

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19433

研究課題名（和文）PETによるフェロトシスメージング：動脈硬化プラークの不安定性評価への挑戦

研究課題名（英文）Ferroptosis imaging with PET: Challenge to assess vulnerability of atherosclerotic plaques

研究代表者

久下 裕司（KUGE, YUJI）

北海道大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：70321958

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、動脈硬化プラークの不安定性を多角的に評価するための核医学イメージングプローブの開発を行った。動脈硬化症の進展には、フェロトシスと呼ばれる細胞死様式が関与するため、フェロトシス関連分子であるトランスフェリン受容体1（TfR1）もしくは脂質過酸化物を標的としたプローブを作製した。新たに作製したプローブは、それぞれTfR1もしくは脂質過酸化物特異的な細胞集積を示し、プラークの不安定性を評価する新たな放射性プローブとなり得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて見出した放射性プローブは、動脈硬化プラークの不安定性を評価する新たなプローブとなり得ることが示された。フェロトシス関連分子のイメージングによりプラークの不安定性を評価した報告はこれまでになく、¹⁸F-FDGや¹⁸F-NaFなどの従来のイメージング剤の弱点を補う、新たな動脈硬化イメージング手法の開発へとつながることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed nuclear medicine imaging probes for evaluating the instability of atherosclerotic plaque from various perspectives. Since the development of atherosclerosis involves ferroptosis, a recently discovered programmed cell death, we developed two probes targeting ferroptosis-related molecules, transferrin receptor 1 (TfR1) or lipid peroxides. The newly prepared probes showed TfR1- or lipid peroxide-specific cell accumulation, indicating that they could be novel probes to evaluate plaque instability.

研究分野：放射性薬品科学

キーワード：フェロトシス PET イメージング 動脈硬化 不安定性評価

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化病変の評価においては、早期治療を必要とする“破綻しやすいプラーク(不安定プラーク)”を的確に診断することが重要であり、この観点から種々の侵襲的・非侵襲的画像診断法が検討されている(Int J Mol Sci, 2020, 2992)。これらの中で、ポジトロンCT (PET) などの核医学診断法は対応するイメージング剤を用いることで、プラークの不安定性を決定付ける因子を分子・細胞レベルで画像化できる利点を持つ。実際、¹⁸F-FDG (炎症・マクロファージ活性)、¹⁸F-NaF (石灰化)をはじめとして、動脈硬化の進展・不安定性に関わる種々因子の核医学イメージング剤が検討されている(Ann Nucl Med, 2020, 305)。しかし、¹⁸F-FDG は初期病変を含む炎症部位に非特異的に集積すること、¹⁸F-NaF は安定化した石灰化病変にも集積することが指摘されており、これらの弱点を補いプラークの性状・不安定性を正確に把握できるイメージング剤の開発が切望されている(Semin Nucl Med, 2020, 311)。

最近、鉄依存性酸化ストレスに起因するフェロトーシスと呼ばれる細胞死の様式が、動脈硬化の病態にも深く関与していることが報告された(Free Radic Biol Med, 2020, 92)。フェロトーシスは2価鉄イオンの異常蓄積を起点とし、細胞内での活性酸素種(ROS)の増大と脂質過酸化を介して起こると考えられている。そこで申請者は、フェロトーシスのマーカーとして、細胞内への鉄輸送を担うトランスフェリン受容体1(TfR1)に着目した。実際に、TfR1のノックダウンによりフェロトーシスが抑制されること(Mol. Cell, 2015, 298)、フェロトーシス阻害剤Ferrostatin-1により動脈硬化の進展抑制とともに鉄含量低下が認められること(Free Radic Biol Med, 2020, 160, 92)から、TfR1及びフェロトーシスは動脈硬化プラークの形成・進展において重要な役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、フェロトーシス関連分子のPETイメージングが、動脈硬化プラークの不安定性評価に有用であるか検証することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため、本研究ではフェロトーシス関連分子として(1)TfR1、(2)活性酸素種(ROS)に着目し、これらの分子の局在を可視化できる放射性プローブを設計・合成した後、イメージングプローブとしての基礎的評価を行った。

(1)- TfR1を標的としたプローブ(⁶⁸Ga-TfRB1G3)の作製

TfR1への高い結合親和性を有するリガンドの候補として、cystine dense peptideの1種であるTfRB1G3を選択した。TfRB1G3は、TfR1に対して高い親和性と選択性を有することが報告されている(J Mol Biol, 2020, 3989)。また、TfRB1G3の標識に用いるPET用核種として、ジェネレータから簡便に入手可能な⁶⁸Gaを選択した。⁶⁸Gaでの標識反応を実施するため、TfRB1G3のN末端にHBED-CCを導入したHBED-CC-TfRB1G3を合成し、標識前駆体として使用した。

⁶⁸Ga標識反応は、ジェネレータ(IRE EliT社製)から溶出した[⁶⁸Ga]GaCl₃とHBED-CC-TfRB1G3をHEPES緩衝液中で混合し、室温で10分間静置することで実施した。放射化学的純度は、iTLC及び逆相HPLC分析を用いて算出した。

(1)- 培養細胞を用いた⁶⁸Ga-TfRB1G3の評価

⁶⁸Ga-TfRB1G3がTfR1陽性細胞に対してTfR1特異的な集積を示すか評価するため、TfR1をノックダウンした細胞に対する取り込み試験を実施した。まず、TfR1陽性細胞であるT98GにTfR1特異的なsiRNA(siTfR1)もしくは非特異的なsiRNA(siCont)を処置し、3日間培養を行った。その後、⁶⁸Ga-TfRB1G3(20 nM)とsiRNA処置したT98G細胞を37℃で1時間インキュベートした。インキュベーション溶液を除去した後、細胞を氷冷PBSで洗浄し、細胞を0.1 M NaOHで溶解した。細胞溶解液の放射能をガンマカウンターで、タンパク量をBCAアッセイで測定し、%Dose/mg proteinを算出した。また、TfR1発現量はウェスタンブロッティング法を用いて評価した。

(2)- 酸化ストレスを標的としたプローブ([⁶⁴Cu][Cu^I(BCA)₂]³⁻と[⁶⁴Cu][Cu^I(BCS)₂]³⁻)の作製

フェロトーシスは鉄依存性の酸化ストレスに起因する細胞死であるため、酸化ストレスを標的とした放射性プローブも、動脈硬化プラークの不安定性評価に有用となることが期待できる。そこで本研究では、メタボリックトラッピングを用いた酸化ストレスイメージングプローブの作製を計画した。メタボリックトラッピングとは、ある標的組織に集積したイメージングプローブが、組織滞留性の高い化学形へと代謝を受けることで、標的組織に長時間滞留する現象を指す。¹⁸F-FDGは、メタボリックトラッピングを介して様々な疾患部位に集積することが知られており、メタボリックトラッピングを用いた疾患イメージングの有用性は、臨床レベルでも十分に実証

されている。

本研究では、ある種のリガンドが酸化数 1 の Cu に対しては安定な錯体を形成する一方、酸化数 2 の Cu に対しては安定な錯体を形成できない知見に着目した。このような性質を有するリガンドの Cu 錯体は、Cu の酸化数が 1 の時には安定に存在できるが、ROS との反応により Cu の酸化数が 2 に変化した際に、錯体が崩壊して遊離の Cu を放出することが予想される。遊離の Cu は細胞内外に存在するタンパクに補足されるため、ROS 存在量に応じた Cu の蓄積が期待できる。このような性質を有するリガンドの具体的な候補として、bicinchoninic acid (BCA) と bathocuproine disulfonate (BCS) を選択した。また、放射性の銅としては、PET 用核種であり市販されている ^{64}Cu を選択した。

BCA 及び BCS の ^{64}Cu 標識反応は、リガンド、還元剤であるアスコルビン酸、 $[\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{2+}]$ を混合し、60 で 10 分間加熱することで行った。標識反応後の溶液を逆相 TLC (メタノール/0.1M 酢酸緩衝液 pH 5 = 6 : 4 (v : v)) で分析し、放射化学的収率を算出した。

(2)- $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の各種 ROS との反応

作製した $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の各種 ROS との反応性を評価した。本研究では、4 種類の ROS (ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) (Org. & Biomol. chem., 2014, 4421)、脂質過酸化物 (LOOH) (Free Rad. Bio. & Med., 2021, 297)、スーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2004, C895)、過酸化水素 (H_2O_2)) を既報に従って調製し、評価に用いた。

$[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を各種 ROS (基質濃度 1 mM) と混合し、37 で 30 分間インキュベートした。その後、反応溶液を逆相 TLC で分析し、TLC の原点に観察された放射能の割合を放出された $[\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{2+}$ として評価した。

(2)- フェロトキシシスが誘導された細胞に対する $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取込み試験

