

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590041

研究課題名(和文)酸化ストレスの画像化のためのSPECTプローブの開発

研究課題名(英文)Development of SPECT probe for oxidative stress imaging

研究代表者

鈴木 紀行 (Suzuki, Noriyuki)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10376379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは様々な疾患の発症や増悪に深く関与している。申請者は本研究課題において、生体深部組織における酸化ストレスや、酸化ストレスに関連した病態の非侵襲的なバイオイメージングが可能な新規SPECTプローブの開発を目指し、候補化合物のデザイン・合成・評価を行った。その結果、直接的に活性酸素種を可視化するものとしてはOHラジカルなどの高い反応性を有する活性酸素種特異的に反応し組織中に滞留するプローブを開発した。また、酸化ストレス関連の病態の可視化としては、酸化ストレスの結果生じる肝障害に着目し、肝細胞に発現しているBSPE活性を可視化するプローブの合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：In vivo imaging have grown exponentially in these days, and SPECT has become indispensable in clinical use. Since SPECT imaging is more practical as routine clinical diagnostic procedures, the development of superior SPECT imaging probes had been required. In this work, we focused on the development of SPECT probes for imaging of in vivo oxidative stress, the relationships between biological redox state and diseases relevant to oxidative stress such as cardiovascular disease, ischemic disease, diabetes mellitus and cancer. Ordinarily, the balance of reductant and oxidant in biological systems such as cells or organs is maintained appropriate state, and disturbance of the redox state is involved in pathogenic or precipitating mechanism of these diseases. Therefore we planned to visualize the redox state and the production levels of ROS.

The clinical application of these SPECT probes will provide significant knowledge on oxidative stress.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

生きたままの生体の機能を画像として捉える分子イメージングは、ダイナミックな生理機能を細胞レベルから組織レベル、個体レベルで時間的・空間的に解析することを可能とし、近年大きな成果をもたらしている。特に SPECT によるイメージングは、*in vivo* への適用が容易であること、比較的小規模な施設においても実施可能であることなどから臨床における画像診断に有用であり、近年普及してきた SPECT のハードウェアを十分に活用するためにはソフトウェアに相当する有用な分子プローブの開発が併せて必要である。申請者は、本申請にあたって生体内の酸化ストレスの画像化のための新規 SPECT プローブの開発を行い、癌や循環器疾患への適用を目指した。

生体は常に酸化ストレスにさらされており、酸化ストレスによってタンパク質や核酸といった重要な生体分子は障害を受ける。その一方で酸化ストレスを消去するための抗酸化系も幾重にも張り巡らされているため、通常は生体内 redox state、すなわち酸化ストレスと抗酸化系のバランスは適切な範囲に保たれている。しかしながら、癌や循環器疾患などにおいてはこのバランスが破綻しており、疾患の発症や増悪に関連していると考えられている。以上のことから、組織内で生成する酸化ストレスを非侵襲的に測定することが重要であることは論を待たないところである。以上を背景として、現在までに多種多様な活性酸素種検出用のバイオプローブが開発されてきたが、そのほとんどは蛍光発光を検出原理とするものであり、光の透過性の問題から *in vivo* で深部組織における酸化ストレスの発生を評価するには適さないものであった。しかしながら酸化ストレスを病態と関連づけて検討するためには *in vivo* で酸化ストレスの発生を評価することが必須であり、それを可能とする生体深部の可視化が可能な SPECT プローブを開発し供給することは急務であるといえる。

## 2. 研究の目的

酸化ストレスは様々な疾患の発症や増悪に深く関与している。申請者は本研究課題において、生体深部組織における酸化ストレスの非侵襲的なバイオイメージングが可能な新規 SPECT プローブの開発を行い、様々な酸化ストレス関連疾患の画像診断に向けた基礎的な知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本計画では、いわゆる“酸化ストレス状態”を画像化するための分子プローブの開発にあたって、2つのアプローチから検討を行った。すなわち、酸化ストレス状態を引き起こすもっとも直接的な原因物質である活性酸素種を画像化のターゲット分子とし、組織内で発生する活性酸素種の量や反応性に対応した集積を示す SPECT プローブの開発、

特に肝臓に着目し、酸化ストレスによる肝障害を評価するための肝トランスポーターの機能を可視化する SPECT プローブの開発、について検討を行う事とした。

まず については、活性酸素種との反応により大きく体内動態が変化するような“スイッチ”を導入し、<sup>125</sup>I といった線放出核種で標識したプローブを合成し、それらのプローブについて活性酸素種との反応速度や反応の特異性の評価を行った。

また については、胆汁酸の肝臓内挙動の制御において非常に重要なトランスポーターである BSEP に着目し、そのトランスポーターの基質となる taurochenodeoxycholic acid (TCDCA) の誘導体に <sup>125</sup>I 標識を行い、BSEP による輸送能の評価を行った。

## 4. 研究成果

まず活性酸素種を直接画像化する事を目指し、Figure 1 に示すプローブの設計を行った。このプローブには活性酸素種との反応部位として、活性酸素種の芳香族 *ipso* 位置換反応を受けるフェノキシフェノール骨格を組み込み、また SPECT のための放射性同位体標識部位としてヨードフェニル基を有する幾つかの候補化合物を合成し、それらについて OH ラジカルや次亜塩素酸などの生体内で生成する活性酸素種との反応性の検討を行った。その結果、Figure 1 に示す電子吸引性基としてニトロ基を組み込んだプローブについて活性酸素種によって効率的に分子変換が起こり、分子全体の *pKa* が大きく変化することを示した。この変化により、プローブ由来の放射活性が酸化ストレス部位に滞留する事が予想される。すなわち、本化合物は酸化ストレスの SPECT イメージングのための基本的な性能を有するという結果を得た。

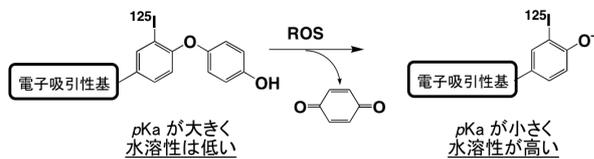


Figure 1. プローブのデザインと ROS との反応

また、酸化ストレスによる肝障害を可視化するためのプローブの開発について、肝の酸化ストレス障害によって活性が低下すると考えられている BSEP をターゲットとする事とした。C 型肝炎や慢性肝炎時に BSEP などの胆汁排泄輸送体の機能低下に伴う胆汁うっ滞が発症することが報告されており、肝障害を引き起こし、肝病態の進展につながる事が考えられている。そのため BSEP は胆汁酸の肝臓内挙動を制御する面において非常に重要なタンパク質であり、その機能低下は胆汁流低下に伴う胆汁酸の肝蓄積に起因すると考えられる肝障害の一因となる。そのため BSEP の機能変動を迅速にとらえることは、慢性肝炎の病態の進展を正確にとらえることができるかと期待されている。しかしながら、BSEP の胆汁酸排泄能力及び胆汁酸の肝細胞内における蓄積の評価には、侵襲的な手法が必要でありヒトにおいて肝臓に発現する BSEP の機能を直接的に評価することは困難である。そこで、BSEP 活性の非侵襲的な可視化をめざし、BSEP の良好な基質として知られる TCDCA に放射性同位体標識部位を結合した誘導体を合成した(Figure 2)。

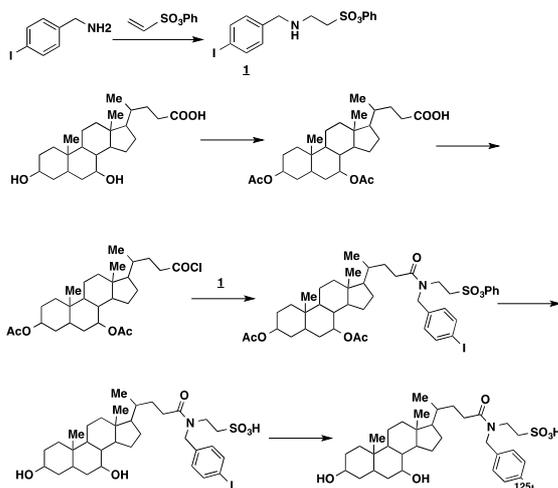


Figure 2. BSEP 活性の可視化のための SPECT プローブのデザインと合成

<sup>125</sup>I 標識は比較的 BSEP による認識に影響を与えないとされるスルホン酸側鎖部分に行う事とし、アミド窒素に iodobenzyl 基を修飾

した。

この <sup>125</sup>I 標識 TCDCA 誘導体(125I-TCDCA)については、BSEP 受容体を発現したベシクルによってその輸送能を検討した。その結果、内在性の基質と比較して若干輸送能は劣るものの、ATP 添加時と AMP 添加時を比較したところ ATP 依存的な 125I-TCDCA のベシクルへの取り込みが認められたことから、BSEP 親和性を有することが確認された(Figure 3)。

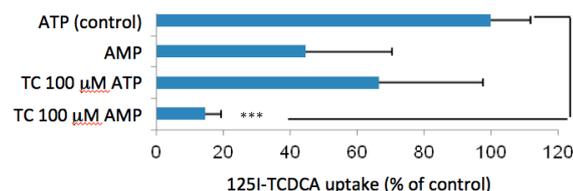


Figure 3. BSEP発現ベシクルへの125I-TCDCA取り込みの評価

以上の結果から、125I-TCDCA は非侵襲的な BSEP 活性のイメージングを行うための有望なプローブであると言える。

## 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)

[雑誌論文](計 15件)

N. Suzuki, K. Kishimoto, K. Yamazaki, T. Kumamoto, T. Ishikawa, D. Margetić. Immobilized

1,2-Bis(guanidinoalkyl)benzenes: Their Potential Ability for Purification of Arsenic-Polluted Water. *Synlett*, 査読有, 24, 2510–2514 (2013).

DOI: 10.1055/s-0033-1338980

H. Kojima, C. Takahata, D. Lemm, M. Takahashi, T. Kumamoto, W. Nakanishi, N. Suzuki, T. Ishikawa. Synthesis of the Aziridinomitosenone Skeleton by Application of Guanidinium Ylide-Mediated Aziridination. *Helv. Chim. Acta*, 査読有, 96, 379-388 (2013).

DOI: 10.1002/hlca.201200510

M. Takahashi, N. Suzuki, T. Ishikawa. Enantioselective Formal Synthesis of (-)-Podophyllotoxin from (2S,3R)-3-Arylaziridine-2-carboxylate. *J. Org. Chem.*, 査読有, 78, 3250-3261 (2013).

DOI: 10.1021/jo400147f

T. Miyayama, Y. Arai, N. Suzuki, S. Hirano. Mitochondrial electron transport is inhibited by disappearance of metallothionein in human bronchial epithelial cells following

exposure to silver nitrate. *Toxicology*, 査読有, 305, 20–29 (2013).  
DOI: 10.1016/j.tox.2013.01.004

K. Rehman, Z. Chen, W. Wang, Y. Wang, A. Sakamoto, Y. Zhang, H. Naranmandura, N. Suzuki: Mechanisms Underlying the Inhibitory Effects of Arsenic Compounds on Protein Tyrosine Phosphatase (PTP). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 査読有, 263, 273-280 (2012).  
DOI: 10.1016/j.taap.2012.06.019

Y. Kondo, N. Suzuki, M. Takahashi, T. Kumamoto, H. Masu, T. Ishikawa. Enantioselective Construction of Polyhydroxylated Pyrrolidine Skeleton from 3-Vinylaziridine-2-carboxylates: Syntheses of (+)-DMDP and a Potential Common Intermediate for (+)-Hyacinthacine A1 and (+)-1-epi-Australine. *J. Org. Chem.*, 査読有, 77, 7988-7999 (2012).  
DOI: 10.1021/jo301178b

