

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04848

研究課題名（和文）フッ素18標識のPET用アクアポリンイメージング薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of fluorine-18 labeled aquaporin imaging ligands for PET

研究代表者

中村 ゆきみ（NAKAMURA, Yukimi）

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：70377208

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）：本研究では様々な疾患への関与が明らかになってきているアクアポリン（Aquaporin; AQP）を陽電子放出断層撮影（Positron Emission Tomography; PET）により解析するためのフッ素18標識薬剤を開発することを目標とし、AQPのうちAQP1と4についてそれぞれ個別および両方に対するイメージング薬剤の候補を選出し、実際にPET用薬剤として製造してマウスを用いて撮像も行った。AQP4用のイメージング薬剤については概ね目的を達したが、AQP1用とAQP1と4の両用の薬剤については良好な結果は得られなかった。またこれらの薬剤は代謝耐性に問題があることもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PET用のフッ素標識のAQPイメージング薬剤を完成させることによりAQPに関連する様々な疾患に対する画像診断法を確立し、病態解明や治療法の開発につながることを期待していたが、残念ながら不十分な結果だった。問題点として、薬剤がターゲットとしたAQP以外に結合しないことを確認する必要性や、標識位置の変更により代謝耐性を向上させて標識したフッ素原子が外れてしまわないようにする必要性があることが本研究により判明した。これらの知見は今後の研究において役立つものと思われる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a fluorine-18 labeled ligands for the analysis of aquaporins (AQPs), which have been shown to be involved in various diseases, using positron emission tomography (PET).

Some candidate ligands for AQP1 and 4 individually and for both are investigated. We synthesize them as PET imaging formulations, and also performed imaging using mice.

The goals were substantially achieved for imaging ligands for AQP4, but poor results were obtained for ligands for AQP1 and for both AQP1 and 4. It was also found that these ligands have metabolic tolerance problems.

研究分野：神経科学一般

キーワード：アクアポリン フッ素18 陽電子放出断層撮影

1. 研究開始当初の背景

アクアポリン 4 (Aquaporin-4; AQP4) は他の臓器と比較して脳における発現量が多く、毛細血管周囲のアストロサイト足突起、脳室周囲上衣細胞、くも膜下腔 (軟膜) などに存在し機能維持に重要な役割を果たすとともに、脳腫瘍の浸潤や増殖、脳浮腫、視神経脊髄炎など様々な病態にも関与しているとされる。また近年、AQP4 を介した間質流による脳髄液調節機構 (Glymphatic System) が脳におけるリンパ系組織として、脳の老廃物を破棄する役目をなす事が示唆され、その機能低下から生ずるアミロイドたんぱくの排泄不全がアルツハイマー病の発症に強い関連がある事が明らかになった (Suzuki Y et al. PLOS ONE 2015, Nakada T et al. J. Mol. Sci. 2017)。しかしながら AQP4 の生理学的な役割は未だ十分に解明されておらず、今後も更なる研究が必要である。それ故に in-vivo で AQP4 を画像化する技術は研究手段として重要な役割を果たし、生理機能の解明のみならず様々な疾患に対する画像診断を確立し、病態解明や治療法の開発につながる事が期待される。

申請者らはこれまでに炭素 11 (^{11}C) で標識された陽電子放出断層撮影 (Positron Emission Tomography; PET) 用 AQP イメージング薬剤 ($[^{11}\text{C}]\text{TGN-020}$) の開発に成功している。しかしながら ^{11}C の短い半減期 (約 20 分) や $[^{11}\text{C}]\text{TGN-020}$ の合成の困難さが AQP イメージングの普及や発展の妨げとなるのは必至であるため、より長い半減期 (約 110 分) を持つ ^{18}F 標識の AQP イメージング薬剤を開発することを考えた。既に $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (Fluoro Deoxy Glucose) のように撮像施設へのデリバリー体制が確立している薬剤があるので ^{18}F 標識の薬剤であれば同様に製造設備を有しない撮像施設においてもデリバリーの薬剤により PET 撮像が可能となるからである。

2. 研究の目的

様々な疾患の関与が明らかになってきた AQP の画像解析を PET によって行うための ^{18}F 標識の AQP イメージング薬剤を開発することを目標とする。

^{18}F 標識の薬剤は $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ においてデリバリー体制が確立しており、製造設備を有しない撮像施設であっても $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ と同様に PET 撮像が可能となることが期待できる。よって ^{18}F 標識の AQP イメージング薬剤の開発に成功すれば薬剤製造設備を持たない撮像施設であっても AQP イメージングの普及や発展のために大いに貢献するものと期待され、AQP イメージングの普及により AQP が関与している様々な疾患の病態が解明され、新たな治療法の開発につながっていくことが期待できる。

3. 研究の方法

研究は次のような 3 つのステップに分けて行った。①候補となる化合物を決定する ② ^{18}F 標識の目的化合物を合成し PET 用薬剤として製剤化する ③PET 装置により画像化し有効性を判断する

薬剤については過去に開発した $[^{11}\text{C}]\text{TGN-020}$ は AQP1 および AQP4 の双方に結合するものであったので、まずは脳における発現量が多い AQP4 に特化した化合物について研究を進め、次いで AQP1 に特化した化合物と、AQP1 および AQP4 の双方に結合する TGN-020 のフッ素標識版ともいえる化合物について研究を行った。

① 候補となる化合物の決定

既存の化合物データベースに登録されている膨大な数の化合物から、塩素原子とフッ素原子の置換反応により ^{18}F で標識可能な位置にフッ素原子を含み、さらに AQP4 等のターゲットとしている AQP に対して選択的かつ強力に結合する化合物を選別する。AQP に選択的に結合する化合物が結合した AQP は水チャネルとして機能しなくなる。この性質を利用してヒト型 AQP を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の吸水の程度を基準に薬剤候補となる化合物を選定した。

② ^{18}F 標識の目的化合物の合成および PET 用薬剤としての製剤化

^{18}F 標識の方法として塩素とフッ素の置換反応を利用することにしたのはじめにリファレンス用の化合物と標識位置を塩素原子で置き換えた前駆体を製造した。次いで自動合成装置により製造可能となるよう反応や精製条件を、PET 薬剤として経静脈投与が可能となる状態となるよう調製条件を決定した。

③ PET 装置により画像化し有効性を判断

自動合成装置により製造された PET 用薬剤を野生型および特定の AQP をノックアウト (以下 KO と表記する) し発現しないようにしたマウスの双方に投与した後、動物用 PET 装置により画像化し各化合物の有効性を判断した。

4. 研究成果

① 薬剤候補となる化合物

まずコンピューター上で既存の化合物データベースに登録されている化合物の中から AQP1 and/or AQP4 と強力的に結合する化合物をスクリーニングする。アフリカツメガエル卵母細胞にヒト型 AQP を発現させる cRNA を注入すると卵母細胞の細胞膜に AQP が発現し、そのような卵母細胞を水中に入れると卵母細胞は急速に吸水し、膨潤した後に破裂してしまう。卵母細胞を入れる溶液中に AQP と結合してその働きを阻害する化合物を混合しておくこの吸水・膨潤・破裂の過程が阻害され、その速度が遅くなり破裂する細胞数が減少するので、この性質を利用して各化合物の AQP 阻害能力を調べ、その能力が高い化合物を候補薬剤として選定した。判定法は当初は AQP の機能が 50% 阻害される濃度を調べる方法を用いて AQP4 と強く結合する化合物として TGN-052 を選定した。後に効率化のために濃度が 20 μ M の時の AQP 阻害能を見る方法に変更し、AQP1 に強く結合する化合物として TGN-091 を、AQP1 と AQP4 の双方に強く結合する化合物として TGN-074 を選定した（表 1 と表 2）。各薬剤候補化合物について図 1 に示す。

表 1: 各化合物の AQP 阻害度

評価基準 化合物名	阻害度 50% となる濃度	20 μ M の時の AQP 阻害度	
	TGN-052	TGN-091	TGN-074
AQP1	$\geq 20 \mu\text{M}$	41 %	35 %
AQP4	89 nM	0 %	40 %

表 2: 各化合物の各 AQP に対する適合性

化合物名	TGN-052	TGN-091	TGN-074
AQP1	×	○	○
AQP4	◎	×	○

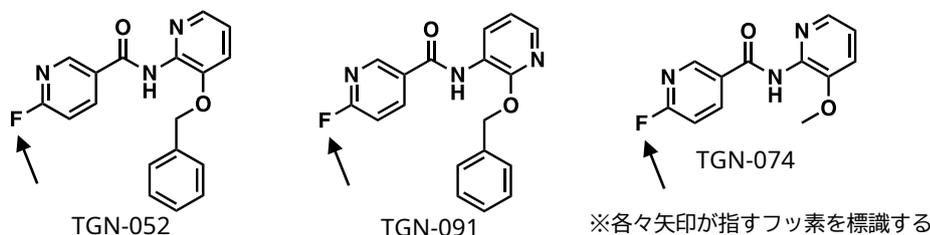


図 1: 薬剤候補として選定した化合物

② ^{18}F 標識の目的化合物の合成および PET 用薬剤としての製剤化

TGN-052、TGN-091、TGN-074 の各々の標識位置のフッ素を塩素に置き換えた化合物を各々の前駆体として用意する。フッ素標識と精製および製剤化は自動合成装置により以下のような手順で行った。1) サイクロトロン装置で H_2^{18}O に陽子線を照射し $^{18}\text{F}^-$ を製造する 2) 捕集用カートリッジで $^{18}\text{F}^-$ をトラップした後に炭酸カリウムと Kryptofix 222 の混合液で溶出し真空下で加熱し溶媒除去を行い K^{18}F として乾固する 3) 前駆体 1mg をジメチルスルホキシド 1mL で溶解した物に加え 160 $^\circ\text{C}$ で 40 分間の標識反応を行う 4) 反応後の液体に分取に使う高速液体クロマトグラフ (High Performance Liquid Chromatography、以下 HPLC) の移動相と同じ溶液を 4mL 加え Sep-Pak Plus Alumina N (Waters, WAT020510) カートリッジを通して未反応の $^{18}\text{F}^-$ を除去した後に HPLC に投入し精製する 5) 表 2 に示す保持時間の分画を捕集する 6) エバポレーターにより HPLC 移動相中のエタノールを除去する 7) エタノール除去後の液体をメイロンで希釈して PET 用標識薬剤とする。表 3 に化合物ごとの分取用 HPLC の諸条件を示す。移動相には 0.01% 程度の酢酸を添加した。製造した標識薬剤は Millex-GV (メルクミリポア, SLGVJ33RS) を用いてろ過滅菌を行い、放射化学的純度 95% 以上、pH 5~8、 Al^{3+} 残留量 3 ppm 未満、Kryptofix 222 残留量 40 ppm 未満であることを確認した後に投与および撮像を行った。分析用 HPLC の諸条件も表 3 に示した通りで、移動相には 0.1% 程度の酢酸を添加した。 ^{18}F を用いて合成を行った場合の ^{18}F TGN-052 の収量は 500~1000 MBq 程度、 ^{18}F を用いて合成を行った場合の ^{18}F TGN-091 の収量は 700~1100 MBq 程度で、同条件での ^{18}F TGN-074 の収量は 300~650 MBq 程度だった。

表 3: 分取 HPLC および分析 HPLC の諸条件

化合物名	分取用				分析用			
	UV 検出器の波長 [nm]	移動相の種類	移動相流速 [mL/min]	保持時間 [min]	UV 検出器の波長 [nm]	移動相の種類	移動相流速 [mL/min]	保持時間 [min]
TGN-052	290	40% EtOH	3.0	11.0 \pm 1.5	290	40% MeCN	2.0	4.5 \pm 0.2
TGN-091	290	45% EtOH	3.0	11.0 \pm 1.5	290	40% MeCN	2.0	6.2 \pm 0.3
TGN-074	290	16% EtOH	5.0	10.5 \pm 1.5	290	20% MeCN	2.0	3.8 \pm 0.3

③ PET 装置により画像化し有効性を判断

自動合成装置により製造した PET 用薬剤のうち、 $[^{18}\text{F}]\text{TGN-052}$ と $[^{18}\text{F}]\text{TGN-074}$ については野生型マウスおよび AQP4-KO マウスに、 $[^{18}\text{F}]\text{TGN-091}$ は野生型マウスおよび AQP1-KO マウスにそれぞれ投与して小動物用 PET 装置を用いて撮像を行い、各薬剤の動態を調べた。

$[^{18}\text{F}]\text{TGN-052}$:

野生型マウス 4 匹、AQP4-KO マウス 4 匹で撮像実験を行った。投与した薬剤量は 0.2mL で放射エネルギーは 10~15MBq だった。薬剤投与後 3 分から 30 分間の撮影を行った。得られた画像の例を図 2 に、脳の部分の SUV 値の時間変化を図 3 に示す。

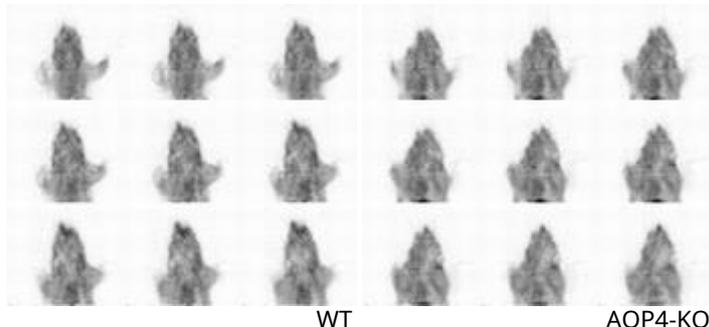


図 2 : $[^{18}\text{F}]\text{TGN-052}$ を投与して撮像した画像例

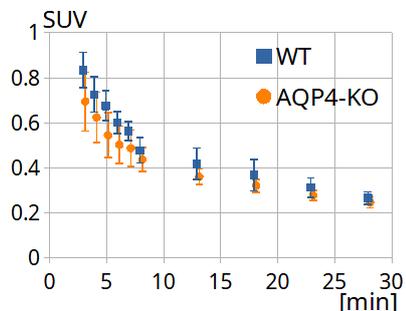


図 3 : SUV 値の時間変化

$[^{18}\text{F}]\text{TGN-091}$:

野生型マウス 4 匹、AQP1-KO マウス 4 匹で撮像実験を行った。投与した薬剤量は 0.2mL で放射エネルギーは 10~15MBq だった。投与後 3 分から 30 分間の撮影を行った。得られた画像の例を図 4 に、脳の部分の SUV 値の時間変化を図 5 に示す。

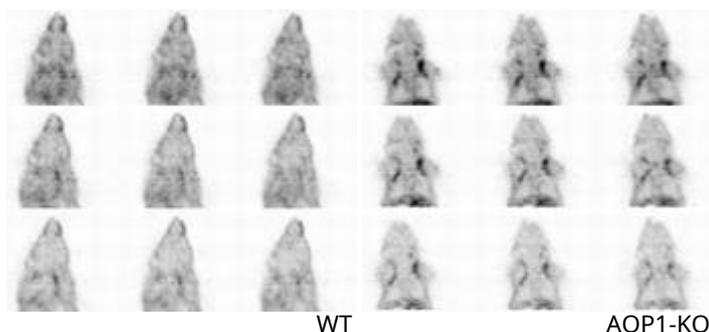


図 4 : $[^{18}\text{F}]\text{TGN-091}$ を投与して撮像した画像例

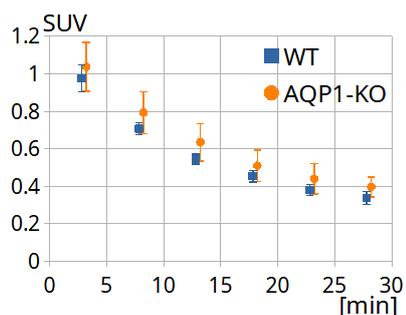


図 5 : SUV 値の時間変化

$[^{18}\text{F}]\text{TGN-074}$:

野生型マウス 3 匹、AQP4-KO マウス 3 匹で撮像実験を行った。投与した薬剤量は 0.2mL で放射エネルギーは 10~16MBq だった。投与後 3 分から 20 分間の撮影を行った。得られた画像の例を図 6 に、脳の部分の SUV 値の時間変化を図 7 に示す。

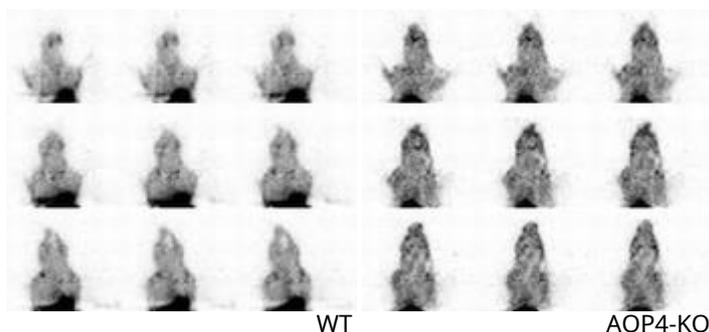


図 6 : $[^{18}\text{F}]\text{TGN-074}$ を投与して撮像した画像例

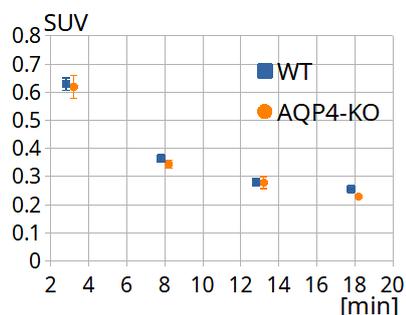


図 7 : SUV 値の時間変化

まとめ

$[^{18}\text{F}]\text{TGN-052}$ については PET 用 AQP4 イメージング薬剤として一定の能力には達していると考えられたが、 $[^{14}\text{C}]\text{TGN-020}$ ほどの特異性には至らなかった。また、 $[^{18}\text{F}]\text{TGN-091}$ および $[^{18}\text{F}]\text{TGN-074}$ は AQP イメージング薬剤としては不適であると考えた。またいずれの薬剤も投与後 60 分程度経過すると骨への集積傾向が見られた。これは代謝により $^{18}\text{F}^-$ が遊離しているためと考えられる。

今後の課題としては、本研究では化合物と AQP との親和性だけに焦点を当てて開発してきたが AQP 以外への親和性も確認する必要があること、標識位置を変更するなどにより代謝耐性を向上させる必要があることの 2 点を挙げておく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Yuji, Nakamura Yukimi, Igarashi Hironaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Blood Cerebrospinal Fluid Barrier Function Disturbance Can Be Followed by Amyloid-Accumulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 6118 ~ 6118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11206118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	鈴木 雄治 (SUZUKI Yuji) (90529851)	新潟大学・脳研究所・准教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------