フェロトキシシスは鉄依存的な酸化ストレスに起因する細胞死の様式であり、特に脂質過酸化物の生成がその大きな特徴として知られている。そこで本研究では、フェロトキシシス誘導剤処置した細胞に対して、 $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ が脂質過酸化物 (LOOH) 特異的な集積を示すか評価した。フェロトキシシス誘導剤としてはイミダゾールケトンエラスチン (IKE) を選択し、細胞株としては IKE に対する感受性が高いことが報告されている HT-1080 を選択した。また、フェロトキシシス阻害剤として、フェロスタチン 1 (Fer-1) を用いた。

まず、HT-1080 を IKE 非存在下 (Cont)、IKE 存在下 (IKE)、IKE+Fer-1 存在下 (IKE+Fer-1) において 37 で 6 時間インキュベートした。その後、インキュベーション溶液を $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を含む培地に交換し、37 で 30 分間インキュベートした。インキュベーション溶液を除去した後、細胞を氷冷 PBS で洗浄し、細胞を 0.1 M NaOH で溶解した。細胞溶解液の放射能をガンマカウンターで、タンパク量を BCA アッセイで測定し、%Dose/mg protein を算出した。また、HT-1080 細胞における LOOH の生成量は、脂質過酸化物特異的な蛍光試薬である BODIPYTM 581/591 C11 を用いて評価した。

(2)- $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の安定性試験

$[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ のインビボ PET イメージングプローブとしての有用性を評価するため、生体内環境を模擬した条件における安定性試験を実施した。具体的には、中性緩衝液もしくはヒト血漿中において $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を 37 で 30 分間インキュベートし、逆相 TLC を用いて未変化体の割合を評価した。

4. 研究成果

(1)- Tfr1 を標的としたプローブ (^{68}Ga -TfrB1G3) の作製

^{68}Ga -TfrB1G3 は、リガンド濃度 5 μM 、室温 10 分間の温和な反応条件下において、90%以上の放射化学的収率で得られた。また、比放射能は約 20 MBq/nmol であった。

(1)- 培養細胞を用いた ^{68}Ga -TfrB1G3 の評価

T98G (siCont) と T98G (siTfr1) に対する ^{68}Ga -TfrB1G3 の集積量は、それぞれ 91.3 ± 2.7 , 5.7 ± 0.4 %Dose/mg protein であった。この結果は、 ^{68}Ga -TfrB1G3 が Tfr1 特異的に T98G へ集積したことを示し、Tfr1 イメージングプローブとして有望な性質を有していることが明らかとなった。なお、siRNA 処置による Tfr1 発現量の変化は別途ウェスタンブロッティングによって評価しており、siTfr1 処置によって Tfr1 発現量は 90%以上低下していた。

(2)- 酸化ストレスを標的としたプローブ ($[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$) の作製

リガンド濃度 200 μM の条件下において、 $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ と $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ はそれぞれ 44 ± 3 , 86 ± 1 %の放射化学的収率で得られた。 $[\text{Cu}^{\text{I}}[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ がより高い収率で得られたという結果は、 $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の安定度定数が $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCA})_2]^{3-}$ よりも高値を示したという報告

(Electroanalysis 2018, 479) と一致する。以降の検討では、より高い収率で得られた $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ のみを実験に用いた。

(2)- $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の各種 ROS との反応

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を $\cdot\text{OH}$ 、 LOOH 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 とインキュベートした後に放出された $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の割合は、それぞれ 67 ± 2 、 44 ± 13 、 22 ± 3 、 $4 \pm 1\%$ であった。一方、 $\cdot\text{OH}$ 、 LOOH 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 の酸化還元電位は、それぞれ 2.3 (Biochem J, 1988, 287), 1.9 (FEBS Letters, 1990, 165), 0.9 (Biochem J, 1988, 287), 0.38 (Redox Report, 2003, 179) V/NHE であり、放出された $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ の割合は、それぞれの ROS の酸化還元電位に比例していた。この結果は、 $\cdot\text{OH}$ や LOOH など酸化力の強い ROS によって $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ が選択的に酸化されることを示しており、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を用いた PET イメージングが、 $\cdot\text{OH}$ や LOOH などの高い酸化力を持つ ROS の検出に利用できることを示唆している。

(2)- フェロトキシが誘導された細胞に対する $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の取込み試験

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の HT-1080 への集積は、Cont 群、IKE 群、IKE+Fer-1 群でそれぞれ、 42 ± 2 、 54 ± 2 、 47 ± 5 %Dose/mg protein であり、IKE 群での取り込み量は Cont 群に比べて約 30% 増加した。また、蛍光試薬を用いて LOOH の生成量を評価したところ、 LOOH の存在を示す緑色蛍光が IKE 群で上昇し、IKE+Fer-1 群では Cont 群と同程度まで低下していた。この結果は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の HT-1080 細胞への取込み量が LOOH の生成量に応じて変化したことを示しており、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ が LOOH を標的とした放射性プローブとして機能し得ることが示された。

(2)- $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ の安定性試験

$[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ を中性緩衝液、もしくはヒト血漿中においてインキュベートした後の未変化体の割合は、それぞれ 78 ± 2 、 $9 \pm 5\%$ であった。この結果は、 $[^{64}\text{Cu}][\text{Cu}^{\text{I}}(\text{BCS})_2]^{3-}$ は中性溶液中では安定に存在するものの、血漿中では速やかに崩壊することを示す。そのため、 Cu^{I} 錯体を母体とした放射性プローブをインビボ PET イメージングに用いるためには、より生体内安定性の高い錯体を新たに設計合成することが必要であると考えられた。

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 0件）

1. 著者名 Tada Tetsuro, Mizuno Yuki, Shibata Yuki, Yasui Hironobu, Kuge Yuji	4. 巻 134-135
2. 論文標題 Application of copper (I) selective ligands for PET imaging of reactive oxygen species through metabolic trapping	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 108914 ~ 108914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nucmedbio.2024.108914	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tada T, Mizuno Y, Shibata Y, Yasui H, Kuge Y
2. 発表標題 Synthesis of $[64\text{Cu}]\text{Cu}^+$ complex for redox imaging and evaluation of its reactivity with reactive oxygen species.
3. 学会等名 The 25th International Symposium of Radiopharmaceutical Sciences (iSRS 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 多田 哲朗、水野 雄貴、柴田 悠貴、安井 博宣、久下 裕司
2. 発表標題 ROSイメージングを目的とした $[64\text{Cu}]\text{Cu}^+$ 錯体の合成と評価：配位子構造が錯体の安定性に与える影響
3. 学会等名 第62回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 多田 哲朗、水野 雄貴、柴田 悠貴、安井 博宣、久下 裕司
2. 発表標題 レドックスイメージングを目的とした $[64\text{Cu}][\text{CuI}(\text{BCS})_2]^+$ の合成とROSとの反応性評価
3. 学会等名 第5回日本核医学会分科会 放射性薬品科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 龍昕、水野 雄貴、柴田 悠貴、安井 博宣、久下 裕司
2. 発表標題 Cystine-dense peptideを母体としたTfR1イメージング薬剤開発に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第8回 北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 龍昕、水野 雄貴、久下 裕司、柴田 悠貴、安井 博宣
2. 発表標題 Cystine-dense peptide TfRB1G3 のTfR1への親和性評価と68Ga標識に向けたHBED-CC結合体の合成
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦春香, 水野雄貴, 高橋春香, 大久保直登, 前原経, 久下裕司, 武田宏司, 大西俊介
2. 発表標題 68Ga標識トランスフェリン受容体認識ペプチドによるがんイメージングの検討
3. 学会等名 第7回北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多田哲朗, 水野雄貴, 柴田悠貴, 安井博宣, 久下裕司
2. 発表標題 ROSイメージングを目的としたメタボリックトラップ型PETプローブの開発: CuI-イソニトリル錯体の利用
3. 学会等名 第7回北大・部局横断シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水野雄貴, 三浦春香, 安井博宣, 柴田悠貴, 大久保直登, 前原経, 武田宏司, 大西俊介, 久下裕司
2. 発表標題 トランスフェリン受容体認識直鎖ペプチドを母体とした68Ga標識プローブの合成と評価
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 多田哲朗, 水野雄貴, 柴田悠貴, 安井博宣, 久下裕司
2. 発表標題 ROSイメージングを目的としたメタボリックトラップ型PETプローブの開発: CuI-BCA錯体の利用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔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	安井 博宣 (Yasui Hironobu) (10570228)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	小川 美香子 (Ogawa Mikako) (20344351)	北海道大学・薬学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	横田 千晶 (Yokota Chiaki) (80300979)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・医長 (84404)	

6. 研究組織（つづき）

	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	水野 雄貴 (Mizuno Yuki) (90805194)	北海道大学・アイソトープ総合センター・助教 (10101)	

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