

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 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791468

研究課題名（和文）末梢組織における異物排出トランスポータ機能のイメージング

研究課題名（英文）Imaging of the function of efflux transporters in peripheral tissues

研究代表者

岡村 敏充 (Okamura Toshimitsu)

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：80443068

研究成果の概要（和文）：Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)は生体内に広く分布し、細胞内に侵入する有害な異物を排除している一方で、その過剰発現は薬剤耐性に深く関与し、また、一部の疾患では MRP1 の発現量が変化している。本研究では、プリン骨格を有する ^{14}C 標識プローブを用いて末梢組織における MRP1 機能のイメージングの可能性を検討した。その結果、本プローブは肺組織において P 糖タンパク質や乳癌耐性タンパク質には認識されず、MRP1 特異的に排出されたことから、肺の MRP1 機能の非侵襲的測定が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) is ubiquitously expressed in the body and transports various xenobiotics out of cells. The alteration of MRP1 expression is associated with certain diseases. The aim of this study was to examine the feasibility of imaging MRP1 function in peripheral tissues using a ^{14}C -labeled probe with a purine skeleton. In the lung tissue, the probe is transported by MRP1 but not P-glycoprotein or breast cancer resistance protein, suggesting that the probe allows for noninvasive measurement of pulmonary MRP1 function.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射性医薬品、分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)は肺や脳、腎臓など生体内に広く分布し、細胞内に侵入する有害な異物を排除するだけでなく酸化ストレスによる毒性の消去にも関与している。また、慢性閉塞性肺疾患やアルツハイマー病をはじめとする様々な疾患において MRP1 の発現量が変化していることが認められている。特に、腫瘍組織における MRP1 の過剰発現は薬剤耐性に深く関与し、臨床問題となっている。従って、MRP1

機能のインビボイメージングは MRP1 阻害剤の薬効の評価については薬物治療の改善、さらに慢性閉塞性肺疾患などの種々の疾患の早期診断や病態解明に貢献できることが期待される。しかしながら、末梢組織での MRP1 に特異的なイメージングプローブは未だ開発されていない。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、ポジトロン断層撮像法(PET)を用いて脳内の MRP1 機能を定量的

に測定するための独自の方法およびこの方法に基づく新規プローブの開発を行ってきた。開発した 6-ブromo-7- ^{14}C メチルプリン (^{14}C I) は測定原理に従った動態を示し、脳内の MRP1 機能の定量測定に成功した (Okamura et al. J Cereb Blood Flow Metab, 2009)。当該研究では本方法論の末梢組織への応用を試み、PET プローブ ^{14}C I を用いて特に肺組織における MRP1 機能のインビボイメージングの可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 測定原理

肺組織における MRP1 機能のイメージングのための測定原理を図 1 に示す。脂溶性の ^{14}C I を静脈内投与し、拡散により肺に取り込ませる。その後、細胞内に存在するグルタチオン (GSH) と反応させ、MRP1 の基質である水溶性の GSH 抱合体 (^{14}C II) に変換させる。投与直後の肺の放射能は ^{14}C I と ^{14}C II の双方に依存して減少するが、一定時間経過後、即ち、 ^{14}C I が完全に ^{14}C II に変換した後の放射能の減少は基質 ^{14}C II のみに依存する。従って、 ^{14}C II が減少する速度を求めることで肺における MRP1 機能のインビボイメージングが可能となると考えられる。

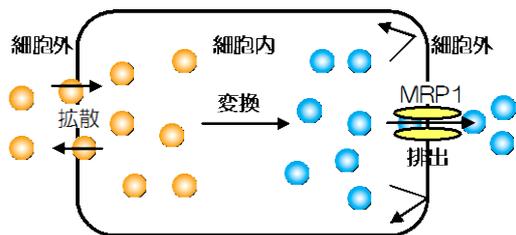


図1. 測定原理

●: ^{14}C I. ●: ^{14}C II (GSH抱合体)

(2) インビトロにおける ^{14}C I と GSH との反応速度の評価

インビトロでの反応速度は、野生型マウスの肺ホモジネート中で ^{14}C I の経時変化を測定後、時間に対して未変化体の割合を対数プロットし、その傾きから求めた。

(3) インビボにおける ^{14}C I および ^{14}C II の肺への移行性の検討および化学形の分析

本測定原理に基づき、 ^{14}C I は血液から肺に速やかに取り込まれることが必要である。一方、 ^{14}C II の組織移行性は低いことが望ましい。これらのことを確認するため、 ^{14}C I または ^{35}S II をマウスに静脈内投与後、解剖学的手法により採取した肺および血液の経時的な放射能濃度を調べた。また、インビボにおいて ^{14}C I から ^{14}C II へ効率よく変換されたかを確認するため、 ^{14}C I 投与後の肺における化学形の分析を行った。

(4) 肺組織における ^{14}C I の動態の検討

PET 装置を用いてマウスの肺における ^{14}C I の動態を評価した。また、投与後 5 分から 15 分までの動態からグルタチオン抱合体 (^{14}C II) の肺からの排出速度を測定した。さらに、排出トランスポーター MRP1、P 糖タンパク質 (Pgp)、乳癌耐性蛋白質 (BCRP) の欠損マウスの肺における動態を比較検討した。薬剤を用いた応答性の評価では、 ^{14}C I の動態に対する MRP1 阻害剤 MK571 の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) インビトロにおける ^{14}C I と GSH との反応速度

本測定原理によって、MRP1 の機能を測定するためには肺における ^{14}C I から ^{14}C II への変換速度が重要である。 ^{14}C I の GSH との反応速度は $1.6 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ であり、 ^{14}C I はインビボ肺においても速やかに ^{14}C II に変換されることが予想された。

(2) インビボにおける ^{14}C I および ^{35}S II の肺への移行性の検討および化学形の分析

図 2 にそれぞれのプローブの肺組織と血液における取り込み量を示す。

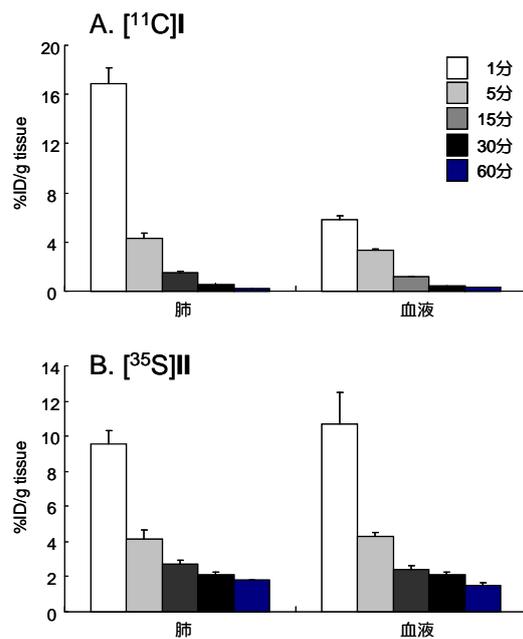


図2. 野生型マウスの組織における放射能の経時変化

^{14}C I は投与後 1 分で高値を示し、その後血中濃度と平行して速やかに減少した。同様に ^{35}S II も 1 分から 60 分の間において速やかに肺組織から洗い出された。しかしながら、肺の初期取り込みが血液中と同程度であり、投与後 1 分における ^{14}C I の肺/血液比は ^{35}S II と比較して有意に高かった。これらの結果は、親化合物である ^{14}C I は肺組織への移行性が高いのに対して、 ^{14}C II は低いことを示唆する。また、MRP1 の機能をイメージン

グするためには実際に肺組織において $[^{14}\text{C}]\text{I}$ が $[^{14}\text{C}]\text{II}$ に速やかに変換されていることが必要となる。このことを確認するため、化学形の分析を行った。その結果、親化合物の $[^{14}\text{C}]\text{I}$ は投与後5分で、野生型およびMrp1欠損マウスの肺組織から完全に消失した。Mrp1欠損マウスでは肺の放射性化合物の大部分はGSH抱合体の $[^{14}\text{C}]\text{II}$ であり、野生型マウスでは未知代謝物が認められたものの、放射能の70%が $[^{14}\text{C}]\text{II}$ であった。

(3) 肺組織における $[^{14}\text{C}]\text{I}$ の動態の検討

図3にPET加算画像を示す。Mrp1欠損マウスの肺組織(矢印)には高い放射能が認められたが、野生型およびPgp/Bcrp欠損マウスでは肺の放射能濃度は低値を示した。

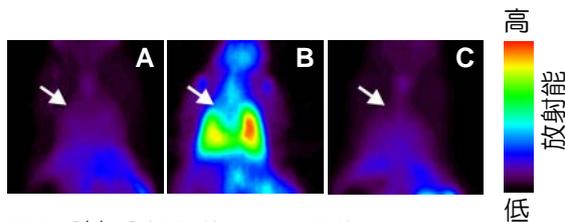


図3. $[^{14}\text{C}]\text{I}$ 投与後のPET画像
野生型マウス(A), Mrp1欠損マウス(B),
Pgp/Bcrp欠損マウス(C)

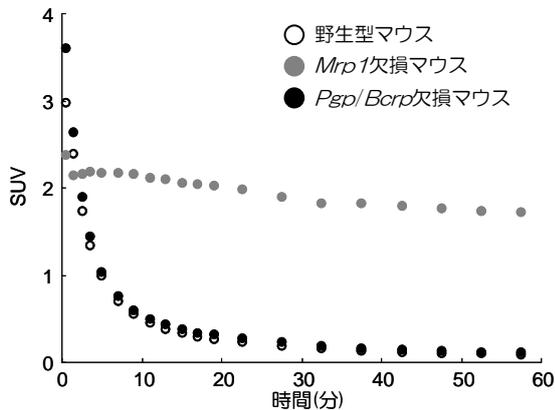


図4. 時間-放射能曲線

図4に $[^{14}\text{C}]\text{I}$ の時間-放射能曲線を示す。野生型およびMrp1欠損マウス共に肺の放射能は投与直後にピークに達した。しかしながら、その後の洗い出し速度に著しい違いが認められた。野生型マウスの肺では放射能は速やかに減少したが、Mrp1欠損マウスでは58分まで大部分が捕捉された。5分から15分までの時間-放射能曲線から算出した排出速度は野生型マウスに関しては 0.11 min^{-1} 、Mrp1欠損マウスに関しては 0.0064 min^{-1} であり、有意な排出速度の低下が認められた。また、Pgp/Bcrp欠損マウスの肺における $[^{14}\text{C}]\text{I}$ の動態は野生型マウスと同様であり、肺組織の放射能はピークに達した後速やかに減少した。これらのことは、肺組織内で生じた $[^{14}\text{C}]\text{II}$

がMRP1を介して血液中に洗い出されていることを示唆する。

また、肺組織における $[^{14}\text{C}]\text{I}$ の動態に対するMK571(MRP1阻害剤)の影響を調べた。その結果、MK571(100 mg/kg)の処置により肺の放射能のクリアランスはコントロールと比べて遅延し、高用量(300 mg/kg)の処置ではそのクリアランスはさらに遅延した。排出速度は対照群、低用量群および高用量群でそれぞれ 0.10 、 0.088 および 0.043 min^{-1} であり、対照群と低用量群間、低用量群と高用量群間に有意な差が認められた。

図5にGSH抱合体 $[^{14}\text{C}]\text{II}$ 投与後の野生型およびMrp1欠損マウスのPET画像を示す。

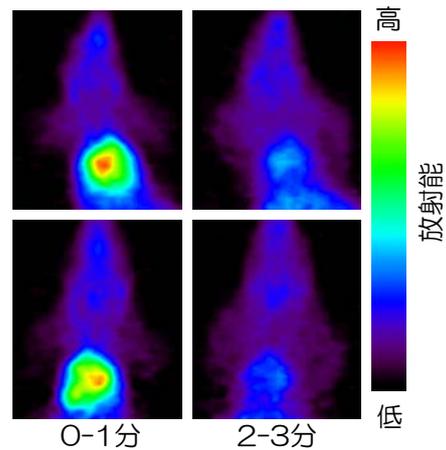


図5. $[^{14}\text{C}]\text{II}$ 投与後のPET画像
上段: 野生型マウス, 下段: Mrp1
欠損マウス

両マウスとも、 $[^{14}\text{C}]\text{II}$ は主に心臓に分布し、その後速やかに排泄された。肺細胞内で生成した $[^{14}\text{C}]\text{II}$ はMrp1欠損マウスの肺から排出されない(図3と4)、血液中の $[^{14}\text{C}]\text{II}$ が肺実質細胞に拡散していれば、野生型マウスとMrp1欠損マウスでは肺の取り込みにより有意な差が認められるはずである。しかしながら、野生型とMrp1欠損マウスの間で $[^{14}\text{C}]\text{II}$ の動態に有意な差は認められなかったことから(図5)、このGSH抱合体の拡散による取り込みは無視できると考えられる。よって、図2における肺組織の $[^{35}\text{S}]\text{II}$ の動態は肺実質細胞内の放射能というより、主に血液中の放射能によるものと考えられる。一方、 $[^{14}\text{C}]\text{I}$ は細胞膜を通過することができ、そこでGSH抱合体に変換されるので、投与5分以降の肺組織における動態はいくぶんは血液中の放射能によるが、主として肺実質細胞に起因すると思われる。しかしながら、血液中の放射能のクリアランスが極端に低下すると、肺組織のクリアランスが見かけ上、低下する恐れがあり、このため、場合によっては、肺組織のMRP1機能を正確に評価することができない可能性がある。本研究では、MK571の処置

により 15 分後の血液中の放射能濃度が増加したが (5 分では有意な増加は認められなかった)、肺の放射能濃度は血液と比較して 5 倍程高かったことから、排出速度の減少は主に MRP1 の機能を反映しているものと考えられる。

以上、6-ブromo-7-[¹⁴C]メチルプリンは速やかに肺に取り込まれた後、水溶性の GSH 抱合体に変換され、Mrp1 により肺組織から排出された。よって、本プローブを用いて肺組織における MRP1 機能のインビボイメージングの可能性が示された。

肺組織における Mrp1 機能をイメージングするためのプローブはこれまでにほとんど報告されていないが、心筋血流イメージング剤の ^{99m}Tc-MIBI および ^{99m}Tc-テトロフォスミンは MRP1 の基質として認識されることから、これらの薬剤を MRP1 イメージングプローブとして用いることができる可能性がある。しかしながら、^{99m}Tc-MIBI および ^{99m}Tc-テトロフォスミンは Mrp1 だけでなく ABC 輸送体 Pgp の基質でもあるので特異性が低いという欠点がある。これまでに、ガン患者におけるそれぞれのプローブの取り込みと MRP1 の発現量を調べた報告があるが、プローブの腫瘍への取り込みは MRP1 と Pgp の双方に制限されていた。また、これらのプローブは脂溶性が高いため、拡散による排出と輸送体 (Mrp1 と Pgp) による排出が同時に起こり、その結果、排出速度と MRP1 機能との間の相関性が低下する可能性がある。よって、^{99m}Tc-MIBI および ^{99m}Tc-テトロフォスミンは腫瘍における MRP1 や Pgp の薬剤耐性への関与を調べるには有用であるかもしれないが、MRP1 イメージングプローブとしては理想的でない。

一方、[¹⁴C]I は図 1 で示したように、肺組織で水溶性の基質に変換させるため、拡散を伴わない MRP1 機能のイメージングが可能であること、また、水溶性基質あるため GSH 抱合体 [¹⁴C]II の洗い出しには ABC 輸送体の Pgp や Bcrp の影響はないことが考えられる (図 3 と図 4)。従って、[¹⁴C]I は特異性に関しては従来のプローブ ^{99m}Tc-MIBI および ^{99m}Tc-テトロフォスミンより MRP1 機能のイメージングに有用であると考えられる。

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 1 件)

- ① Toshimitsu Okamura, Tatsuya Kikuchi, Maki Okada, Hidekatsu Wakizaka, and Ming-Rong Zhang. Imaging of Activity of Multidrug Resistance-Associated

Protein 1 in the Lungs, Am J Respir Cell Mol Biol (in press). 査読有. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0275MA

[学会発表] (計 3 件)

- ① 岡村敏充、菊池達矢、岡田真希、張明榮、脇坂秀克、肺組織における薬剤排出トランスポーター機能測定用分子プローブの開発研究、日本薬学会第 132 年会、2012/03/28、北海道大学札幌キャンパス、札幌市
- ② 岡村敏充、菊池達矢、岡田真希、張明榮、脇坂秀克、肺における異物排出ポンプ機能の測定を目的とする PET プローブの開発、第 51 回日本核医学会学術総会、2011/10/28、つくば国際会議場、つくば市
- ③ Toshimitsu Okamura, Tatsuya Kikuchi, Maki Okada, Hidekatsu Wakizaka: Evaluation of a purine derivative for imaging of the efflux transporter (ABCC1) in the lung, the 19th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, 2011/08/28, VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands

[その他]

発表論文等データベース

<http://www.nirs.go.jp/db/seikadb/Welcome.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 敏充 (OKAMURA TOSHIMITSU)
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：80443068

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし