

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461895

研究課題名(和文) 脳内レドックス状態のイメージングを目的とするPETプローブの開発

研究課題名(英文) Development of PET probes for imaging of redox status in the brain

研究代表者

岡村 敏充 (Okamura, Toshimitsu)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：80443068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳内のレドックス状態を非侵襲的に評価することが可能となれば、脳疾患の病態解明や早期診断に貢献すると期待される。本研究では¹¹C標識ジヒドロキノリン誘導体([¹¹C]DHQ1)について、脳内のレドックスイメージングの可能性を検討した。 [¹¹C]DHQ1は投与後、脳内に入り水溶性代謝物に酸化され、その代謝物は[¹¹C]DHQ1よりも緩やかに脳から排出された。また、レドックスモジュレータのアポシニン投与したマウスの脳では水溶性代謝物への酸化が阻害され、さらに[¹¹C]DHQ1の動態にも変化が認められた。以上、[¹¹C]DHQ1による脳内レドックス状態のイメージングの可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the feasibility of imaging brain redox status using a ¹¹C-labeled dihydroquinoline derivative ([¹¹C]DHQ1) for positron emission tomography. The lipophilic [¹¹C]DHQ1 was rapidly oxidized to its hydrophilic form in mouse brain homogenate. The redox modulators diphenyleiodonium and apocynin significantly decreased the oxidation velocity of [¹¹C]DHQ1, and apocynin caused concentration-dependent inhibition of the oxidation velocity. Furthermore, [¹¹C]DHQ1 diffused into the brain after administration and underwent oxidation into the hydrophilic metabolite, which then slowly decreased. By contrast, apocynin treatment caused a rapid decrease of radioactivity in the brain and inhibited the in vivo oxidation of [¹¹C]DHQ1 to the hydrophilic metabolite. Thus, [¹¹C]DHQ1 is a potential tracer for imaging of redox status in the brain.

研究分野：放射性医薬品

キーワード：PET レドックス

1. 研究開始当初の背景

生体内のレドックス状態は活性酸素種産生系や抗酸化系の様々なシステムによりその恒常性が維持されている。しかしながら、恒常性が破綻し、活性酸素種産生系が抗酸化系に比べ著しく上回った状態、即ち酸化ストレスが発生すると、種々の応答反応が引き起こされる。酸化ストレスは脂質やタンパク質などの生体成分に障害を与え、細胞機能障害や細胞死を引き起こすため、ガンや老化、虚血・再灌流障害など多くの疾患の重要な原因の1つであると考えられている。一方で、活性酸素種は細胞においてシグナル伝達分子として機能し、細胞の分化や増殖など生命機能の制御に関与していることも報告されつつある。従って、生きたまま脳内のレドックス状態を非侵襲的に評価することが可能となれば、脳疾患の病態解明や早期診断に貢献すると期待される。しかしながら、このような評価のためのポジトロン断層撮像法(PET)用プローブはまだ開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は脳内のレドックス状態を非侵襲的に評価するためのPETプローブを開発することである。

3. 研究の方法

(1)測定原理

脳内のレドックス状態を評価するために、代謝変換捕捉原理を用いた。この原理に基づくコンパートメントモデルを図1に示す。

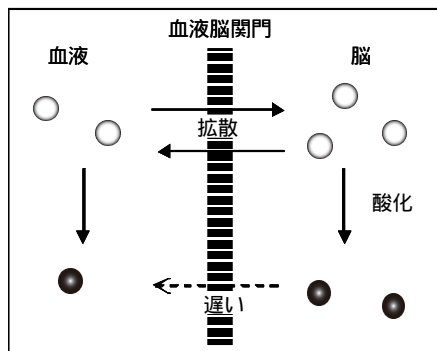


図1 代謝変換捕捉原理に基づくコンパートメントモデル。○: [11C]DHQ1 (還元体)
●: [11C]Q1+ (酸化体)

静脈内投与された脂溶性のPETプローブ(還元体)は単純拡散により血液脳関門を通過し脳内に入る。その後、レドックス状態に依存した酸化反応により水溶性代謝物(酸化体)が生成される。この代謝物は水溶性であるため、脂溶性のPETプローブとは異なり、脳組織内に捕捉されるか、あるいは脳から緩やかに排出されることが期待される。従って、酸化ストレスが生じることや酸化酵素活性が上昇することによって、脳内放射能は増加する。これに対して、脳内の抗酸化防御システムの増強あるいは酸化ストレスに關与す

る酸化酵素の障害が生じると脳内放射能は低下することとなる。本研究では、1-[11C]メチル-1,4-ジヒドロキノリン-3-カルボキサミド([11C]DHQ1)について、レドックスイメージングの可能性を検討した。[11C]DHQ1およびその酸化体([11C]Q1+)の構造を図2に示す。

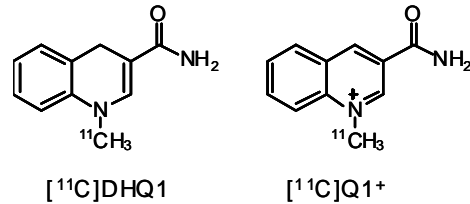


図2 PETプローブの構造

(2)標識合成

[11C]DHQ1の合成は出発原料のキノリン-3-カルボキサミドと¹¹CH₃Iによるメチル化反応により3-カルバモイル-1-[11C]メチルキノリニウム([11C]Q1+)とし、その後ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)を用いた還元によって、目的とする化合物を得た。

(3)脳ホモジネート中での[11C]DHQ1の酸化速度の評価

インビトロでの反応速度は、マウスの脳ホモジネート中で[11C]DHQ1の経時変化を測定後、時間に対して未変化体の濃度をプロットし、その傾きから求めた。また、レドックスモジュレータのジフェニレンヨードニウム(DPI)およびアポシニンを用いて、[11C]DHQ1の酸化速度に対する影響を調べた。

(4)インビボにおける[11C]DHQ1の動態の評価

脳移行性の評価のため、[11C]DHQ1または[11C]Q1+をマウスに静脈内投与後の脳内放射能濃度を測定した。また、還元体が消失する時間および脳内の放射性物質が酸化体となっていることを確認するため、HPLCにより脳内化学形の分析を行った。

さらに、PET装置を用いてマウスの脳組織における[11C]DHQ1の放射能濃度の変化を経時的に測定し、[11C]DHQ1の脳内動態に対するアポシニンの影響を調べた。

4. 研究成果

(1)標識合成

[11C]DHQ1は放射化学的収率1.6%~3.7%、放射化学的純度96%以上、比放射能120~360 GBq/μmol、合成時間(照射終了時から)45分で得られた。

(2)リン酸緩衝生理食塩水およびマウス脳ホモジネート中での[11C]DHQ1の安定性

本原理により、脳内のレドックス状態をイメージングするためには、[11C]DHQ1は脳内である程度酸化される必要がある。一方で、PETプローブとしては調剤溶液中で高い安定性

を有することが必要である。そこでまず、インビトロにおいてこれらのことを確認した。 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ はリン酸緩衝生理食塩水中ではほとんど酸化されることなく還元体として存在し、高い安定性を示した(図3)。一方、脳ホモジネート中では速やかに酸化されて、水溶性代謝物の $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ となることから、インビボにおいても $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ は脳内で酸化されることが期待された。

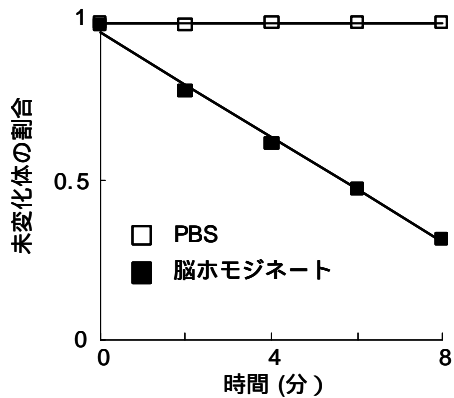


図3 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の経時変化

(3)インビトロでの $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化に対するDPI およびアポシニンの影響

マウス脳ホモジネート中での $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化速度に対するレドックスモジュレータ(DPI およびアポシニン)の影響を調べた結果、DPI の濃度 0.1 mM で $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化速度が約 50%減少し、また、アポシニンについては濃度依存的に酸化速度が減少し、インビトロにおけるレドックス変化に対する応答性が認められた。

(4) $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の脳内動態

本原理による脳内レドックス状態のイメージングには、投与された $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ は速やかに脳内に入ることが必要であるが、血液中に存在する $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ の脳移行性は低いことが望ましい。図4に $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ および $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ 投与後のPET加算画像を示す。還元体の $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ は容易に血液脳関門を通過し、脳内に入った。一方、酸化体 $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ 投与後の脳内放射能は $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ と比べ非常に低い値を示したことから、末梢組織で生じた $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ の血液から脳への移行は無視できるものと考えられる。

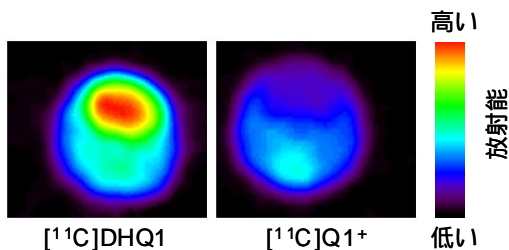


図4 PET画像

次に、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の脳内動態に対するアポシ

ニンの影響を調べた。図5A および図5B には $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ のPET加算画像および時間-放射能曲線が示されている。 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ 投与後の脳内放射能の最大値は同程度であった。しかしながら、放射能がピークに達した後、対照群では緩やかに減少したのに対して、アポシニンを投与したマウスでは速やかに放射能が減少した。

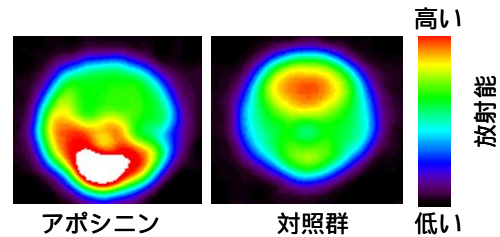


図5A $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ のPET画像

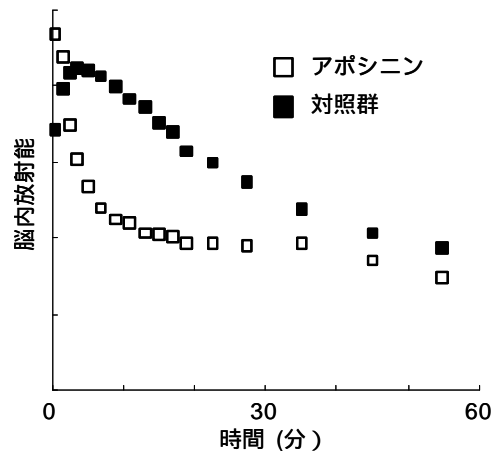


図5B 時間-放射能曲線

さらに、脳組織を採取し、脳内の還元体と酸化体の割合、即ち $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ と $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ の割合を調べた。図6に $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ 投与15分後の脳内化学形の分析結果を示す。対照群のマウスの脳では、投与後15分で還元体の $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ は消失し、放射能の大部分は酸化体の $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ であった。一方、アポシニン投与群では脳内放射能の46%が $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ であり、53%が $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ であった。

これらのインビボにおける結果をまとめる。還元体 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の脳移行性は高いが、酸化体 $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ は非常に低く、無視できる。

$[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ は脳内で $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ に酸化された。アポシニンにより $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化が阻害され、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ は $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ よりも速やかに脳から血液中に拡散した。

以上、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の動態はアポシニンによるレドックスの変化を反映し、 $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の脳内レドックス状態イメージングプローブとしての可能性が示された。

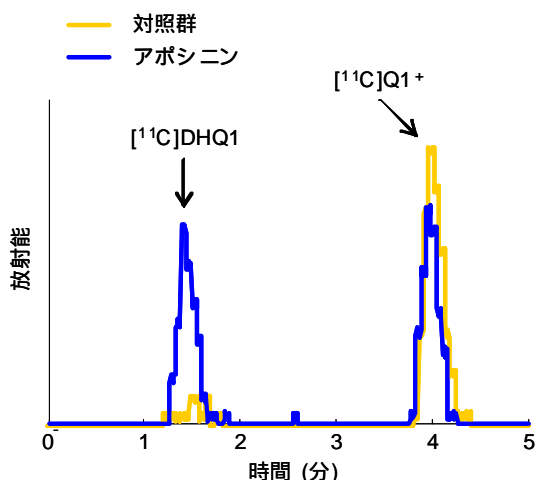


図6 脳内化学形の分析

(5) $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の問題点および今後の展望

酸化代謝物 $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ の脳から血液中の排出速度は $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ よりも遅かったものの、 $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ は完全に脳内に捕捉されなかった。一般に、水溶性カチオン化合物の血液脳関門透過性は低いことが知られていることを考慮すると、 $[^{11}\text{C}]\text{Q1}^+$ の脳からの排出には有機カチオントランスポータやP糖タンパク質などのトランスポータの関与が考えられる。レッドクス状態をより精度良く評価するためには、酸化体が脳内に完全に捕捉されるようなプローブの設計が今後必要と考えられる。

また、アポシニンや DPI は NADPH オキシダーゼ (活性酸素種を産生する酵素) の阻害剤としてしばしば用いられており、本研究により $[^{11}\text{C}]\text{DHQ1}$ の酸化はアポシニンおよび DPI により阻害されたことから、今後は NADPH オキシダーゼの関与を明らかにし、NADPH オキシダーゼ活性イメージングプローブの開発へと展開したい。

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1件)

Toshimitsu Okamura, Maki Okada, Tatsuya Kikuchi, Hidekatsu Wakizaka, and Ming-Rong Zhang. A ^{11}C -labeled 1,4-dihydroquinoline derivative as a potential PET tracer for imaging of redox status in mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 査読有. 2015, 35, 1930-1936. DOI: 10.1038/jcbfm.2015.132.

[学会発表](計3件)

Toshimitsu Okamura, Maki Okada, Tatsuya Kikuchi, Hidekatsu Wakizaka, Ming-Rong Zhang. Development of a PET tracer for imaging of redox status in the brain. Ninth Japan-China Joint

Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, 2015/11/09, National Institute of Radiological Sciences (千葉県・千葉市).

岡村 敏充、岡田 真希、脇坂 秀克、菊池 達矢、張 明栄. 酸化還元状態イメージング用分子プローブの開発、第54回日本核医学会学術総会、2014/11/06、大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

Toshimitsu Okamura, Maki Okada, Hidekatsu Wakizaka, Ming-Rong Zhang. Development of a tracer for imaging activity of NADPH oxidase in the brain. First Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies, 2014/08/25, Split (Croatia)

[その他]

発表論文等データベース

<http://www.nirs.go.jp/db/seikadb/welcome.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 敏充 (OKAMURA TOSHIMITSU)
国立研究開発法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員
研究者番号: 80443068

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし