

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11日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791234

研究課題名（和文） 脳内抗酸化ストレス活性測定用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 brain antioxidant

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）：本課題では、脳内の抗酸化ストレス活性のひとつであるグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)活性の定量測定を目的とする放射性プローブの開発研究を行った。GST 基質であるハロゲン化プリン誘導体をインビトロおよびインビボで検討したところ、6-[¹⁸F]フルオロ-9-メチルプリンおよび6-[⁷⁶Br]ブロモ-9-エチルプリンが脳内の GST 活性をインビボで定量測定し得る放射性薬剤の有力な候補であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed radioprobes for quantifying brain glutathione S-transferase (GST), an antioxidant. Several halogenopurine derivatives were evaluated in vitro and in vivo. Among the derivatives, 6-[¹⁸F]fluoro-9-methylpurine and 6-[⁷⁶Br]bromo-9-ethylpurine showed favorable properties for quantifying brain GST activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：分子イメージング・PET・放射性医薬品・酸化ストレス・グルタチオン

1. 研究開始当初の背景

脳における酸化ストレスは、統合失調症などの精神疾患やパーキンソン病などの脳神経疾患、さらには脳腫瘍や脳梗塞など様々な脳疾患の病因や重症化に深く関与していることが示唆されている (Valko et al., Int J Biochem Cell Biol. 2007)。体内に生じた酸化物質は、通常グルタチオン (GSH) のような生体に備わっている抗酸化物質によって除去されるが、この除去システムの破綻、もしくは除去システムを上回る酸化物質の発

生が酸化ストレスを生じると考えられる。このことから、様々な疾患の予防や治療を目的とした抗酸化作用を有する医薬品の開発が進められている (Slemmer et al., Curr Med Chem. 2008)。したがって、脳内の抗酸化活性を測定することは、脳疾患における病態および病因の解明や、治療薬剤の開発および評価に大きく寄与すると期待される。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) は、有害な代謝物や異物の GSH 抱合を触媒することで、これらの有害物を体外へ排出し、

体や脳を守る機能を持つ。GST は酸化ストレスにより誘導されることから、GST 活性の測定は酸化ストレスマーカーとしてインビトロにおいて盛んに測定されている。インビボでは ^{99m}Tc]HMPAO による GSH 濃度の測定が試みられたが (Sasaki and Senda, J Nucl Med. 1997)、本方法では単光子断層撮像法であることから定量測定ができない。

そこで、これまでに開発に成功しているポジトロン断層撮像 (PET) による酵素活性の測定原理および化合物を応用して、GST 活性を定量測定し得る放射性プローブの開発を行なう。定量的な測定は、GST 基質である放射性プローブを対象組織に送達し、組織内で生じた放射性代謝物の蓄積の割合を測定することで可能となる。これまでの検討から、GST 基質の候補には、9-アルキル-6-ハロゲノプリン誘導体が有望だと考えられる。このハロゲノプリン誘導体は、脳内で GSH 抱合され、生じた GSH 抱合体は脳内からトランスポーターを介して速やかに排出される (下図)。一方、遊離するハロゲンイオンのうち、フッ素および臭素は脳内に保持されることがこれまでの研究から示唆されていることから、本方法論により、インビボにおいて初めて GST 活性の定量測定を可能にするプローブを開発し得ると期待できる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、脳内の抗酸化活性を定量測定し得る放射性プローブの開発である。なかでもグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性を測定対象としたプローブの開発研究を推進した。脳内の抗酸化活性の測定は、病因の解明のみならず、薬剤開発や薬物治療方針の策定に寄与すると期待されることから、インビトロ・インビボ問わず盛んに行われているが、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ポジトロン断層撮像用放射性プローブを開発した。

本研究では、インビトロにおける 9-アルキル-6-ハロゲノプリン誘導体の GSH 単独および GST との反応速度に関するスクリーニングにより、当該誘導体の GST による GSH 抱合に対する構造活性相関を明らかにするとともに、本研究目的を達成するための適切な化合物構造を明らかにする。また、当該化合物のげっ歯類における血中および脳内動態を測定することで、その放射能動態が GST 活性の測定原理に従うことを明らかにした。

一般的な脳内のレセプターなどのタンパク質を測定するプローブは、対象タンパクに結合することでその濃度の測定を可能にすることから高い代謝安定性が求められる。一方、

本研究で開発するプローブは代謝を積極的に利用し、さらに測定原理の反応速度論的考察から、適切な代謝速度を持つプローブを選択することで、酵素活性の定量測定が可能となる点が大きな特色である。測定対象酵素による脳内での代謝速度があまりに速い場合、脳内放射能動態は血流を反映する一方、あまりに遅い場合は脳への放射能集積は低くなることから、酵素活性変化への高い応答性および高い解析精度を得るために、至適な代謝速度を有するプローブの開発を行った。また、本研究で開発するプローブは、比較的半減期が長い ^{18}F (約 2 時間) および ^{76}Br (約 16 時間) による標識体であるため、長時間の経時的動態変化の測定や遠隔地での利用を可能とする。

(2) 本研究の副産物として、放射性臭素標識体の非放射性化合物が抗けいれん薬として使用できることを支持する結果を得る可能性があった。GST は脳内では主に細胞内に存在することから、プロモプリン誘導体の GSH 抱合による臭素イオンの遊離は脳細胞内で起こると考えられる。臭素イオンは抗けいれん作用を有することから小児の難治性てんかん薬として用いられるが、脳移行が少ないことから血中濃度を高く維持するため副作用が問題となる。これに対し、当該化合物を用いることで、効率的に脳内に臭素イオンを送達させることができ、副作用の軽減を目指すことが可能になると期待できる。このことは、多くのプローブが医薬品などの既知化合物を放射性標識して用いていることとは逆に、本研究課題の創薬的な開発によって得られるプローブが医薬品になる可能性を持つことを示す。

酸化ストレスは、上述のように非常に多くの疾患に共通する病因のひとつと考えられていることから、病因の上流もしくは発症の引き金であると考えられている。したがって、酸化ストレスマーカーのひとつである GST 活性を測定することは、生体の恒常性の破綻を極早期に捉えることになると期待される。実際、画像診断において基本的な生命維持システムである局所血流や糖代謝のような基本的な生理活性の測定は、脳疾患における病態もしくは病因の解明や、治療薬剤の開発および評価など応用範囲が広いことから、同様に重要な生命維持システムのひとつである GST 活性の定量測定により応用範囲の広い情報が得られると期待できる。

3. 研究の方法

(1) 放射性ハロゲン標識 9-アルキル-6-ハロゲノプリン誘導体の設計・合成

まず、9 位にメチル、エチル、およびプロピル基を導入した 6- ^{18}F]フルオロプリンお

よび9位にメチル基を導入した6- ^{18}F フルオロプリンを標識合成し、初期のスクリーニングを行った。 ^{18}F 標識体は、9-アルキル-6-トリメチルアンモニウムプリンに $^{18}\text{F}^-$ を有機溶媒中で反応させることで得た。 ^{76}Br 標識体は、ヨードプリン誘導体のヨウ素と ^{76}Br のハロゲン交換反応によって得た。

(2) 代謝速度および GST 特異性の検討

9-アルキル-6-ハロゲンプリン誘導体の GST および GSH による代謝速度を、ラットの脳ホモジネートを用いて検討した。各標識化合物をラットの脳ホモジネートに加え、一定時間後における未変化体と代謝物の割合を薄層クロマトグラフィーとオートラジオグラフィーにより測定することで代謝速度を求めた。

(3) 体内動態の検討

(2) のインビトロでの検討から、本研究目的を達成すると期待される9-メチル-6- ^{18}F フルオロプリンおよび9-エチル-6- ^{76}Br プロモプリンが見出されたことから、マウスおよびラットでの体内動態を PET により検討した。標識体を尾静脈内投与後60分間の撮像を行い、特に脳移行性を示す初期の取り込みと、後期の脳内放射能の保持について検討を行った。また、同様に末梢で生じると予想される放射性ハロゲンの脳移行性を検討するために、 ^{18}F および ^{76}Br の単独投与による検討を行った。この時、 ^{18}F 標識化合物については、末梢で生じる ^{18}F イオンの骨への高い集積が予測されるため、特に頭蓋骨の放射能集積の脳内放射能動態計測への影響を検討した。また、マウスおよびラットに標識体を静脈内投与後の経時的な血中および脳内化学形を検討する。化学形の分析は、TLC による未変化体および放射性代謝物の検出と、イオン交換カラムを用いた HPLC による遊離ハロゲンの検出により行った。

(4) モデル動物を用いた検討

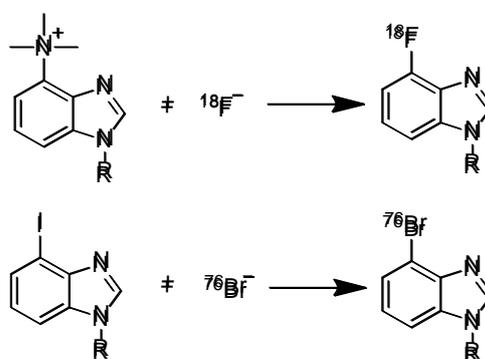
体内動態の基礎検討から、評価化合物が有望であると判明した場合、モデル動物を用いた検討を行った。評価化合物を、脳内 GST 活性を変化させるようなモデル動物に投与し、脳内動態を PET により検討した。脳内 GST 活性の変化モデルには、マレイン酸ジエチルおよびスルフォラファンをそれぞれ投与したマウスを用いた。測定原理から、初期のピークにおける脳内放射能と後期の脳内に保持される放射能の比は GST 活性を反映することから、未処置動物におけるこの比と処置動物における比の変化が GST 活性を実際に反映するかを、定法によりインビトロで測定する GST 活性と比較検討し、脳内放射能動態の GST 応答性を評価した。

(5) 抗けいれん作用の検討 (臭素化体)
体内動態の基礎検討から、放射性臭素標識体が脳内において臭素イオンを遊離することが確認されたことから、その非放射性化合物は抗けいれん作用を有すると期待された。そこで、マウスのペンチレンテトラゾール誘発性けいれんモデルおよび最大電撃けいれんモデルに対する当該化合物の抗けいれん作用を試験した。この時、対照薬として抗てんかん薬として用いられている臭化ナトリウムを用いた。

4. 研究成果

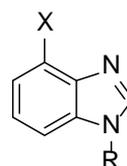
(1) 放射性ハロゲン標識 9-アルキル-6-ハロゲンプリン誘導体の設計・合成

9-アルキル-6-ハロゲンプリン誘導体の合成法を下図に示す。 ^{18}F 標識体は70%程度、 ^{76}Br 標識体は40%程度の良い収率で得られ、放射化学的純度はどちらも97%以上であった。



(2) 代謝速度および GST 特異性の検討

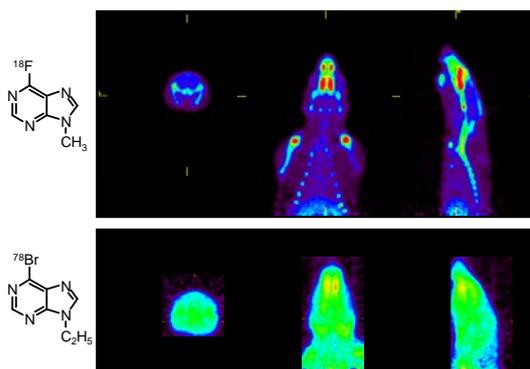
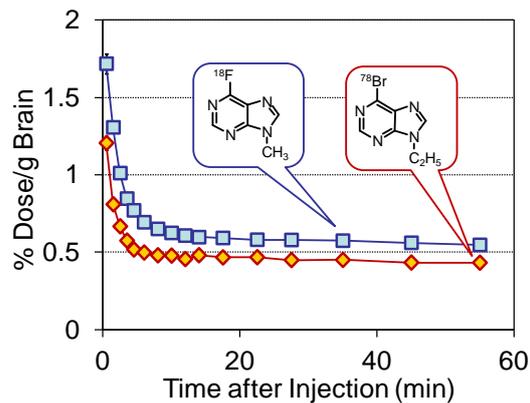
評価した化合物のラット大脳皮質 (k_{GST}) および GSH 生理濃度 (k_{GSH}) での代謝速度 (h^{-1}) を下表に示す。この結果から、①アルキル鎖が長くなるにつれ k_{GST} が増大する、② k_{GSH} はアルキル鎖の影響が少ない、③ F から Br への置換で k_{GST} が減少する、④特異性 ($k_{\text{GST}}/k_{\text{GSH}}$) はいずれの場合でも高い、ということが示唆され、酵素活性測定に適切な抱合速度は 4 h^{-1} 前後であることから、9-メチル-6- ^{18}F フルオロプリンおよび9-エチル-6- ^{76}Br プロモプリンが有望な化合物であると考えられた。



X	R	k_{GST}	k_{GSH}	$k_{\text{GST}}/k_{\text{GSH}}$
	Me	4.2	0.41	10
F	Et	6.0	0.42	14
	Pr	13	0.50	25
Br	Me	1.5	0.046	32

(3) 体内動態の検討

実際に両化合物をラットに投与し、その脳内動態を PET により検討した。脳の時間-放射能曲線および 60 分間の積算画像を下図に示す。評価化合物の投与初期における脳内移行性は高い一方、脳内で生成した ^{18}F および ^{76}Br イオンは、ほぼ完全に脳内に保持された。この投与初期における脳内放射能濃度のピークと、投与後期の脳内放射能濃度の比は、1/2 から 1/3 であり脳内の酵素活性を精度良く測定するための適切な脳内動態を示した。一方、末梢で生成した ^{18}F イオンは骨に集積し、 ^{76}Br イオンは全身に広く分布した。また、 ^{18}F および ^{76}Br イオンを単独投与した場合には、脳内にその放射能は観察されず、末梢で生成した ^{18}F および ^{76}Br イオンの脳移行性は低いことが示された。しかしながら実際にモデル動物を用いた場合において、その放射能動態の応答は低かった。その原因として、小動物では末梢で生成する ^{18}F および ^{76}Br イオンの分布により、画像上での脳内放射能集積の変化を定性的に観察することは困難であると考えられた。



(4) 抗けいれん作用の検討 (臭素化体)

非放射性的臭素標識化合物が脳へ効率的に臭素イオンを送達し得ることに着目し、その抗痙攣作用を検討したところ、最大電撃痙攣モデルにおいて抗痙攣作用は示さなかったものの、死亡率を低下させる作用があること

が示唆された。

(5) 総括

本研究の目的は、脳内の GST 活性をインビボで定量測定し得る放射性薬剤の開発研究であったが、小動物への適用に対しては問題は残るものの、当該目的を達成する 2 つの化合物の開発に成功した。さらに、非放射性的臭素標識化合物の抗痙攣作用の検討では、当初予測した抗痙攣作用は示さなかったものの、死亡率を低下させる作用があることを示唆する結果を得た。

一方、本研究課題において開発した 2 つの化合物は、放射性代謝物の骨もしくは血液での滞留により、小動物への適用が困難であるという問題が残ったことから、グルタチオン抱合により脱離する置換基を再設計することにより、この問題を解決することが今後の課題である。また、非放射性的臭素標識化合物の痙攣モデルに対する薬理効果について、さらに検討を進める必要がある。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 菊池達矢、脳内グルタチオン S-トランスフェラーゼ活性定量測定用 PET プロブの開発研究、第 50 回日本核医学会学術総会、平成 22 年 11 月 11 日、さいたま市
- ② 菊池達矢、Development of a PET probe for in vivo measurement of cerebral glutathione S-transferase activity、2010 World Molecular Imaging Congress、平成 22 年 9 月 8 日、京都市

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