

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591813

研究課題名(和文) 不安定プラークの核医学診断のための理論的精密設計に基づく低分子プローブ開発

研究課題名(英文) Development of small molecular radiolabeled probes for nuclear medical imaging of unstable plaques

研究代表者

天満 敬 (TEMMA, TAKASHI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：90378787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、近年動脈硬化治療の分子標的として注目されてきているFatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) およびMatrix Metalloproteinase 12 (MMP12) に着目し、選択的阻害剤構造を基盤とした低分子核医学イメージングプローブの開発を目的とした。トリアゾロピリミジン骨格を有する¹²⁵I-TAP1は高いFABP4親和性を認め、一方で高い非特異的結合性を示した。脂溶性を低減した¹⁸F-FTAP1は高いFABP4親和性・選択性を示し非特異的集積を低減した。さらに¹⁸F-FTAP1はFABP4発現組織のインビボPETイメージングが可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop small molecular radiolabeled probes for imaging Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) and Matrix Metalloproteinase 12 (MMP12) in unstable plaques since FABP4 and MMP12 are promising candidates for molecular targeted therapy of atherosclerosis. ¹²⁵I-TAP1 with triazolopyrimidine structure showed high FABP4 affinity and selectivity but showed high nonspecific accumulation in vitro. ¹⁸F-FTAP1 showing lower hydrophobicity rather than ¹²⁵I-TAP1 maintained high affinity and selectivity toward FABP4 and succeeded in decrease of nonspecific accumulation in vitro. Besides, ¹⁸F-FTAP1 enabled in vivo imaging of FABP4 expression in mice by microPET/CT.

研究分野：放射性薬品化学・分子イメージング学

キーワード：放射性医薬品 動脈硬化イメージング 不安定プラーク

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞の根幹的原因である“動脈内のプラーク”の不安定性を精度よく評価できる診断法の開発が臨床画像診断学の急務である。超音波診断法、MRI、CTは、形態的診断が主で、質的診断に有効な方法は開発されていない(*J Nucl Med*, 51(S1), 2010)。一方、質的診断に優れた核医学イメージング法(PET, SPECT)では、 ^{18}F -FDGのマクロファージへの集積や $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -annexin Vのアポトーシス細胞への集積を指標とする不安定評価が、研究代表者ら(*Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; *J Nucl Med* 2008)を含めた多くのグループで試みられている。しかし、 ^{18}F -FDG、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -annexin Vは、初期・進行病変への集積も高く、不安定病変の特異的検出に優れたイメージング剤の開発が望まれている(*J Nucl Med*, 51(S1), 2010)。

研究代表者らはこれまでに単クローン抗体の高い標的親和性に着目し、動脈硬化プラークの不安定化に関与するいくつかの因子に対する $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識単クローン抗体の開発に成功しており、自然発症動脈硬化モデルウサギ(WHHLMIウサギ)を用いたエクスピボ検討において、不安定なアテローム性病変への特異的かつ高感度な集積性を示してきた(*J Nucl Med* 2008; *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; *J Nucl Med* 2010)。しかしながら抗体プローブでは血中消失速度が遅く、インビボ画像化に必要な高い標的血液比が得られないという問題点を有していた。そこで研究代表者らは、真にインビボイメージングに有効な核医学プローブ開発のためには、

血中消失動態の速やかな低分子プローブであること、高い標的親和性・特異性を示すこと、が必要不可欠であるとの着想に至った。研究代表者らはこれまでに低分子プローブにおいても計算科学に基づく精密分子設計を行うことによりインビボイメージングに足る高い標的親和性・特異性を達成し得ることを示してきている(*Nucl Med Biol* 2009; *J Med Chem* 2011)。さらに、低分子プローブは抗体等のタンパク質プローブにおいてしばしば問題となる免疫原性・安全性リスクが極めて低いこと、製剤としての均一性担保が容易であること、等の理由により、前臨床研究から臨床研究へのトランスレーショナル研究実施にかかるハードルが低く、真に臨床利用可能な不安定プラークの新しい核医学診断法構築に大いに貢献し得ると期待される。

本研究では、最近、インビボにおいて選択的阻害剤による動脈硬化病変治療効果が報告された Fatty Acid Binding Protein4 (FABP4) (*Nature* 447:959-967(2007)) および Matrix Metalloproteinase12 (MMP12) (*ATVB* 31:528-535(2011)) を標的分子として選択し、計算科学的手法を駆使した精密分子設計により高い標的親和性・特異性を有する低分子プローブの開発、およびそれに立脚

した新しい不安定プラークの核医学診断法の確立を目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、動脈硬化治療の分子標的として注目されてきている FABP4 および MMP12 に着目し、選択的阻害剤を基盤とした計算科学的手法に基づく精密分子設計を駆使することで高親和性・高選択性を両立した『低分子核医学イメージングプローブ』を開発することにある。開発するプローブは、最適な標識合成法を併せて供出することにより臨床試験への効率的展開を推進し、真に臨床利用が可能な不安定プラーク(粥状動脈硬化巣)の新しい核医学診断法を提案する。

3. 研究の方法

(1) 分子プローブの設計

文献検索により見出した標的に対する選択的阻害剤の構造を基に、計算科学的手法を基盤として放射性核種を選択し放射性核種導入部位を検討した。

(2) 分子プローブの合成

各合成ステップは類似する論文報告を参考に合成し、クロマトグラフィーによる分取精製を経て、NMR により構造の確認を行った。

放射性ヨウ素標識反応、放射性フッ素標識反応のために、標品に対応するトリブチルスズ体、トシル体をそれぞれ別途合成し、前駆体として用いた。標識反応は常法に従い行った。

(3) インビトロ評価

合成した化合物群について FABP4 に対する親和性を調べるため、FABP4 タンパク質と 1-Anilino-naphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS) を用い、蛍光阻害実験を行った。また、マグネットビーズに固相化した FABP4 タンパク質を用いて放射性プローブの結合飽和実験を行い解離定数 K_d 値を調べた。細胞内に存在する FABP4 への結合性を調べるため、脂肪細胞を分化し FABP4 発現を誘導した後、放射性プローブの細胞取込実験を行った。

(4) インビボ評価

FABP4 プローブの有効性をインビボで調べるため、多数のモデル動物を均一に作製可能で効率的に評価の推進が可能な C6 担がんマウスを利用することとした。プローブを尾静脈より投与し、体内放射能分布を臓器摘出法により調べた。また、投与 3 時間後に PET/CT 撮像を行いインビボイメージングプローブとしての有効性を調べた。

4. 研究成果

(1) 分子プローブの設計

FABP4 プローブ設計にあたりその母体化

合物としては、既報の阻害剤の中から比較的高い FABP4 親和性を示すものを数種類選択し、その構造への導入が比較的容易と考えられた放射性ハロゲン ($^{123/125}\text{I}$ 、 ^{18}F) を放射性核種として選択した。当初、半減期が長く取り扱いが容易な放射性ヨウ素を用いて検討を行ったが、後述の通り放射性ヨウ素標識プローブは高い脂溶性に課題を認めたことから、後半では脂溶性の低減を目的とし放射性フッ素を用いたプローブ開発に移行した。MMP-12 プローブ設計にあたって文献検索によりプローブ母体化合物となる分子構造を認め、放射性核種導入部位の検討を行った。FABP4 プローブと同じく放射性ハロゲンの導入が適切と考えられた。

(2) 分子プローブの合成

FABP4 標的プローブとして、アニリド骨格、ピリミジン骨格、インドール骨格、トリアゾロピリミジン骨格のいずれかを有する計 7 種類の放射性ヨウ素標識プローブ P1 ~ P7 の非放射性標品を合成した。放射性フッ素標識プローブとしてはトリアゾロピリミジン骨格を有する 2 種類 (FTAP1、FTAP3) の非放射性標品を合成した。

放射性ヨウ素標識 P7 ($^{123/125}\text{I}$ -TAP1) は対応するトリブチルスズ前駆体を別途合成し、トリブチルスズ - 放射性ヨウ素交換反応により放射化学的収率 23%、放射化学的純度 99%以上で得た。放射性フッ素標識 FTAP1 (^{18}F -FTAP1) は対応するトシル前駆体を別途合成し、 ^{18}F -KF と Kryptofix222 を用いる ^{18}F 標識反応により放射化学的収率 31%、放射化学的純度 98%以上で得た。

(3) インビトロ評価

1,8-ANS を用いた蛍光阻害実験から P7 が最も高い阻害能を示し、トリアゾロピリミジン骨格の有効性が示された。そこで、P7 を Triazolopyrimidine Derivative-1 (TAP1) と称し放射性ヨウ素標識を行った。 ^{125}I -TAP1 の FABP4 タンパク質に対する Kd 値は 69 ± 12 nM となり放射性イメージングプローブとしての有効性が示唆された。分化脂肪細胞を用いた細胞取込実験の結果、FABP4 発現量に依存して細胞に取り込まれ、阻害剤の添加により濃度依存的に取込が抑制された一方で、その抑制は限定的であり、 ^{125}I -TAP1 の非特異的な細胞集積が示された。 ^{125}I -TAP1 と比べ脂溶性を低減した ^{18}F -FTAP1 は ^{125}I -TAP1 と同程度の FABP4 への親和性を認めた。また、分化脂肪細胞への取り込みは FABP4 依存的であり、阻害剤の添加によって集積の約 95%が抑制された。以上より、 ^{18}F -FTAP1 のインビボイメージングの可能性が示された。

(4) インビボ評価

^{18}F -FTAP1 の体内分布を臓器摘出法により調べたところ骨への放射能集積を認めな

かったことから生体内で脱フッ素反応は起きていないことが示された。 ^{18}F -FTAP1 は肝臓、腎臓に同程度の高い放射能集積を認め、他の臓器に顕著な集積を示さなかった。腫瘍への放射能集積は経時的に上昇し、イメージングの指標となる腫瘍対筋肉放射能集積比は投与 1 時間後以降で 3 以上を示した。さらに、 ^{18}F -FTAP1 投与 3 時間後に PET/CT イメージングを行ったところ、対側正常部位と比べ腫瘍部位に高い放射能集積を認め、明瞭な腫瘍部位のイメージングに成功した。

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 3 件)

K. Nishigori, T. Temma, K. Yoda, S. Onoe, N. Kondo, M. Shiomi, M. Ono and H. Saji, "Radioiodinated peptide probe for selective detection of oxidized low density lipoprotein in atherosclerotic plaques," Nucl Med Biol 40(1), 97-103 (2013) doi: 10.1016/j.nucmedbio.2012.08.002. 査読有
K. Nishigori, T. Temma, S. Onoe, S. Sampei, I. Kimura, M. Ono and H. Saji, "Development of a radioiodinated triazolopyrimidine probe for nuclear medical imaging of Fatty Acid binding protein 4," PLoS One 9(4), e94668 (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0094668. 査読有
T. Temma, K. Nishigori, S. Onoe, S. Sampei, I. Kimura, M. Ono and H. Saji, "Radiofluorinated probe for PET imaging of fatty acid binding protein 4 in cancer," Nucl Med Biol 42, 184-91 (2015) doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.10.006. 査読有

[学会発表](計 7 件)

西郡寛太郎、天満 敬、小野正博、佐治英郎、Fatty acid binding protein-4 を標的とした動脈硬化イメージングのための新規低分子プローブの開発、第 7 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2012 年 5 月 24 日 ~ 25 日、アクトシティ浜松コンgresセンター (静岡県)
Temma T, Nishigori K, Yoda K, Shiomi M, OnoM, Saji H, Development of a radioiodinated short peptide probe for selectively imaging oxidized LDL in atherosclerotic plaques, Society of Nuclear Medicine 59th Annual Meeting, Jun 9-13, 2012, Miami Beach, Florida (United States of America)
天満 敬、西郡寛太郎、依田敬子、塩見雅志、小野正博、佐治英郎、動脈硬化の質的診断のための酸化 LDL 結合性核医学分子イメージングプローブ開発、第 1 回ウサギバイオサイエンス研究会、2012

年8月4日、宮崎観光ホテル(宮崎県)西郡寛太郎、天満 敬、小野正博、佐治英郎、Fatty acid binding protein-4 を標的としたトリアゾロピリミジン骨格を母体とする動脈硬化イメージングプローブの開発、第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2012年8月6日~7日、ホテル平安の森(京都府)

Nishigori K, Temma T, Ono M, Saji H, A novel imaging probe targeting fatty acid binding protein-4 for evaluation of glioblastoma malignancy, Society of Nuclear Medicine 60th Annual Meeting, Jun 8-12, 2013, Vancouver, BC (Canada)

西郡寛太郎、天満 敬、小野正博、佐治英郎、Fatty acid binding protein-4 イメージングプローブの開発：神経膠芽腫モデルマウスを用いた評価、第53回日本核医学会学術総会、2013年11月8日~10日、福岡国際会議場(福岡県)

Temma T, Nishigori K, Kimura I, Ono M, Saji H, Development of a novel radiofluorinated probe for PET imaging of fatty acid binding protein 4 in glioblastoma, XIII Turku PET Symposium, May 24-27, 2014, Turku (Finland)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：不安定プラークへの選択性集積性に優れる化合物

発明者：佐治英郎、小野正博、天満敬、関育也

権利者：佐治英郎、小野正博、天満敬、関育也

種類：特許

番号：特願 2012-110965

出願年月日：2012年5月14日

国内外の別：国内

名称：トリアゾロピリミジン誘導体化合物

発明者：佐治英郎、天満敬、小野正博、関育也

権利者：佐治英郎、天満敬、小野正博、関育也

種類：特許

番号：特願 2013-94993

出願年月日：2013年4月30日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天満 敬 (TEMMA TAKASHI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：90378787

(2) 研究分担者

佐治 英郎 (SAJI HIDEO)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：40115853

塩見 雅志 (SHIOMI MASASHI)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50226106

(3) 連携研究者

なし