

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08061

研究課題名(和文) 原発性アルドステロン症の核医学検査法の開発

研究課題名(英文) Development of nuclear medicine imaging technology in the diagnosis of primary aldosteronism

研究代表者

木村 寛之 (KIMURA, HIROYUKI)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50437240

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)：アルドステロン合成関連酵素CYP11B2を特異的に描出できる放射性標識プローブを目指し、既報のプローブの構造情報を基に新規プローブの開発を行った。合成した化合物群を用いてCYP11B1とCYP11B2に対する阻害活性を評価したところ、CYP11B2に対して特異性の高い化合物を得ることに成功した。候補化合物の動物での体内分布動態の評価から、副腎に高い集積を示す化合物を得ることに成功した。最後に、患者から提供されたアルドステロン産生腺腫組織切片を用い、新規プローブのARGを実施したところ免疫組織染色でCYP11B2に陽性を示す領域に強く集積する化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性アルドステロン症(PA)は、高血圧患者の約5-6%を占め、代表的な二次性高血圧の一つである。PAは主にアルドステロン産生腺腫(APA)と特異性アルドステロン症に大別される。APAの局在診断には副腎静脈サンプリングが必須であるが、技術的に成功率が高い施設に限られており、また、患者さんへの負担も大きく、代替の簡便な局在診断法の開発が望まれている。新規分子イメージングプローブに基づく新たなAPAの検査法を開発できれば、日本発・世界初の普及可能な検査として、多くの患者を治療に結びつけることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：To develop a new radiolabeled probe for PET (Positron Emission Tomography) and SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) that can specifically detect aldosterone synthesis-related enzyme CYP11B2, we have developed a new probe based on the structural information of previously reported imaging probes. The synthesized compounds were evaluated for their inhibitory activity against CYP11B1 and CYP11B2, and a compound with high specificity for CYP11B2 was successfully obtained. From the evaluation of the distribution kinetics of the candidate compounds in mice, we succeeded in obtaining compounds that showed high accumulation in the adrenal gland. Finally, we performed an ARG (autoradiography) on candidate compounds using tissue sections of an aldosterone-producing adenoma provided by a patient, and found a compound that strongly accumulated at sites where CYP11B2 was positive by immunohistochemistry.

研究分野：放射薬学

キーワード：アルドステロン産生腺腫 CYP11B2 イメージングプローブ PET SPECT

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

高血圧では、患者数が 3500 ~ 4000 万人もいる国民病のひとつである。その分類は、原因が明らかにでない本態性高血圧とホルモン異常などによって生じる二次性高血圧に分類される。二次性高血圧の原因疾患のひとつとして、アルドステロン産生腺腫 (APA) が引き起こす原発性アルドステロン症 (PA) の割合が高いことが明らかとなってきた。その潜在患者数は 200 ~ 400 万人とも言われ、脳卒中・心不全のリスクが本態性高血圧よりもはるかに高い。APA は年齢や生活習慣に関係無く、副腎の異常により発症するが、病巣が片側性の場合には手術により根治できる。しかし現在の診療では手術方針の決定に、高度な技術を要し高価で侵襲性の高いカテーテル検査 (AVS) を必要とするため、実施可能な施設も限られており診断も治療も満足に実施されていないのが現状である。そこで、多施設で実施可能な非侵襲的かつ高精度な APA 診断法の開発が急務となっている。

現在、CT、MRI を用いた形態学的な診断が試みられているが、副腎の大きさだけでは診断できず、さらに CT 陰性でもアルドステロンを産生している場合があるため、AVS との比較では正診率が 6 割程度と満足のいく結果が得られていない。そこで、陽電子放射型断層撮影 (PET) や単光子放射型コンピュータ断層撮影 (SPECT) などのイメージング手法を用いた機能診断が今後増加する患者に対応できる唯一の診断法となり得ると考えている。

2. 研究の目的

前述の課題に対して申請者は、PET、SPECT を代表とする核医学画像診断法の利用がその解決法の 1 つと考えている。現在、副腎皮質の形態的变化・機能評価する副腎皮質シンチグラフィのための放射性薬剤として ^{131}I -アドステロールが上市されているが、クッシング症候群などコルチゾールの産生を捉えるのには有効なものの、副腎皮質ステロイドの中で相対的に産生量の少ないアルドステロン産生の局在を捉えるのは困難である。

そこで本研究課題では、原発性アルドステロン症患者のいくつかの病型で発現の亢進が知られているアルドステロン合成関連酵素 CYP11B2 (図 1) を特異的に描出できる放射性標識プローブを開発し、APA に対する特異的なイメージング手法の開発を目指す。本研究の成果は、慢性疾患である PA の世界初の非侵襲的な診断法の開発となりうる。また、AVS より簡便で非侵襲的であるため、有効なイメージングプローブを開発でき上市されれば、PA の標準的な局在診断法になる可能性が高い。また、手術後の薬物治療費を減らせることによっても、医療経済効果につながると期待する。

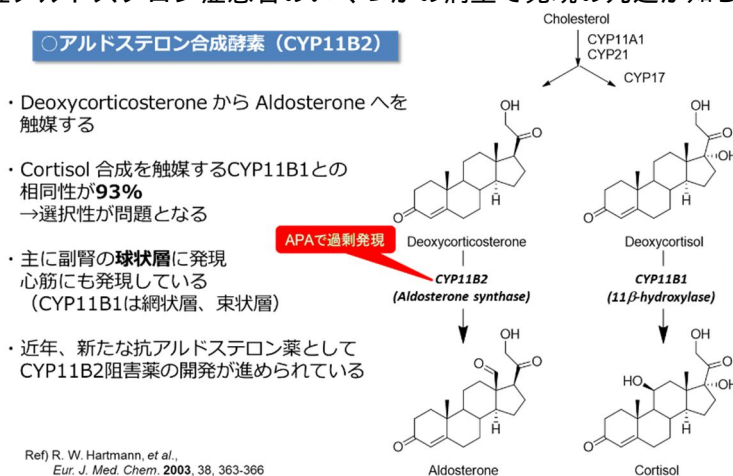
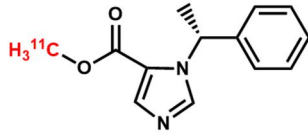


図 1 アルドステロン合成酵素

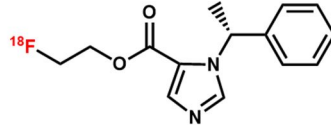
3. 研究の方法

(1) 候補化合物の合成と選定

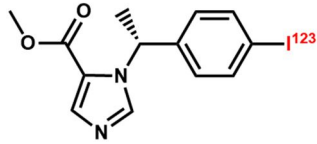
図 2 に示す既に報告されている化合物 ((R) - ^{11}C -Metomidate, (R)- ^{18}F -FETO, (R)- ^{123}I -IMTO, (R , S)-Fadrozole) の情報を基に新規化合物を設計・合成し、既に確立済みのインビトロ評価系を利用して標的への親和性・選択性の評価を行った。CYP11B2 への親和性が数 nM レベル、更に CYP11B2/CYP11B1 の選択性が 10 倍以上の化合物については、イメージングに十分な親和性を有していると考え、インビボスクリーニングへ移行した。



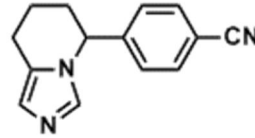
(R)-¹¹C-Metomidate
PA患者への投与実績あり



(R)-¹⁸F-FETO
健康人への投与実績あり



(R)-¹²³I-IMTO
副腎癌、副腎偶発腫瘍患者への投与実績あり



(R, S)-Fadrozole
CYP11B1, CYP11B2及びCYP19に
結合能を持つと報告されている

図2 既報のPET, SPECT用イメージングプローブ

(2) 候補化合物の動物での体内分布動態の評価、PET や SPECT を利用したイメージング

健康マウス、ラットに放射性標識したプローブを投与して経時的に屠殺し、各臓器の重量および集積した放射能を測定した。副腎への集積性、血液副腎比、副腎肝臓比、副腎腎臓比を指標にプローブの選別を行った。投与後副腎肝臓比は2倍以上、その他の周辺臓器(筋肉・腎臓・膵臓・脾臓など)比は5倍以上を目標に化合物を選別した。また、標的部位に結合する既知の化合物あるいはプローブの非標識体を投与してインビボ阻害実験も行い、副腎に集積した放射能の標的特異性について検討した。

(3) 候補化合物のヒト組織を用いた評価

倫理委員会承認済みであり、同意をいただいた患者より提供されたアルドステロン産生腺腫組織切片と正常副腎組織切片を用いて、ヒト組織での化合物の特異性を評価する方法を検討した。具体的には、患者のアルドステロン産生腺腫組織切片を用い、放射性同位元素で標識した候補化合物を用いてオートラジオグラフィ(ARG)を行い、CYP11B2 が高発現しているアルドステロン産生腺腫に特異的に反応するかを検討した。

4. 研究成果

(1) 候補化合物の合成と選定

プローブの設計・合成：アルドステロンの合成に關与する酵素阻害剤や既報のイメージングプローブの中で、CYP11B2 に高い選択性を示す化合物をインシリコで構造情報を解析し、SPECT、PETプローブを設計した。母体となる化合物を実際合成し、CYP11B1 とCYP11B2 に対する阻害活性を評価したところ、CYP11B2 に対して特異性の高い化合物を得ることに成功した(図3)。そこで、この化合物を母体とした SPECT、PETプローブの合成を実施したところ、目的の標識体を、高い放射化学的収率と放射化学的純度で得ることに成功した。

Compound	CYP11B2 に対する親和性 (IC ₅₀ :nM)	CYP11B1 に対する親和性 (IC ₅₀ :nM)	Selectivity factor (親和性の比: CYP11B1/CYP11B2)
(R)-MTO	0.39 ± 0.17	0.22 ± 0.08	0.56
(R)-IMTO	0.11 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.62
(R)-FETO	0.45 ± 0.10	0.26 ± 0.06	0.56

Compound	CYP11B2 に対する親和性 (IC ₅₀ :nM)	CYP11B1 に対する親和性 (IC ₅₀ :nM)	Selectivity factor (親和性の比: CYP11B1/CYP11B2)
1	0.66 ± 0.10	136 ± 41.3	206
2	0.79 ± 0.17	26.1 ± 28.9	32.8
3	0.98 ± 0.27	78.0 ± 5.44	79.5
4	0.23 ± 0.08	13.4 ± 2.22	58.2
5	136 ± 49.0	>1000	>7
6	4.62 ± 1.41	>1000	>216

図3 CYP11B1, CYP11B2 への親和性及び選択性の評価

(2) 候補化合物の動物での体内分布動態の評価、PET や SPECT を利用したイメージング

健康マウスに放射性標識した化合物を 10%エタノール生理食塩水で調製した。これをマウス 1 匹あたり 37 kBq/100 μ L ずつ尾静脈投与し、5、15、30、60、120 分後 (n = 4) に断頭屠殺し、副腎、膵臓、血液、心臓、肺、胃、小腸、大腸、肝臓、脾臓、腎臓、甲状腺を摘出した。その後、各臓器における放射エネルギーをガンマカウンターで測定し、各臓器の単位重量当たりの RI の集積量 (% injection dose/g) を算出した。その結果、副腎に高い集積を示す化合物を得ることに成功した (図 4)。PET、SPECT を用いたイメージングを実施し、副腎の明瞭な可視化を達成する化合物を見出した (知財対応のためデータ未掲載)。

