

令和 6 年 7 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16411

研究課題名(和文)慢性炎症診断を志向した補体複合体イメージング法の開発

研究課題名(英文)Development of an imaging method of complement complex for the diagnosis of chronic inflammatory disease

研究代表者

東川 桂(Higashikawa, Kei)

北海道大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：10756878

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):補体第二経路に関与するProperdinを放射性標識したプローブの合成条件の検討を行った。ProperdinとS-2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-diethylenetriamine pentaacetic acid (p-SCN-Bn-DTPA)と反応させることで金属キレーターを導入し、その後 $^{111}\text{InCl}_3$ を反応させる方法で標識条件を検討した結果、中性以上のpHを維持したまま、目的の薬剤を合成することに成功した。また、本プローブを評価するためのNASHモデルも確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、IBD、NASH、動脈硬化モデルの病変部位において高集積する補体(Properdin)に注目し、これらにより形成される補体複合体を検出するための核医学診断薬を開発することで、慢性炎症を可視化する画像診断法を構築することを特色としている。本研究ではProperdinの放射性標識法の確立およびプローブの有用性を評価するための実験モデル動物の確立に成功した。今後、プローブの有用性をモデル動物等で評価することによって、IBD、NASH、動脈硬化の病態の質的情報を得ることができると期待される新たな診断法の開発が行える可能性がある。

研究成果の概要(英文):We examined the radiolabeling conditions of properdin, which is involved in the alternative complement pathway. Since, in the process of this examination, it was found that properdin aggregates under acidic conditions, we investigated the radiolabeling method of the properdin under neutral pH and basic condition. As a result, we succeeded in establishing the radiolabeling method of the properdin under neutral pH and basic condition by using the following method. (1) Properdin was reacted with S-2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-diethylenetriamine pentaacetic acid (p-SCN-Bn-DTPA) to synthesis DTPA-Properdin. (2) DTPA-properdin was radiolabeled with $^{111}\text{InCl}_3$ to synthesis ^{111}In -DTPA-Properdin.

研究分野：核医学

キーワード：分子イメージング 慢性炎症 補体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病や炎症性腸疾患等の多くの疾患において、「慢性炎症」が基盤病態であることが明らかになっている。免疫系による慢性的な炎症反応は、多くの疾患の増悪に関与しており、組織機能の変調と障害を引き起こすのみならず、不可逆な臓器の機能不全やがんの発症まで進展することが明らかになっている。そのため、炎症状態を評価できれば、疾患の性状・進行度、並びに治療効果を判定することが可能である。しかしながら、現在、慢性炎症性疾患に対して臨床で行われている画像診断法（超音波診断法、MRI、CT等）は、病変部位を形態的に評価する方法が主であるため、炎症部位に存在する分子に基づく質的情報を得ることはできない。

他方、申請者らはこれまで慢性炎症性疾患の発症や進展と補体カスケード第二経路に關与する分子との関係について解析を進めてきた。補体カスケード第二経路概略図を図1に示す。第二経路では、補体B因子が酵素(D因子)により切断されてできるBbと補体成分3b(C3b)との複合体(C3bBb)に対してProperdinは結合し、C3bBb複合体を安定化することが知られている。さらに、このC3bBb-Properdin複合体が、補体成分3(C3)を切断してさらにC3b生成することで、さらなるC3bBb-Properdin複合体の形成を促すことも報告されている(Mol Immunol., 2006)。

申請者らは、Real-time PCRによる遺伝子発現解析や質量分析によるプロテオーム解析により、以下の研究成果を得ている。

1. デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発炎症性腸疾患(IBD)モデルにおいて、補体カスケード第二経路に重要な分子であるProperdinおよび補体第3成分(C3)の遺伝子発現レベルが有意に増加。
2. メチオニン・コリン欠乏食(MCDD)誘発非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルにおいて、Properdinの遺伝子発現レベルが有意に増加。
3. ApoE欠損マウスに高脂肪食を与えることで作製した動脈硬化モデルにおいて、不安定プラーク形成に深く関わるIV型病変(AHA分類)の動脈血管病変に、ProperdinやB因子が集積。

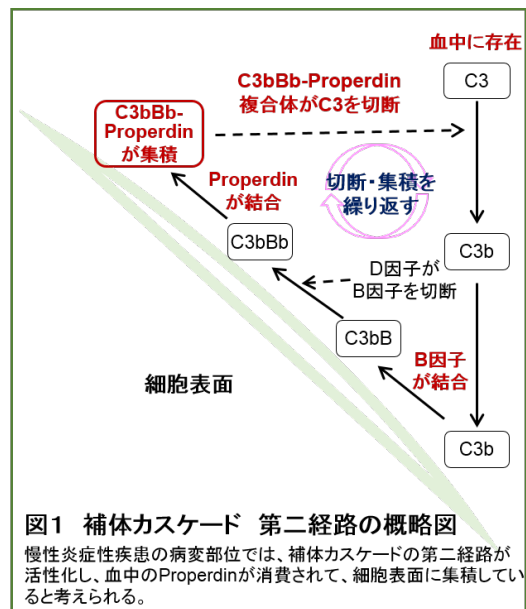


図1 補体カスケード 第二経路の概略図

慢性炎症性疾患の病変部位では、補体カスケードの第二経路が活性化し、血中のProperdinが消費されて、細胞表面に集積していると考えられる。

さらに、Properdin欠損マウスを用いた腸炎モデルの解析により、Properdinが炎症性サイトカインであるInterleukin-6(IL-6)の発現や、炎症部位への好中球の浸潤に重要であることが報告されている(Inflamm Bowel Dis., 2015; J Immunol., 2015)。またヒトNASH患者においても、肝小葉で炎症の進行が認められる患者では、高濃度のProperdinタンパク質が炎症部位に存在していることが報告されている(PLoS One, 2014)。

2. 研究の目的

上記の背景から、慢性炎症性疾患の病変部位の局所では、補体カスケードの第二経路が活性化し、絶えず血中に存在するProperdinを消費して、C3bBb-Properdin複合体を形成していると推察される。そこで申請者は、生体内の分子の挙動を非侵襲的に可視化できる核医学イメージング技術を用いて、C3bBb-Properdin複合体の形成を*in vivo*で可視化する方法を開発することで、補体に関する分子情報を持つ慢性炎症性疾患診断法が確立できないかと考えた。そこで

Properdin を金属キレート剤と結合させた後、核医学診断用放射性金属核種 (^{111}In) で標識して核医学診断用薬剤の開発を行った。

3. 研究の方法

^{111}In -1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic Acid (DOTA)-Properdin の合成

^{111}In -DOTA-Properdin は以下の方法で合成した (図 2)。

- p-isothiocyanatobenzyl-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic Acid (p-SCN-Bn-DOTA) と Properdin を炭酸バッファー (pH 9.0) 中で反応させることで、Properdin に金属キレート剤である DOTA を導入
- DOTA-Properdin を HEPES バッファー (pH 5.5) 中で $^{111}\text{InCl}_3$ と反応させることで、 ^{111}In -DOTA-Properdin を合成

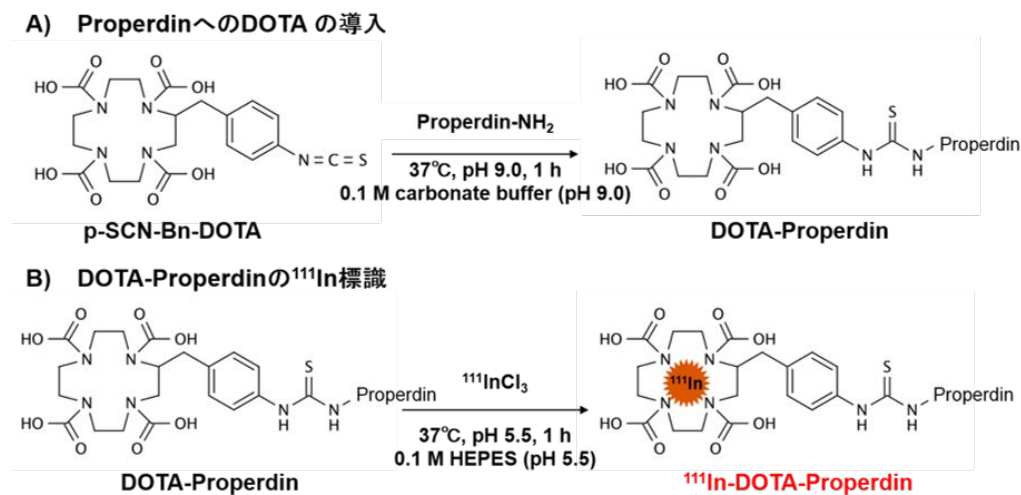


図 2 : 放射性標識 Properdin の合成

合成した薬剤の放射化学的純度は、逆相薄層クロマトグラフィー (TLC) により調べた。

^{111}In -DOTA-Properdin の生体内分布解析

雄性の C57BL/6 マウスにイソフルラン麻酔下で ^{111}In -DOTA-Properdin (81-651 kBq) を 5 μg (低用量)、あるいは 40 μg (高用量) 投与した。投与 6 時間後にイソフルラン麻酔下で心採血を行って安楽死させ、心臓、肺、肝臓、膵臓、脾臓、胃、小腸、大腸、腎臓、大腿筋、および大腿骨を摘出した。摘出した血液および臓器の放射能をガンマカウンターで測定し、低用量群 (n = 2) と高用量群 (n = 1) で比較した。

^{111}In -DTPA-Properdin の合成条件の検討

^{111}In -DTPA-Properdin は以下の方法で合成した。

- p-SCN-Bn-Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid (DTPA) と Properdin を炭酸バッファー (pH 9.0) 中で反応させることで、Properdin に金属キレート剤である DTPA を導入
- DTPA-Properdin を HEPES バッファー (pH 7.4) 中で $^{111}\text{InCl}_3$ と反応させることで、 ^{111}In -DTPA-Properdin を合成

合成した薬剤の放射化学的純度は、逆相 TLC により調べた。

NASH モデルマウスの作製、および補体第三成分 (C3) の発現量測定

NASH モデルマウスは C57BL/6 マウス (Wild type)、あるいは C3 ノックアウトマウスに MCDD

を 4 週間給餌して作製した。上記の正常および NASH モデルの肝臓からタンパク質を Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) Buffer で抽出し、Western blot 法にてタンパク質の発現量解析を行った。

4. 研究成果

図 1 のように合成した結果、¹¹¹In-DOTA-Propertdin を放射化学的収率 34.2%、放射化学的純度 86.6% で得ることに成功した。そこで次に、正常マウスにおける本薬剤を投与し、投与 6 時間後の生体内分布を解析した結果 C3 (Propertdin の結合分子) の高発現臓器である肝臓へ特異的に集積することを確認した (図 3)。これらの結果から、合成過程で Propertdin の機能 (標的への結合活性) を維持したまま、¹¹¹In-DOTA-Propertdin を得られたことが示唆された。

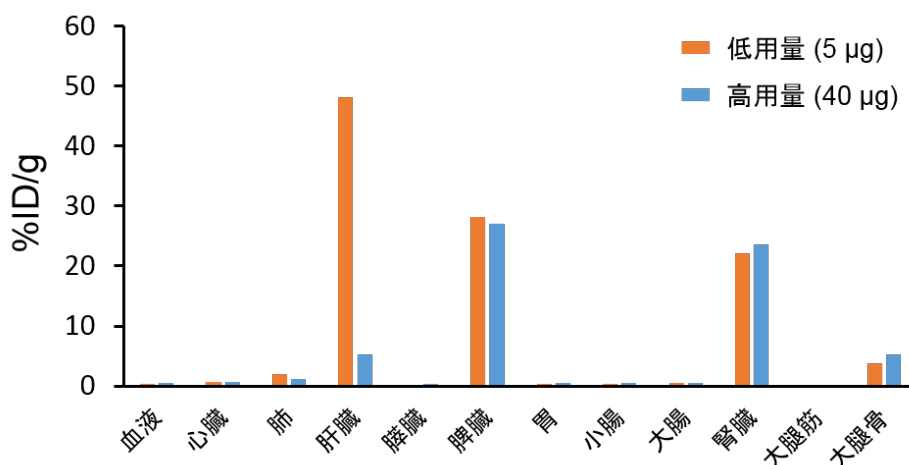


図 3 : 正常マウスにおける ¹¹¹In-DOTA-Propertdin の生体内分布。

低用量 (5 µg)、あるいは高用量 (40 µg) ¹¹¹In-DOTA-Propertdin をマウスに投与し、投与 6 時間後に臓器を摘出して放射能を測定することで解析した。高用量の ¹¹¹In-DOTA-Propertdin を投与したマウスでは、肝臓での薬剤の集積濃度 [%injected dose per gram of organ (% ID/g)] が低下しているため、¹¹¹In-DOTA-Propertdin の肝集積は特異的であると考えられる。

次に、より放射化学的純度および収率を向上させるため、 の反応の p-SCN-Bn-DOTA と Propertdin の反応比の検討を進めていたが、この検討の際に、DOTA-Propertdin のバッファーを弱酸性 (pH 5.5-6.5) で Propertdin 濃度を高くすると、Propertdin の一部が不溶化 (沈殿) することが発覚した。そこで、Propertdin に結合させる金属キレーターを、より標識効率の高い p-SCN-Bn-DTPA に変更し、標識時の HEPES バッファーを中性 (pH 7.4) にして In-111 の標識を行った。その結果、¹¹¹In 標識 Propertdin を放射化学的純度 95%、放射化学的収率 75% で合成することに成功した。

さらにメチオニン・コリン欠乏食誘発 NASH モデルマウス作製し、肝臓での C3 発現解析を行った。その結果、正常マウスの肝臓と比較して、メチオニン・コリン欠乏食誘発 NASH モデルの肝臓では、C3 および C3c の発現量が増加し、C3KO モデルマウスの肝臓では検出されないことを確認した。すなわち、合成したプローブを評価するためのモデル動物の作製法も確立に成功した。

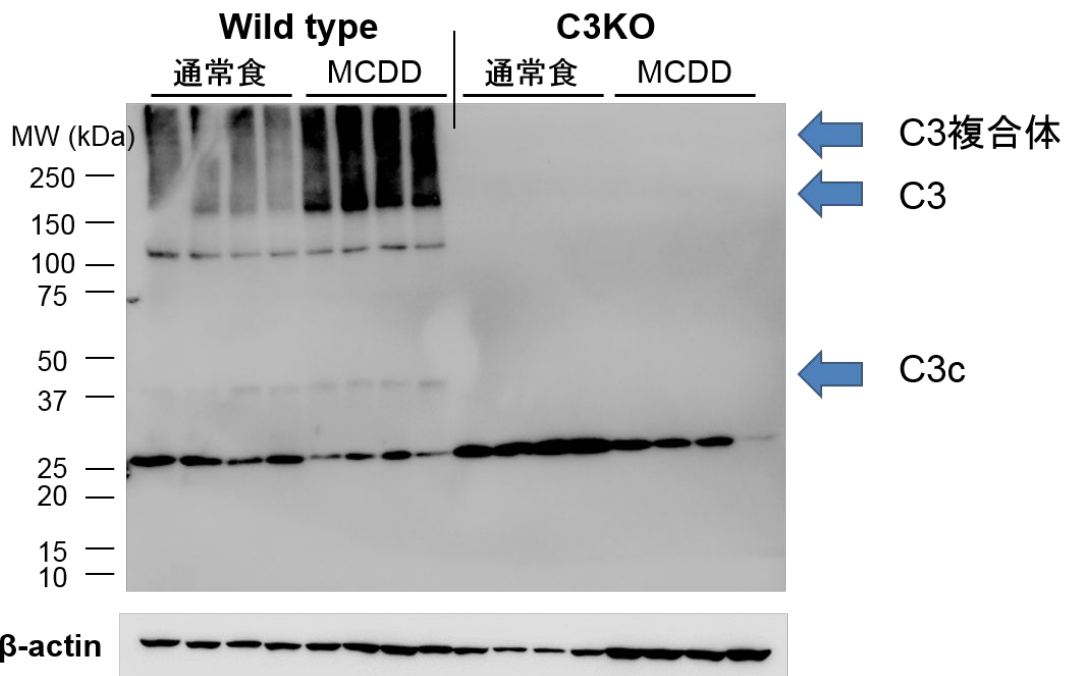


図5：正常およびNASHモデルマウスの肝臓におけるC3発現解析。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

該当なし

〔学会発表〕(計 0 件)

該当なし

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.hokudai.ac.jp/radiois/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし