

研究種目：基盤研究(G)
 研究期間：2007年～2008年
 課題番号：19591444
 研究課題名（和文） アポトーシス抑制分子 Bcl-xL のイメージング法開発のための基礎的研究
 研究課題名（英文） Study for Molecular imaging of Bcl-xL; an apoptosis inhibitor

研究代表者
 高橋 和弘 (Takahashi kazuhiro)
 独立行政法人理化学研究所・イメージング基盤ユニット・ユニットリーダー
 研究者番号：20370257

研究成果の概要：

ミトコンドリアを介したアポトーシスの決定因子として知られる Bcl-2 ファミリータンパク質の中でアポトーシスを抑制する Bcl-xL に特異的に結合する低分子化合物 BH3I-2' の4つの類似化合物 $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ の ^{18}F 標識合成を行い、Bcl-xL の *in vivo* イメージングを試みた結果、梗塞やガンの状態の評価法、それら治療の評価法、さらにはそれらの治療に用いる治療薬、抗ガン剤の評価法としての有用性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

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：Bcl-xL、脳・神経、腫瘍、アポトーシス、PET、標識合成、分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

ポジトロン断層撮影法は、ポジトロン放出源から放出されるポジトロン（陽電子）が消滅するとき生成される一対の γ 線（消滅放射線）を電子に変換し、この電子を検出器で測定（同時計数）するものである。ポジトロン放出核種で標識した薬剤を投与することにより、生体内の機能を体外から測定することが可能であり、疾病の診断に適用できる。そして、今後の発展が大いに期待されている。

アポトーシスとは、個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされる、管

理・調節された細胞の自殺のことである。アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経変性疾患、あるいは虚血性疾患においてはアポトーシスにより、神経細胞の脱落が起こっているといわれている。また、ガン化した細胞も通常はアポトーシスで排除されるが、何らかの原因によりその機序が働かなくなると悪性腫瘍へと成長する。逆にガン治療におけるガン細胞の縮退にアポトーシスが関与していると考えられている。アポトーシスは細胞内ミトコンドリアで抑制系と促進系の経路で制御されており、促進系が活性化したり、

抑制系が薬剤により抑制されることにより、アポトーシスが進む。

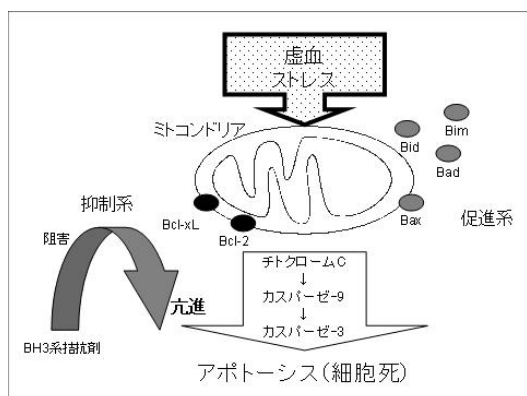


図.1 アポトーシスの機序

2. 研究の目的

アポトーシス関連タンパク質、その中でも特に抑制タンパク質の1つである Bcl-xL の画像化をめざした。

3. 研究の方法

アポトーシス計測用ポジトロン標識化合物としては次の $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ を考え、その標識前駆体と標品のの合成を行った。

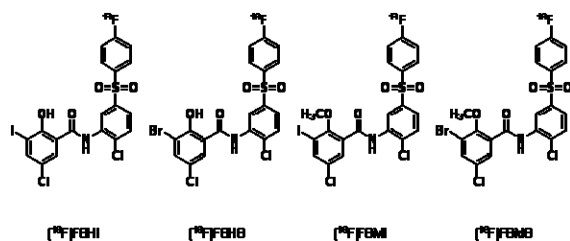


図 2. $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ の構造式

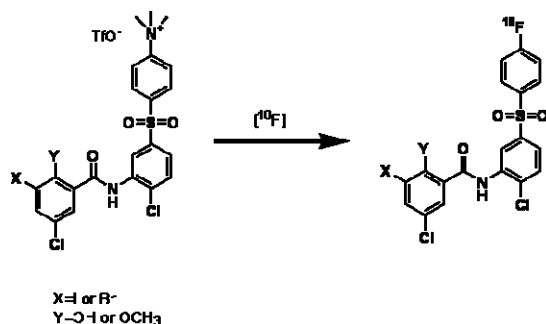


図 3. $[^{18}\text{F}]$ 標識反応式

$[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ の標識合成

サイクロトロン (HM-18、住友重機械工業製) にて 18MeV に加速した陽子を 20 μA の電流値で、 $^{18}\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ およそ 2mL を封入したターゲットに照射して、 $^{18}\text{O}(\text{p}, \text{n})^{18}\text{F}$ 核反応により $[^{18}\text{F}]$ を製造した。ターゲット内では $[^{18}\text{F}]$ は $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ の化学形で存在し、照射後製造された $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ を含むターゲット水を自動合成装置に導入し $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ を含むターゲット水を He 圧でトラップ用イオン交換樹脂カラムを通過させて、 $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ イオンを樹脂に吸着させた。

$[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ ではこの樹脂に 0.5mg K_2CO_3 水溶液 0.5mL を導入して $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ イオンを脱着し、反応容器に $[^{18}\text{F}]\text{KF}$ 水溶液として回収した。反応容器内の $[^{18}\text{F}]\text{KF}$ 水溶液に $\text{K}[2, 2, 2]$ 3mg/ CH_3CN 2mL を加えて He 気流下に加熱して 5 分間共沸脱水し、 CH_3CN 1mL を追加して 2 分間共沸脱水を続けた。さらに CH_3CN 1mL を追加して乾固するまで共沸脱水し、真空ポンプで 90 秒間減圧留去、90 秒間 He パージを行って系内の水分を完全に除き、残渣を室温付近まで冷却した。また、この樹脂に $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ では 4% Tetrabutylammonium bicarbonate 水溶液/アセトニトリ N (1/1) 溶液 0.5mL を導入して $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ イオンを脱着し、反応容器に回収した。反応容器内の $[^{18}\text{F}]$ 水溶液にアセトニトリ 2mL を加えて He 気流下に加熱して 5 分間共沸脱水し、アセトニトリ 1mL を追加して 2 分間共沸脱水を続けた。さらにアセトニトリ 1mL を追加して乾固するまで共沸脱水し、真空ポンプで 90 秒間減圧留去、90 秒間 He パージを行って系内の水分を完全に除き、残渣を室温付近まで冷却した。

残渣に標識原料 $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ では 4mg/ DMSO 0.3mL 溶液、または $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ では 0.5mg/ DMSO 0.3mL 溶液を加え、 100°C で 10 分間フッ素化を行い、反応終了後、生成物を HPLC 溶媒で希釈し、Sep-Pak Plus Alumina N カラムで未反応の $[^{18}\text{F}]\text{F}^-$ イオンを取り除き、溶出液を HPLC にて精製した。移動相に $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ ではアセトニトリル/0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸=400/600/1、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ ではアセトニトリル/0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸=350/650/1、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ ではアセトニトリル/0.1M 酢酸ナトリウム/酢酸=580/420/1 を使い、カラムに $\mu\text{Bond}\text{-Pak C18}$ (7.8x300mm, Waters)、流速 6mL/min、波長 254nm で分取を行った。標識体フラクションを 25 μL の Tween80 を添加したナスコルに分

取し、加熱減圧下で HPLC 溶媒を留去した。さらに残渣を注射用生理食塩水に再溶解した後、無菌バイアルに標識化合物を回収した。

最終製剤を高速液体クロマトグラフィー (Inertsil ODS-3 4.6*150mm (GL サイエンス), アセトニトリル/30mM 酢酸アンモニウム/酢酸=500/500/2, 流速 2mL/min, 波長 230nm) にて分析した。

図 4. $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ の標識合成結果

		$[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$	$[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$	$[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$	$[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$
生産量	OD ₆	2.25	0.96	3.85	0.60
放射化学的純度	%	99.1	97.9	98.8	100.0
濃度	μM	7.17	2.77	12.41	-
比放射能	GBq/ μmol	107	80	59	-
qH		6	6	6	6

合成した標識化合物についての動物実験

1. 担がんマウスを用いた実験

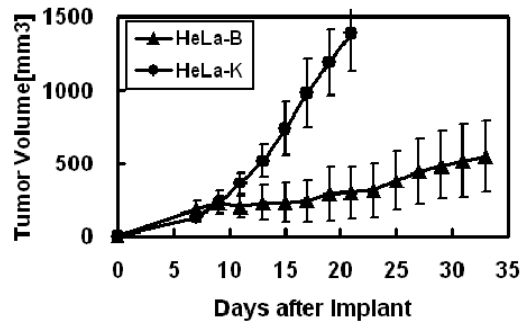


図 5. HeLa-K および HeLa-B 腫瘍の増殖曲線

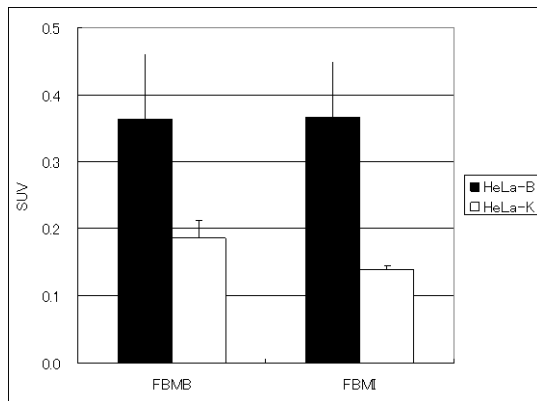


図 6. $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ の細胞増殖能の異なるガン細胞の腫瘍への集積

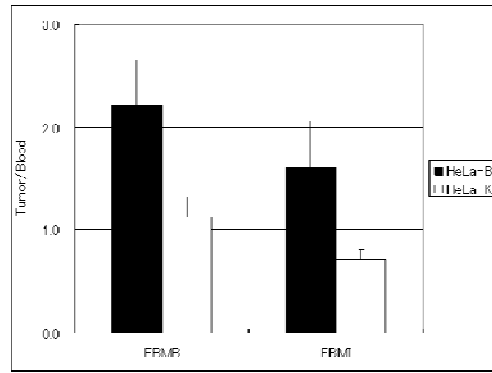


図 7. $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ の細胞増殖能の異なるガン細胞の腫瘍対血液比

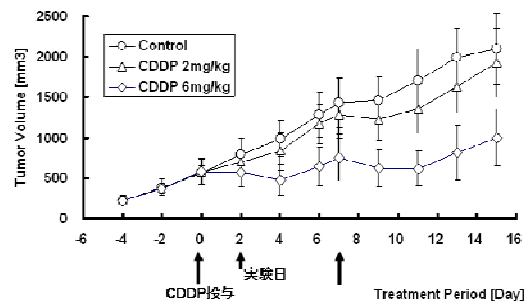


図 8. シスプラチン (CDDP) 治療における腫瘍の大きさの変化

図 9. $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ のガン治療マウスの腫瘍への集積 (SUV)

	Control		CDDP 2mg/kg		CDDP 6mg/kg	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
FBHI	0.110	0.010	0.119	0.022	0.128	0.014
FBHB	0.099	0.037	0.082	0.012	0.150	0.020
FBMI	0.164	0.026	0.252	0.036	0.358	0.072
FBMB	0.185	0.108	0.312	0.077	0.358	0.111

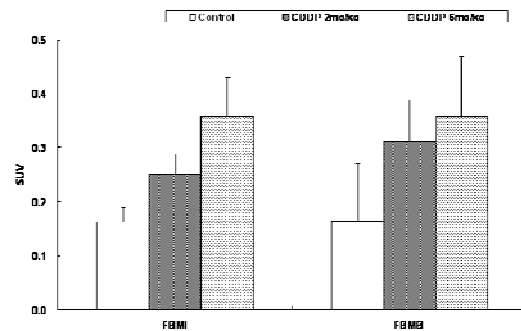


図 10. $[^{18}\text{F}]\text{FBHI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBHB}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMI}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FBMB}$ のガン治療マウスの腫瘍への集積

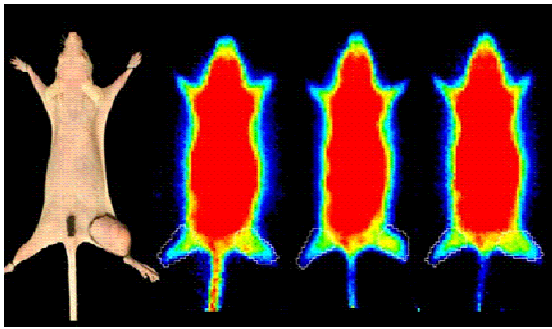


図 11. $[^{18}\text{F}]$ FBMB のプラナー写真：左からマウス写真、コントロール、CDDP 2mg/kg、CDDP 6mg/kg。右大腿部丸く囲んだ部分が腫瘍

以上のことから $[^{18}\text{F}]$ FBMI、 $[^{18}\text{F}]$ FBMB は腫瘍縮退におけるアポトーシスを反映していると考えられることから、抗ガン剤の評価をすることが可能であると考えられる。

2. 脳梗塞マウスモデル (PIT) 実験

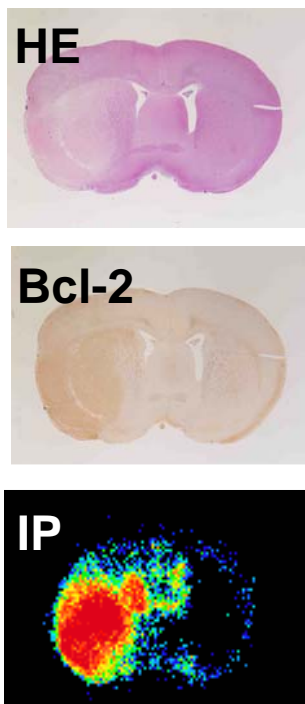


図 12. 虚血による Bcl-2 発現と $[^{18}\text{F}]$ FBHI 集積画像

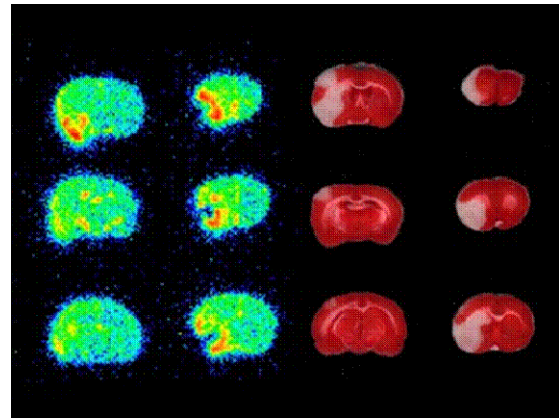


図 13. 脳虚血ラット脳スライス写真 (右) と $[^{18}\text{F}]$ FBHI の集積画像 (左)：写真で白く抜けた部分は虚血により脳細胞死を起こした部分。集積画像でオレンジから赤色部分が集積の高いところで虚血周辺部に高いところがみられる。

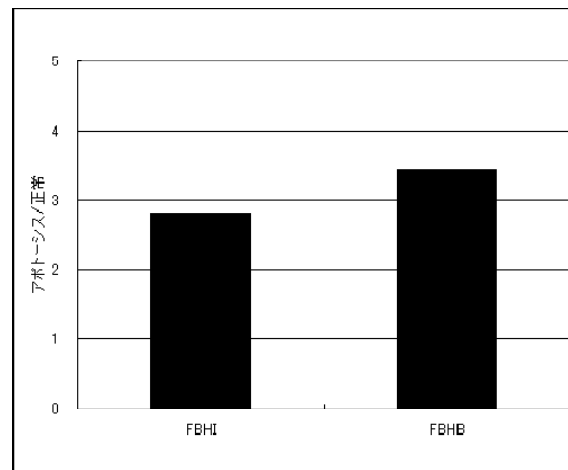


図 14. 脳反対側における性状部位に対するアポトーシス部位の標識化合物の集積比

また $[^{18}\text{F}]$ FBHI、 $[^{18}\text{F}]$ FBHB は脳梗塞モデルにおいて、アポトーシス部位への集積が、 $[^{18}\text{F}]$ FBMI、 $[^{18}\text{F}]$ FBMB より高かったことから神経系のアポトーシス検出に有効であると思われる。

4. 研究成果

開発した標識化合物を $[^{18}\text{F}]$ FBHI、 $[^{18}\text{F}]$ FBHB、 $[^{18}\text{F}]$ FBMI、 $[^{18}\text{F}]$ FBMB はアポトーシスを評価できる標識化合物であると考えられる。これらを用いることにより、梗塞、ガンの状態の評価、それら治療の評価、さらには、それら治療に用いる治療薬、抗ガ

ン剤の評価をすることが可能である。

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)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 アポトーシスの検出に適した化合物

出願番号 2008-186378

出願日 2008/07/17

公開番号 2010-024172

公開日 2010/02/04

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 和弘 (Takahashi kazuhiro)

独立行政法人理化学研究所・イメージング基

盤ユニット・ユニットリーダー

研究者番号： 20370257