

(論文要約)

動脈硬化およびがんの病態評価のための  
放射性ハロゲン標識核医学分子  
イメージングプローブの開発に関する研究

西郡 寛太郎



## 第1章

### 酸化低密度リポタンパク質を標的とした核医学動脈硬化分子イメージングのための放射性ヨウ素標識ペプチドプローブの開発

動脈硬化症は、脳血管疾患、心血管疾患の背景疾患であり、過去 50 年以上に渡り治療法の研究がなされているが、未だ根治には至っていない。現在においても、脳・心血管疾患は先進国の主要な死因であり、日本人の死因の約 26% を占めている。動脈硬化病変は、脂質コア、繊維性皮膜、炎症性細胞など多様な構成因子で形成される動脈硬化プラークを有するが、プラークの脆弱性の程度には幅があり、破綻しやすく危険性の高いプラークは不安定性動脈硬化プラークと称される。不安定性動脈硬化プラークは、炎症細胞の浸潤、大きな脂質コアの形成、繊維性皮膜の薄化、血管新生の亢進、ポジティブリモデリング等の特徴を有し、このようなプラークの破綻とそれに伴う血栓形成は、心筋梗塞や心臓突然死の 75% を占める。狭心症患者の冠動脈には複数の動脈硬化プラークが存在しているため、将来破綻へと至りうる不安定なプラークを検出することは臨床上重要である。

酸化低密度リポタンパク質 (OxLDL) は動脈硬化プラークの主構成成分であり、動脈硬化プラークの形成と不安定化に深く寄与している。血中の低密度リポタンパク質 (LDL) は血管内膜内の酸化ストレス環境下で OxLDL となり動脈硬化プラーク内に蓄積し、蓄積した OxLDL はスカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれて、その泡沫化を誘導する。動脈硬化プラーク内の OxLDL 蓄積量はプラークの不安定性と相関するため、OxLDL は動脈硬化プラークの不安定性の指標となる。

一方、核医学分子イメージング法は、病態に関与する分子 (標的) と特異的に相互作用

用する放射性分子（核医学分子プローブ）を用いて、その体内挙動から病態での機能変化を捉え、それを可視化する、非侵襲的かつ高感度な臨床画像診断法である。この核医学分子イメージングに用いられる放射性核種の中で、放射性ハロゲン核種はいくつかの利点を持っている。まず、物理化学的、放射線物理学的特性の異なる多様な核種が存在して核医学診断・放射線治療へと広く展開可能な優れた特性を有する。また、核医学イメージング分野で汎用されている放射性金属核種とは違って、放射性核種結合のためのキレート構造を必要とせず、母体化合物の特性を保持した状態で分子を合成できるため、低分子量のペプチドや有機化合物の標識に有効である。

以上より、本章では **OxLDL** を標的とした新規放射性ハロゲン標識核医学分子イメージングプローブの開発を計画した。

## 1-1 プローブ設計

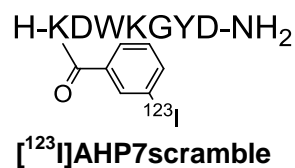
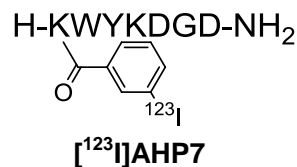
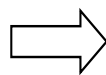
*Aspergillus fumigatus* より抽出された溶血性タンパク質毒素である Asp-hemolysin は OxLDL に対し高い親和性 ( $K_d = 1.2 \text{ nM}$ ) を有し、ペプチド配列解析から、YKDG を含む配列が OxLDL の認識に重要であることが明らかとなっている。本研究では、OxLDL に結合する部位の 6 残基のペプチド、WYKDGD を母体配列とし、結合性に関与しない部位への標識のため、N 末端にリジンを配し、当該εアミノ基を放射性同位元素による標識部位とした。

標識核種には、放射性ハロゲンの一つである、 $^{123}\text{I}$  を選択した。 $^{123}\text{I}$  は SPECT に適した線質の放射線を放出し、*N*-succinimidyl-3-iodobenzoate を標識試薬とすることで、低分子量ペプチドに安定的に導入可能である。

以上を背景として、 $[^{123}\text{I}]\text{Asp-hemolysin derived peptide probe}$  (H-K( $[^{123}\text{I}]\text{IB}$ )WYKDGD-NH<sub>2</sub>、 $[^{123}\text{I}]\text{AHP7}$ ) を設計した。加えて、陰性対照プローブとして、アミノ酸配列をランダムに並び変えた $[^{123}\text{I}]\text{AHP7scramble}$  (H-K( $[^{123}\text{I}]\text{IB}$ )DWKGYD-NH<sub>2</sub>、 $[^{123}\text{I}]\text{AHP7sc}$ ) を設計した (Figure 1-1)。なお、この実験には、 $^{123}\text{I}$  の代わりに半減期が長く取り扱いの容易な  $^{125}\text{I}$  を用いて行った。

H-IKNASLSWGK**WYKDGD**KDAEI-OH

The amino acid sequence of binding site of  
Asp-hemolysin.



**Figure 1-1.** The chemical structure of  $[^{123}\text{I}]\text{AHP7}$  and  $[^{123}\text{I}]\text{AHP7scramble}$ .

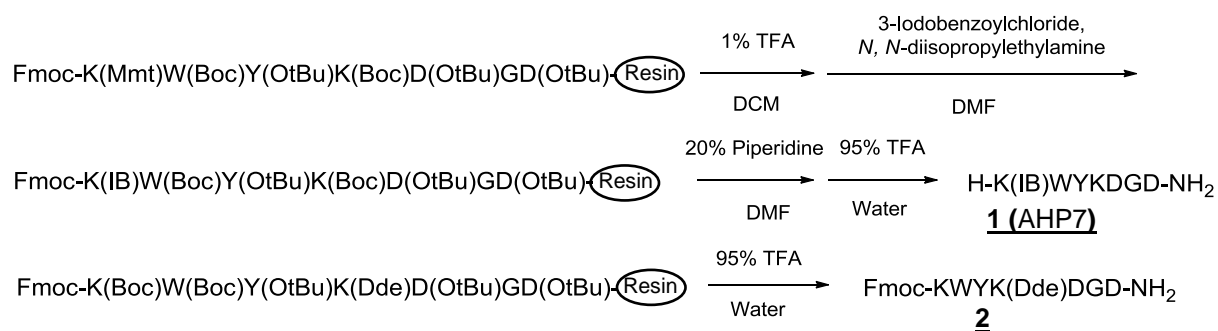
## 1-2 実験方法

### 試薬・機器

試薬は、ナカライテスク株式会社、和光純薬工業株式会社から購入した特級試薬を用いた。ペプチドの合成は、渡辺化学工業株式会社から購入した試薬を用い、ペプチド自動合成装置 (PSSM-8、株式会社島津製作所) を用いて行った。液体クロマトグラム質量分析 (LC-MS) は定速ポンプ (LC-10AP、株式会社島津製作所) に分光光度検出器 (SPD-10AP、株式会社島津製作所) および MS 検出器 (MS-2010、株式会社島津製作所) を用いて測定した。MS は GC-MS-QP Plus (株式会社島津製作所) を用いて測定した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は定速ポンプ (LC-20A、株式会社島津製作所) に分光光度検出器 (SPD-20A、株式会社島津製作所) およびオンライン NaI (TI) シンチレーション検出器 (NDW-351D、日立アロカメディカル株式会社) を接続した系を用いた。LDL の限外濾過には、Amicon Ultra-4 (30,000 MWCO、Merck Millipore 社) を用いた。thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 値の測定には TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Company 社) を用いた。放射能の測定には、キュリーメーター (IGC-7、日立アロカメディカル株式会社)、オートウェルガンマカウンター (Wallac 1480 WIZARD 3、PerkinElmer 社) を用いた。凍結切片の作製には、クリオスタット (CM1900、Leica 社) を用い、包埋剤には、super cryoembedding Medium (SCEM、Section Lab 社) を用いた。免疫染色像の観察は蛍光顕微鏡 (BZ9000、KEYENCE 社) を用いた。オートラジオグラフィ実験にはイメージングプレート (BAS-MS、富士フイルム株式会社) を用い、画像解析装置 (BAS2500、富士フイルム株式会社) を用いて、オートラジオグラムを得た。さらに、得られた画像の解析には画像解析ソフト (Image Gauge Software、富士フイルム株式会社) を用いた。 $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$  は MP Biomedicals 社より購入した。

## 合成

AHP7、 $[^{125}\text{I}]$ AHP7 標識前駆体の合成は Scheme 1-1 に示す方法で行った。  
H-K(IB)DWKGYD-NH<sub>2</sub> (AHP7<sub>sc</sub>)、Fmoc-KDWK(Fmoc)GYD-NH<sub>2</sub> ( $[^{125}\text{I}]$ AHP7<sub>sc</sub> 標識前駆体) は Bex 社より純度 95%以上で購入した (Fmoc : 9-fluorenylmethyloxycarbonyl、IB : iodobenzoyl)。



**Scheme 1-1.** Synthesis of AHP7 and the precursor of  $[^{125}\text{I}]$ AHP7. Fmoc : 9-fluorenylmethoxy carbonyl, IB : iodobenzoyl, Mmt : 4-methoxytrityl, OtBu : *O-t*-butyl, Dde : 4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene.

### H-K(IB)WYKDGD-NH<sub>2</sub> (1)

Fmoc-K(Mmt)W(Boc)Y(OtBu)K(Boc)D(OtBu)GD(OtBu)を、ペプチド自動合成機を用い Fmoc 固相合成法により合成した (Mmt : 4-methoxytrityl、OtBu : *O-t*-butyl)。常法により Mmt 基を脱保護後、3-iodobenzoylchloride/*N,N*-diisopropylethylamine/DMF (12/15/100) を加え 1 時間攪拌した。さらに、常法により Fmoc 基を脱保護後、TFA 0.95 ml と、精製水 0.05 ml を加え、4 時間攪拌することにより脱樹脂を行った。得られた未精製体は下記の HPLC 条件により精製を行い、**1** (AHP7) を得た。精製後 MS により生成を確認した。

MS (ESI, pos.)  $m/z$  calcd for C<sub>49</sub>H<sub>62</sub>IN<sub>11</sub>O<sub>13</sub> (M<sup>+</sup>) 1140, found 571, 1140

HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID × 250 mm, 2.5 ml/min, 220 nm, water (0.1%

TFA) : methanol (0.1% TFA) = 80 : 20 (0 min) → 5 : 95 (30 min)

### Fmoc-KWYK(Dde)DGD-NH<sub>2</sub> (2)

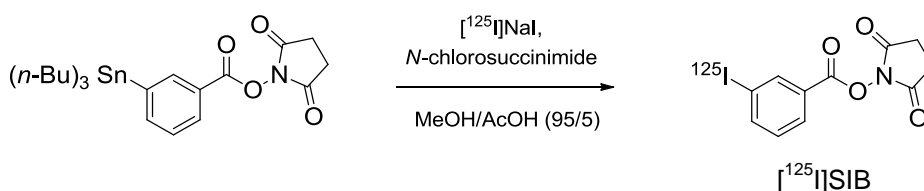
上記と同様に Fmoc 固相合成法により合成後、脱樹脂を行った (Dde : 4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)。得られた未精製体は下記の HPLC 条件により精製を行い、**2** (<sup>125</sup>I]AHP7 標識前駆体) を得た。精製後 MS により生成を確認した。

MS (ESI, pos.) m/z calcd for C<sub>67</sub>H<sub>81</sub>N<sub>11</sub>O<sub>16</sub> (M<sup>+</sup>) 1296, found 1296

HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID × 250 mm, 2.5 ml/min, 220 nm, water (0.1%

TFA) : methanol (0.1% TFA) = 40 : 60 (0 min) → 5 : 95 (40 min)

[<sup>125</sup>I]SIB 合成は、Scheme1-2 に示す方法で行った。



**Scheme 1-2.** Synthesis of [<sup>125</sup>I]SIB.

### [<sup>125</sup>I]N-succinimidyl-3-iodobenzoate ([<sup>125</sup>I]SIB)

N-succinimidyl-3-(tri-n-butylstannyl) benzoate (ATE) をメタノール/酢酸 (95/5) に溶解した (2.0 mg/ml)。また、N-chlorosuccinimide (NCS) をメタノールに溶解した (0.50 mg/ml)。ATE 水溶液 72 μl、NCS 溶液 20 μl、<sup>125</sup>I]NaI (37-370 MBq、0.01 N 水酸化ナトリウム水溶液) を混合し、室温で 30 分攪拌した。3.2 μl の硫酸水素ナトリウム水溶液 (0.72 mg/ml) を添加することで反応を終了させた。反応後下記の HPLC 条件により精製を行い、

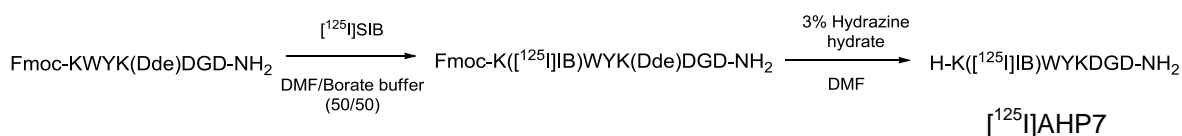


[<sup>125</sup>I]SIB を放射化学的収率 45 ± 4.7%、放射化学的純度 98%以上で得た。

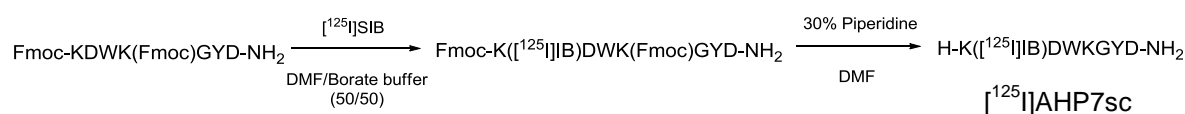
HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID × 250 mm, 1.5 ml/min, 220 nm, water (0.1%

TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 60 : 40 (0 min) → 10 : 90 (15 min)

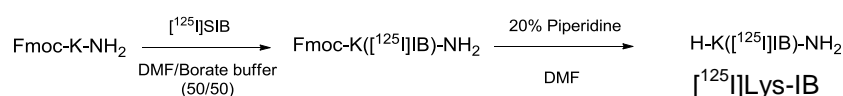
[<sup>125</sup>I]AHP7、[<sup>125</sup>I]AHP7sc、H-K([<sup>125</sup>I]IB)-NH<sub>2</sub> ([<sup>125</sup>I]Lys-IB)の合成は Scheme 1-3 から 1-5 に示す方法で行った。



**Scheme 1-3.** Synthesis of [<sup>125</sup>I]AHP7.



**Scheme 1-4.** Synthesis of [<sup>125</sup>I]AHP7sc.



**Scheme 1-5.** Synthesis of [<sup>125</sup>I]Lys-IB.

### H-K([<sup>125</sup>I]IB)WYKDGD-NH<sub>2</sub> ([<sup>125</sup>I]AHP7)

[<sup>125</sup>I]AHP7 標識前駆体を DMF/0.2 M ホウ酸塩緩衝液 (pH 7.8) (50/50) に溶解後 (13 mg/ml)、本溶液 40 μl と DMF に溶解した [<sup>125</sup>I]SIB (51-110 MBq) 溶液 50 μl を混合した。

トリエチルアミンで pH を 8.5 に調整し、1 時間室温で攪拌した。次に 15  $\mu$ l の hydrazine hydrate/DMF (3/97) を添加して水浴中で 3 時間攪拌し、Dde 基の脱保護を行った。反応後下記の HPLC 条件により精製を行い、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  を放射化学的収率  $36 \pm 12\%$ 、放射化学的純度 98% 以上で得た。

HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 10 ID  $\times$  250 mm, 1.0 ml/min, 220 nm, water (0.1% TFA) : methanol (0.1% TFA) = 90 : 10 (0 min)  $\rightarrow$  5 : 95 (40 min)

#### **H-K( $[^{125}\text{I}]\text{IB}$ )DWKGYD-NH<sub>2</sub> ( $[^{125}\text{I}]\text{AHP7sc}$ )**

$[^{125}\text{I}]\text{AHP7sc}$  標識前駆体と  $[^{125}\text{I}]\text{SIB}$  の反応は上記と同様に行った。Fmoc 基の脱保護は、上記反応液に 20  $\mu$ l の piperidine/DMF (30/70) を加え、室温で 1 時間攪拌することにより行った。反応後下記の HPLC 条件により精製を行い、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7sc}$  を放射化学的収率 54%、放射化学的純度 98% 以上で得た。

HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 4.6 ID  $\times$  150 mm, 1.0 ml/min, 220 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 80 : 20 (0 min)  $\rightarrow$  60 : 40 (40 min)

#### **H-K( $[^{125}\text{I}]\text{IB}$ )-NH<sub>2</sub> ( $[^{125}\text{I}]\text{Lys-IB}$ )**

Fmoc-K-NH<sub>2</sub> を DMF/0.2 M ホウ酸塩緩衝液 (pH 7.8) (50/50) に溶解後 (13 mg/ml)、本溶液 50  $\mu$ l と DMF に溶解した  $[^{125}\text{I}]\text{SIB}$  (51-110 MBq) 溶液 170  $\mu$ l を混合した。トリエチルアミンで pH を 9.0 に調整し、1 時間室温で攪拌した。次に 38  $\mu$ l の piperidine/DMF (20/80) を添加して室温で 1 時間攪拌し、Fmoc 基の脱保護を行った。反応後下記の HPLC 条件により精製を行い、 $[^{125}\text{I}]\text{Lys-IB}$  を放射化学的純度 98% 以上で得た。

HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 4.6 ID  $\times$  150 mm, 1.0 ml/min, 220 nm, water (0.1% TFA) : methanol (0.1% TFA) = 80 : 20 (0 min)  $\rightarrow$  35 : 65 (40 min)

### OxLDL の調製

LDL (Biomedical Technologies 社) は限外濾過フィルターにより 0.1 M PBS 溶液 (pH = 7.4, 4.5 mg/ml) に調製した。LDL 溶液 0.50 ml に、50  $\mu$ l の硫酸銅水溶液 (0.17 mM) を添加し、37 °C で 0、2、4、24、29 時間反応する事で種々の酸化度の OxLDL を得た。反応の停止は ethylenediaminetetraacetic acid 水溶液 (0.30 mM) 添加により行った。調製した OxLDL について、酸化度の指標として一般的な thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 値を TBARS Assay Kit を用いて測定した。調製した OxLDL は更なる酸化を防ぐために冷蔵保存した。

### 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) 前処置 OxLDL の調製

上記と同様の LDL 溶液 0.25 ml に、0.25 ml の platelet activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) 阻害剤、AEBSF 水溶液 (6.0 mM)、0.25 ml の PBS (-) と 50  $\mu$ l の硫酸銅水溶液 (170  $\mu$ M) を添加し、37 °C で 24 時間反応することで AEBSF 前処置 OxLDL を調製した。上記と同様に反応停止後、冷蔵保存した。

### OxLDL 結合性評価

[<sup>125</sup>I]AHP7 と [<sup>125</sup>I]AHP7sc の DMSO/PBS (-) 溶液 (5/95、0.9-3.7、1.0 kBq) 25  $\mu$ l を 0.25 ml の OxLDL 溶液 (40-80 nM、TBARS : 0.85-45 nmols malondialdehyde/mg protein) に添加し、4 °C で 3 時間インキュベートした。反応溶液を Microcon (YM-30、Millipore 社) に添加し、遠心分離 (4,160 g、50 分) 後、PBS (-) 0.10 ml を加え、再度遠心分離した。次に、PBS (-) 0.10 ml を加え、Microcon を上下逆向きにして遠心分離 (1,000 g、10 分) を行い、高分子量画分を回収した。高分子量画分と低分子量画分の放射能を測定し、下記の式に従って結合率を求めた。

結合率 (%) = (高分子量画分放射能) / (高分子量画分放射能 + 低分子量画分放射能 + フィルター上放射能)

また、AEBSF 前処置 OxLDL に対する結合性評価は、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  の DMSO/PBS (-) 溶液 (5/95、1.0 kBq) 25  $\mu\text{l}$  と AEBSF 前処置 OxLDL 溶液 (38 nM、TBARS : 52 nmols malondialdehyde/mg protein) を用い、上記と同様に行った。

また、 $[^{125}\text{I}]\text{Lys-IB}$  の OxLDL に対する結合性評価は、 $[^{125}\text{I}]\text{Lys-IB}$  (1.0 kBq) を用い、上記と同様に行った。

#### インビトロ阻害実験

AHP7 (0.08-40 nmol) を 250  $\mu\text{l}$  の OxLDL 溶液 (40 nM、TBARS : 46 nmols malondialdehyde/mg protein) に添加し、4 °C で 2 時間インキュベートした。次に $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  (1.0 kBq) を添加し、更に 4 °C で 3 時間インキュベート後、上記と同様に結合率を求めた。

#### 動物

動脈硬化モデル動物として WHHLMI (myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic) ウサギ (11-18 ヶ月齢、 $3.0 \pm 0.2$  kg) を、神戸大学医学部附属動物実験施設より譲受し用いた。対照として日本白色種 (JW) ウサギ (3 ヶ月齢、 $2.1 \pm 0.3$  kg) を日本エスエルシー株式会社より購入し用いた。餌は通常餌 (Type CR-3、日本クレア株式会社) を 1 日に 120 g 与え、給水は適時行った。動物実験は、京都大学動物実験委員会の指針を遵守して行った。

### インビトロ血漿中安定性評価

JW ウサギ（雄性、3 ヶ月齢）から採取した血漿 0.10 ml に、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  の DMSO/PBS (-) 溶液 (5/95、11 kBq) 10  $\mu\text{l}$  を添加し、37 °C で 5、30 分間インキュベートした。終了後、メタノール 0.20 ml を加えてボルテックスし、遠心分離した (4,160 g、15 分)。上清をフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ 、Millex-LH、Merck Millipore 社) に通じた後に下記の HPLC 条件で分析した。

HPLC 条件 : COSMOSIL 5C18-AR-II 4.6 ID  $\times$  150 mm、1.0 ml/min、220 nm、water (0.1% TFA) : methanol (0.1% TFA) = 80 : 20 (0 min)  $\rightarrow$  25 : 75 (40 min)

### 体内放射能分布実験

WHHLMI ウサギ（雄性、6 羽）および JW ウサギ（雄性、4 羽）を用いた。麻酔は、ケタミン（ケタラル、35 mg/kg、第一三共株式会社）、キシラジン（セラクタール、5.0 mg/kg、Bayer 社）の混合溶液の筋肉内注射により行った。 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  (3.3-19 MBq) または  $[^{125}\text{I}]\text{AHP7sc}$  (22-29 MBq) を耳静脈より投与し、30 分後に抱水クロラルの過量投与によって安楽死させ、下大静脈から採血を行うとともに大動脈（上行・弓部大動脈、胸部大動脈、腹部大動脈）、肺、心臓、肝臓、腎臓、胃、腸、筋肉を摘出した。大動脈は周囲の脂肪組織や結合組織を除いた後、上行・弓部大動脈を 6 等分、胸部および腹部大動脈をそれぞれ 9 等分に切断し、各断片の重量を測定した。その後、直ちに periodate lysine paraformaldehyde 溶液により組織固定を行い、各臓器とともに放射能と重量を測定した。結果は、下の式に示す Differential uptake ratio (DUR) で表した。

$\text{DUR} = (\text{大動脈断片放射能} / \text{動脈断片重量}) / (\text{投与放射能} / \text{ウサギ体重})$

### インビボ阻害実験

2.0  $\mu\text{mol}$  の AHP7 を DMSO/生理食塩水 (5/95) に溶解し、 $^{125}\text{I}$ AHP7 (15-32 MBq) と同時投与し、上記と同様に体内放射能分布実験を行った。

### Autoradiography (ARG)

上項で摘出した大動脈について、super cryoembedding medium 溶液中にて包埋を行った。ドライアイス-ヘキサン (-78 °C) で凍結後、クリオスタットを用いて厚さ 20  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。得られた組織切片をイメージングプレートに 2 週間露光し、 $^{125}\text{I}$ AHP7 のオートラジオグラムを得た。更に、画像解析ソフトを用いて得られた画像を解析した。

### OxLDL 免疫組織染色

ARG に用いた切片の隣接切片に対し、Azan-Mallory 染色、HE 染色、OxLDL、マクロファージに対する免疫組織染色を行った。Azan-Mallory 染色、HE 染色は、常法に従って施行した。アセトンによる親水化後、10%過酸化水素水と室温で 30 分反応させた。1.0%BSA 含有 100 mM トリス緩衝生理食塩水 (pH = 7.6) と室温で 30 分反応させた後、抗ヒト OxLDL マウスモノクローナル抗体 (3G5、abcam 社)、抗ウサギマクロファージマウスモノクローナル抗体 (RAM11、Dako 社) をそれぞれ 1 次抗体として用い、4 °C で一晩反応させた。2 次抗体として Dako Envision + kit (K4000、Dako 社) を用い、室温で 30 分反応させ、続いて 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride と反応させた。各免疫組織染色では、核の同定のため、ヘマトキシリンによる対比染色を施行した。

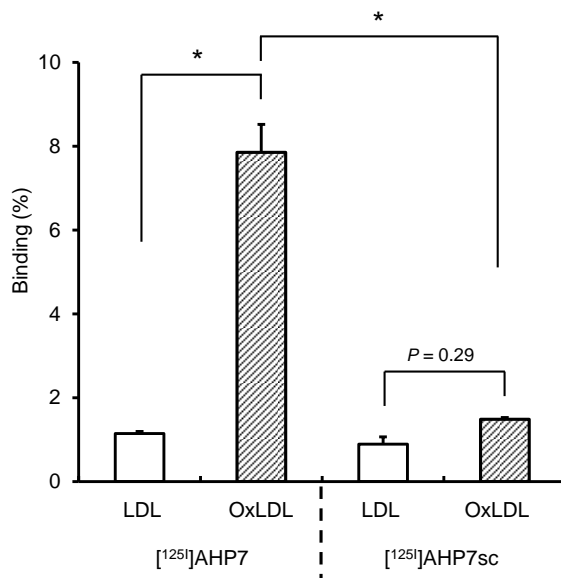
## 統計処理

有意差検定は Mann-Whitney U test により行い、 $P < 0.05$  を有意とした。相関係数は Spearman rank correlation coefficient により解析した。

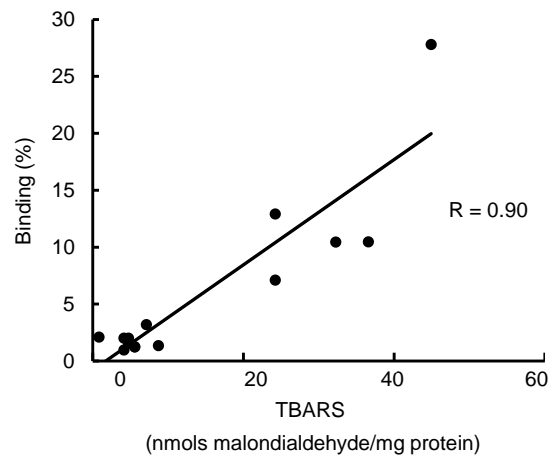
### 1-3 結果

#### OxLDL 結合性評価

[<sup>125</sup>I]AHP7 は LDL に比べ OxLDL に対して、高い結合性を示した。一方、[<sup>125</sup>I]AHP7sc の LDL および、OxLDL への結合率は同程度であった (Figure 1-2)。[<sup>125</sup>I]AHP7 の OxLDL に対する結合率は TBARS 値と高い相関 ( $R = 0.90$ 、 $P < 0.0001$ ) を示した (Figure 1-3)。また、[<sup>125</sup>I]AHP7 の OxLDL に対する結合率は、AHP7 濃度依存的に阻害された (Figure 1-4)。一方で、[<sup>125</sup>I]AHP7 の AEBSF 前処置 OxLDL への結合率は、非処置群に比べ有意に低下した (Figure 1-5)。

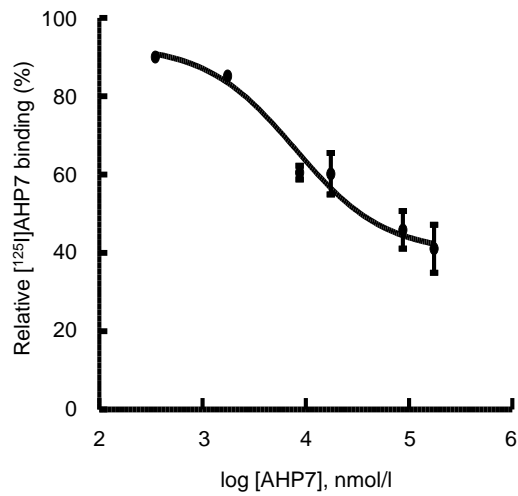


**Figure 1-2.** Binding of [<sup>125</sup>I]AHP7 or [<sup>125</sup>I]AHP7sc to LDL and OxLDL. Data are represented as the mean  $\pm$  S.D. \* $P < 0.0001$ .

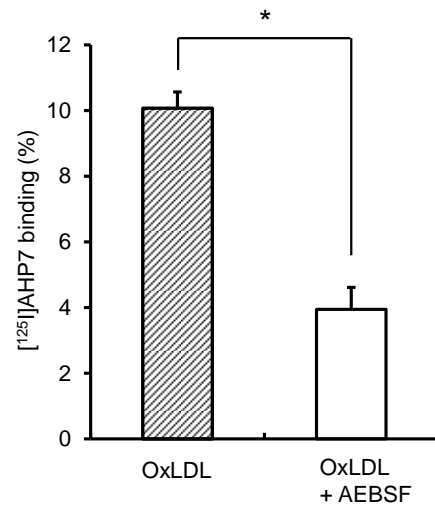


**Figure 1-3.** Correlation between [<sup>125</sup>I]AHP7 binding to OxLDL and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)





**Figure 1-4.** Inhibition of [<sup>125</sup>I]AHP7 binding to OxLDL by nonradioactive AHP7. Data are represented as the mean ± S.D.



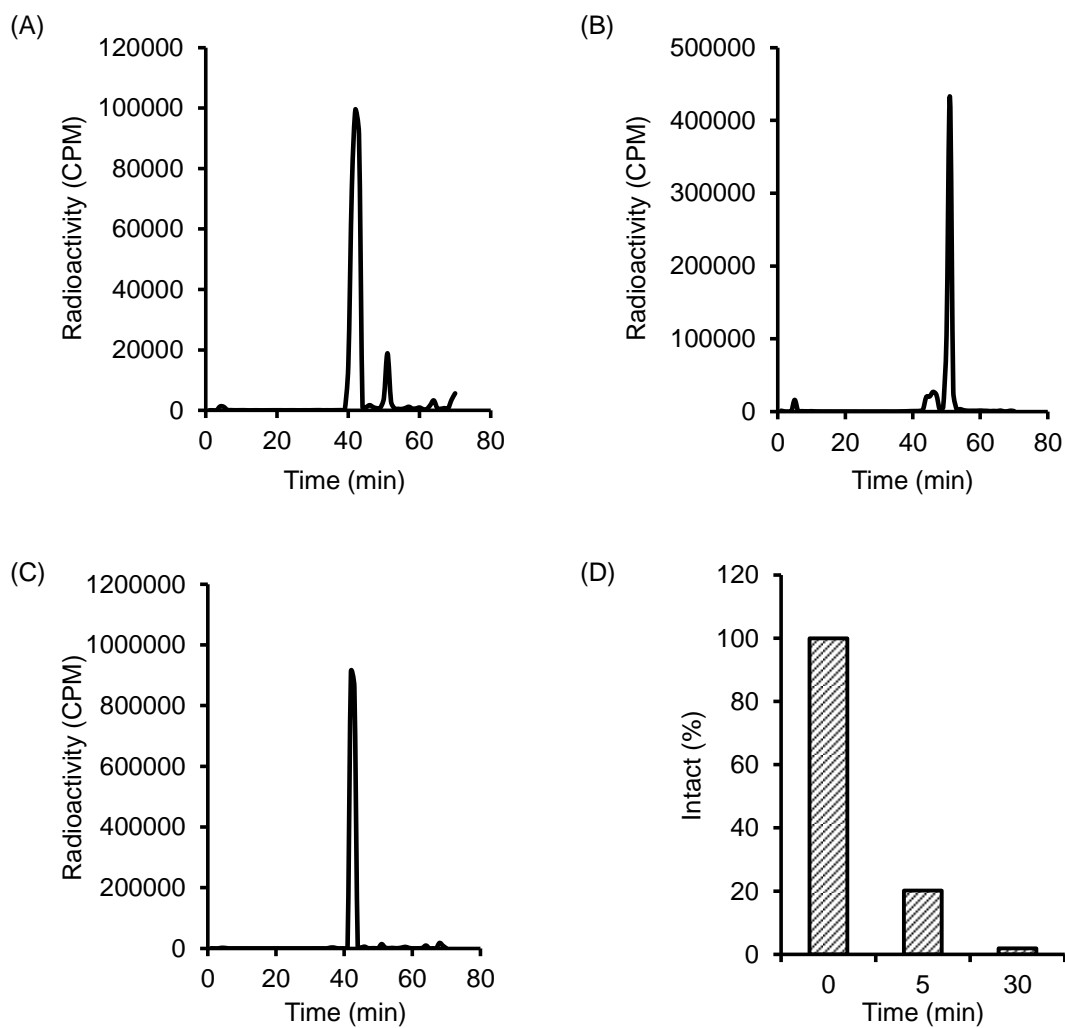
**Figure 1-5.** Binding of [<sup>125</sup>I]AHP7 to OxLDL and AEBSF-pretreated OxLDL. Data are represented as the mean ± S.D. \**P* < 0.05.

### インビトロ血漿中安定性評価

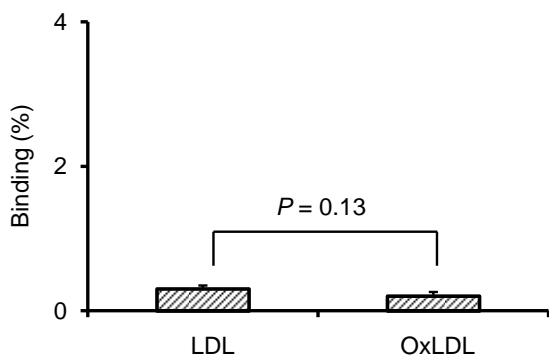
[<sup>125</sup>I]AHP7 は血漿中で経時的な分解が認められ (Figure 1-6 (D))、代謝物のピーク保持時間は [<sup>125</sup>I]Lys-IB の保持時間と一致した (Figure 1-6 (A-C))。

### [<sup>125</sup>I]Lys-IB の OxLDL 結合性評価

[<sup>125</sup>I]Lys-IB の LDL と OxLDL への結合率は同程度であった (Figure 1-7)。



**Figure 1-6.** Analysis of [<sup>125</sup>I]AHP7 at 30 min after incubation in plasma (A). Analysis of [<sup>125</sup>I]AHP7 in saline (B). Analysis of [<sup>125</sup>I]Lys-IB in saline (C). Percentage of unchanged [<sup>125</sup>I]AHP7 (D).



**Figure 1-7.** Binding of [<sup>125</sup>I]Lys-IB to LDL and OxLDL. Data are represented as the mean ± S.D.

## 体内放射能分布実験

[<sup>125</sup>I]AHP7 の WHHLMI ウサギ大動脈への放射能集積量は、正常ウサギ大動脈への集積と比較して、約 3 倍であった。また、[<sup>125</sup>I]AHP7 の WHHLMI ウサギにおける放射能集積量の動脈血液比、動脈筋肉比は、正常ウサギと比較して有意に高い値を示した。加えて、[<sup>125</sup>I]AHP7sc と比較しても、WHHLMI ウサギ大動脈への放射能集積量、対筋肉比は有意に高かった (Table 1-1)。一方、他臓器への放射能集積は、排泄臓器である腎臓に高い腎集積を示した他は、目立った集積は認められなかった (Table 1-2)。

**Table 1-1.** Radioactivity accumulation levels in aortic segments in WHHLMI and control rabbits at 30 min after the injection of [<sup>125</sup>I]AHP7 or [<sup>125</sup>I]AHP7sc.

	[ <sup>125</sup> I]AHP7		[ <sup>125</sup> I]AHP7sc	
	WHHLMI	Control	WHHLMI	Control
Aorta (DUR)	0.58 ± 0.24 <sup>#, §</sup>	0.21 ± 0.07	0.34 ± 0.06	0.25 ± 0.08
Aorta / Blood	0.41 ± 0.14 <sup>†</sup>	0.32 ± 0.10	0.45 ± 0.08	0.40 ± 0.13
Aorta / Muscle	3.47 ± 1.04 <sup>#, §</sup>	1.98 ± 0.64	2.11 ± 0.67	1.73 ± 0.60

Data are represented as the mean ± S.D. *Aorta / Blood* aorta to blood ratio, *Aorta / Muscle* aorta to muscle ratio. <sup>#</sup>*P* < 0.0001 vs. control group, <sup>†</sup>*P* < 0.001 vs. control group, <sup>§</sup>*P* < 0.0001 vs. <sup>125</sup>I-AHP7sc group.

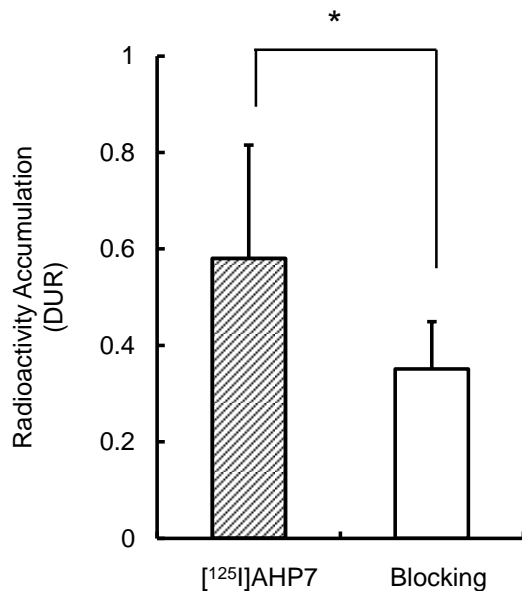
**Table 1-2.** Radioactivity accumulation levels (DUR) in tissues at 30 min after the injection of [<sup>125</sup>I]AHP7 or [<sup>125</sup>I]AHP7sc.

	[ <sup>125</sup> I]AHP7		[ <sup>125</sup> I]AHP7sc	
	WHHLMI <sup>a</sup>	Control <sup>b</sup>	WHHLMI <sup>b</sup>	Control <sup>b</sup>
Blood	1.40 ± 0.24	0.66	0.74	0.62
Muscle	0.17 ± 0.06	0.11	0.17	0.15
Heart	0.94 ± 0.65	0.50	0.33	0.24
Lung	1.83 ± 0.49	0.90	0.61	0.28
Stomach	0.53 ± 0.21	0.29	0.57	0.29
Kidney	36.0 ± 7.78	25.80	30.86	22.17
Liver	2.06 ± 0.51	0.97	1.02	0.71
Intestine	0.60 ± 0.32	0.37	0.34	0.22

Data are represented as the mean ± S.D. <sup>a</sup>n=4, <sup>b</sup>n=2

### インビボ阻害実験

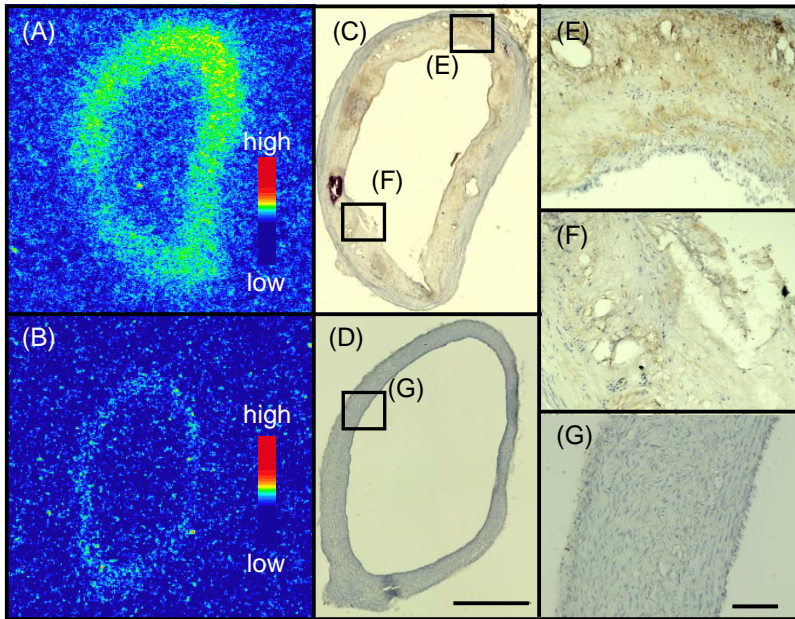
AHP7 同時投与群の大動脈への放射能集積は通常群の約 60%と有意に低下した (Figure 1-8)。



**Figure 1-8.** Radioactivity accumulation levels in aortic segments in WHLMI rabbits at 30 min after the injection of [<sup>125</sup>I]AHP7 or [<sup>125</sup>I]AHP7 with 2 μmol AHP7. Data are represented as the mean ± S.D. \**P* < 0.0001.

### ARG、OxLDL 免疫組織染色

ARG の結果、[<sup>125</sup>I]AHP7 の大動脈切片中放射能分布は不均一であり、WHLMI ウサギ大動脈の肥厚した内膜部位に高い放射能集積が認められた (Figure 1-9 (a))。隣接切片における抗 OxLDL 抗体による免疫組織染色の結果、同様に内膜に高い発現が認められた (Figure 1-9 (c))。放射能集積の高い部位では、OxLDL の発現が高い一方で (Figure 1-9 (a, e))、放射能集積の低い部位では、OxLDL の発現も低かった (Figure 1-9 (a, f))。一方、正常ウサギ大動脈においては内膜肥厚および OxLDL 発現が全く認められず、[<sup>125</sup>I]AHP7 の放射能集積も同様に認められなかった (Figure 1-9 (b, d, e))。



**Figure 1-9.** Regional distribution of radioactivity at 30 min after the injection of  $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  (A and B). OxLDL immunohistochemical staining of adjacent sections to A (C, E and F) and B (D and G). High magnification images of OxLDL immunohistochemical staining in regions detected in C and D (E-G). Bar = 1 mm (C and D) and 100 mm (E-G)

#### 1-4 考察

本章では、動脈硬化プラークの不安定化と関連する OxLDL を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発について検討した。OxLDL 標的核医学分子イメージングプローブとして、放射性ハロゲン核種であり、SPECT に適した線質の放射線を放出する  $^{123}\text{I}$  を [ $^{123}\text{I}$ ]iodobenzoyl 基として導入することで [ $^{123}\text{I}$ ]AHP7 を設計した。

ところで、不安定プラークには安定プラークと比較して約 20 倍の、血漿中と比べても約 70 倍の OxLDL が蓄積していると報告されている。加えて、プラーク内においては泡沫細胞内と細胞外基質領域の両方に存在することから、ペプチドを母体とする [ $^{125}\text{I}$ ]AHP7 であっても容易に OxLDL に到達可能であると考えられる。これらのことから、OxLDL は動脈硬化プラークの不安定性を評価するためのイメージング標的として有効であると考えられる。OxLDL の酸化の程度も分子プローブの集積には影響する。この指標としては一般的に TBARS 値が用いられるが、動脈硬化プラークにおいては、約 40 nmols malondialdehyde/mg protein まで様々な酸化度の OxLDL が存在し、また、酸化ストレスは動脈硬化プラークの進行につれて増大することが知られている。今回の実験結果から、[ $^{125}\text{I}$ ]AHP7 の OxLDL に対する結合率は TBARS 値と正の相関を示したことから、本化合物は動脈硬化プラークの進行の程度を評価できるものと考えられる。

また、本プローブの母体化合物である Asp-hemolysin は OxLDL 中のリゾホスファチジルコリン (Lyso-PC) を認識している可能性が報告されているため、本プローブの結合部位が同様に Lyso-PC であるかを検討した。LDL を構成するリン脂質の内、ホスファチジルコリン (PC) は 2/3 を占めるが、酸化の過程で、酸化 PC の *sn*-2 アシル基は PAF-AH により加水分解され、Lyso-PC になる。PAF-AH 阻害剤である AEBSF を用いた検討により、[ $^{125}\text{I}$ ]AHP7 が、母体化合物である Asp-hemolysin と同様に OxLDL 中の

Lyso-PC を認識している可能性が示された。一方、LDL1 分子中には約 450 個の PC が存在し、Lyso-PC は PC に比較して僅かな量しか存在しないが、OxLDL においては約 40-50% の PC が Lyso-PC に変換されることから、約 200 個の Lyso-PC が OxLDL 中に存在すると推測される。 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  の OxLDL に対する結合率が AHP7 により完全に阻害されなかった理由は、このように結合部位が多数存在することに由来するものと考えられる。また、OxLDL は多種の脂質やリポタンパク質の複合体であり、均一分子ではなく、同時に Lyso-PC の含有量にも幅があることから、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  の OxLDL に対する定量的な親和性を算出することはできなかった。

本研究において、動脈硬化モデル動物として WHHLM1 ウサギを用いた。本モデルは、塩見らにより開発された動脈硬化の自然発症モデル動物であり、大動脈にヒト動脈硬化と類似した病変を有し、かつ病変の程度に多様性を有する。本研究では、臨床における不安定プラークのイメージングを最終目標とする観点から本モデル動物を選択した。

$[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  は WHHLM1 ウサギ大動脈に高く集積し、また、大動脈切片中の放射能分布は OxLDL の分布と一致する傾向にあった。

一方、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  は血漿中での安定性が低いことが示され、徐々に  $[^{125}\text{I}]\text{Lys-IB}$  に代謝されていることが示唆された。しかし、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  が  $[^{125}\text{I}]\text{AHP7sc}$  と比較して WHHLM1 ウサギ大動脈に高く集積したこと、加えて、 $[^{125}\text{I}]\text{Lys-IB}$  が OxLDL への結合性を示さなかったことから、 $[^{125}\text{I}]\text{AHP7}$  は投与後早期に動脈硬化プラーク中の OxLDL を認識、集積している可能性が示された。

OxLDL を標的とした核医学分子イメージングプローブとして、malondialdehyde-modified LDL に対する抗体を母体とした  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{MDA2}$  が報告されている。本プローブは MDA-LDL を後から投与することで血中の残存  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{MDA2}$  を除去することによりモデル動物で動脈硬化プラークの描出に成功している。しかし、抗体を母体としたプローブ

は、免疫原性を有する可能性があり、また、安全な製造法確立に困難を伴うため、臨床応用のハードルが高いという問題がある。一方でペプチドを母体としたプローブは、純化学合成的に製造可能であり、低免疫原性であることから、臨床応用の点で有利であると考えられる。加えて、 $^{125}\text{I}$ AHP7 の投与 30 分後における血中残存放射能は、抗体プローブの投与後 24 時間後における血中残存放射能の約 1/3 であり、早い血液クリアランスという特徴が示されることから、投与後早期にイメージングが可能であり、被曝を軽減できるという点で、抗体プローブに対する利点であると考えられる。

動脈硬化プラークは、炎症系サイトカイン、マクロファージ、アポトーシス細胞、マトリックスメタロプロテアーゼなど、様々な構成因子から成り立つことから、これらの分子を標的とした多種多様な核医学分子イメージングプローブがこれまでに開発されている。この内、 $^{18}\text{F}$ fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ FDG) と  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ annexin A5 が有望なプローブとして臨床試験がなされている。 $^{18}\text{F}$ FDG は増殖の盛んな細胞に取り込まれるプローブであるため、マクロファージにも取り込まれ、動脈硬化プラークに高く集積するが、心筋にも高く集積するために冠動脈イメージングに適用が困難であるという問題点を有する。一方、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ annexin A5 はアポトーシスイメージングプローブであり、 $^{18}\text{F}$ FDG に比較して、より進行した動脈硬化プラークに選択的であるとされているが、本研究において、 $^{125}\text{I}$ AHP7 の WHHLM I ウサギ大動脈への放射能集積量は  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ annexin A5 と同程度であったことから、 $^{125}\text{I}$ AHP7 は動脈硬化プラークを標的とした核医学分子イメージングプローブとして有効である可能性が示された。

以上、本章では  $^{123}\text{I}$ AHP7 を設計し、インビトロにおいて、 $^{125}\text{I}$ AHP7 が OxLDL に対する選択的な親和性を保持していること、また、OxLDL への結合率は LDL の酸化度と関連し、結合部位が OxLDL 中の Lyso-PC であることを示した。また、インビボにおいて、WHHLM I ウサギ大動脈に高く集積し、かつその集積が過剰量の非標識体により有



意に阻害されること、更に、大動脈切片中放射能分布と OxLDL の分布が一致する傾向にあることを示した。これらの結果より、 $^{123}\text{I}$ AHP7 が不安定性動脈硬化プラークにおける OxLDL を標的とした核医学分子イメージングプローブとなりうることを明らかとした。

## 第 2 章

### 脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質を標的とした 核医学がん分子イメージングのための放射性フッ素標識 トリアゾロピリミジン誘導体の開発

がんは、先進国の最大の死因であるが、がん細胞を取りまく周辺細胞群が、がんの増殖・転移に影響を与えることが広く知られている。その中でも、肥満人口の増加に伴い、がん周囲に存在する脂肪細胞(cancer associated adipocytes, CAA)の働きが近年着目されている。肥満はがんのリスクファクターであり、肥満ががん増殖に与える影響には、insulin-like growth factor (IGF-1)や、レプチン、アディポネクチンに代表されるアディポカインを介する全身性の作用に加えて、CAA のがん細胞に直接的な作用も存在する。これまでに、脂肪細胞と共培養することでがんの増殖能、転移能が亢進すること、また、脂肪細胞から分泌されるサイトカインや脂肪酸ががん細胞の形質に影響を与えることが明らかになっているが、この直接的な相互作用については未だ十分に解明されていない。よって、がんと脂肪組織の境界領域におけるこれらの相互作用に関与する因子の評価が求められている。

ところで、脂肪酸結合タンパク質(FABP)は細胞内の脂質輸送に携わる細胞内タンパク質であり、脂質蓄積、シグナル伝達、膜合成等に関与している。中でも脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質(FABP4)は、PI3K/Akt シグナルの抑制を介して脂肪細胞のインスリン感受性を低下させることにより脂質異常症やインスリン抵抗性に関与する一方で、JNK1 の活性化を介して tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、interleukin 1 $\beta$ 、monocyte chemoattractant protein1 (MCP-1) 等の炎症性サイトカインの産生を亢進する機能を有する。FABP4 欠損マウスにおいて移植がんの成長速度、転移能が低下し、また、脂肪細胞からがん細胞への脂肪酸の移行が FABP4

阻害剤により抑制されることが報告されており、加えて、一部のがん細胞においては、脂肪細胞と相互作用することで、がん細胞自体における FABP4 の発現も誘導される。

このように、がん微小環境に存在する CAA に発現する FABP4 は、CAA とがん細胞の代謝的な相互作用において、重要な役割を担っていることから、FABP4 をイメージングすることができれば、がんと脂肪組織の境界領域における病態評価や治療薬開発に有用であると考えられる。一方、細胞内タンパク質である FABP4 を標的とすることから、受動拡散により細胞膜の通過が可能な低分子化合物がプローブ母体化合物として適する。加えて、導入する放射性同位元素が母体化合物の特性に与える影響は最小限であるべきである。放射性ハロゲン核種は、第一章で述べたように、母体骨格に直接導入することが可能であり、加えて、母体化合物のハロゲン元素の位置を標識部位とすることで、母体化合物への影響を最小限にすることが可能であると考えられる。

以上より、本章では FABP4 を標的とした放射性ハロゲン標識新規核医学分子イメージングプローブの開発を計画した。

FABP4 を標的とした放射性ハロゲン標識新規核医学分子イメージングプローブとして、FABP4 選択的阻害剤であるトリアゾロピリミジン骨格を有する化合物を母体化合物として、これに陽電子放出断層撮影法 (PET) に適した放射線物理学的性質を有する放射性フッ素 ( $^{18}\text{F}$ ) を導入した、 $^{18}\text{F}$  標識化合物を設計した。

得られた化合物について、1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid を FABP4 結合性蛍光リガンドとする阻害実験の結果、 $^{18}\text{F}$  標識化合物は FABP4 へ高い結合親和性を示した。また、FABP4 発現細胞への取り込みを調べたところ、高い取り込みが認められた。そこで、担がんマウスを用いて  $^{18}\text{F}$  標識化合物の体内放射能分布実験を行ったところ、腫瘍組織塊への放射能集積、および、イメージングの指標となる腫瘍対筋肉放射能集積比の経時的な上昇が認められた。また、摘出腫瘍切片における放射能分布は FABP4 免疫染

色の分布と一致する傾向を示した。さらに、インビボイメージング実験を行ったところ、腫瘍の描出が可能であった。

以上の結果から、本  $^{18}\text{F}$  標識化合物が脂肪細胞とがん細胞の代謝的な相互作用において重要な FABP4 を標的とした核医学がん分子イメージングプローブとなる可能性が示された。