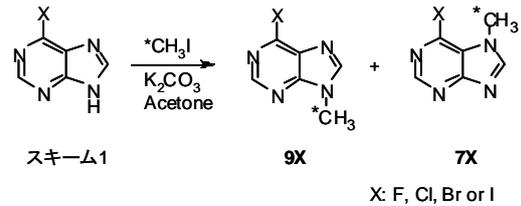


図1. 新規測定法 (MEM)

○: 放射性プローブ, ◼: 水溶性基質

(2)標識合成

^{14}C または ^{14}C 標識化合物の合成はアセトン中で炭酸カリウム存在下 6-halopurine と ^{14}C または ^{14}C ヨウ化メチルによるメチル化反応によって標識合成を行った (スキーム1)。



(3)PETを用いた脳内動態の検討

小動物用のPET(positron emission tomography)装置を用いてマウスにおける ^{14}C 標識プローブの脳内動態を評価した。また、投与後15分以降の動態から脳内で変換した7Brのグルタチオン抱合体(PSG)の排出速度を測定した。さらに、排出トランスポータMRP1、MRP2、P糖タンパク質(Pgp)、乳癌耐性蛋白質(BCRP)のノックアウト(KO)マウスを用いて排出速度を比較した。

(4)GSHに対する反応性の評価

マウス、ラットおよびサルの大脳皮質ホモジネート中あるいはリン酸緩衝液中における種々の ^{14}C 標識プローブとGSHとの反応性を評価した。

4. 研究成果

(1)MRP1プローブの創製

① ^{14}C 7Brの合成

^{14}C 7Brは放射化学的収率4~9%、放射化学的純度95%以上、比放射能40~84 GBq/ μmol 、合成時間(照射終了時から)約30分で得られた。

②血液脳関門透過性と基質への変換

プローブは速やかに脳内に入り、その後効率よく水溶性基質へ変換することが必要である。図2は ^{14}C 7Brあるいは ^{35}S PSGをマウスに静脈内投与後、解剖法による大脳における取り込みを示す。 ^{14}C 7Brは投与後1分で高い脳内取り込み(4.5% ID/g)を示し、その後速やかに減少した。さらに、投与15分後の脳内化学形を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、7Brは消失し大部分GSH抱合体(PSG)であることが確認された。これらの結果は高い血液脳関門透過性と速やかな水溶性基質への変換というプローブの条件を7Brが満たしたことを示す。また、変換された水溶性のPSGは単純拡散により血液脳関門を通過しないことが必要である。 ^{35}S PSGは親化合物の ^{14}C 7Brに比べ1分から60分まで脳内放射能は低値を示し、PSGの単純拡散による脳移行性はほとんどないことが示唆された。

③プローブの脳内動態

図3は野生型およびMrp1KOマウスにおける ^{14}C 7Brの脳内動態を示す。 ^{14}C 7Brは投与

後 1.5 分において共に高い取り込みを示した。しかしながら、その後の動態に顕著な違いが認められた。すなわち、野生型マウスでは脳内放射能は速やかに減少したのに対して、Mrp1KO マウスでは 60 分までほぼ一定の値を示した。これらの結果は、脳内で変換された $[^{14}\text{C}]\text{PSG}$ は Mrp1 によって血液中に排出されていることを示唆している。

