

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591826

研究課題名(和文) 脳の多剤耐性関連タンパク質4 活性定量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 PET probe for measuring the activity of multidrug resistance-associated protein 4 in the brain

研究代表者

菊池 達矢 (Kikuchi, Tatsuya)

国立研究開発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・主任研究員

研究者番号：90392224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、脳に存在する多剤耐性関連タンパク質4(MRP4)の活性を定量測定し得る放射性プローブの開発を行なった。まず、C-11で標識した種々の馬尿酸誘導体のエステルを設計し、それらの簡便な標識法について開発を行なった結果、C-11で標識したヨウ化メチルにより室温で効率良くC-11標識する方法を見出した。次いで設計した種々の化合物をインビトロおよびインビボで評価したところ、C-11で標識した馬尿酸ベンジルエステルは、マウスにおいては脳のOAT3および心臓のMRP4の活性を定量測定し得る放射性プローブであることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a PET probe for measuring the activity of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) in the brain. Several hippuric acid ester derivatives labeled with C-11 were synthesized and benzyl hippurate labeled with C-11 showed favorable hydrolysis rate and uptake properties in the brain of mice. Further evaluation using transporter knockout mice revealed that this compound was specifically hydrolyzed to form hippuric acid labeled with C-11 in vivo after the intravenous administration and the radioactive metabolite was retained in the brain and heart of Oat3 knockout mice and Mrp4 knockout mice, respectively, compared with control mice. Therefore, benzyl hippurate labeled with C-11 could be used as a probe for measuring the activities of OAT3 and MRP4 in mouse brain and heart, respectively.

研究分野：放射性医薬品科学

キーワード：PET 多剤耐性関連タンパク質 有機アニオントランスポータ 馬尿酸 脳 心臓

1. 研究開始当初の背景

現在、多数の薬物トランスポータのクローニングに伴い、脳に存在するトランスポータの機能解析などの研究が世界的に展開されている。なかでも異物排出トランスポータが脳内で生成する有害代謝物の排出に關与することで、その活性低下が有害代謝物を蓄積させ脳神経疾患を引き起こすことが示唆され、さらに中枢に作用する薬物や異物の動態を決定する因子として重要視されている。近年、様々な薬剤排出トランスポータ遺伝子の一塩基多型による発現量や活性の低下が報告され、疾患との關連が研究されている。中枢の薬物動態に關与する異物排出トランスポータのうち代表的なP糖タンパク質や乳がん耐性タンパク質だけでなく、多剤耐性關連タンパク質(MRP)も一塩基多型により発現量や活性が低下している人口は少なくないと報告されている。例えば、日本人の18%以上がインフルエンザ治療薬であるタミフルの活性体などを輸送するMRP4の活性を低下させる遺伝子多型を持つとの報告がある。さらに、MRP4活性はアルツハイマー病患者の剖検脳において上昇していることが報告されている。このことから、MRP4の一塩基多型等によるMRP4の発現量や活性の変化による薬物動態の変化や疾患の発症に關する研究のさらなるステップとして、実際に生体においてどの程度MRP4活性が低下しているのかを調べる必要があると考えられる。

これに対し、血液脳関門に発現するトランスポータの発現量を質量分析により計測し、インビトロから求められる輸送速度と発現量の関係をこれに外挿することで、生体における薬物の脳移行性を予測することが試みられている。一方、脳神経疾患の診断や中枢に作用する医薬品等の化合物の動態評価を目的として、近年急速に普及しているポジトロン断層撮像法(PET)の利用が試みられ、PETによる異物排出トランスポータの測定を目的としたPET用放射性プローブの開発が近年盛んに行われている。しかしながら、これらの放射性プローブはトランスポータ基質であることから、正常脳への移行性が低いと変化の定量性が乏しく、さらに脂溶性基質ではトランスポータに依存しない脳への移行および排出があることから、トランスポータ活性の定量測定が極めて困難である。また、動物を用いた研究では、異物排出トランスポータの基質を直接脳内に投与する方法が実施されているが、侵襲的であるためヒトで実施することができない。そこでこれまでに報告者らは、異物排出トランスポータ活性の定量測定を可能にする新たな方法を考案し、血液脳関門に存在する異物排出トランスポータのひとつであるMRP1の定量評価を可能にするPETプローブの開発に成功した。MRP1活性の定量測定を可能にするPETプローブは、脳に移行すると速やかに膜透過性の低い代謝物となり、MRP1特異的に脳から血液に排出

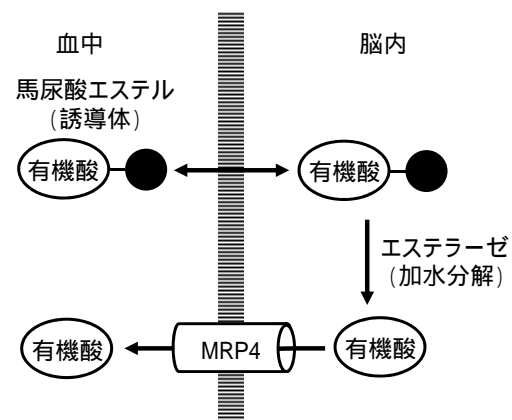
される。実際、MRP1ノックアウトマウスを用いた検討では、脳からの放射能の排出は野生型のマウスと比べ約90%低下した。このことから、報告者らの考案した異物排出トランスポータ活性の定量測定法が妥当であり有用であることが示され、さらに未だその存在意義が不明な脳に存在するヨードトランスポータ活性を定量測定し得るPETプローブの開発へと発展した。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究課題では脳に存在する異物排出トランスポータのなかでもMRP4活性を“非侵襲的”に“インビボ”で“定量”することを可能にするPETプローブの開発を目的として研究を推進した。

脳に存在するMRP4活性の非侵襲的なインビボでの定量測定は、MRP4特異的に排出される放射性代謝物を脳内で生成する、いわばプロドラッグのようなPETプローブを開発することにより本研究目的を達成し得ると考えた。MRP4は馬尿酸などの有機酸を基質とすることが知られており、極性の高い有機酸は膜透過性が低いと考えられることから、脳内でMRP4基質である放射性核種で標識した有機酸を生成するエステルを用いることで、当該目的を達成するPETプローブの開発が可能になると考えた。これまでに報告者らは、脳内コリンエステラーゼ活性の定量測定を目的としたPETプローブの開発を行い、様々なピペリジノールエステル誘導体の構造活性相関の検討から、アセチルコリンエステラーゼおよびブチリルコリンエステラーゼ特異的な基質を見出し、これを放射性核種で標識することにより当該目的を達成するPETプローブの開発に成功した。この研究から得た知見に、効率的に脳に有機酸のひとつであるカルボン酸を持つ化合物を送達する化学構造がある。報告者らの基礎的な検討において、有機アニオンでありMRP4の基質である馬尿酸とメタノールのエステルは脳組織試料中でほとんど加水分解されない一方、馬尿酸および馬尿酸誘導体とピペリジノール誘導体とのエステルの脳組織試料中での加水分解速

図1. 脳のMRP4活性の測定モデル



度は速やかであった。このことから、図1に示すように、放射性標識した馬尿酸もしくは馬尿酸誘導体と種々のアルコールとのエステルを投与し、MRP4の基質である放射性標識された馬尿酸もしくは馬尿酸誘導体を脳内で生じさせることで、脳のMRP4活性の測定が可能であると期待した。

3. 研究の方法

(1) 馬尿酸および馬尿酸誘導体のエステルの¹¹C標識法の検討

本研究目的を達成するPETプローブの候補として、[amide-¹¹C]馬尿酸エステル(以下¹¹C馬尿酸エステル)、*N*-¹¹Cメチル馬尿酸エステル、*m*-¹¹Cメトキシ馬尿酸エステル、および*p*-¹¹Cメトキシ馬尿酸エステルを設計した。従来の方法による*N*-¹¹Cメチル馬尿酸エステル、*m*-¹¹Cメトキシ馬尿酸エステル、および*p*-¹¹Cメトキシ馬尿酸エステルの¹¹C標識法では、対応する標識前駆体と¹¹C-ヨウ化メチルとを反応させる際に、塩基触媒としてNaHやNaOH等を用いるが、これらは有機溶媒に不溶であるため自動合成装置による¹¹C標識の際に幾つかの問題がある。そこで、有機溶媒に可溶な塩基であるフッ化テトラブチルアンモニウムを用いた¹¹C標識法について検討を行ない、NaHを用いた場合と比較した。

(2) ¹¹C馬尿酸エステルおよび¹¹C馬尿酸誘導体エステルのインビトロおよびインビボ評価

脳に存在するMRP4活性の定量測定を可能にするPETプローブは、脳内での速やかな代謝分解、高い脳内移行性、代謝物の低い脳移行性、単一の脳内放射性代謝物、脳で生成する放射性代謝物の排出がMRP4特異的(律速)などの条件を満たすことが必要である。そこで、エタノールおよびベンジルアルコールの[amide-¹¹C]馬尿酸エステル、*N*-¹¹Cメチル馬尿酸エステル、*m*-¹¹Cメトキシ馬尿酸エステル、および*p*-¹¹Cメトキシ馬尿酸エステルを標識合成し、上記条件について検討を行なった。

加水分解速度

血液を灌流により除いたマウスから大脳を採取し、ホモジネートを作成した。37°Cでインキュベートした大脳ホモジネートおよび血液(灌流前に採取)にそれぞれの¹¹C標識候補化合物を加え、幾つかの時点において一部をあらかじめエタノールの入ったチューブに採取し反応を停止した。次いで、遠心分離により除タンパクした上清について、Radio-TLC法にて分析した。

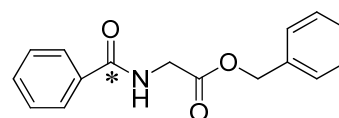
¹¹C標識候補化合物の脳移行性

それぞれの¹¹C標識候補化合物をマウスに投与した後の0.5分における脳内放射能をPETにより測定した。

¹¹C馬尿酸の脳移行性

上記およびの検討により、¹¹C馬尿酸

図2. Benzyl [¹¹C]hippurate



*: ¹¹C-Labeling position

のベンジルエステル(図2)が最も有力な候補化合物であったことから、¹¹C馬尿酸を標識合成し、MRP4ノックアウトマウス、対照マウス、およびMRP4と同様に有機アニオンを輸送するOAT3をノックアウトしたマウスにおける¹¹C馬尿酸の脳移行性を、と同様にPETを用いて検討した。

脳内放射性代謝物

¹¹C馬尿酸のベンジルエステルをマウスに投与した後の脳内代謝物をRadio-TLC法にて分析した。

脳内放射性代謝物の排出速度

¹¹C馬尿酸のベンジルエステルをMRP4ノックアウトマウス、対照マウス、およびMRP4と同様に有機アニオンを輸送するOAT3をノックアウトしたマウスに投与し、PETにより得た投与後中期の脳内放射能動態から、脳内放射性代謝物の排出速度を測定した。

(3) ^{99m}Tc-ECDのマウス脳内動態に対するOAT3の関与

^{99m}Tc-ECDは臨床において脳血流を測定するために用いられる放射性薬剤である。^{99m}Tc-ECDは脳内において速やかに加水分解され、それにより生じたモノカルボン酸代謝物がヒトの脳内に保持される。しかしながら、マウスやラットにおいては放射能が脳内に保持されないことが知られており、これらの動物では加水分解速度が遅いことがこの原因として考えられていた。これに対し、(2)の研究結果とOAT3の脳における発現の種差から、マウスやラットにおいては脳内で生じた^{99m}Tc-ECDのモノカルボン酸代謝物がOAT3により脳から排出され得ると考えた。そこで、^{99m}Tc-ECDを対照マウスおよびOAT3ノックアウトマウスに投与し、脳内代謝物および脳内放射能動態を(2)の研究と同様に検討した。この脳内放射能動態の検討では小動物用単光子断層撮像装置を用い、^{99m}Tc-ECD投与後5分毎の脳内放射能を連続的に計測した。

4. 研究成果

(1) 馬尿酸エステルおよび馬尿酸誘導体エステルの¹¹C標識法の検討

アミド基の*N*-¹¹Cメチル化およびフェノール性水酸基の*O*-¹¹Cメチル化を¹¹C-ヨウ化メチルを用いて行う際に、溶媒にDMSOを用い、塩基触媒としてフッ化テトラブチルアンモニウムを用いることで、NaHを使用した際よりも簡便かつ効率的に対応する¹¹C標識体を得ることが出来ることを見出した。多く

の場合、NaH を使用した場合には加熱が必要であったのに対し、フッ化テトラブチルアンモニウムを使用した場合には、室温で NaH を使用した場合と同等もしくは高い標識収率を得た。

(2) [¹¹C]馬尿酸エステルおよび[¹¹C]馬尿酸誘導体エステルのインビトロおよびインビボ評価

加水分解速度

各候補化合物はリン酸緩衝液中(0.1 M, pH7.4)で安定であったが、組織試料中では一次速度に従いエステル結合が加水分解され、他の代謝物は観察されなかった。ベンジルエステルの組織試料中での加水分解速度は非常に速やかであったが、エチルエステルの加水分解速度は非常に低く、エチルエステルは本研究目的に適さない化合物であると考えられた。

¹¹C 標識候補化合物の脳移行性

エチルエステルをマウスに投与した後の0.5分における脳の放射能は高く、ベンジルエステル投与後では中程度であった。この結果は、血中加水分解速度が遅いエチルエステルがより多く脳に到達したためと考えられ、実際、血中加水分解速度と投与後0.5分の脳内放射能濃度に高い相関を認めた。

[¹¹C]馬尿酸の脳移行性

[¹¹C]馬尿酸の脳への取り込みは非常に低く、脳内放射能動態は対照マウス、MRP4 ノックアウトマウス、および OAT3 ノックアウトマウスの間で差を認めなかった。

脳内放射性代謝物

[¹¹C]馬尿酸のベンジルエステルをマウスに投与した後の脳内には、[¹¹C]馬尿酸以外の代謝物は観察されなかった。また、投与後5分の時点で脳内の放射能の全てが[¹¹C]馬尿酸由来であり、[¹¹C]馬尿酸のベンジルエステルは観察されなかった。

脳内放射性代謝物の排出速度

[¹¹C]馬尿酸のベンジルエステルをマウスに投与した後、5分以降の脳内放射能動態は一次速度に従い減少した。この放射能の減少は、およびの実験結果から、脳内で生成した[¹¹C]馬尿酸が脳から排出を示していると考えられた。

対照マウスにおける脳からの放射能の排出速度は、OAT3 ノックアウトマウスの約5倍であり、脳内放射能の約80%がOAT3により排出されることが示された。一方、対照マウスとMRP4 ノックアウトマウスにおける脳からの放射能の排出速度に差は認められなかったことから、脳からの[¹¹C]馬尿酸の排出にMRP4は関与しないことが示唆された。

以上の結果から、[¹¹C]馬尿酸のベンジルエステルは、マウスの脳におけるOAT3活性を定量測定し得るPETプローブであることが示された。

また、本研究を遂行する過程で、[¹¹C]馬尿酸のベンジルエステルをマウスに投与し

た後の心臓組織からの放射能の消失は、MRP4 ノックアウトマウスにおいて顕著に低下することが判明した。このことは、[¹¹C]馬尿酸がMRP4基質であること、そして[¹¹C]馬尿酸のベンジルエステルが心臓のMRP4活性を定量測定し得るPETプローブであることを示唆した。

(3) ^{99m}Tc-ECD のマウス脳内動態に対する OAT3 の関与

^{99m}Tc-ECD をマウスに投与した後の脳内にはほぼ単一の放射性代謝物が観察され、この代謝物はモノカルボン酸代謝物と考えられた。また投与15分以降では、脳内に未変化体(^{99m}Tc-ECD)は観察されず、投与15分以降の脳の放射能の減少は、モノカルボン酸代謝物の排出によるものと考えられた。この脳内放射能の減少は一次速度に従い、上記(2)の研究結果と同様に、対照マウスにおける脳からの放射能の排出速度は、OAT3 ノックアウトマウスの約5倍であり、脳内放射能の約80%がOAT3により排出されることが示された。

このことから、[¹¹C]馬尿酸のベンジルエステルもヒトにおいては^{99m}Tc-ECDと同様にその放射能が脳に保持されることが示唆され、[¹¹C]馬尿酸のベンジルエステルはヒトにおいては脳血流もしくは血液脳関門の健全性を測定するPETプローブとして利用できる可能性が示唆された。また、[¹¹C]馬尿酸エステルのアルコールを変え、加水分解速度を調節することで、[¹¹C]馬尿酸エステルを脳内で加水分解する酵素を測定し得るPETプローブの開発が可能になることも示唆された。

(4) まとめ

本研究により、マウスの脳におけるOAT3活性を定量測定し得るPETプローブの開発に成功した。当該化合物がMRP4 ノックアウトマウスにおいて心臓のMRP4活性に反応したものの、脳のMRP4活性には反応しなかった点については、MRP4 ノックアウトマウスにおいて、他の[¹¹C]馬尿酸を排出するトランスポーターが脳では代償的に発現している可能性も考えられる。また、脳における[¹¹C]馬尿酸のMRP4特異性が低い可能性もあることから、今後のさらなる検討が必要であると考えられた。

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)

Tatsuya Kikuchi, Toshimitsu Okamura, Maki Okada, Masanao Ogawa, Chie Suzuki, Hidekatsu Wakizaka, Joji Yui, Toshimitsu Fukumura, Antony D. Gee, Ming-Rong Zhang. Benzyl [¹¹C]hippurate as an agent for measuring the

activities of organic anion transporter 3 in the brain and multidrug resistance-associated protein 4 in the heart of mice. J Med Chem. [E-pub ahead of print] 査読有り

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00454
Tatsuya Kikuchi, Toshimitsu Okamura, Hidekatsu Wakizaka, Maki Okada, Kenichi Odaka, Joji Yui, Atsushi B Tsuji, Toshimitsu Fukumura, Ming-Rong Zhang. OAT3-mediated extrusion of the ^{99m}Tc-ECD metabolite in the mouse brain. J. Cereb. Blood Flow. Metab. 2014, 34(4), 585-588. 査読有り

DOI: 10.1038/jcbfm.2014.20.
Tatsuya Kikuchi, Katsuyuki Minegishi, Hiroki Hashimoto, Ming-Rong Zhang, Koichi Kato. The use of tetrabutylammonium fluoride to promote *N*- and *O*-¹¹C-methylation reactions with iodo[¹¹C]methane in dimethyl sulfoxide. J. Labelled Compd. Radiopharm. 2013, 56(13), 672-678. 査読有り

DOI: 10.1002/jlcr.3092.

〔学会発表〕(計 3件)

菊池達矢. DMSO 中における TBAF を塩基として用いた [¹¹C]H₃I による *N*-および *O*-¹¹C メチル化. 日本核医学会学術総会, 2013 年 11 月 9 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

菊池達矢. 有機アニオン輸送体活性の定量測定を目的とした PET プローブの開発研究. 日本核医学会学術総会, 2012 年 10 月 11 日, ロイトン札幌/ニトリ文化ホール(北海道・札幌市)

Tatsuya Kikuchi. Development of a PET probe for imaging of organic anion transporters. World Molecular Imaging Congress, 2012 年 9 月 5 日, ダブリン(アイルランド)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 達矢 (Kikuchi, Tatsuya)
国立研究開発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・主任
研究員
研究者番号: 9 0 3 9 2 2 2 4