

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659319

 研究課題名（和文）高比放射能マルチバレント PET プローブの開発：  
痛み分子イメージングへの挑戦

 研究課題名（英文）Development of a high spec multivalent PET probe  
for molecular imaging of pain

研究代表者

向 高弘 (MUKAI TAKAHIRO)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30284706

研究成果の概要（和文）：ミクログリアの活性化を誘導したラット脳スライスを作製し、末梢性ベンゾジアゼピン受容体（PBR）リガンドの<sup>3</sup>H 標識体を用いてインビトロオートラジオグラフィを施行した。その結果、ミクログリアの活性化の分布と<sup>3</sup>H リガンドの分布と一致した。よって、ミクログリアの活性化を分子イメージングする標的分子として、PBR が有用であることが示された。そこで、PBR を標的とした高比放射能マルチバレント PET プローブとして、放射性ガリウム錯体のキレート部位である DOTA に PBR のリガンド骨格を 2 つ導入した DOTA-PK2 を設計、合成し、<sup>67</sup>Ga 標識に成功した。

研究成果の概要（英文）：Here we confirmed the validity of peripheral benzodiazepine receptors (PBR) as a target for molecular imaging of activated microglia, as revealed by quantitative in vitro autoradiography of <sup>3</sup>H-labeled PBR ligand in rat brain slices. A two PBR ligands-conjugated Ga-DOTA chelate, DOTA-PK2 was designed as a multivalent PET probe of activated microglia. We successfully synthesized a <sup>67</sup>Ga-labeled DOTA-MN2 with high radiochemical purity. These results provide useful information about the chemical design of PET probe for molecular imaging of pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：薬学、放射線、疼痛、イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

痛みは組織損傷の存在またはその発生の可能性があるときに生じるのが普通であり、生体における警告反応とされている。一方、組織損傷が治癒したにもかかわらず発生し続ける痛みや明らかな組織損傷がみあたらないのに訴えられる痛みもあり、こうした生体にとって無用の痛みは抑えなければならない。そのような痛みの一つに神経因性疼痛がある。神経因性疼痛は痛みを伝える神経そ

のものが帯状疱疹、糖尿病性神経炎、がんの浸潤などの疾患により傷害を受ける場合や、事故や外科手術の後遺症として起こる痛みであり、自発痛、痛覚過敏反応および非侵害性の触刺激を激痛として誤認識する病態（アロディニア）を伴う。その発症メカニズムは未解明であり、既存の非ステロイド性抗炎症薬や麻薬性鎮痛薬が奏効し難いために、世界で 2000 万人以上の患者が苦しんでいるとされてきた。そこで、神経因性疼痛のメカニズムの解明、その治療を目的とした基礎研究、

臨床研究が盛んに行われている。なかでも、神経因性疼痛発症メカニズムにおけるグリア細胞の役割に関する研究が精力的に進められ、現在では、ミクログリア-ニューロン連関と神経因性疼痛に関する研究は世界的なトレンドとなっている。しかし、問題は、痛みを客観的に評価する方法がほとんど無いことであり、基礎研究の発展を阻害し、臨床現場では患者の診断や治療に困難を生じさせている。

PET は、ポジトロン放出核種 ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ) によって標識された生理活性物質や薬剤を投与することにより、臓器や組織の分子レベルでの機能画像を提供できるという点で、他の画像診断技術の追随を許しておらず、医療分野のみならず脳科学などの生命科学分野の発展にも大きく寄与してきた。しかし、ポジトロン放出核種は極めて短寿命であり、PET カメラの他にポジトロンを製造するサイクロトロンを設置した大型施設を必要とするために、臨床応用や基礎研究などへの広範な利用が制約を受けてきたのも実情である。一方、ガリウムの放射性同位体である  $^{68}\text{Ga}$  は、 $^{68}\text{Ge}$ - $^{68}\text{Ga}$  の放射平衡を利用したジェネレータより得られるため、サイクロトロンを必要とせず、汎用性が高く、今後の利用の拡大が期待される。

また、生体内の極微量物質を高精度に計測する上で、測定器の高感度化とともに、PET 薬剤の高比放射能化が重要である。短半減期の放射性核種は、理論的には非常に高い比放射能を有する。しかし、 $^{11}\text{C}$  標識化合物を合成する場合、製造工程の段階で環境中に存在する二酸化炭素により同位体希釈され、その比放射能は極端に低下する。ミクログリアの PET イメージングを目的として、活性化ミクログリアに発現する末梢性ベンゾジアゼピン受容体 (PBR) リガンド、 $^{11}\text{C}$ -PK11195 を用いた臨床検討が進められているが、高比放射能化が一つの課題となる。 $^{11}\text{C}$  標識薬剤の高比放射能化も検討されているが、特殊な方法を必要とするため普及するには至っていない。

一方、PBR は、いまだミクログリアにおける機能的な役割が明らかではなく、臨床情報の生理的意義が明確ではない。最近、神経因性疼痛モデル動物において脊髄ミクログリアが活性化し、ATP 受容体の一つである P2X4 の発現が亢進し、また P2X4 刺激が痛みを引き起こすことが明らかにされた。

## 2. 研究の目的

本研究では、活性化ミクログリアを痛みのバイオマーカーとした痛み PET イメージングの達成を目的とし、以下の 2 点について検討を行うこととする。

### (1) ミクログリアの活性化の指標としての PBR の評価 :

ミクログリアに発現する PBR について、分子イメージングの標的分子としての有用性を検討することとする。そこで、 $^3\text{H}$  標識体を用い、ミクログリアの活性化を誘導したラット脳スライスにおけるインビトロオートラジオグラフィを施行し、PBR と P2X4 を比較検討する。

### (2) PBR を標的とする高比放射能マルチバレント PET プローブの開発 :

PBR を高感度で検出する PET プローブの開発を目的に、標的組織の認識部位と放射性金属核種結合部位とを一分子内に独立して有する二官能性キレートという分子設計概念の基に、安定な Ga-DOTA 錯体において 2 つの COOH 基が錯体形成に関与していないことに着目して、この COOH 基に、PBR のリガンド骨格 PK を 2 つ導入した放射性ガリウム標識化合物 (図 1) の開発を計画した。活性化ミクログリアを認識する分子構造を複数導入するマルチバレント効果により、親和性の飛躍的な向上が期待されるとともに、環境中に存在する元素量が元々少ない Ga を利用するため、理論値に近い高比放射能プローブの合成でき、その結果、これまでにない非常に高感度の活性化ミクログリア PET イメージングが達成できると考えた。

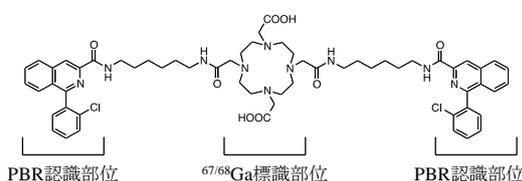


図 1 DOTA-PK2 の構造

## 3. 研究の方法

### (1) ミクログリアの活性化の指標としての PBR の評価 :

#### ①MCAO 脳虚血モデル

ペントバルビタール麻酔下、Sprague-Dawley (SD)ラット雄性 9 週齢(250-310g)の頸部を切開し、総頸動脈からシリコンでコートしたマイクロフィラメントを挿入して右中大脳動脈 (MCA) 起始部まで閉塞し、局部脳虚血モデルラットを作製した。MCAO 後、姿勢反射、回転運動などの行動学的評価を行い、神経学的症状の存在を確認し、症状が認められなかったラットは除外した。

## ②トリメチルスズ(TMT)処置モデル

雄性 SD ラット(9~11 週齢)に TMT/saline 8mg/kg(1mL) また 0.9%Saline(1mL)を腹部投与し、12 時間の明暗周期で飼育し、自由に飲水させた。

## ③脳切片の作製

ペントバルビタール麻酔下、開腹し、PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH 7.4), ice-cold 4%paraformaldehyde/PBS により経心還流を行った。経心還流後、脳を摘出し、氷冷下スライサーを用いて冠状切片を作製した。その後、包埋、凍結し、クリオスタットにより 10  $\mu$ m 厚さの切片を作製した。

## ④組織染色

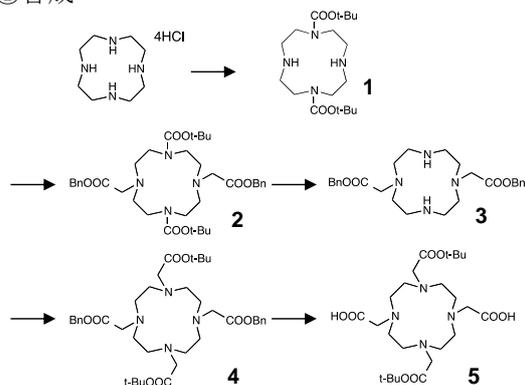
厚さ 10  $\mu$ m の凍結切片に対して、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行った。また、ミクログリアのマーカとして Iba1、OX-42 に対する一次抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。

## ⑤オートラジオグラフィ

25°C, 15 分間プレインキュベーションした  $^3$ H 標識薬剤溶液に脳組織切片を入れ 25°C、90 分間インキュベーションを行った。その後、0°Cにて洗浄、乾燥させた。乾燥後、イメージングプレートに 2 週間コンタクトさせ、バイオイメージングアナライザーにて  $^3$ H の脳内分布を測定した。

(2) PBR を標的とする高比放射能マルチバレント PET プロブの開発:

### ①合成



Scheme 1

脱塩処理した cyclene をクロロホルムに溶解し、0°Cにて攪拌しながらクロロホルム(20 mL)に溶解した N-(tert-ブトキシカルボニルオキシ)スクシンイミドを添加した。30 時間後、10%水酸化ナトリウム水溶液で洗浄し、有機層を乾燥、溶媒留去、真空乾燥し、**1** (92%)を薄黄色油状物質として得た。

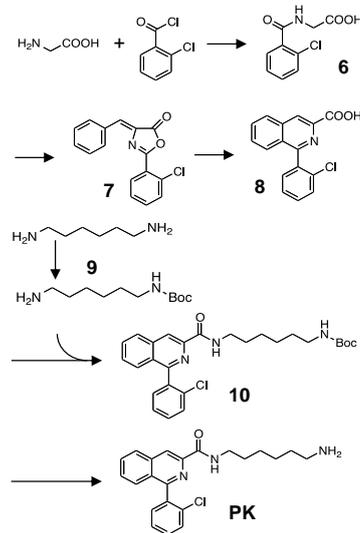
**1** に炭酸カリウム、無水アセトニトリルを

添加して溶解し、ベンジルプロモアセテートを加えて攪拌した。25 時間後、濾過し、溶媒留去し、クロマトグラフィーにて精製し、**2** (76%)を薄黄色油状物質として得た。

**2** をジクロロメタンに溶解し、0°Cにて TFA を添加して攪拌した。10 分後室温に戻し、100 分後攪拌を止めて溶媒留去し、5%水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、ジエチルエーテルで抽出した。有機層を乾燥、溶媒留去、真空乾燥して **3** (78%)を薄黄色油状物質として得た。

**3** に炭酸カリウム、無水アセトニトリルを添加して溶解し、tert-ブチルプロモアセテートを加えて攪拌した。24 時間後、濾過し、溶媒留去し、クロマトグラフィーで精製し、**4** (81%)を薄黄色油状物質として得た。

**4** を無水エタノールに溶解し、10%Pd/C を加え、水素気流下、室温において攪拌した。76 時間後、濾過、溶媒留去、真空乾燥した。クロロホルムに溶解後、精製水で抽出し、水層を溶媒留去、真空乾燥し、**5** (62%)を白色固体として得た。



Scheme 2

グリシンを 4%水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 0°Cにて攪拌、10 分後 o-クロロベンズイルクロライドを添加し、室温に戻した。10%水酸化ナトリウム水溶液を随時添加し、反応溶液の pH を塩基性側に保ちながら攪拌を続けた。160 分後攪拌を止め、ジエチルエーテルにて洗浄した。水層に塩酸を添加して析出した固体を再結晶し、**6** (73%)を白色固体として得た。

**6**、酢酸ナトリウム、無水酢酸を混和し、さらにベンズアルデヒドを添加した。70°Cで攪拌し、2 時間半後 90°C に上げた。さらに 30 分、攪拌し室温に戻した。反応液をクロロホルムに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて洗浄、有機層を乾燥、溶媒留去、真

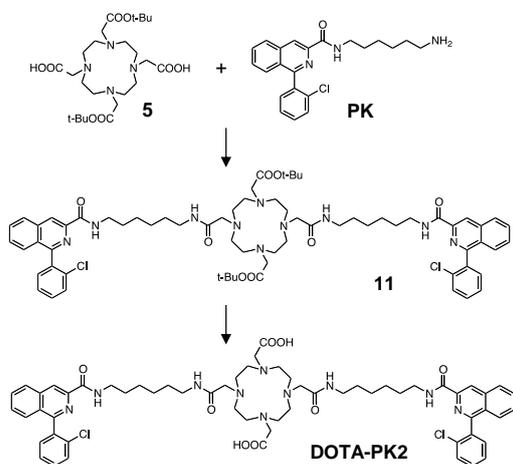
空乾燥して **7** (23%)を黄色固体として得た。

塩化アルミニウムを無水テトラクロロエタンに懸濁し、室温にて攪拌した。無水テトラクロロエタンに溶解した **7** を添加し、60°Cにて 24 時間攪拌した。攪拌後室温に戻し、反応液にクロロホルムを添加して飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で抽出し、水層を塩酸にて酸性にし、クロロホルムにて抽出した。有機層を乾燥、溶媒留去、真空乾燥して **8** (31%)を薄赤色固体として得た。

1, 6-ヘキサンジアミンをジクロロメタンに溶解し、0°Cにて攪拌した。ジクロロメタンに溶解したジ-tert-ブチルジカルボネートを添加し、24 時間室温にて反応させた。反応液を濾過し、得られた濾液を溶媒留去し、酢酸エチルに溶解、飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、有機層を乾燥、溶媒留去し、真空乾燥し、**9** (81%)を透明油状物質として得た。

**8**、BOP 試薬を混和し、そこに無水ジメチルホルムアルデヒドに溶解した **9**、無水トリエチルアミンを添加し、室温にて攪拌した。24 時間後、反応液をクロロホルムに溶解し、精製水にて洗浄、有機層を乾燥、溶媒留去し、クロマトグラフィーにて精製を行い、**10** (97%)を透明油状物質として得た。

**10**に 1M 塩酸/酢酸エチルを 0°Cにて添加して、室温にて 24 時間反応させた。反応液に 10%水酸化ナトリウム水溶液を添加し、ジクロロメタンにて抽出、有機層を乾燥、溶媒留去し、クロマトグラフィーにて精製し、**PK** (72%)を薄黄色固体として得た。



**5**、BOP 試薬を混和し、さらに無水ジメチルホルムアルデヒドに溶解した **PK**、無水トリエチルアミンを添加し、室温にて 48 時間攪拌した。反応液に精製水を加え、ジクロロメタンにて抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、乾燥、溶媒留去し、クロマトグラフィーにて精製し、**11** (70%)を白色固体として得た。

**11** にトリフルオロ酢酸を添加して室温で攪拌した。2 時間後溶媒留去し、メタノールに溶解し、ジエチルエーテルを添加した。得られた白色固体を乾燥させ、DOTA-PK2 (47%)を得た。

DOTA-PK2 を 0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.6)に溶解させ、硝酸ガリウム多水和物を添加して 95°C で攪拌した。60 分後、逆相 HPLCにて精製し Ga-DOTA-PK2 を得た。

## ②放射性ガリウム標識

DOTA-PK2 を少量のアセトニトリルに溶解し、0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液(pH 4.6)に溶解させた  $^{67}\text{GaCl}_3$  を添加して 95°C で攪拌した。60 分後、逆相 HPLCにて精製した。