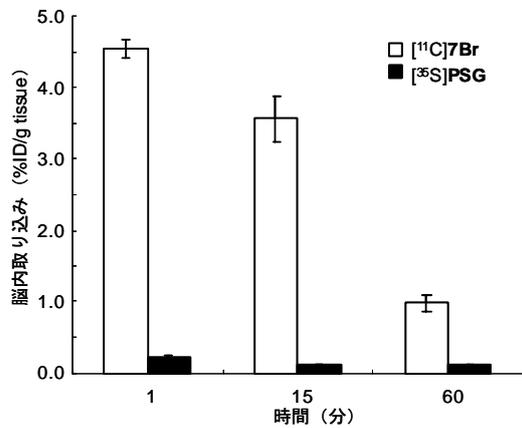


図2. 放射性プローブ投与後の脳内取り込み量

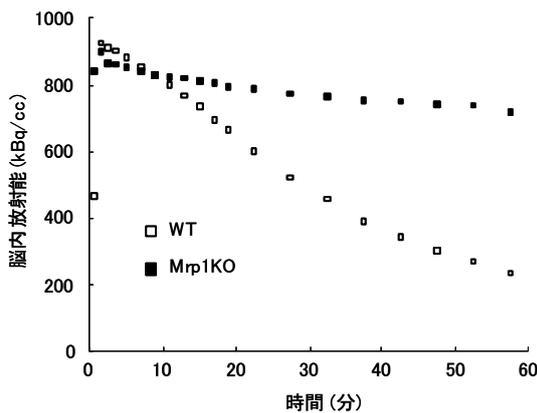


図3. 時間-放射能曲線

④種々の KO マウスにおける排出速度の比較
MRP1 に加えて血液脳関門上では MRP2、Pgp、BCRP といったトランスポーターが異物排出に重要な役割を果たしている。そこで、 $[^{14}\text{C}]\text{PSG}$ の排出に対するこれらのトランスポーターの関与を検証した。その結果、Mrp2KO および Pgp/Bcrp ダブル KO マウスにおける $[^{14}\text{C}]\text{PSG}$ の脳からの排出速度は野生型マウスと同程度であった(図 4)。従って、 $[^{14}\text{C}]\text{PSG}$ は Mrp1 によって特異的に排出されていることが考えられる。

以上、MEM に基づき設計した PET プローブは血液脳関門を容易に通過し、脳内で速やかに GSH 抱合体に代謝され、この抱合体は MRP1 に

よって特異的に脳から排出されたことから、脳内の MRP1 機能の非侵襲的定量測定が可能であるとともに、MEM の妥当性が示された。これまでに開発された $[^{14}\text{C}]\text{ペラパミル}$ などの PET プローブは脂溶性の基質であるため脳内に入った後、排出システムによって排出されるだけでなく拡散によっても脳から血液中に洗い出される。このため、排出システムによる排出と拡散による排出を区別することができないので、定量測定は非常に困難である。また、プローブは基質として認識されるため正常状態ではほとんど脳内に入らず、排出システムの機能が低下した場合のみ画像として検出できる。一方、MEM では図 1 に示すように、脂溶性の親化合物 $[^{14}\text{C}]\text{7Br}$ を脳内に取り込ませ、速やかに基質に変換させる。その後、親化合物が完全に消失した後、脳内放射能から基質のみの排出速度を測定するので、非侵襲的かつ定量的な測定が可能となる。さらに、MEM は正常状態でのプローブの排出速度を基準としているので、機能の亢進および低下、いずれも測定できると考えられる。本研究において開発された MEM に基づく PET プローブはこれまでの脳内排出システム機能のイメージング薬剤の測定精度および定量性を大きく上回るプローブであると考えられる。また、中枢作用薬物が異物排出システムに認識され脳内に入らない場合、排出システムを他の薬物によって阻害することは有効な手段である。この時、定量的に、即ち、どの程度阻害できるかをインビボで推定することは副作用を招かず投与量を決定するのに重要である。本研究で開発された MEM 型 PET プローブはこのような薬剤評価に対しても大きく貢献できることが期待される。

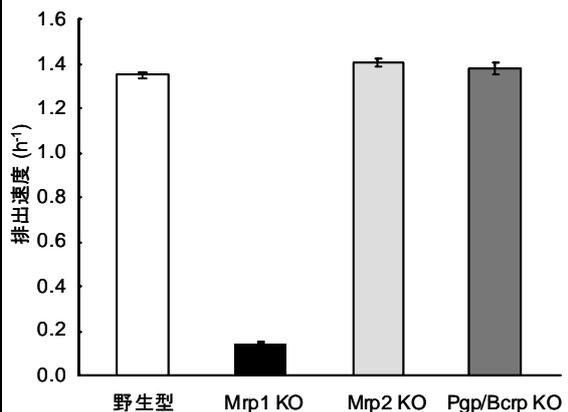


図4. 種々のKOマウスにおけるGSH抱合体の排出速度の比較

(2) 種差の問題解決のための速度調節

MEM で脳内の異物排出システム機能を非侵襲的定量的に測定するにはプローブが速やかに基質に変換することが重要である。変換速度が遅い場合には、脳内放射能は常にプローブと基質の双方に依存して減少するので、排

出システム機能を定量測定することは困難である。本研究で開発した ^{14}C **7Br** はマウス脳においてこのプローブの条件を満たした。しかしながら、GSH S-トランスフェラーゼを介するGSH 抱合反応には種差が報告されており、マウスだけでなくヒトやサルなど様々な種に対応するためには、 ^{14}C **7Br** のGSH に対する反応性を調節する必要がある。そこで、**7Br** に基づき 6-halo-9-methylpurine (**9X**, X= F, Cl, Br または I) および 6-halo-7-methylpurine (**7X**) を設計し、マウス、ラットおよびサルの大脳皮質ホモジネート、リン酸緩衝液中におけるGSH との反応性を評価した (表1)。設計した 6-halopurine 誘導体はGSH 以外のチオール基と反応する可能性があるが、全ての化合物に関して、ホモジネート中でのGSH との反応速度はリン酸緩衝液中での反応速度よりも10倍以上増加した。このことから6-halopurine 誘導体は脳内で特異的にGSH 抱合体に変換されることが示唆された。また、いずれのホモジネートにおいてもプリン環のメチル基を7位に導入した化合物 **7X** は対応する異性体 **9X** に比べGSH に対する反応性が増加した。特にハロゲンがCl、Br、またはIの時に顕著な差が現れた。Fを除いたハロゲン間で反応速度を比較すると、Cl<Br<Iの順で反応性が増大する傾向が認められた。さらに、リン酸緩衝液中においても、**7X** は対応する異性体 **9X** に比べGSH に対する反応速度が増加したことから、メチル基をプリン環7位に導入することにより6-halopurine 誘導体の電子吸引性が増大することが考えられる。

化合物	反応速度			
	リン酸緩衝液	マウス	ラット	サル
9F	0.0068	0.14	0.071	0.53
9Cl	0.00040	0.026	0.0072	0.033
9Br	0.00077	0.060	0.025	0.033
9I	0.00077	0.044	0.034	0.022
7F	0.024	0.68	0.79	2.0
7Cl	0.0016	0.34	0.51	0.13
7Br	0.0047	1.4	1.5	0.44
7I	0.0055	2.5	4.3	1.3

表1. リン酸緩衝液中でのGSHとの反応速度 (min^{-1}) および大脳皮質ホモジネートでの反応速度 ($\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}\text{mL}^{-1}$)

以上、広範なGSH との反応性を有する8つの6-halopurine 誘導体を得ることに成功した。このことから、 ^{14}C **7Br** を化学修飾することにより、様々な種に対応できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Okamura, T.; Kikuchi, T.; Okada, M.; Toramatsu, C.; Fukushi, K.; Takei, M.; Irie, T. Noninvasive and quantitative assessment of the function of multidrug resistance-associated protein 1 in the living brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009, 29, 504-511. 査読有
- ② Okamura, T.; Kikuchi, T.; Fukushi, K.; Irie, T. Reactivity of 6-Halopurine Analogs with Glutathione as a Radiotracer for Assessing Function of Multidrug Resistance-Associated Protein 1. *J Med Chem* 2009, 52, 7284-7288. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① Okamura, T. et al., 6-Bromo-7- ^{14}C -methylpurine is a Specific Probe for the ABC Transporter Mrp1, but not for Mrp2, Pgp, and Bcrp, Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, 2009/10/13, Barcelona International Convention Center, Barcelona.
- ② Okamura, T. et al., Evaluation of the conversion rate of 6-halogenopurine derivatives as a probe for assessing mrp1 function, 18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, 2009/7/14, Shaw Conference Centre, Edmonton.
- ③ Okamura, T. et al., A PET Probe for Quantitatively Assessing the Efflux Transport Function of Multidrug Resistance-Associated Protein 1 in the Brain, World Molecular Imaging Congress, 2008/9/13, The Acropolis Convention Center, Nice.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 敏充 (OKAMURA TOSHIMITSU)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号: 80443068

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし