

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34306

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15459

研究課題名(和文)炎症性マクロファージ様細胞を標的とした新規放射性分子プローブの開発研究

研究課題名(英文)Development of  $^{125}\text{I}$ -labeled probe for the detection of macrophage-like cells in inflammatory lesion

研究代表者

河嶋 秀和 (Kawashima, Hidekazu)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70359438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性組織のマクロファージ様細胞に発現しているプリン受容体(P2Y6サブタイプ)を標的とした放射性分子プローブの開発と、これを用いた炎症性病変の定量的評価を目指した。P2Y6受容体リガンドであるUDPのuridine骨格C5位に放射性ヨウ素を導入した化合物： $[^{125}\text{I}]5\text{-I-UDP}$ の合成を試みた。テレピン油の皮下投与により作製した炎症誘発モデルマウスを用いた検討では、 $[^{125}\text{I}]5\text{-I-UDP}$ は静脈内投与の30分後、炎症部位において健常部位よりも1.6倍の高い放射能集積を認めた。一方、合成収率や純度を高めるための検討は継続する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Purinoceptor (P2Y6 subtype) is expressed on the surface of macrophage-like cells at inflamed tissue. The purpose of this study was to develop a novel radioligand targeting to P2Y6 receptor which can quantitatively detect the inflammatory lesion. Uridine diphosphate is known as a selective endogenous ligand for P2Y6 receptor. Based on the consideration of structure-activity relationship, iodine-125 was introduced at C5 position on the uridine site of UDP and then  $[^{125}\text{I}]5\text{-I-UDP}$  was synthesized. When  $[^{125}\text{I}]5\text{-I-UDP}$  was intravenously injected to mice bearing inflammation induced by the subcutaneous treatment of turpentine, 1.6 times higher radioactivity was accumulated at the inflammatory lesion compared to the unaffected site. However, further investigations are needed to improve both yield and radiochemical purity.

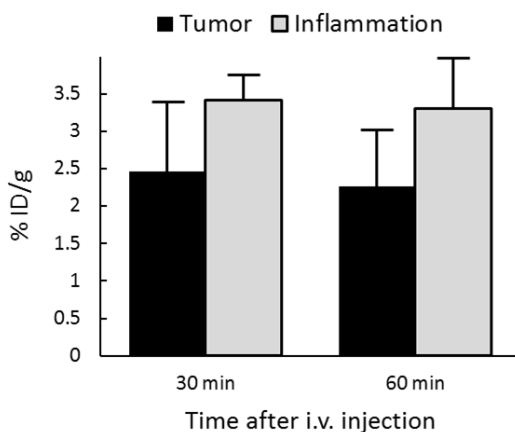
研究分野：放射性医薬品

キーワード：炎症 マクロファージ 分子イメージング 放射線 プリン受容体

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症は種々の疾患に付随して観察される生体反応であり、しばしば患者の QOL を著しく低下させる。したがって、その病態像を早期の段階で正確に理解することが、基礎疾患の進行を制御するとともに治療を進める上で重要である。現在、各種病変のインビボ診断には Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) や Positron Emission Tomography (PET) 等の生体機能情報を可視化する分子イメージング手法が活用されており、その技術の炎症性疾患への適応が期待されている。

(2) 炎症性組織にはマクロファージが遊走しており、活動状態にあるマクロファージでは糖代謝が亢進しているため、グルコース誘導体である PET プローブ: 2-deoxy-2- $^{18}\text{F}$  fluoro-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ FDG) を用いた炎症部位の同定が試みられてきた。一方、 $^{18}\text{F}$ FDG は脳や腫瘍等、炎症以外の糖代謝が活発な組織にも集積するため、このことが臨床、炎症性疾患の診断精度を高めるにあたっての障壁となっている。研究代表者は、担癌マウスにテレピン油処置を施すことにより炎症を誘発させ、 $^{18}\text{F}$ FDG を静脈内投与した後の分布を同一個体で比較検討したところ何れの組織にも高い集積性を示すという結果が得られた(下図)。



(3) 近年、末梢組織におけるプリン受容体の役割が明らかになりつつあり、特に免疫系細胞種の活性の上昇に深く関与していることが示された (Rayah A., *Microbes Infect.*, 2012)。プリン受容体の中でも、マクロファージ様細胞が貪食能を獲得する過程においては主に G タンパク共役型 (P2Y6 受容体) との関連性が示唆されているが、その研究は発展途上であり、中でも病態を把握する診断ツールとして重要な役割を担う分子プローブの開発は実用化の域に達していない。そこで、研究代表者は P2Y6 受容体を標的とした新たな集積機序に基づく炎症を定量的に評価しうる分子プローブの開発を行った。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症性組織に遊走・集積したマクロファージ様細胞に高発現するプリン受容体をターゲットとした新規放射性分子プローブを創製し、新しい炎症性病変の診断技術を構築することにある。すなわち、プリン受容体のサブタイプ中、特に貪食能への関与が報告されている P2Y6 受容体に着目し、当該受容体が認識する分子に適切な放射性同位元素を導入した化合物の合成を課題目標とする。

この目的のため、研究代表者は以下の 3 項目について研究推進を企図した。

- P2Y6 受容体が高い親和性を有するリガンドの選択
- 放射性プローブの分子設計と合成
- 疾患モデル動物の作製とこれを用いたプローブの評価

### 3. 研究の方法

#### (1) UDP 受容体結合リガンドの選択

炎症性組織に遊走した免疫系細胞の細胞膜にはプリン受容体が発現しており、損傷した細胞から放出された ATP 等ヌクレオチドの結合が免疫応答の活性化に関与している。さらに、ヌクレオチドの一種である UDP は P2Y6 受容体に特異的な内因性アゴニストとして知られていることから (Balasubramanian R., *Biochem. Pharmacol.*, 2013) 本研究では UDP を放射性プローブの母体を選択した。

#### (2) 分子設計

UDP はウリジンのピロリン酸エステルである。さらに、ウリジンはウラシルがリボース環に  $-N_1$ -グリコシド結合で接続した構造を有するが、構造活性相関を基盤とする知見に基づき (Besada P., *J. Med. Chem.*, 2006) ウリジン骨格 C5 位にヨウ素を置換しても受容体の基質認識性は保持されると判断した。そこで、本研究ではウリジン骨格 C5 位に放射性ヨウ素 I-125 を炭素-ハロゲン結合を介して直接導入した化合物、 $^{125}\text{I}$ -5-I-UDP の標識合成を検討した(図 1)。

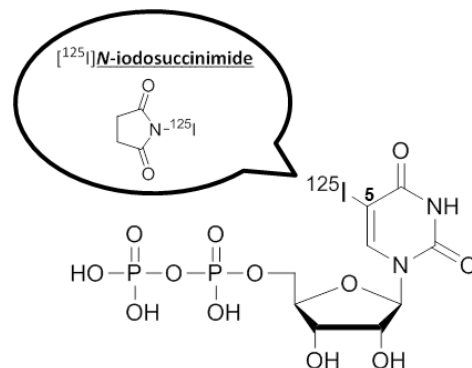


図 1  $^{125}\text{I}$ -5-I-UDP の構造式

### (3) [<sup>125</sup>I]5-I-UDP の合成

[<sup>125</sup>I]N-iodosuccinimide ([<sup>125</sup>I]NIS) を用いる求電子置換反応により、標識前駆体への I-125 の導入を試みた。

まず、窒素雰囲気下、[<sup>125</sup>I]NaI (18.5 MBq) に N-chlorosuccinimide (NCS) のアセトン溶液 (15 μg/50 μL) を添加し、室温で 10 分間静置した。その後、カラムによる固相抽出にて [<sup>125</sup>I]NIS を調製した。溶媒を留去した後、水とアセトニトリル (1:2) の混液に溶解した UDP ニナトリウム塩溶液 (100 μg/50 μL) を加え、70°C に加熱したが反応は進行しなかった。これは、負に帯電した分子内ピロリン酸基が [<sup>125</sup>I]NIS による求電子反応を阻害したことが原因と考えた。そこで、ヌクレオシドの C5 位ハロゲン化に関する報告を参考に (Kumar V., *Synthesis*, 2009) Ionic Liquid を反応溶媒としてウリジンから [<sup>125</sup>I]5-iodouridine を合成し、さらに C5' 位水酸基にリン酸基を伸長させて [<sup>125</sup>I]5-I-UDP を得る手法 (Maruoka H., *J. Med. Chem.*, 2010) を組み合わせることを考えた。すなわち、[<sup>125</sup>I]NIS を調製後、[MoeMim][TFA] に溶解したウリジン溶液 (150 μg/100 μL) を加え、75°C で 4 時間反応させた。引き続き 1,8-bis (dimethylamino)naphthalene の存在下、温度調節をしながら塩化ホスホリルとリン酸ピストリブチルアンモニウム塩を順次添加して反応を進行させた。反応溶液を固相カラムに通じ、[<sup>125</sup>I]5-I-UDP を得た。

### (4) 血漿中安定性の評価

[<sup>125</sup>I]5-I-UDP を ddY マウスから採取した血漿と混合し、37°C で 30 分、1 時間、3 時間インキュベートした。アセトニトリルを添加してタンパク成分を除いた後、リン酸緩衝液で希釈した試料を固相カラムに通じ、[<sup>125</sup>I]I<sup>-</sup> に該当する画分の放射能をもとに未変化体の割合を算出した。

### (5) モデルマウスの作製

ddY マウス (雄性、6 週齢) にテレピン油 (50 μL) を背側部皮下投与した。投与 18 日後にマウスをイソフルラン吸入により安楽死させ、皮膚を切開して炎症性組織を摘出した。直ちに凍結切片標本 (5 μm 厚) を作製し、定法にしたがって HE 染色を行った。また、抗マクロファージ抗体と抗 P2Y6 抗体を一次抗体に用い、DAB による免疫組織化学染色に供した。

### (6) 体内放射能分布の測定

テレピン油を処置し、21 日間が経過した ddY マウス (雄性、9 週齢) に [<sup>125</sup>I]5-I-UDP (37 kBq) を尾静脈より投与した。投与 30 分後にマウスから血液を採取するとともに、臓器を摘出した。それぞれの重量および放射能を測定し、単位重量あたりの放射能集積量を % injected dose/g (% ID/g) にて求めた。

## 4. 研究成果

[<sup>125</sup>I]5-I-UDP の合成については、UDP を直接的な標識前駆体とした場合、反応が進行しなかった。したがって、まず Ionic Liquid 中、[<sup>125</sup>I]NIS を用いる求電子置換反応により uridine から [<sup>125</sup>I]5-iodouridine を合成し、さらにリン酸基を伸長させるという合成経路を検討した (図 2)。

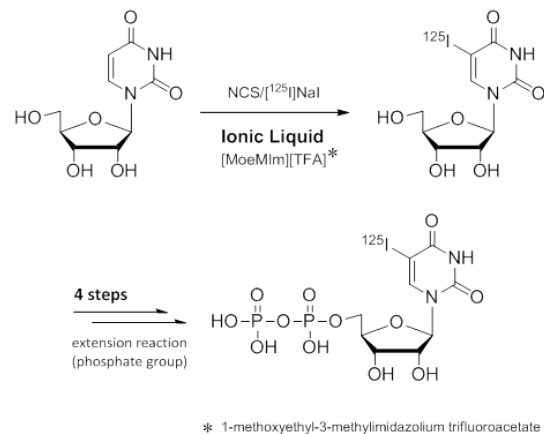


図 2 [<sup>125</sup>I]5-I-UDP 合成の反応式

固相抽出を経て得られた [<sup>125</sup>I]5-I-UDP の放射能は 820 kBq (収率: 4.4%)、TLC で確認した放射化学的純度は 92%であった。また、[<sup>125</sup>I]NIS の合成工程を含めると全合成に 7 時間 30 分を要した。これらについては最適化の検討を重ねる必要がある。まず、設備上の問題として精製が固相法に限られてしまったことから、今後 HPLC を系に導入した際は、分離精製過程および分析過程の再検討を行う。また、Ionic Liquid は今回使用した化合物以外にも反応基質に応じて複数の種類が存在するため、条件検討項目に加えることで合成時間の短縮と収率の向上を図る。

[<sup>125</sup>I]5-I-UDP はマウス血漿中で 3 時間インキュベートした後も、初期値と比較して 95%以上が未変化体で存在していた (図 3)。ただし、前述の通り放射化学的純度には改善の余地があるため、分析系の確立とともに再評価を試みたい。

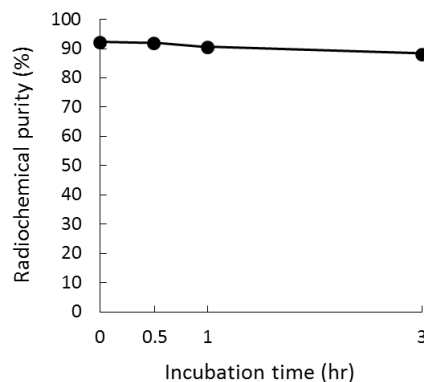


図 3 [<sup>125</sup>I]5-I-UDP のマウス血漿中安定性

テレピン油により誘発される炎症モデルでは、処置後早期に好中球が、中期以降にマクロファージがそれぞれ優位に浸潤することが報告されている。テレピン油投与 18 日後の組織切片 (HE 染色) においては、組織融解壊死と格子状の細胞質を呈した貪食性マクロファージの遊走を伴う、特徴的な炎症の病理像が観察された (図 4)。さらに、マクロファージにおける P2Y6 受容体の発現は DAB による免疫組織化学染色により確認し、このモデルマウスを  $[^{125}\text{I}]5\text{-I-UDP}$  の体内放射能分布実験に使用した。

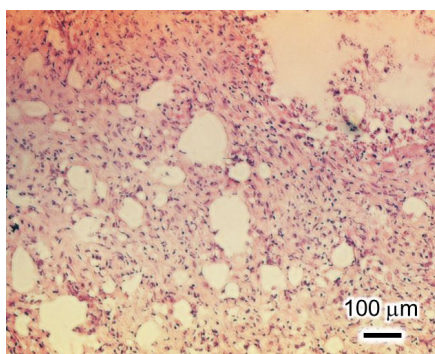


図 4 炎症性組織の HE 染色写真

テレピン油投与 21 日後のモデルマウスに  $[^{125}\text{I}]5\text{-I-UDP}$  を静脈内投与し、30 分後における放射能の体内分布を測定した。皮下組織に注目すると、健常部位での数値は 2.5% ID/g であったのに対し、炎症部位では 4.0% ID/g と、およそ 1.6 倍高い放射能集積を示した (図 5)。一方、炎症性組織/血液比は 1.4、炎症性組織/筋肉比は 7.9 であった。また、脳へ移行した放射能は 0.10% ID/g と極端に低く、これは 5-I-UDP の血液脳関門透過性が低い (分子量が 530 あり、脂溶性の指標となる Log P 値 (Chem Office ソフトを用いて計算) も 0.09 と低いため) という当初の予想に合致した結果であった。

なお、甲状腺への放射能集積も認め、生体内で脱ヨウ素化が進行している可能性が示唆された。ただし、今回の研究で確認した放射能分布は放射化学的純度が低かったことの影響を考慮せねばならず、こちらについては精製法を確立させた後に再確認したい。

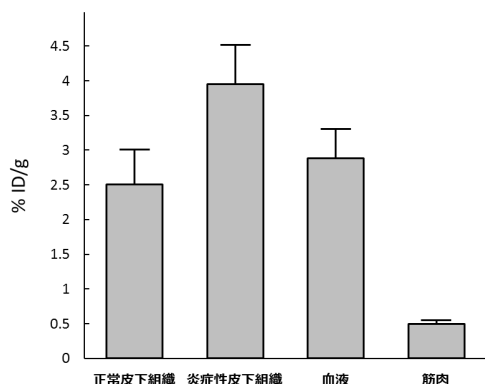


図 5  $[^{125}\text{I}]5\text{-I-UDP}$  のマウス放射能分布

以上のように、当該研究では炎症性病変イメージングプローブ開発の基盤技術として  $[^{125}\text{I}]5\text{-I-UDP}$  を標識合成し、その有用性に関する一定の知見を得た。しかし、合成収率が低く、また高い放射化学的純度が得られなかったため、十分な成果を収めるには至らなかった。今後、UDP への I-125 の直接導入を含めた合成経路の再検討を進め、収率および純度の向上を図ることで、より精度の高いデータの取得へと繋げたい。

また、研究課題の目標に掲げていた脳機能障害時に発現する貪食性ミクログリアの定量評価は達成できなかった。ただし、臓器摘出法に基づく体内分布実験では  $[^{125}\text{I}]5\text{-I-UDP}$  の脳移行性が低いことが示されたため、今後は脂溶性の面から血液脳関門を透過しうる新規化合物について探索を継続する。最終的にはアルツハイマー型認知症やパーキンソン病などの神経変性疾患、あるいは脳血管病変等、広範な脳機能障害に付随する炎症の診断に結び付けたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河嶋 秀和 (KAWASHIMA, Hidekazu)  
京都薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：70359438

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

大倉 一枝 (Ohkura, Kazue)  
北海道医療大学・薬学部・教授  
研究者番号：60094827

大島 伸宏 (Oshima, Nobuhiro)  
北海道医療大学・薬学部・助教  
研究者番号：80508648

### (4) 研究協力者