# 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

## $2\ 0\ 1\ 3$

## 西郡 寬太郎

緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
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・・・・・・・・・・・・・・・ 4
プローブ設計 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17
考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
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・・・・・・・・・・ 27
第1節 脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質標的核医学分子イメージングプローブとしての
放射性ヨウ素標識化合物の設計と評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
プローブ設計 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 29
実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31
結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45
考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 49
第2節 脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質標的核医学分子イメージングプローブとしての
放射性フッ素標識トリアゾロピリミジン誘導体の設計と評価・・・・・・・・ 51
プローブ設計 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 52
実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53
結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 65
考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 73

結語 •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	75
引用文南	ť	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	77
謝辞 ·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	82

緒言

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 イメージング領域において、放射性ハロゲン核種は、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 を有すること、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な核種 であることなどの理由から、その利用が注目されている。

一方、近年我が国では食の欧米化とそれに伴う肥満人口の増加および高齢化によって、 動脈硬化症を背景疾患とした心疾患・脳血管疾患、および、種々のがんによる死亡率は 上昇の一途を辿っており、動脈硬化症やがんの性状を対象とした非侵襲的な画像診断の 重要性は益々高まっている[1]。

そこで本研究では、動脈硬化プラークの主構成要素でありプラーク内蓄積量がプラー クの不安定性と相関する酸化低密度リポタンパク質(OxLDL)[2,3]、がん周囲に存在 する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役割を担う脂肪細胞型脂 肪酸結合タンパク質(FABP4)に着目して[4]、これらを標的とする核医学分子イメージ ングは動脈硬化症、がんの病態評価、さらには、これらの因子を標的とする治療薬開発 に有効な評価法を提供するものと考え、OxLDL、FABP4を標的とした、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

まず、OxLDL を標的とする核医学分子イメージングのためには、OxLDL に高い親和 性を有するタンパク質 Asp-hemolysin に着目し[5, 6]、OxLDL に結合する部位のアミノ 酸配列に、標識核種として単光子放出断層撮影法(SPECT)に適した放射線物理学的性 質を有する放射性ヨウ素(<sup>123</sup>I)を導入したペプチド性核医学分子プローブ [<sup>123</sup>I]Asp-hemolysin derived peptide probe([<sup>123</sup>I]AHP7)の開発を計画した。そこで、基礎 実験には<sup>123</sup>Iより半減期が長く取り扱いの容易な<sup>125</sup>Iを用いることとし、[<sup>125</sup>I]AHP7 お よび、陰性対照プローブとして[<sup>125</sup>I]AHP7scramble([<sup>125</sup>I]AHP7sc)を合成し、OxLDLへ の結合性をインビトロ結合実験によって評価した。その結果、[1251]AHP7はLDLと比べ OxLDL に高い結合性を示し、その結合部位が OxLDL 中のリゾホスファチジルコリンで あることが示された。そこで、動脈硬化モデル動物である myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic ウサギ (WHHLMI ウサギ) と正常ウサギを用い、体内 放射能分布実験を行った。その結果、[<sup>125</sup>I]AHP7のWHHLMIウサギ大動脈への放射能 集積は、正常ウサギ大動脈への集積、あるいは、[<sup>125</sup>I]AHP7sc の WHHLMI ウサギ大動 脈への集積と比較して高い値を示した。さらに、[<sup>125</sup>I]AHP7 の WHHLMI ウサギ大動脈 への放射能集積は過剰量の AHP7 同時投与により低下し、大動脈切片における放射能分 布は隣接切片の OxLDL 免疫染色の分布と一致する傾向を示した。以上の結果から、 [<sup>123</sup>I]AHP7 が動脈硬化の不安定化と関連する OxLDL を標的とした核医学動脈硬化分子 イメージングプローブとなる可能性が示された。

また、FABP4 を標的とする核医学分子イメージングのためには、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[7]、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(<sup>18</sup>F) を導入した、5-[{3-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethoxy)phenoxy}methyl]-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a] pyrimidin-7(4*H*)-one([<sup>18</sup>F]FTAP1)を設計した。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、FTAP1 は FABP4 へ高い結合親和性 を示した。また、[<sup>18</sup>F]FTAP1 の 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[<sup>18</sup>F]FTAP1 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は経時的に上昇し、摘出腫瘍切片における放射能分布は、隣接切片 の脂肪細胞存在領域に認められる FABP4 免疫染色の分布と一致する傾向を示した。さ らに、担がんマウスに[<sup>18</sup>F]FTAP1 を静脈内投与して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、[<sup>18</sup>F]FTAP1 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。

以上、本研究は、動脈硬化症とがんの病態に関与する因子を標的とした放射性ハロゲ ン標識核医学分子イメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものであり、こ れらの知見は、動脈硬化症とがんの病態評価、新規治療薬開発に有益な情報を提供する ものと考えられる。

これらの結果について、以下に詳述する。

#### 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[1]。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[8,9]。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[10]。

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[11]。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[2]。

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[5]、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[6]。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 $\epsilon$ 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、<sup>123</sup>Iを選択した。<sup>123</sup>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、[<sup>123</sup>I]Asp-hemolysin derived peptide probe (H-K([<sup>123</sup>I]IB)WYKDGD-NH<sub>2</sub>、[<sup>123</sup>I]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[<sup>123</sup>I]AHP7scramble (H-K([<sup>123</sup>I]IB)DWKGYD-NH<sub>2</sub>、[<sup>123</sup>I]AHP7sc)を 設計した (Figure 1-1)。なお、この実験には、<sup>123</sup>I の代わりに半減期が長く取り扱いの 容易な<sup>125</sup>Iを用いて行った。



[<sup>123</sup>I]AHP7scramble

**Figure 1-1.** The chemical structure of [<sup>123</sup>I]AHP7 and [<sup>123</sup>I]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 (Tl) 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。[<sup>125</sup>I]NaI は MP Biomedicals 社より購入した。

AHP7、[<sup>125</sup>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> (AHP7sc)、Fmoc-KDWK(Fmoc)GYD-NH<sub>2</sub> ([<sup>125</sup>I]AHP7sc 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 [<sup>125</sup>I]AHP7. Fmoc : 9-fluorenylmethyloxy 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) =  $80 : 20 (0 \text{ min}) \rightarrow 5 : 95 (30 \text{ min})$ 

#### 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)  $\rightarrow$  5: 95 (40 min)

[<sup>125</sup>I]SIB 合成は文献 12 を参考に、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) =  $60 : 40 (0 \text{ min}) \rightarrow 10 : 90 (15 \text{ min})$ 

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



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

## $H-K([^{125}I]IB)WYKDGD-NH_2([^{125}I]AHP7)$

[<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 μl 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、[<sup>125</sup>I]AHP7 を放射化学的収率 36±12%、放射化 学的純度 98%以上で得た。

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

## H-K([<sup>125</sup>I]IB)DWKGYD-NH<sub>2</sub> ([<sup>125</sup>I]AHP7sc)

[<sup>125</sup>I]AHP7sc 標識前駆体と[<sup>125</sup>I]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 μl 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、[<sup>125</sup>I]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 × 150 mm, 1.0 ml/min, 220 nm, water (0.1% TFA): acetonitrile (0.1% TFA) = 80: 20 (0 min) → 60: 40 (40 min)

#### H-K([<sup>125</sup>I]IB)-NH<sub>2</sub> ([<sup>125</sup>I]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 µl と DMF に溶解した[<sup>125</sup>I]SIB (51-110 MBq) 溶液 170 µl 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 µl 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、[<sup>125</sup>I]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 × 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)

#### <u>OxLDL の調製</u>

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 µl の硫酸銅水溶液 (0.17 mM) を添加し、37 ℃ 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。

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

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 µl の硫酸銅水溶 液(170 µM) を添加し、37 ℃ 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 µl を 0.25 ml の OxLDL 溶液(40-80 nM、TBARS : 0.85-45 nmols malondialdehyde/mg protein)に添 加し、4 ℃ 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、[<sup>125</sup>I]AHP7 の DMSO/PBS (-) 溶液 (5/95、1.0 kBq) 25 µl 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、[<sup>125</sup>I]Lys-IB の OxLDL に対する結合性評価は、[<sup>125</sup>I]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 µl の OxLDL 溶液 (40 nM、TBARS : 46 nmols malondialdehyde/mg protein)に添加し、4 ℃ で 2 時間インキュベートした。次に[<sup>125</sup>I]AHP7 (1.0 kBq) を添加し、更に4 ℃ 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±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±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 120g 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、[<sup>125</sup>I]AHP7 の DMSO/PBS (-)溶液 (5/95、11 kBq) 10 µl を添加し、37 ℃ 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 µm、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 × 150 mm、1.0 ml/min、220 nm、water (0.1% TFA): methanol (0.1% TFA) = 80: 20 (0 min) → 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(ケタラール、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。[<sup>125</sup>I]AHP7 (3.3-19 MBq) または[<sup>125</sup>I]AHP7sc (22-29 MBq)を耳静脈より投与し、30 分後に抱水クロラールの過 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。 DUR = (大動脈断片放射能/動脈断片重量)/(投与放射能/ウサギ体重)

#### インビボ阻害実験

2.0 μmol の AHP7 を DMSO/生理食塩水 (5/95) に溶解し、[<sup>125</sup>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 ℃) で凍結後、クリオスタットを用いて厚さ 20 µm 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、 [<sup>125</sup>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 ℃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  $[^{125}I]AHP7$  or  $[^{125}I]AHP7sc$  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  $[^{125}I]$ AHP7 binding to OxLDL by nonradioactive AHP7. Data are represented as the mean  $\pm$  S.D.

**Figure 1-5.** Binding of  $[^{125}I]$ AHP7 to OxLDL and AEBSF-pretreated OxLDL. Data are represented as the mean  $\pm$  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  $[^{125}I]$ Lys-IB to LDL and OxLDL. Data are represented as the mean  $\pm$  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 集積量の大動脈血液比、大動脈筋肉比は、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]A	HP7	[ <sup>125</sup> I]A	HP7sc
	WHHLMI	Control	WHHLMI	Control
Aorta (DUR)	0.58 ± 0.24 <sup>#, §</sup>	0.21 ± 0.07	$0.34 \pm 0.06$	0.25 ± 0.08
Aorta / Blood	$0.41 \pm 0.14^{\dagger}$	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.  ${}^{\#}P < 0.0001$  vs. control group,  ${}^{\dagger}P < 0.001$  vs. control group,  ${}^{\$}P < 0.0001$  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]AI	HP7	[ <sup>125</sup> I]AH	IP7sc
	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

are represented as the

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 WHHLMI rabbits at 30 min after the injection of  $[^{125}I]AHP7$  or  $[^{125}I]AHP7$  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、WHHLMI 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  $[^{125}I]AHP7$  (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<sup>123</sup>Iを[<sup>123</sup>I] iodobenzoyl 基として導入することで[<sup>123</sup>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[13]。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 [<sup>125</sup>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[14]、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[15, 16]。 今回の実験結果から、[<sup>125</sup>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[17]、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[11]。PAF-AH 阻害剤である AEBSF を

23

用いた検討により、[<sup>125</sup>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[18]。[<sup>125</sup>I]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、[<sup>125</sup>I]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 WHHLMI 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[19]。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。[<sup>125</sup>I]AHP7 は WHHLMI 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、[<sup>125</sup>I]AHP7 は血漿中での安定性が低いことが示され、徐々に[<sup>125</sup>I]Lys-IB に代謝
されていることが示唆された。しかし、[<sup>125</sup>I]AHP7 が[<sup>125</sup>I]AHP7sc と比較して WHHLMI
ウサギ大動脈に高く集積したこと、加えて、[<sup>125</sup>I]Lys-IB が OxLDL への結合性を示さな
かったことから、[<sup>125</sup>I]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[<sup>99m</sup>Tc]MDA2 が報告されている[20]。本プローブは MDA-LDL を後から投与することで血中の残存[<sup>99m</sup>Tc]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[21]。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、[<sup>125</sup>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[22]、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 [23]。この内、[<sup>18</sup>F]fluorodeoxyglucose ([<sup>18</sup>F]FDG) と[<sup>99m</sup>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。[<sup>18</sup>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[24]、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[25]。一方、[<sup>99m</sup>Tc]annexin A5 はアポトーシスイメージングプローブであり、 [<sup>18</sup>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 [26]、本研究において、[<sup>125</sup>I]AHP7 の WHHLMI ウサギ大動脈への放射能集積量は [<sup>99m</sup>Tc]annexin A5 と同程度であったことから[27]、[<sup>125</sup>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[<sup>123</sup>I]AHP7 を設計し、インビトロにおいて、[<sup>125</sup>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 相関し、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、WHHLMI 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、[<sup>123</sup>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[28]。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 [29]。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[29、30]。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[31]、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 [32]、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[33]。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[4, 34]。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 [31]。

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、まず実験の容易な放射性ヨウ素標識化合物を設計・評価し、その結果を基盤に、より有効な放射性フッ素標識化合物を設計し、その有効性を評価した。

#### 第1節

# 脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質標的核医学分子イメージングプローブとしての 放射性ヨウ素標識化合物の設計と評価

#### 2-1-1 プローブ設計

FABP4 選択的阻害剤として、これまでに Sulsly らの報告を含め多数の化合物が報告されて いる[7,35-39]。そこで、FABP4 を標的とした新規核医学分子イメージングプローブを開発する ために、まず、プローブ候補化合物の探索を行うことを計画した。プローブ設計に当たり、その 母体化合物として、報告されている阻害剤の内、高い FABP4 親和性を示すものを選択し、放 射性核種には、ハロゲン元素の核種で、低分子化合物への導入が容易な、<sup>123</sup>Iを選択した。 導入位置は、母体化合物の FABP4 親和性に与える影響を最小限にするために、各化合物の ハロゲン原子部位とした。

これらを背景として、アニリド骨格を有する 2-[[2-{(3-chloro-[<sup>123</sup>I]5-iodophenyl)amino}-2oxoethyl]thio]acetic acid([<sup>123</sup>I]P1)、*N*-(3-chloro-[<sup>123</sup>I]5-iodophenyl)-2-[{2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl}thio]acetamide([<sup>123</sup>I]P2)、2-[{(1*H*-tetrazol-5-yl)methyl}thio]-*N*-(3-chloro-[<sup>123</sup>I]5iodophenyl)acetamide([<sup>123</sup>I]P3)、ピリミジン骨格を有する 2-{([<sup>123</sup>I]4-iodobenzyl)amino}-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-ol([<sup>123</sup>I]P4)、インドール骨格を有する 3-{([<sup>123</sup>I]5-iodo-1*H*-indol-1-yl)sulfonyl}thiophene-2-carboxylic acid([<sup>123</sup>I]P5)、また、トリアゾロピリミジン骨格を有する 5-[{([<sup>123</sup>I]5-iodo-2-methoxy-phenyl)amino}methyl]-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7 (4H)-one([<sup>123</sup>I]P6)、5-{([<sup>123</sup>I]3-iodophenoxy)methyl}-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7 (4H)-one([<sup>123</sup>I]P7、[<sup>123</sup>I]Triazolopyrimidine derivative-1([<sup>123</sup>I]TAP1))を設計した(Figure 2-1-1)。



**Figure 2-1-1.** The chemical structure of [<sup>123</sup>I]P1, [<sup>123</sup>I]P2, [<sup>123</sup>I]P3, [<sup>123</sup>I]4, [<sup>123</sup>I]P5, [<sup>123</sup>I]P6 and [<sup>123</sup>I]P7 ([<sup>123</sup>I]TAP1).

#### 2-1-2 実験方法

#### 試薬・機器

<sup>1</sup>H-NMR は JNM-AL400, JEOL JNM-LA500(日本電子株式会社)を用い、内部標準物 質として tetramethylsilane (TMS)を用いて行った。中圧分取クロマトグラフィーは Silica Gel 60N (関東化学株式会社)を用いた。薄層クロマトグラフィー (TLC) は Kieselgel 60 F-254 plates (Merck 社)を用いた。分取用 TLC (PTLC) は Silica gel 60 F-254 plate (0.5 mm、 Merck 社)を用いた。反応に用いた無水溶媒は、常法に従い無水としたものを用いた。 蛍光強度の測定には Infinite M200 PRO (Tecan 社)を用いた。Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) には PAMPA plate system (BD Biosciences 社)を用いた。 細胞を観察する顕微鏡は BZ9000(KEYENCE 社)を用いた。超音波破砕装置は (vivra-cell、 Sonics & Materials 社)を用いた。ウェスタンブロッティング用の発光検出装置は Chem Doc XRS (Bio-Rad 社)を用いた。その他の試薬は、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。

#### 細胞

3T3-L1 細胞株は ATCC より 譲受した。3T3-L1 細胞株の培地には 10% fetal bovine serum 含有 DMEM を用いた。培地にはグルタミン(1 mM)、ペニシリン(50 U/mL)、ストレ プトマイシン(50 µg/mL)を混合し、37℃、5.0% CO2環境下にて培養した。

#### 合成

P1-P7、[<sup>125</sup>I]TAP1 標識前駆体の合成は Scheme 2-1-1 から 2-1-3 に示す方法で行った。



Scheme 2-1-1. Synthesis of P1, P2 and P3.



Scheme 2-1-2. Synthesis of P4, P5, P6 and P7.



Scheme 2-1-3. Synthesis of the precursor of [<sup>125</sup>I]TAP1.
#### Ethyl 2-[[2-{(3-bromo-5-chlorophenyl)amino}-2-oxoethyl]thio]acetate (1)

DMF 10 ml に 3-bromo-5-chloroaniline (1.5 g、 7.3 mmol)、2-{(2-ethoxy-2-oxoethyl)thio} acetic acid (1.3 g、 7.3 mmol)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (1.5 g、 8.0 mmol)、1-hydroxybenzotriazole hydrate (1.2 g、 8.0 mmol)を加えた。ここに トリエチルアミン (1.1 ml、 8.0 mmol)を加え、室温で一晩攪拌後、溶媒を減圧留去し た。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去 した。残渣を酢酸エチル: ヘキサン = 1:3を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフ ィーにより精製し、1 (0.95 g、 2.6 mmol、 36%)を得た。

1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 9.16 (sbr, 1H), 7.72-7.71 (t, 1H, *J* = 1.8 Hz,), 7.65-7.64 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz,), 7.27-7.26 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz),4.23-4.18 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz,), 3.46 (s, 2H), 3.38 (s, 2H), 1.30 -1.27 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz,).

# Ethyl 2-[[2-{(3-chloro-5-iodophenyl)amino}-2-oxoethyl]thio)]acetate (2)

1,4-ジオキサン 10 ml、トリエチルアミン 5.0 ml に 1 (0.48 g、1.3 mmol)を加え、こ こに bis(tributyltin) (1.3 ml、2.6 mmol)、tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.15 g、 0.13 mmol)を加え、90 °C で 4 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチ ル: ヘキサン = 1:3 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーにより精製した。 引き続きクロロホルム 10 ml に回収物 (0.21 g、0.36 mmmol)、 $I_2$  (0.20 g、0.79 mmol) を加え、室温で 15 分攪拌した。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液 5.0 ml を加えて反応 を停止後、クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留 去した。残渣を酢酸エチル: ヘキサン = 1:3 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラ フィーにより精製し、2 (0.12 g、0.30 mmol、23%)を得た。

1H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 9.10 (sbr, 1H), 7.87-7.86 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz), 7.71-7.70 (t, 1H, *J* =

1.7 Hz), 7.47-7.46 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz,),4.23-4.18 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz,), 3.45 (s, 2H), 3.37 (s, 2H), 1.35 -1.27 (m, 3H).

#### 2-[[2-{(3-Chloro-5-iodophenyl)amino}-2-oxoethyl]thio]acetic acid (3)

1,4-ジオキサン 3.0 ml、2 N 水酸化ナトリウム水溶液 3.0 ml に 2 (0.13 g、 0.31 mmol)
を加え、室温で 5 分攪拌した。2 N 塩化ナトリウム水溶液で中和後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム:
メタノール = 4:1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーにより精製し、3 (P1、 0.10 g、 0.27 mmol、 87%)を得た。

1H-NMR (DMSO, 400 MHz) : 12.6 (sbr, 1H), 10.3 (sbr, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 3.41 (s, 2H), 3.40 (s, 2H).

# N-(3-Chloro-5-iodophenyl)-2-[{2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl}thio]acetamide (4)

メタノール 2.0 ml に水酸化カリウム 82 mg、hydroxylamine hydrochloride 60 mg を加え、 室温で 10 分攪拌した。一方、メタノール 1.0 ml に 2 (0.10 g、0.24 mmol) を加え、攪拌 後、上記溶液に加えた。室温で一晩撹拌後、溶媒を減圧留去し、残渣をクロロホルム : メタノール = 5:1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーにより精製し、4 (P2) を得た。

1H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) : 7.84-7.83 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz,), 7.63-7.62 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 7.38-7.37 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz), 337-3.25 (s, 2H), 3.17 (s, 2H).

# *N*-(3-Bromo-5-chlorophenyl)-2-{(cyanomethyl)thio}acetamide (5)

DMF 11 ml <a>[]</a> 3-bromo-5-chloroaniline (1.7 g, 8.1 mmol), 2-{(cyanomethyl)thio}acetic acid

(1.1 g、8.1 mmol)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (1.7 g、8.9 mmol)、1-hydroxybenzotriazole hydrate (1.4 g、8.9 mmol)を加えた。ここにトリエチ ルアミン (1.2 ml、8.9 mmol)を加え、室温で一晩攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣 を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残 渣を酢酸エチル: ヘキサン = 1:2を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーによ り精製し、5 (0.86 g、2.7 mmol、34%)を得た。

1H-NMR (Acetone-d6, 400 MHz) : 9.70 (sbr, 1H), 7.85-7.84 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz,), 7.75-7.74 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz,), 7.33-7.32 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz,), 3.82-3.79 (s, 2H), 3.62 (s, 2H).

#### *N*-(3-Chloro-5-iodophenyl)-2-{(cyanomethyl)thio}acetamide (6)

DMF 10 ml、トリエチルアミン 5.0 ml に 5 (0.23 g、0.72 mmol)を加え、ここに bis(tributyltin)(0.84 g、1.4 mmol)、tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)(0.08 g、0.07 mmol) を加え、100 °C で 4 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチル : ヘキ サン =1:3を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーにより精製した。引き続き、 クロロホルム 5.0 ml に回収物 (0.11 g、0.21 mmmol)、I<sub>2</sub> (0.25 g、0.98 mmol)を加え、 室温で 30 分攪拌した。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液 5.0 ml を加えて反応を停止後、 クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残 渣を酢酸エチル : ヘキサン =1:3を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーによ

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) : 10.5 (sbr, 1H), 7.77-7.76 (s, 1H, *J* = 1.8 Hz,), 7.67-7.66 (s, 1H, *J* = 1.8 Hz,), 7.41-7.40 (s, 1H, *J* = 1.8 Hz,), 3.82 (s, 2H), 3.56 (s, 2H).

#### 2-[{(1H-Tetrazol-5-yl)methyl}thio]-N-(3-chloro-5-iodophenyl)acetamide (7)

DMF 20 ml に 6 (0.11 g、0.31 mmol)、sodium azide (0.08 g、1.3 mmol)、ammonium chloride (0.33 g、0.62 mmol)を加え、100 ℃ で二晩攪拌した。酢酸エチルで抽出後、溶媒を減 圧留去し、残渣をクロロホルム:メタノール = 4:1を溶出溶媒とする中圧分取クロマ トグラフィーにより精製し、7 (P3、0.05 g、0.13 mmol、42%)を得た。

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) : 11.4 (sbr, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 3.96 (s, 2H), 3.32 (s, 2H).

#### 1-(4-Iodobenzyl)guanidine (8)

精製水/エタノール溶液(50/50)10 ml に *p*-iodobenzylamine(1.4 g、6.0 mmol)、 2-methyl-2-thiopseudourea sulfate(1.7 g、6.0 mmol)を加え、80 ℃で一晩加熱還流した。 溶媒を減圧留去後、残渣に精製水を15 ml 加え、100 ℃に加熱した。熱時濾過後、室温 で一晩放置した。沈殿を濾過により回収し、8(1.1 g、4.1 mmol、69%)を得た。 1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6): 7.70-7.67 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz,), 7.12-7.10 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz,), 4.23 (s, 2H).

#### 2-{(4-Iodobenzyl)amino}-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-ol (9)

メタノール 5.0 ml に sodium methoxide (0.13 g、 5.5 mmol) を加え、室温で撹拌後、8 (0.30 g、 1.1 mmol)、ethyl 4,4,4-trifluoroacetoacetate (0.20 g、 1.1 mmol)を加えた。80 ℃ で 6 時間加熱還流し後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチルで抽出した。溶媒を減圧留去し、 残渣をクロロホルム:メタノール = 97:3 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフ ィーにより精製し、9 (P4、 0.05 g、 0.12 mmol、 11%)を得た。 1H-NMR (400 MHz、 DMSO-d6): 7.77 (sbr, 1H), 7.71-7.68 (m, 2H), 7.03-7.01 (d, 2H, *J* = 8.3

Hz,), 6.10 (s, 1H), 5.09 (s, 2H).

#### Methyl 3-{(5-iodo-1*H*-indol-1-yl)sulfonyl}thiophene-2-carboxylate (10)

DMF 1.5 ml に水酸化ナトリウム (0.08 g、 1.9 mmol)、5-iodoindole (0.30 g、 1.2 mmol) を加え、室温で 30 分攪拌後、更に methyl 3-chlorosulfonylthiophene-2-carboxylate (0.46 g、 1.9 mmol)を加えた。室温で一晩撹拌後、溶媒を減圧留去し、酢酸エチルで抽出した。 溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 2 を溶出溶媒とする中圧分取ク ロマトグラフィーにより精製し、10 (0.36 g、 0.80 mmol、 65%)を得た。 1H-NMR (400 MHz、DMSO-d6) : 7.94 (s, 1H), 7.77-7.76 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz,), 7.58-7.52 (m, 1H), 7.46-7.45 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz,), 7.26 (s, 1H), 7.16-7.14 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz,), 6.61-6.60 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz,), 3.91 (s, 3H).

# 3-{(5-Iodo-1*H*-indol-1-yl)sulfonyl}thiophene-2-carboxylic acid (11)

1,4-ジオキサン 5.0 ml、2 N 水酸化ナトリウム水溶液 5.0 ml に 10 (0.23 g、0.51 mmol) を加え、室温で 5 分攪拌した。2 N 塩化ナトリウム水溶液で中和後、酢酸エチルで抽出 し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム : メタノール = 4:1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーにより精製し、11 (P5、 0.04 g、0.09 mmol、16%)を得た。

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) : 8.00-8.00 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz,), 7.95-7.94 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz,), 7.65-7.62 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz,), 7.54-7.52 (dd, 1H, *J* = 8.5, 1.7 Hz,), 7.44-7.43 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz,), 7.11-7.10 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz,), 6.65-6.64 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz,).

#### 5-(Chloromethyl)-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one (12)

12 は文献 40 の方法に従って合成した。

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) : 8.13-8.12 (dd, 2H, *J* = 3.2, 1.7 Hz,), 8.12-8.11 (dd, 2H, *J* =

3.2, 1.7 Hz,), 7.55-7.54 (m, 1H), 6.19 (s, 1H), 4.69 (s, 1H).

# 5-[{(5-Iodo-2-methoxyphenyl)amino}methyl]-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4 *H*)-one (13)

DMA 1.8 ml に 5-iodo-2-methoxyaniline (0.03 g、0.12 mmol) を加え、ここに N,N-diisopropylethylamine (0.04 g、0.30 mmol) を加えた。一方、DMF 3.0 ml に 12 (0.02 g、0.06 mmol) を加え、攪拌後、5-iodo-2-methoxyaniline 溶液に加えた。180 °C で 3 時間 攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加え て脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 5 : 1 を溶出溶媒とす る中圧分取クロマトグラフィーにより精製し、13 (P6、0.005 g、0.01 mmol、16%) を 得た。

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) : 8.12-8.10 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.53-7.51 (m, 3H), 6.92-6.90 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 6.79 (s, 1H), 6.67-6.65 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz,), 5.86 (S, 1H), 4.32 (s, 2H), 3.81 (s, 3H).

## 5-{(3-Iodophenoxy)methyl}-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one (14)

DMF 7.0 ml に 3-iodophenol (0.34 g、1.5 mmol) を加え、ここに炭酸カリウム (0.21 g、 1.5 mmol) を加えた。一方、DMF 3.0 ml に 12 (0.20 g、0.77 mmol) を加え、攪拌後、 3-iodophenol 溶液に加えた。85 ℃ で 19 時間攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸 エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣をク ロロホルム:メタノール = 10:1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーにより 精製し、14 (P7 (TAP1)、0.11 g、0.24 mmol、16%) を得た。

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) : 8.12-8.10 (m, 2H), 7.54-7.46 (m, 3H), 7.43-7.42 (t, 1H, J =

1.8 Hz), 7.36-7.33 (dt, 1H, J = 1.4, 7.3 Hz), 7.13-7.06 (m, 2H), 5.96 (s, 1H), 5.05 (s, 2H).

#### 5-{(3-Bromophenoxy)methyl}-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one (15)

DMF 7.0 ml に 3-bromophenol (0.27 g、1.5 mmol) を加え、ここに炭酸カリウム (0.32 g、2.3 mmol) を加えた。一方、DMF 3.0 ml に 12 (0.20 g、0.77 mmol) を加え、攪拌後、 3-bromophenol 溶液に加えた。85 ℃ で 7 時間攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸 エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣をク ロロホルム:メタノール = 10:1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーによ り精製し、15 (0.06 g、0.15 mmol、9.8%) を得た。

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) : 8.12-8.10 (d, 2H), 7.52-7.51 (m, 3H), 7.30-7.27 (m, 2H), 7.20-7.18 (m, 1H), 7.08-7.06 (m, 1H), 6.03 (s, 1H), 5.10 (s, 2H).

# 2-Phenyl-5-[{3-(tributylstannyl)phenoxy}methyl][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4*H*)-one (16)

DMF 10 ml、トリエチルアミン 5.0 ml に 15 (0.11 g、0.27 mmol)を加え、ここに bis (tributyltin) (0.31 g、0.54 mmol)、tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.03 g、0.03 mmol)を加え、100 ℃ で 4 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去後、残渣にクロロホル ムを加え、クロロホルム : メタノール = 10 : 1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラ フィーにより精製した。更に PTLC (クロロホルム : メタノール = 10 : 1) で精製を行 い、16 (TAP1 標識前駆体、0.02 g、0.04 mmol、16%)を得た。

1H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) : 8.23-8.21 (m, 2H), 7.47-7.45 (m, 3H), 7.29-7.26 (m, 1H), 7.15-7.14 (d, 1H), 7.04-7.03 (d, 1H), 6.79-6.76 (s, 1H), 6.11 (s, 1H), 5.06 (s, 2H), 1.58-1.50 (m, 6H), 1.38-1.25 (m, 6H), 1.09-1.05 (m, 6H), 0.91-0.87 (m, 9H).

#### 1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid 蛍光阻害実験

P1-P7 の DMSO 溶液 (0.03  $\mu$ M-0.80 mM) 30  $\mu$ l、FABP4 タンパク質 (1.0  $\mu$ M) 75  $\mu$ l、 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1,8-ANS) の 50 mM リン酸バッファー (pH = 7.4) / エタノール溶液 (98/2、24 nM) 75  $\mu$ l をリン酸バッファー (50 mM、pH = 7.4) 120  $\mu$ l に添加し、室温で 5 分インキュベートした。その後、蛍光強度を測定した (excitation : 370 nm、emission : 475 nm)。得られた測定結果を GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad Software 社)により解析することで IC<sub>50</sub> 値を算出し、 $K_i$  値を下記の式に従って算出した。 1,8-ANS の FABP4 に対する  $K_d$  値は別途算出し、1.2  $\mu$ M とした。  $K_i = IC_{50}/(1 + [L]/K_d)$ 、[L]: 1,8-ANS 濃度、 $K_d$ : 1,8-ANS の  $K_d$  値 (1.2  $\mu$ M)。

# Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA)

TAP1 の DMSO/PBS (-)溶液 (2.5/97.5、0.10-0.20 mM) 0.30 ml を PAMPA plate system の donor plate に添加し、一方 PBS (-) 0.20 ml を PAMPA plate system の acceptor plate に添加 した。両プレートを連結し、室温で 5 時間静置後、各 plate より 0.15 ml を採取し、96 well plate を用いて 280 nm の吸光度を測定した。透過速度 (Pe) は下記の式に従って算出し た。

 $\begin{aligned} &\text{Pe (cm/s)} = (-\ln (1 - C_A / C_{equilibrium})) / \text{St } (1 / V_D + 1 / V_A), \ C_{equilibrium} = (C_D V_D + C_A V_A) / (V_D + V_A), \ C_D \\ &= C_0 (A_D - A_{buffer}) / (A_0 - A_{buffer}), \ C_A = C_0 (A_A - A_{buffer}) / (A_0 - A_{buffer}). \end{aligned}$ 

C<sub>0</sub>: サンプル濃度、A<sub>0</sub>、A<sub>buffer</sub>、A<sub>D</sub>、A<sub>A</sub>: サンプル溶液、PBS (-)、donor plate、acceptor plate の吸光度、V<sub>D</sub>、V<sub>A</sub>: donor plate、acceptor plate の溶液量、S: 膜面積、t: インキュベート時間。

#### [<sup>125</sup>I]TAP1 の標識合成

[<sup>125</sup>I]TAP1 の標識は Schme 2-1-4 に示す方法で行った。TAP1 標識前駆体の酢酸/メタノ ール溶液 (1/99、4.0 mg/ml) 0.16 ml、N-chlorosccinimide のメタノール溶液 (0.50 mg/ml) 44 μl を混合し、ここに[<sup>125</sup>I]NaI (37 MBq) 20 μl を加えた。室温で 30 分撹拌後、飽和亜 硫酸水素ナトリウム水溶液 10 μl を添加して反応を停止させ、溶媒を留去した。残渣を 酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣 について下記の HPLC 条件により精製を行い、[<sup>125</sup>I]TAP1 を放射化学的収率 23 ± 0.3%、 放射化学的純度 99%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) = 37:63



Scheme 2-1-4. Synthesis of [<sup>125</sup>I]TAP1.

#### 分配係数測定実験

1-オクタノール 3.0 ml と PBS (-) 3.0 ml の混合溶液を撹拌後、[<sup>125</sup>I]TAP1 のエタノール /PBS (-)溶液 (5/95、0.024 MBq) 20 μl を添加した。ボルテックス後、遠心分離し (1,000 g、5 分)、1-オクタノール相、水相それぞれから 0.50 ml 採取し、放射能を測定した。同 操作を 3 回繰り返して行い、分配係数は下記の式に従って算出した。 LogP = ln (1 - オクタノール相の放射能/水相の放射能)

#### FABP4 サブタイプ選択性実験

50 mM リン酸二水素ナトリウム水溶液 (protein binding buffer、300 mM 塩化ナトリウム、10 mM imidazole 含有、pH = 8.0) 0.50 ml に、FABP3、FABP4、FABP5 リコンビナントタンパク質の 50 mM リン酸バッファー溶液 (0.2  $\mu$ M、0.10 M 塩化ナトリウム、20% glycerol 含有、pH = 7.2) と Ni-NTA Magnetic Agarose Beads 溶液 (Qiagen 社) 0.02 ml を添加した。室温で 1 時間撹拌後、上清を除き、1.0%BSA 含有 PBS (-) 0.50 ml を加えた。室温で 30 分撹拌後、上清を除き、50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (interaction buffer、0.30 M 塩化ナトリウム、10 mM imidazole、0.005% tween 含有、pH = 8.0) 0.50 ml、[<sup>125</sup>I]TAP1 のエタノール/interaction buffer 溶液 (5/95、0.01 MBq) を添加した。非特異的結合の評価のためのブロッキング群には、TAP1 のエタノール/interaction buffer 溶液 (5/95、11  $\mu$ M)を同時に添加した。室温で 2 時間撹拌後、上清を除き、beads をエタノール/interaction buffer 溶液 (5/95) で洗浄した。上清を除去後、beads 上の放射能を測定した。結合率は下記の式に従って算出した。

結合率(%) = (beads 上の放射能) / (アプライした放射能) × 100

#### FABP4 飽和結合実験

[<sup>125</sup>I]TAP1 (0.3-9.5 MBq) と TAP1 (0.01-0.40  $\mu$ M) のエタノール/DMSO/interaction buffer 溶液 (2.5/5/92.5) 混合液を調製した。上記と同様に FABP4 タンパク質を Ni-NTA Magnetic Agarose Beads に固相化後、interaction buffer 0.40 ml と上記混合液 0.05 ml を添加した。 非特異的結合群には、TAP1 を 90  $\mu$ g/ml になるように同時に添加した。室温で 2 時間撹 拌後、上記と同様に結合率を算出し、GraphPad Prism を用いて Scatchard 解析を行い、  $K_{\rm d}$  値を算出した。

#### 脂肪細胞分化実験

3T3-L1 細胞を 2.0 × 10<sup>5</sup> cells/well になるように 24 well plate に播種後、4 日間培養し、 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX、0.50 mM)、dexamethasone (0.25 mM)、insulin (10 µg/ml)、 pioglitazone hydrochloride (10 µM) 含有 DMEM 培地に交換した。2 日間培養後、insulin (10 µg/ml)、pioglitazone hydrochloride (10 µM) 含有 DMEM 培地に交換した。更に 2

日間培養後、pioglitazone hydrochloride (10 μM) 含有 DMEM 培地に交換し、以降 2 日間

ごとに培地を交換し、8-10日目に実験に用いた。

#### <u>Oil Red O 染色</u>

24 well 上の分化脂肪細胞と未分化の 3T3-L1 細胞の培地を除き、PBS (-)で洗浄後、 paraformaldehyde/PBS (4/96) 溶液を 1.0 ml を加え、30 分室温で静置した。PBS (-)で洗 浄後、2-プロパノール/精製水 (60/40) 1.0 ml を加え、2 分静置した後に、上清を除き、 Oil Red O 染色液 (ナカライテスク株式会社) 1.0 ml を加え、8 分静置した。2-プロパノ ール/精製水 (60/40) 1.0 ml で 2 度洗浄後、精製水 1.0 ml を加えて、5 分静置した後に ヘマトキシリン染色液を加えて 3 分間静置した。精製水で 2 度洗浄後、顕微鏡で観察し た。

# <u>ウェスタンブロッティング</u>

分化脂肪細胞、3T3-L1 細胞を PBS (-)にて洗浄した後、1 × Passive Lysis バッファー (1.0% プロテアーゼインヒビター含有、Promega 社) に懸濁し、超音波破砕装置により 細胞を破砕して細胞溶解液を得た。BCA 法によるタンパク定量を行った後、63 mM ト リス-塩酸緩衝液中(1.0% sodium dodecyl sulfate、10% glycerol、0.01% bromo phenol blue、 5.0% 2-mercaptoethanol 含有、pH6.8) を加え、ウェスタンブロッティング用サンプルと した。本サンプルを 100°C で 5 分間加熱することにより熱変性し、熱変性したタンパク 質 0.01 mg を SDS-PAGE (5.0-20%) 電気泳動 (20 mA、90 分間) により分離し、ニト ロセルロース膜に転写した (15 V、45 分間)。Blocking One (ナカライテスク) を用い て室温で 30 分間ブロッキングした後、1 次抗体として抗マウス FABP4 ウサギ抗体 (D25B3、Cell Signaling Technology 社) を 4°C で一晩反応させた。さらに HRP 標識し た 2 次抗体 (#7074、horseradish peroxidase 標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体、Cell Signaling Technology 社) を室温で 45 分間反応させた後、ウェスタンブロッティング用化学発光 検出試薬 (Chemi-Lumi One Super、ナカライテスク株式会社) を使用し、発光検出装置 を用いて免疫反応陽性タンパク質を検出した。

# 脂肪細胞取り込み実験

24 well 上の分化脂肪細胞と未分化の 3T3-L1 細胞の培地を除き、PBS (-)で洗浄後、 BMS309403 の DMSO/DMEM (1/99、0-10 µM) 0.50 ml を加えた。37 ℃ で 1 時間インキ ュベート後、[<sup>125</sup>I]TAP1 の DMSO/tween 20/PBS (-)溶液 (1/0.1/98.9、37 MBq) 0.50 ml を 加え、更に 37 ℃ で 1 時間インキュベートした。DMSO/tween20/PBS (-)溶液 (1/0.1/98.9) 0.50 ml で 3 回洗浄後、2 N 水酸化ナトリウム水溶液 0.25 ml 加えて細胞を溶解し、回収 した。回収した細胞の放射能を測定後、タンパク定量を行った。

#### 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。

44

# 2-1-3 結果

# <u>P1-P7 の 1,8-ANS 蛍光阻害実験</u>

P1-P7の FABP4 に対する  $K_i$ 値は Table 2-1-1 に示す結果となり、P7 が最も高い阻害能 を示した。この結果より、トリアゾロピリミジン骨格の有用性が示され、P7 を Triazolopyrimidine Derivative-1 (TAP1)と称し、以降の検討を行うこととした。

 Table 2-1-1. The binding affinities of the designed candidate compounds.

<i>K</i> i (nM)		K <sub>i</sub> (nM)		
P1	1500 ± 160	P5	1400 ± 200	
P2	12000 ± 1200	P6	144 ± 11	
P3	7700 ± 693	P7	45 ± 9.8	
P4	374000 ± 104000			

Data are represented as the mean  $\pm$  S.E.

# TAP1の PAMPA 膜透過速度と分配係数測定

TAP1 の膜透過速度、分配係数は Table 2-1-2 に示す結果となり、TAP1 が高い細胞膜 透過性を有することが示唆された[41]。

**Table 2-1-2.** Physical property of [<sup>125</sup>I]TAP1.

Permeability (10 <sup>-6</sup> cm/s)		LogP	
[ <sup>125</sup> I]TAP1	12.6 ± 6.5	2.7 ± 0.3	

Data are represented as the mean  $\pm$  S.D.

# [<sup>125</sup>I]TAP1のFABP4サブタイプ選択性実験

[<sup>125</sup>I]TAP1のFABP4に対する結合率は、FABP3と比較して約12倍、FABP5と比較して約36倍となった(Figure 2-1-2)。



**Figure 2-1-2.** Binding of  $[^{125}I]$ TAP1 to FABP3, 4, and 5.  $^*P < 0.05$  vs. FABP4 group. Data are represented as the mean ± S.D.

# [<sup>125</sup>I]TAP1 の FABP4 結合飽和実験

[<sup>125</sup>I]TAP1 の FABP4 に対する解離定数は  $K_d = 69 \pm 12$  nM となった (Figure 2-1-3)。



**Figure 2-1-3.** Saturation curve of  $[^{125}I]TAP1$  for FABP4 (A). Scatchard plots of  $[^{125}I]TAP1$  binding to FABP4 (B). Data are represented as the mean  $\pm$  S.D.

# <u>Oil Red O 染色・ウェスタンブロッティング</u>

Oil Red O 染色の結果、分化脂肪細胞(adipocyte)は、脂質の蓄積による陽性像が得られた(Figure 2-1-4 (A))。一方、未分化の 3T3-L1 細胞は染まらなかった。また、ウェスタンブロッティングの結果、分化脂肪細胞において FABP4 の発現が認められた(Figure 2-1-4 (B))。



**Figure 2-1-4.** Oil Red O staining of cultured 3T3-L1 cells and adipocytes (A). Western blotting of FABP4 protein in cultured 3T3-L1 cells and adipocytes (B).

# [<sup>125</sup>I]TAP1の脂肪細胞取り込み実験

[<sup>125</sup>I]TAP1 は 3T3-L1 に比較して分化脂肪細胞に高く取り込まれた。また、その取り込 みは FABP4 選択的阻害剤である BMS309403 により、濃度依存的に、かつ、10 μM 群に おいて対照群と比較して約 50%まで阻害された(Figure 2-1-5)。



**Figure 2-1-5.** Uptake of [<sup>125</sup>I]TAP1 into adipocytes and 3T3-L1 cells, and inhibitio by BMS309403. Data are represented as the mean  $\pm$  S.D. <sup>#</sup>*P* < 0.05 vs. 3T3-L1 group, <sup>†</sup>*P* < 0.05 vs. 1 µM group, <sup>§</sup>*P* < 0.0001 vs. 10 µM group.

#### 2-1-4 考察

本節では、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うFABP4を標的 とした新規核医学分子イメージングプローブの開発のための、プローブ候補化合物の探索を 行った。標識核種には放射性ハロゲンであり、SPECTに適した線質の放射線を放出する <sup>123</sup>Iを選択した。また、標識部位は、母体化合物への影響を最小限にするために、母体 化合物のハロゲン元素の位置を選択した。

本研究において最も高い阻害能を示した TAP1 の 1,8-ANS 阻害能は、インビボで薬理効果 が報告されている FABP4 選択的阻害剤、BMS309403 と同程度であった(TAP1:45±9.8 nM vs. BMS309403:17±1.5 nM)。一方で、FABP4 には 9 種類のサブタイプが存在するため[33]、 FABP4 を標的とする上で、サブタイプ選択性が重要である。本研究では、全身に広く発現する FABP3 と、FABP4 と同様に脂肪細胞やマクロファージに発現すると共に、全身に広く発現する FABP5 を比較対象としたが[33]、[<sup>125</sup>I]TAP1 は FABP4 に対する選択的な結合性を示した。

また、FABP4 は細胞内タンパク質であるため、本タンパク質を標的とするプローブは高い細胞膜透過性を有する必要がある。[<sup>125</sup>I]TAP1 は分子量 444 であり、かつ算出された logP 値から、高い膜透過性を期待された[42]。実際に PAMPA 実験の結果、[<sup>125</sup>I]TAP1 は高い膜透過性を示し、細胞内に存在する FABP4 に到達可能であることが示唆された。

[<sup>125</sup>I]TAP1の細胞レベルでの有効性を調べるにあたって、FABP4が脂肪細胞の分化マーカ ーであることを利用して[43]、3T3-L1細胞を脂肪細胞に分化させることでFABP4発現細胞とし、 これを実験に用いた。[<sup>125</sup>I]TAP1は脂肪細胞中のFABP4に対する親和性を示したが、同時に 非特異的結合性が高いことが示された。この非特異性が高いことはインビボ応用において不 利に働くと予想されることから、これを低減するためにプローブの脂溶性を低減する必要性が 示唆された。 以上、本節では、FABP4を標的とした新規核医学分子イメージングプローブの開発のため に、プローブ候補化合物の探索を行い、この内、トリアゾロピリミジン骨格を有する[<sup>125</sup>I]TAP1が、 FABP4に対し高い親和性と選択性を有することを見出した。しかし、本化合物は高い非特異 的結合性を有していたことから、さらなる改良の必要性が示された。

#### 第2節

# 脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質標的核医学分子イメージングプローブとしての

# 放射性フッ素標識トリアゾロピリミジン誘導体の設計と評価

第1節で、FABP4を標的とした新規核医学分子イメージングプローブとして[<sup>125</sup>I]TAP1 を見 出したが、本化合物は高い非特異的結合性を有しており、これを低減するためにプローブの 脂溶性を低減させる必要性が示唆された。

ところで、<sup>18</sup>F は放射性ハロゲン核種の一つであり、定量性に優れる PET に適した性質の放 射線を放出し、かつ PET 核種の中で最も汎用されていることから、本研究においても有効な核 種であると考えられる。<sup>18</sup>Fを<sup>123</sup>Iの代わりに導入することで脂溶性の低減が期待できることから、 この<sup>18</sup>F を利用した新規プローブを設計した。さらに、インビボでの有効性を評価するにあたっ て、C6 ラット神経膠腫細胞株に着目した。神経膠腫患者剖検脳を用いた研究で、FABP4の発 現量が神経膠腫の悪性度に相関しており、特に悪性度の高い神経膠芽腫において FABP4 が 高く発現していること、また、FABP4 の発現部位ががん実質ではなく、血管内皮細胞やミクログ リアなどであることが明らかとなっている[44]。よって、神経膠腫細胞株である C6 細胞も FABP4 非発現であると予測し、同細胞株を接種した担がんモデルマウスを用いることで、がん周囲の 脂肪細胞に発現する FABP4 への特異性を評価することを計画した。

51

# 2-2-1 プローブ設計

[<sup>123</sup>I]TAP1 における<sup>123</sup>Iの導入位置に、1 個または3 個のオキシエチレン基を介して<sup>18</sup>Fを 導入した、5-[{3-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethoxy)phenoxy}methyl]-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a] pyrimidin-7(4*H*)-one([<sup>18</sup>F]FTAP1)、5-[[3-[2-{2-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethoxy)ethoxy}ethoxy]phenoxy] methyl]-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4*H*)-one([<sup>18</sup>F]FTAP3)を設計した。ヨウ素原 子からフッ素原子に変更し、更にオキシエチレン基を介することで、脂溶性の低減を期待した。 また、オキシエチレン基の数を変えることで、脂溶性、分子サイズを制御することを計画した。



**Figure 2-2-1.** The chemical structure of [<sup>18</sup>I]FTAP1 and 3.

# 2-2-2 方法

#### 試薬·機器

<sup>1</sup>H-NMR、中圧分取クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー (TLC)、蛍光強度 の測定、Parallel Artificial Membrane Permeability Assay、免疫染色像の観察、ウェスタン ブロッティングは前節と同様の機器を用いて行った。PET/CT 装置による画像の収集は、 GMI FX-3300 Pre-Clinical Imaging System を用いて行い、データ解析には 3D OSEM を使 用した。血漿タンパク結合率の測定には Rapid Equilibrium Dialysis (RED、Thermo Fisher Scientific 社)を用いた。<sup>18</sup>F は京都大学医学部附属病院設置の超小型サイクロトロン CYPRIS HM-18 (住友重機械工業株式会社)を用いて製造した。その他の試薬は、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。

#### 細胞

3T3-L1 細胞は 2-1-2 と同様に培養した。C6 細胞株はヒューマンサイエンス研究資源 バンク(HSRBB)社より譲受した。C6 細胞株の培地には 10% fetal bovine serum 含有 RPMI を用いた。培地にはグルタミン(1 mM)、ペニシリン(50 U/mL)、ストレプトマイシン (50 μg/mL) 含有)を混合し、37℃、5.0% CO2環境下にて培養した。

# 動物

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。ddy マウス(雄性、6 週齡)、Sprague-Dawley ラット(雌性、8 週齡)は清水実験材料株式会社より購入し、 Balb/c nu/nu マウス(雌性、7 週齡)は日本エスエルシー株式会社より購入した。12 時 間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し、飼料・水は自由に与えた。 <u>合成</u>

**FTAP1、FTAP3、**[<sup>18</sup>F]**FTAP1**標識前駆体の合成は Scheme 2-2-1 から 2-2-2 に示す方法 で行った。



Scheme 2-2-1. Synthesis of FTAP1 and FTAP3.



Scheme 2-2-2. Synthesis of the precursor of [<sup>18</sup>F]FTAP1.

# 1-(Benzyloxy)-3-(2-fluoroethoxy)benzene (17)

DMF 27 ml に 3-benzyloxyphenol (0.90 g、4.6 mmol)、2-fluoroethyl 4-methylbenzene sulfonate (1.0 g、4.6 mmol) を加え、ここに炭酸カリウム (1.3 g、9.2 mmol) を加えた。 105 ℃ で一晩攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナト リウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1:8 を 溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーにより精製し、17 (0.91 g、3.7 mmol、80%) を得た。

1H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.44-7.31 (m, 5H), 7.21-7.17 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.63-6.53 (m, 3H), 5.05 (s, 2H), 4.81-4.67 (td, 2H, *J* = 4.4, 47 Hz), 4.24-4.15 (td, 2H, *J* = 4.4, 28 Hz).

# 5-[{3-(2-Fluoroethoxy)phenoxy}methyl]2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one

(18)

メタノール 30 ml に 17 (0.90 g、3.7 mmol)、palladium carbon (Pd 10%、0.10 g)を加え、 室温、水素雰囲気下で 1 時間撹拌した。palladium carbon を濾過により除き、残渣 (0.70 g、4.3 mmol) を回収した。続いて、ここに DMF 45 ml を加えた。更に、12 (0.80 g、2.9 mmol)、炭酸カリウム (1.2 g、8.7 mmol) を加え、85 ℃ で一晩攪拌後、溶媒を減圧留去 した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留 去した。残渣をクロロホルム : メタノール = 20 : 1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマト グラフィーにより精製し、18 (FTAP1、0.11 g、0.30 mmol、11%) を得た。 1H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) : 8.13-8.11 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.55-7.53 (m, 3H), 7.27-7.22 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.69-6.62 (m, 3H), 6.12 (s, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.81-4.19 (m, 4H).

#### 2-{2-(2-Fluoroethoxy)ethoxy}ethyl 4-methylbenzenesulfonate (19)

THF 40 ml に 1,2-bis[2-(*p*-toluenesulfonyloxy)ethoxy]ethane (1.0 g、20 mmol) と
tetrabutylammonium fluoride (6.3 g、24 mmol) を加え、85 ℃ で 8 時間攪拌後、溶媒を減
圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を
減圧留去した。更に、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 2 を溶出溶媒とする中圧分取
クロマトグラフィーにより精製し、19 (1.1 g、3.6 mmol、18%) を得た。
1H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.81-7.79 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 7.36-7.33 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz),
4.61-4.59 (t, 1H, *J* = 4.1 Hz), 4.49-4.47 (t, 1H, *J* = 4.1 Hz), 4.18-4.16 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz),

3.76-3.74 (t, 1H, J = 4.1 Hz), 3.71-3.59 (m, 7H), 2.45 (s, 3H).

#### 1-(Benzyloxy)-3-[2-{2-(2-fluoroethoxy)ethoxy}ethoxy]benzene (20)

DMF 5.0 ml に 3-benzyloxyphenol (0.10 g、0.70 mmol)、**19** (0.20 g、0.70 mmol) を加 え、ここに炭酸カリウム (0.20 g、1.4 mmol) を加えた。105 ℃ で一晩攪拌後、溶媒を 減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒 を減圧留去した。残渣を酢酸エチル: ヘキサン = 1:3 を溶出溶媒とする中圧分取クロ マトグラフィーにより精製し、**20** (0.17 g、0.50 mmol、72%) を得た。 1H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): 7.44-7.32 (m, 5H), 7.19-7.15 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.59-6.51 (m,

3H), 5.04 (s, 2H), 4.63-4.49 (m, 2H), 4.12-4.10 (t, 2H, *J* = 4.3 Hz), 3.89-3.84 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz), 3.80-3.70 (m, 6H).

# 5-[[3-[2-{2-(2-Fluoroethoxy)ethoxy}phenoxy]methyl]-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a] pyrimidin-7(4*H*)-one (21)

メタノール 5.0 ml に 20 (0.10 g、 0.70 mmol)、palladium carbon (Pd 10%、 0.01 g)を加 え、室温、水素雰囲気下で 2 時間撹拌した。palladium carbon を濾過により除き、残渣 (0.04 g、 0.20 mmol)を回収した。続いて、ここに DMF 5.0 ml を加えた。更に、12 (0.03 g、 0.10 mmol)、炭酸カリウム (0.02 g、 0.16 mmol)を加え、85 ℃ で 5 時間攪拌後、溶 媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、 溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム:メタノール = 10:1 を溶出溶媒とする中圧 分取クロマトグラフィーにより精製し、21 (FTAP3、 0.005 g、 0.01 mmol、13%)を得た。 1H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): 8.14-8.12 (d, 2H, *J* = 7.3 Hz), 7.55-7.53 (m, 3H), 7.25-7.21 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz), 6.66-6.59 (m, 3H), 6.11 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.57-4.44 (m, 2H), 4.10-4.08 (t, 2H, *J* = 4.4 Hz), 3.75-3.58 (m, 8H).

#### 2-{3-(Benzyloxy)phenoxy}ethanol (22)

DMF 70 ml に 3-benzyloxyphenol (2.0 g、10 mmol)、ethylene bromohydrin (3.8 g、30 mmol) を加え、ここに炭酸カリウム (4.1 g、30 mmol) を加えた。85 ℃ で一晩攪拌後、溶媒を 減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒 を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 3 を溶出溶媒とする中圧分取クロ マトグラフィーにより精製し、22 (1.7 g、7.0 mmol、70%)を得た。 1H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.44-7.33 (m, 5H), 7.21-7.17 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.62-6.52 (m, 3H), 5.05 (s, 2H), 4.07-4.05 (m, 2H), 3.97-3.93 (m, 2H).

#### 3-[2{(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy}ethoxy]phenol (23)

ジクロロメタン 20 ml に 22 (1.7 g、7.0 mmol) を加え、ここに氷冷下で tert-butyldimethylsilyl chloride (1.7 g、11 mmol)、imidazole (1.0 g、15 mmol) を加え、室 温で5 時間撹拌した。溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリ ウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム:メタノール = 20:1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーにより精製した。引き続き、回収物 (2.3 g、6.5 mmol) をメタノール 50 ml に加え、更に palladium carbon (Pd 10%、0.20 g)を加え、 室温、水素雰囲気下で 3 時間撹拌した。palladium carbon を濾過により除き、溶媒を減 圧留去後、残渣を酢酸エチル: ヘキサン = 1:8 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグ ラフィーにより精製し、23 (1.7 g、6.3 mmol、88%) を得た。

1H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : 7.13-7.09 (t, 1H, *J* = 8.5 Hz), 6.50-6.41 (m, 3H), 4.02-3.94 (m, 4H), 0.91 (s, 9H), 0.10 (s, 6H).

57

# 5-[{3-(2-Hydroxyethoxy)phenoxy}methyl]-2-phenyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4*H*)one (24)

DMF 50 ml に 23 (1.0 g、3.7 mmol)、12 (0.60 g、2.5 mmol) を加えた。更に、炭酸カ リウム (1.0 g、7.5 mmol) を加え、85 ℃ で 6 時間攪拌後、溶媒を減圧留去した。残渣 を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、溶媒を減圧留去した。残 渣をクロロホルム:メタノール = 30:1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィ ーにより精製した。引き続き回収物 (0.40 g、0.80 mmol) を THF 15 ml に加え、更に氷 冷下で tetrabutylammonium fluoride (0.30 g、1.0 mmol) を加えた。室温で 2 時間撹拌後、 溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、 溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、 溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、 2 時間 2 中圧 分取クロマトグラフィーにより精製し、24 (0.19 g、0.50 mmol、19%) を得た。 1H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): 8.13-8.11 (dd, 2H, *J* = 8.2, 1.4 Hz), 7.54-7.48 (m, 3H), 7.22-7.18 (t, 1H, *J* = 8.7 Hz), 6.62-6.55 (m, 3H), 5.96 (s, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.98-3.96 (t, 2H, *J* = 4.8 Hz), 3.18-3.14 (m, 2H).

# 2-[3-{(7-Oxo-2-phenyl-4,7-dihydro-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-5-yl)methoxy}phenoxy] ethyl 4-methylbenzenesulfonate (25)

ジクロロメタン 10 ml に 24 (0.20 g、0.50 mmol)を加え、更に、氷冷下で *p*-toluenesulfonyl chloride (0.10 g、 0.70 mmol)、トリエチルアミン (0.10 g、 1.0 mmol)、 *N*,*N*-dimethyl-4-aminopyridine (0.006 g、 0.05 mmol)を加えた。室温で 6 時間撹拌後、溶 媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後、 溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム:メタノール = 30:1 を溶出溶媒とする中圧 分取クロマトグラフィーにより精製し、25 (FTAP1 標識前駆体、0.02 g、0.04 mmol、7.9%) を得た。

1H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) : 8.14-8.11 (d, 2H, *J* = 10.1 Hz), 7.81-7.79 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz), 7.55-7.47 (m, 5H), 7.23-7.19 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.67-6.49 (m, 3H), 6.11 (s, 1H), 5.09 (s, 2H), 4.34-4.32 (m, 2H), 4.17-4.15 (m, 2H), 2.41 (s, 3H).

#### <u>1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid 蛍光阻害実験</u>

FTAP1,3のDMSO 溶液(0.004-65 µM)を用い、2-1-2と同様に行った。

# Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA)

FTAP1のDMSO/PBS (-)溶液 (2.5/97.5、0.10-0.20 mM)を用い、2-1-2と同様に行った。

#### [<sup>18</sup>F]FTAP1 の標識合成

[<sup>18</sup>F]FTAP1 の<sup>18</sup>F 標識合成は Scheme 2-2-3 に示す方法で行った。[<sup>18</sup>F]KF 水溶液に Kryptofix222 を添加し、Ar 気流下にてアセトニトリルを用いた共沸脱水を行い、これを [<sup>18</sup>F]FTAP1 標識前駆体 (2.0 mg) に加え、DMSO 0.20 ml 中、マイクロウェーブ照射下、 130 ℃ で 2 分間反応することで <sup>18</sup>F 標識体を得た。精製水 2.0 ml を加えて希釈した後に Sep-Pak (C18、Waters 社) に通じてアセトニトリル溶液に置換した後、下記の HPLC 条 件により精製を行い、[<sup>18</sup>F]FTAP1 を放射化学的収率 31 ± 17%、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) = 50 : 50 (0 min)  $\rightarrow$  30 : 70 (40 min)



Scheme 2-2-3. Synthesis of [<sup>18</sup>F]FTAP1.

# 分配係数測定実験

[<sup>18</sup>F]FTAP1のDMSO/生理食塩水溶液(5/95、0.16 MBq)を用い、2-1-2と同様に算出 した。

# <u>FABP4 サブタイプ選択性実験</u>

[<sup>18</sup>F]FTAP1 のエタノール/interaction buffer 溶液(5/95、0.08 MBq)を用い、2-1-2 と同様に行った。

# 脂肪細胞取り込み実験

[<sup>18</sup>F]FTAP1のDMSO/tween 20/PBS (-)溶液(1/0.1/98.9、0.22 MBq)を用い、2-1-2と同様に行った。

# 正常マウス体内放射能分布実験

[<sup>18</sup>F]FTAP1のtween20/生理食塩水溶液(0.1/99.9、0.07 MBq)ddyをマウス尾静脈より投与した。投与後、5、15、30、60、120分後に断頭により屠殺し、心臓、肺、肝臓、 腎臓、腸、胃、脾臓、膵臓、筋肉、骨、脂肪、血液を摘出した。各臓器の重量と放射能 とを測定し、単位重量あたりの放射能から集積量(%ID/g)を算出した。

#### インビトロ血漿中安定性評価

ddy マウスから採取した血漿 0.10 ml に、[<sup>18</sup>F]FTAP1 の DMSO/PBS (-)溶液 (5/95、0.08 MBq) 0.01 ml を添加し、37 °C で 2 時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、10 分)。上清をフィルター (0.45  $\mu$ m、Millex-LH、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 10 ID × 250 mm, 1.5 ml/min, 220 nm, water (0.1% TFA) : acetonitrile (0.1% TFA) = 50 : 50 (0 min)  $\rightarrow$  30 : 70 (40 min)

# 血漿タンパク結合率評価

上記と同様に採取した血漿 0.30 ml に[<sup>18</sup>F]FTAP1 のエタノール/PBS (-)溶液 (5/95、0.43 MBq) 0.03 ml を添加し、RED device の sample chamber にアプライした。一方、PBS (-) 0.50 ml を buffer chamber にアプライし、37 °C で 4 時間インキュベートした。その後、両 chamber より 0.05 ml ずつ採取して放射能を測定し、下記の式に従って血漿タンパク結 合率を算出した。

血漿タンパク結合率(%)=(sample chamber の放射能 - buffer chamber の放射能)/(sample chamber の放射能) × 100

#### 担がんモデル動物の作成

C6 細胞を PBS (-)に懸濁した後、Balb/c nu/nu マウスの右下肢に皮下投与し(5×10<sup>6</sup> cells/0.10 ml)、移植後 14 日目に実験に用いた。

# <u>ウェスタンブロッティング</u>

C6 担がんマウスを抱水クロラール麻酔下で四肢を固定し、生理食塩水 20 ml を左心

室より注入することにより屠殺した。内臓脂肪と腫瘍組織をそれぞれ摘出後、1×Passive Lysis バッファー(1.0%プロテアーゼインヒビター含有)に懸濁し、超音波破砕装置に より細胞を破砕して細胞溶解液を得た。BCA 法によるタンパク定量を行った後、63 mM トリス-塩酸緩衝液中(1.0% sodium dodecyl sulfate、10% glycerol、0.01% bromo phenol blue、 5.0% 2-mercaptoethanol 含有、pH6.8)を加え、ウェスタンブロッティング用サンプルと した。一方、Sprague-Dawley ラットより内臓脂肪を摘出して、同様に調製し、陽性対象 サンプルとした。また、C6 培養細胞を用いて 2-1-2 と同様の方法でウェスタンブロッテ ィング用サンプルを調製した。得られたこれらのサンプルを用いて、2-1-2 と同様の方 法でウェスタンブロッティングを行った。

# C6担がんモデルマウス体内放射能分布実験

C6 担がんマウスへ[<sup>18</sup>F]FTAP1 の tween 20/生理食塩水溶液(0.1/99.9、0.10 MBq)をマ ウス尾静脈より投与した。投与後、5、30、60、120、180 分後に断頭により屠殺し、心 臓、肺、肝臓、腎臓、腸、胃、脾臓、膵臓、筋肉、骨、腫瘍、血液、脳を摘出した。各 臓器の重量と放射能とを測定し、単位重量あたりの放射能から集積量(%ID/g)を算出 した。

# 代謝物実験

C6 担がんマウスへ[<sup>18</sup>F]FTAP1 の tween 20/生理食塩水溶液(0.1/99.9、185 MBq)を尾 静脈より投与した。投与後 180 分後に屠殺後、腫瘍を摘出し、腫瘍を断片化後、5.0 mM 酢酸マグネシウム含有 30 mM トリス-塩酸緩衝液(pH = 8.5) 1.0 ml を氷上で加え、ホモ ジナイズを行った。次に 3.0 ml のメタノールを加えてボルテックス後、遠心分離(10,000 g、5分)を行い、上清をフィルター(Millex-LH MILLIPORE、0.45 μm)に通じた後に 上記の HPLC 条件で分析した。対照として投与前の[<sup>18</sup>F]FTAP1 のメタノール/生理食塩 水溶液(33/66、11 MBq)を調製し、下記の HPLC 条件で分析した。 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) = 50: 50 (0 min) → 30: 70 (40 min)

#### 経心灌流実験

C6担がんマウスへ[<sup>18</sup>F]FTAP1のtween 20/生理食塩水溶液(0.1/99.9、3.7 MBq)を尾静脈より投与した。投与後180分後に抱水クロラール麻酔下で四肢を固定し、生理食塩水20mlを左心室より注入することにより屠殺した。屠殺後、肺及び腫瘍を摘出した。対照群はマウス体内放射能分布実験と同様に断頭により屠殺した。その後、上記と同様に集積量(%ID/g)を算出した。

# ARG

C6 担がんマウスへ[<sup>18</sup>F]FTAP1 の tween 20/生理食塩水溶液(0.1/99.9、81 MBq)をマウ ス尾静脈より投与した。投与 180 分後に屠殺し、腫瘍を摘出後、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 ℃)で凍結後、クリオ スタットを用いて厚さ 10 µm 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 時間露光し、画像解析装置を用いて、[<sup>18</sup>F]FTAP1 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。

#### 免疫組織染色

ARG に用いた切片の隣接切片に対し、FABP4、perilipin に対する免疫組織染色を行った。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 FABP4 ウサギポリクローナル抗体 (ab13979、abcam 社)、抗マウス perilipin ウサギモノ クローナル抗体 (D1D8、Cell Signaling 社) をそれぞれ 1 次抗体として、4  $^{\circ}$ C で一晩反 応させた。2 次抗体として Dako Envision + kit (K4002、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。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。

## <u>PET 撮像</u>

C6 担がんマウスへ[<sup>18</sup>F]FTAP1 の tween 20/生理食塩水溶液(0.1/99.9、37 MBq)を尾静 脈より投与した。投与後 175 分からイソフルラン(2.0%)吸引麻酔し投与後 180 分から PET/CT 装置を用いて 30 分間撮像した。その後、CT 撮像(60 kV、310 μA) を行った。 画像再構成は 3D ordered subset expectation maximization method (OSEM)を用いて行った (Iteration: 5、Subset: 8)。

# 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。

# 2-2-3 結果

# FTAP1、3の1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid 蛍光阻害実験

FTAP1、3の FABP4 に対する K<sub>i</sub>値は Table 2-2-1 に示す結果となり、FTAP1 が TAP1 と同程度の高い FABP4 親和性を示した。この結果より、FTAP1 を用いてより詳細な検 討を行うこととした。

Table 2-2-1. The binding affinities of FTAP1, FTAP3 and TAP1.

	<i>K</i> <sub>i</sub> (nM)
FTAP1	68 ± 8.9
FTAP3	490 ± 41
TAP1	45 ± 9.8

Data are represented as the mean  $\pm$  S.E.

#### FTAP1の膜透過速度と分配係数測定

FTAP1の膜透過速度、分配係数は Table 2-2-2 に示す結果となり、FTAP1 が十分な細胞膜透過性を保持していることが示唆された[41]。

# **Table 2-2-2.** Physical property of [<sup>18</sup>F]FTAP1.

	Permeability (10 <sup>-6</sup> cm/s)	LogP
[ <sup>18</sup> F]FTAP1	1.5 ± 0.30	1.7 ± 0.04

Data are represented as the mean  $\pm$  S.D.

# [<sup>18</sup>F]FTAP1のFABP4サブタイプ選択性実験

[<sup>18</sup>F]FTAP1 の FABP4 に対する結合率は、FABP3 と比較して約 16 倍、FABP5 と比較 して約 10 倍となった (Figure 2-2-2)。



**Figure 2-2-2.** Binding of [<sup>18</sup>F]FTAP1 to FABP3, 4, and 5.  ${}^*P < 0.05$  vs. FABP4 group. Data are represented as the mean  $\pm$  S.D.

# [<sup>18</sup>F]FTAP1 の脂肪細胞取り込み実験

[<sup>18</sup>F]FTAP1 は 3T3-L1 に比較して分化脂肪細胞に高く取り込まれた。また、その取り 込みは FABP4 選択的阻害剤である BMS309403 により、濃度依存的に、かつ、10 μM 群 において対照群と比較して約 95%まで阻害された(Figure 2-2-3)。[<sup>18</sup>F]FTAP1 は脂肪細 胞内の FABP4 に対する親和性を示した一方で、[<sup>125</sup>I]TAP1 に比較して非特異的結合の低 下が示された。



Figure 2-2-3. Uptake of [<sup>18</sup>F]FTAP1 into adipocytes and 3T3-L1 cells, and inhibition by BMS309403. Data are represented as the mean  $\pm$ S.D. <sup>#</sup>*P* < 0.05 vs. 3T3-L1 group, <sup>†</sup>*P* < 0.05 vs. 1  $\mu$ M group, <sup>§</sup>*P* < 0.05 vs. 10  $\mu$ M group.

# インビトロ血漿中安定性評価

血漿中インキュベート2時間までHPLC上のメインピークはコントロールの保持時間 と一致し、[<sup>18</sup>F]FTAP1 が安定に存在していることが示された(Figure 2-2-4)。



# 正常マウス体内放射能分布実験

体内放射能分布実験の結果を Table 2-2-3 に示す。[<sup>18</sup>F]FTAP1 は肝臓、腎臓より排泄さ れ、他臓器への目立った集積は認められなかった。骨への集積は認められなかったこと から、脱フッ素は起きていないことが示唆された。一方で、高い血中滞留性が認められ た。

	Time After Injection (min)				
	5	15	30	60	120
Blood	20.09 ± 1.86	17.20 ± 0.83	14.40 ± 0.82	11.03 ± 3.17	7.02 ± 0.78
Heart	3.95 ± 0.61	$4.42 \pm 0.80$	$4.08 \pm 0.54$	3.87 ± 1.17	2.27 ± 0.38
Lung	9.65 ± 0.71	7.56 ± 2.68	7.02 ± 1.02	5.67 ± 1.24	3.87 ± 0.50
Liver	36.26 ± 0.93	32.01 ± 0.89	28.27 ± 2.05	24.11 ± 2.49	17.67 ± 4.39
Kidney	31.62 ± 3.64	26.18 ± 5.50	26.16 ± 4.31	23.39 ± 3.71	14.93 ± 4.44
Intestine	1.96 ± 0.22	3.58 ± 0.39	5.48 ± 0.71	8.82 ± 1.79	10.78 ± 4.94
Stomach <sup>a</sup>	0.48 ± 0.19	0.48 ± 0.26	0.83 ± 0.51	0.56 ± 0.10	0.84 ± 0.17
Spleen	3.00 ± 0.54	2.79 ± 0.33	2.84 ± 1.27	1.81 ± 0.67	1.23 ± 0.07
Pancreas	2.26 ± 0.48	2.01 ± 0.42	1.85 ± 0.22	1.68 ± 0.80	1.08 ± 0.32
Muscle	0.62 ± 0.13	1.04 ± 0.31	1.24 ± 0.18	1.52 ± 0.35	1.17 ± 0.32
Adipose	2.18 ± 0.38	1.86 ± 0.61	2.61 ± 1.08	3.74 ± 1.86	1.62 ± 0.92
Bone	2.46 ± 0.38	2.72 ± 0.15	2.20 ± 0.15	2.02 ± 0.47	1.74 ± 0.33

**Table 2-2-3.** Biodistribution of radioactivity after the injection of [<sup>18</sup>F]FTAP1 in normal mice.

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. for 3 animals at each interval. <sup>a</sup> Presented as % injected dose per organ.
### 血漿タンパク結合率評価

[<sup>18</sup>F]FTAP1 は高い血漿タンパク結合率を示した(Table 2-2-4)。

**Table 2-2-4.** Serum protein binding ratio of [<sup>18</sup>F]FTAP1.

	Binding ratio (%)
[ <sup>18</sup> F]FTAP1	> 99%

ウェスタンブロッティング

マウス脂肪細胞、摘出腫瘍塊、C6 培養細胞、ラット脂肪細胞のウェスタンブロッティングの結果を Figure 2-2-5 に示す。FABP4 の発現は、マウス脂肪、ラット脂肪、摘出腫瘍塊で認められたのに対し、C6 培養細胞では認められなかった。この結果より、腫瘍塊において、腫瘍周囲の組織に FABP4 が発現する事が示された。



Figure 2-2-5. Western blotting analyses of FABP4 and  $\beta$ -actin expression in mouse adipose, excised tumor, C6 cultured cell and rat adipose.

### <u>C6担がんモデルマウス体内放射能分布実験</u>

腫瘍組織塊への放射能集積は、経時的に増加し、投与後3時間では3.86 %ID/g であった。また、腫瘍体筋肉放射能集積比は経時的に増加し、投与1時間以降で約3以上となった(Table 2-2-5)。

	Time After Injection (min)					
	5	30	60	120	180	
Blood	22.27 ± 1.54	15.29 ± 1.92	12.44 ± 1.43	10.12 ± 0.44	10.38 ± 0.56	
Heart	4.56 ± 0.48	4.55 ± 0.47	3.64 ± 0.56	3.03 ± 0.20	2.88 ± 0.50	
Lung	12.74 ± 1.58	10.56 ± 1.52	6.11 ± 1.13	5.45 ± 1.03	5.71 ± 0.77	
Liver	36.32 ± 1.72	31.89 ± 2.65	25.59 ± 4.65	20.50 ± 2.28	17.63 ± 1.08	
Kidney	31.94 ± 6.70	24.42 ± 2.81	20.84 ± 2.99	17.14 ± 2.16	15.19 ± 2.12	
Intestine	17.65 ± 13.11	6.57 ± 0.80	9.96 ± 1.14	13.39 ± 0.37	19.24 ± 3.49	
Stomach <sup>a</sup>	0.54 ± 0.10	0.63 ± 0.10	0.72 ± 0.20	0.97 ± 0.15	0.73 ± 0.32	
Spleen	2.93 ± 0.15	1.96 ± 0.20	1.87 ± 0.08	1.33 ± 0.11	1.55 ± 0.29	
Pancreas	2.66 ± 0.30	2.13 ± 0.08	1.70 ± 0.30	1.36 ± 0.18	1.26 ± 0.10	
Muscle	0.78 ± 0.16	0.96 ± 0.15	1.03 ± 0.21	0.98 ± 0.02	0.88 ± 0.13	
Bone	1.45 ± 0.23	$1.44 \pm 0.14$	1.49 ± 0.32	1.28 ± 0.10	1.95 ± 0.58	
Brain	0.36 ± 0.06	$0.26 \pm 0.04$	0.25 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.01	
Tumor	1.13 ± 0.22	2.48 ± 0.54	2.96 ± 0.16	3.74 ± 0.31	3.86 ± 0.39	
Tumor/Muscle	1.45 ± 0.15	2.57 ± 0.30	2.95 ± 0.57	3.83 ± 0.28	$4.49 \pm 0.90$	
Tumor/Blood	0.05 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.36 ± 0.04	0.37 ± 0.05	

**Table 2-2-5.** Biodistribution of radioactivity after the injection of [<sup>18</sup>F]FTAP1 in C6 bearing mice.

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. for 3 animals at each interval. <sup>a</sup> Presented as % injected dose per organ.

## 代謝物実験

摘出腫瘍ホモジネートにおいて、HPLC上のメインピークはコントロールの保持時間 と一致し、代謝物のピークは認められなかったことから、[<sup>18</sup>F]FTAP1が腫瘍中で安定に 存在していることが示された(Figure 2-2-6)。



**Figure 2-2-6.** Analysis of [<sup>18</sup>F]FTAP1 in saline (A). Analysis of tumor homogenate at 180 min after injection of [<sup>18</sup>F]FTAP1 (B).

## 経心灌流実験

断頭、もしくは経心灌流により屠殺した際の肺と腫瘍の放射能集積は Table 2-2-6 に示 す結果となり、肺への放射能集積が断頭群と比べて 9.4%まで低下したのに比較して、 腫瘍集積は両者で同程度であった。

**Table 2-2-6.** The radioactiovity accumulation in Lung and tumor at 180 min after the injection of  $[^{18}F]FTAP1$  in mice sacrificed by decapitation or transcardial perfusion.

	Decapitation	Transcardial perfusion	
Lung	5.4	0.51	
Tumor	3.9	4.1	

Data are presented as % injected dose per gram. Each value represents the mean of 2 animals.

### ARG、免疫組織染色

摘出腫瘍塊より得られた[<sup>18</sup>F]FTAP1のオートラジオグラム、FABP4免疫染色像、脂肪 細胞マーカーである perilipin 免疫染色像を Figure 2-2-7 に示す。FABP4 は腫瘍周囲組織 に主に発現が認めれ、perilipinの発現部位と一致した(黒矢印)。[<sup>18</sup>F]FTAP1の腫瘍塊中 放射能分布は不均一であり、FABP4の発現部位と一致する傾向にあった。一方で、FABP4 の発現部位と一致しない[<sup>18</sup>F]FTAP1の分布も認められた(白矢印)。



**Figure 2-2-7.** Regional distribution of radioactivity at 180 min after the injection of  $[^{18}F]$ FTAP1 (A). FABP4 and perilipin immunohistochemical staining of adjacent sections to A (B, C). Bar = 1 mm (B, C).

# <u>PET 撮像</u>

[<sup>18</sup>F]FTAP1 投与後 3 時間の PET 画像を Figure 2-2-8 に示す。[<sup>18</sup>F]FTAP1 は右足皮下の 腫瘍塊を描出した。



## Transverse Image

**Figure 2-2-8** PET/CT imaging at 180 min after the injection of [<sup>18</sup>F]FTAP1 in C6 bearing mouse.

### 2-2-4 考察

本節では、[<sup>125</sup>I]TAP1の非特異的結合性を低減する目的で、新たに [<sup>18</sup>F]FTAP1、3を設計し、FABP4を標的とした核医学分子イメージングプローブとしての有効性を評価した。

FTAP1は、FTAP3に比較して、高いFABP4親和性を示したことから、FABP4を標的とする プローブにはコンパクトな分子サイズが求められることが示された。加えて、[<sup>18</sup>F]FTAP1 は [<sup>125</sup>I]TAP1に比較した脂溶性の低減が認められ、非特異的結合が低減した。これらの結果より、 [<sup>18</sup>F]FTAP1の設計の有効性が示された。

モデル動物には、C6ラット神経膠腫担がんマウスを用いた。FABP4は摘出腫瘍塊において 発現が認められた一方で、C6培養細胞では非発現であったことから、腫瘍に付随する組織に 発現している可能性が示され、加えて、FABP4は腫瘍周囲に発現し、かつ、脂肪細胞マーカ ーである perilipinの発現部位と共局在していたことから、主に腫瘍周囲の脂肪細胞に発現し ていることが示された。[<sup>18</sup>F]FTAP1はインビボにおいて、排泄臓器を除く他臓器への目立った 放射能集積は示さなかった一方で、高い血中滞留性が認められた。[<sup>18</sup>F]FTAP1は高い血漿 タンパク結合率を示したことから、これが高い血中滞留性の原因であると推定された。このこと から、摘出腫瘍塊中の放射能集積が血中残留放射能に由来する可能性が考えられたが、経 心灌流による屠殺後の腫瘍塊中の放射能は断頭時の放射能と同程度であったことから、腫瘍 塊中の放射能集積は、血中残留放射能の影響によらないことが示唆された。一方で、一部血 流に依存したものと考えられる集積も認められたことから、イメージングの際にはこの影響を考 慮する必要がある。

CAAはIL-6などのサイトカインや脂肪酸等の生理活性物質を介して、がん細胞と相互作用 を行い、がんの増殖、転移を亢進させることが明らかとなっているが[32]、FABP4 が代謝的な 相互に関与していることが明らかとなっている[31]。臨床においても、乳がんで脂肪組織浸潤 の有無が、がんの成長や転移能に相関することから、脂肪組織浸潤の評価ががんの予後マー カーになりうるとして注目されている[45]。よって、FABP4の非侵襲的なイメージングは、がんと 脂肪組織の境界部位における病態評価、治療薬開発において有用な情報を与えるものと考 えられるが、これまでに FABP4を標的とした核医学分子イメージングプローブとしては、

[<sup>14</sup>C]BMS309403 が報告されているのみであり[46]、イメージングプローブとしての有効性を示した報告はない。以上のことから、[<sup>18</sup>F]FTAP1 は CAA における FABP4 を標的とした初めての イメージングプローブである。

本研究においてはインビボにおける有効性を評価するために、FABP4 非発現である C6 細胞を用いたが、脂肪細胞と共培養することで FABP4 の発現が誘導されるがん細胞も存在する [31]。CAA とがん細胞との相互作用において、がん細胞に発現する FABP4 も役割を担ってい ると考えられることから、[<sup>18</sup>F]FTAP1 を用い、FABP4 非発現がんにおける結果と比較評価する ことで、がんと脂肪組織の境界領域における FABP4 の機能に関し、重要な知見を与えるものと 考えられる。また、近年、がん微小環境を標的とした治療薬の開発が着目されており[28]、 CAA とがん細胞の相互作用も治療標的となりうると考えられる。このような治療薬の治療効果 判定等にも応用可能であると考えられる。

以上、本節では、FABP4を標的とした新規核医学分子イメージングプローブとして [<sup>18</sup>F]FTAP1を設計、合成し、本プローブが FABP4 に対し高い親和性と選択性を有することを 示した。また、本プローブが腫瘍への経時的な集積性を有し、インビボにおいて FABP4 を認 識可能であることを示し、更に PET で腫瘍塊を描出することに成功した。これらの結果より、 [<sup>18</sup>F]FTAP1 ががんの増殖、転移に関与する、CAA における FABP4 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。

74

# 結 語

本研究では、動脈硬化症とがんの病態評価のため、酸化低密度リポタンパク質 (OxLDL)と脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質(FABP4)を標的とした放射性ハロゲン 標識核医学分子イメージングプローブの設計およびその評価を行い、以下の知見を得た。

1. OxLDL 標的核医学分子イメージングプローブとして[<sup>123</sup>I]AHP7 を設計した。 [<sup>125</sup>I]AHP7 がインビトロにおいて、OxLDL に対する選択的な親和性を保持しており、 OxLDL への結合率が LDL の酸化度と相関すること、かつ、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、[<sup>125</sup>I]AHP7 は WHHLMI ウサ ギ大動脈に対し、対照ウサギ、[<sup>125</sup>I]AHP7sc と比較して高く集積すること、加えて、 [<sup>125</sup>I]AHP7 の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。以上の結果より、[<sup>123</sup>I]AHP7 が、不安定性動脈硬化プラークにおける OxLDL イ メージングプローブとなりうる可能性を有することを明らかにした。

2. FABP4標的核医学分子イメージングプローブとして7種類のプローブ候補化合物を 設計、合成し、その内、[<sup>125</sup>I]TAP1 が高い FABP4 親和性、細胞膜透過性を有することを 見出した。しかし、[<sup>125</sup>I]TAP1 が高い非特異結合性を示したことから、脂溶性を低減し た[<sup>18</sup>F]FTAP1 を設計、合成し、[<sup>18</sup>F]FTAP1 が FABP4 に対する高い親和性、サブタイプ選 択性と、低い非特異的結合性の両方の特性を併せ持つことを示した。また、[<sup>18</sup>F]FTAP1 がイ ンビボにおいて腫瘍への経時的な集積性を示すこと、摘出腫瘍切片中の[<sup>18</sup>F]FTAP1 の放射 能分布が脂肪細胞に発現する FABP4 の発現部位と一致する傾向にあることを示し、さらに、 PET で皮下腫瘍を描出することに成功した。以上の結果より、[<sup>18</sup>F]FTAP1 が、CAA における FABP4 イメージングプローブとなりうる可能性を有することを明らかにした。

以上、本研究は、動脈硬化症とがんの病態に関与する因子を標的とした放射性ハロゲ ン標識核医学分子イメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものであり、こ れらの知見は、動脈硬化症とがんの病態評価、新規治療薬開発に有益な情報を提供する ものと考えられる。

# 引用文献

- Alsheikh-Ali A, Kitsios G, Balk E, Lau J, Ip S. The Vulnerable Atherosclerotic Plaque: Scope of the Literature. *Ann Intern Med* 2010;153(6):387-W149.
- Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, Nagahiro S. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22(10):1649-1654.
- Aikawa M, Sugiyama S, Hill C, Voglic S, Rabkin E, Fukumoto Y, Schoen F, Witztum J, Libby P. Lipid lowering reduces oxidative stress and endothelial cell activation in rabbit atheroma. *Circulation* 2002;106(11):1390-1396.
- Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun C, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev V, Fazio S, Linton M, Sulsky R, Robl J, Parker R, Hotamisligil G. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 2007;447(7147):959-U952.
- Kudo Y, Fukuchi Y, Kumagai T, Ebina K, Yokota K. Oxidized low-density lipoprotein-binding specificity of Asp-hemolysin from Aspergillus fumigatus. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj* 2001;1568(3):183-188.
- Kumagai T, Tsutsumi H, Gawa N, Naito S, Ebina K, Yokota K, Nagata K. Oxidized low-density lipoprotein-binding specificity of the asp-hemolysin-related synthetic peptides from Aspergillus fumigatus. *Biol Pharm Bull* 2006;29(11):2181-2186.
- 7. Lan H, Cheng C, Kowalski T, Pang L, Shan L, Chuang C, Jackson J, Rojas-Triana A, Bober L, Liu L, Voigt J, Orth P, Yang X, Shipps G, Hedrick J. Small-molecule inhibitors of FABP4/5 ameliorate dyslipidemia but not insulin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Lipid Res* 2011;52(4):646-656.
- Sanz J, Fayad Z. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* 2008;451(7181):953-957.
- Finn A, Nakano M, Narula J, Kolodgie F, Virmani R. Concept of Vulnerable/Unstable Plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30(7):1282-1292.
- Ohtani T, Ueda Y, Mizote I, Oyabu J, Okada K, Hirayama A, Kodama K. Number of yellow plaques detected in a coronary artery is associated with future risk of acute coronary syndrome - Detection of vulnerable patients by angioscopy. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(11):2194-2200.
- Itabe H. Oxidized phospholipids as a new landmark in atherosclerosis. *Prog Lipid Res* 1998;37(2-3):181-207.
- 12. Zalutsky MR, Narula AS. A method for the radiohalogenation of proteins resulting in

decreased thyroid uptake of radioiodine. *Int J Rad Appl Instrum A* **1987**;38(12):1051-1055.

- Sigala F, Kotsinas A, Savari P, Filis K, Markantonis S, Iliodromitis EK, Gorgoulis VG, Andreadou I. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. *J Vasc Surg* 2010;52(3):704-713.
- Liu SY, Lu X, Choy S, Dembinski TC, Hatch GM, Mymin D, Shen X, Angel A, Choy PC, Man RY. Alteration of lysophosphatidylcholine content in low density lipoprotein after oxidative modification: relationship to endothelium dependent relaxation. *Cardiovasc Res* 1994;28(10):1476-1481.
- 15. Boyd HC, Gown AM, Wolfbauer G, Chait A. Direct evidence for a protein recognized by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* **1989**;135(5):815-825.
- Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(2):110-115.
- Kudo Y, Ootani T, Kumagai T, Fukuchi Y, Ebina K, Yokota K. A novel oxidized low-density lipoprotein-binding protein, Asp-hemolysin, recognizes lysophosphatidylcholine. *Biol Pharm Bull* 2002;25(6):787-790.
- Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 2000;1488(3):189-210.
- Shiomi M, Ito T, Yamada S, Kawashima S, Fan J. Development of an animal model for spontaneous myocardial infarction (WHHLMI rabbit). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(7):1239-1244.
- Tsimikas S, Palinski W, Halpern SE, Yeung DW, Curtiss LK, Witztum JL. Radiolabeled MDA2, an oxidation-specific, monoclonal antibody, identifies native atherosclerotic lesions in vivo. *J Nucl Cardiol* 1999;6(1 Pt 1):41-53.
- Ramos-Suzarte M, Pintado A, Mesa N, Oliva J, Iznaga-Escobar N, Aroche L, Pimentel G, Gonzalez J, Cordero M, Rodriguez O, Crombet R, Perez R. Diagnostic efficacy and safety of Tc-99m-labeled monoclonal antibody ior c5 in patients with colorectal and anal carcinomas Final report clinical trial phase I/II. *Cancer Biol Ther* 2007;6(1):22-29.
- 22. Ishino S, Mukai T, Kuge Y, Kume N, Ogawa M, Takai N, Kamihashi J, Shiomi M, Minami M, Kita T, Saji H. Targeting of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1) with 99mTc-labeled anti-LOX-1 antibody: potential agent for imaging of vulnerable plaque. *J Nucl Med* 2008;49(10):1677-1685.

- Glaudemans A, Slart R, Bozzao A, Bonanno E, Arca M, Dierckx R, Signore A. Molecular imaging in atherosclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010;37(12):2381-2397.
- 24. Khandani AH, Dunphy CH, Meteesatien P, Dufault DL, Ivanovic M, Shea TC. Glut1 and Glut3 expression in lymphoma and their association with tumor intensity on 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Nucl Med Commun* 2009;30(8):594-601.
- 25. Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Molecular and cellular imaging of atherosclerosis: emerging applications. *J Am Coll Cardiol* **2006**;47(7):1328-1338.
- Zhao Y, Kuge Y, Zhao S, Morita K, Inubushi M, Strauss HW, Blankenberg FG, Tamaki N. Comparison of 99mTc-annexin A5 with 18F-FDG for the detection of atherosclerosis in ApoE-/- mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34(11):1747-1755.
- 27. Ishino S, Kuge Y, Takai N, Tamaki N, Strauss HW, Blankenberg FG, Shiomi M, Saji H. 99mTc-Annexin A5 for noninvasive characterization of atherosclerotic lesions: imaging and histological studies in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34(6):889-899.
- Mueller M, Fusenig N. Friends or foes Bipolar effects of the tumour stroma in cancer. Nat Rev Cancer 2004;4(11):839-849.
- 29. Wagner M, Bjerkvig R, Wiig H, Melero-Martin J, Lin R, Klagsbrun M, Dudley A. Inflamed tumor-associated adipose tissue is a depot for macrophages that stimulate tumor growth and angiogenesis. *Angiogenesis* 2012;15(3):481-495.
- 30. Hefetz-Sela S, Scherer P. Adipocytes: Impact on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* **2013**;138(2):197-210.
- 31. Nieman K, Kenny H, Penicka C, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt M, Romero I, Carey M, Mills G, Hotamisligil G, Yamada S, Peter M, Gwin K, Lengyel E. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med* 2011;17(11):1498-U1207.
- 32. Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, Wang Y, Meulle A, Salles B, Le Gonidec S, Garrido I, Escourrou G, Valet P, Muller C. Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. *Cancer Res* 2011;71(7):2455-2465.
- 33. Furuhashi M, Hotamisligil G. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **2008**;7(6):489-503.
- 34. Makowski L, Brittingham K, Reynolds J, Suttles J, Hotamisligil G. The fatty acid-binding protein, aP2, coordinates macrophage cholesterol trafficking and

inflammatory activity - Macrophage expression of aP2 impacts peroxisome proliferator-activated receptor gamma and I kappa B kinase activities. *J Biol Chem* **2005**;280(13):12888-12895.

- 35. Sulsky R, Magnin D, Huanga Y, Simpkins L, Taunk P, Patel M, Zhu Y, Stouch T, Bassolino-Klimas D, Parker R, Harrity T, Stoffel R, Taylor D, Lavoie T, Kish K, Jacobson B, Sheriff S, Adam L, Ewing W, Robl J. Potent and selective biphenyl azole inhibitors of adipocyte fatty acid binding pirotein (aFABP). *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17(12):3511-3515.
- 36. Hertzel A, Hellberg K, Reynolds J, Kruse A, Juhlmann B, Smith A, Sanders M, Ohlendorf D, Suttles J, Bernlohr D. Identification and Characterization of a Small Molecule Inhibitor of Fatty Acid Binding Proteins. J Med Chem 2009;52(19):6024-6031.
- 37. Cai H, Yan G, Zhang X, Gorbenko O, Wang H, Zhu W. Discovery of highly selective inhibitors of human fatty acid binding protein 4 (FABP4) by virtual screening. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20(12):3675-3679.
- 38. Ringom R, Axen E, Uppenberg J, Lundback T, Rondahl L, Barf T. Substituted benzylamino-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4(1H)-ones: a novel class of selective human A-FABP inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**;14(17):4449-4452.
- 39. Lehmann F, Haile S, Axen E, Medina C, Uppenberg J, Svensson S, Lundback T, Rondahl L, Barf T. Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14(17):4445-4448.
- 40. Dolzhenko A, Chui W. Practical synthesis of regioisomeric 5(7)-amino-6,7(4,5)-dihydro[1,2,4]triazolo[1,5-a][1,3,5]triazines. *Tetrahedron* 2007;63(52):12888-12895.
- 41. Chen X, Murawski A, Hladik L, Crespi CL. A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA Model. *Application Note #479*.
- 42. Camenisch G, Alsenz J, van de Waterbeemd H, Folkers G. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *Eur J Pharm Sci* **1998**;6(4):313-319.
- 43. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Santangelo C, Scazzocchio B, Maggiorella M, Sernicola L, Titti F, Sanchez M, Di Mario U, Leto G, Giovannini C. Oxidised LDL modulate adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by affecting the balance between cell proliferation and differentiation. *Febs Lett* 2006;580(10):2421-2429.
- 44. Cataltepe O, Arikan M, Ghelfi E, Karaaslan C, Ozsurekci Y, Dresser K, Li Y, Smith T,

Cataltepe S. Fatty acid binding protein 4 is expressed in distinct endothelial and non-endothelial cell populations in glioblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* **2012**;38(5):400-410.

- 45. Yamaguchi J, Ohtani H, Nakamura K, Shimokawa I, Kanematsu T. Prognostic impact of marginal adipose tissue invasion in ductal carcinoma of the breast. *Am J Clin Pathol* **2008**;130(3):382-388.
- 46. Okada T, Hiromura M, Otsuka M, Enomoto S, Miyachi H. Synthesis of BMS-309403-related compounds, including [<sup>14</sup>C]BMS-309403, a radioligand for adipocyte fatty acid binding protein. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2012**;60(1):164-168.

# 謝 辞

本研究の終わりに鑑み、終始御懇意なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院 薬学研究科 佐治 英郎 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

同時に、本研究の遂行および本論文の作成にあたり、懇切なる御指導と御教示を戴き ました京都大学大学院薬学研究科 天滿 敬 助教に深く感謝申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり有益な御助言と御指導、御協力を戴きました京都大学大 学院薬学研究科 小野 正博 准教授、京都大学環境安全保健機構 木村 寛之 助教、 京都大学医学部附属病院 佐野 紘平 助教、WHHLMI ウサギを分与戴きました神戸 大学大学院医学研究科附属動物実験施設 塩見 雅志 准教授、3T3-L1 細胞を用いる 実験に関しご教授を戴きました東京農工大学大学院農学研究院 木村 郁夫 准教授 に厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、多くの有益な御助言を戴きました北海道医療大学薬学 部 河嶋 秀和 准教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 上田 真史 准教授、 福井大学高エネルギー医学研究センター 牧野 顕 助教、北海道大学アイソトープ総 合センター 志水 陽一 助教、京都大学大学院薬学研究科 渡邊 裕之 助教、天野 博夫 研究員にそれぞれ謹んで感謝いたします。

さらに、ともに実験を進め、ご協力を戴きました京都大学大学院薬学研究科 森 大 輔 博士、小川 祐 博士、松田 洋和 博士、小川 侑記 修士、正木 悠紀子 修 士、渡邉 裕之 修士、林 瞬 修士、原田 直弥 修士、平沢 真 修士、屋木 祐 亮 修士、尾江 悟 修士、近藤 直哉 修士、松村 憲志 修士、依田 敬子 学士、 荒井 貴大 学士、金崎 健吾 氏、米澤 晶 氏、三平 崇太郎 氏をはじめ、病態 機能分析学分野の方々にそれぞれ謹んで御礼申し上げます。

最後に、著者が研究に専念できるよう陰ながら支えて下さいました家族に感謝いたし ます。

82