## 4. 研究成果

### (1) ミクログリアの活性化の指標としての PBR の評価：

P2X4 アンタゴニスト活性が見出された抗鬱薬 (パロキセチン、フルオキセチン、デシプラミン、イミプラミン) に注目し、これらの  $^3\text{H}$  標識体を用い、トリメチルスズおよび中大脳動脈閉塞処置によりミクログリアの活性化を誘導したラット脳スライスにおけるインビトロオートラジオグラフィにより、ミクログリアを標的とした分子プローブとしての評価を行った。モデル動物における活性化ミクログリアの増加は、マーカーである OX-42 および Iba1 の免疫組織染色法により確認した。その結果、フルオキセチンを除く抗鬱薬において、ミクログリアの活性化が認められた病変部における放射能集積は低いものであり、また、その集積は P2X4 への結合性を示す TNP-ATP により阻害されなかった。一方、フルオキセチンは特に TMT 処置ラットにおいて活性化ミクログリアの発現に応じた集積増加を示し、TNP-ATP により阻害された (図 2)。

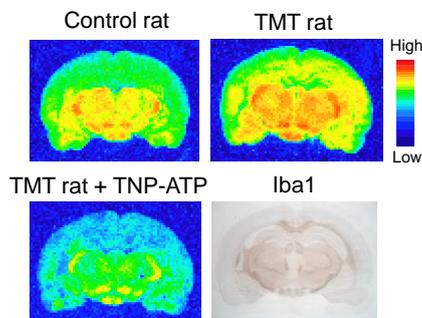


図 2  $^3\text{H}$ Fluoxetine のオートラジオグラフィと免疫組織化学染色(Iba1)

一方、PBR リガンドである $[^3\text{H}]$ PK-11195 は、正常部位と比較して病変部において高い集積を示し、その分布は Iba1 や OX-42 の染色部位と一致することを明らかとした(図 3)。

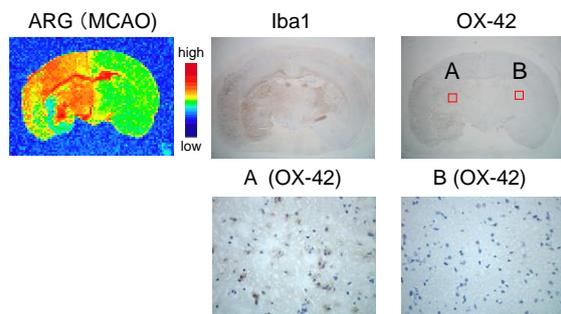


図 3  $[^3\text{H}]$ PK-11195 のオートラジオグラフィーと免疫組織化学染色(Iba1、OX-42)

(2) PBR を標的とする高比放射能マルチバレント PET プローブの開発:

まず、PK の合成法として、オキサゾロン環を構築してイソキノリンカルボン酸を生成する経路を試みた。グリシンを *o*-クロロベンゾイルクロライドと反応させ **6** を得た。次に、無水酢酸存在下、ベンズアルデヒドを反応させ、**7** を得、続いて、無水テトラクロロエタン中で塩化アルミニウムを  $60^{\circ}\text{C}$  で攪拌し **8** を得た。その後、ヘキシルジアミンの一方のアミノ基を Boc 基で保護した **9** と縮合後、脱保護を行い、PK を得た。DOTA 誘導体と PK の縮合は、BOP 試薬を用いて行い、その後脱保護することで DOTA-PK2 を得ることに成功した。得られた DOTA-PK2 を用いて放射性ガリウム標識を検討した。放射性ガリウムとして、半減期が比較的長く、取扱いの容易な  $^{67}\text{Ga}$  を使用した。DOTA-PK2 を  $^{67}\text{GaCl}_3$  と pH 4.6、 $95^{\circ}\text{C}$  で 60 分間反応させることで、放射化学的収率 50%以上、放射化学的純度 99%以上で  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-PK2 を得ることに成功した。また標品として非放射性ガリウムを用いて、Ga-DOTA-PK2 の作製にも成功した。

以上、痛み分子イメージングの標的として、PBR の有用性を明らかとした。また、P2X4 を標的としたプローブとしてフロキセチンの可能性を見出した。さらに、PBR を標的としたマルチバレント PET プローブとして放射性ガリウム標識 DOTA-PK2 の合成に成功した。これらの基礎的知見は、今後の活性化ミクログリア特異的 PET プローブの開発に新たな指針を与えるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

向 高弘 (MUKAI TAKAHIRO)  
神戸薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：30284706

(3) 連携研究者

佐野 紘平 (KOHEI SANO)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：00546476