

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791233

研究課題名（和文） 軸索再生の指標となる神経特異的接着分子のPETイメージング

研究課題名（英文） PET imaging of neural specific cell adhesion molecule as an indication of axonal regeneration

## 研究代表者

向井 英史 (MUKAI HIDEFUMI)

独立行政法人理化学研究所・分子プローブ動態応用研究チーム・研究員

研究者番号：60570885

## 研究成果の概要（和文）：

末梢神経障害や脊髄損傷時における、神経損傷の程度や再生の可否に関する情報は、治療方針の決定に対して重要であり、その指標となり得る分子プローブの開発が求められている。本研究では、神経特異的接着分子(NCAM)に対するペプチドリガンドを誘導体化した<sup>64</sup>Cu標識PET分子プローブを構築し、NCAMを高発現した腫瘍移植マウスをモデル動物としたPET研究を実施した所、腫瘍部位の可視化に成功した。より集積性を高める戦略として、ペプチドリガンドを多量体化、高分子量化したデンドロン型のPET分子プローブの合成にも成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

In the case of peripheral nerve disorder and spinal cord injury, extent of nerve damage and regeneration ability are important for decision of treatment strategy and, therefore, development of molecular probes useful for getting these information is urgently required. In this study, I synthesized peptide ligand derivatives against neural cell adhesion molecule (NCAM), or <sup>64</sup>Cu-labeled PET probes, and performed PET study using NCAM expressing tumor bearing mice. Additively, I successfully synthesized dendron type PET probes for improvement of affinity and biodistribution by the effect of multimerization and increase of molecular weight.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：神経接着分子、PETイメージング、<sup>64</sup>Cu標識

## 1. 研究開始当初の背景

末梢神経障害や脊髄損傷は、神経の圧迫や外傷、ある種の薬物などに起因する神経損傷であり、前者では 2012 年には世界主要市場 7ヶ国での患者数は 150 万人以上に達すると想定され、また後者の脊髄損傷においても、その患者数は国内だけで約 10 万人以上であり、毎年約 5000 人以上の新たな罹患が推計されている。損傷部位に依存して、運動障害や感覚障害によって車椅子生活を余儀なくされたり、自立神経障害においては内臓器官の機能異常が引き起こされるなど、QOL が著しく低下する。神経損傷の程度や再生の可否に関する情報は、治療方針の決定に対して重要であり、従来の電気刺激に対する反応に基づく神経伝導検査に加え、MRI などによる神経造影の試みが推進されているが、神経損傷あるいは再生時の神経組織状態に関連する分子標的を可視化する戦略による画像診断は未だ無く、その指標となり得る分子プローブの開発が求められている。

神経損傷後の再生時における軸索伸長に対し、接着分子や栄養因子など周辺環境との相互作用が多大な影響を及ぼすことが知られている。代表的な神経特異的接着分子の一つである neural cell adhesion molecule (NCAM) は、末梢神経軸索及び末梢神経におけるグリア細胞であるシュワン細胞に発現し、NCAM 同士の同種分子親和性結合や fibroblast growth factor 受容体 I などとの異種分子親和性結合を介して軸索の再生において主要な役割を果たしていると考えられている。実際に、損傷後の再生時に NCAM が上方制御を受けることが報告されており、神経再生における有効な分子マーカーと期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経特異的接着分子 (NCAM) に対するペプチドリガンドとして見出された C3 を誘導体化し、 $^{64}\text{Cu}$  標識 PET 分子プローブを構築することを目的とした。合わせて、標的親和性、体内動態の改善を指向し、ペプチドリガンド C3 を多量体化、高分子量化した、デンドロン型の PET 分子プローブの開発も目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) ペプチド合成

ペプチド部位は、Fmoc 固相合成法により合成した。配位子としては、1, 4, 7, 10-tetra-azacyclododecane- N, N', N'', N'''-tetra-

acetic acid (DOTA) を用い、ペプチドの N 末端側に導入する際は末端アミノ基にアミド結合により、C 末端の場合は、あらかじめ導入しておいたシステイン残基に対しチオール-マレイミド結合を介して結合させた。

### 2) $^{64}\text{Cu}$ 標識 PET プローブの合成

住友重機製 HM-12S サイクロトロンを用い、 $^{64}\text{Ni}$  メッキを施した金ディスクターゲット上で、 $^{64}\text{Ni} (p, n) ^{64}\text{Cu}$  核反応により  $^{64}\text{Cu}$  を生成した。イオン交換樹脂を用いて精製し、 $^{64}\text{CuCl}_2$  を得た。配位子 DOTA へのキレート反応は、0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中 50 °C で行い、ODS カートリッジにより精製した。

### 3) 実験モデル動物の作製

ヒトグリオーマ細胞株 U87MG は ATCC から購入し、10% の非働化したウシ胎児血清、100 IU/ml ペニシリン、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ストレプトマイシン、1 mM ピルビン酸、非必須アミノ酸を添加した MEM 培地中 37 °C、5%  $\text{CO}_2$ 、加湿条件下で培養した。Balb/c nu/nu 雌性マウス (5 週齢) を日本エスエルシー株式会社より購入し、右脇部皮下に対し、100  $\mu\text{L}$  の PBS に懸濁した U87MG 細胞  $3 \times 10^5$  個を注入して作製した。

### 4) PET 実験

1.5% イソフルラン、 $\text{N}_2\text{O}/\text{O}_2$  (7:3) による麻酔下、マウス尾静脈から約 10 MBq のプローブを投与し、シーメンス社製 microPET Focus 220 を用いてデータ収集を行った。取得したサイノグラムは、最尤推定法により画像再構成を行い、RI 投与量と実験動物体重により補正した standardized uptake value (SUV) に変換した。

## 4. 研究成果

### 1) $^{64}\text{Cu}$ 標識 C3 ペプチドリガンドプローブの合成及び PET 研究

まず、N 末端あるいは C 末端  $^{64}\text{Cu}$  標識 C3 ペプチドリガンドプローブを合成した。それぞれ末端にグリシンリンカーを挟んで、配位子 DOTA を結合させ、精製した  $^{64}\text{Cu}$  を配位させた。比放射能はおよそ 30 MBq/nmol であった。これを、腫瘍移植マウスに投与して PET 研究を実施した。スクランブル配列と比較して、NCAM が発現している腫瘍部位への集積が高い傾向が示され、この PET プローブが NCAM の個体レベルでの可視化に有用である可能性が示唆された。培養細胞を利用した実験系などでの検討から、標的親和性の向上や体内動態の改良が必要と考えられた。

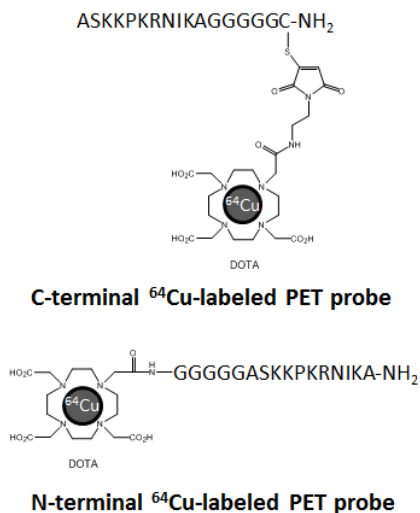


図. <sup>64</sup>Cu 標識 C3 ペプチドリガンドプローブ

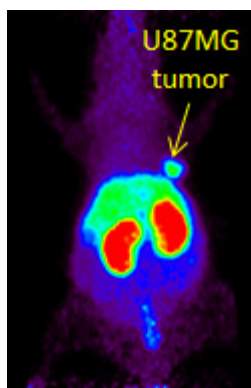


図. <sup>64</sup>Cu 標識 C3 ペプチドリガンドプローブを用いた PET イメージング(投与 24 時間後、Maximum Intensity Projection (MIP) 画像)

## 2) デンドロン型 PET 分子プローブの合成

生体内で分解、代謝を受けた後の安全性を考慮し、リジンによる分岐構造を持つデンドロン型 PET 分子プローブの合成を検討した。まず、Fmoc-Lys(Fmoc)-OH を用いて、通常の固相合成による分岐ペプチドの合成を試みたが、HPLC においてブロードなピークとなり、収量が非常に低いという問題点が明らかとなった。これは、導入するアミノ酸残基数が多いため目的物の収率が低下したものと考えられ、効率的な合成手法の検討が必要となったことが明らかになった。そこで、デンドロンコア部分とペプチドリガンド部分を別々に合成した後、カップリングする戦略を検討することにした。C3 ペプチドリガンドがシステイン残基を含まないことから、チオール-マレイミド結合を利用しカップリングした。デンドロンコア部分の各 N 末端にマレイミド基の導入を試みたが、溶解性に問題があることが

明らかとなったため、デンドロンコア部分の N 末端にシステインを、ペプチドリガンド部分の C 末端にマレイミド基を導入したペプチド誘導体を合成した。これらを溶液中、カップリングし、精製した後、<sup>64</sup>Cu 標識して、デンドロン型 PET 分子プローブの構築に成功した。

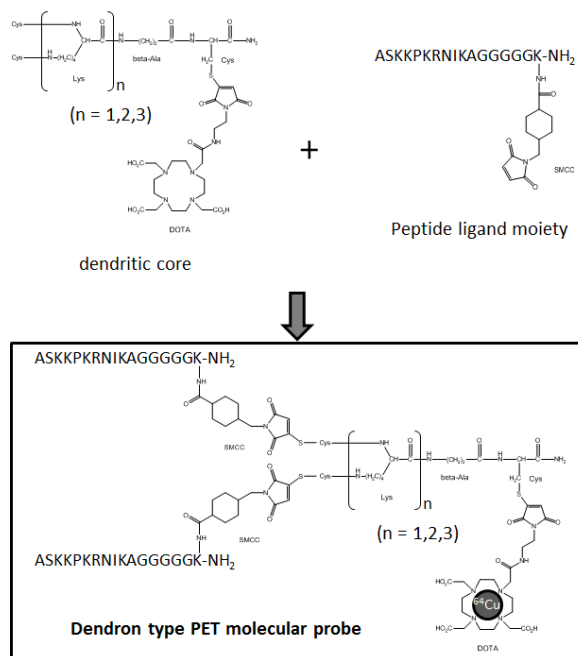


図. デンドロン型 PET 分子プローブの合成スキーム

## 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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 向井英史, 未来の創薬・医療と分子イメージング技術~Drug Delivery System 開発への応用を例として~, 神戸学院大学ライフサイエンス産学連携研究センター LSC 学術講演会, 神戸市, 2012 年 3 月 9 日.
- ② 向井英史, 渡辺恭良, 分子イメージング技術と DDS 開発の接点, 第 1 回 DDS 製剤臨床応用フォーカスグループ合宿討論会, 神奈川県箱根町, 2011 年 11 月 13 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕 ホームページ等  
なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向井 英史 (MUKAI HIDEFUMI)

独立行政法人理化学研究所・分子プローブ動  
態応用研究チーム・研究員

研究者番号：60570885