

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：20790924

研究課題名 (和文) 高精度多剤耐性タンパク質活性測定放射性プローブの開発研究

研究課題名 (英文) Development of a radioprobe for quantifying the activity of multidrug resistance protein

研究代表者

菊池 達矢 (KIKUCHI TATSUYA)

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：90392224

研究成果の概要 (和文)：本研究では、多剤耐性タンパク質の活性を定量測定し得る放射性プローブの開発研究を行った。なかでも P 糖タンパク質の測定は、薬剤開発や薬物治療方針の策定に大きく寄与するが、インビボにおける定量的な測定は未だ成し遂げられていない。そこで本研究では、これまでに開発した方法論と化合物を応用し、当該目的を達成する放射性プローブの開発を推進した。P 糖タンパク質の基質と考えられた既存化合物についての検討において、当該化合物の脳からの排出には未知の薬剤排出タンパク質の関与が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The aim of this study is to develop a radioprobe for quantifying the activity of multidrug resistance protein. The in vivo measurement of P-glycoprotein activity would be useful for development of drugs and optimizing the dose, whereas the method has not been established. In this study, we evaluated the compound, which was considered to be a substrate for P-glycoprotein, to achieve the aim. However, the extraction of the compounds from the brain was considered to be mediated by the other unknown transporters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射性科学

キーワード：多剤耐性タンパク質・放射性プローブ・PET・脳

## 1. 研究開始当初の背景

P 糖タンパク質 (P-gp) は、有害な代謝物や異物を体外へ排出し、体や脳を守る機能を持つ。近年話題のインフルエンザ治療薬であるタミフルは P-gp の基質であり、成熟した血

液脳関門では脳への移行は極めて少ないことが知られている (Morimoto K. et al., Drug Metab Dispos. 16, 2007)。その一方、このような脳血管に存在する P-gp がある種の薬物の脳移行を阻み、腫瘍においては薬剤耐性

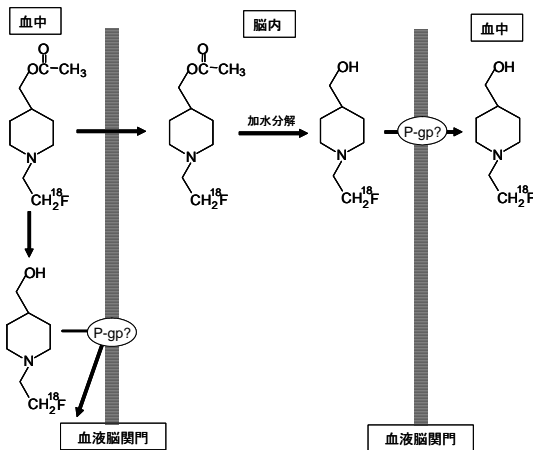
に關与することは薬物治療における障壁となつてゐる。また、P-gp 発現の低下がクロイツフェルトヤコブ病やアルツハイマー病において報告されており、この P-gp 活性低下がプリオンやアミロイドの排泄を遅延させ、神経毒性物質の蓄積に關与することを示唆している (Vogelgesang S. et al., *Acta Neuropathol* (Berl). 111, 2006; Cirrito JR. et al., *J Clin Invest.* 115, 2005)。これらのことから、P-gp 活性を測定することは、治療薬剤の脳移行性の検討や、腫瘍や脳神経疾患における薬剤耐性の評価、また神経変性疾患における病態もしくは病因の解明に大きく寄与すると期待される。

現在、様々な P-gp 活性を測定を目的とする放射性プローブが開発されており (Sharma V. *Bioconjug Chem.* 15, 2004.)、特に<sup>14</sup>Cベラパミルと<sup>99m</sup>TcMIBI の研究が多くなされているが、これらは P-gp 基質であり、脳を測定対象とした場合、正常脳への移行性が低いため変化の定量性が乏しく、腫瘍のように P-gp の活性が上昇しても応答性に欠ける。また、<sup>14</sup>Cベラパミルは血中において代謝物を生成し解析を困難にし、<sup>99m</sup>TcMIBI は P-gp のみならず他のトランスポータの基質でもあり、その動態は P-gp 特異的でない。

## 2. 研究の目的

これまでに我々が開発した薬物排泄トランスポータの測定原理を用いて、P-gp 活性を定量測定し得るプローブの開発を行なう。定量的な測定は、P-gp 基質を組織内で生成する、いわばプロドラッグのようなプローブにより対象組織に放射能を送達し、組織内で生じた代謝物放射能のクリアランスを測定することで可能となる。これまでの検討から、P-gp 基質の候補には、N-フルオロエチル-4-ピペリジンメタノール (FEP-4MOH) が有望だと考えられる。このアセチルエステル体は、脳内で加水分解され、生じた FEP-4MOH は脳内から比較的速やかに排出される一方、血液

図 1



中で生じたアルコール体は脳内に移行しない。この結果は、FEP-4MOH はなんらかのトランスポータにより脳から排出されることを強く示唆した (図 1)。ここで、FEP-4MOH はアミンであることから、およそ中性な脳内ではプロトン化したカチオンの割合が多いことが予想され、有機カチオンを輸送する P-gp が排泄に關与していると考えられる。以上から、本研究は他と一線を描き、新しいアプローチをもって P-gp 活性を定量測定し得るプローブの開発であると位置づけられる。

## 3. 研究の方法

(1) インビトロにおける P-gp の FEP-4MOH 認識の検討

① P-gp の ATPase 活性を利用した純粋な系において、FEP-4MOH の Chinese hamster 由来 P-gp による認識をインビトロで検討した。

② ヒト由来乳がん耐性タンパク質 (BCRP) および多剤耐性関連タンパク質 (MRP1-MRP 5, MRP8) のインサイドアウト膜小胞を用いて、FEP-4MOH の小胞への取り込みを検討した。

(2) インビボにおける P-gp の FEP-4MOH 認識の検討

FEP-4MOH の排泄には、有機カチオンを輸送する P-gp が排泄に關与していると考えられる一方、BCRP や MRP の關与も考えられることから、P-gp、BCRP および MRP のそれぞれ、もしくは共にノックアウトしたマウスでの FEP-4MOH の動態を検討した。さらに、全排出速度にはピラミントランスポータの關与も考えられる。そこでピラミントランスポータの FEP-4MOH 認識の検討も行った。ピラミントランスポータの基質であるピラミンを阻害剤として用い、マウスにピラミンと<sup>18</sup>F]FEP-4MOH のアセチルエステルを同時投与し放射能の脳クリアランスを小動物用ポジトロン断層撮像法 (PET) で評価した。

(3) 4-ヒドロキシ 1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリンの誘導体の検討

P-gp の基質であることが示唆される 4-ヒドロキシ 1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリンの誘導体について設計を行った。4-ヒドロキシ 1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリンは、Ramらの方法により得ることができる (Indian J. Chem. 16B, 1978)。

## 4. 研究成果

(1) インビトロにおける P-gp の FEP-4MOH 認識の検討

① P-gp の ATPase 活性を利用した純粋な系における FEP-4MOH の P-gp 認識をインビトロで検討した結果を表 1 に示す。P-gp に認識されない 5-フルオロウラシル、シスプラチン、メトトレキサート、ナプロキセンおよびスク

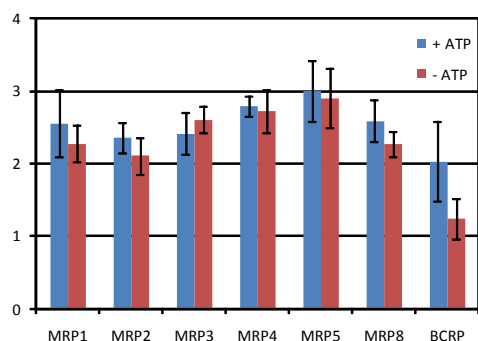
コースのネガティブコントロール群では、ATPase 活性を認めることは無かったが、P-gp によって認識されることが知られているキニジンおよびベラパミルでは ATPase 活性を認め、FEP-4MOH についても濃度依存的な ATPase 活性を認めた。このことから、FEP-4MOH は、キニジンおよびベラパミルと同様に P-gp によって組織から排出されることが示唆された。

表 1

	化合物濃度 (μM)	ΔmAbs/min		
		0.05	0.5	5
Negative Control	5-fluorouracil	0.92	0.91	0.92
	cis-platinium	0.95	0.90	1.0
	methotrexate	1.1	1.1	1.0
	naproxen	0.94	0.94	0.94
	sucrose	0.84	0.89	0.91
Positive Control	Quinidine	0.99	1.2	1.9
	Verapamil	1.1	2.0	2.8
評価化合物	FEP-4MOH	1.0	2.2	3.6

② ヒト由来乳がん耐性タンパク質 (BCRP) および多剤耐性関連タンパク質 (MRP1-MRP 5、MRP8) のインサイドアウト膜小胞を用いた、FEP-4MOH の小胞への取り込みの結果を図 2 に示す。FEP-4MOH は、いずれのトランスポーターに対しても有意な ATP 依存的取り込みを示さなかった。

図 2

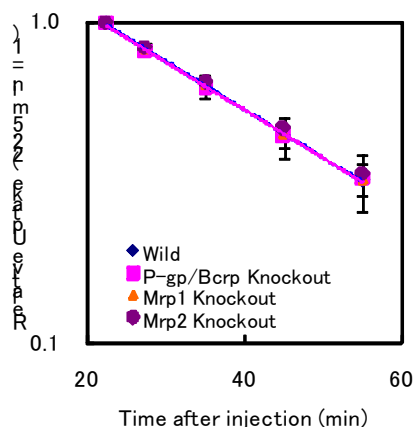


(2) インビボにおける P-gp の FEP-4MOH 認識の検討

P-gp (Mdr 1a/1b)、BCRP および MRP のそれぞれ、もしくは共にノックアウトしたマウスでの  $[^{18}\text{F}]$ FEP-4MOH の脳内動態および、ピラミンを同時投与した時の脳内動態を図 3 に示す。 $[^{18}\text{F}]$ FEP-4MOH のアセチルエステルを投与した後、20 分からの脳からの放射能の消失速度は、いずれの場合でもほぼ完全に一致した。すなわち、脳からの放射能の消失速度は再現性が高い一方、マウスにおいては FEP-4MOH の脳からの排出に P-gp、BCRP、MRP (1-5、8) およびピラミントランスポーターの関与は低いことが示唆された。

(3) 以上の検討により、FEP-4MOH の脳から

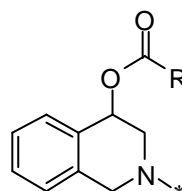
図 3



の排出には Chinese hamster の P-gp が関与する一方で、マウスの P-gp は関与しないことが示唆されたことは、FEP-4MOH の脳からの排出に種差があることが示唆された。今後、Chinese hamster の P-gp の関与の再検討とともに、マウスにおける脳からの FEP-4MOH の排出に関与するトランスポーターの探索が必要と考えられる。

(4) 4-ヒドロキシ 1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリンの誘導体の検討  
P-gp の基質であることが示唆される 4-ヒドロキシ 1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリンの N-メチル誘導体を脳で生成すると期待される化合物 (図 4、\* ; 標識部位) について合成法を図 5 に示す。

図 4

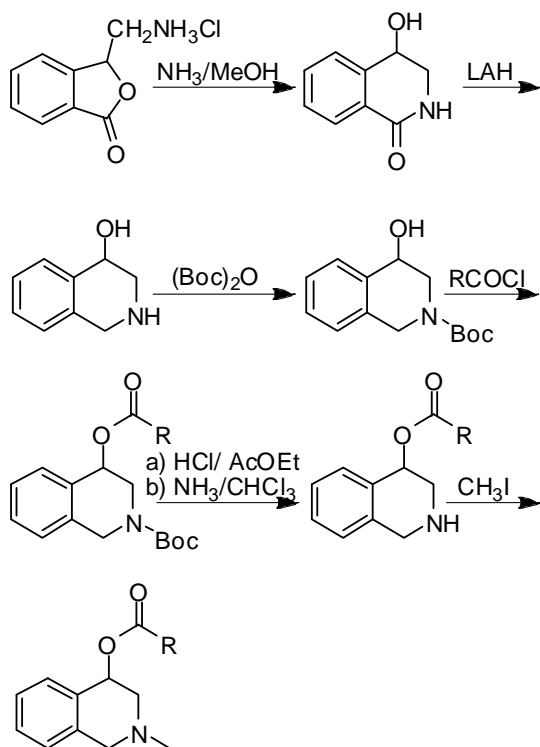


今後、合成した N-メチルイソキノリン誘導体のアルコール体について、P-gp を発現した小胞へ取り込みの検討、エステル体については脳組織中で加水分解について検討を進める。

(5) 総括

本研究では、多剤耐性タンパク質の活性を定量測定し得る放射性プローブの開発を行い、なかでも P-gp を測定対象としたプローブの開発研究を推進した。FEP-4MOH は、血液から脳への移行は極めて低い一方、脳からは排出されることから、なんらかの排出機構の関与が示唆され、なかでも P-gp の関与が有力視されていたが、ヒト BCRP、MRP1-5 および 8 を発現 (inside-out) した小胞への FEP-4MOH

図 5



の取り込みは認められず、また P-gp、BCRP、および MRP1, 2 をノックアウトしたマウスにおける脳からの排出速度も野生型と同じであった。以上のことから、FEP-4MOH のマウスにおける脳からの排出には P-gp、BCRP、MRP1 もしくは MRP2 のどのトランスポーターも関与しないことが示唆された。さらにピリラミントランスポーターの関与について検討したが、いずれのトランスポーターの関与も示されなかったことから、さらなるトランスポーターの探索が必要と考えられた。FEP-4MOH と類似の構造を持つ N-メチル-4-ピペリジノールは、げっ歯類においては脳から血液に速やかに排出されるが、ヒトやサルの霊長類では脳から血液への排出は極めて遅く、この脳からの排出に関する種差の要因は不明であった。本研究の結果から、FEP-4MOH の脳からの排出は種によって P-gp が関与することが示唆されたことから、霊長類においては P-gp が関与する可能性があり、今後ヒト P-gp を用いた検討を行う必要がある。一方、FEP-4MOH の脳からの排出に種をまたいだ普遍的な P-gp の関与が認められなかったことから、P-gp を測定対象としたプローブに関しては、P-gp の基質であることが示唆される 4-ヒドロキシ 1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリンの誘導体について設計を行った。今後、イソキノリン誘導体のアルコール体について、P-gp を発現した小胞へ取り込みの検討、エステル体については脳組織中で加水分解について検討を進める。

## 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)

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菊池 達矢 (KIKUCHI TATSUYA)

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：90392224