

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659590

研究課題名(和文)マラリア感染イメージングのための分子プローブの開発

研究課題名(英文)Development of molecular probe for imaging of malaria infection

研究代表者

中山 守雄(NAKAYAMA, MORIO)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60164373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：感染症の中でも、世界的には最も重要なマラリア感染症のイメージングのための分子プローブの開発に着手し、抗マラリア薬とアミロイドに親和性を示す化合物を基本骨格とする分子プローブの合成を進めた。抗マラリア薬キナクリンの放射性ヨウ素標識体、キナクリンの基本骨格であるアクリジン誘導体とその放射性ヨウ素標識体、またアミロイドに親和性を示すスチリルクロモン誘導体とその放射性ヨウ素標識体の合成に成功したが、マラリア原虫を体外で直接標識する方法は未達成である。

研究成果の概要(英文)：We started to develop the molecular probe for imaging of malaria infection which is the most important worldwide infection and advanced the synthesis of the candidates molecular probe based on the fundamental skeleton of antimalarial drugs or the compound which shows an affinity to amyloid. It succeeded in synthesis of the radioactive-iodine labeled quinacrine as antimalarial-drugs, the acridine derivatives which is a fundamental skeleton of quinacrine and its radioactive-iodine labeled compound, and the styrylchromone derivatives which shows an affinity for amyloid and its radioactive-iodine labeled derivatives. However, the direct labeling of the malaria parasite outside a body is not completed.

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：マラリア原虫 感染症分子イメージング 抗マラリア薬 キナクリン アミロイド 放射性ヨウ素標識化合物

1. 研究開始当初の背景

我が国の死因の上位を占める悪性腫瘍、心疾患、脳血管疾患に対する核医学診断の寄与は大きく、そのための *in vivo* イメージング用薬剤も多数開発されてきた。一方、世界的には、微生物感染症が死因の第一位を占めているにもかかわらず、病因となる微生物を直接標的とする *in vivo* イメージングは、これまで、ほとんど行われていない。その最大の要因は、感染性の微生物と放射性同位元素を同時に扱える研究設備が無かったことにある。本学では昨年度に、放射性同位元素センター内に、動物用 PET/SPECT/CT を設置した P2,P3 施設を整備し、本邦初の感染症の *in vivo* イメージングが可能な本格的な研究環境が整うこととなった。そこで、我々のこれまでの、*in vivo* イメージングのための分子プローブ開発研究の経験を基に、感染プロセスの視覚化と新規感染症治療薬開発の際に有効な分子プローブの開発研究に着手することを計画した。この感染症イメージングでは、以下に列挙した理由により、まず、対象としてマラリア感染を選択した。

- (1) 古くから知られているにもかかわらず、今なお重大な感染症であること。
- (2) 今後の地球温暖化に伴い、マラリア感染地域が拡大する恐れがあること。
- (3) 現存の抗マラリア薬に耐性を示すマラリア原虫の出現が報告されており、新たな抗マラリア薬の開発が求められていること。
- (4) 本学に新たに設置される施設ではじめて、マラリアの *in vivo* イメージングが可能になること。
- (5) ヒトへの感染がないマウスマラリア原虫を用いてモデル動物が作成可能なこと。
- (6) 分子プローブ設計にヒントとなる抗マラリア薬やマラリア原虫の染色試薬があること。
- (7) 本研究に協力可能なマラリアの専門家が、本学の熱帯医学研究所に多数いること。

2. 研究の目的

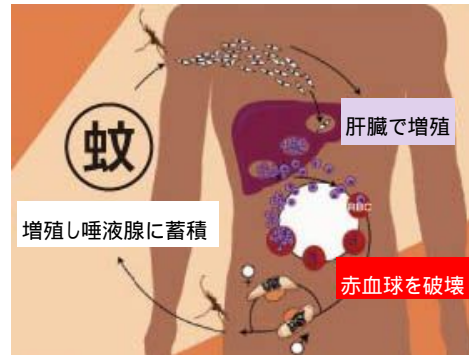
マラリアは、WHO の推計によると、年間 3~5 億人の罹患者と 150~270 万人の死亡者があるとされる。病原体はマラリア原虫で、未だワクチンは開発されていない。本研究では、感染プロセスの視覚化と新規感染症治療薬開発における *in vivo* イメージング技術の活用のために、マラリア感染症を標的とした *in vivo* イメージングのための分子プローブの開発を目的としている。

マラリア原虫は、ハマダラカの唾液腺にスポロゾイトとして集積し、感染は以下のプロセスで進むことが明らかになっている (Fig.1)。

- (1) 吸血によるスポロゾイトの人体への侵入
- (2) 血中スポロゾイトの肝細胞への取込
- (3) 肝細胞内で分裂増殖によるメロゾイト

の生成

- (4) メロゾイトの血中への放出と赤血球への侵入
- (5) 赤血球内での分裂増殖後、赤血球膜を破壊して放出され、このサイクルを繰り返す。一方、肝細胞内で潜伏状態となる休眠原虫も形成され、再発を生ずることもある。



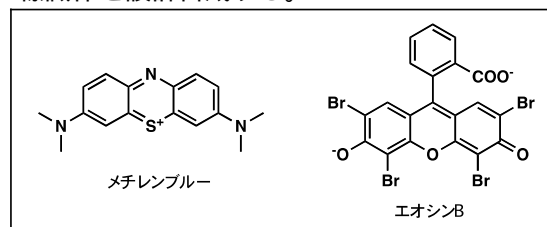
http://www.newsdigest.de/newsde/images/doctor/676_03.jpg

現在マラリアの早期診断は、上記の(4)(5)の段階で、血液サンプルのギムザ染色や PCR で十分可能であるが、マラリア感染の最大の特徴は、そのダイナミズムにあり、その動態の追跡は、*in vivo* イメージングでしかなしえないと考えた。

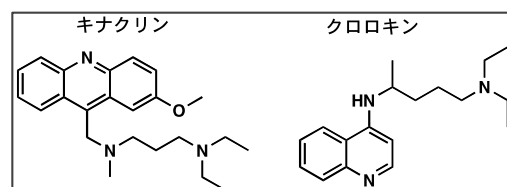
3. 研究の方法

アプローチ1 (分子プローブの設計合成)

- (1) ギムザ染色に用いられるメチレンブルー及びエオシンは、すでにマラリア原虫の染色剤として使用されていることから、これらを、リード化合物とする放射性ヨウ素標識体を設計合成する。

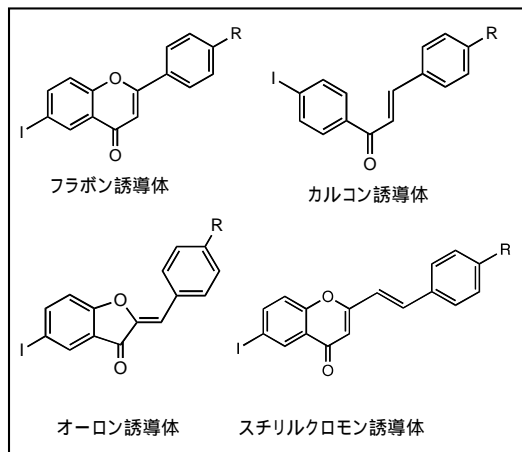


- (2) キナクリンは、抗マラリア薬であるが、近年、抗プリオン薬としても注目を集めた。我々は、このキナクリンと幾つかの関連化合物の放射性ヨウ素標識体を合成し、アミロイド と強く結合することを明らかにした。このキナクリンはマラリア原虫の細胞膜を透過し、原虫内のタンパク質に強く結合し、集積することが期待できる。同じく既存の抗マラリア薬であるクロロキンも、同様の効果が期待でき、これらを基本骨格として各種誘導体の合成を進めた。



(3) アミロイドに親和性を示すフラボノイド及びその関連化合物から分子プローブを選別する作業を進めた。

脳内アミロイドに親和性を有する化合物として、これまでに、フラボノイド及びその関連化合物に着目し、多くの分子プローブを開発してきた。すでに、キナクリンの例からもわかるように、脳内アミロイドの中でも、異常プリオン凝集体 (PrP^{Sc}) に結合性を示す化合物とマラリア原虫染色剤、抗マラリア薬剤との間に相性が認められることから、これまでの合成した化合物群の中で、PrP^{Sc} との結合性を示す化合物を抽出することによって、候補化合物の選別を行った。



アプローチ2 (分子プローブの投与方法)

(1) 体外で、マラリア原虫、スポロゾイト及びメロゾイト内のマラリア原虫を放射標識し、投与する(感染させる)方法を開拓する。この方法が成功すれば、分子プローブが原虫内にのみ存在するため、原虫の動態を的確に視覚化できる。しかし、猛烈に増殖し、移動する原虫をとらえるためには、比放射能が高い分子プローブが必要となる。

(2) 感染動物を作成後、各ステージで、分子プローブを投与し、体内挙動を検討した。この方法は一般的な方法であり、既存薬物を骨格に用いた場合には、その分布挙動と原虫との相互作用が把握できるが、分子プローブは全身に分布する可能性があるため、分布を制御するための薬剤設計が必要となる。

4. 研究成果

アプローチ1: 分子プローブの設計合成

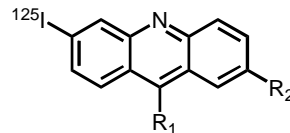
マラリア原虫のギムザ染色に用いられるメチレンブルー及びエオシンを基本骨格とする *in vivo* イメージング薬剤の開発を当初計画したが、これら染色薬剤は水溶性で、骨格自体が荷電を有しており、原虫の細胞膜等の透過性に難点が生じるため、新たなドラッグデザインが必要になる。そこで、抗マラリア薬を基本骨格とする *in vivo* イメージング薬剤の開発とアミロイドに親和性を示

す化合物から *in vivo* イメージング薬剤を抽出するアプローチから進めることとした。

(1) 抗マラリア薬を基本構造とする分子プローブ群の合成:

抗マラリア薬キナクリンの放射性ヨウ素標識体の合成とキナクリンの基本骨格であるアクリジン誘導体とその放射性ヨウ素標識体の合成:

抗マラリア薬キナクリンが、*in vitro* において PrP^{Sc} の形成を阻害し、またヒト PrP ペプチドの凝集体に結合することが明らかになっている。また、プリオン病患者にキナクリンを投与すると、症状が一時的に改善したという報告も存在する。これらのキナクリンの作用機序は明らかにされていないが、PrP^{Sc} と何らかの相互作用をしている可能性が高く、マラリア感染のスクリーニングに使用できるのではないかと考えた。そこで本研究では、キナクリンの母骨格であるアクリジン (AC) に様々な置換基を導入した ¹²⁵I 標識 AC 誘導体を合成した。また、大腸菌により発現させたリコンビナントマウスプリオンタンパク質 (rMoPrP) を精製後、凝集させた後、Thioflavin T を用いてアミロイド構造を確認後、PrP^{Sc} モデルとして結合実験に用いた。



Chemical structure of AC derivatives

- 1: R₁=H, R₂=OCH₃
 2: R₁=N(CH₃)₂, R₂=OCH₃
 3: R₁=NHCH₃, R₂=OCH₃
 4: R₁=NH₂, R₂=OCH₃
 5: R₁=OCH₃, R₂=OCH₃
 6: R₁=OCH₃, R₂=N(CH₃)₂
 15: R₁=NHCH₂CH₂OH, R₂=OCH₃
 16: R₁=NH(CH₂CH₂O)₂H, R₂=OCH₃
 21: R₁=OCH₂CH₃, R₂=OCH₃
 22: R₁=OCH₂CH₃, R₂=N(CH₃)₂

4-Bromo-2-chlorobenzoic acid とアニリン誘導体を出発原料とし、Ullmann-Jourdan 反応を経た後、POCl₃ を用いた環化反応によって AC 骨格を形成し、2 位及び 9 位に数種の置換基を導入した。新規の ¹²⁵I 標識体は、トリブチルスズ標識前駆体からスズ-ヨウ素交換反応にて、放射化学的収率 29-94% で得た。rMoPrP 凝集体を用いた吸着実験を行ったところ、¹²⁵I 標識 AC 誘導体は導入した置換基により吸着率が大きく変化した。このうち、脂溶性が比較的高い化合物は吸着率が高い傾向にあったが、明確な相関性は認められなかった。次に、最も吸着率が高かった化合物 2 を用いて結合飽和実験を行ったところ、rMoPrP 凝集体に対し結合親和性を示した (K_d 値=49.82 nM)。続いて、化合物 2 を用いた BSE 感染モデルマウス脳切片の蛍光染色実験を行った結果、化合物 2 由来の蛍光像が認められ、さらに隣接切片におけるアミロイド蛍光染色試薬である thioflavin T (ThT) の蛍光像と一致した。よって、化合物 2 は BSE 感染モデルマウス脳内に存在する PrP^{Sc} 由来と思

われるアミロイドへ結合性を有することが示されたことから、候補化合物の一つと考えた。

(2)アミロイドに親和性を示す分子プローブ群の選別：

我々は、フラボン誘導体、カルコン誘導体、オーロン誘導体、スチリルクロモン誘導体、を百種類以上合成している。これらについても、rMoPrP 凝集体を用いて結合性の検討を行った。rMoPrP 凝集体を用いた結合飽和実験の結果、4'位にジメチルアミノ基を有するフラボン (FL-NMe₂)、カルコン(CH-NMe₂)、オーロン (AR-NMe₂)、スチリルクロモン (SC-NMe₂) 誘導体の中で、SC-NMe₂ は rMoPrP 凝集体に対して高い結合親和性と、結合量を示した ($K_d = 37.4 \text{ nM}$, $B_{max} = 1.89 \text{ pmol/} \mu\text{g protein}$)。さらに、BSE プリオン感染マウス脳切片を用いて、SC-NMe₂ の蛍光染色を行ったところ、切片上の PrP^{Sc} 沈着部位に化合物由来の蛍光像が得られたため、SC-NMe₂ は、マウス脳内の PrP^{Sc} に対して結合性を有することが示された。従って、4種の誘導体の中で SC 誘導体がプリオンイメージングプローブとして最も有望であることが示唆された。更に、BSE プリオン感染マウス脳切片を用いて、4'位にモノメチルアミノ基、メトキシ基、3'位及び4'位にメトキシ基を導入した SC 誘導体 {SC-NHMe, SC-OMe, SC-(OMe)₂} の蛍光染色を行ったところ、切片上の PrP^{Sc} 沈着部位に化合物由来の蛍光像が得られたことから、これらを候補化合物として抽出した。

アプローチ2：分子プローブの投与方法

- (1) 体外で、マラリア原虫、スポロゾイト及びメロゾイト内のマラリア原虫を放射標識し、投与する(感染させる)方法については、マラリア原虫は、血液もしくは赤血球から取り出すと生存できないため、現在、原虫を体外で直接標識する方法は未達成である。今後 *in vitro* での赤血球標識法への転換を検討中である。
- (2) 感染動物を作成後、各ステージで、分子プローブを投与する一般的な方法については、分子プローブは全身に分布するため、分布を制御するための薬剤設計が必要となる。そこで、まず、正常動物を用いて、分子プローブの体内分布挙動を確認した。放射性ヨウ素標識キナクリンは、肺への集積が著しく高い結果となり、キナクリン自体の適用は困難であるが、一連の AC 化合物やスチリルクロモンの標識体においては、置換基の種類や導入位置の違いによって、その体内動態は大きく変化した。しかしながら、総じて、血中からの消失は早く、*in vivo* での、赤血球取込は、あまり期待できないと考えられた。また、総じて、脂溶性が大きい化合物であるため、肝臓への取込が高くなっており、これらの問題を解決するためには、今後 *in vitro* で、マラリア原虫を包含する赤血球標識法を採用する方向で検討を進める予定である。

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)

[雑誌論文](計 3件)

Mamoru Haratake, Sakura Yoshida, Megumi Mandai, Takeshi Fuchigami, Morio Nakayama: Elevated amyloid-plaque deposition in dietary selenium-deficient Tg2576 transgenic mice. *Metallomics*, 査読有、2013巻、2013、479-483

DOI: 10.1039/c3mt00035d

Kazuma Ogawa, Katsuichi Ohtsuki, Tomomi Shibata, Miho Aoki, Morio Nakayama, Yoji Kitamura, Masahiro Ono, Masashi Ueda, Tomoki Doue, Masahisa Onoguchi, Kazuhiro Shiba, Akira Odani: Development and Evaluation of a Novel ^{99m}Tc-Labeled Annexin A5 for Early Detection of Response to Chemotherapy. *PLOS ONE*, 査読有、8巻、2013、e81191

DOI: 10.1371/journal.pone.0081191

Takeshi Fuchigami, Nobuya Kobashi, Mamoru Haratake, Masao Kawasaki, Morio Nakayama, Synthesis and biological evaluation of radioiodinated quinacrine based derivatives for SPECT imaging of Aβ plaques. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 査読有、60巻、2013、469-478

[学会発表](計 6件)

川崎 仁央(中山 守雄) プリオン病診断薬への応用を目的とした放射性ヨウ素標識アクリジン誘導体の合成と評価. 日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日(熊本)

飯國 慎平(中山 守雄) アミロイド結合性の向上を目指した ^{99m}Tc-ヒドロキサムアミド錯体の合成とその基礎的評価. 第 13 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2013 年 12 月 14 日(京都)

川崎 仁央(中山 守雄) 脳内プリオン感染イメージング薬剤の開発を目的とした ¹²⁵I 標識アクリジン誘導体の合成と評価. 第 13 回放射性医薬品・画像診断薬研究会、2013 年 12 月 14 日(京都)

川崎 仁央(中山 守雄) ¹²⁵I 標識アクリジン(AC)誘導体の合成とプリオンイメージングプローブとしての基礎的評価. 第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 8 日(佐世保市)

川崎 仁央(中山 守雄) ¹²⁵I 標識アクリジン(AC)誘導体の合成とプリオン病診断薬としての基礎的評価. 第 53 回日本核医学会学術総会、2013 年 11 月 9 日(福岡市)

Takeshi Fuchigami, Synthesis and evaluation of radioiodinated flavonoid-related compounds as SPECT probes for imaging cerebral prion deposits. Asian Pacific Prion Symposium 2013 (APPS2013), 2013年7月21日・22日(佐世保市)

[図書](計 1件)

Takeshi Fuchigami, Morio Nakayama, Yasuhiro Magata, Springer 2014 London, PET and SPECT of Neurobiological Systems . 2014、513-559

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 守雄 (NAKAYAMA, Morio)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：60164373

(2) 研究分担者

淵上 剛志 (FUCHIGAMI, Takeshi)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：30432206