

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：83903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19466

研究課題名(和文) 生体直交反応を用いた脳PETリガンドの開発

研究課題名(英文) Development of brain PET imaging using bioorthogonal reactions

研究代表者

木村 泰之(Kimura, Yasuyuki)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 認知症先進医療開発センター・副部長

研究者番号：20423171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、生体直交反応を利用した陽電子断層撮像法(PET)リガンドシステムを開発することである。これまで、生体直交反応の官能基を付与した汎用PETリガンドとして、tetrazine化合物を複数選出し、¹¹Cによる標識合成に成功し、高い脳移行性と、速い洗い出しを確認した。一方、ラット脳線条体および脳室内にbicyclononyneを付与した抗体を定位的に投与し、尾静脈から上述の標識tetrazine化合物を投与し画像化を試みたが、明らかな放射能集積は認められなかった。抗体に付与できる官能基の数や抗体の脳内濃度の制約から、本システムでの抗体のPETイメージングは困難と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の重要性は、特定の生体脳内分子を標的としたイメージングの確立だけでなく、むしろ生体内IEDDA反応を用いた脳PETイメージングという新たな手法の実証にある。既存の手法で脳内分子を標的としたイメージングを行う場合、PETリガンドは脳移行性と標的分子に対して高い親和性や選択性を両立することが困難であった。本研究の手法を用いた新たな脳PETイメージング技術が確立すれば、今後これまで可視化や測定のできなかった多様な分子を標的としたイメージングを可能にし、医療や創薬に破壊的イノベーションを起こしうる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a positron emission tomography (PET) ligand system based on bioorthogonal reaction. We have selected several tetrazine compounds as general-purpose PET ligands with functional groups for bioorthogonal reactions, successfully synthesized and labeled with ¹¹C, and confirmed their high brain penetration and fast washout. On the other hand, no obvious accumulation of radioactivity was observed in the striatum and ventricles of the rat brain after stereotactic administration of antibodies with bicyclononyne and administration of the above-mentioned labeled tetrazine compounds through the tail vein. PET imaging of antibodies with this system was considered difficult due to limitations in the number of functional groups that can be added to the antibodies and the concentration of the antibodies in the brain.

研究分野：脳神経核医学

キーワード：生体直交反応 陽電子断層撮像法 IEDDA

1. 研究開始当初の背景

現在、ヒト生体脳内の微量な分子を低侵襲的に画像化し測定する方法として、陽電子断層撮像法 (PET) が活用され、様々な診療や創薬に役立てられている。PET が持つ他のイメージング技術にない大きな特徴は、生体内分子の密度や動態を特異的に高感度に画像化し測定できることであり、それは標的分子に特異的に結合する化合物を陽電子放出核種で標識した薬物として投与することによって得られる。しかし、最適な標識薬物=PET リガンドに必要なとされる条件は厳しく、画像化や測定ができる脳内分子は非常に限られている。

脳内分子を標的とした PET リガンドの開発を特に困難にしているのは、脳血液関門の存在と脳内標的分子の低い密度である。脳血液関門を通過しやすい低分子化合物で、高い親和性と選択性を有するものは限られている。一方、標的分子の脳内密度が低い場合、PET プローブには非常に高い親和性が要求される。

実際、現在画像化が切望されている脳内分子の密度は低い。例えばパーキンソン病を含むレビー小体病において蓄積する α -synuclein や前頭側頭型認知症の一部などで蓄積する TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43)の脳内密度はアルツハイマー病で蓄積するアミロイド と比べて遥かに低いと報告されている (Harada et al. 2018)。

また、標的分子に非常に高い親和性と選択性を持つことが可能な抗体や、標的分子と共有結合するなどして非可逆的に結合する低分子化合物は、脳血液関門の通過率が低いか、動態が遅いため、PET リガンド化は困難である。これらを観察するために長半減期核種で標識することはしばしばおこなわれるが、人体への被曝線量を低く抑えるために、十分な放射エネルギーの投与が困難である。

このような幾つかの困難を乗り越え、これまで画像化や測定が不可能であったヒト生体脳内の微量な分子を低侵襲的に画像化し測定できる可能性を追求するため、本研究構想を提案する。今回提案するシステムを用いることで、高分子化合物や非可逆的結合をする低分子化合物を脳 PET リガンド化する際に問題となる遅い動態や、低いシグナル、高い被曝線量を回避できると考えられる。実現すれば、神経変性疾患をはじめとする脳疾患の病態解明や治療の体系や方向を大きく変革・転換させる潜在性を有する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの方法では画像化や測定が不可能であったヒト生体脳内の微量な分子を低侵襲的に画像化し測定するための新しい方法として生体直交反応を利用した PET リガンドシステムを開発し、神経変性疾患をはじめとする脳疾患の病態解明や治療に貢献することである。生体直交反応を利用することで、従来の PET リガンドでは困難であった、微量な脳内分子の測定を可能にする。

3. 研究の方法

生体直交反応とは、生体環境で生じるが、生体由来の機能や機構に干渉せず、毒性反応物を生じない反応である。脳内標的分子への特異的結合する分子を先に投与し、後に投与する PET リガンドと生体内において生体直交反応で結合することでイメージングを可能とするシステムを開発する。

本研究では、生体脳内分子に特異的結合する分子と、陽電子放出核種で標識した PET リガンドそれぞれに官能基を付与し、生体内で特異的結合させる (図 1)。先に投与する分子の生体脳内分子への特異的結合や洗い出しに必要な時間が、後に投与する PET リガンドの陽電子放出核種の物理的半減期によって制約されないため、これまで生体内で画像化や測定ができなかった

微量な疾患関連脳内分子の画像化と定量測定ができる可能性がある。この方法の有効性と安全性を動物で実証し、臨床検証をおこなう価値があるか判断する。

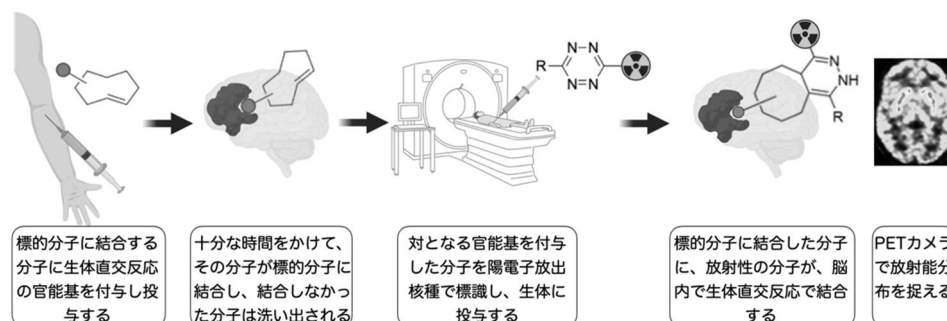


図 1、生体直交反応を応用した脳 PET イメージングの概念図

本研究では生体直交反応として、1,2,4,5-tetrazine と trans-cyclooctene のようなアルケンの反応である the inverse-electron-demand Diels–Alder (IEDDA) 反応を用いる (図 1)。この反応は、一对の特定の官能基間の特異的な、非常に反応速度が速い効率の良い反応であり、化合物濃度の低い生体内でも高効率な反応が可能と予想され、本研究における標的分子の特異的な画像化や測定に最適と考えられる。

IEDDA の官能基を付与した汎用 PET リガンドに求められる要件は、簡便に短時間で標識できることに加えて、高い IEDDA 反応速度、脳移行性と速やかな洗い出し、そして生体内安定性である。過去に報告のある下記の化合物を元にして、これらの条件を満たす化合物への構造展開をおこなう (図 2)。脳移行性に関連する特性が良好な設計化合物について、 ^{11}C や ^{18}F で標識合成したものを PET リガンドとしてラットに投与し、脳移行性や体内動態、生体内安定性を評価する。

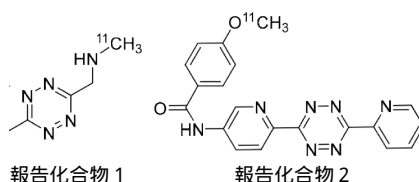


図 2、IEDDA の官能基テトラジン付与化合物の ^{11}C 標識体の報告例

次に、抗体イメージングを念頭に、抗体に IEDDA の官能基 trans-cyclooctene (TCO) や bicyclononyne (BCN) を付与したものを合成する。生体内におけるイメージング可能性を確認するため、官能基を付与した抗体と放射性標識したテトラジン化合物と反応させたものを直接脳内に投与し、その動態を確認する。次に官能基を付与した抗体のみを脳内に投与し、放射性標識したテトラジン化合物を経静脈投与して、脳 PET イメージングをおこなう。

4. 研究成果

これまで、生体直交反応の官能基を付与した汎用 PET リガンドとして、簡便に短時間で標識でき、高い反応速度、脳移行性と速やかな洗い出しという条件を満たすテトラジン化合物を複数選出した。

まず、9 種類の化合物について ^{11}C による標識合成をおこない、5 種類の化合物について安定した合成に成功した。

安定して合成ができた 5 種類の標識化合物について、健常ラットに経静脈投与し、PET イメージングをおこなったところ、良好な脳移行性と、洗い出しが確認された (図 3)。

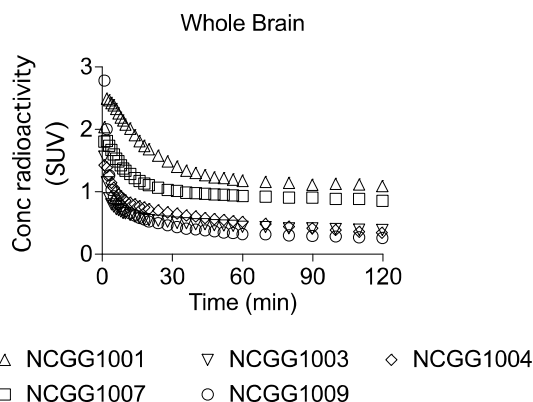


図3、¹¹C 標識テトラジン化合物の脳内動態

次に、ラット脳線条体および脳室内にテトラジンと反応する官能基である BCN を付与した抗体を定位的に投与し、尾静脈から上述の標識テトラジン化合物を投与し画像化を試みた。抗体として Trastuzumab を用い、アミノ基反応性活性エステルを用いて BCN を付与した。

BCN 付与抗体とテトラジン化合物の反応性は良好で、テトラジン化合物溶液に BCN 付与抗体溶液を添加したところ、1-2 分でテトラジン由来のピークの消失を確認した。

次に、生体外で BCN 付与抗体と標識テトラジン化合物を反応させたものを脳内に定位的に投与したところ、投与部位に放射能を認め、2 時間の撮像時間中に明らかな拡散は認めなかった。

しかし、BCN 付与抗体と付与していないコントロール抗体をラットの脳内に投与し、1 時間後や 24 時間後に標識テトラジン化合物を経静脈投与、PET イメージングをおこなったところ、脳内動態に明らかな差は認めなかった。

また、ラット脳室内に BCN 付与抗体と付与していないコントロール抗体を投与し、24 時間後に標識テトラジン化合物を経静脈投与、PET イメージングをおこなったが、脳内動態に明らかな差は認めなかった。

抗体には、一分子あたり 2 個程度の BCN が付与されていたが、脳内や脳室内に投与できる容量に制限があることから、BCN の組織内濃度が不十分で、PET イメージングで捉えることができなかった可能性が考えられた。しかし、BCN の組織内濃度を上げるために、抗体一分子あたりに付与する BCN の量を増やすことは、抗体の活性低下を引き起こすことが想定される。さらに、将来的に抗体は経静脈投与し、脳内移行したもののイメージングを想定していたが、その場合の脳内移行する抗体の分子数は今回の脳内投与の量よりもかなり少ないと考えられる。したがって、このシステムでの抗体の脳 PET イメージングは現時点では困難と考えられた。

一方で、今回開発した ¹¹C 標識テトラジン化合物の反応性や体内動態は良好であるため、多くの BCN が付与できる高分子で、脳移行性が良好なものをを用いたイメージングや、脳以外の臓器のイメージングに活用できる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	小縣 綾 (Ogata Aya) (10805857)	岐阜医療科学大学・薬学部・助教 (33708)	
研究分担者	今村 真一 (Imamura Shinichi) (40873203)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 研究推進基盤センター・室長 (83903)	
研究分担者	境 崇行 (Sakai Takayuki) (40881925)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 認知症先進医療開発センター・研究員 (83903)	
研究分担者	古山 浩子 (Koyama Hiroko) (50402160)	岐阜大学・工学部・准教授 (13701)	
研究分担者	加藤 隆司 (Kato Takashi) (60242864)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・病院 放射線診療部・部長 (83903)	
研究分担者	外山 宏 (Toyama Hiroshi) (90247643)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

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