H. Naranmandura, X. Chen, M. Tanaka, W-W. Wang, K. Rehman, S. Xu, Z. Chen, S-Q. Chen, N. Suzuki. Release of Apoptotic Cytochrome c from Mitochondria by Dimethylarsinous Acid (DMA<sup>III</sup>) Occurs Through Interaction with Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) In Vitro. *Toxicol. Sci.*, 査読有, 128, 137-146 (2012).  
DOI: 10.1093/toxsci/kfs154

H. Naranmandura, S. Xu, S. Koike, L. Q. Pan, B. Chen, Y. W. Wang, K. Rehman, B. Wu, Z. Chen, N. Suzuki. The Endoplasmic Reticulum is Target Organelle for Trivalent Dimethylarsinic Acid (DMA<sup>III</sup>)-Induced Toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 査読有, 260, 241-249 (2012).  
DOI: 10.1016/j.taap.2012.02.017

H. Sato, R. Yamada, M. Yanagihara, H. Okuzawa, H. Iwata, A. Kurosawa, S. Ichinomiya, R. Suzuki, H. Okabe, T. Yano, T. Kumamoto, N. Suzuki, T. Ishikawa, K. Ueno. A new 2-aryl-1,4-naphthoquinone -1-oxime methyl ether compound induces microtubule depolymerization and subsequent apoptosis. *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, 118, 467-478 (2012).  
DOI: 10.1254/jphs.11229FP

T. Tajima, Y. Akagi, T. Kumamoto, N. Suzuki, T. Ishikawa. Synthesis of jadomycin A and related jadomycin aglycons: structural re-examination of jadomycins S and T may be needed. *Tetrahedron Lett.*, 査読有, 53, 383-387 (2012).  
DOI: 10.1016/j.tetlet.2011.10.160

I. Khantikaew, M. Takahashi, T. Kumamoto,

N. Suzuki, T. Ishikawa. Synthesis of (-)-Benzolactam-V8 by Application of Asymmetric Aziridination. *Tetrahedron*, 査読有, 68, 878-882 (2012).  
DOI: 10.1016/j.tet.2011.11.033

M. Ito, F. Konno, T. Kumamoto, N. Suzuki, M. Kawahata, K. Yamaguchi, T. Ishikawa. Enantioselective Synthesis of Chelidonine, a B/C-cis-11-Hydroxyhexahydrobenzo [c]phenanthridine Alkaloid. *Tetrahedron*, 査読有, 67, 8041-8049 (2011).  
DOI: 10.1016/j.tet.2011.07.091

Y. Ohta, N. Suzuki, Y. Kobayashi, S. Hirano. Rapid speciation and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP MS using multiple standards labeled with different isotopes. *Isot. Environ. Health Stud.*, 査読有, 47, 330-340 (2011).  
DOI: 10.1080/10256016.2011.587609

H. Naranmandura, S. Xu, T. Sawada, W. H. Hao, H. Liu, N. Bu, Y. Ogra, Y. J. Lou, N. Suzuki. Mitochondria are the Main Target Organelle for Trivalent Monomethylarsonous Acid (MMA<sup>III</sup>)-Induced Cytotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 査読有, 24, 1094–1103 (2011).  
DOI: 10.1021/tx200156k

Y. Anan, K. Ishiwata, N. Suzuki, S. Tanabe, Y. Ogra. Speciation and identification of low molecular weight selenium compounds in the liver of sea turtles. *J. Anal. At. Spectrom.*, 査読有, 26, 80-85 (2011).  
DOI: 10.1039/c0ja00031k

〔学会発表〕(計 1 件)

N. Suzuki, E. Nakamura, T. Uehara, Y. Arano, T. Ishikawa. Development of SPECT probe for imaging of Multidrug resistance-associated proteins. *AIMECS11*, Tokyo, Nov 30 (2011).

〔図書〕(計 1 件)

鈴木 紀行：物理系薬学 11. 化学物質の分析．スタンダード薬学シリーズ2，日本薬学会編，pp.250-257，東京化学同人，東京(2012)．

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 紀行 (SUZUKI, Noriyuki)  
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：10376379