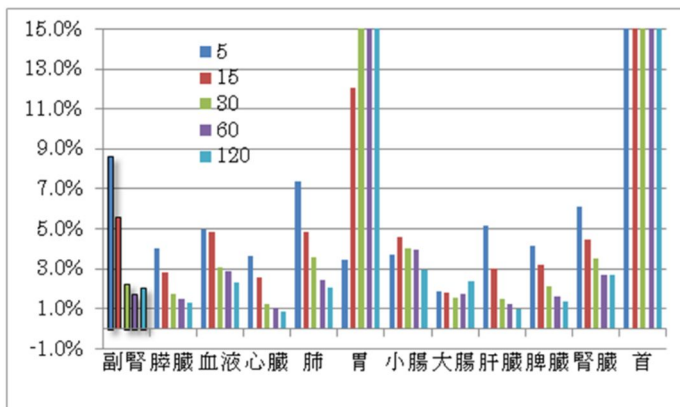


図 4 健康マウスを用いた新規化合物の臓器分布

(3) 候補化合物のヒト組織を用いた評価

患者から提供されたアルドステロン産生腺腫組織切片を用い、CYP11B1 と CYP11B2 の免疫組織染色を行った結果を図 5 に示す。同一切片上で CYP11B1 と CYP11B2 にそれぞれ特異的に染まる切片を用いて、新規化合物の評価を実施することとした。まずは、比較対象となる既存の化合物である [¹²⁵I](R)-IMTO を用いてオートラジオグラフィ (ARG) を実施した結果を図 6 に示す。[¹²⁵I](R)-IMTO は事前に測定した親和性の評価においても CYP11B1 と CYP11B2 に対する選択性が低かったが、ARG による評価でもそれを反映する結果が得られた。そこで、このアルドステロン産生腺腫組織切片と ARG 法を組み合わせたスクリーニングを新規化合物にも適用し、評価を行った。

CYP11B1抗体(Purple) - CYP11B2抗体(DAB)

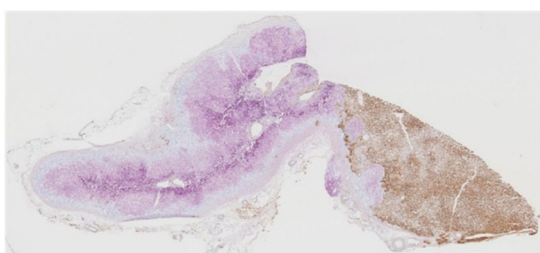
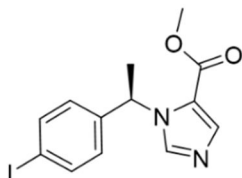
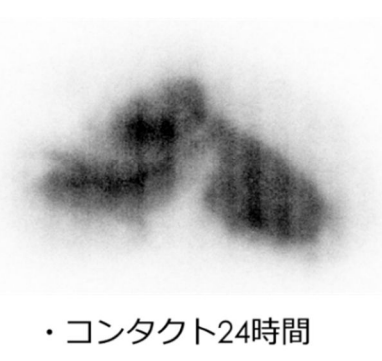


図 5 CYP11B1, CYP11B2 の免疫組織染色



化合物名	CYP11B2 に対する親和性 (IC ₅₀ :nM)	CYP11B1 に対する親和性 (IC ₅₀ :nM)	Selectivity factor (親和性の比: CYP11B1/CYP11B2)
(R)-IMTO	0.11 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.62



・コンタクト24時間

図 6 [¹²⁵I](R)-IMTO を用いたアルドステロン産生腺腫組織切片の ARG

これまでに開発した化合物に対して、ARG による評価を行ったところ免疫組織染色で CYP11B2 に陽性を示す領域に強く集積する化合物を 3 種類見出すことに成功した。報告書では、3 番目に良好な結果が得られた化合物の ARG の結果のみ記載する (図 7)。これにより、ヒト組織での化合物の特異性を評価する方法として、アルドステロン産生腺腫組織切片と ARG を組み合わせた化合物のスクリーニング法を確立した。

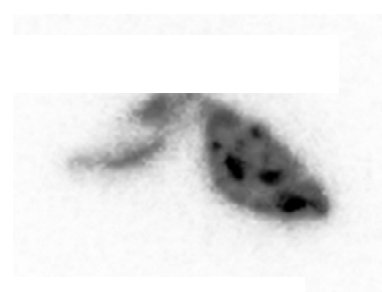


図 7 新規化合物の ARG

結論:

アルドステロン合成関連酵素 CYP11B2 を特異的に描出できる放射性標識プローブを目指し、既報のプローブの構造情報を基に新規プローブの開発を行った。合成した化合物群を用いて CYP11B1 と CYP11B2 に対する阻害活性を評価したところ、CYP11B2 に対して特異性の高い化合物を得ることに成功した。候補化合物の動物での体内分布動態の評価から、副腎に高い集積を示す

化合物を得ることに成功し、さらに PET、SPECT を用いたイメージングでも副腎の明瞭な可視化を達成する化合物を見出した。最後に、患者から提供されたアルドステロン産生腺腫組織切片を用い、新規プローブの ARG を実施したところ免疫組織染色で CYP11B2 に陽性を示す領域に強く集積する化合物を見出した。今後は、臨床研究などを実施し、実際の医療で利用できるイメージングプローブであるか評価を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kondo Yuto, Kimura Hiroyuki, Fukumoto Chiaki, Yagi Yusuke, Hattori Yasunao, Kawashima Hidekazu, Yasui Hiroyuki	4. 巻 64
2. 論文標題 Copper mediated radioiodination reaction through aryl boronic acid or ester precursor and its application to direct radiolabeling of a cyclic peptide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 336 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jlcr.3925	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 Mogi Katsuo, Kimura Hiroyuki, Kondo Yuto, Inoue Tomoya, Adachi Shungo, Natsume Tohru	4. 巻 8
2. 論文標題 Automatic radioisotope manipulation for small amount of nuclear medicine using an EWOD device with a dimple structure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 201809 ~ 201809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.201809	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa Takenori, Kimura Hiroyuki, Torimoto Hanae, Yagi Yusuke, Kawashima Hidekazu, Arimitsu Kenji, Yasui Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 A Putative Single-Photon Emission CT Imaging Tracer for Erythropoietin-Producing Hepatocellular A2 Receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.1c00030	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 Kenji Arimitsua, Yusuke Yagi, Kazuhiro Koshino, Yukina Nishito, Takahiro Higuchi, Hiroyuki Yasui, Hiroyuki Kimura	4. 巻 30
2. 論文標題 Synthesis of 18F-labeled streptozotocin derivatives and an in-vivo kinetics study using positron emission tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2020.127400	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 該当する

1. 著者名 Katsuo Mogi, Hiroyuki Kimura, Yuto Kondo, Tomoya Inoue, Shungo Adachi, Tohru Natsume	4. 巻 -
2. 論文標題 Automatic radioisotope manipulation for small amount of nuclear medicine using an EWOD device with a dimple structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5061/dryad.2z34tmpks	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuto Kondo, Hiroyuki Kimura, Chiaki Fukumoto, Yusuke Yagi, Yasunao Hattori, Hidekazu Kawashima, Hiroyuki Yasui	4. 巻 -
2. 論文標題 Copper-mediated radioiodination reaction through aryl boronic acid or ester precursor and its application to direct radiolabeling of a cyclic peptide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jlcr.3925	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都薬科大学 代謝分析学分野 https://labo.kyoto-phu.ac.jp/taisya/ 京都薬科大学 代謝分析学分野 https://labo.kyoto-phu.ac.jp/taisya/</p>

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			
ドイツ	University Wurzburg			