

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591601

研究課題名（和文） 細胞内情報伝達系分子PKCのPETイメージング法開発のための基礎的研究

研究課題名（英文） Basic study of PET imaging of PKC, a intracellular transduction enzyme

研究代表者

高橋 和弘 (TAKAHASHI KAZUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・イメージング基盤ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：20370257

研究成果の概要（和文）：

脳虚血病態におけるプロテインキナーゼC（PKC）の役割や挙動を明らかにし、臨床応用の可能性を探るため、PETによるPKCイメージング用標識プローブ：N-[<sup>11</sup>C]methyl-bisindolylmaleimideⅢを合成した。放射化学的純度はTLC, HPLCから95%以上、[<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>からの放射化学的収率は30-50%、合成時間は30分であった。マウスを用いた体内分布実験から、ほとんどの放射能は肝と腎に集積し、脳への取り込みは非常に少なかった。血液中の放射能も投与後早い時期から低値を示した。血中クリアランスの早さと脳への集積の低さから脳虚血への応用は難しいと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We synthesize N-[<sup>11</sup>C]methyl-bisindolylmaleimideⅢ, a selective inhibitor for protein kinase C (PKC), in order to estimate the roll of PKC in the ischemic brain. The radiochemical yield was 30-50%, radiochemical purity was >95%. The synthetic time was 30 min. Blood clearance was fast and the concentration in blood was low after few minutes. Bio-distributions of this labeled compound showed high uptake in liver and kidney. The uptake in brain was very low. So this tracer was not suitable for estimation of PKC in the ischemic brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
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

キーワード：シグナル伝達、生体分子、脳神経、標識合成、PKC、PET、分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼ C(PKC)はイノシトールリン脂質を介する細胞内伝達経路で、ジアシルグリセロールにより活性化され、細胞死に対しては抑制的に、生存に対しては促進的に働く重要な分子(リン酸化酵素)である。心筋では PKC の活性化によって虚血による障害を抑制することが、また脳の虚血に対しても PKC が障害の程度に影響を与えることが報告されている。最近 Sun 等により PKC が脳梗塞後の神経細胞死からの救済やシナプス形成をコントロールしていることが報告された。即ち PKC は細胞を生に向かわせる重要な分子と考えられる。このように脳虚血後の細胞の生死についてインジケータとなり得る分子の研究が進められてきた中で PKC は脳虚血後の神経細胞の生死に関連する分子として注目されている訳である。またポジトロンエミッショントモグラフィ (PET) はヒトや動物を対象に生きたまま生体内の機能分子を非侵襲的にイメージングする方法 (分子イメージング法) として注目されている。一方、細胞死 (アポトーシス) のイメージング法にはアポトーシスを起こした細胞の細胞膜の反転により細胞膜内側に局在するフォスファチジルセリンに特異的に結合するアネキシン V の  $^{99m}\text{Tc}$  や  $^{18}\text{F}$  の標識化合物を用いた研究が広く行われている。しかし、アネキシン V は分子量が大きなタンパク質でブラッドブレインバリア (BBB) を通過できず、正常脳組織には集積しないため、脳虚血の評価には不向きであり、他の組織への拡散も制限を受けるという欠

点をもつ。本研究課題の PKC の分子イメージング法は低分子化合物を用いることにより組織透過性は高いことが期待され、さらにアポトーシスが動き出す前に、即ちアネキシン V が集積よりも早い時期に、組織の生死を推定するのに役立つと考えられる。また生に向かう細胞をポジティブにイメージング出来ることが期待されることから、より治療法選択に直結した診断法と位置付けることができる。このように標識分子の動きをイメージングする技術を利用して、PKC 活性に応じた集積の変化がイメージングできる標識薬剤が開発されれば、動物で PKC の活性と脳組織の生死の関係を生きた動物で可視化が可能となり、PKC 変化と虚血部位の細胞の生死の関係が解明できると予想される。将来的には、脳梗塞発症後の脳組織の生死判定が可能になり、予後予測や治療法選択に役立つ PET イメージング法につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

脳虚血病態における PKC の役割や挙動を明らかにし、臨床応用の可能性を探るため、PET による PKC イメージング用標識プローブ：N- $^{11}\text{C}$ methyl-bisindolyl-maleimide III (標識薬剤 1) を合成する。さらにマウスを用いた体内分布の経時的変化を測定し、虚血時の変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

トレーサー合成

[<sup>11</sup>C]methyl iodideを用いたデスメチル体に対するN-メチル化反応を用いた。

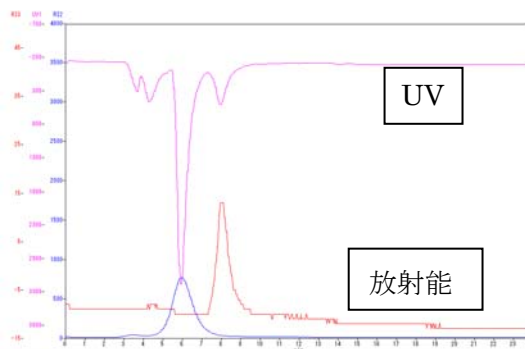
サイクロトロンを用いて<sup>14</sup>N<sub>2</sub>ガスをターゲットとして<sup>14</sup>N(p, α)<sup>11</sup>C反応で産生する[<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>ガスを製造し、LiAlH<sub>4</sub>により還元、さらにヨウ化水素酸により[<sup>11</sup>C]ヨウ化メチルとした。アスカライトカラムと五酸化ニリンカラムを用いて十分によく水素酸と水分を除去し、DMF中80℃で標識前駆化合物bisindolyl-maleimide IIIとの求核置換反応を行った。1.5分間反応後、反応液中の目的[<sup>18</sup>F]化合物1をHPLCを用いて分取精製し、エバポレーターを用いて有機溶媒を除去した。可溶化のため20%ポリソルベート80、0.2mlおよび安定化のため25%アスコルビン酸ナトリウム0.2mlを添加し注射用蒸留水に溶解させ、滅菌フィルターを通して、標識薬剤1を注射剤として得た。用いた分取HPLC条件はInertsil-ODS2; 10mm x 250 mm, 0.05M 酢酸ナトリウム/アセトニトリル/酢酸=600/400/1、分析HPLC条件はInertsil-ODS2; 4.6 mm x 100 mm, 0.05M 酢酸ナトリウム/アセトニトリル/酢酸=600/400/1、TLC条件はシリカゲルシートを用い、展開液はn-ブタノール/酢酸/水=12/3/5を用いた。

#### マウス体内分布測定

標識薬剤1を雄性マウスの尾静脈より投与し、投与後2分、15分、30分、60分で断頭により屠殺して（各群3匹）、血液、肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、小腸、睾丸、筋肉（大腿部）、脳（全脳）の10種類の臓器を摘出し、重量および放射活性を天秤およびγカウンターで測定した。各臓器の分布割合は%Injection Dose/g tissueで算出した。

#### 4. 研究成果

目的の標識薬剤1は図1に示すように分取され、可溶化のため20%ポリソルベート80、0.2mlおよび安定化のため25%アスコルビン酸ナトリウム0.2mlを用いることで注射剤として製造できた。最終製剤の放射化学的純度は95%以上（図2、図3）、[<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>からの放射化学的収率は30-50%、合成時間は30分であった。



分取画分  
図1 分取 HPLC

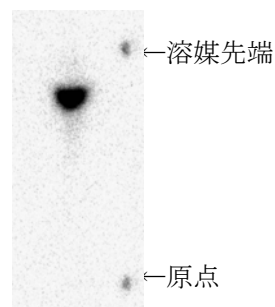


図2 TLC  
(最終製剤)

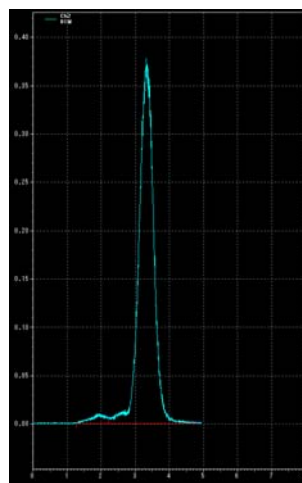


図3 HPLC 放射活性 (最終製剤)

マウスにおける放射能の経時的な体内分布 (図4) から、ほとんどの放射能は肝臓と腎臓へ集積することが確認され、他の臓器への集積は少なかった。特に脳への取り込みは非常に少なく、血液よりも低いことからBBBを透過しないと考えられた。また血液中の放射能は投与後2分から低値を示し、血中半減期が非常に短いことを示している。この血中クリアランスの速さと脳への集積の低さから標識薬剤1の脳内PKC活性イメージングへの利用は難しいと考えられた。

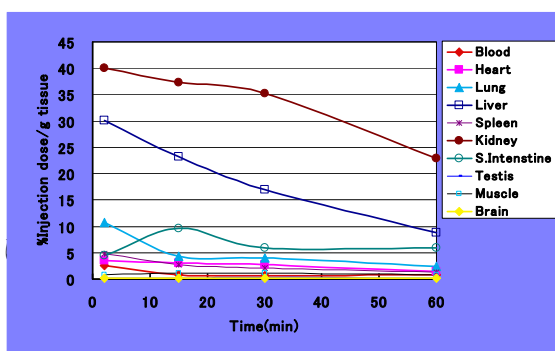


図4 マウスの経時的な体内分布 (n=3)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 和弘 (TAKAHASHI KAZUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・イメージング基盤ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：20370257

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし