

アミロイドーシスおよび固形腫瘍の診断・治療を
目的とした多価放射性金属錯体の開発に関する研究

2018

飯國 慎平

目次

緒言	1	
第1章	脳アミロイドアンギオパチーの早期診断を目的とした 脳血管アミロイド標的2価 ^{99m} Tc錯体の開発	4
第1節	2価 ^{99m} Tc錯体を用いたアミロイド凝集体に対する多価効果の検証	5
1.1.1.	実験方法	7
1.1.2.	結果	11
1.1.3.	考察	19
1.1.4.	小括	22
第2節	2価 ^{99m} Tc錯体を基盤とする 脳アミロイドアンギオパチーイメージング薬剤の開発	23
1.2.1.	実験方法	25
1.2.2.	結果	27
1.2.3.	考察	35
1.2.4.	小括	37
第3節	脳アミロイドアンギオパチーイメージングを目的とした <i>N</i> -メチル化 ヒドロキサムアミドを配位子とする新規2価 ^{99m} Tc錯体の合成と評価	38
1.3.1.	実験方法	39
1.3.2.	結果	42
1.3.3.	考察	48
1.3.4.	小括	49
第2章	固形腫瘍の画像診断・治療を目的とした 炭酸脱水酵素-IX標的セラノスティクス用2価 ¹¹¹ In/ ⁹⁰ Y錯体の開発	50
2.1.	実験方法	53
2.2.	結果	60
2.3.	考察	78
2.4.	小括	81
結語	82	
引用文献	84	
学術雑誌公表論文	91	
謝辞	92	

緒言

現在、金属錯体は様々な疾患の診断および治療に利用されている[1, 2]。金属錯体において、金属とそれに結合する非金属原子の割合は 1 対多であるため、ひとつの金属に対して複数の分子を結合させることができる。したがって、複数の同一機能性分子を含有する金属錯体を容易に作製することが可能であり、単一の機能性分子と比較して、その機能の増強効果が得られると考えられる。さらに、放射性金属を用いることにより、核医学画像診断のためのシグナル放出および放射性同位元素内用療法のための内部照射の機能を錯体に付与することができる。配位させる放射性金属を異なる機能を有する金属に置換することにより、錯体の基本構造を変更することなく、異なる機能を有する放射性金属錯体を簡便に作製することができる(Figure)。

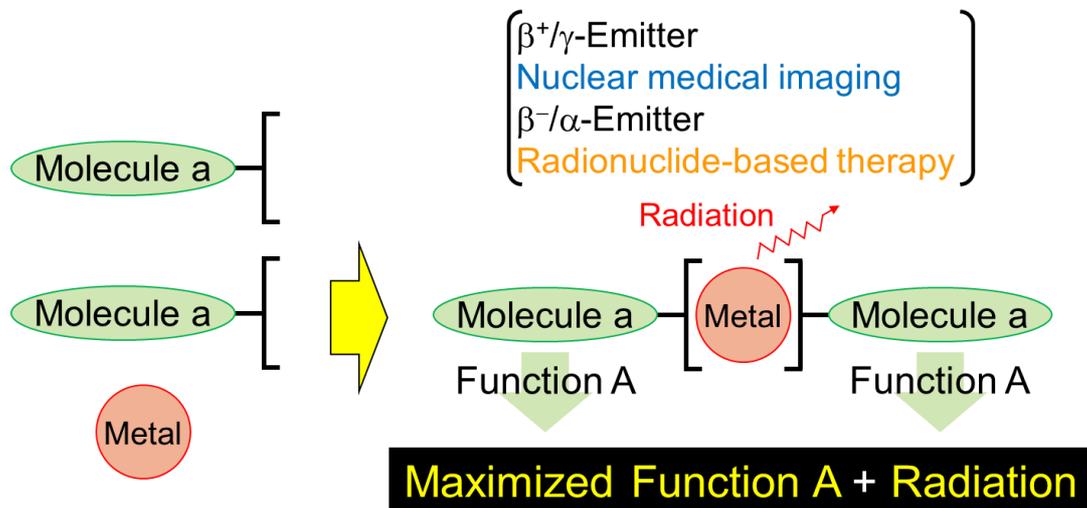


Figure. Design of the radiometallic chelate consisting of a multivalent molecule with a function.

本研究では、金属錯形成を基盤とした薬剤設計により、脳アミロイドアンギオパチー(cerebral amyloid angiopathy, CAA)におけるアミロイド凝集体または固形腫瘍の低酸素領域における炭酸脱水酵素(carbonic anhydrase, CA)-IX に対して特異的親和性を有する低分子化合物を、機能性分子として 2 分子導入した 2 価放射性金属錯体を設計し、それぞれの疾患に対する診断および治療用放射性薬剤の開発を計画した。

CAA は、脳血管にアミロイドと呼ばれる線維状の異常タンパク質凝集体が沈着する病態であり、脳内出血や脳血管性認知症の主因となっている[3]。現在、CAA は主に生体検査およびコンピュータ断層撮像(computed tomography, CT)や核磁気共鳴イメージング(magnetic resonance imaging, MRI)により診断されているが、それらの高い侵襲性や低い疾患特異性が問題となっている。そこで、非侵襲的かつ疾患特異的な CAA 診断を可能とする、CAA 標的放射性薬剤の開発を計画した。アミロイド凝集体に対する結合性が報告されているスチルベン誘導体(stilbene derivative, SB) [4]およびベンゾ

チアゾール誘導体(benzothiazole derivative, BT) [5]を、錯形成を利用することにより 1 または 2 分子導入した ^{99m}Tc -ヒドロキサムアミド(hydroxamamide, Ham)錯体(^{99m}Tc]SB1~2, ^{99m}Tc]BT1~2)を設計・合成した。アミロイド凝集体を用いた結合阻害実験において、1 錯体あたりに含まれるアミロイドリガンド数の増加に伴い、SB および BT いずれにおいても、アミロイド凝集体に対する親和性の増強が認められ、2 価金属錯体によるアミロイド凝集体に対する多価効果を実証された[6]。

アミロイド凝集体に対する高い親和性を示した 2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体(^{99m}Tc]SB2 および ^{99m}Tc]BT2) について、正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行ったところ、いずれも低い脳移行性を示した。さらに、脳内アミロイド過剰産生モデルマウスを用いた *ex vivo* オートラジオグラフィ (autoradiography, ARG)において、脳血管に沈着したアミロイドに対する特異的な高い放射能集積を示し、体内分布実験の結果を反映して CAA のみを明瞭に描出し、脳実質に存在する老人斑は描出しなかった。以上の結果より、2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体は CAA 特異的診断用放射性薬剤となり得ることが示され、複数の機能性分子を導入することができる錯形成を基盤とした分子設計が、生体分子イメージングを目的とした放射性薬剤の開発に有効であることを見出した[7]。

さらに、 ^{99m}Tc -Ham 錯体に特徴的な異性体の生成の抑制を目的として、 ^{99m}Tc]BT2 を *N*-メチル化した ^{99m}Tc]MBT2 を設計・合成し、CAA 診断用放射性薬剤としての基礎的評価を行った。 ^{99m}Tc]MBT2 の調製において、単一の ^{99m}Tc 錯体の生成が確認された。また、 ^{99m}Tc]MBT2 は ^{99m}Tc]BT2 と比較して、マウス血漿における高い安定性を示した。 ^{99m}Tc]MBT2 は ^{99m}Tc]BT2 と同様に、顕著な脳移行性を示さなかったが、*N*-メチル化によりアミロイド凝集体に対する *in vitro* 親和性が低減することが認められた。以上の結果より、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の錯形成部位が、マウス血漿における安定性およびアミロイド凝集体に対する親和性に関して重要な役割を担うことを見出した[8]。

固形腫瘍における低酸素領域は化学療法や放射線治療に対する抵抗性を示し、腫瘍の増殖・転移に深く関わると考えられている[9]。近年、低酸素がん細胞が腫瘍の増殖や外部放射線治療に伴って、劇的にその絶対的局在を変えることが報告されている[10]。そのため、低酸素領域を標的とした治療にはリアルタイムなイメージングが重要であり、その実現には治療と診断の融合、即ちセラノスティクスの概念が有効であると考えられる。セラノスティクス(theranostics)とは、治療(therapeutics)および診断(diagnosics)のそれぞれのモダリティを組み合わせたものと定義される[11]。また、CA-IX は固形腫瘍の低酸素領域に高く特異的に発現することが知られており、ウレイドスルホンアミド誘導体(ureidosulfonamide derivative, US)が CA-IX に対する高い親和性を有することが報告されている[12]。そこで、単光子放出断層撮像(single photon emission computed tomography, SPECT)または内部放射線治療用として ^{111}In または ^{90}Y をそれぞれ配位させ、US を 2 分子導入した 2 価放射性金属錯体である $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$]US2 を設計・合成し、CA-IX 高発現腫瘍の SPECT イメージング(^{111}In]US2)および放射性同位元素内用療法(^{90}Y]US2)に関して評価した。 ^{111}In]US2 を用いた SPECT により、CA-IX 高発現腫瘍移植モデルマウスにおける腫瘍を、選択的かつ明瞭にイメージングすることに成功した。続いて、 ^{90}Y]US2 を CA-IX 高発現腫瘍移植モデルマウスに投与したところ、生理食塩水投与群と比較し

て、腫瘍成長が有意に遅延した。以上の結果より、 $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ および $[^{90}\text{Y}]\text{US2}$ は、CA-IX を標的とした固形腫瘍の画像診断および治療を可能とすることが示され、がんのセラノスティクスに有用であることを見出した[13]。

以上、本研究は CAA における脳血管アミロイドおよび固形腫瘍の低酸素領域における CA-IX を標的とした画像診断・治療に有効な多価放射性金属錯体の開発に成果を収めたものであり、今後、様々な疾患に対する診断および治療用放射性薬剤の開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

第1章

脳アミロイドアンギオパチーの早期診断を目的とした 脳血管アミロイド標的 2価 ^{99m}Tc 錯体の開発

背景

アミロイドーシスとは、アミロイドと呼ばれる線維状の異常タンパク質凝集体が臓器や組織に沈着し、機能障害を引き起こす病態の総称である[14]。アミロイドーシスは一般的に、沈着するアミロイドの化学的性質に従って、全身性または限局性のものに分類される。アミロイドとして、アルツハイマー病(Alzheimer's disease, AD)における老人斑およびCAAにおける脳血管アミロイドの主成分であるβ-アミロイド(β-amyloid, Aβ)、プリオン病におけるプリオンタンパク質、II型糖尿病におけるアミリンなどが挙げられる。これらのアミロイド凝集体は疾患の臨床症状が現れる前に沈着が認められるため[15]、これらを *in vivo* で検出することは、対応するアミロイドーシスの早期診断に繋がると考えられる。さらに、アミロイドを *in vivo* で観察することは、抗アミロイド治療のような新規治療法の開発を支援すると考えられる。以上のことから、アミロイドーシスの疾患特異的診断を可能とする、非侵襲的な診断法の開発が強く望まれている。

アミロイドーシスの非侵襲的な診断において、陽電子断層撮像(positron emission tomography, PET)やSPECTといった核医学分子イメージングが主に利用され、現在までに、AD患者脳内の老人斑のイメージングを可能とするPETならびにSPECT用放射性薬剤の開発研究が活発に行われてきた。 [¹⁸F]florbetapir [16]、 [¹⁸F]florbetaben [4]、 [¹⁸F]flutemetamol [5]、 [¹¹C]Pittsburgh compound-B (PIB) [17]のようなPET用薬剤を用いた臨床研究が数多く行われ、AD診断に対する有用性が示されてきた(Figure 1-1)。特に、 [¹⁸F]florbetapir、 [¹⁸F]florbetaben、 [¹⁸F]flutemetamolの3剤がPET用Aβイメージング薬剤として欧米で承認されている。これらの薬剤は、アミロイド凝集体中のβ-sheet構造を認識すると考えられており、高密度のAβから構成されるdense plaqueには強く結合するが、Aβの乏しいdiffuse plaqueには比較的弱い結合性を示すことが報告されている[18]。さらに、近年、アミロイドの凝集過程において比較的β-sheet構造が乏しい、凝集度が低いアミロイドオリゴマーが、凝集体と比較して、より高い毒性を有することが報告されている[19]。したがって、アミロイドーシスの早期診断には、より高い親和性を有するイメージング薬剤が必要であると考えられる。

以上のことから、強力なアミロイド親和性を有するイメージング薬剤は、アミロイドーシスを発症過程において重要な段階で診断することを可能とすると考え、独自の分子設計により、アミロイド親和性を向上させたアミロイドイメージング放射性薬剤の開発を計画した。さらに、開発した化合物群が、実際に分子イメージング薬剤として機能し得るかを検証するため、アミロイドーシスの1種であるCAAにおける脳血管アミロイド標的イメージング薬剤としての有用性評価を行った。

第1節

2価^{99m}Tc錯体を用いたアミロイド凝集体に対する多価効果の検証

有用な分子イメージング薬剤の必須条件のひとつとして、標的分子に対する高い親和性が挙げられる。多価効果は、同一分子に複数のリガンドを導入することにより、標的に対する親和性が向上することを特徴とする[20]。例として、細胞接着因子であるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ はがんの増殖などに関与すると考えられており、そのリガンドである RGD 配列を有するペプチドを同一分子中に複数含有する放射性イメージング薬剤、即ち多価 RGD ペプチドが、多くの研究者により利用されてきた[21]。アミロイド凝集体についても、多価アミロイドリガンドを有するイメージング薬剤の開発に関する研究が報告されているが、多価リガンドによるアミロイド凝集体に対する親和性の向上は観測されなかった[22]。

Ham は硫黄原子を含まず、高い放射化学的収率および安定性で^{99m}Tcと錯体を形成する配位子である。Ham はニトリルとヒドロキシルアミンとの1段階反応により容易に合成することができる。さらに、2座配位子であるため、Ham化合物2分子から^{99m}Tc錯体1分子が生成される。よって、2種類のHam化合物を含む^{99m}Tc錯体を作製することができる[23]。このような特徴のため、Hamは2価アミロイドリガンドを有する^{99m}Tc錯体の合成に有効であると考えられる。

そこで、アミロイド凝集体に対する親和性の向上を目的として、1および2価アミロイドリガンドを含む^{99m}Tc-Ham錯体を新たに設計した。アミロイドリガンドとして、**Figure 1-1**に示す、^[18F]florbetapir [16]と^[18F]florbetaben [4]の基本骨格であるSB、および^[18F]flutemetamol [5]と^[11C]PIB [17]の基本骨格であるBTを選択し、^[99mTc]SB1、^[99mTc]SB2、^[99mTc]BT1、および^[99mTc]BT2を合成した(**Figure 1-2**)。2価^{99m}Tc-Ham錯体によるアミロイド凝集体に対する親和性の向上、即ち多価効果を検証するため、モデルアミロイドとしてA β (1-42)を用いて、^{99m}Tc-Ham錯体のアミロイド親和性を系統的に評価した。また、対照として、アミロイド親和性を有しないジメチルアミノベンゼンを2分子導入した^[99mTc]DABを合わせて設計・合成し、アミロイド凝集体に対する親和性について、^[99mTc]SB1、^[99mTc]SB2、^[99mTc]BT1、および^[99mTc]BT2と比較検討した。

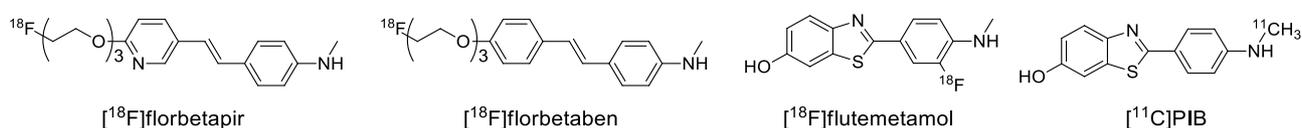


Figure 1-1. A β -targeted PET imaging agents. Chemical structure of ^[18F]florbetapir, ^[18F]florbetaben, ^[18F]flutemetamol, and ^[11C]PIB as clinically available A β imaging agents.

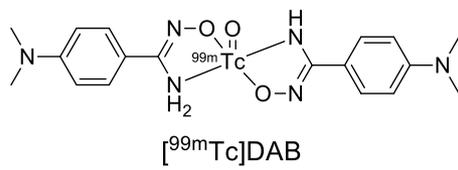
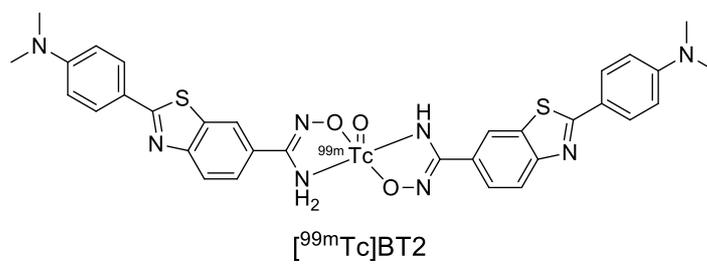
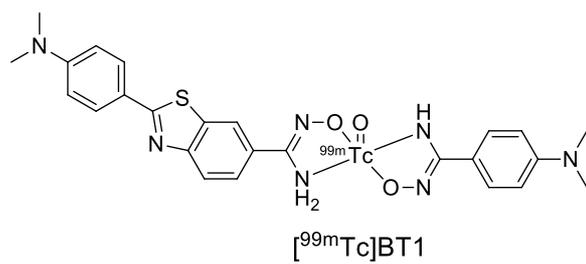
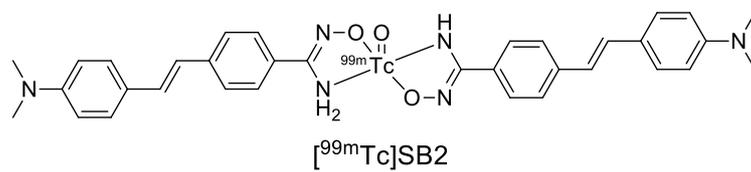
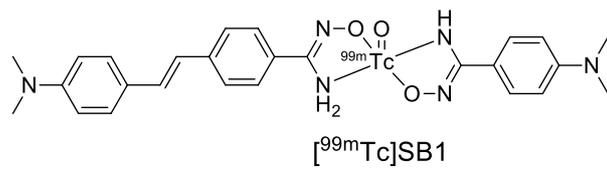


Figure 1-2. Proposed structure of the ^{99m}Tc-Ham complexes.

1.1.1. 実験方法

試薬・機器

試薬は、東京化成工業株式会社、ナカライテスク株式会社、和光純薬工業株式会社、ABX 社、Ark Pharm 社、Strem Chemicals 社から購入した。中圧分取液体クロマトグラフィーには、山善株式会社製自動設定中圧分取液体クロマトグラフシステム[EPCLC-W-Prep 2XY; 送液ポンプ(ミキサー内臓): No. 580D, 検出器(波長固定型): prep UV-254W, フラクションコレクター: FR-260]を使用し、HI-FLASH COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 µm, カラムサイズ: L または 2L) および INJECT COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 µm, カラムサイズ: M または L) を装着した。核磁気共鳴分光(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)には、日本電子株式会社製 JNM-ECS400 を用い、tetramethylsilane を内部標準物質として測定した。電子イオン化高分解能質量分析(electron ionization high-resolution mass spectrometry, EI-HRMS)には、日本電子株式会社製 GCMate II を用いた。Aβペプチド(human, 1-42) [トリフルオロ酢酸(trifluoroacetic acid, TFA) form] は、株式会社ペプチド研究所より購入した。Na^{99m}TcO₄ は日本メジフィジックス株式会社より購入した。高速液体クロマトグラフィー(high-performance liquid chromatography, HPLC)には、株式会社島津製作所製 LC-20AT を使用し、検出器として株式会社島津製作所製紫外スペクトル検出器 SPD-20A と日立アロカメディカル株式会社製シンチレーションサーベイメーターTCS-172 またはユニバーサル技研株式会社製 HPLC 用放射線検出器 US-3000T を使用した。逆相 HPLC 用カラムは、ナカライテスク株式会社製 Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6 mm I.D. × 150 mm) を使用した。放射能の測定には、パーキンエルマー社製 Wallac WIZARD 1470 または Wallac WIZARD 1480、および ALOKA 社製キュリーメーターIGC-7 を用いた。イメージングプレートは、富士フイルム株式会社製 BAS-SR2025 を使用した。イメージングプレートの読み込みには、富士フイルム株式会社製バイオイメージングアナライザーBAS-5000 を使用し、解析には、富士フイルム株式会社製 MultiGauge を使用した。マイクロトームは、Leica Microsystems 社製クライオスタット CM1900 を使用した。蛍光染色像および免疫染色像は、株式会社キーエンス製 BZ-9000 を用いて観察した。

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。アミロイド前駆タンパク質過剰発現遺伝子改変(Tg2576)マウスおよび野生型マウスは Taconic 社より購入した。動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し、飼料と水は自由に与えた。

Ham 化合物の合成

Diethyl (Z)-(4-(N'-hydroxycarbamimidoyl)benzyl)phosphonate (1)

diethyl (4-cyanobenzyl)phosphonate (759 mg, 3.0 mmol) のエタノール(20 mL)溶液にヒドロキシルアミン塩酸塩(625 mg, 9.0 mmol) と トリエチルアミン(1.25 mL, 9.0 mmol) を加え、反応液を 2 時間加熱還流

した。溶媒を減圧留去した後、超純水を加えた。クロロホルムを加えて抽出し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 10:1)で精製して目的物 **1** を収量 790 mg (92%)で得た。¹H NMR (400 MHz, ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide, DMSO)-*d*₆) δ 9.58 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 5.76 (s, 2H), 3.98–3.91 (m, 4H), 3.24 (d, *J* = 21.8 Hz, 2H), 1.17 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 150.7, 133.1, 131.6, 129.5 (2C), 125.3 (2C), 61.4 (2C), 32.0, 16.2 (2C). EI-HRMS *m/z* calculated for C₁₂H₁₉N₂O₄P⁺ (M⁺), 286.1082; found, 286.1086.

(Z)-4-((E)-4-(Dimethylamino)styryl)-N'-hydroxybenzimidamide (2)

化合物 **1** (100 mg, 0.35 mmol)および 4-(dimethylamino)benzaldehyde (52 mg, 0.35 mmol)の *N,N*-ジメチルホルムアミド(*N,N*-dimethylformamide, DMF) (10 mL)溶液に sodium methoxide (5 M メタノール溶液, 0.14 mL, 0.70 mmol)をゆっくり加え、室温で3時間攪拌した。析出した固体を濾取し、超純水で洗浄後、シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 10:1)で精製して目的物 **2** を収量 30 mg (31%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.60 (s, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 5.77 (s, 2H), 2.94 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 150.6, 150.0, 138.4, 131.2, 129.2, 127.6 (2C), 125.5 (2C), 125.4 (2C), 124.8, 122.9, 112.2 (2C), 39.9 (2C). EI-HRMS *m/z* calculated for C₁₇H₁₉N₃O⁺ (M⁺), 281.1528; found, 281.1532.

2-(4-(Dimethylamino)phenyl)benzo[*d*]-thiazole-6-carbonitrile (3)

2-bromobenzo[*d*]-thiazole-6-carbonitrile (1165 mg, 5.0 mmol)、*N,N*-dimethyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (1483 mg, 6.0 mmol)および tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (577 mg, 0.50 mmol)の 2 M 炭酸ナトリウム水溶液/ジオキサン (1:1, 40 mL)混合溶液を2時間加熱還流した。反応溶液を室温に戻した後、酢酸エチル(150 mL)と超純水(150 mL)を加えた。析出した固体を濾取して目的物 **3** を収量 1061 mg (76%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.64 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.05 (s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂-*d*₂) δ 173.1, 157.4, 153.3, 135.4, 129.8, 129.6 (2C), 126.4, 122.8, 120.6, 119.4, 112.0 (2C), 107.5, 40.3 (2C). EI-HRMS *m/z* calculated for C₁₆H₁₃N₃S⁺ (M⁺), 279.0830; found, 279.0827.

(Z)-2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-N'-hydroxybenzo[*d*]thiazole-6-carboximidamide (4)

化合物 **1** の合成反応と同様の反応を行い、目的物 **4** を化合物 **3** から収率 58%で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.71 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.89 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.89 (s, 2H), 3.03 (s, 6H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 168.5, 154.2, 152.3, 150.5, 133.7, 129.6, 128.5 (2C), 123.9, 121.2, 120.0, 118.7, 111.8 (2C), 39.7 (2C). EI-HRMS *m/z* calculated for C₁₆H₁₆N₄OS⁺ (M⁺), 312.1045; found, 312.1043.

(Z)-4-(Dimethylamino)-N'-hydroxybenzimidamide (5)

化合物 1 の合成反応と同様の反応を行い、目的物 5 を 4-(dimethylamino)benzotrile から収率 34% で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.25 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.58 (s, 2H), 2.91 (s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 151.0, 150.7, 126.1 (2C), 120.8, 111.4 (2C), 39.9 (2C). EI-HRMS *m/z* calculated for C₉H₁₃N₃O⁺ (M⁺), 179.1058; found, 179.1061.

^{99m}Tc 標識反応

化合物 2、化合物 4、または化合物 5 (0.2 mg) の酢酸/エタノール混合溶液(1:4, 200 μL) に Na^{99m}TcO₄ 溶液(100 μL) および酒石酸すず(II)水和物(3.0 mM 水溶液, 15 μL) を加えた。反応液を室温で 30 分間静置し、逆相 HPLC を用いて精製した。

Aβ(1-42)凝集体の作製

リン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline, PBS)を用いて Aβ(1-42)が 0.25 mg/mL の濃度になるように調整し、37 °C で 42 時間静置することにより、Aβ(1-42)凝集体溶液を作製した。

Aβ(1-42)凝集体を用いた結合実験

Aβ(1-42)凝集体 PBS 溶液(最終 1.25 μg/mL, 50 μL)、^{99m}Tc-Ham 錯体 30%エタノール溶液(8.3 kBq, 50 μL)、30%エタノール(900 μL)を混和し、室温で 3 時間静置した。混和溶液を Brandel 社製 M-24 セルハーバスターおよび Whatman 社製 GF/B フィルターを用いて吸引濾過し、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定した。得られた結果から、B/F 分離前後の放射能比を算出した。

Aβ(1-42)凝集体を用いた結合阻害実験

Aβ(1-42)凝集体 PBS 溶液(最終 1.25 μg/mL, 50 μL)、^{99m}Tc-Ham 錯体 30%エタノール溶液(8.3 kBq, 50 μL)、非放射性 PIB 30%エタノール溶液(最終 64 pM–125 μM, 50 μL)、30%エタノール(850 μL)を混和し、室温で 3 時間静置した。混和溶液を Brandel 社製 M-24 セルハーバスターおよび Whatman 社製 GF/B フィルターを用いて吸引濾過し、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定した。得られた結果から、GraphPad Prism 5.0 を用いて結合阻害曲線を作成し、50%阻害濃度(half-maximal inhibitory concentration, IC₅₀)を算出した。

Tg2576 および野生型マウス脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

29 か月齢雌性の Tg2576 および野生型マウスを安楽死させ、直ちに脳を摘出し、SECTION-LAB 社製 Super Cryoembedding Medium (SCEM) compound で包埋して、ドライアイス-ヘキサンバスで凍結させた。その後、マイクロトームを用いて 10 μm 厚の凍結切片を作製した。^{99m}Tc-Ham 錯体 50%エタノール溶液(0.37 MBq/mL)を添加し、室温で 1 時間静置した。阻害実験のため、隣接切片に非放射性 PIB (1.0 mM)含有 ^{99m}Tc-Ham 錯体 50%エタノール溶液(0.37 MBq/mL)を添加し、室温で 1 時間静置し

た。50%エタノール(1.5 分間 × 2)で洗浄後、イメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析した。

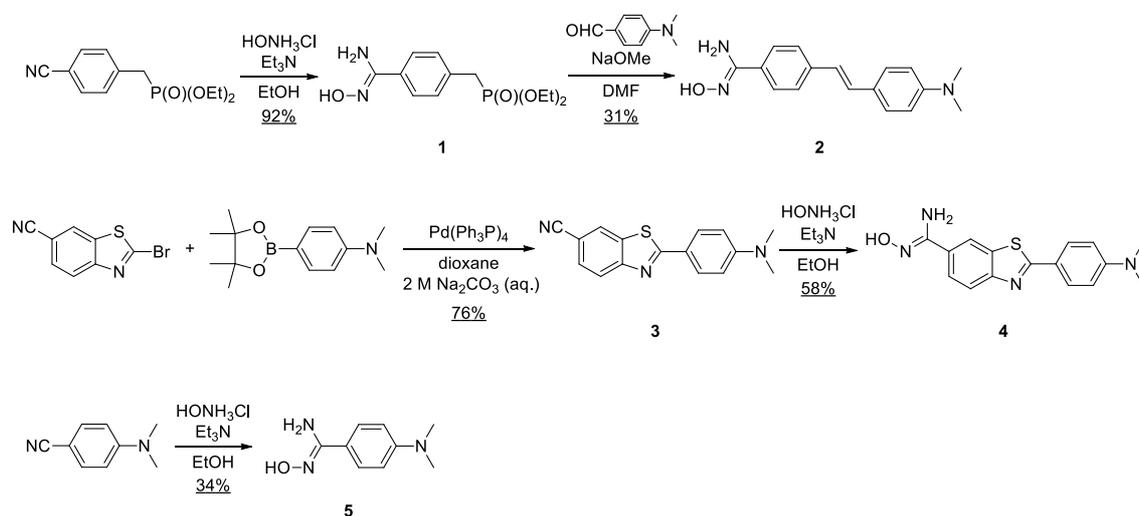
ARG 実験後、同一切片に thioflavin-S (ThS)の 50%エタノール溶液を添加し、50%エタノールで洗浄後、蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行い、脳内アミロイド斑の局在を確認した。

1.1.2. 結果

Ham 化合物の合成

Scheme 1-1 に Ham 化合物の合成経路を示す。既報の方法に従い、diethyl (4-cyanobenzyl)phosphonate および 4-(dimethylamino)benzotrile をそれぞれヒドロキシルアミン塩酸塩と反応させることにより Ham 基を導入し、化合物 **1** および化合物 **5** を収率 92% および 34% で得た[23]。化合物 **1** と 4-(dimethylamino)benzaldehyde との縮合反応により化合物 **2** を収率 31% で得た。2-bromobenzo[*d*]thiazole-6-carbonitrile と *N,N*-dimethyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline とのスズキカップリング反応により、化合物 **3** を収率 76% で得た。化合物 **3** に Ham 基を導入することにより、化合物 **4** を収率 58% で得た。

Scheme 1-1. Synthetic Route of the Precursors for Radiolabeling of the ^{99m}Tc -Ham Complexes



^{99m}Tc 標識反応

^{99m}Tc 標識反応は、Ham 標識前駆体、Na^{99m}TcO₄、ならびに還元剤として酒石酸すず(II)を用いた錯形成反応により行った。**Figure 1-3** に、[^{99m}Tc]SB1、[^{99m}Tc]SB2、[^{99m}Tc]BT1、[^{99m}Tc]BT2、および [^{99m}Tc]DAB の、同一条件における逆相 HPLC 分析の結果を示す。[^{99m}Tc]SB2、[^{99m}Tc]BT2、および [^{99m}Tc]DAB は、それぞれ標識前駆体 **2**、**4**、**5** から作製した。^{99m}Tc 標識反応液を逆相 HPLC により分析すると、^{99m}Tc-Ham 錯体に関する既存の報告のように、2 種類の放射性化合物の生成が確認された [23]。以後、逆相 HPLC において、保持時間がより短い異性体を A 体([^{99m}Tc]SB1A、[^{99m}Tc]SB2A、[^{99m}Tc]BT1A、[^{99m}Tc]BT2A、および[^{99m}Tc]DABA)、より長い異性体を B 体([^{99m}Tc]SB1B、[^{99m}Tc]SB2B、[^{99m}Tc]BT1B、[^{99m}Tc]BT2B、および[^{99m}Tc]DABB)と定義する。

化合物 **2** および化合物 **5** を混合し、^{99m}Tc 錯形成反応を行うと、6 種類の放射性化合物の生成が確認された。同様に、化合物 **4** および化合物 **5** を用いた ^{99m}Tc 錯形成反応により、6 種類の放射性化合物が生成することを確認した。

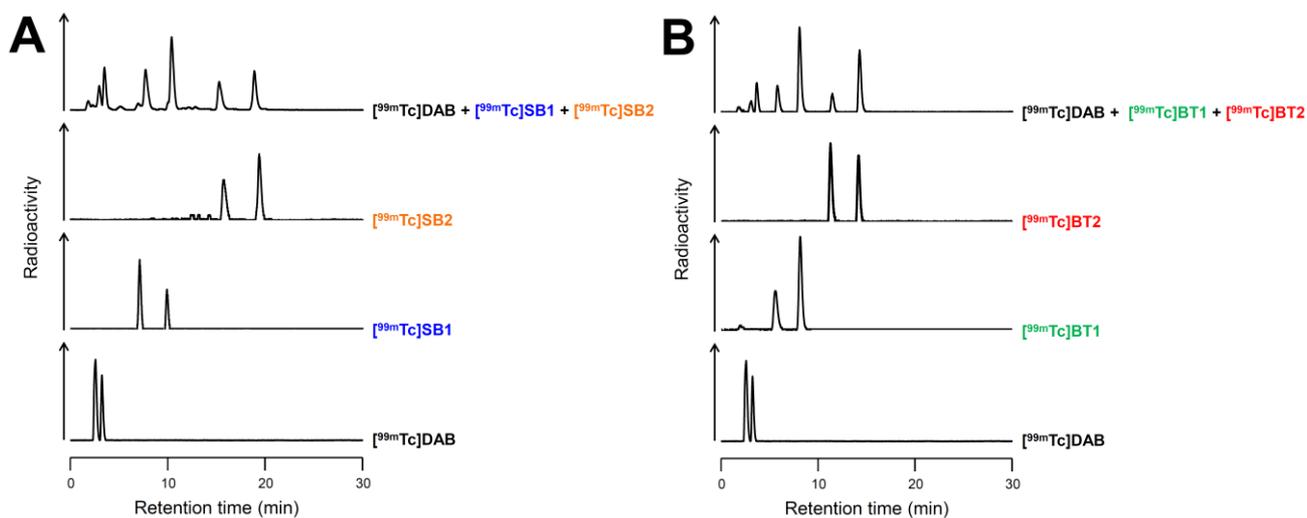


Figure 1-3. Radiolabeling of ^{99m}Tc-Ham complexes. Radiochromatograms of ^{99m}Tc-Ham complexes with SB (A) and BT (B). The HPLC analyses were performed on a Cosmosil C₁₈ column (5C₁₈-AR-II, 4.6 × 150 mm) with a solvent of phosphate buffer (10 mM, pH 7.4)/MeCN [3:2 (0 min) to 3:7 (30 min)] as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min.

A β (1-42)凝集体を用いた結合実験

作製した ^{99m}Tc -Ham 錯体について、アミロイド凝集体に対する結合性を *in vitro* 結合実験により評価した。ここでは、各 ^{99m}Tc -Ham 錯体の A 体のみを評価に用いた。 ^{99m}Tc -Ham 錯体のアミロイド凝集体に対する親和性を、一定濃度の A β (1-42)凝集体における、A β (1-42)凝集体に結合した放射能の割合(%)として算出した。結果を **Figure 1-4** に示す。 [^{99m}Tc]SB1A および [^{99m}Tc]SB2A について、A β (1-42)凝集体に結合した%放射能は、それぞれ 22.2%および 42.6%であった一方で、アミロイドリガンドを有しない [^{99m}Tc]DABA は顕著な親和性を示さなかった (0.4%) (**Figure 1-4A**)。 [^{99m}Tc]BT1A および [^{99m}Tc]BT2A は、それぞれ 4.6%および 38.7%の親和性を示した(**Figure 1-4B**)。

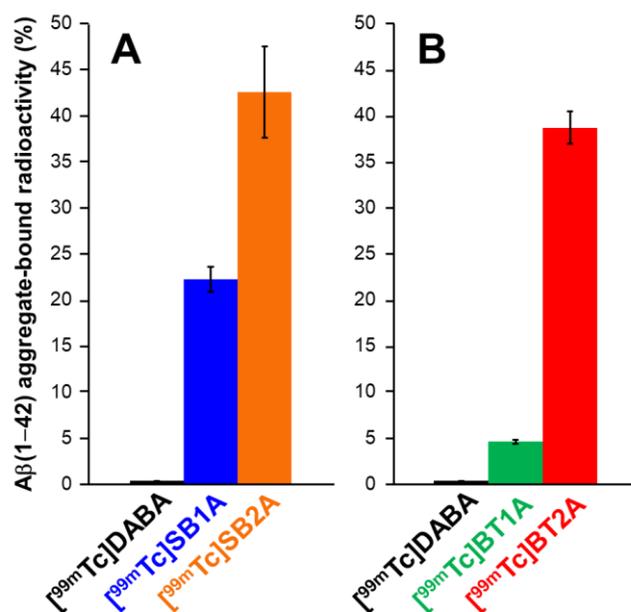


Figure 1-4. Binding assay of ^{99m}Tc -Ham complexes. A β (1-42) aggregate-bound radioactivity (%) for A-forms of ^{99m}Tc -Ham complexes with SB (**A**) and BT (**B**). Each value is the mean \pm standard error of three independent experiments.

Aβ(1-42)凝集体を用いた結合阻害実験

アミロイド凝集体に対する親和性を定量的に評価するため、PIB を競合リガンドとする結合阻害実験を行った。結果を **Figure 1-5** および **Table 1-1** に示す。ここでは、^{99m}Tc-Ham 錯体の両異性体(A体およびB体)のアミロイド凝集体に対する親和性を評価した。一定濃度の Aβ(1-42)凝集体と ^{99m}Tc-Ham 錯体の存在下、様々な濃度の非放射性 PIB を加えた。[^{99m}Tc]SB1A、[^{99m}Tc]SB1B、[^{99m}Tc]SB2A、[^{99m}Tc]SB2B、[^{99m}Tc]BT1A、[^{99m}Tc]BT1B、[^{99m}Tc]BT2A、および[^{99m}Tc]BT2B の存在下、PIB の IC₅₀ はそれぞれ 0.72、0.38、16.40、2.55、0.26、0.47、2.80、および 5.78 μM であった(**Table 1-1**)。SB は A 体が B 体より高い親和性を示した一方で、BT は A 体が B 体より低い親和性を示した。**Figure 1-4** において、[^{99m}Tc]DABA はアミロイド凝集体にほとんど結合せず、[^{99m}Tc]DAB の結合阻害実験では、PIB の濃度に関わらず一定の放射能が観測されたため、[^{99m}Tc]DAB の IC₅₀ を算出することができなかった。

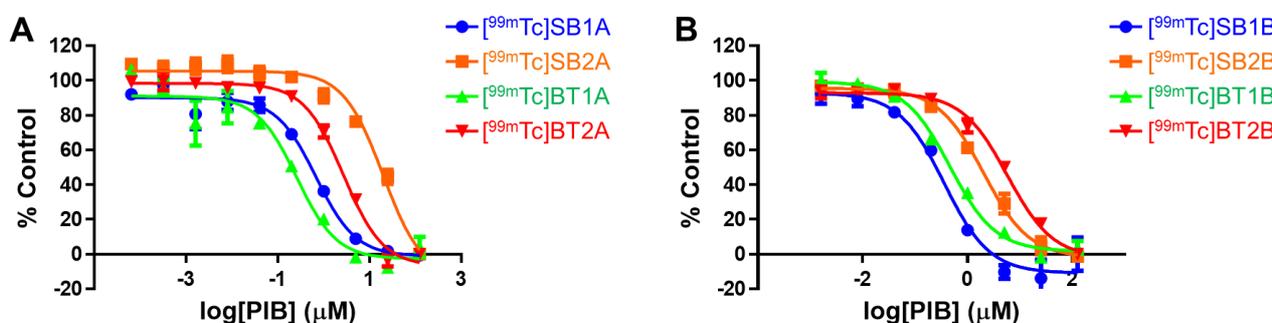


Figure 1-5. Inhibition assay using Aβ aggregates in solution. Displacement curves of A-forms (A) and B-forms (B) of ^{99m}Tc-Ham complexes from the inhibition assay for binding of PIB to Aβ(1-42) aggregates. Each value is the mean ± standard error of 6–15 independent experiments.

Table 1-1. Half-Maximal Inhibitory Concentration (IC₅₀, μM) for the Binding of PIB to Aβ(1-42) Aggregates Determined Using ^{99m}Tc-Ham Complexes as Ligands

Compound	IC ₅₀ of PIB (μM)
[^{99m} Tc]SB1A	0.72 ± 0.10
[^{99m} Tc]SB1B	0.38 ± 0.08
[^{99m} Tc]SB2A	16.40 ± 2.47
[^{99m} Tc]SB2B	2.55 ± 0.45
[^{99m} Tc]BT1A	0.26 ± 0.02
[^{99m} Tc]BT1B	0.47 ± 0.05
[^{99m} Tc]BT2A	2.80 ± 0.32
[^{99m} Tc]BT2B	5.78 ± 0.53

Each value is the mean ± standard error of 6–15 independent experiments.

また、SB および BT から構成される ^{99m}Tc -Ham 錯体(^{99m}Tc]SBT)も合わせて合成した(**Figure 1-6**, **Figure 1-7**)。結合阻害実験では、 ^{99m}Tc]SBTA および ^{99m}Tc]SBTB の存在下、PIB の IC_{50} はそれぞれ 9.91 および 2.86 μM であった(**Table 1-2**)。

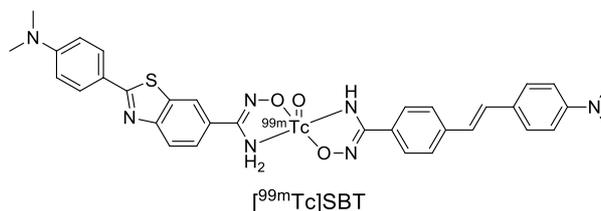


Figure 1-6. Proposed structure of ^{99m}Tc]SBT.

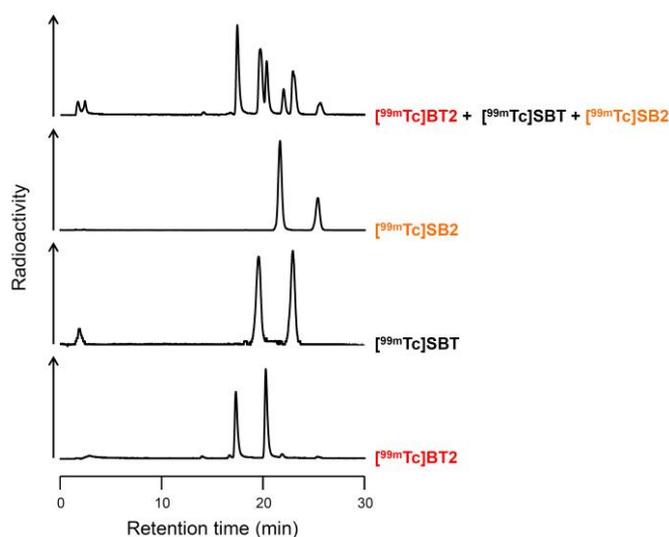


Figure 1-7. Radiolabeling of ^{99m}Tc]SBT. Radiochromatograms of ^{99m}Tc -Ham complexes with both SB and BT. The HPLC analyses were performed on a Cosmosil C_{18} column (5 C_{18} -AR-II, 4.6 \times 150 mm) with a solvent of phosphate buffer (10 mM, pH 7.4)/MeCN [13:7 (0 min) to 7:13 (30 min)] as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min.

Table 1-2. Half-Maximal Inhibitory Concentration (IC_{50} , μM) for the Binding of PIB to $\text{A}\beta(1-42)$ Aggregates Determined Using ^{99m}Tc -Ham Complexes as Ligands

Compound	IC_{50} of PIB (μM)
^{99m}Tc]SBTA	9.91 \pm 1.22
^{99m}Tc]SBTB	2.86 \pm 0.22

Each value is the mean \pm standard error of six independent experiments.

Tg2576 および野生型マウス脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

マウス脳内に沈着したアミロイド斑に対する ^{99m}Tc -Ham 錯体の親和性を評価するため、 ^{99m}Tc -Ham 錯体を Tg2576 および野生型マウス脳切片に添加し、*in vitro* ARG を行った。ここでは、2 種類の異性体のうち、結合阻害実験において比較的高い親和性を示した錯体のみを評価した。**Figure 1-8A, E, I, M** に示すように、野生型マウス脳切片において、顕著な放射能スポットは観測されなかった。Tg2576 マウス脳切片において、 $[^{99m}\text{Tc}]$ SB1A、 $[^{99m}\text{Tc}]$ SB2A、および $[^{99m}\text{Tc}]$ BT2B はアミロイド斑を明瞭に描出し、脳実質における高い放射能集積ならびに白質における低い放射能集積を示した(**Figure 1-8B, F, N**)。 $[^{99m}\text{Tc}]$ BT1B は比較的少数のアミロイド斑を描出した(**Figure 1-8J**)。一方で、 $[^{99m}\text{Tc}]$ DABA はアミロイド斑に対する顕著な結合を示さなかった(**Figure 1-8Q**)。さらに、同一切片をアミロイド斑の蛍光染色試薬である ThS により染色したところ、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の集積と ThS の蛍光像が一致した(**Figure 1-8C, G, K, O**)。また、 $[^{99m}\text{Tc}]$ SB1A、 $[^{99m}\text{Tc}]$ SB2A、 $[^{99m}\text{Tc}]$ BT1B、および $[^{99m}\text{Tc}]$ BT2B のアミロイド斑における集積は、過剰量の非放射性 PIB の添加により減少した(**Figure 1-8D, H, L, P**)。

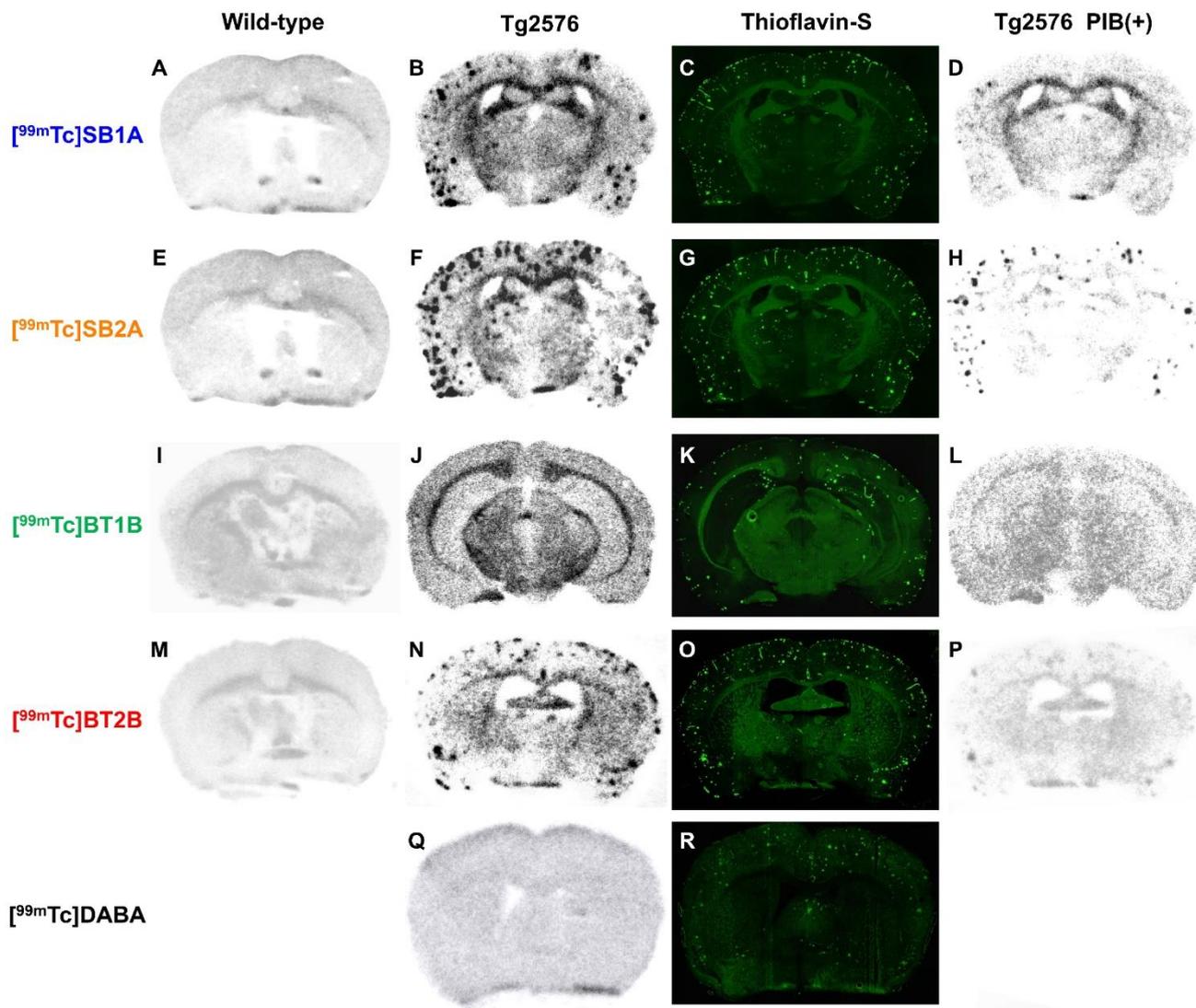


Figure 1-8. *In vitro* ARG of mouse brain sections with ^{99m}Tc -Ham complexes. *In vitro* autoradiograms of wild-type (A, E, I, and M) and Tg2576 (B, F, J, N, and Q) mouse brain sections labeled with ^{99m}Tc -Ham complexes. (C, G, K, O, and R) The same Tg2576 mouse brain sections were stained with ThS. (D, H, L, and P) Blocking studies with nonradioactive PIB were also performed using the adjacent Tg2576 mouse brain sections.

さらに、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{SBTA}$ は、他の ^{99m}Tc -Ham 錯体と同様に、マウス脳内のアミロイド斑を明瞭に描出した(**Figure 1-9**)。

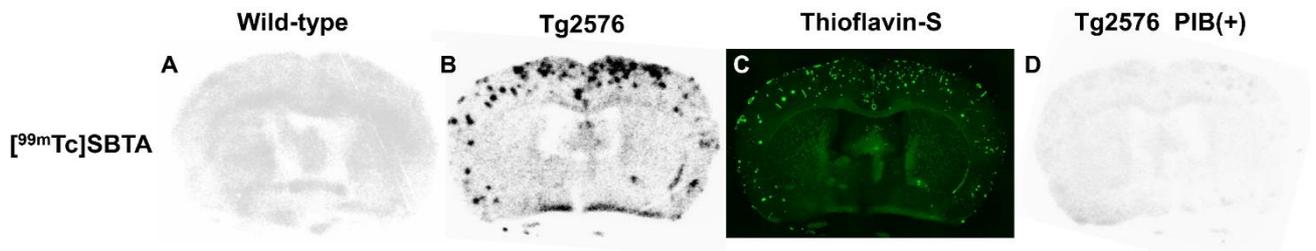


Figure 1-9. *In vitro* ARG of mouse brain sections with $[^{99m}\text{Tc}]\text{SBTA}$. *In vitro* autoradiograms of wild-type (A) and Tg2576 (B) mouse brain sections labeled with $[^{99m}\text{Tc}]\text{SBTA}$. (C) The same Tg2576 mouse brain section was stained with ThS. (D) A blocking study with nonradioactive PIB was also performed using the adjacent Tg2576 mouse brain section.

1.1.3. 考察

核医学分子イメージング薬剤の満たすべき条件として、1)標的分子への高い結合力、2)標的部位への速やかな分布、3)高い化学的・代謝的安定性、4)高い標的/非標的比、5)高い安全性などが挙げられる。これらの中でも、標的分子への高い結合力は非常に重要な条件であり、その実現のために、様々な薬剤設計が多くの研究者により試みられてきた。インフルエンザウイルスなどにおいて、複数の標的分子認識部位が同時に標的分子に結合することにより、標的に対する強力な親和性を達成していることが確認されていたことから、がん細胞における標的分子に対するリガンドを同一分子中に複数含有する薬剤が設計されてきた[24]。このような多価リガンド薬剤に関する系統的な研究が活発に行われ、リガンド数の増大に伴って、がん細胞に対する親和性が向上することが報告されてきた[20]。一方で、アミロイドーシスにおけるアミロイド凝集体に対する多価リガンド薬剤の報告例は少なく、さらに、多価リガンドの導入によるアミロイド親和性の向上に関しては報告が未だ無い。本節における目的は、多価 ^{99m}Tc -Ham 錯体(**Figure 1-2**)を用いて、アミロイド凝集体に対する多価効果に関して、系統的に検討することである。

^{99m}Tc 標識反応は、既報の方法に従って行った。 ^{99m}Tc]SB2、 ^{99m}Tc]BT2、および ^{99m}Tc]DAB は、それぞれ標識前駆体 **2**、**4**、**5** から作製した。 ^{99m}Tc 標識反応により、 ^{99m}Tc -Ham 錯体に関する既存の報告のように、2 種類の放射性化合物の生成が確認された(**Figure 1-3**) [23]。これは、Ham 化合物を用いた ^{99m}Tc 錯形成反応において、2 種類の異性体が生成することを示唆する。

Tc には安定同位体が存在しないため、同族元素である Re の錯体が非放射性化合物として代用されてきた。一方、現在までに、Ham 化合物による Re 錯形成反応は成功しておらず、さらに、 ^{99}Tc を扱うことが非常に困難であることなどの理由から、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の構造決定には制限があった。しかし、近年、窒素原子にメチル基が導入された Ham 化合物を用いて、 ^{99}Tc 錯形成反応が行われ、その生成物について、X 線回折、NMR、および赤外分光による分析が行われた[25]。この報告によると、*N*-メチル化 Ham 化合物を用いた ^{99}Tc 錯形成反応により、**Figure 1-10** に示す単一の ^{99}Tc 錯体のみが生成し、異性体の生成は確認されなかった。さらに、Ham 化合物を用いた ^{99m}Tc 錯形成反応により生成される 2 種類の異性体は、**Figure 1-11** に示す構造であることが推定された。

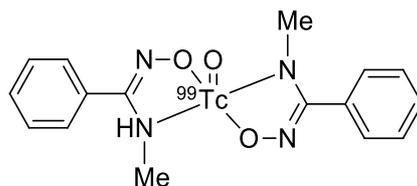


Figure 1-10. Chemical structure of the *N*-substituted Ham-based ^{99m}Tc complex.

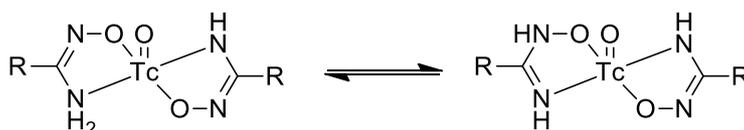


Figure 1-11. Proposed structure of two isomers of Tc-Ham complexes.

化合物 **2** および化合物 **5** を用いて ^{99m}Tc 錯形成反応を行うと、6 種類の放射性化合物の生成が確認され、それらは ^{99m}Tc]SB1、 ^{99m}Tc]SB2、および ^{99m}Tc]DAB のそれぞれの異性体によるものであると考えられた。逆相 HPLC の保持時間について、3.0 と 3.5 分、および 15.3 と 18.9 分の放射能ピークは、それぞれ ^{99m}Tc]DAB および ^{99m}Tc]SB2 のものと一致し、7.7 と 10.4 分の 2 本の放射能ピークは ^{99m}Tc]SB1 の生成を示すものであると推定された(**Figure 1-3A**)。同様に、化合物 **4** および化合物 **5** を用いた ^{99m}Tc 錯形成反応により 6 種類の放射性化合物が生成し、 ^{99m}Tc]BT1、 ^{99m}Tc]BT2、および ^{99m}Tc]DAB が同時に作製されたことが示唆された。逆相 HPLC の保持時間について、3.1 と 3.6 分、5.8 と 8.1 分、および 11.5 と 14.3 分の放射能ピークは、それぞれ ^{99m}Tc]DAB、 ^{99m}Tc]BT1、および ^{99m}Tc]BT2 に由来するものであると考えられた(**Figure 1-3B**)。

作製した ^{99m}Tc -Ham 錯体について、アミロイド凝集体に対する親和性をリコンビナント A β (1-42) を用いた *in vitro* 結合実験により評価した(**Figure 1-4**)。アミロイド凝集体に結合した放射能の割合から、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の親和性の順列は、 ^{99m}Tc]SB2A > ^{99m}Tc]SB1A > ^{99m}Tc]DABA および ^{99m}Tc]BT2A > ^{99m}Tc]BT1A > ^{99m}Tc]DABA となり、SB および BT いずれにおいても、アミロイドリガンド数の増加に伴うアミロイド親和性の向上が認められ、多価 ^{99m}Tc -Ham 錯体がアミロイド凝集体に対する親和性を向上させる可能性が示された。

結合阻害実験により、アミロイド凝集体に対する親和性を定量的に評価した(**Figure 1-5, Table 1-1**)。競合リガンドには PIB を用いた。各錯体の存在下における PIB の IC₅₀ から、いずれのアミロイドリガンドおよび異性体についても、1 価 ^{99m}Tc 錯体と比較して 2 価 ^{99m}Tc 錯体がより高い親和性を示し、この結果は **Figure 1-4** で示す結果と一致した。また、異性体によって PIB の IC₅₀ が異なり、異性化がアミロイド凝集体に対する親和性に関わることが示唆された。さらに、この実験結果より、 ^{99m}Tc -Ham 錯体がアミロイド凝集体に対して、PIB と同様の結合サイトを介して結合することが示唆された。SB および BT から構成される ^{99m}Tc]SBT は両異性体ともに、 ^{99m}Tc]SB2 と ^{99m}Tc]BT2 の間のアミロイド親和性を示した(**Table 1-2**)。

^{99m}Tc -Ham 錯体について、Tg2576 および野生型マウス脳切片を用いた *in vitro* ARG を行った(**Figure**

1-8)。Tg2576 マウスは、12 か月齢より脳内でアミロイド斑の蓄積がはじまり、薬剤のアミロイド結合性を *in vitro* および *in vivo* で評価する上で一般的に用いられる AD モデル動物である[26]。結合阻害実験の結果を反映し、1 価 ^{99m}Tc 錯体と比較して 2 価 ^{99m}Tc 錯体が、Tg2576 マウス脳切片における脳内アミロイドをより明瞭に描出した。また、 ^{99m}Tc]SB1A、 ^{99m}Tc]SB2A、 ^{99m}Tc]BT1B、および ^{99m}Tc]BT2B のアミロイド斑における集積は、過剰量の非放射性 PIB の添加により大きく減少したことから、 ^{99m}Tc -Ham 錯体のマウス脳内アミロイド斑に対する特異的結合が示唆された(Figure 1-8D, H, L, P)。

多価効果における親和性の向上に関して、様々な機構が考えられている。一般的に、標的における隣接する結合サイトを多価リガンドが覆う際に、親和性の向上が最大となる。即ち、多価リガンドが複数の結合サイトに同時に結合することが、親和性の大きな向上に重要であると考えられている。しかし、リガンド間の距離が隣接する結合サイト間の距離より短い場合でも、有意な親和性の向上が観測されている。この場合、一度標的に結合したリガンドが結合サイトから完全に解離する前に、高い局所濃度を有するリガンドが再び標的に結合することができるため、親和性の向上が観測されると考えられている[27]。これらの機構のうちのいずれかが働いたため、2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体によるアミロイド親和性の向上が認められたと考えられた。

1.1.4. 小括

本節において、強力なアミロイド親和性を有する薬剤の開発を目的として、金属の錯形成を利用することでアミロイドリガンドを複数導入する新たな分子設計により多価 $^{99m}\text{Tc-Ham}$ 錯体を作製し、モデルアミロイドである $\text{A}\beta$ 凝集体に対する親和性に関する評価を行い、以下に述べる結果を得た。

- (1) SB または BT をアミロイドリガンドとする新規多価 $^{99m}\text{Tc-Ham}$ 錯体を設計・合成した。
- (2) アミロイド凝集体を用いた結合阻害実験において、2価 $^{99m}\text{Tc-Ham}$ 錯体は1価 $^{99m}\text{Tc-Ham}$ 錯体と比較して、より高いアミロイド親和性を示し、多価 $^{99m}\text{Tc-Ham}$ 錯体によるアミロイド親和性の向上が認められた。
- (3) マウス脳切片を用いた *in vitro* ARG において、結合阻害実験の結果を反映して、2価 $^{99m}\text{Tc-Ham}$ 錯体が1価 $^{99m}\text{Tc-Ham}$ 錯体と比較して、マウス脳内のアミロイド斑をより明瞭に描出した。

以上の結果より、2価 $^{99m}\text{Tc-Ham}$ 錯体を基盤とした新たな分子設計が、強力なアミロイド親和性を有するアミロイドイメージング薬剤の開発に有効であることが示唆された。

第2節

2 価 ^{99m}Tc 錯体を基盤とする脳アミロイドアンギオパチーイメージング薬剤の開発

CAAは中枢神経系における動脈や毛細血管に、アミロイド凝集体が沈着することを特徴とする孤発性または家族性の疾患である[28]。沈着するアミロイドは主に $\text{A}\beta$ であり、CAA はアミロイドーシスの1種として分類されている。CAA は高齢者の10–40%程度に認められる。特に、AD患者の80%以上において、少なくとも軽度なCAAが認められ[29]、約25%のAD患者脳において、重篤なCAAが確認されている[30]。

CAAは脳内出血(intracerebral hemorrhage, ICH)や脳血管性認知症の主要な原因であり、大脳白質病変や微小脳内出血などの脳小血管病にも関与すると考えられている[3]。CAA-associated ICHは、高齢者における孤発性ICHの5–20%程度を占め、脳内の広範囲にわたる複数のアミロイド沈着のため、致命的となる可能性が高く、再発率も高い[28]。また、ADの初期段階において、脳血管疾患による認知機能の低下が報告されている[31]。

40個のアミノ酸から構成される $\text{A}\beta(1-40)$ は、 $\text{A}\beta(1-42)$ より溶解性が高い。CAA患者において主に認められるアミロイドは $\text{A}\beta(1-40)$ である一方、 $\text{A}\beta(1-42)$ はAD患者脳実質内に蓄積する老人斑の主成分であることが知られている[28]。CAAやADなどのアミロイドーシス患者において、疾患の臨床症状に先行してアミロイドが蓄積すると考えられており[15]、これらアミロイドの *in vivo* での検出は、対応するアミロイドーシスの早期診断に繋がると考えられる。さらに、アミロイド凝集体を *in vivo* で観察することは、アミロイドーシスの新規治療法の開発に有益な情報を与えると考えられる。

CAAを診断する際には、侵襲性が高い脳の生体検査が主に行われている[32]。一方、CTやMRIは非侵襲的であり、CAA-associated ICHの診断に有効であるが、それらはアミロイド凝集体の沈着ではなく脳における出血を検出する[33]。CAAの代替マーカーとしてICHを利用していることから、この間接的なCAA診断法は疾患特異的とは言えない。そのため、イメージング薬剤によりアミロイドを検出し、CAA関連疾患の特異的診断を可能とする非侵襲的な診断法の開発が強く望まれている。

前節においても述べたように、ADの早期診断を目的としたPET/SPECT用 $\text{A}\beta$ イメージング薬剤の開発研究が活発に行われてきた。AD脳内の老人斑と同様、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ を用いた脳血管アミロイドイメージングに関して、いくつかの報告がある[34, 35]。しかし、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ は血液脳関門(blood-brain barrier, BBB)を透過するように設計されているため、脳血管アミロイドだけでなく、脳実質アミロイドに対しても同様に結合すると考えられる。よって、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ は脳全体のアミロイド沈着を検出し、CAA診断においては、老人斑をバックグラウンドシグナルとして検出することとなる。一方、CAA特異的イメージング薬剤の開発研究も行われてきた。CAAを標的とした蛍光[36]、PET/SPECT[37]、およびMRI[37]用イメージング薬剤が設計され、それらのCAA診断における有用性が示されてきた。しかし、CAAにおける $\text{A}\beta$ 凝集体に対する *in vivo* 特異性は未だ示されていない。脳血管壁

に沈着した A β に選択的に結合し、AD と CAA を鑑別することを可能とするイメージング薬剤の開発が望まれている。

老人斑は検出せず、CAA のみを検出するためには、A β イメージング薬剤の脳移行性は低い方が好ましい(Figure 1-12) [22]。そこで、前節において作製した、1および2価^{99m}Tc-Ham 錯体([^{99m}Tc]SB1、[^{99m}Tc]SB2、[^{99m}Tc]BT1、および[^{99m}Tc]BT2)を CAA 特異的イメージング薬剤として応用することとした。これらの^{99m}Tc 錯体は、高い分子量を有するため、*in vivo* で BBB を透過することは困難であると考えられること、さらに、A β 凝集体に対する高い親和性を有することから、CAA 特異的イメージングに適すると考えられた。前節において、^{99m}Tc-Ham 錯体のアミロイド親和性は A β (1-42)凝集体を用いて評価したが、A β (1-42)は老人斑で優位に認められるアミロイドであり、CAA においてはほとんど観測されない。一般的に、A β (1-42)凝集体に対する高い親和性を有する低分子化合物は、過剰リン酸化タウや α -シヌクレインなど、他のアミロイド凝集体に対しても結合する可能性が高いと考えられている[38-40]。よって、^{99m}Tc-Ham 錯体は A β (1-42)と同様に、CAA において優位なアミロイドである A β (1-40)凝集体に対する結合性を有すると考えられた。

本節では、1 および 2 価^{99m}Tc-Ham 錯体([^{99m}Tc]SB1、[^{99m}Tc]SB2、[^{99m}Tc]BT1、および[^{99m}Tc]BT2)について、CAA 特異的イメージング薬剤としての有用性評価を行った。

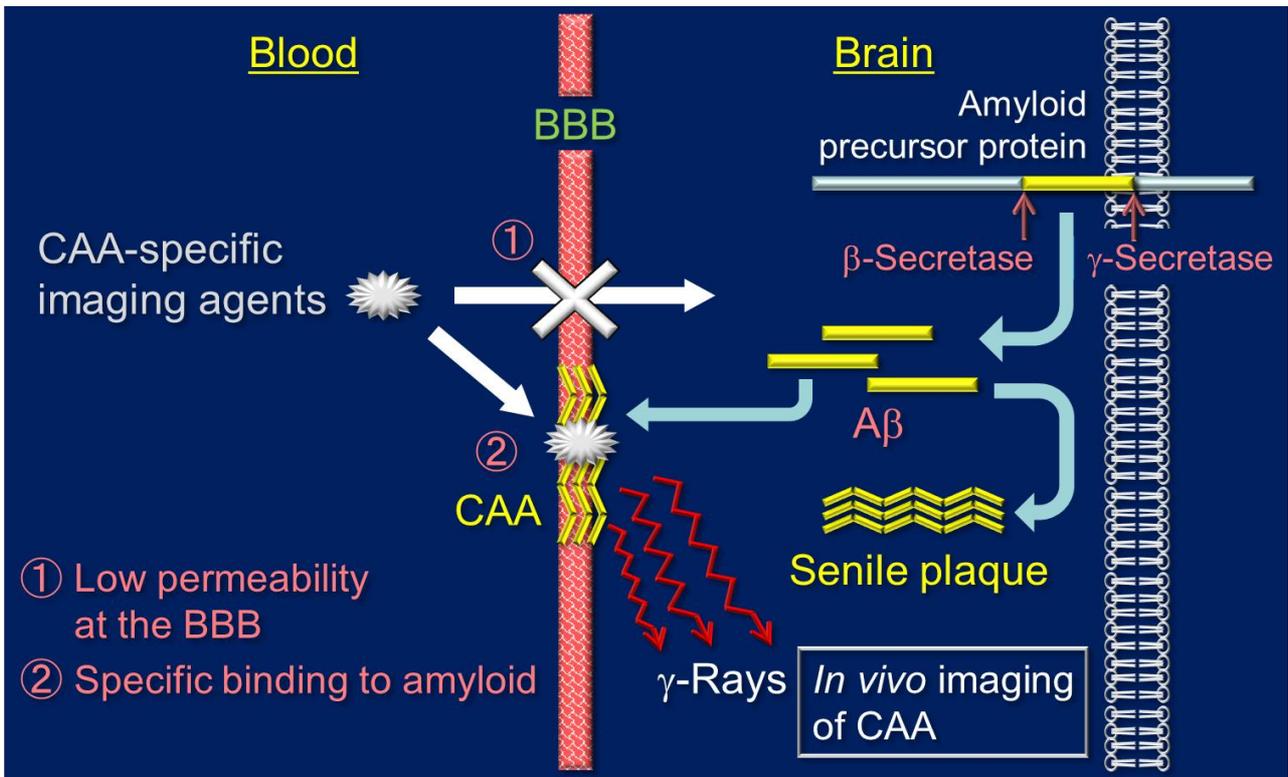


Figure 1-12. Schematic design of CAA-specific imaging.

1.2.1. 実験方法

試薬・機器

第1章第1節と同じ試薬・機器を使用した。A β ペプチド(human, 1–40) [TFA form]は、株式会社ペプチド研究所より購入した。CAA患者剖検脳組織切片は、京都大学大学院医学研究科および国立循環器病研究センター病院より提供されたものを使用した。健常者剖検脳組織切片は、BioChain社より購入した。

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系雄性マウスは清水実験材料株式会社より購入した。Tg2576マウスおよび野生型マウスはTaconic社より購入した。動物は12時間/12時間の昼夜サイクル条件下で飼育し、飼料と水は自由に与えた。

Ham化合物の合成

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。

^{99m}Tc 標識反応

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。

A β (1–40)凝集体の作製

PBSを用いてA β (1–40)が0.25 mg/mLの濃度になるように調整し、37 °Cで42時間静置することにより、A β (1–40)凝集体溶液を作製した。

A β (1–40)凝集体を用いた結合阻害実験

A β (1–40)凝集体 PBS 溶液(最終 1.25 μ g/mL, 50 μ L)、^{99m}Tc-Ham 錯体 30%エタノール溶液(8.3 kBq, 50 μ L)、非放射性 PIB 30%エタノール溶液(最終 64 pM–125 μ M, 50 μ L)、30%エタノール(850 μ L)を混和し、室温で3時間静置した。混和溶液を Brandel 社製 M-24 セルハーベスターおよび Whatman 社製 GF/B フィルターを用いて吸引濾過し、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定した。得られた結果から、GraphPad Prism 5.0を用いて結合阻害曲線を作成し、IC₅₀を算出した。

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

^{99m}Tc-Ham 錯体を 10%エタノール含有生理食塩水で希釈した。1群5匹の5週齢 ddY系雄性マウスに、尾静脈より1匹あたり 20 kBq (100 μ L)の ^{99m}Tc-Ham 錯体を投与した。2、10、30、および60分後に安楽死させ、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、および脳を摘出し、重量と放射能を測定した。

CAA 患者および健常者剖検脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

パラフィン包埋された CAA 患者(67 歳女性および 85 歳女性)および健常者(73 歳男性)剖検脳組織切片を、キシレン(30 分間 × 2)、エタノール(1 分間 × 2)、90%エタノール(1 分間)、70%エタノール(1 分間)、および超純水(5 分間)中で順次静置することで脱パラフィン処理を行った。^{99m}Tc-Ham 錯体 50%エタノール溶液(0.37 MBq/mL)を添加し、室温で 1 時間静置した。阻害実験のため、隣接切片に非放射性 PIB (1.0 mM)含有 ^{99m}Tc-Ham 錯体 50%エタノール溶液(0.37 MBq/mL)を添加し、室温で 1 時間静置した。50%エタノール(3 分間 × 2)で洗浄後、イメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析した。

ARG 実験後、同一切片を用いて Aβ(1-40)の免疫染色を行った。0.01 M クエン酸緩衝液(pH 6.0)におけるオートクレーブ(15 分間)を行い、流水洗(5 分間)した後、0.5% Tween 20 含有 PBS (0.5-PBST) (5 分間 × 3)中で静置した。切片を抗 Aβ(1-40)の 1 次抗体溶液(BA27, 和光純薬工業株式会社)と室温で終夜反応させた後、0.5-PBST (5 分間 × 3)中で静置した。ビオチン標識抗マウス抗体と室温で 3 時間反応させた後、0.5-PBST (5 分間 × 3)中で静置した。切片をstreptavidin-peroxidase 複合体と室温で 30 分間反応させた後、0.5-PBST (5 分間 × 3)中で静置した。最後に Merck 社製 diaminobenzidine と室温で 5 分間反応させ、超純水で洗浄し、反応を停止させた。エタノールによる脱水処理、キシレンによる透徹処理を行った後、切片を封入し、顕微鏡で観察した。

Tg2576 および野生型マウスを用いた *ex vivo* ARG

20%エタノール含有生理食塩水に溶解した ^{99m}Tc-Ham 錯体 (19 MBq, 150 μL)を 29 か月齢雌性の Tg2576 および野生型マウスに尾静脈より投与した。投与 30 分後に安楽死させ、直ちに脳を摘出し、SECTION-LAB 社製 SCEM compound で包埋して、ドライアイス-ヘキサンバスで凍結させた。その後、マイクロトームを用いて 30 μm 厚の凍結切片を作製した。切片をイメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析した。

ARG 実験後、同一切片に ThS の 50%エタノール溶液を添加し、50%エタノールで洗浄後、蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行い、脳内 Aβ沈着の局在を確認した。

さらに、同一切片を用いて CD31 の免疫染色を行った。0.5-PBST (5 分間 × 3)中で静置した後、切片を抗 CD31 の 1 次抗体溶液(SZ31, Abcam 社)と室温で終夜反応させた。0.5-PBST (5 分間 × 3)中で静置した後、Dako 社製ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ポリマー結合抗ウサギ 2 次抗体と室温で 3 時間反応させた。0.5-PBST (5 分間 × 3)中で静置した後、Merck 社製 diaminobenzidine と室温で 5 分間反応させ、超純水で洗浄し、反応を停止させた。エタノールによる脱水処理、キシレンによる透徹処理を行った後、切片を封入し、顕微鏡で観察した。

1.2.2. 結果

^{99m}Tc-Ham 錯体の調製

1 および 2 価 ^{99m}Tc-Ham 錯体([^{99m}Tc]SB1、[^{99m}Tc]SB2、[^{99m}Tc]BT1、および[^{99m}Tc]BT2)の調製は、前節と同様の方法を用いて行った。前節と同様に、逆相 HPLC 分析において、保持時間がより短い異性体を A 体([^{99m}Tc]SB1A、[^{99m}Tc]SB2A、[^{99m}Tc]BT1A、および[^{99m}Tc]BT2A)、より長い異性体を B 体([^{99m}Tc]SB1B、[^{99m}Tc]SB2B、[^{99m}Tc]BT1B、および[^{99m}Tc]BT2B)と定義した。

Aβ(1-40)凝集体を用いた結合阻害実験

^{99m}Tc-Ham 錯体の Aβ(1-40)凝集体に対する親和性を評価するため、PIB を競合リガンドとする結合阻害実験を行った。[^{99m}Tc]SB1A、[^{99m}Tc]SB1B、[^{99m}Tc]SB2A、[^{99m}Tc]SB2B、[^{99m}Tc]BT1A、[^{99m}Tc]BT1B、[^{99m}Tc]BT2A、および[^{99m}Tc]BT2B の存在下、PIB の IC₅₀ はそれぞれ 0.38、0.45、4.59、3.37、0.24、0.99、1.58、および 4.96 μM であった(**Table 1-3**)。

Table 1-3. Half-Maximal Inhibitory Concentration (IC₅₀, μM) for the Binding of PIB to Aβ Aggregates Determined Using ^{99m}Tc-Ham Complexes as Ligands

Compound	IC ₅₀ of PIB (μM)	
	Aβ(1-40)	Aβ(1-42)
[^{99m} Tc]SB1A	0.38 ± 0.06	0.72 ± 0.10
[^{99m} Tc]SB1B	0.45 ± 0.11	0.38 ± 0.08
[^{99m} Tc]SB2A	4.59 ± 0.77	16.40 ± 2.47
[^{99m} Tc]SB2B	3.37 ± 0.61	2.55 ± 0.45
[^{99m} Tc]BT1A	0.24 ± 0.06	0.26 ± 0.02
[^{99m} Tc]BT1B	0.99 ± 0.17	0.47 ± 0.05
[^{99m} Tc]BT2A	1.58 ± 0.27	2.80 ± 0.32
[^{99m} Tc]BT2B	4.96 ± 0.90	5.78 ± 0.53

Each value is the mean ± standard error of 6–15 independent experiments.

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

^{99m}Tc -Ham 錯体の脳移行性を評価するため、正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行った。ここでは、2種類の異性体のうち、結合阻害実験において比較的高い親和性を示した錯体のみを評価した。対照として、 ^{18}F florbetapir についても同様に評価した(**Figure 1-13**)。 ^{99m}Tc SB1A、 ^{99m}Tc SB2A、 ^{99m}Tc BT1B、および ^{99m}Tc BT2B の投与 2 分後における脳への取り込みは、それぞれ 0.37、0.28、0.36、および 0.37% injected dose/g であった。脳内の放射能は投与 60 分後まで低値を示した。 ^{99m}Tc -Ham 錯体の体内分布は **Table 1-4** に示す。

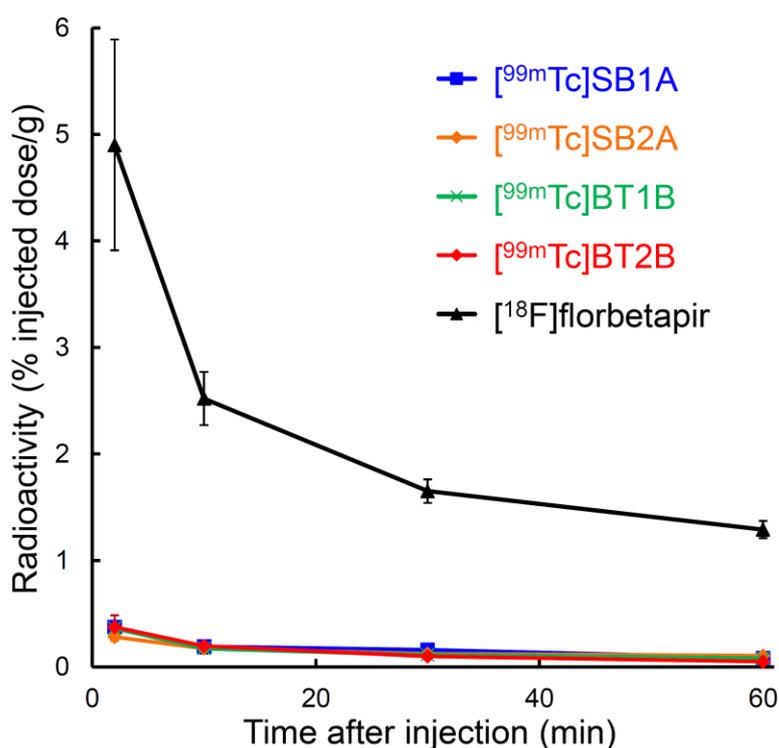


Figure 1-13. Comparison of radioactivity of extracted brain tissues after intravenous injection of ^{99m}Tc -Ham complexes and ^{18}F florbetapir in normal mice. Each value is the mean \pm standard deviation of five mice at each interval.

Table 1-4. Biodistribution of Radioactivity after Intravenous Injection of ^{99m}Tc-Ham Complexes in Normal Mice

Organ	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
	[^{99m} Tc]SB1A			
Blood	18.89 ± 4.57	9.30 ± 1.96	6.06 ± 0.29	2.71 ± 0.14
Spleen	9.73 ± 3.34	9.70 ± 3.03	7.86 ± 1.11	5.44 ± 0.49
Pancreas	4.12 ± 0.62	3.09 ± 0.38	1.74 ± 0.33	2.67 ± 0.07
Stomach*	1.64 ± 0.41	4.54 ± 0.97	10.28 ± 2.03	6.63 ± 1.12
Intestine	1.94 ± 0.25	4.27 ± 0.88	7.06 ± 1.67	14.34 ± 2.35
Kidney	10.74 ± 2.03	9.48 ± 1.28	6.18 ± 0.84	9.66 ± 0.18
Liver	28.55 ± 4.86	31.03 ± 2.29	20.17 ± 3.18	22.16 ± 2.20
Heart	9.48 ± 2.01	6.51 ± 0.77	2.98 ± 0.63	4.30 ± 0.14
Lung	15.47 ± 4.14	9.67 ± 0.88	5.31 ± 0.67	5.14 ± 0.29
Brain	0.37 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.08 ± 0.00
	[^{99m} Tc]SB2A			
Blood	14.28 ± 1.90	7.50 ± 0.51	5.13 ± 0.57	4.17 ± 0.24
Spleen	10.76 ± 0.96	11.24 ± 2.26	8.91 ± 3.26	7.58 ± 2.60
Pancreas	3.35 ± 0.60	2.12 ± 0.08	2.06 ± 0.11	1.83 ± 0.07
Stomach*	3.15 ± 0.56	8.78 ± 1.32	16.13 ± 2.33	14.72 ± 4.51
Intestine	1.52 ± 0.25	1.71 ± 0.11	2.64 ± 0.36	4.05 ± 0.55
Kidney	5.03 ± 0.52	3.57 ± 0.41	3.61 ± 0.29	3.39 ± 0.20
Liver	25.52 ± 1.67	29.35 ± 2.85	27.04 ± 3.90	24.95 ± 3.38
Heart	12.64 ± 1.59	6.57 ± 0.92	8.58 ± 1.32	8.27 ± 1.19
Lung	14.35 ± 1.86	7.79 ± 0.50	7.26 ± 1.02	6.48 ± 0.49
Brain	0.28 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01
	[^{99m} Tc]BT1B			
Blood	18.61 ± 2.47	9.34 ± 2.62	5.84 ± 0.65	3.51 ± 0.34
Spleen	3.83 ± 0.84	3.00 ± 0.82	3.11 ± 0.48	1.36 ± 0.54
Pancreas	1.80 ± 0.28	1.58 ± 0.55	1.72 ± 0.11	1.11 ± 0.18
Stomach*	1.39 ± 0.21	3.76 ± 0.82	8.24 ± 1.41	6.47 ± 0.85
Intestine	0.90 ± 0.25	2.00 ± 0.86	6.81 ± 2.03	9.95 ± 2.65
Kidney	5.94 ± 0.73	4.29 ± 1.25	5.24 ± 0.59	3.20 ± 0.45
Liver	19.90 ± 4.06	25.64 ± 6.77	27.06 ± 2.49	19.04 ± 3.61
Heart	5.25 ± 0.22	3.30 ± 1.02	2.72 ± 0.28	1.64 ± 0.32
Lung	10.87 ± 2.06	6.50 ± 1.41	5.00 ± 0.34	2.78 ± 0.54
Brain	0.36 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.02
	[^{99m} Tc]BT2B			
Blood	23.15 ± 4.78	10.05 ± 1.78	3.72 ± 0.49	1.81 ± 0.44
Spleen	10.83 ± 1.58	14.49 ± 3.50	10.91 ± 1.59	4.80 ± 0.63
Pancreas	2.81 ± 0.35	2.19 ± 0.35	1.14 ± 0.25	1.27 ± 0.28
Stomach*	0.69 ± 0.12	3.77 ± 0.56	6.47 ± 1.37	4.20 ± 1.21
Intestine	1.32 ± 0.21	1.97 ± 0.26	6.44 ± 1.04	13.90 ± 1.52
Kidney	6.04 ± 0.96	5.02 ± 0.40	3.47 ± 0.57	3.13 ± 0.48
Liver	23.21 ± 5.72	33.78 ± 6.07	31.45 ± 3.39	35.76 ± 3.34
Heart	9.48 ± 4.83	8.62 ± 2.34	6.67 ± 1.52	7.08 ± 1.34
Lung	22.06 ± 3.09	11.97 ± 1.01	5.38 ± 1.16	4.50 ± 0.60
Brain	0.37 ± 0.11	0.20 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.05 ± 0.01

Values are expressed as % injected dose per gram of organ. Each value is the mean ± standard deviation of five mice at each interval. *Values are expressed as % injected dose.

CAA 患者および健常者剖検脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

CAA 患者脳切片における A β 沈着に対する [^{99m}Tc]SB2A および [^{99m}Tc]BT2B の結合を *in vitro* ARG により評価した。 [^{99m}Tc]SB2A は CAA 患者脳切片における A β 沈着を明瞭に描出した一方(**Figure 1-14A**)、健常者脳切片において、顕著な放射能集積は観測されなかった(**Figure 1-14D**)。また、CAA 患者脳切片における放射能分布は、同一切片における A β (1-40)免疫染色像と一致した(**Figure 1-14B**)。さらに、A β 沈着における [^{99m}Tc]SB2A の集積は過剰量の非放射性 PIB の添加により阻害された (**Figure 1-14C**)。

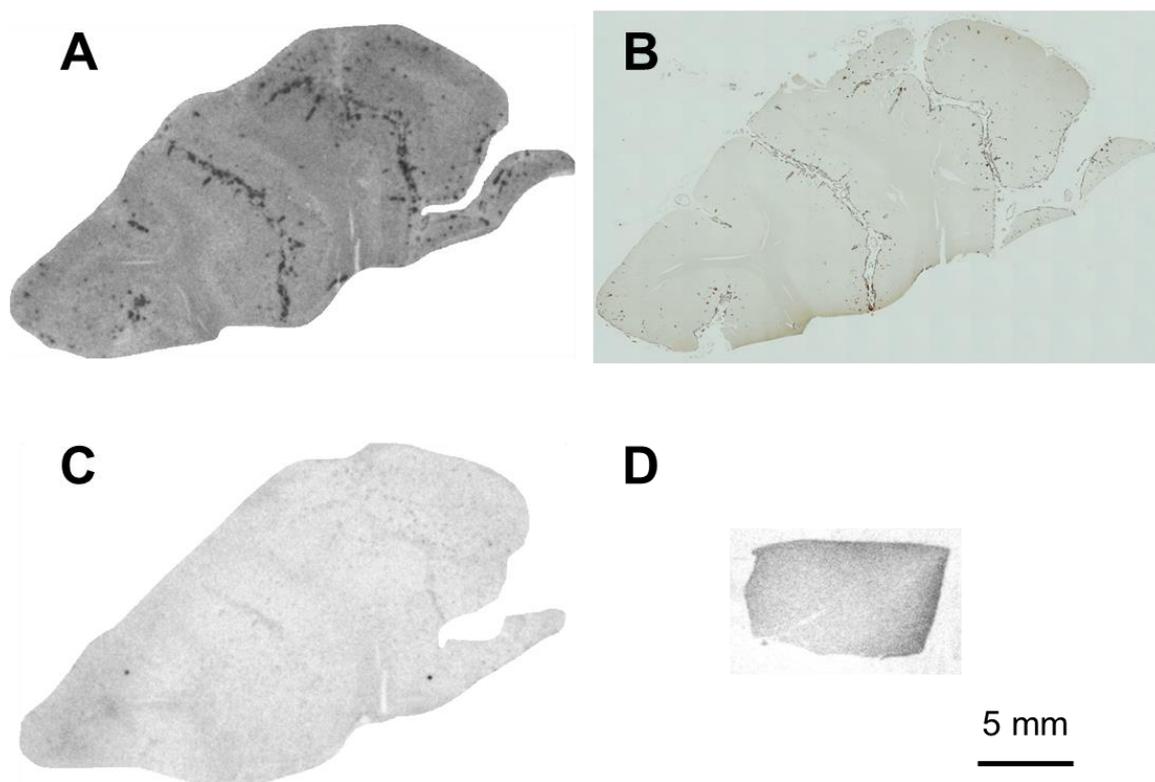


Figure 1-14. *In vitro* ARG of human brain sections with [^{99m}Tc]SB2A. (A) An *in vitro* autoradiogram of a brain section from a CAA patient (female, 67 years old) labeled with [^{99m}Tc]SB2A. **(B)** The same brain section was immunostained with an antibody against A β (1-40). **(C)** A blocking study with nonradioactive PIB was also performed using the adjacent brain section. **(D)** An *in vitro* autoradiogram of a brain section from a healthy control (male, 73 years old) labeled with [^{99m}Tc]SB2A.

また、 $[^{99m}\text{Tc}]$ BT2B は *in vitro* ARG において、 $[^{99m}\text{Tc}]$ SB2A と同様の結果を示した(**Figure 1-15**)。

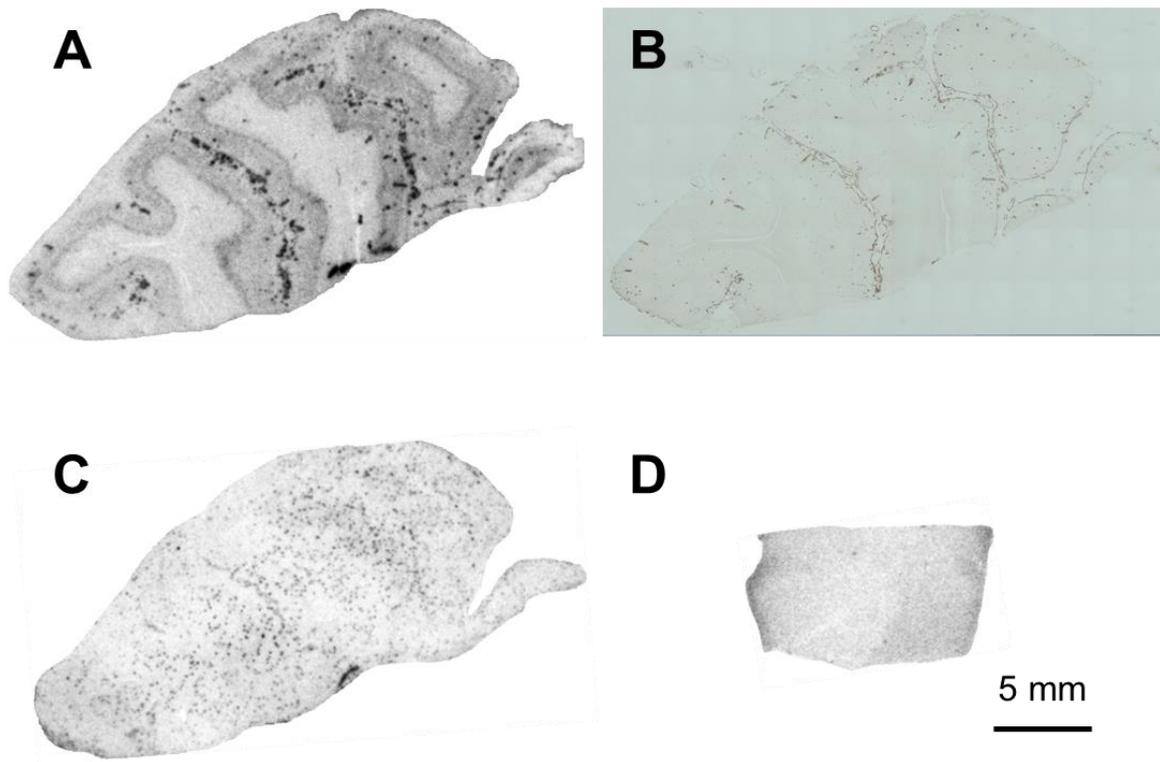


Figure 1-15. *In vitro* ARG of human brain sections with $[^{99m}\text{Tc}]$ BT2B. (A) An *in vitro* autoradiogram of a brain section from a CAA patient (female, 67 years old) labeled with $[^{99m}\text{Tc}]$ BT2B. (B) The same brain section was immunostained with an antibody against $\text{A}\beta(1-40)$. (C) A blocking study with nonradioactive PIB was also performed using the adjacent brain section. (D) An *in vitro* autoradiogram of a brain section from a healthy control (male, 73 years old) labeled with $[^{99m}\text{Tc}]$ BT2B.

さらに、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{SB2A}$ および $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$ は、別の CAA 患者の剖検脳組織切片における $\text{A}\beta$ 沈着も明瞭に描出した(Figure 1-16)。

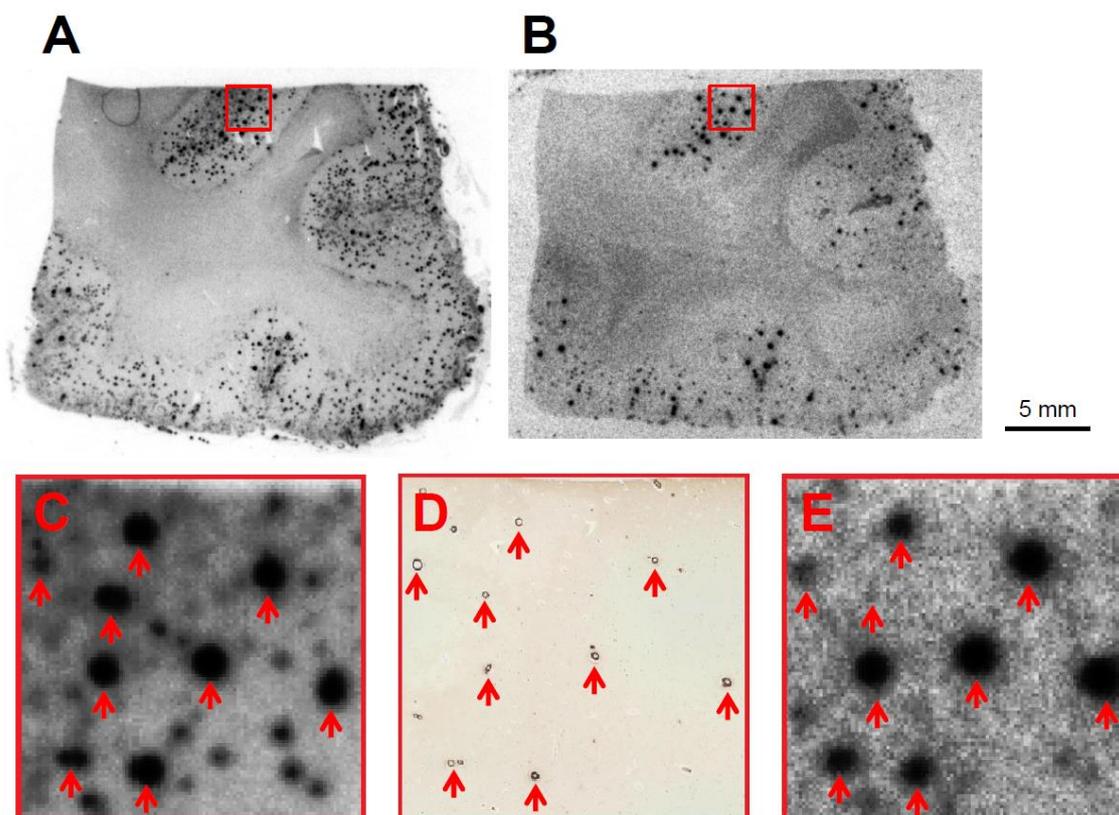


Figure 1-16. *In vitro* ARG of human brain sections with $[^{99m}\text{Tc}]\text{SB2A}$ and $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$. *In vitro* autoradiograms of brain sections from a CAA patient (female, 85 years old) labeled with $[^{99m}\text{Tc}]\text{SB2A}$ (A) and $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$ (B). Panel C and E represent magnified image details of panel A and B, respectively. (D) The adjacent brain section was immunostained with an antibody against $\text{A}\beta(1-40)$. Red arrows indicate $\text{A}\beta$ depositions labeled with both the bivalent ^{99m}Tc -Ham complex and anti- $\text{A}\beta(1-40)$ antibody.

Tg2576 および野生型マウスを用いた *ex vivo* ARG

マウス脳における A β 凝集体に対する [^{99m}Tc]SB2A および [^{99m}Tc]BT2B の親和性を評価するため、Tg2576 および野生型マウスを用いて *ex vivo* ARG 実験を行った。 [^{99m}Tc]SB2A の投与 30 分後の *ex vivo* ARG において、Tg2576 マウス脳内に多数の放射能集積が観測された一方(Figure 1-17A, B)、野生型マウス脳切片から顕著な放射能集積は観測されなかった(Figure 1-17C)。切片中の A β 沈着を ThS 染色により確認し、野生型マウス脳切片において A β 沈着は認められなかったが(Figure 1-17F)、Tg2576 マウス脳切片において多数の A β 沈着が認められ、それらは放射能分布と部分的に一致した(Figure 1-17D, E)。しかし、いくつかの A β 沈着は、 [^{99m}Tc]SB2A により描出されなかった。そこで、 [^{99m}Tc]SB2A が脳血管アミロイドあるいは脳実質アミロイドのどちらを描出したのかを明らかにするため、血管内皮細胞マーカーである CD31 に対する抗体により、同一切片を免疫染色した(Figure 1-17G-I)。ARG における放射能集積は、ThS および抗 CD31 抗体の両方で染色された A β 沈着においてのみ観測された(Figure 1-17B, E, H、赤矢印)。一方、ThS でのみ染色され、抗 CD31 抗体では染色されなかった A β 沈着において、放射能集積は認められなかった(Figure 1-17E、白矢じり)。

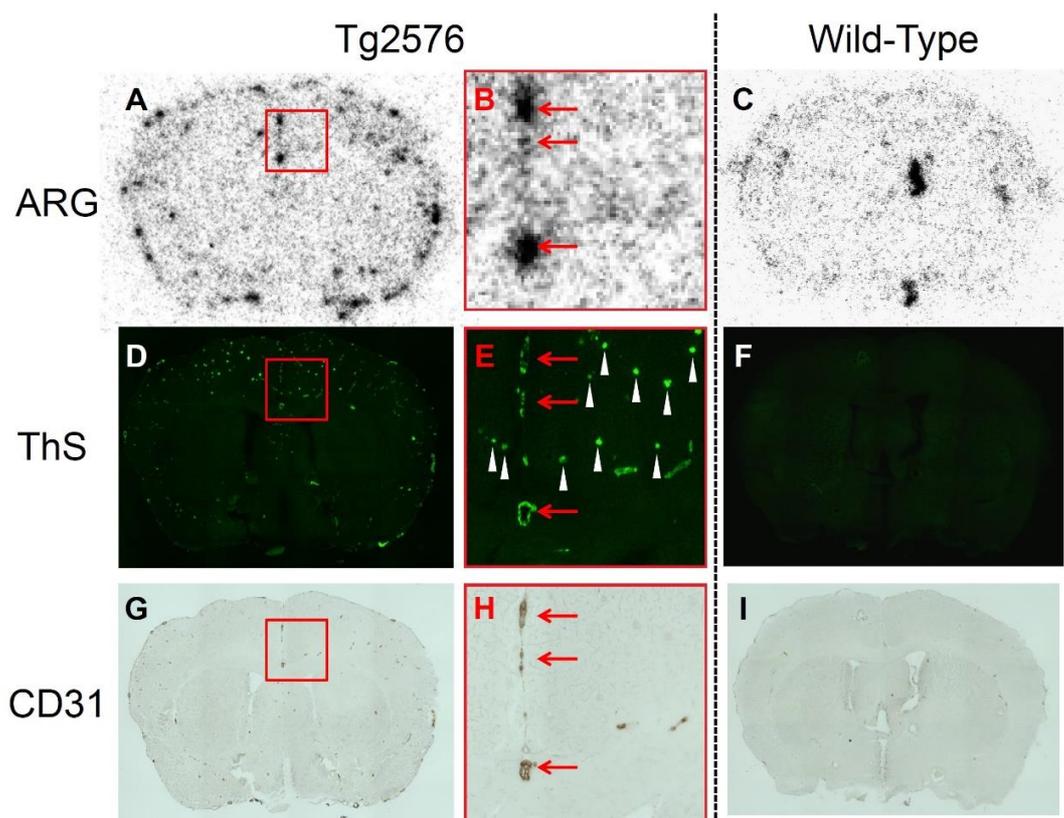


Figure 1-17. *Ex vivo* ARG from mice with [^{99m}Tc]SB2A. *Ex vivo* autoradiograms from Tg2576 (A) and wild-type (C) mice with [^{99m}Tc]SB2A. (D and F) The same sections were stained with ThS. (G and I) The same sections were also immunostained with an antibody against CD31. Panel B, E, and H represent magnified image details of panel A, D, and G, respectively. Red arrows show A β depositions labeled with both ThS and anti-CD31 antibody. White arrowheads show A β depositions labeled with ThS, not anti-CD31 antibody.

さらに、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$ による *ex vivo* ARG は、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{SB2A}$ と同様な結果を示した(**Figure 1-18**)。

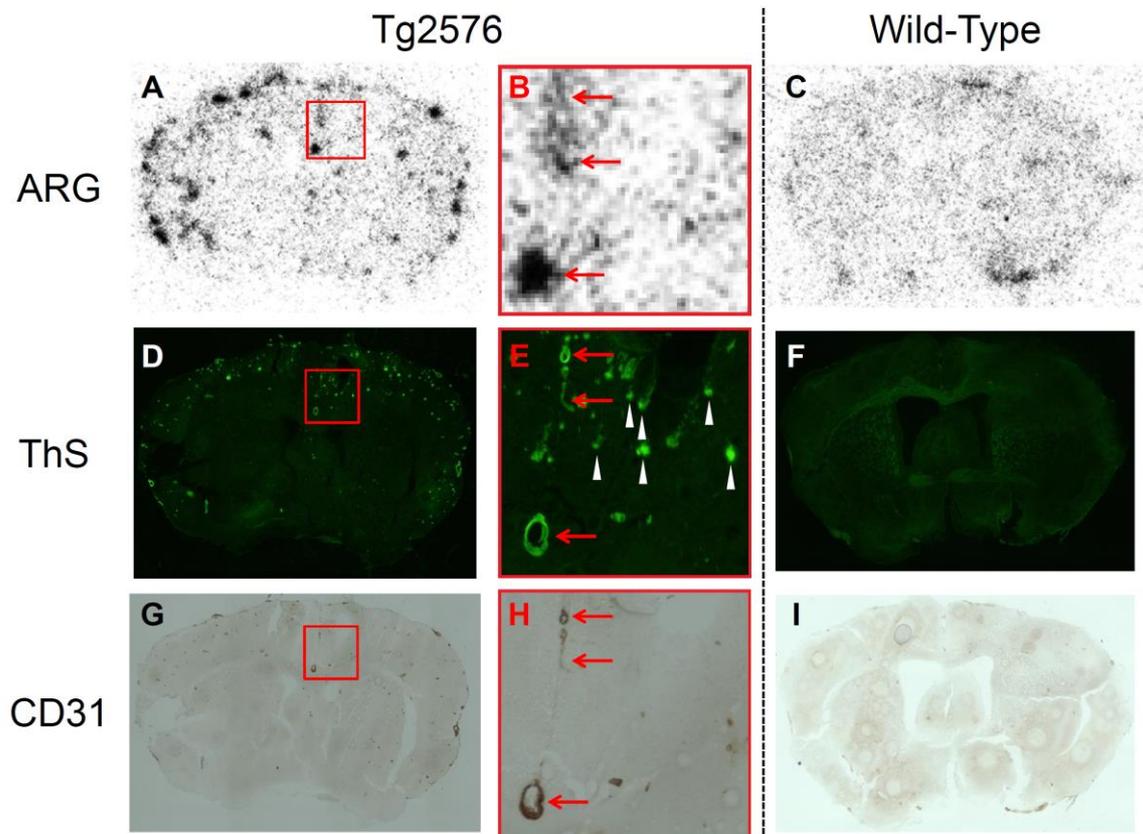


Figure 1-18. *Ex vivo* ARG from mice with $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$. *Ex vivo* autoradiograms from Tg2576 (**A**) and wild-type (**C**) mice with $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$. (**D and F**) The same sections were stained with ThS. (**G and I**) The same sections were also immunostained with an antibody against CD31. Panel B, E, and H represent magnified image details of panel A, D, and G, respectively. Red arrows show A β depositions labeled with both ThS and anti-CD31 antibody. White arrowheads show A β depositions labeled with ThS, not anti-CD31 antibody.

1.2.3. 考察

前節において、作製した 2 価アミロイドリガンドを含有する ^{99m}Tc -Ham 錯体がアミロイド凝集体に対する高い親和性を示したため、本節では、それらを CAA 特異的イメージング薬剤として応用することを考案した。近年、CAA イメージングを目的とした ^{99m}Tc 標識薬剤が新たに報告されているが、それらの合成は、高温かつ酸性条件下で行う必要がある[41]。一方、 ^{99m}Tc -Ham 錯体は室温かつ中性という非常に温和な条件で作製することができる。CAA における主要なアミロイドである $\text{A}\beta(1-40)$ 凝集体を用いた結合阻害実験では、1 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体(^{99m}Tc]SB1 および ^{99m}Tc]BT1)と比較して、2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体(^{99m}Tc]SB2 および ^{99m}Tc]BT2)はより高い $\text{A}\beta(1-40)$ に対する親和性を示した。また、 ^{99m}Tc]BT1 および ^{99m}Tc]BT2 の A 体は、それぞれの B 体より低い親和性を示し、この結果は、前節において $\text{A}\beta(1-42)$ を用いて得られた結果と一致した(**Table 1-3**)。しかし、 ^{99m}Tc]SB1 および ^{99m}Tc]SB2 について、異性体によって $\text{A}\beta(1-42)$ に対する親和性が異なることが前節において示されたが、それらの $\text{A}\beta(1-40)$ に対する親和性について、異性体間で大きな差異は認められなかった(**Table 1-3**)。作製した全ての ^{99m}Tc -Ham 錯体のアミロイド凝集体に対する結合は、非常に高い濃度 (μM order)の PIB によって阻害された。既存の $\text{A}\beta$ イメージング薬剤の親和性が PIB と同等あるいは PIB より低いことから[41]、CAA 特異的イメージング薬剤を含む全ての既報 $\text{A}\beta$ イメージング薬剤と比較して、 ^{99m}Tc -Ham 錯体が非常に高い $\text{A}\beta$ 親和性を有することが示唆された。作製した 8 種類の ^{99m}Tc -Ham 錯体の中では、 ^{99m}Tc]SB2A および ^{99m}Tc]BT2B が最も高い $\text{A}\beta(1-40)$ に対する親和性($\text{IC}_{50} = 4.59$ および $4.96 \mu\text{M}$)を示した。

$\text{A}\beta(1-40)$ および $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体を用いた結合阻害実験の結果より、比較的高い親和性を示した異性体についてのみ、正常マウスを用いて脳移行性を評価した。即ち、SB については A 体、BT については B 体をそれぞれ評価した。脳実質に沈着するアミロイドのイメージング薬剤としての有用性が実証されている ^{18}F florbetapir の同一条件における脳移行性(投与 2 分後 4.90% injected dose/g)と比較して[42]、 ^{99m}Tc]SB1A、 ^{99m}Tc]SB2A、 ^{99m}Tc]BT1B、および ^{99m}Tc]BT2B は非常に低い脳移行性を示した(**Figure 1-13**)。また、既報の CAA イメージング薬剤の脳移行性は投与 2 分後に $0.61-1.21\%$ injected dose/g であり[41]、 ^{99m}Tc -Ham 錯体はそれらと比較しても、非常に低い脳移行性を有することが示された。これらの結果より、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の BBB 透過性は非常に低く、脳実質に沈着した $\text{A}\beta$ 凝集体に ^{99m}Tc -Ham 錯体が結合することは困難であると考えられた。 $\text{A}\beta(1-40)$ および $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体に対する *in vitro* 親和性ならびに正常マウスにおける *in vivo* 脳移行性評価の結果から、 $\text{A}\beta$ に対する親和性が高く、脳移行性が非常に低い ^{99m}Tc]SB2A および ^{99m}Tc]BT2B について、更なる検討を行った。

CAA 患者脳切片を用いた *in vitro* ARG を行ったところ、 ^{99m}Tc]SB2A および ^{99m}Tc]BT2B は CAA 患者脳における $\text{A}\beta$ 沈着を明瞭に描出した(**Figure 1-14A, Figure 1-15A**)。 $\text{A}\beta$ 沈着の局在は、同一切片を抗 $\text{A}\beta(1-40)$ 抗体で免疫染色することにより確認した(**Figure 1-14B, Figure 1-15B**)。 $\text{A}\beta$ に対する親和性を有する ^{99m}Tc 標識 $\text{A}\beta$ イメージング薬剤が数多く報告されているが、それらを用いて患者脳内に

沈着した A β を ARG などにより描出することは困難であると考えられていた。しかし、近年、AD 患者脳切片における A β 沈着を ARG により描出した ^{99m}Tc 標識放射性薬剤が報告され[41]、それと同様に、^{99m}Tc-Ham 錯体を用いて、患者脳内 A β 沈着を明瞭に描出することに成功した。さらに、非放射性 PIB を用いた阻害実験により、[^{99m}Tc]SB2A および[^{99m}Tc]BT2B の患者脳内 A β 沈着に対する特異的結合が示された(**Figure 1-14C, Figure 1-15C**)。

マウスを用いた *ex vivo* ARG において、[^{99m}Tc]SB2A および[^{99m}Tc]BT2B は Tg2576 マウス脳内の A β 凝集体に対する特異的結合を示した一方(**Figure 1-17A, B, Figure 1-18A, B**)、野生型マウス脳切片からは顕著な放射能集積が観測されなかった(**Figure 1-17C, Figure 1-18C**)。Tg2576 マウス脳切片における放射能集積は、A β 凝集体(**Figure 1-17D, E, Figure 1-18D, E**)および血管内皮細胞(**Figure 1-17G, H, Figure 1-18G, H**)の両方が存在する部位でのみ観測されたことから、[^{99m}Tc]SB2A および[^{99m}Tc]BT2B は脳実質ではなく脳血管に沈着した A β 凝集体に対して選択的に結合することが示唆された。これらの結果は、^{99m}Tc-Ham 錯体が非常に低い脳移行性を有するという体内分布実験で得られた結果と一致した。以上のことから、2 価 ^{99m}Tc-Ham 錯体である[^{99m}Tc]SB2A および[^{99m}Tc]BT2B が *in vivo* で CAA を特異的に検出する可能性が示唆された。しかし、^{99m}Tc-Ham 錯体による *ex vivo* ARG で、ThS で染色されなかった部位において、いくつかの放射能スポットが観測された。ThS の A β に対する親和性(K_d: μ M order)は、PIB や florbetapir などの有用な既存 A β イメージング薬剤(K_d: nM order)と比較して、非常に低いことが知られている[17, 43]。 *in vitro* 結合阻害実験において、非常に高い濃度の非放射性 PIB により ^{99m}Tc-Ham 錯体の A β 凝集体に対する結合が阻害されたことから、^{99m}Tc-Ham 錯体は既報の A β イメージング薬剤よりも非常に高い A β 親和性を有すると考えられた。以上のことから、^{99m}Tc-Ham 錯体は ThS より多数の A β 沈着を検出したと考えられた。また、血液灌流を施したマウス脳を用いて *ex vivo* ARG 実験を行ったところ、Tg2576 と野生型マウスの結果に差異が認められたため(データ未掲載)、*ex vivo* ARG で観測された放射能集積は血液に含まれる ^{99m}Tc 化合物ではなく、A β に結合した ^{99m}Tc 化合物由来のものであると考えられた。

AD 患者脳における BBB の破綻の可能性に関する報告があるが、AD の進行が BBB の機能障害の原因となるかは、未だに不明である[44]。AD 患者脳において BBB の破綻が認められなかったという報告もあるが[45]、近年、AD が進行するに従って、段階的に BBB が破綻するという報告がされた[46]。これより、CAA イメージング薬剤が利用されることが望まれる、臨床症状発症前の早期段階では、BBB は正常に機能すると考えられる。よって、^{99m}Tc-Ham 錯体は BBB を透過することができず、AD の早期診断において、CAA 特異的イメージング薬剤として機能し得ると考えられる。

1.2.4. 小括

前節において作製した 1 および 2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体がアミロイドに対する高い親和性を示したことから、本節では、脳血管に沈着するアミロイドである CAA のイメージングに、それらの ^{99m}Tc 錯体を応用することを考案し、CAA 特異的イメージング薬剤としての有用性に関する評価を行い、以下に述べる結果を得た。

- (1) SB または BT を含有する 1・2 価錯体およびそれぞれの異性体、計 8 種類の ^{99m}Tc -Ham 錯体について、CAA において優位に認められるアミロイドである $\text{A}\beta(1-40)$ 凝集体に対する親和性を評価したところ、いずれの錯体も高い親和性を示した。 $[^{99m}\text{Tc}]\text{SB2A}$ および $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$ が最も高い $\text{A}\beta$ 親和性を示した。
- (2) いずれの ^{99m}Tc -Ham 錯体も、既存の $\text{A}\beta$ イメージング薬剤と比較して、顕著に低い脳移行性を示した。
- (3) CAA 患者剖検脳組織切片を用いた *in vitro* ARG において、2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体($[^{99m}\text{Tc}]\text{SB2A}$ および $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$)は脳内 $\text{A}\beta$ 沈着に対する特異的結合を示した。
- (4) Tg2576 マウスを用いた *ex vivo* ARG において、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{SB2A}$ および $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$ は、脳内の実質ではなく血管に沈着した $\text{A}\beta$ に対して選択的に結合し、それを明瞭に描出した。

以上の結果より、2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体である $[^{99m}\text{Tc}]\text{SB2A}$ および $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$ が CAA 特異的イメージング薬剤として機能する可能性が示唆された。

第3節

脳アミロイドアンギオパチーイメージングを目的とした

N-メチル化ヒドロキサムアミドを配位子とする新規 2 価 ^{99m}Tc 錯体の合成と評価

前節において、2 価アミロイドリガンドを含む一連の ^{99m}Tc -Ham 錯体を設計・合成し、それらが CAA イメージング薬剤として有用であることを明らかにした。アミロイド結合部位として 2 分子のベンゾチアゾール骨格を含む 2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体である $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2}$ は、Tg2576 マウスを用いた *ex vivo* ARG において、CAA を特異的に検出した。しかし、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2}$ の標識反応では 2 種類の異性体が同時に生成することが確認され、 $\text{A}\beta$ 凝集体に対する親和性など、それぞれの生物学的特性が異なることが示された。一方で近年、*N*-メチル化 Ham を用いた ^{99}Tc 錯形成反応により、高い安定性を有する単一の錯体が得られたことが報告されている[25]。そこで、本節では、この報告を基盤とした新たな ^{99m}Tc -Ham 錯体を設計した。即ち、CAA を標的とした新規分子イメージング薬剤の開発を目的として、*N*-メチル化 $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2}$ ($[^{99m}\text{Tc}]\text{MBT2}$)を設計・合成し、その有用性に関する評価を行った (Figure 1-19)。

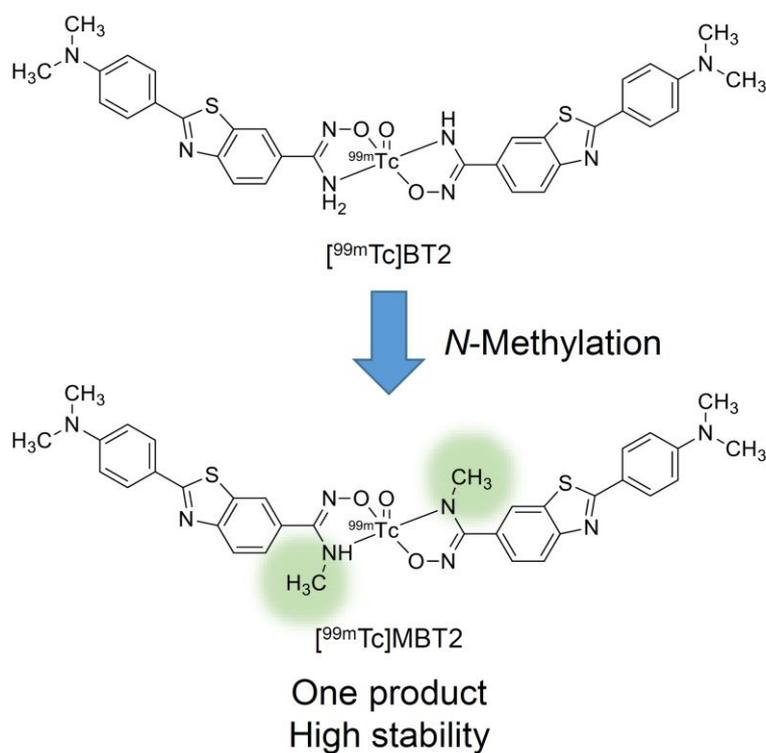


Figure 1-19. Chemical structure of *N*-methyl-substituted $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2}$ ($[^{99m}\text{Tc}]\text{MBT2}$).

1.3.1. 実験方法

試薬・機器

試薬は、東京化成工業株式会社、ナカライテスク株式会社、和光純薬工業株式会社、ABX 社、Ark Pharm 社、Strem Chemicals 社から購入した。第 1 章第 1 節および第 2 節と同じ機器を使用した。エレクトロスプレーイオン化質量分析(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS)には、株式会社島津製作所製高速クロマトグラフ質量分析計 LCMS-2020 を用いた。

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 系雄性マウスは清水実験材料株式会社より購入した。Tg2576 マウスおよび野生型マウスは Taconic 社より購入した。動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し、飼料と水は自由に与えた。

MBTHam の合成

(Z)-2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-N'-hydroxybenzo[d]thiazole-6-carboximidamide (BTHam, 1)

化合物 **1** の合成は、第 1 章第 1 節と同様の方法を用いて行った。

(Z)-2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-N'-((ethoxycarbonyl)oxy)benzo[d]thiazole-6-carboximidamide (2)

化合物 **1** (50 mg, 0.16 mmol) の DMF (10 mL) 溶液にクロロ炭酸エチル(18 μ L, 0.19 mmol) とトリエチルアミン(44 μ L, 0.32 mmol) を加え、反応液を室温で 1 時間攪拌した。超純水(50 mL) を加えた後、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 10:1) で精製して目的物 **2** を収量 16 mg (25%) で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.35 (s, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.24–4.19 (m, 2H), 3.04 (s, 6H), 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ESI-MS *m/z* calculated for C₁₉H₂₁N₄O₃S⁺ (MH⁺), 385; found, 385.

3-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one (3)

化合物 **2** (87 mg, 0.23 mmol) の 1 M 水酸化ナトリウム水溶液/DMF (1:1, 40 mL) 混合溶液を室温で 1 時間攪拌した。酢酸(5 mL) を加えた後、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(20 mL) で中和し、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 5:1) で精製して目的物 **3** を収量 15 mg (20%) で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.50 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.05 (s, 6H). ESI-MS *m/z* calculated for C₁₇H₁₅N₄O₂S⁺ (MH⁺), 339; found, 339.

3-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)benzo[*d*]thiazol-6-yl)-4-methyl-1,2,4-oxadiazol-5(4*H*)-one (4)

ヨウ化メチル(5.5 μ L, 0.088 mmol)と炭酸カリウム(18 mg, 0.13 mmol)を化合物 **3** (15 mg, 0.044 mmol)の DMF (5 mL)溶液に加えた。反応液を室温で 3 時間攪拌した後、超純水(50 mL)を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1:1)で精製して目的物 **4** を収量 9 mg (58%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.48 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.28 (s, 3H), 3.05 (s, 6H). ESI-MS *m/z* calculated for C₁₈H₁₇N₄O₂S⁺ (MH⁺), 353; found, 353.

(*Z*)-2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-*N*'-hydroxy-*N*-methylbenzo[*d*]thiazole-6-carboximidamide (MBTHam, 5)

化合物 **4** (15 mg, 0.043 mmol)の 1 M 水酸化ナトリウム水溶液/DMF (1:1, 10 mL)混合溶液を 90 °C で 14 時間攪拌した。反応液に氷冷下、1 M 塩酸を加えて中和した後、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 10:1)で精製し、さらに逆相 HPLC [phosphate buffer (10 mM, pH 7.4)/MeCN = 3:2 (0 min) to 3:7 (30 min)]で精製して目的物 **5** を収量 5 mg (36%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.67 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 5.84–5.79 (m, 1H), 3.03 (s, 6H), 2.63 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H). ESI-MS *m/z* calculated for C₁₇H₁₉N₄OS⁺ (MH⁺), 327; found, 327.

^{99m}Tc 標識反応

第 1 章第 1 節と同様の方法を用いて行った。

マウス血漿における安定性評価

ddY 系雄性マウスより採取した血液を、4,000 \times g で 5 分間遠心分離し、上清を回収することで血漿を得た。^{99m}Tc-Ham 錯体(0.74 MBq)をマウス血漿(200 μ L)に加え混和した後、37 °C で 0.5、1、および 2 時間静置した。アセトニトリル(200 μ L)を加えた後、4,000 \times g で 5 分間遠心分離した。上清を回収してナカライテスク株式会社製 Cosmonice Filter (S) (0.45 μ m, 4 mm)で濾過した後、濾液を逆相 HPLC で分析した。

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

第 1 章第 2 節と同様の方法を用いて行った。

A β (1–42)凝集体の作製

第 1 章第 1 節と同様の方法を用いて行った。

A β (1-42)凝集体を用いた結合阻害実験

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。

Tg2576および野生型マウス脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。

CAA患者および健常者剖検脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

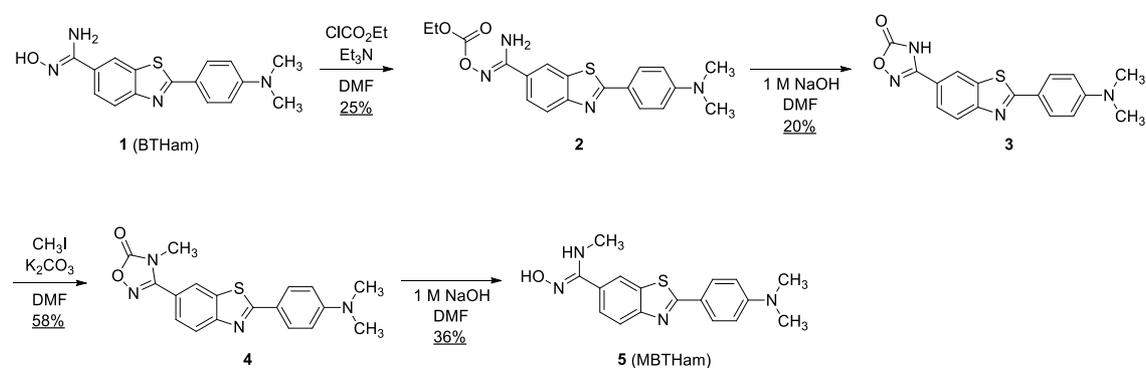
第1章第2節と同様の方法を用いて行った。

1.3.2. 結果

MBTHam の合成

[^{99m}Tc]MBT2 の標識前駆体である MBTHam (5) の合成は、[^{99m}Tc]BT2 の標識前駆体である BTHam (1) から 4 段階の反応を経て行った (Scheme 1-2)。前節と同様の方法を用いて BTHam を合成し、クロロ炭酸エチルとの反応により、化合物 2 を収率 25% で得た。化合物 2 を塩基性溶液中で環状化させることにより化合物 3 を収率 20% で合成し、ヨウ化メチルによりメチル化した化合物 4 を収率 58% で合成した。最後に、化合物 4 を塩基性溶液中で加熱することにより、目的とする MBTHam を収率 36% で合成した。

Scheme 1-2. Synthetic Route of the Precursor for Radiolabeling of [^{99m}Tc]MBT2



^{99m}Tc 標識反応

^{99m}Tc 標識反応は第 1 章第 1 節と同様の方法を用いて行った(Scheme 1-3)。逆相 HPLC 分析において、BTHam を用いた ^{99m}Tc 錯形成反応では、保持時間 11.5 および 14.3 分に 2 本の放射能ピークが観測された一方、MBTHam を用いた反応では、保持時間 13.6 分に単一の放射能ピークが観測された (Figure 1-20)。前節と同様に、逆相 HPLC 分析において、保持時間がより短い [^{99m}Tc]BT2 の異性体を [^{99m}Tc]BT2A、より長い異性体を [^{99m}Tc]BT2B と定義した。

Scheme 1-3. Radiolabeling of [^{99m}Tc]BT2 and [^{99m}Tc]MBT2

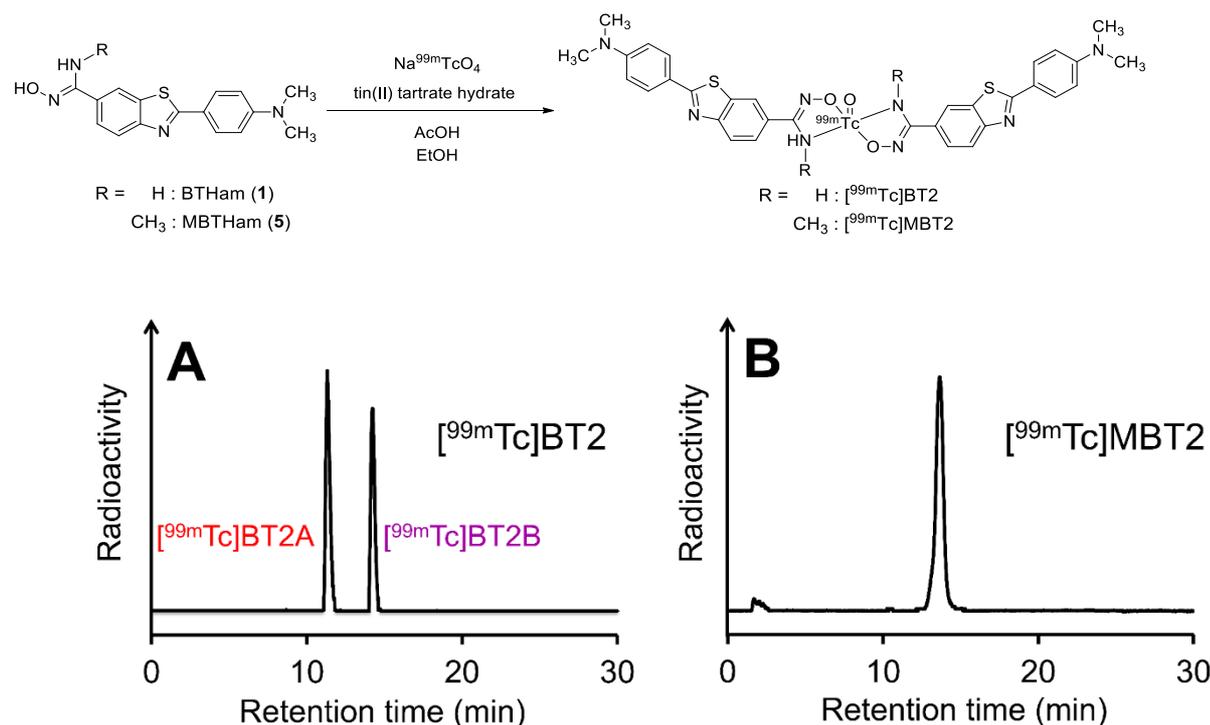


Figure 1-20. Radiolabeling of [^{99m}Tc]BT2 and [^{99m}Tc]MBT2. Radiochromatograms of [^{99m}Tc]BT2 (A) and [^{99m}Tc]MBT2 (B). The HPLC analyses were performed on a Cosmosil C₁₈ column (5C₁₈-AR-II, 4.6 × 150 mm) with a solvent of phosphate buffer (10 mM, pH 7.4)/MeCN [3:2 (0 min) to 3:7 (30 min)] as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min.

マウス血漿における安定性評価

[^{99m}Tc]MBT2 および [^{99m}Tc]BT2 の *in vitro* における安定性を、マウス血漿中 37°C で 0.5、1、および 2 時間静置することにより評価した (Figure 1-21, Table 1-5)。 [^{99m}Tc]BT2 については、2 種類の異性体を統合して純度を算出した。 [^{99m}Tc]MBT2 は 2 時間後まで、 [^{99m}Tc]BT2 より高い安定性を示した。

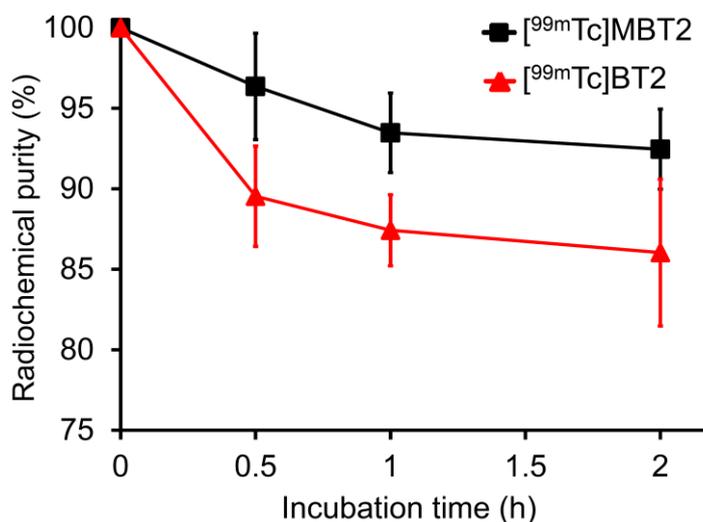


Figure 1-21. Percent radiochemical purity of [^{99m}Tc]MBT2 and [^{99m}Tc]BT2 as a function of time. Each value is the mean ± standard deviation of three experiments for each point.

Table 1-5. *In Vitro* Stability of [^{99m}Tc]MBT2 and [^{99m}Tc]BT2 in Mouse Plasma

Compound	Radiochemical purity (%) at the given incubation times		
	0.5 h	1 h	2 h
[^{99m} Tc]MBT2	96.4 ± 3.3	93.5 ± 2.5	92.5 ± 2.5
[^{99m} Tc]BT2	89.5 ± 3.1	87.4 ± 2.2	86.0 ± 4.6

Each value is the mean ± standard deviation of three experiments for each point.

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

[^{99m}Tc]MBT2 の正常マウスにおける脳移行性を評価するため、体内分布実験を行った (Table 1-6)。 [^{99m}Tc]MBT2 は [^{99m}Tc]BT2B と同様に、非常に低い脳移行性を示した (投与 2 分後 0.35% injected dose/g)。

Table 1-6. Radioactivity of Extracted Brain Tissues after Intravenous Injection of [^{99m}Tc]MBT2 and [^{99m}Tc]BT2B in Normal Mice

Compound	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[^{99m} Tc]MBT2	0.35 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.01
[^{99m} Tc]BT2B	0.37 ± 0.11	0.20 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.05 ± 0.01

Values are expressed as % injected dose per gram of brain. Each value is the mean ± standard deviation of five mice at each interval.

Aβ(1-42)凝集体を用いた結合阻害実験

第1章第1節と同様に、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{MBT2}$ のAβ凝集体に対する親和性を、PIBを競合リガンドとする結合阻害実験により評価した(**Figure 1-22**)。 $[^{99m}\text{Tc}]\text{MBT2}$ 、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2A}$ 、および $[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$ の存在下、PIBの IC_{50} はそれぞれ0.56、2.80、および5.78 μM であった(**Table 1-7**)。

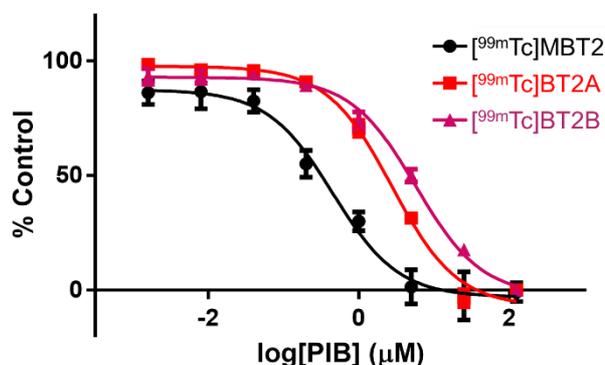


Figure 1-22. Inhibition assay using Aβ aggregates in solution. Displacement curves of ^{99m}Tc -Ham complexes from the inhibition assay for binding of PIB to Aβ aggregates. Each value is the mean \pm standard error of six independent experiments.

Table 1-7. Half-Maximal Inhibitory Concentration (IC_{50} , μM) for the Binding of PIB to Aβ Aggregates Determined Using ^{99m}Tc -Ham Complexes as Ligands

Compound	IC_{50} of PIB (μM)
$[^{99m}\text{Tc}]\text{MBT2}$	0.56 ± 0.08
$[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2A}$	2.80 ± 0.32
$[^{99m}\text{Tc}]\text{BT2B}$	5.78 ± 0.53

Each value is the mean \pm standard error of six independent experiments.

Tg2576 および野生型マウス脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

マウス脳内の A β 斑に対する [^{99m}Tc]MBT2 および [^{99m}Tc]BT2 の結合性を *in vitro* ARG により評価した。結果を **Figure 1-23** に示す。野生型マウス脳切片において、顕著な放射能スポットは観測されなかった(**Figure 1-23A, E, I**)。 [^{99m}Tc]BT2A および [^{99m}Tc]BT2B を用いた Tg2576 マウス脳切片の ARG では、明瞭な放射能スポットが多く認められた一方、 [^{99m}Tc]MBT2 を用いた ARG では比較的少数の不明瞭なスポットが観測された(**Figure 1-23B, F, J**)。これらの放射能スポットは、A β 蛍光染色試薬である ThS による蛍光像と一致した(**Figure 1-23C, G, K**)。しかし、 [^{99m}Tc]BT2A および [^{99m}Tc]BT2B がほとんど全ての A β 斑を描出した一方、 [^{99m}Tc]MBT2 は一部の A β 斑のみを描出した。また、A β 斑における ^{99m}Tc-Ham 錯体の集積は、過剰量の非放射性 PIB により阻害された(**Figure 1-23D, H, L**)。

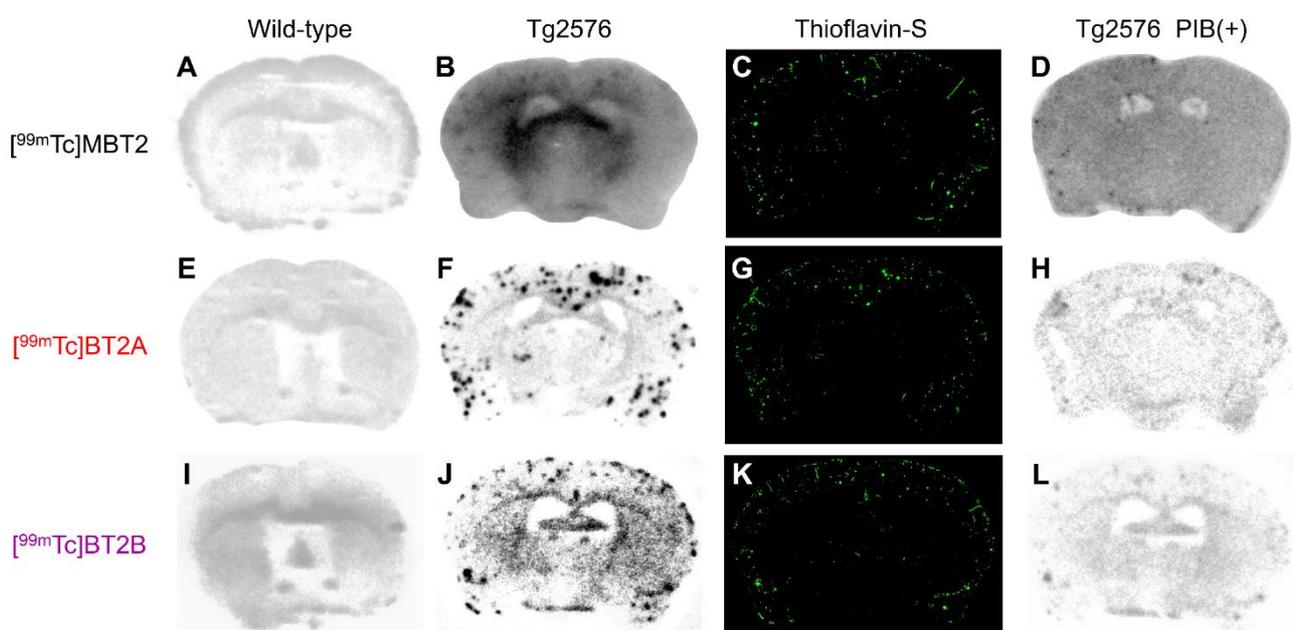


Figure 1-23. *In vitro* ARG of mouse brain sections with ^{99m}Tc-Ham complexes. *In vitro* autoradiograms of wild-type (**A, E, and I**) and Tg2576 (**B, F, and J**) mouse brain sections labeled with ^{99m}Tc-Ham complexes. (**C, G, and K**) The same Tg2576 mouse brain sections were stained with ThS. (**D, H, and L**) Blocking studies with nonradioactive PIB were also performed using the adjacent Tg2576 mouse brain sections.

CAA 患者および健常者剖検脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

CAA 患者脳内に蓄積した A β に対する結合を評価するため、CAA 患者剖検脳組織切片の *in vitro* ARG を行った。結果を **Figure 1-24** に示す。切片における A β 凝集体の局在は A β の免疫染色により確認した(**Figure 1-24B**)。[^{99m}Tc]MBT2 は切片上の A β に対する親和性を示したが、[^{99m}Tc]BT2B と比較して、[^{99m}Tc]MBT2 の ARG は不明瞭であった(**Figure 1-24A**)。

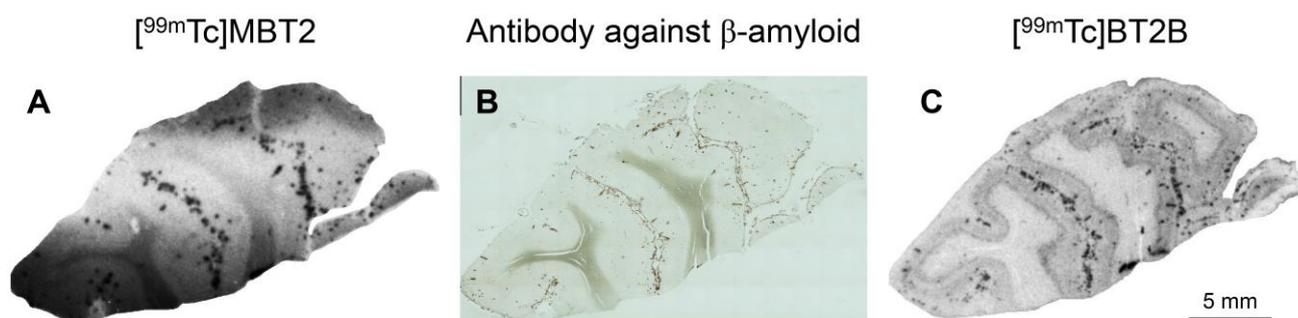


Figure 1-24. *In vitro* ARG of human brain sections from a CAA patient. The sections were labeled with [^{99m}Tc]MBT2 (A) and [^{99m}Tc]BT2B (C). (B) The adjacent brain section was immunostained with an antibody against A β .

1.3.3. 考察

第 1 章第 1 節および第 2 節において開発した ^{99m}Tc -Ham 錯体は、錯形成の際に異性体が生じることが認められた。 Tc -Ham 錯体に関する報告を基に、本節では、異性体の生成を抑制することで単一の ^{99m}Tc 錯体を得ることを目的として、*N*-メチル化した Ham を ^{99m}Tc で標識した錯体を設計・合成し、CAA イメージング薬剤としての有用性に関して評価した。

MBTHam を用いた ^{99m}Tc 錯形成反応において、単一の放射性化合物の生成が確認され、Ham の *N*-メチル化により、 ^{99m}Tc -Ham 錯体に特徴的な異性化が抑制されたことが示唆された(**Figure 1-20**)。 [^{99m}Tc]BT2 の *N*-メチル化錯体である [^{99m}Tc]MBT2 はマウス血漿において、 [^{99m}Tc]BT2 より高い安定性を示し、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の *N*-メチル化による安定性の向上が示唆された(**Figure 1-21, Table 1-5**)。脳実質に沈着した A β 凝集体に対する結合を軽減させるため、CAA 特異的イメージング薬剤の BBB 透過性は低い方が好ましい。 [^{99m}Tc]MBT2 を正常マウスに投与したところ、 [^{99m}Tc]BT2B と同様に、非常に低い脳移行性を示し、 [^{99m}Tc]MBT2 は CAA イメージングに適した性質を示した(**Table 1-6**)。これより、Ham に対するメチル基の導入は脳移行性に影響を与えないことが示唆された。

競合リガンドとして PIB を用いた A β 結合阻害実験を行ったところ、 [^{99m}Tc]MBT2、 [^{99m}Tc]BT2A、ならびに [^{99m}Tc]BT2B の存在下、PIB の IC₅₀ はそれぞれ 0.56、2.80、ならびに 5.78 μM であった(**Table 1-7**)。 ^{99m}Tc -Ham 錯体を *N*-メチル化することにより、A β 凝集体に対する親和性が低下することが認められた。また、マウス脳切片を用いた *in vitro* ARG では、A β 結合阻害実験の結果を反映し、 [^{99m}Tc]MBT2 により得られた画像は不明瞭であった(**Figure 1-23B**)。過剰量の非放射性 PIB の添加により、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の A β 斑に対する結合が阻害されたことから、 ^{99m}Tc -Ham 錯体のマウス脳内 A β に対する特異的結合が示唆された(**Figure 1-23D, H, L**)。A β 結合阻害実験およびマウス脳切片を用いた *in vitro* ARG の結果から、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の構造修飾により、A β に対する親和性が低下することが示唆された。 ^{99m}Tc -Ham 錯体の *N*-メチル化による A β 親和性の低下は、CAA 患者剖検脳組織切片を用いた *in vitro* ARG においても認められた(**Figure 1-24**)。以上の結果より、 ^{99m}Tc -Ham 錯体中の金属キレートを形成するコアの部分が、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の血漿中安定性ならびに A β 凝集体に対する親和性に関与する可能性が示された。

1.3.4. 小括

本節において、2価アミロイドリガンドを含む *N*-メチル化 ^{99m}Tc -Ham 錯体を設計・合成し、CAA を標的とした分子イメージング薬剤としての基礎的評価を行い、以下に述べる結果を得た。

- (1) ^{99m}Tc 錯形成反応において、Ham の *N*-メチル化により異性体の生成が抑制され、単一の ^{99m}Tc 錯体の生成が確認された。
- (2) [^{99m}Tc]MBT2 はマウス血漿において、[^{99m}Tc]BT2 より高い安定性を示した。
- (3) 正常マウスを用いた体内放射能分布評価において、[^{99m}Tc]MBT2 および[^{99m}Tc]BT2 は非常に低い脳移行性を示した。
- (4) A β 凝集体を用いた結合阻害実験、および Tg2576 マウスならびに CAA 患者脳切片を用いた *in vitro* ARGにおいて、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の *N*-メチル化により、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の A β 親和性が低下することが示された。

以上の結果より、 ^{99m}Tc -Ham 錯体の錯形成部位が、マウス血漿における安定性および A β 凝集体に対する親和性に関して重要な役割を果たすことが示唆された。これらの知見は、 ^{99m}Tc -Ham 錯体を基盤とした新規アミロイドイメージング薬剤の分子設計に重要な情報を与えると考えられる。

第2章

固形腫瘍の画像診断・治療を目的とした 炭酸脱水酵素-IX 標的セラノスティクス用 2 価 $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ 錯体の開発

背景

多くの固形腫瘍における重要な特徴として、低酸素領域が挙げられる。低酸素領域は酸素の供給と消費のバランスが破綻することに起因し、腫瘍における酸素の拡散が不十分となることにより生じる。腫瘍における毛細血管網は通常組織とは異なり、酸素分圧を調節できなくなることがある。低酸素領域は、がんの化学療法や放射線治療に対する抵抗性を示し、さらに、腫瘍の増殖・転移に深く関与することが知られている[9]。そのため、低酸素領域は、がん治療における重要な標的のひとつとして考えられている。

固形腫瘍における絶対的な低酸素がん細胞が、腫瘍の増殖や外部放射線治療に伴って劇的に局在を変えることが、近年報告されている[10]。また、放射線により再酸素化が誘導され、低酸素細胞が減少することも報告されている[47]。以上のことから、低酸素領域を標的とした治療において、放射線治療の介入は低酸素細胞のイメージングと共同して行うことが理想であり、これは、個別化医療の実現に繋がる。セラノスティクス(theranostics)は、治療(therapeutics)と診断(diagnosics)のそれぞれのモダリティを組み合わせたものと定義される(**Figure 2-1**) [11]。診断のモダリティとして、PET、SPECT、近赤外(near-infrared, NIR)蛍光イメージング、MRI など、治療のモダリティとして、化学療法、温熱療法、放射線治療などが挙げられる。現在までに、がんを標的とした多くのセラノスティクス用薬剤が開発されてきたが、それらの大半はナノ粒子を基盤としている[11, 48]。しかし、ナノ粒子は投与後、一般的に血液や非標的組織からの消失が遅く、正常臓器に対する非特異的集積が認められる。これらの特徴は、様々な正常組織に対する高い毒性に繋がる可能性がある。一方、PET や SPECT を利用した、放射標識低分子薬剤によるラジオセラノスティクス(radiotheranostics)が大きな注目を集めている。例として、放射標識された前立腺特異的膜抗原阻害薬やソマトスタチン類縁体によるラジオセラノスティクスは、がん患者の放射性同位元素内用療法に伴って腫瘍の核医学分子イメージングを行い、劇的な治療効果が得られるなど、大きな成功を収めている[49-51]。このように、低分子薬剤を用いたラジオセラノスティクスは、がん患者の治療に非常に有用であると考えられている。

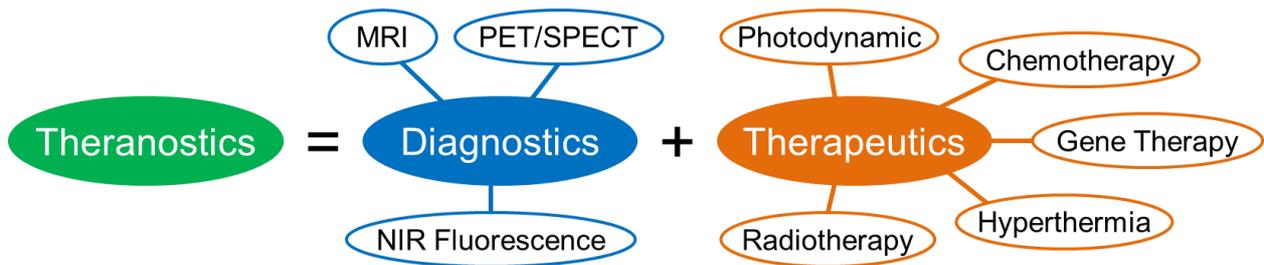


Figure 2-1. Concept of theranostics combining diagnostics and therapeutics.

低酸素誘導シグナル伝達カスケードにおける生体分子を標的とすることは、がん治療に有効な戦略であると考えられてきた[52]。低酸素誘導因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)カスケードにより、CAのアイソザイムの1種であるCA-IXなど、様々なタンパク質の発現が調節される[9, 53, 54]。CA-IXは二酸化炭素と水からプロトンと炭酸水素イオンを産生する生体反応を触媒する[9, 54]。CA-IXはアクアポリンやプロトンチャンネルなど、様々なタンパク質と共同して細胞内外のpHを調節し、このような働きが、腫瘍の増殖・転移に関与すると考えられている[9, 54-56]。低酸素環境においてCA-IXが過剰に発現する一方、通常酸素環境では、酸素により水酸化されたHIF-1に、野生型の腫瘍抑制遺伝子産物である von Hippel Lindau (VHL)が結合することでHIF-1がユビキチン化され、最終的に分解されるため、CA-IXの発現は抑制される[55, 57]。膀胱がん[58]、子宮頸がん[59, 60]、乳がん[61]、肺がん[62]、腎臓がん[63]など、多種類の腫瘍においてCA-IXの過剰な発現が認められる。さらに、CA-IXはがん細胞膜表面に発現することから、がんの治療および診断における優れた標的であると考えられている。抗CA-IX抗体であるG250は放射標識され、PET/SPECTや放射性同位元素内用療法において有用である可能性が報告されている[64-66]。しかし、放射標識G250は投与後の血液からの消失が遅いため、イメージングの際の低い標的/非標的比や、長時間の放射線被曝による高い毒性が問題となる。一方、現在までに、CA-IXを標的とした治療または診断のための低分子薬剤の開発研究が活発に行われてきた[67-72]。近年、CA阻害剤であるアセタゾラミドの誘導体(XYIMSR)が、腎細胞がんのイメージングおよび治療を目的に、それぞれ $^{111}\text{In}/^{64}\text{Cu}$ および ^{177}Lu で標識され、 ^{177}Lu XYIMSR-01による治療が、有望な結果を示したことが報告されている[73-75]。

放射標識薬剤は様々な疾患の診断および治療に利用されてきた。標的とする生体分子と特異的に相互作用するラジオセラノスティクス用薬剤は、核医学分子イメージング(SPECTまたはPET)を目的として γ または β^+ 放出核種でそれぞれ標識され、さらに、放射性同位元素内用療法を目的として β^- または α 放出核種で標識される。それぞれの目的に対応した様々な放射性同位体により標識された薬剤は、放射性金属錯体を用いることにより容易に作製することができる。 γ 放出核種である ^{111}In と β^- 放出核種である ^{90}Y は、錯形成に関して同様な性質を有する放射性金属であり、それぞれSPECTイメージングと放射性同位元素内用療法に適する[76]。同じ標識前駆体から ^{111}In および ^{90}Y 錯体を作製し、共同して用いることは、ラジオセラノスティクス戦略のひとつである。また、1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)は ^{111}In や ^{90}Y などの放射性金属と安定な錯体を形成する金属配位子として、多くの薬剤開発に利用されてきた。

本章における目的は、CA-IX を標的とした新規がんセラノスティクス用薬剤を開発することである。CA-IX リガンドである US を 2 分子導入した 2 価放射性金属錯体である $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ 標識化合物 ($^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ US2) を作製し、CA-IX 高発現腫瘍移植モデルマウスを用いて、がんラジオセラノスティクスに関する評価を行った(Figure 2-2)。

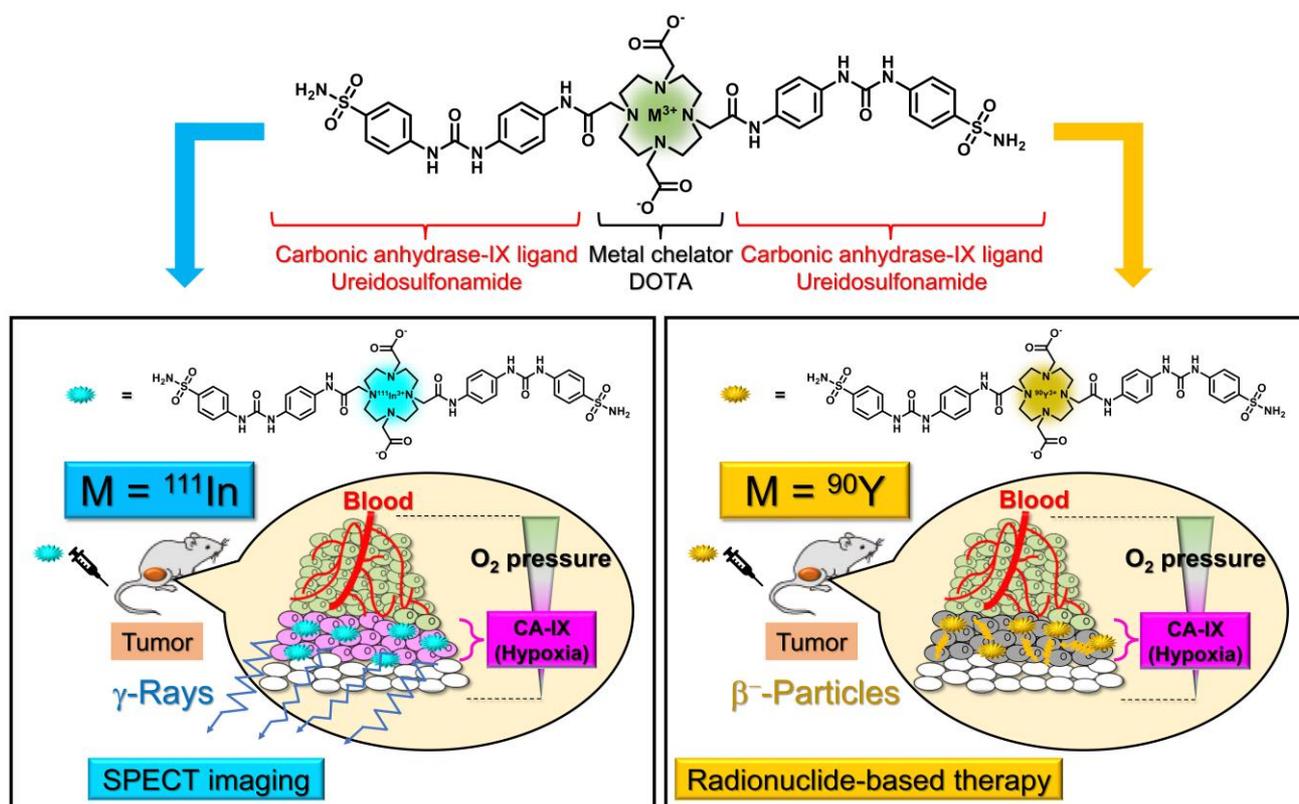


Figure 2-2. Cancer radiotheranostics targeting CA-IX in hypoxic cancer cells with low-molecular-weight $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ US2. (top) Chemical structure of the $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ complex with a bivalent US for cancer radiotheranostics. **(bottom left)** SPECT imaging schematic of hypoxic cancer cells with ^{111}In US2. SPECT imaging of hypoxic cancer cells uses γ -rays from ^{111}In US2 that specifically accumulates within CA-IX-expressing cells (hypoxia). **(bottom right)** Radionuclide-based therapy schematic of hypoxic cancer cells with ^{90}Y US2. Radionuclide-based therapy of hypoxic cancer cells uses β^- -particles from ^{90}Y US2 that specifically accumulates within CA-IX-expressing cells (hypoxia).

2.1. 実験方法

試薬・機器

試薬は、東京化成工業株式会社、ナカライテスク株式会社、和光純薬工業株式会社、渡辺化学工業株式会社、Ark Pharm 社より購入した。中圧分取液体クロマトグラフィーには、山善株式会社製自動設定中圧分取液体クロマトグラフシステム[EPCLC-W-Prep 2XY; 送液ポンプ(ミキサー内臓): No. 580D, 検出器(波長固定型): prep UV-254W, フラクションコレクター: FR-260]を使用し、HI-FLASH COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 µm, カラムサイズ: L または 2L) および INJECT COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 µm, カラムサイズ: M または L) を装着した。NMR には、日本電子株式会社製 JNM-ECS400 を用い、tetramethylsilane を内部標準物質として測定した。エレクトロスプレーイオン化高分解能質量分析(electrospray ionization high-resolution mass spectrometry, ESI-HRMS)には、株式会社島津製作所製高速クロマトグラフ質量分析計 LCMS-IT-TOF を用いた。¹¹¹InCl₃ および ⁹⁰YCl₃ は日本メジフィジックス株式会社および Eckert & Ziegler Radiopharma 社よりそれぞれ購入した。HPLC には、株式会社島津製作所製 LC-20AT を使用し、検出器として株式会社島津製作所製紫外スペクトル検出器 SPD-20A と日立アロカメディカル株式会社製シンチレーションサーベイメーターTCS-172 またはユニバーサル技研株式会社製 HPLC 用放射線検出器 US-3000T を使用した。逆相 HPLC 用カラムは、ナカライテスク株式会社製 Cosmosil 5C₁₈-PAQ (4.6 mm I.D. × 250 mm) を使用した。放射能の測定には、パーキンエルマー社製 Wallac WIZARD 1470 または Wallac WIZARD 1480、および ALOKA 社製キュリーメーター IGC-7 を用いた。イメージングプレートは、富士フイルム株式会社製 BAS-SR2025 を使用した。イメージングプレートの読み込みには、富士フイルム株式会社製バイオイメージングアナライザーBAS-5000 を使用し、解析には、富士フイルム株式会社製 MultiGauge を使用した。ミクロトームは、Leica Microsystems 社製クライオスタット CM1900 を使用した。免疫染色像は、オリンパス株式会社製 FSX100 を用いて観察した。

細胞培養

ヒト大腸がん細胞である HT-29 細胞およびヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞は大日本住友製薬株式会社より購入した。pcDNA3-VHL (VHL-expressing vector) および pcDNA3 (empty vector) がそれぞれトランスフェクションされたヒト腎臓がん細胞である RCC4 plus VHL (RCC4-VHL) および RCC4 plus vector alone (RCC4-VA) 細胞は DS Pharma Biomedical 社より購入した。細胞は抗生物質(ペニシリンおよびストレプトマイシン)と非働化ウシ胎児血清 10% を含む Thermo Fisher Scientific 社製 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中、37 °C、5% CO₂ 下で培養した。

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 系雄性マウスおよび雌性

BALB/c-*nu/nu* ノードマウスは清水実験材料株式会社より購入した。動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し、飼料と水は自由に与えた。

DMEM と Thermo Fisher Scientific 社製 Geltrex を 1:1 で混和し、MDA-MB-231 細胞(150 μ L, 1×10^7 cells/mouse)を懸濁させ、イソフルラン(2%)麻酔下、BALB/c-*nu/nu* ノードマウスの左脇腹に皮下移植した。15 日後、HT-29 細胞(1×10^7 cells/mouse)を MDA-MB-231 細胞移植マウスの右脇腹に同様に皮下移植した。放射性同位元素内用療法のため、HT-29 細胞(5×10^6 cells/mouse)を BALB/c-*nu/nu* ノードマウスの右脇腹に同様に皮下移植した。

ウェスタンブロッティング

培養した細胞(HT-29、MDA-MB-231、RCC4-VHL、RCC4-VA)を 37 °C、5% CO₂、21% O₂ (通常酸素環境)または 1% O₂ (低酸素環境)下で 24 時間静置した。PBS で 3 回洗浄後、セルスクレーパーにより細胞をはがし、400 \times g で 3 分間遠心分離することにより細胞ペレットを得た。腫瘍サンプルの調製のため、安楽死させた腫瘍移植マウスより HT-29 および MDA-MB-231 腫瘍を摘出し、氷冷下ホモジネートを作製した。Promega 社製(5 \times) cell culture lysis reagent (1 mL)と超純水(4 mL)を混和し、Roche Diagnostics 社製 protease inhibitor cocktail tablet を 1錠溶解させた。この溶液(0.5 mL)を細胞(HT-29、MDA-MB-231、RCC4-VHL、RCC4-VA)ペレットおよび腫瘍(HT-29、MDA-MB-231)ライセートに加え、12,000 \times g で 10 分間遠心分離した。上清のタンパク質濃度を Thermo Fisher Scientific 社製 BCA Protein Assay Kit を用いて算出し、等量のタンパク質(10 μ g/well)を Atto 社製ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動により分離させ、Immobilon-P Membrane 社製ポリフッ化ビニリデン膜に転写した。0.05% Tween 20 含有 PBS (0.05-PBST) (5 分間 \times 3)中で静置後、膜を 5%スキムミルク含有 0.05-PBST 中、室温で 1 時間静置した。続いて、膜を抗 CA-IX の 1 次抗体(ab108351; Abcam 社)と 4 °C で終夜反応させた。対照として、抗 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)抗体(14C10; Cell Signaling Technology 社)を用いた。膜を 0.05-PBST (5 分間 \times 3)中で静置後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識 2 次抗体(W401B; Promega 社)と室温で 1 時間反応させた。膜を 0.05-PBST (5 分間 \times 3)中で静置後、ナカライテスク株式会社製 Chemi-Lumi One Super で染色し、抗体の結合を Bio-Rad 社製 ChemiDoc Touch Imaging System により観察した。得られた結果を ImageJ を用いて解析した。

合成

2,2'-(4,10-Bis(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetic acid (5)

化合物 5 は既報の方法に従い、1,4,7,10-tetraazacyclododecane から 5 段階で合成した[77]。

4-(3-(4-Aminophenyl)ureido)benzenesulfonamide (6)

sulfanilamide (172 mg, 1.0 mmol)と 1,1'-carbonyldiimidazole (195 mg, 1.2 mmol)の DMSO (5 mL)溶液を室温で 3 時間攪拌した。薄層クロマトグラフィーにより反応完了を確認した後、反応液を終夜凍結

乾燥した。残渣をアセトニトリル(10 mL)に溶解し、1,4-phenylenediamine (130 mg, 1.2 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=10:1)で精製して目的物 **6** を収量 71 mg (23%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.98 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.28 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.8, 143.5, 139.7, 137.0, 127.2 (2C), 126.0, 123.8 (2C), 119.6 (2C), 117.9 (2C). ESI-HRMS *m/z* calculated for C₁₃H₁₅N₄O₃S⁺ (MH⁺), 307.0859; found, 307.0852.

2,2',2''-(10-(2-Oxo-2-((4-(3-(4-sulfamoylphenyl)ureido)phenyl)amino)ethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid (7)

化合物 **5** (22 mg, 42 μmol)の DMF (10 mL)溶液に化合物 **6** (13 mg, 42 μmol)、1-hydroxybenzotriazole (HOBT)水和物(13 mg, 84 μmol)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)塩酸塩(16 mg, 84 μmol)、トリエチルアミン(12 μL, 84 μmol)を加え、室温で48時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、酢酸エチル(50 mL)を加えた。溶液を0.5 M水酸化ナトリウム水溶液(50 mL × 2)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(50 mL)、飽和塩化ナトリウム水溶液(50 mL)で順次洗い、溶媒を減圧留去した。残渣に TFA (5 mL)を加え、室温で6時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣を逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90:10:0.1 (0 min) to 60:40:0.1 (30 min)]で精製して目的物 **7** を収量 6 mg (21%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.30 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.20 (s, 2H), 3.32 (s, broad, 8H), 3.22 (s, broad, 8H), 2.50–2.48 (m, 8H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.7, 158.4, 152.5, 143.3, 136.6, 126.8 (4C), 118.74 (2C), 118.69 (2C), 117.9 (2C), 117.3 (2C), 40.2 (4C), 40.0 (8C). ESI-HRMS *m/z* calculated for C₂₉H₄₁N₈O₁₀S⁺ (MH⁺), 693.2661; found, 693.2646.

2,2'-(4,10-Bis(2-oxo-2-((4-(3-(4-sulfamoylphenyl)ureido)phenyl)amino)ethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diyl)diacetic acid (8)

化合物 **5** (59 mg, 0.12 mmol)、化合物 **6** (71 mg, 0.23 mmol)、HOBT 水和物(35 mg, 0.23 mmol)、EDC 塩酸塩(44 mg, 0.23 mmol)、トリエチルアミン(32 μL, 0.23 mmol)の DMF (10 mL)溶液を室温で26時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、酢酸エチル(50 mL)を加えた。溶液を0.5 M水酸化ナトリウム水溶液(50 mL × 2)、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(50 mL)、飽和塩化ナトリウム水溶液(50 mL)で順次洗い、溶媒を減圧留去した。残渣に TFA (5 mL)を加え、室温で4時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣を逆相 HPLC [H₂O/MeCN/TFA = 90:10:0.1 (0 min) to 60:40:0.1 (30 min)]で精製して目的物 **8** を収量 19 mg (17%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.46 (s, 2H), 9.54 (s, 2H), 9.30 (s, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.52 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.44 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 7.19 (s, 4H), 4.13 (s, broad, 4H), 3.78 (s, broad, 8H), 3.64 (s, broad, 4H), 3.45 (s, broad, 4H), 3.15 (s, broad, 4H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 158.7, 158.4, 152.4 (2C), 143.2 (2C), 136.6 (2C), 135.7 (2C), 132.7 (2C), 126.8 (4C),

120.1 (4C), 118.8 (4C), 118.2, 117.4 (4C), 115.3, 40.2 (4C), 40.0 (8C). ESI-HRMS m/z calculated for $C_{42}H_{53}N_{12}O_{12}S_2^+$ (MH^+), 981.3342; found, 981.3351.

[^{113/115}In]US1 (9)

化合物 **7** (100 mg, 0.14 mmol) の DMSO (1 mL) 溶液に塩化インジウム(III)無水和物(250 mg, 1.13 mmol) と 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)緩衝液(0.1 M, pH 5.5, 10 mL)を加えた。反応液を 60 °C で 6 時間攪拌し、室温に戻した後、逆相 HPLC [$H_2O/MeCN/TFA = 95:5:0.1$ (0 min) to $65:35:0.1$ (30 min)] で精製して目的物 **9** を収量 40 mg (35%) で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.88 (s, 1H), 9.36 (s, 1H), 9.14 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.15 (s, 2H), 3.05 (s, broad, 8H), 2.77 (s, broad, 8H), 2.46–2.43 (m, 8H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.3 (2C), 158.6, 158.2, 152.4, 143.1, 136.7, 126.8 (4C), 120.1 (2C), 118.6 (2C), 117.4 (2C), 40.4 (8C), 40.2 (2C), 40.0 (2C). ESI-HRMS m/z calculated for $C_{29}H_{38}InN_8O_{10}S^+$ (M^+), 805.1465; found, 805.1450.

[^{113/115}In]US2 (10)

化合物 **8** (10 mg, 10 μ mol) の DMSO (1 mL) 溶液に塩化インジウム(III)無水和物(23 mg, 0.10 mmol) と MES 緩衝液(0.1 M, pH 5.5, 10 mL)を加えた。反応液を 60 °C で 12 時間攪拌し、室温に戻した後、逆相 HPLC [$H_2O/MeCN/TFA = 90:10:0.1$ (0 min) to $60:40:0.1$ (30 min)] で精製して目的物 **10** を収量 9 mg (80%) で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.93 (s, 2H), 9.33 (s, 2H), 9.11 (s, 2H), 7.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.60 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.49 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.44 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.20 (s, 4H), 2.83 (s, broad, 8H), 2.52–2.49 (m, 16H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 152.3 (2C), 143.0 (2C), 136.7 (2C), 136.4 (2C), 131.7 (2C), 126.8 (4C), 120.8 (4C), 118.5 (4C), 117.4 (4C), 40.4 (16C). ESI-HRMS m/z calculated for $C_{42}H_{50}InN_{12}O_{12}S_2^+$ (M^+), 1093.2146; found, 1093.2151.

¹¹¹In および ⁹⁰Y 標識反応

¹¹¹In 標識のため、¹¹¹InCl₃ 溶液(200 μ L)を MES 緩衝液(0.01 または 0.1 M, pH 5.5, 600 μ L)または酢酸ナトリウム緩衝液(0.01 または 0.1 M, pH 6.0, 600 μ L)と混和し、室温で 15 分間静置した。この溶液に 50 μ L の標識前駆体(化合物 **7** または化合物 **8**)水溶液(最終 0.05 mM)を加え、室温、60 °C、または 90 °C で 30 分間静置した。室温に戻した後、反応液を逆相 HPLC [$H_2O/MeCN/TFA = 90:10:0.1$ (0 min) to $60:40:0.1$ (30 min)] で精製した。

⁹⁰Y 標識のため、⁹⁰YCl₃ 溶液(100 μ L)を 0.1 M MES 緩衝液(pH 5.5, 300 μ L)と混和し、室温で 15 分間静置することにより、⁹⁰Y-MES 溶液を得た。化合物 **8** の水溶液(最終 0.04 mM, 50 μ L)を ⁹⁰Y-MES 溶液(400 μ L)に加え、90 °C で 30 分間静置した。室温に戻した後、反応液を逆相 HPLC [$H_2O/MeCN/TFA = 90:10:0.1$ (0 min) to $60:40:0.1$ (30 min)] で精製した。

LogP 値測定

1-オクタノール(3 mL)および PBS (pH 7.4, 3 mL)が入った遠沈管に ^{111}In]US1 または ^{111}In]US2 (50 kBq)を加え、2 分間ボルテックスした後、4,000 ×g で 5 分間遠心分離した。各層から 0.5 mL ずつ溶液を採取した後、それぞれの放射能を測定した。さらに残りの PBS 層から 1 mL を別の遠沈管に移し、1-オクタノール(3 mL)および PBS (2 mL)を加えて、同様にボルテックスし、遠心分離した後、各層の放射能を測定した。1-オクタノール/PBS における放射能の比から分配係数を求め、安定した分配係数が得られるまで、これらの操作を繰り返した。

細胞結合実験

HT-29、MDA-MB-231、RCC4-VHL、RCC4-VA 細胞(2×10^5 cells/well)を 12 ウェルプレートに播種し、通常酸素環境で 24 時間静置した。続いて、プレートを通常酸素または低酸素環境でさらに 24 時間静置した。培地を除去した後、各ウェルに ^{111}In]US1 または ^{111}In]US2 (20 kBq)の DMEM (1 mL) 溶液を低酸素チャンバー内で加え、プレートを通常酸素または低酸素環境で 2 時間静置した。非特異的結合は 50 μM の非放射性アセタゾラミドを添加することにより評価した。各ウェルを PBS (1 mL)で洗浄し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液(0.5 mL × 2)で細胞を溶解させた。細胞に結合した放射能をガンマカウンターで測定し、タンパク質濃度を Thermo Fisher Scientific 社製 BCA Protein Assay Kit を用いて算出した。

腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布評価

^{111}In]US1 または ^{111}In]US2 を生理食塩水で希釈した。1 群 5 匹の HT-29 および MDA-MB-231 腫瘍移植モデルマウスに、尾静脈より 1 匹あたり 40 kBq (100 μL)の ^{111}In 錯体を投与した。*in vivo* 競合実験のため、 ^{111}In]US1 または ^{111}In]US2 (40 kBq)と非放射性アセタゾラミド(10 mg/kg)を同時に投与した。1、4、8、および 24 時間後に安楽死させ、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、脳、HT-29 腫瘍、MDA-MB-231 腫瘍、および筋肉を摘出し、重量と放射能を測定した。

マウス血漿における安定性評価

ddY 系雄性マウスより採取した血液を、4,000 ×g で 5 分間遠心分離し、上清を回収することで血漿を得た。 ^{111}In]US2 (0.19 MBq)をマウス血漿(200 μL)に加え混和した後、37 °C で 1、4、8、および 24 時間静置した。アセトニトリル(200 μL)を加え混和した後、4,000 ×g で 5 分間遠心分離した。上清を回収してナカライテスク株式会社製 Cosmonice Filter (S) (0.45 μm , 4 mm)で濾過した後、濾液を逆相 HPLC で分析した。

腫瘍移植モデルマウスにおける血中放射性代謝物分析

生理食塩水に溶解した ^{111}In]US2 (4.5 MBq, 100 μL)を HT-29 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈より投与した。1 時間後に安楽死させ、採取した血液を、4,000 ×g で 5 分間遠心分離し、上清を回収するこ

とで血漿を得た。血漿にアセトニトリル(200 μ L)を加え混和した後、4,000 \times g で 5 分間遠心分離した。上清を回収してナカライテスク株式会社製 Cosmonice Filter (S) (0.45 μ m, 4 mm)で濾過した後、濾液を逆相 HPLC で分析した。

腫瘍移植モデルマウスにおける腫瘍内放射性代謝物分析

生理食塩水に溶解した ^{111}In]US2 (4.5 MBq, 100 μ L)を HT-29 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈より投与した。1 および 24 時間後に安楽死させ、速やかに HT-29 腫瘍を摘出した。トリス緩衝生理食塩水 (0.5 mL)中で腫瘍ホモジネートを作製し、アセトニトリル(0.5 mL)を加え混和し、4,000 \times g で 5 分間遠心分離した。得られた上清にさらにアセトニトリル(0.5 mL)を加え混和し、4,000 \times g で 5 分間遠心分離した。上清を回収してナカライテスク株式会社製 Cosmonice Filter (S) (0.45 μ m, 4 mm)で濾過した後、濾液を逆相 HPLC で分析した。

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

^{111}In]US2 を生理食塩水で希釈した。1 群 5 匹の 5 週齢 ddY 系雄性マウスに、尾静脈より 1 匹あたり 40 kBq (100 μ L)の ^{111}In]US2 を投与した。1、4、8、および 24 時間後に安楽死させ、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、脳、および筋肉を摘出し、重量と放射能を測定した。

SPECT/CT

MILabs 社製 U-SPECT-II/CT system にて SPECT/CT を行った。HT-29 および MDA-MB-231 腫瘍移植モデルマウスにおける腫瘍容積(V)を、 $V = [\text{length} \times (\text{width})^2]/2$ に従って求め、両腫瘍の容積が同等なマウスを使用した($218.0 \pm 58.9 \text{ mm}^3$)。生理食塩水に溶解した ^{111}In]US2 (30 MBq, 150 μ L)をマウスに尾静脈より投与した。*in vivo* 競合実験のため、 ^{111}In]US2 (30 MBq)と非放射性アセタゾラミド (10 mg/kg)を同時に投与した。投与 1、4、8、および 24 時間後にマウスをイソフルラン(2%)で麻酔し、SPECT を行った。直径 1.0 mm のピンホールコリメーターを使用し、60 分間 \times 1 frame にて撮像した。SPECT 後に CT (管電圧: 65 kV、管電流: 615 μ A)を行った。SPECT の投影データについて、3 次元 ordered-subset expectation maximization 法(8 subsets, 1 iteration)による画像再構成を行った。

腫瘍移植モデルマウスを用いた *ex vivo* ARG

生理食塩水に溶解した ^{111}In]US2 (15 MBq, 150 μ L)を HT-29 および MDA-MB-231 腫瘍移植モデルマウスに尾静脈より投与した。 ^{111}In]US2 の投与 3 時間後、Hypoxyprobe 社製ピモニダゾール塩酸塩 (100 mg/kg)の生理食塩水(100 μ L)溶液をマウスに尾静脈より投与した。さらに 1 時間後(^{111}In]US2 の投与 4 時間後)にマウスを安楽死させ、直ちに両腫瘍を摘出し、SECTION-LAB 社製 SCEM compound で包埋して、ドライアイス-ヘキサンバスで凍結させた。その後、マイクロトームを用いて 10 μ m 厚の凍結切片を作製した。切片をイメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析した。

ARG 実験後、同一切片をヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。

さらに、隣接切片を抗 CA-IX、抗ピモニダゾール、または抗 CD31 抗体を用いて免疫染色した。CA-IX と CD31 の免疫染色のため、切片を 4%パラホルムアルデヒド(20 分間)中で静置した。PBS (5 分間×2)中で静置後、メタノールで希釈した 3%過酸化水素(15 分間)中で静置した。PBS (5 分間×2)中で静置後、切片を抗 CA-IX の 1 次抗体(ab108351; Abcam 社)または抗 CD31 の 1 次抗体(ab28364; Abcam 社)と室温で 90 分間反応させた。PBS (5 分間×2)中で静置後、切片を Dako 社製ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ポリマー結合抗ウサギ 2 次抗体と室温で 60 分間反応させた。PBS (5 分間×2)中で静置後、Merck 社製 diaminobenzidine と室温で 5 分間反応させ、超純水で洗浄し、反応を停止させた。エタノールによる脱水処理、キシレンによる透徹処理を行った後、切片を封入し、顕微鏡で観察した。ピモニダゾールの免疫染色には、ニチレイバイオサイエンス社製ヒストファイน์マウスステインキットを用いた。1 次抗体反応には Hypoxyprobe 社製抗ピモニダゾールの 1 次抗体を用いて、室温で 60 分間行った。クロモゲンに Merck 社製 diaminobenzidine を用いた。

放射性同位元素内用療法

[⁹⁰Y]US2 を生理食塩水で希釈した。1 群 6 匹の HT-29 腫瘍移植モデルマウスに、尾静脈より 1 匹あたり 7.4、3.7、または 1.85 MBq の [⁹⁰Y]US2 (100 μL)を投与した。対照として、 [⁹⁰Y]US2 を含まない生理食塩水(100 μL)をマウスに投与した。腫瘍容積と体重を [⁹⁰Y]US2 の投与 4 週間後まで、週 3 回測定した。腫瘍容積は SPECT/CT において前述した式に従って求め、 [⁹⁰Y]US2 投与日(day 0)における腫瘍容積に対する相対的腫瘍容積を算出した。 [⁹⁰Y]US2 投与日(day 0)における腫瘍容積は 7.4、3.7、1.85 MBq の [⁹⁰Y]US2 ならびに生理食塩水投与群において、それぞれ 68.9±7.1、63.2±4.3、60.7±12.0、ならびに 52.5±4.2 mm³ (mean ± standard error)であった。体重についても同様に、 [⁹⁰Y]US2 投与日(day 0)における体重に対する相対的体重を算出した。

放射線治療による骨髄抑制を末梢血細胞数から評価した。血液はそれぞれのマウスの尾静脈より採取した。血液(2 μL)を、白血球数測定用に 98 μL のチュルク液(0.01% gentian violet 含有 1%酢酸水溶液)で、血小板数測定用に 2,498 μL の 1%シュウ酸アンモニウム水溶液でそれぞれ希釈し、Thermo Fisher Scientific 社製光学顕微鏡(EVOS XL Core Cell Imaging System)およびオリンパス株式会社製細胞計数機(Cell Counter model R1)を用いて、血液細胞数を計測した。血液細胞数は [⁹⁰Y]US2 の投与 4 週間後まで、週 3 回計測し、 [⁹⁰Y]US2 投与前(day -4)における血液細胞数に対する相対的血液細胞数を算出した。

統計解析

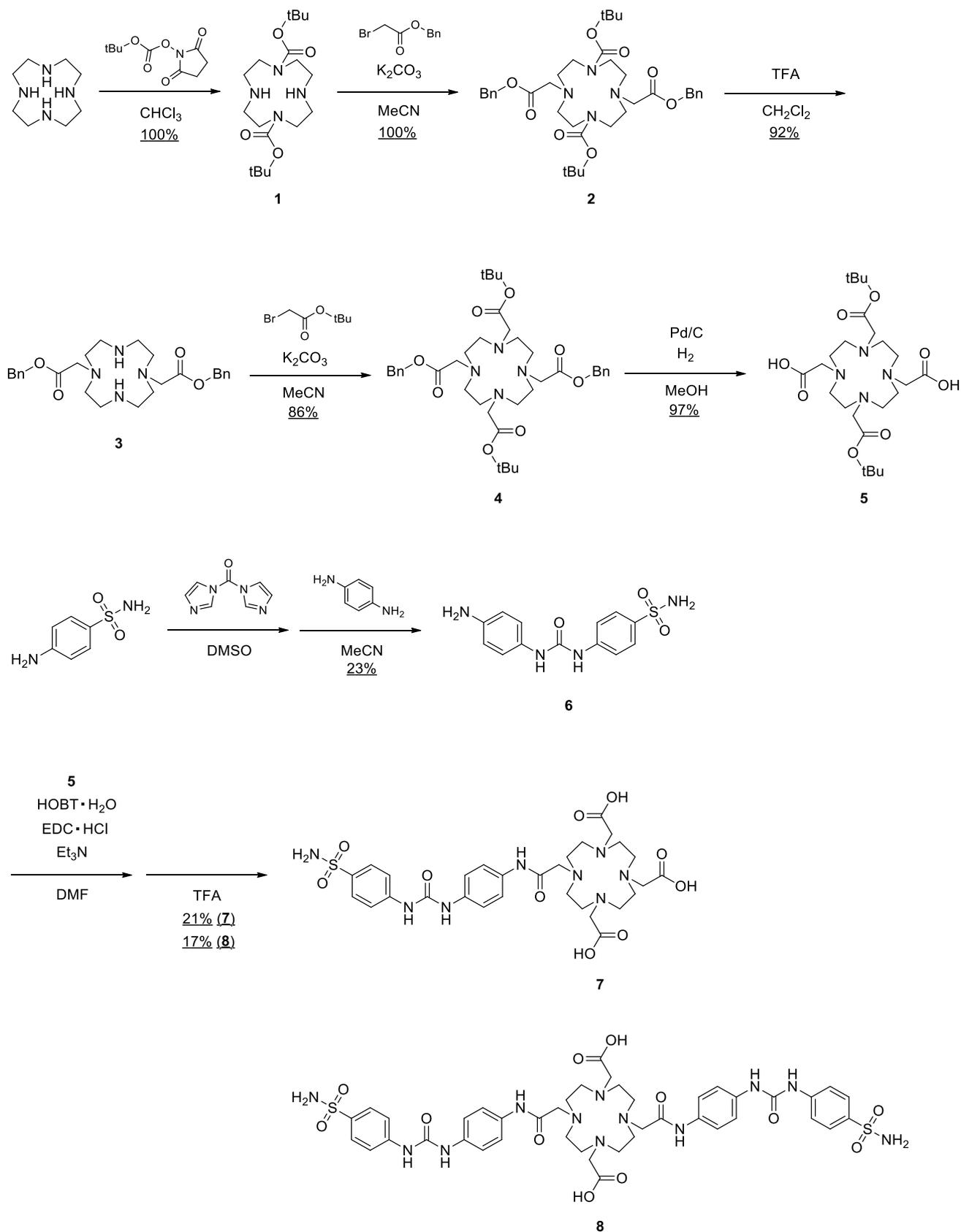
Student's *t*-test を用いて有意差を評価し、*P* < 0.05 の場合に有意差ありとした。

2.2. 結果

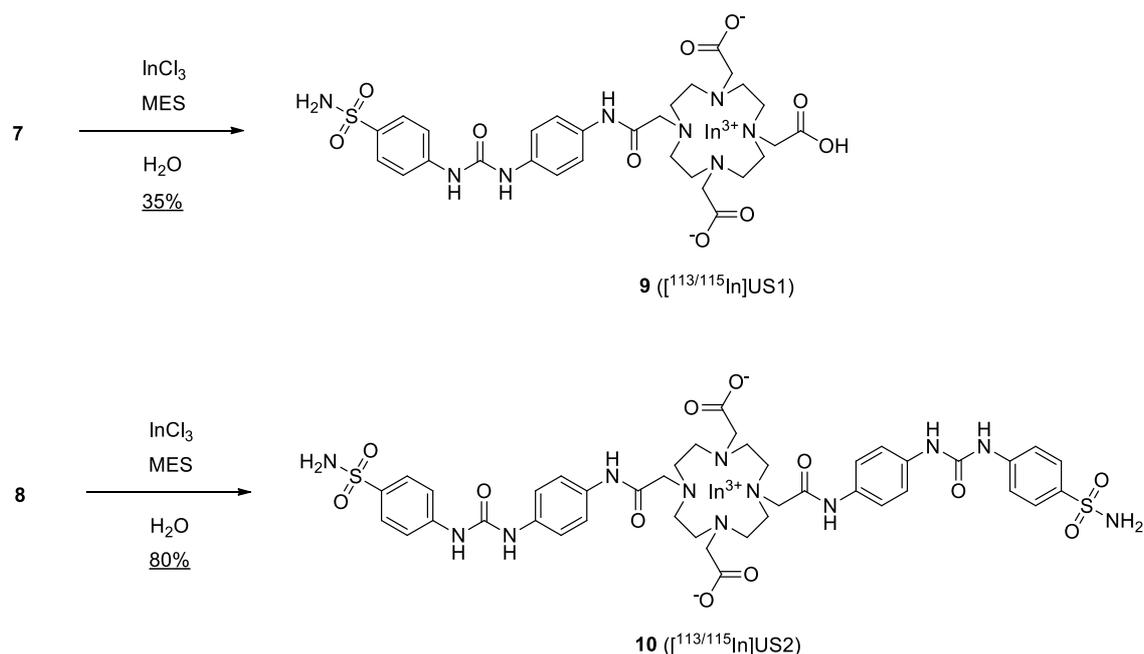
^{111}In および ^{90}Y 錯体の作製

Scheme 2-1 および **Scheme 2-2** にウレイドスルホンアミドを基盤とした $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ 標識前駆体と、対応する $^{113/115}\text{In}$ 錯体の合成経路を示す。まず、*N*-(*tert*-butoxy-carbonyloxy)succinimide を用いて、1,4,7,10-tetraazacyclododecane における *N*1 と *N*7 位を保護した。既報の方法に従い、**Scheme 2-1** に示すように、DOTA-bis(*tert*-butyl)ester (化合物 **5**) を 1,4,7,10-tetraazacyclododecane より総収率 73% で合成した[77]。ウレイドスルホンアミド骨格形成の中間体である 4-isocyanatobenzenesulfonamide は 4-aminobenzenesulfonamide と 1,1'-carbonyldiimidazole を反応させることにより合成し、生成物を直接 1,4-phenylenediamine とカップリング反応させることにより、化合物 **6** を収率 23% で得た[78]。DMF 中、HOBT 水和物、EDC 塩酸塩およびトリエチルアミンの存在下、化合物 **5** と化合物 **6** でアミド結合を形成させ、生成物を TFA で脱保護し、化合物 **7** および化合物 **8** を収率 21% および 17% でそれぞれ得た。 $^{113/115}\text{In}$ 錯体である化合物 **9** および化合物 **10** は、対応する前駆体と $^{113/115}\text{InCl}_3$ を MES 緩衝液中で反応させることにより合成した(**Scheme 2-2**)。

Scheme 2-1. Synthetic Route of the Precursor for Radiolabeling of [¹¹¹In]US1 and [¹¹¹In/⁹⁰Y]US2

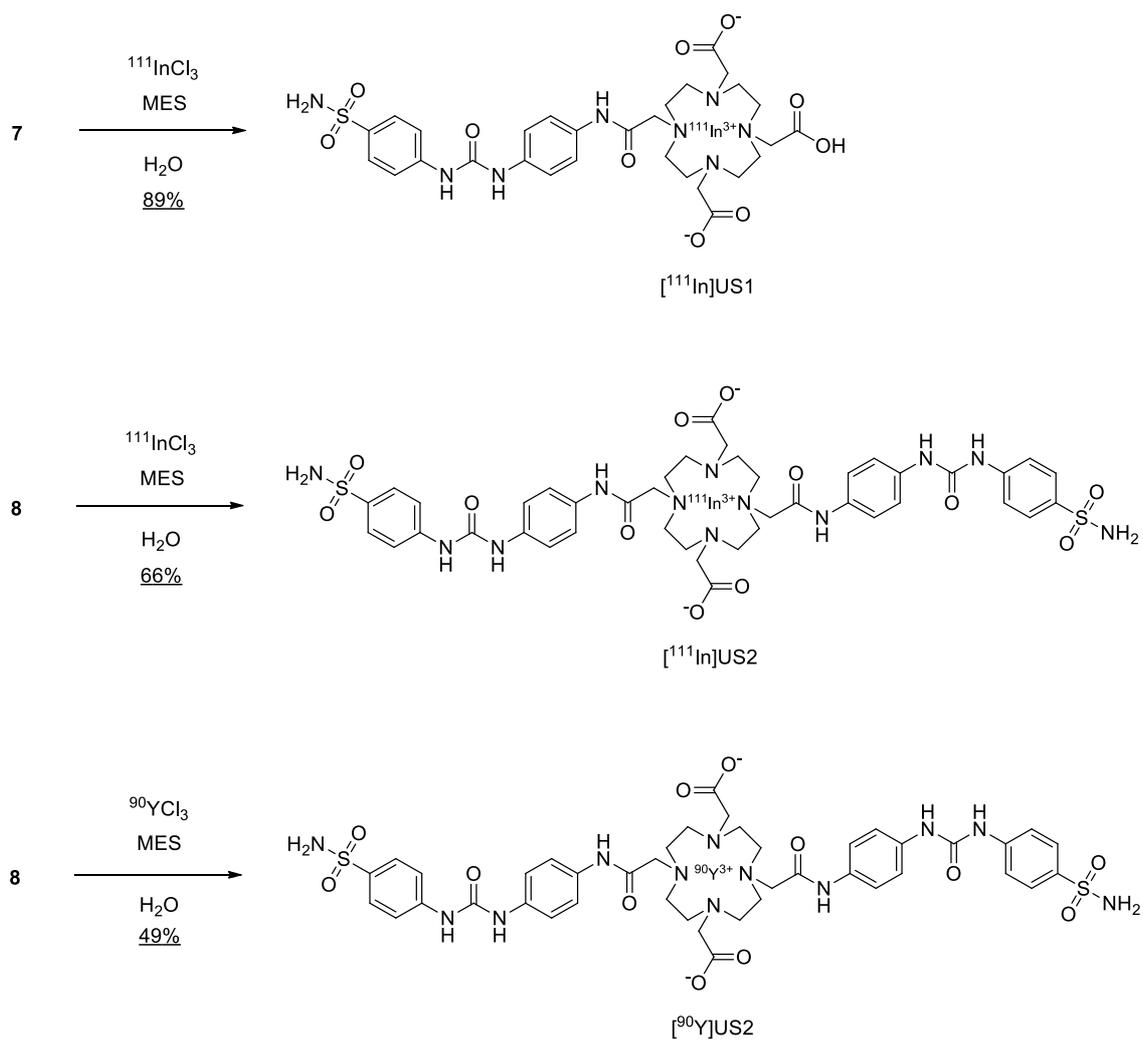


Scheme 2-2. Synthetic Route of [^{113/115}In]US1 and [^{113/115}In]US2



¹¹¹In 標識反応は、標識前駆体と ¹¹¹InCl₃ を 0.1 M MES 緩衝液(pH 5.5)中、90 °C で反応させることにより行った(Scheme 2-3, Figure 2-3)。逆相 HPLC を用いた精製により、[¹¹¹In]US1 および[¹¹¹In]US2 を放射化学的純度 95%以上で作製した(Figure 2-3A, B)。[¹¹¹In]US1 は高い放射化学的収率(89.2%)で得た。また、[¹¹¹In]US2 の作製について、様々な溶媒中、室温、60 °C、または 90 °C で標識検討を行った。Table 2-1 に示すように、室温では溶媒に関わらず、[¹¹¹In]US2 はほとんど得られなかった。60 °C では収率が低く、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液ならびに 0.1 M MES 緩衝液中で、それぞれ 12.0% ならびに 23.2%であった一方、低濃度(0.01 M)の緩衝液では収率が非常に低かった。また、90 °C における ¹¹¹In 標識反応では、0.01 M MES 緩衝液を溶媒として用いた場合を除き、中程度の収率(47.7–66.0%)で[¹¹¹In]US2 を得た。検討した条件の中では、0.1 M MES 緩衝液中、90 °C で反応を行うことにより、最も高い放射化学的収率(66.0%)で[¹¹¹In]US2 を得た。これらの結果から、[⁹⁰Y]US2 をこの条件下で作製し、放射化学的収率は 48.8%であった。逆相 HPLC 精製後、[⁹⁰Y]US2 を高い放射化学的純度(> 95%)で得た(Figure 2-3C)。¹¹¹In/⁹⁰Y 錯体の放射化学的同一性は、対応する ^{113/115}In 錯体を標品として、逆相 HPLC 分析により行った(Table 2-2)。¹¹¹In/⁹⁰Y 錯体と、対応する ^{113/115}In 錯体の保持時間から、目的とする ¹¹¹In/⁹⁰Y 標識 US の生成が示唆された。

Scheme 2-3. Radiolabeling of [¹¹¹In]US1, [¹¹¹In]US2, and [⁹⁰Y]US2



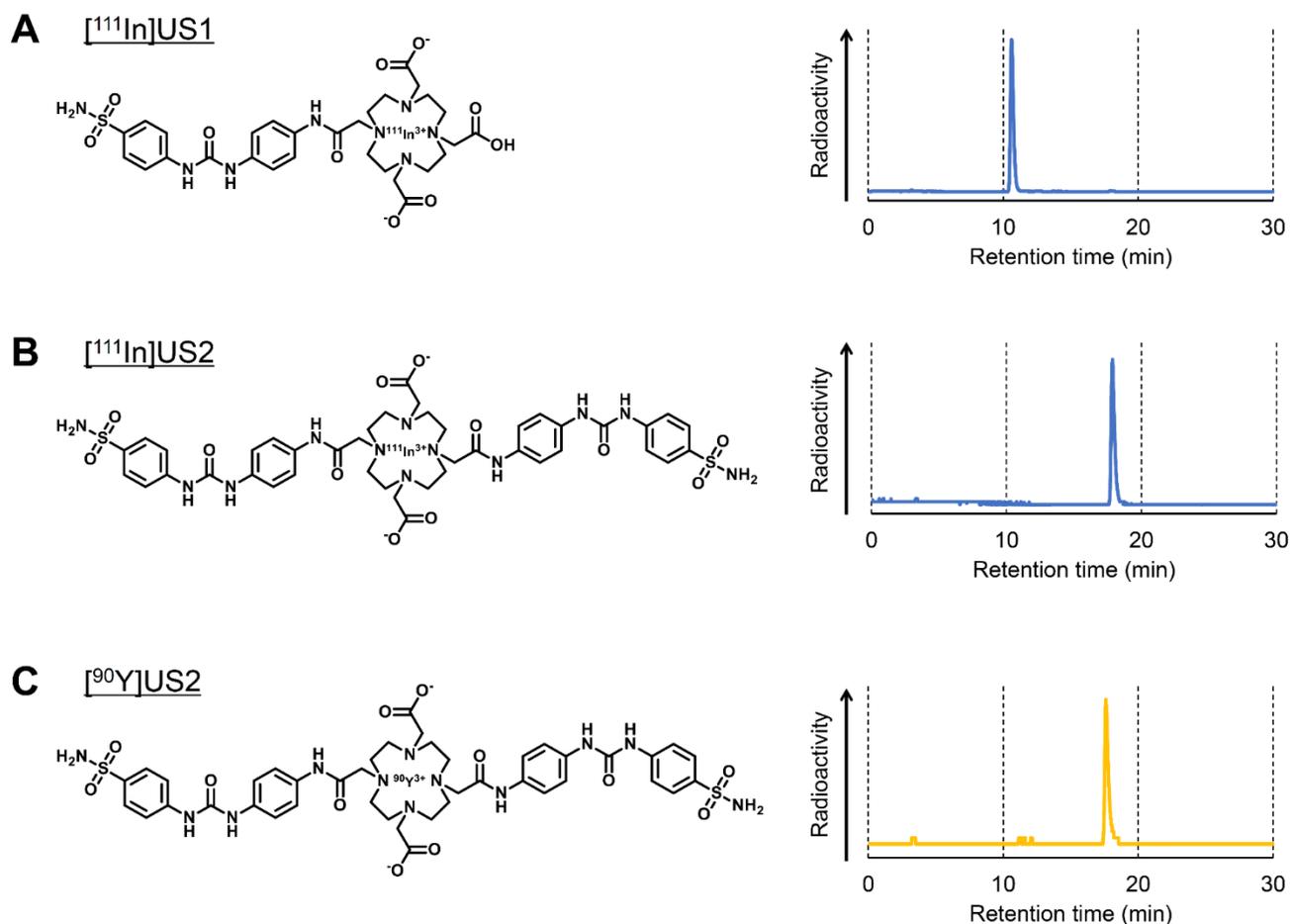


Figure 2-3. Radiolabeling of $[^{111}\text{In}]\text{US1}$, $[^{111}\text{In}]\text{US2}$, and $[^{90}\text{Y}]\text{US2}$. (A) Chemical structure and typical HPLC profile of $[^{111}\text{In}]\text{US1}$. (B) Chemical structure and typical HPLC profile of $[^{111}\text{In}]\text{US2}$. (C) Chemical structure and typical HPLC profile of $[^{90}\text{Y}]\text{US2}$. The HPLC analyses were performed on a Cosmosil C₁₈ column (5C₁₈-PAQ, 4.6 × 250 mm) with a solvent of H₂O/MeCN/TFA [90:10:0.1 (0 min) to 60:40:0.1 (30 min)] as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min.

Table 2-1. Radiochemical Yields of $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ under the Given Conditions

Temperature	Solvent	Radiochemical yield (%)
Room temperature	0.01 M NaOAc (pH 6.0)	0.0
	0.1 M NaOAc (pH 6.0)	1.5
	0.01 M MES (pH 5.5)	0.5
	0.1 M MES (pH 5.5)	1.2
60 °C	0.01 M NaOAc (pH 6.0)	6.5
	0.1 M NaOAc (pH 6.0)	12.0
	0.01 M MES (pH 5.5)	0.7
	0.1 M MES (pH 5.5)	23.2
90 °C	0.01 M NaOAc (pH 6.0)	47.7
	0.1 M NaOAc (pH 6.0)	57.9
	0.01 M MES (pH 5.5)	7.0
	0.1 M MES (pH 5.5)	66.0

Table 2-2. Reversed-Phase HPLC Retention Times and Partition Coefficients of the ^{111}In , $^{113/115}\text{In}$, and ^{90}Y Complexes and Corresponding Precursors

Compound	Retention time (min)*	Log P^\dagger
Compound 7	13.2	Not determined
[^{111}In]US1	10.5	-3.38 ± 0.09
[$^{113/115}\text{In}$]US1	10.3	Not determined
Compound 8	19.1	Not determined
[^{111}In]US2	17.7	-2.81 ± 0.01
[$^{113/115}\text{In}$]US2	17.6	Not determined
[^{90}Y]US2	17.6	Not determined

*Reversed-phase HPLC on a Cosmosil C₁₈ column (5C₁₈-PAQ, 4.6 × 250 mm) with a solvent of H₂O/MeCN/TFA [90:10:0.1 (0 min) to 60:40:0.1 (30 min)] as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min.

†Each value is the mean ± standard deviation of three independent experiments.

細胞結合実験

細胞結合実験の前に、通常酸素および低酸素環境における、HT-29、MDA-MB-231、RCC4-VHL、および RCC4-VA 細胞の CA-IX 発現を、ウェスタンブロッティングにより確認した。HT-29 細胞は CA9 遺伝子を発現する一方、MDA-MB-231 細胞は発現しないことが報告されている[79]。本研究では、通常酸素環境下の HT-29 細胞において高い CA-IX 発現が観測され、低酸素環境でその発現は増大した。低酸素環境における HT-29 細胞の CA-IX 発現は、通常酸素環境下の 1.9 倍であった。一方、通常酸素環境下の MDA-MB-231 細胞において CA-IX 発現はほとんど観測されず、低酸素環境で CA-IX 発現のわずかな上昇が認められた(**Figure 2-4A**)。一般的に、VHL 遺伝子の欠損は HIF-1 を安定化させ、高い CA-IX 発現に繋がると考えられている[9, 55]。酸素濃度に依存せず、RCC4-VHL 細胞において CA-IX 発現がほとんど観測されなかった一方、RCC4-VA 細胞において高い CA-IX 発現が観測された(**Figure 2-5A**)。

細胞結合実験は、これらの細胞を用いて通常酸素および低酸素環境で行った(**Figure 2-4, Figure 2-5**)。Figure 2-4B および Figure 2-5B が示すように、通常酸素および低酸素環境で、[^{111}In]US1 はいずれの細胞に対しても、顕著な結合性を示さなかった(<3% initial dose/mg protein)。[^{111}In]US1 の細胞に対する結合がそれぞれの細胞における CA-IX 発現とほとんど相関しなかったことから、[^{111}In]US1 の CA-IX 親和性は低いことが示唆された。しかし、通常酸素環境と比較して、低酸素環境における HT-29 細胞に対する結合は有意に増強した(0.775 および 2.91% initial dose/mg protein)。これは、ウェスタンブロッティングの結果と一致した。一方、[^{111}In]US1 と比較して、[^{111}In]US2 は全ての細胞に対してより強い結合を示した(**Figure 2-4C, Figure 2-5C**)。多価効果により、 ^{111}In 標識 US の CA-IX 親和性が増強したと考えられた[6, 20]。通常酸素環境で、[^{111}In]US2 の CA-IX 高発現細胞(HT-29 および RCC4-VA)に対する結合(25.4 および 69.0% initial dose/mg protein)は、CA-IX 低発現細胞(MDA-MB-231 および RCC4-VHL)に対する結合(11.6 および 14.4% initial dose/mg protein)より有意に高かった。これより、[^{111}In]US2 の高い CA-IX 親和性が示唆された。この選択性は、低酸素環境においても観測さ

れた(HT-29、MDA-MB-231、RCC4-VHL、および RCC4-VA 細胞に対してそれぞれ 125、16.9、24.0、および 74.3% initial dose/mg protein)。[¹¹¹In]US1 と同様、[¹¹¹In]US2 の HT-29 細胞に対する結合は、低酸素環境により有意に増強した。さらに、通常酸素および低酸素環境で、[¹¹¹In]US2 の CA-IX 高発現細胞に対する結合は、CA 阻害剤であるアセタゾラミドの添加により有意に低減したことから、[¹¹¹In]US2 の高い CA 特異性が示された。しかし、この阻害実験により、¹¹¹In 錯体の細胞に対する高い非特異的結合が示唆された([¹¹¹In]US2 について 5–20% initial dose/mg protein)。これらの結果より、[¹¹¹In]US2 は CA-IX 標的薬剤として、*in vitro* において[¹¹¹In]US1 より優れた性質を有することが示された。

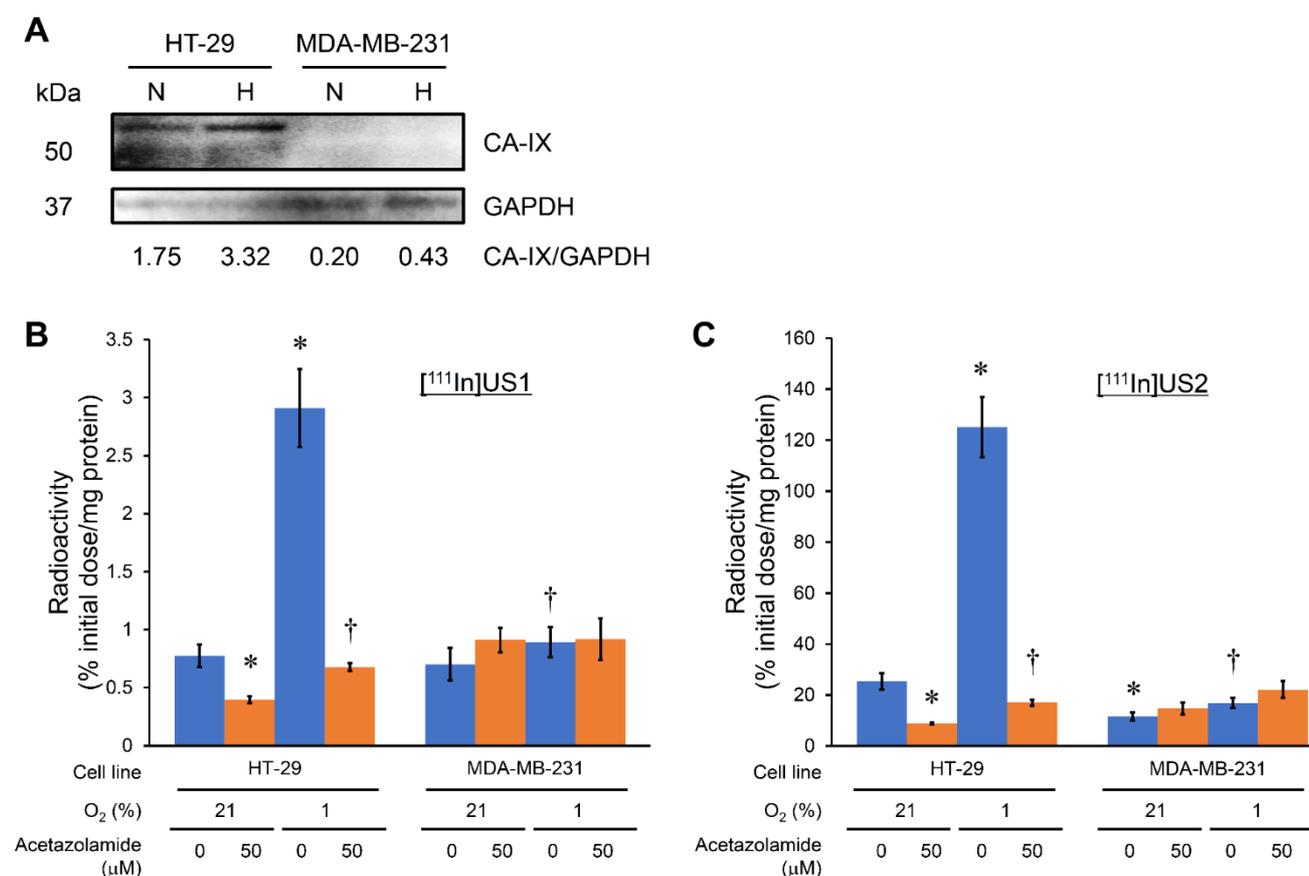


Figure 2-4. Cell binding assay with [¹¹¹In]US1 and [¹¹¹In]US2 using HT-29 and MDA-MB-231 cells. (A) Western blotting analysis of HT-29 and MDA-MB-231 cells under normoxic (N) and hypoxic (H) conditions. GAPDH was used as a loading control. **(B)** *In vitro* uptake of [¹¹¹In]US1 into cells. **(C)** *In vitro* uptake of [¹¹¹In]US2 into cells. Each value is the mean ± standard error of six independent experiments. **P* < 0.05 as compared with uptake into HT-29 cells under normoxic conditions, †*P* < 0.005 as compared with uptake into HT-29 cells under hypoxic conditions (Student's *t*-test).

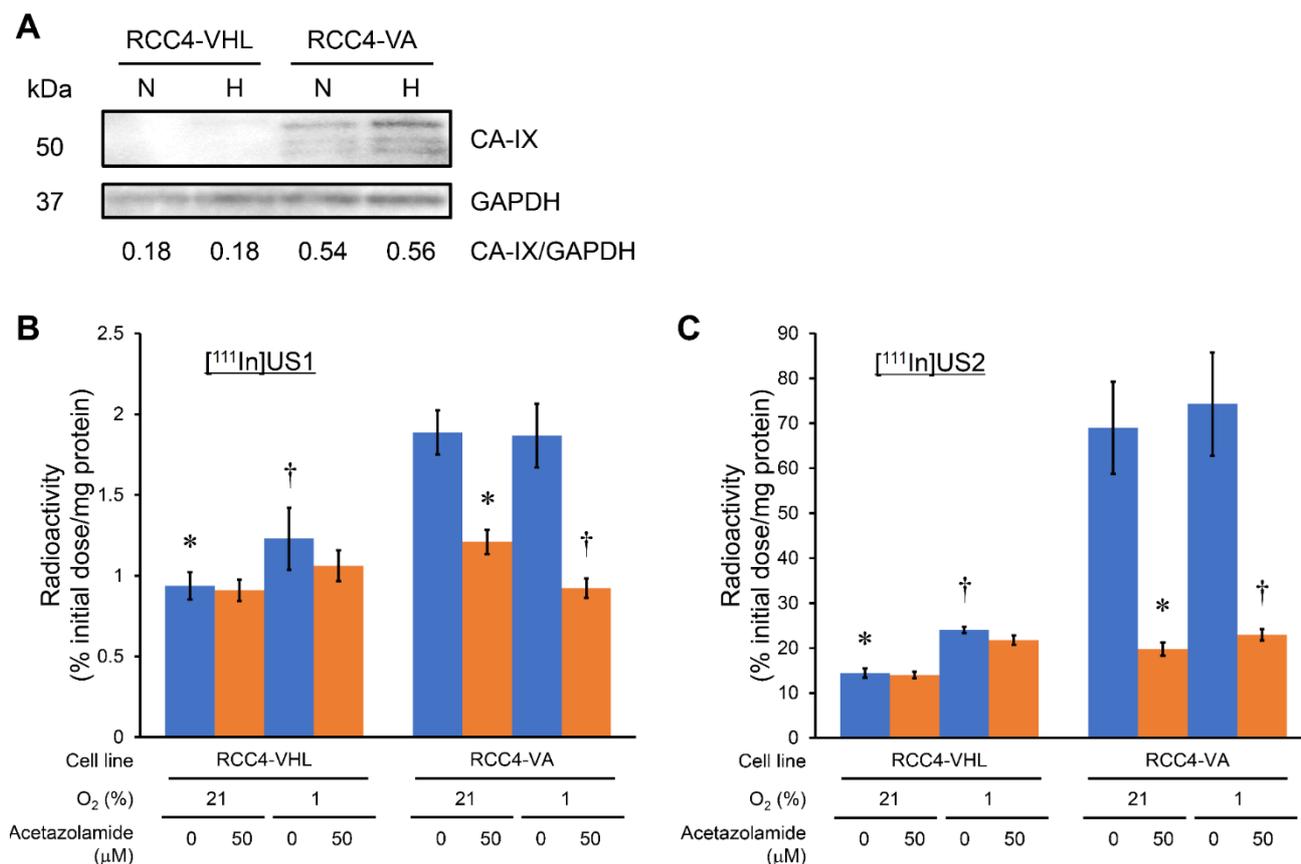


Figure 2-5. Cell binding assay with [¹¹¹In]US1 and [¹¹¹In]US2 using RCC4-VHL and RCC4-VA cells. (A) Western blotting analysis of RCC4-VHL and RCC4-VA cells under normoxic (N) and hypoxic (H) conditions. GAPDH was used as a loading control. **(B)** *In vitro* uptake of [¹¹¹In]US1 into cells. **(C)** *In vitro* uptake of [¹¹¹In]US2 into cells. Each value is the mean ± standard error of six independent experiments. **P* < 0.005 as compared with uptake into RCC4-VA cells under normoxic conditions, †*P* < 0.05 as compared with uptake into RCC4-VA cells under hypoxic conditions (Student's *t*-test).

腫瘍移植モデルマウスを用いた体内放射能分布評価

モデルマウスにおける CA-IX 発現腫瘍に対する集積を評価するため、体内放射能分布実験を行った(**Figure 2-6, Table 2-3**)。 *in vitro* および *in vivo* どちらにおいても、HT-29 ならびに MDA-MB-231 細胞は、CA-IX 高発現ならびに低発現細胞としてそれぞれ用いられてきた[80]。本研究では、モデルマウスから摘出した HT-29 腫瘍において高い CA-IX 発現が認められた一方、MDA-MB-231 腫瘍からは低い発現が観測された(**Figure 2-6A**)。MDA-MB-231 細胞は *in vitro* においてほとんど CA-IX 発現が観測されなかったが、生体内である程度の低酸素環境になったため、*in vivo* において MDA-MB-231 腫瘍から低い CA-IX 発現が確認されたと考えられた。

2 価 ^{111}In 錯体である [^{111}In]US2 は投与 1 時間後において、MDA-MB-231 腫瘍(1.64% injected dose/g)と比較して、HT-29 腫瘍(4.57% injected dose/g)に対する有意に高い集積を示したことから、*in vivo* における CA-IX 高発現腫瘍に対する高い選択性が示された。全てのタイムポイントにおいて、HT-29 腫瘍に対する集積は、MDA-MB-231 腫瘍に対する集積より有意に高かった。MDA-MB-231 腫瘍に対する集積は投与 1 時間後から 8 時間後にかけてわずかに上昇したが、有意差は認められなかった ($P = 0.06$, Student's *t*-test)。非特異的集積を考慮して、アセタゾラミドによる競合実験は最も遅いタイムポイント(投与 24 時間後)において行った。投与 24 時間後における HT-29 腫瘍に対する集積が 1.72% injected dose/g から、アセタゾラミドの共投与により 0.63% injected dose/g へと有意に減少したことから、[^{111}In]US2 の CA に対する特異的結合性が示された(**Figure 2-6D**)。また、低い CA-IX 発現を示した MDA-MB-231 腫瘍においても、アセタゾラミドの共投与により放射能集積がわずかに減少した。さらに、[^{111}In]US2 の集積について、HT-29 腫瘍/血液比および HT-29 腫瘍/筋肉比は継時的に上昇し、投与 24 時間後において、それぞれ 10.78 および 7.75 となったことから、[^{111}In]US2 は固形腫瘍の *in vivo* イメージングに優れた性質を有することが示された(**Figure 2-6E**)。2 価 ^{111}In 錯体 ([^{111}In]US2)と比較して、1 価 ^{111}In 錯体([^{111}In]US1)は HT-29 腫瘍に対して、より低い集積と選択性(投与 1–24 時間後 0.27–2.12% injected dose/g)を示し、*in vitro* 細胞結合実験の結果と相関した結果が得られた(**Figure 2-6B**)。

細胞結合実験および体内放射能分布実験の結果より、以後の実験は [^{111}In]US2 および [^{90}Y]US2 について行った。

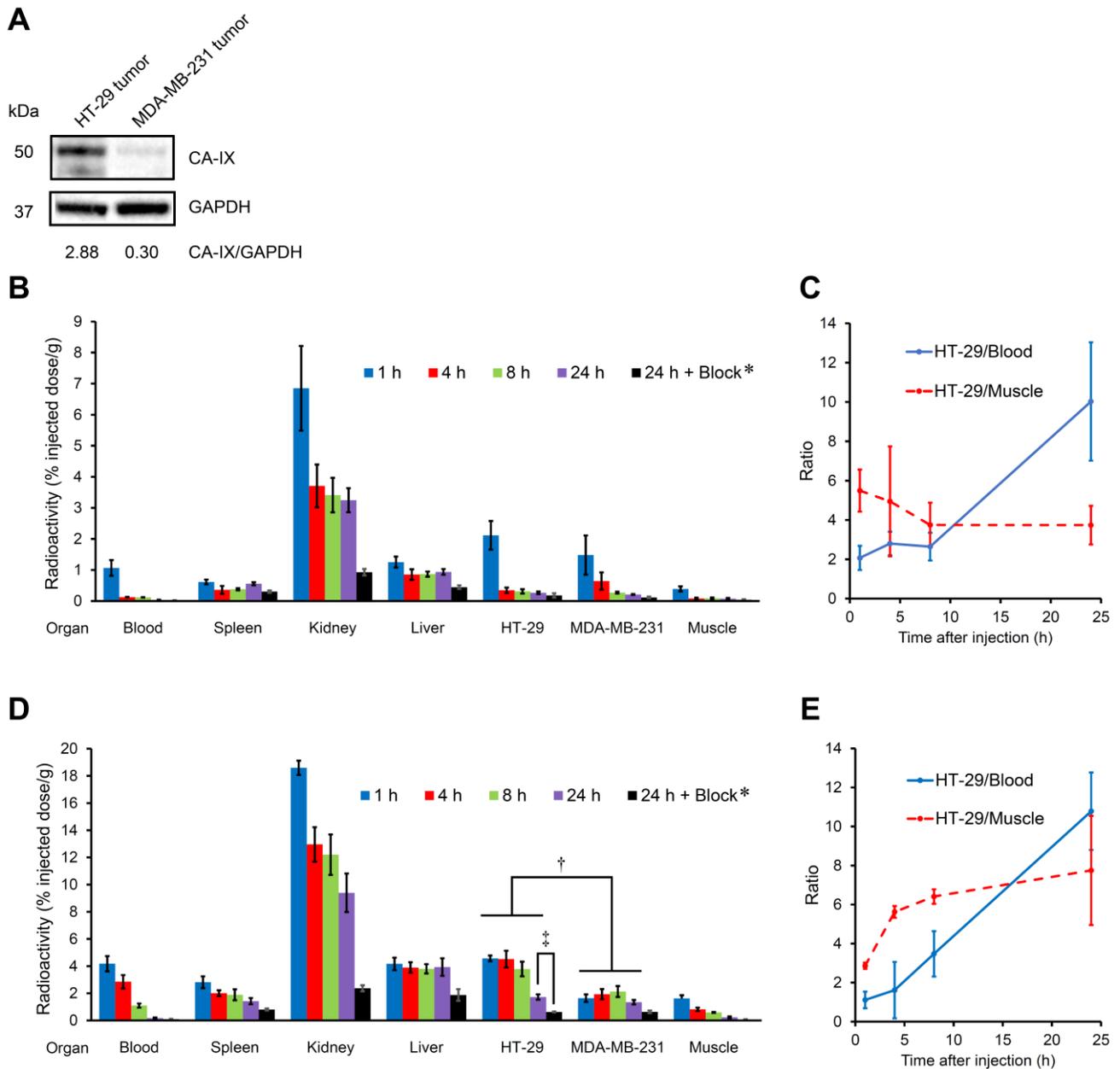


Figure 2-6. *In vivo* biodistribution study with [¹¹¹In]US1 and [¹¹¹In]US2 in HT-29 and MDA-MB-231 tumor-bearing mice. (A) Western blotting analysis of HT-29 and MDA-MB-231 tumor lysate *in vivo*. GAPDH was used as a loading control. (B) Radioactivity of representative extracted organs and tissues after the intravenous injection of [¹¹¹In]US1 in the HT-29 and MDA-MB-231 tumor-bearing mice. (C) Ratios of radioactivity in the HT-29 tumor to that in the blood and muscle in (B). (D) Radioactivity of representative extracted organs and tissues after the intravenous injection of [¹¹¹In]US2 in the HT-29 and MDA-MB-231 tumor-bearing mice. (E) Ratios of radioactivity in the HT-29 tumor to that in the blood and muscle in (D). Each value is the mean \pm standard deviation of five mice at each interval. *Coinjection of acetazolamide (10 mg/kg). $^\dagger P < 0.05$ each time, $^\ddagger P < 0.001$ (Student's *t*-test).

Table 2-3. Radioactivity of Extracted Organs after Intravenous Injection of [¹¹¹In]US1 and [¹¹¹In]US2 in the HT-29 and MDA-MB-231 Tumor-Bearing Mice

Organ	Time after injection (h)				
	1	4	8	24	24 + Block*
	[¹¹¹ In]US1				
Blood	1.07 ± 0.25	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00
Spleen	0.61 ± 0.08	0.36 ± 0.12	0.38 ± 0.03	0.56 ± 0.05	0.30 ± 0.04
Pancreas	0.41 ± 0.14	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Stomach [†]	1.44 ± 0.47	0.31 ± 0.27	0.89 ± 0.61	0.15 ± 0.08	0.43 ± 0.27
Intestine	2.00 ± 1.16	8.22 ± 2.47	17.60 ± 7.39	2.69 ± 1.29	2.58 ± 1.03
Kidney	6.85 ± 1.36	3.71 ± 0.69	3.41 ± 0.55	3.25 ± 0.39	0.93 ± 0.11
Liver	1.25 ± 0.18	0.85 ± 0.17	0.87 ± 0.08	0.94 ± 0.09	0.45 ± 0.06
Heart	0.54 ± 0.04	0.09 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.04 ± 0.03
Lung	1.55 ± 0.29	0.21 ± 0.07	0.22 ± 0.03	0.21 ± 0.08	0.08 ± 0.04
Brain	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01
HT-29	2.12 ± 0.46	0.35 ± 0.09	0.31 ± 0.07	0.27 ± 0.04	0.18 ± 0.07
MDA-MB-231	1.48 ± 0.63	0.64 ± 0.28	0.27 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.11 ± 0.03
Muscle	0.39 ± 0.08	0.08 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.01
HT-29/Blood	2.07 ± 0.61	2.80 ± 0.60	2.65 ± 0.71	10.03 ± 3.01	9.45 ± 4.66
HT-29/Muscle	5.49 ± 1.07	4.95 ± 2.80	3.75 ± 1.14	3.74 ± 0.98	4.26 ± 1.69
HT-29/MDA-MB-231	1.53 ± 0.42	0.59 ± 0.19	1.14 ± 0.20	1.27 ± 0.22	1.59 ± 0.63
	[¹¹¹ In]US2				
Blood	4.17 ± 0.56	2.85 ± 0.50	1.09 ± 0.15	0.17 ± 0.05	0.09 ± 0.02
Spleen	2.82 ± 0.44	2.01 ± 0.21	1.89 ± 0.40	1.42 ± 0.23	0.80 ± 0.07
Pancreas	3.22 ± 0.54	1.80 ± 0.19	1.32 ± 0.23	0.43 ± 0.10	0.17 ± 0.04
Stomach [†]	8.86 ± 0.98	6.64 ± 0.86	4.90 ± 0.70	1.25 ± 0.13	0.30 ± 0.03
Intestine	6.86 ± 1.24	6.64 ± 0.79	5.76 ± 1.92	1.51 ± 0.31	0.43 ± 0.13
Kidney	18.59 ± 0.53	12.96 ± 1.27	12.20 ± 1.49	9.40 ± 1.42	2.37 ± 0.22
Liver	4.17 ± 0.46	3.90 ± 0.38	3.80 ± 0.34	3.93 ± 0.64	1.87 ± 0.43
Heart	2.78 ± 0.27	1.59 ± 0.16	1.07 ± 0.21	0.58 ± 0.10	0.20 ± 0.04
Lung	8.76 ± 0.53	4.99 ± 0.20	3.64 ± 0.91	0.99 ± 0.22	0.48 ± 0.10
Brain	0.17 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.02 ± 0.00
HT-29	4.57 ± 0.21 [‡]	4.51 ± 0.62 [‡]	3.78 ± 0.54 [‡]	1.72 ± 0.20 ^{‡,§}	0.63 ± 0.03
MDA-MB-231	1.64 ± 0.28	1.93 ± 0.38	2.13 ± 0.40	1.34 ± 0.17	0.63 ± 0.10
Muscle	1.62 ± 0.24	0.82 ± 0.12	0.59 ± 0.04	0.23 ± 0.06	0.07 ± 0.02
HT-29/Blood	1.11 ± 0.16	1.61 ± 0.30	3.47 ± 0.37	10.78 ± 2.80	7.06 ± 1.70
HT-29/Muscle	2.86 ± 0.43	5.62 ± 1.45	6.41 ± 1.16	7.75 ± 1.98	9.64 ± 4.15
HT-29/MDA-MB-231	2.84 ± 0.41	2.38 ± 0.34	1.81 ± 0.32	1.31 ± 0.30	1.01 ± 0.14

Values are expressed as % injected dose per gram of organ. Each value is the mean ± standard deviation of five mice at each interval. *Coinjection of acetazolamide (10 mg/kg). [†]Values are expressed as % injected dose. [‡] $P < 0.05$ as compared with MDA-MB-231 tumor each time, [§] $P < 0.001$ as compared with 24 h + Block (Student's *t*-test).

in vitro および *in vivo* 安定性

in vitro における実験の妥当性を検証するため、[¹¹¹In]US2 の *in vitro* における安定性をマウス血漿中 37 °C で静置することにより評価した(Figure 2-7)。その結果、[¹¹¹In]US2 は 24 時間後まで、非常に高い安定性(> 96.4%)を示した(Figure 2-7A)。さらに、[¹¹¹In]US2 を HT-29 腫瘍移植モデルマウスに

投与した後の血液および HT-29 腫瘍における放射性代謝物を分析した。Figure 2-7B, C が示すように、投与 1 時間後の血液および腫瘍において、ほとんどの $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ が分解されずに存在した(81.4% および 84.4%)。1 時間における血中の *in vivo* 安定性(81.4%)は *in vitro* (> 99.9%)と異なったが、*in vivo* では代謝の影響を大きく受けるため、それらの差が生じたと考えられた。また、投与 24 時間後の HT-29 腫瘍において、 $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ は 70.4%が安定に存在し、生体内で CA-IX を認識した後、ほとんど分解されずに、CA-IX に結合したままであることが示唆された(Figure 2-7C)。逆相 HPLC 分析において観測された $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ 以外の放射能ピークは、その保持時間より、 $^{111}\text{In}^{3+}$ 由来のものであると考えられた。

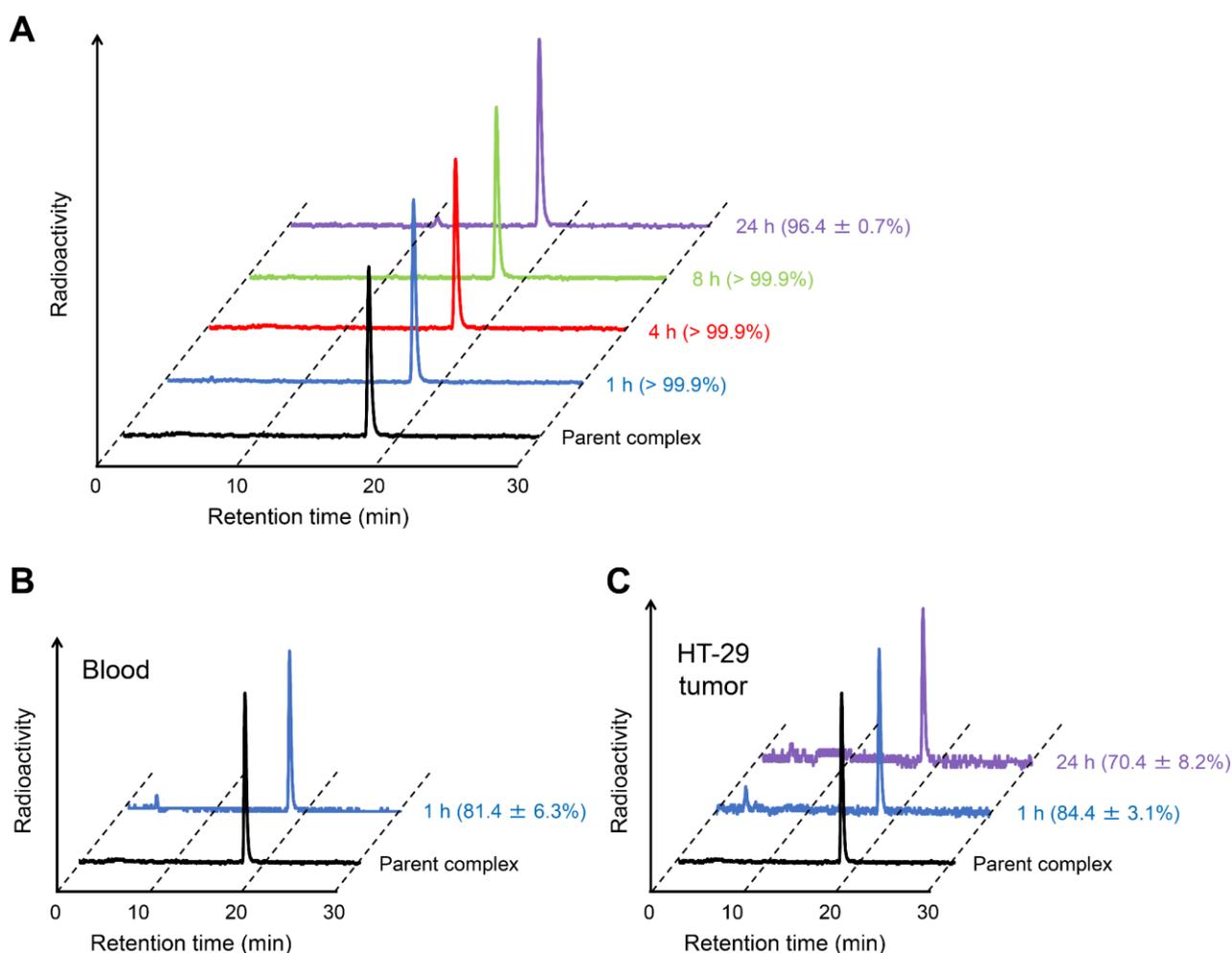


Figure 2-7. Stability of $[^{111}\text{In}]\text{US2}$. (A) Typical HPLC profile of radioactivity and radiochemical purity of $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ after incubation in mouse plasma at 37 °C for 1, 4, 8, and 24 h. (B) Typical HPLC profile of radioactivity and radiochemical purity of $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ in the blood at 1 h postinjection. (C) Typical HPLC profile of radioactivity and radiochemical purity of $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ in the HT-29 tumor at 1 and 24 h postinjection. The HPLC analyses were performed on a Cosmosil C₁₈ column (5C₁₈-PAQ, 4.6 × 250 mm) with a solvent of H₂O/MeCN/TFA [90:10:0.1 (0 min) to 60:40:0.1 (30 min)] as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. Each value is the mean ± standard error of five independent experiments.

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

[¹¹¹In]US2 について、正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行った(**Table 2-4**)。 [¹¹¹In]US2 は血液ならびに筋肉から経時的かつ速やかに消失し(投与 24 時間後それぞれ 0.10 ならびに 0.22% injected dose/g)、固形腫瘍の *in vivo* イメージングにおける低いバックグラウンドシグナルおよび放射性同位元素内用療法における低い血液毒性の可能性が示唆された。また、腎臓に放射能が滞留する傾向(投与 1–24 時間後 7.11–11.39% injected dose/g)および胃に対する放射能集積(投与 1 時間後 8.05% injected dose)が認められ、放射性同位元素内用療法において腎毒性などを示す可能性が示唆された。全てのタイムポイントにおいて、腎臓に対して肝臓より高い集積が観測され、 [¹¹¹In]US2 は腎臓から優位に排泄されることが示唆された。これは、 [¹¹¹In]US2 が高い親水性(log*P* = -2.81)を有することに起因すると考えられた(**Table 2-2**)。正常組織に対する集積について、正常マウスとモデルマウスの間に有意な差が認められたが、これはモデルマウスが胸腺や T 細胞の機能を欠損していること、および HT-29 や MDA-MB-231 腫瘍を有することなど、正常マウスと異なる性質を有するためであると考えられた。

Table 2-4. Radioactivity of Extracted Organs after Intravenous Injection of [¹¹¹In]US2 in Normal Mice

Organ	Time after injection (h)			
	1	4	8	24
Blood	2.34 ± 0.46	1.36 ± 0.16	1.02 ± 0.19	0.10 ± 0.01
Spleen	1.46 ± 0.31	1.00 ± 0.15	0.88 ± 0.15	0.45 ± 0.08
Pancreas	3.07 ± 1.05	2.20 ± 0.57	1.38 ± 0.31	0.47 ± 0.17
Stomach*	8.05 ± 4.22	7.00 ± 1.85	3.92 ± 1.37	1.18 ± 0.27
Intestine	2.26 ± 0.63	2.05 ± 0.73	2.57 ± 0.78	0.69 ± 0.15
Kidney	11.39 ± 2.00	11.11 ± 1.34	9.88 ± 1.49	7.11 ± 1.40
Liver	2.04 ± 0.26	2.17 ± 0.08	3.16 ± 0.57	1.77 ± 0.24
Heart	2.02 ± 0.43	1.32 ± 0.16	1.04 ± 0.21	0.39 ± 0.04
Lung	6.35 ± 1.76	4.17 ± 0.64	2.85 ± 0.77	0.68 ± 0.16
Brain	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.02
Muscle	1.14 ± 0.17	0.76 ± 0.10	0.58 ± 0.08	0.22 ± 0.06

Values are expressed as % injected dose per gram of organ. Each value is the mean ± standard deviation of five mice at each interval. *Values are expressed as % injected dose.

SPECT/CT

[¹¹¹In]US2 を腫瘍移植モデルマウスに投与し、1、4、8、および 24 時間後において撮像して得られた SPECT/CT 画像を **Figure 2-8** に示す。CT のみ、および SPECT のみの画像を **Figure 2-9** に示す。また、マウス全体の最大値投影画像を **Figure 2-10** に示す。最大値投影画像のマウス体外における放射能は、SPECT 実験中のマウスの糞に由来するものである(**Figure 2-10A**)。[¹¹¹In]US2 の投与 1 時間後において、マウスの右脇腹に移植した HT-29 腫瘍は描出されなかった(**Figure 2-8B**)。これは、その時間における [¹¹¹In]US2 集積の HT-29 腫瘍/血液比が低いことが原因であると考えられた(**Figure 2-6E**)。一方、[¹¹¹In]US2 の投与 4、8、および 24 時間後では HT-29 腫瘍が明瞭に描出され、MDA-MB-231 腫瘍からはほとんど放射能シグナルが観測されなかった(**Figure 2-8B**)。この結果はモデルマウスを用いた体内放射能分布実験の結果と一致し(**Figure 2-6D**)、[¹¹¹In]US2 が CA-IX 高発現腫瘍に対して非常に高い *in vivo* 選択性を有することが示された。さらに、過剰量のアセタゾラミドを [¹¹¹In]US2 と同時に投与することにより、HT-29 腫瘍における放射能シグナルが減弱したことから(**Figure 2-8C**)、[¹¹¹In]US2 の *in vivo* における高い CA 特異性が示された。[¹¹¹In]US2 の血液および筋肉からの速やかな消失により、投与早期における腫瘍イメージングが達成されたと考えられた。

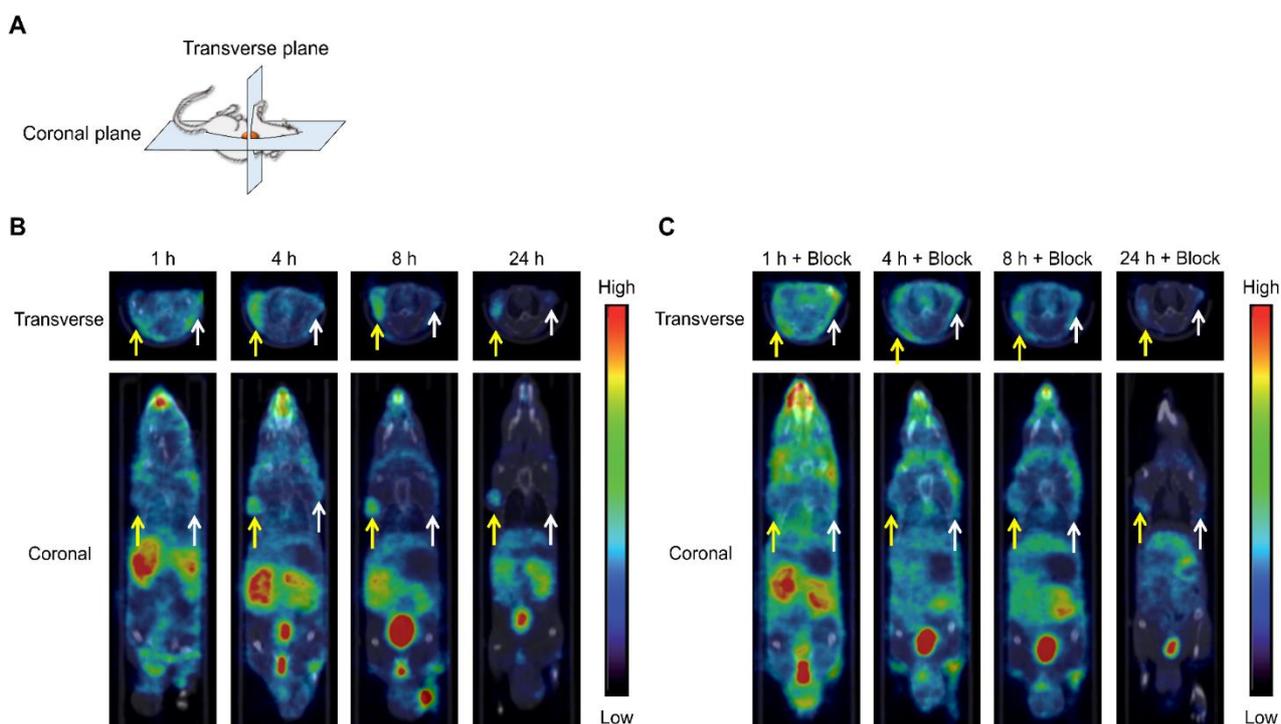


Figure 2-8. SPECT/CT images of the HT-29 and MDA-MB-231 tumor-bearing mice after [¹¹¹In]US2 administration. (A) Planes of collected images from mice. (B) SPECT/CT images after [¹¹¹In]US2 administration. (C) SPECT/CT images after [¹¹¹In]US2 administration with acetazolamide (10 mg/kg). Yellow and white arrows indicate the HT-29 and MDA-MB-231 tumors, respectively.

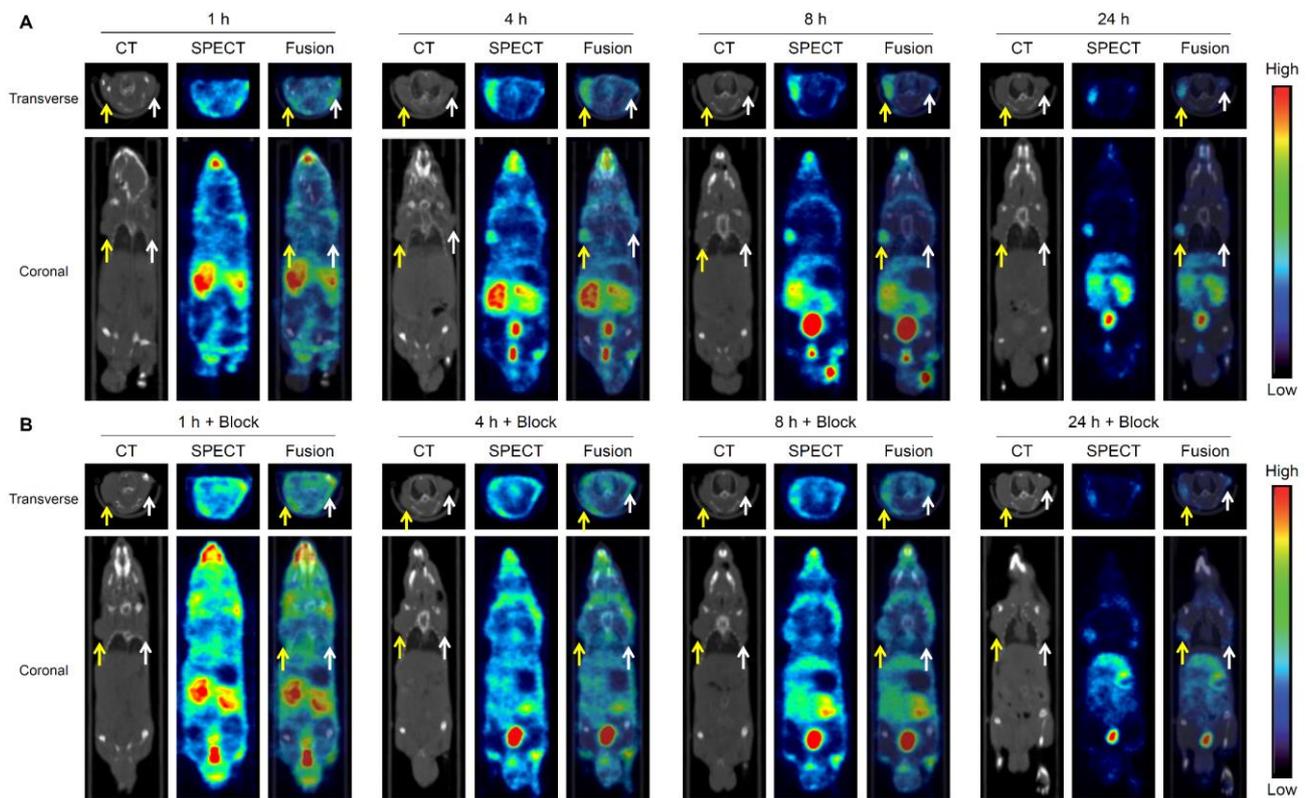


Figure 2-9. CT-only, SPECT-only, and SPECT/CT fusion images of the HT-29 and MDA-MB-231 tumor-bearing mice after $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ administration. (A) CT-only, SPECT-only, and SPECT/CT fusion images after $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ administration. (B) CT-only, SPECT-only, and SPECT/CT fusion images after $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ administration with acetazolamide (10 mg/kg). Yellow and white arrows indicate the HT-29 and MDA-MB-231 tumors, respectively.

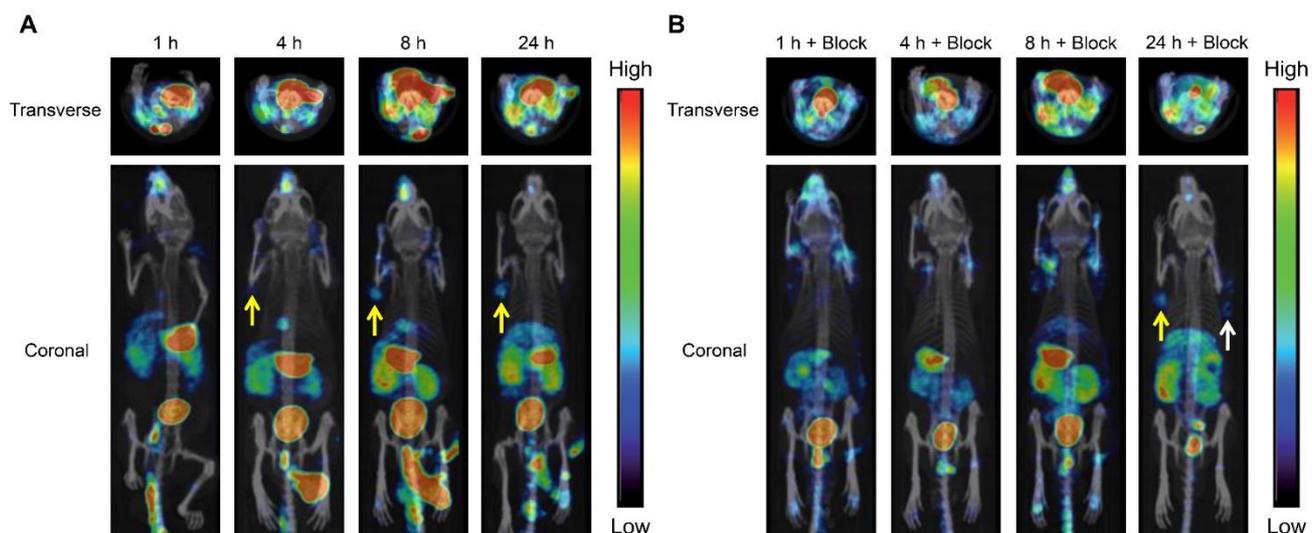


Figure 2-10. Maximum intensity projection of SPECT/CT images of the HT-29 and MDA-MB-231 tumor-bearing mice after $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ administration. (A) Maximum intensity projection of SPECT/CT images after $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ administration. (B) Maximum intensity projection of SPECT/CT images after $[^{111}\text{In}]\text{US2}$ administration with acetazolamide (10 mg/kg). Yellow and white arrows indicate the HT-29 and MDA-MB-231 tumors, respectively.

腫瘍移植モデルマウスを用いた *ex vivo* ARG

HT-29 および MDA-MB-231 腫瘍移植モデルマウスを用いた *ex vivo* ARG 実験を行い、腫瘍における CA-IX に対する [¹¹¹In]US2 の結合を確認した(**Figure 2-11**)。[¹¹¹In]US2 の投与 4 時間後に腫瘍を摘出し、ARG を行った。腫瘍における低酸素領域は、ピモニダゾールの投与と免疫染色により確認した。HT-29 腫瘍において、[¹¹¹In]US2 の集積は CA-IX 陽性部位と一致し(**Figure 2-11A**)、[¹¹¹In]US2 が HT-29 腫瘍における CA-IX に結合することが示唆された。一方、HT-29 腫瘍における放射能集積は、ピモニダゾールおよび CD31 の免疫染色によりそれぞれ確認した低酸素領域および血管の局在とほとんど相関しなかった。MDA-MB-231 腫瘍を用いた *ex vivo* ARG 実験も同様に行い、[¹¹¹In]US2 の集積部位は CA-IX 陽性部位および低酸素領域と一致したが、血管の局在とは一致しなかった(**Figure 2-11B**)。この結果より、[¹¹¹In]US2 が MDA-MB-231 腫瘍における CA-IX および低酸素領域を検出する可能性が示唆された。

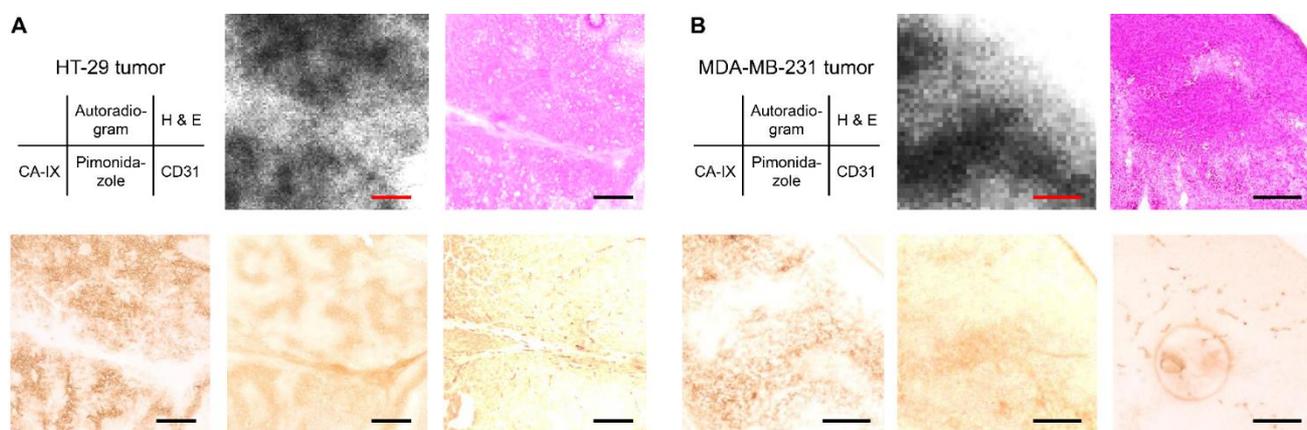


Figure 2-11. *Ex vivo* ARG from the HT-29 and MDA-MB-231 tumor-bearing mice after [¹¹¹In]US2 administration. *Ex vivo* autoradiograms from the HT-29 (**A**) and MDA-MB-231 (**B**) tumors with [¹¹¹In]US2. The same sections were stained with hematoxylin and eosin (H & E). The adjacent sections were immunostained with anti-CA-IX, pimonidazole, and CD31 antibodies. Scale bars, 500 μm in (A) and 250 μm in (B).

放射性同位元素内用療法

[¹¹¹In]US2 について、CA-IX イメージングに関する良好な結果が得られたため、HT-29 腫瘍移植モデルマウスを用いて、[⁹⁰Y]US2 による CA-IX 標的放射性同位元素内用療法を行った(**Figure 2-12**)。[⁹⁰Y]US2 の投与量は1匹あたり 0、1.85、3.7、および 7.4 MBq とした。[⁹⁰Y]US2 を投与した後、週3回マウスの腫瘍容積を測定することにより、治療効果を評価した。**Figure 2-12C** に示すように、7.4 および 3.7 MBq 投与群における相対的腫瘍容積の値は、それぞれ 12 および 23 日目以降、生理食塩水投与群と比較して有意に低かった。これより、7.4 および 3.7 MBq の[⁹⁰Y]US2 を投与した放射性同位元素内用療法により、腫瘍成長が遅延したことが示された。しかし、1.85 MBq の投与では相対的腫瘍容積に有意差は認められず、この投与量では HT-29 腫瘍に対して治療効果が得られないことが示唆された。この治療実験における副作用は、マウスの体重および白血球・血小板数を測定することにより評価した(**Figure 2-12D–F**)。実験期間中、マウスの体重に顕著な変化は認められず、[⁹⁰Y]US2 の低い毒性が示唆された(**Figure 2-12D**)。[⁹⁰Y]US2 の投与直後、特に高い放射エネルギーを投与した群において、白血球および血小板数のわずかな減少が観測されたが、これらの数値は投与から 3 週間以内に回復し、重篤ではなかった(**Figure 2-12E, F**)。

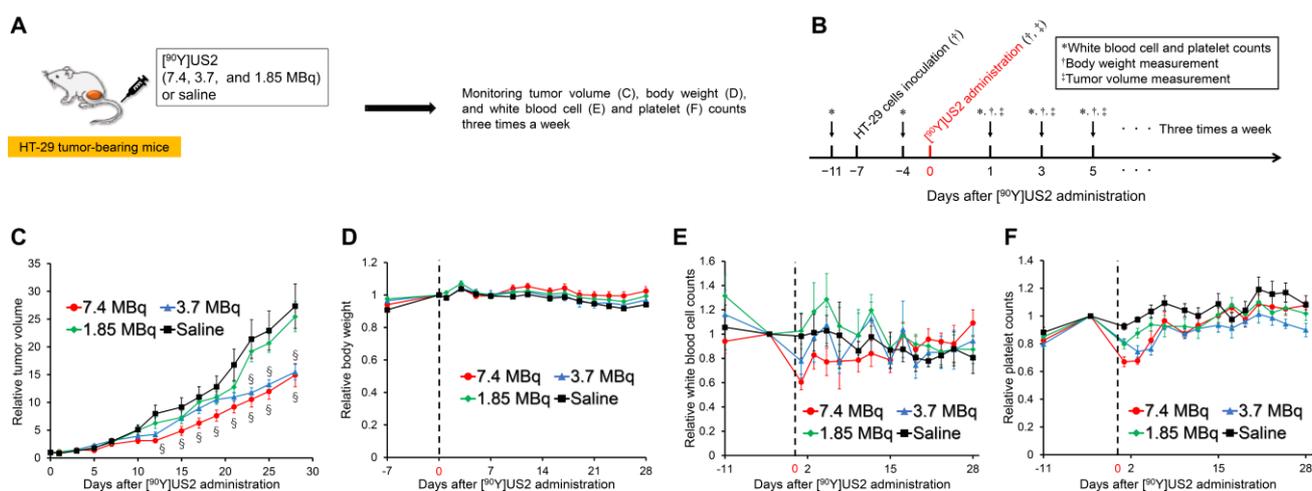


Figure 2-12. Radionuclide-based therapy of HT-29 tumors in mice administered [⁹⁰Y]US2. (A) Procedure for a radionuclide-based therapy study. (B) Schematic diagram of treatments and measurements in a radionuclide-based therapy study. (C) Ratios of the tumor volume for mice to that on the day of [⁹⁰Y]US2 administration. (D) Ratios of the body weight of mice to that on the day of [⁹⁰Y]US2 administration. (E) Ratios of white blood cell counts of mice to that on the day of [⁹⁰Y]US2 administration. (F) Ratios of platelet counts of mice to that on the day of [⁹⁰Y]US2 administration. Each value is the mean \pm standard error of six mice. $^{\$}P < 0.05$ as compared with mice administered saline (Student's *t*-test).

2.3. 考察

哺乳類では、様々な触媒活性、細胞における局在、および組織分布を示す 16 種類の α -CA アイソザイムおよび CA 関連タンパク質が報告されている。ほとんどの CA アイソザイムが細胞内に局在するのに対し、CA-IX は細胞膜表面に発現する[9, 54, 81, 82]。これより、CA 標的薬剤の細胞膜透過性は、他のアイソザイムに対する CA-IX 選択性を決定する要因となる。CA-XII も CA-IX と同様に、低酸素環境に反応して細胞膜表面に発現するアイソザイムであるが、CA-IX と比較して、低い発現量および触媒活性が報告されている[83]。以上の知見を基に、CA-IX を標的としたラジオセラノスティクス用薬剤の開発にあたり、CA-IX リガンドとして US を 2 分子導入し、錯形成の配位子として DOTA を用いた $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ 錯体($[^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}]US_2$)を設計・合成した。錯体のかさ高い構造により細胞膜透過性が抑制され、錯体が細胞内に移行せず、発現量が比較的高い CA-II のようなサイトゾル CA アイソザイムに結合しないことが、Lipinski's rule of five (分子量 500 Da 未満)より考えられる[84]。錯体の水溶性および 1 錯体あたりの CA-IX リガンド数が、CA-IX 親和性および体内分布に与える影響を評価するため、1 価ウレイドスルホンアミド錯体である $[^{111}\text{In}]US_1$ も合わせて合成・評価した。

通常酸素および低酸素環境どちらにおいても、HT-29 細胞の CA-IX 発現は MDA-MB-231 細胞と比較して非常に高いことが観測された(**Figure 2-4A**)。そこで、*in vitro* 実験では、HT-29 および MDA-MB-231 細胞を CA-IX 高発現および低発現細胞としてそれぞれ用いた。しかし、通常酸素環境下の MDA-MB-231 細胞において、高い CA-IX 発現が認められた報告がある[85]。MDA-MB-231 細胞を含む様々な細胞において、培養細胞の密度に依存して CA-IX の発現量が変化するという報告があり、細胞が高い密度で培養されることにより、細胞周囲が低酸素環境となり、HIF-1 の蓄積およびそれに伴う CA-IX 発現が誘導されると考えられている[86-88]。細胞周囲の微小環境を完全に制御することは困難であるため、MDA-MB-231 細胞における CA-IX 発現量の再現性は乏しいことが知られている[86]。一方、酸素によって水酸化された HIF-1 に VHL が結合することにより、HIF-1 は分解され、CA-IX の発現は抑制される。そのため、低酸素環境では、水酸化されていない HIF-1 を VHL は認識することができず、RCC4-VHL 細胞において高い CA-IX 発現が観測されると考えられる。しかし、ウェスタンブロッティングの結果、通常酸素および低酸素環境どちらにおいても、RCC4-VHL 細胞の CA-IX 発現はほとんど認められなかった(**Figure 2-5A**)。

ウレイドスルホンアミドは、置換基を有しないアリルスルホンアミドと比較して、非常に高い CA 親和性を示すことが報告されているが[12]、この骨格を基盤とした分子イメージング薬剤の報告例は少ない[71, 89, 90]。よって、2 価 US は既存のイメージング薬剤と比較して、非常に高い CA-IX 親和性を示すと考えた。所期の通り、ウレイドスルホンアミドの 2 価 ^{111}In 錯体は 1 価錯体と比較して、*in vitro* および *in vivo* どちらにおいても、非常に高い CA-IX 親和性を示した(**Figure 2-4B, C, Figure 2-5B, C, Figure 2-6B, D**)。この結果は、多価リガンドの導入により、標的に対する親和性が向上したことに起因すると考えられた[6, 20]。スルホンアミド基を有する CA-IX 標的核医学分子イメージング薬剤は数多く報告されてきたが、そのほとんどが HT-29 腫瘍に対して高い集積を示さなか

った(<2% injected dose/g) [69, 70, 72, 90-92]。一方で近年、CA-IX を高く発現する SK-RC-52 腫瘍に対して非常に高い集積を示したイメージング薬剤が報告された[67, 75]。しかし、SK-RC-52 細胞における CA-IX 発現が、HT-29 細胞と比較して非常に高いことが報告されており[93]、HT-29 および SK-RC-52 腫瘍に対する薬剤の絶対的集積量を比較することは困難であると考えられる。 [¹¹¹In]US2 は投与 1-4 時間後において、既存の CA-IX イメージング薬剤と比較して、HT-29 腫瘍に対する非常に高い集積を示した[69, 70, 72, 90-92]。以上の結果を基に、 [¹¹¹In]US2 および [⁹⁰Y]US2 について、CA-IX の生体イメージングおよびがんの放射性同位元素内用療法における有用性に関して、更なる検討を行った。

既報のがんセラノスティクス用薬剤のほとんどはナノ粒子を基盤としており、非常に遅い体内挙動を示した[11, 48]。また、放射標識抗体が、CA-IX を標的とした生体イメージングおよび内用療法に広く用いられてきた[64-66, 94]。しかし、それらは血液などの正常組織において、数日にわたる顕著な滞留性を示すため、イメージングの際は低い標的/非標的比、内用療法の際は正常組織に対する長時間の放射線被曝が問題となる。そのため、抗 CA-IX 抗体を用いた核医学イメージングおよび放射性同位元素内用療法は困難であると考えられている。一方、低分子化合物である [¹¹¹In/⁹⁰Y]US2 は速やかな体内動態を示し(Figure 2-6D, Table 2-3, Table 2-4)、 *in vitro* および *in vivo* において、CA-IX 高発現細胞・腫瘍に対する高い集積および特異性を示した(Figure 2-4C, Figure 2-5C, Figure 2-6D)。さらに、 [¹¹¹In]US2 は *in vitro* および *in vivo* において、非常に高い安定性を示した(Figure 2-7)。

[¹¹¹In]US2 による SPECT において、モデルマウスの CA-IX 低発現腫瘍からはほとんど放射能シグナルが観測されなかった一方、 [¹¹¹In]US2 は投与早期に、同一マウスの HT-29 腫瘍を明瞭に描出した(Figure 2-8B)。また、HT-29 腫瘍における放射能シグナルは、CA 阻害剤の投与により減弱したことから、 [¹¹¹In]US2 の *in vivo* における高い CA 特異性が示された(Figure 2-8C)。しかし、 *in vivo* 阻害実験では、正常組織における放射能シグナルの減弱も認められた。これは、様々な臓器の細胞膜表面において発現することが知られている、他の CA アイソザイム(CA-IV など)も同時に阻害されたこと[95]、およびアセタゾラミドの利尿作用により [¹¹¹In]US2 の体内挙動が変化したことが原因であると考えられた。さらに、体内分布実験の結果から、腎臓や肺などの正常臓器と比較して、腫瘍における放射能集積は低く、これら臓器におけるがんを明瞭にイメージングすることは困難であることが示唆された。腎臓や肺における高い放射能集積は、他の CA アイソザイムがそれらの臓器の細胞膜表面に発現するためであると考えられた[95]。しかし、正常臓器における CA リガンドの結合サイト数は、腫瘍における数よりも少なく、適量の非放射性 CA リガンドにより結合サイトのある程度阻害することで、より明瞭な腫瘍イメージングを達成することができる可能性が、近年報告されている[67]。また、 [¹¹¹In]US2 の投与後の HT-29 および MDA-MB-231 腫瘍における放射能集積は CA-IX の局在とよく一致したが、HT-29 腫瘍において、 [¹¹¹In]US2 の集積と低酸素領域との間の相関性は乏しかった(Figure 2-11)。HT-29 細胞においては通常酸素環境でも高い CA-IX 発現が認められたことから(Figure 2-4A)、低酸素部位は CA-IX の局在([¹¹¹In]US2 の集積)と一致しなかったと考えられた。

一方、MDA-MB-231 細胞において、通常酸素環境では CA-IX 発現はほとんど観測されず(**Figure 2-4A**)、CA-IX 発現($[^{111}\text{In}]$ US2 の集積)と低酸素領域には高い相関性があることが認められた(**Figure 2-11B**)。免疫染色により確認された MDA-MB-231 腫瘍における低い CA-IX 発現は、ウェスタンブロッティングの結果と一致した(**Figure 2-6A**)。

$[^{90}\text{Y}]$ US2 を用いた放射性同位元素内用療法により、非治療群と比較して、HT-29 腫瘍の成長は有意に遅延し、さらに、重篤な血液毒性は観測されなかった(**Figure 2-12**)。 $[^{90}\text{Y}]$ US2 の投与は HT-29 腫瘍の成長を有意に阻害した(**Figure 2-12C**)。血液毒性をほとんど示さなかったのは、錯体が血液から早期に消失するためであると考えられた(**Figure 2-6D, Table 2-3, Table 2-4**)。しかし、体内分布実験において示されたように、腎臓、肝臓、胃などの正常臓器に対する放射能集積は、それら臓器における毒性を引き起こす可能性がある。がんモデルマウスに対する ^{90}Y 標識抗体を用いた放射性同位元素内用療法に関する報告によると、その放射標識抗体は正常臓器に対して、 $[^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}]$ US2 と同程度の集積を示したが、腎臓および肝臓の機能不全は観測されなかった[96, 97]。よって、 $[^{90}\text{Y}]$ US2 のそれら臓器に対する毒性は、許容できる範囲であると考えられた。 $[^{90}\text{Y}]$ US2 を用いた放射性同位元素内用療法は、腫瘍における CA-IX、即ち低酸素領域を標的としているため、酸素分圧が高い領域を標的としたがん治療と組み合わせることにより、より効果的な治療を展開することができ、腫瘍を消失、あるいは縮小させることができると考えられる。

2.4. 小括

本章において、固形腫瘍の低酸素領域に高く発現する CA-IX を標的としたがんのセラノスティクスを目的として、2 価ウレイドスルホンアミドを基盤とした低分子 ^{111}In および ^{90}Y 錯体を設計・合成し、がんのラジオセラノスティクス用薬剤としての有用性評価を行い、以下に述べる結果を得た。

- (1) [^{111}In]US2 は *in vitro* において CA-IX 高発現細胞に対する特異的結合、および *in vivo* において CA-IX 高発現腫瘍に対する特異的集積を示した。
- (2) [^{111}In]US2 は *in vitro* および *in vivo* において高い安定性を示した。
- (3) [^{111}In]US2 を用いた SPECT により、*in vivo* においてマウス体内の CA-IX 高発現腫瘍を特異的かつ明瞭にイメージングすることに成功した。
- (4) CA-IX 高発現腫瘍移植モデルマウスに [^{90}Y]US2 を投与したところ、非治療群と比較して、腫瘍成長の有意な遅延が認められ、さらに、重篤な血液毒性は観測されなかった。

以上の結果より、 [^{111}In]US2 および [^{90}Y]US2 を用いた CA-IX 標的がんラジオセラノスティクスは、顕著な血液毒性を示すことなく、CA-IX 高発現腫瘍の SPECT イメージングおよび放射性同位元素内用療法を可能とすることが示唆され、より効果的で安全性が高い治療として、がん患者の個別化医療の実現に貢献すると考えられる。

結 語

本研究では、金属錯形成を基盤とした薬剤設計により、CAAにおける脳血管アミロイドおよび固形腫瘍の低酸素領域における CA-IX を標的とした画像診断・治療用の多価放射性金属錯体の開発を行い、以下に述べる結果を得た。

1. 非侵襲的かつ疾患特異的な CAA 診断を可能とする CAA 標的放射性薬剤の開発に関しては、まず、多価アミロイドリガンドを有する ^{99m}Tc 錯体を用いて、アミロイド凝集体に対する多価効果の検討を行った。アミロイド凝集体に対する高い親和性が報告されている SB および BT を 1 または 2 分子導入した ^{99m}Tc -Ham 錯体を設計・合成し、アミロイド凝集体に対する親和性に関して評価した。アミロイド凝集体を用いた結合阻害実験において、1 錯体あたりに含まれるアミロイドリガンド数の増加に伴い、SB および BT いずれにおいても、アミロイド凝集体に対する親和性が増強することが認められた。この結果を反映して、Tg2576 マウス脳切片を用いた *in vitro* ARG において、1 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体と比較して 2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体が、より明瞭に脳内アミロイドを描出した。以上の結果より、2 価金属錯体によるアミロイド凝集体に対する多価効果が実証された。
2. $\text{A}\beta$ 凝集体に対する高い親和性を示した [^{99m}Tc]SB2 および [^{99m}Tc]BT2 について、正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行ったところ、いずれの錯体も顕著に低い脳移行性を示した。AD における老人斑は脳実質に、CAA は脳血管にそれぞれ沈着することから、顕著な脳移行性を示さなかった両錯体は、脳内において老人斑ではなく、CAA に対して選択的に結合することが示唆された。また、両錯体は CAA 患者剖検脳組織切片を用いた *in vitro* ARG において、CAA 特異的結合を示した。さらに、Tg2576 マウスを用いた *ex vivo* ARG において、脳血管に沈着したアミロイドに対する特異的な高い放射能集積を示し、体内分布実験の結果を反映して CAA のみを明瞭に描出し、脳実質アミロイドは描出しなかった。以上の結果より、2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体は CAA 特異的イメージング薬剤となり得ることが示され、複数の機能性分子を導入可能な錯形成を基盤とした分子設計が、生体分子イメージングを目的とした放射性薬剤の開発に有効であることを見出した。
3. ^{99m}Tc -Ham 錯体に特徴的な異性体の生成を抑制することを目的として、[^{99m}Tc]BT2 を *N*-メチル化した [^{99m}Tc]MBT2 を設計・合成し、CAA イメージング薬剤としての基礎的評価を行った。[^{99m}Tc]MBT2 の調製において、単一の ^{99m}Tc 錯体の生成が確認された。さらに、マウス血漿において、[^{99m}Tc]MBT2 は [^{99m}Tc]BT2 より高い安定性を示した。また、[^{99m}Tc]MBT2 は [^{99m}Tc]BT2 と同様に、顕著な脳移行性を示さなかった。しかし、 $\text{A}\beta$ 結合阻害実験、Tg2576 マウスおよび CAA 患者脳切片を用いた *in vitro* ARG の結果から、*N*-メチル化することにより、 $\text{A}\beta$ に対する親

和性が低減することが認められた。以上の結果より、^{99m}Tc-Ham 錯体の錯形成部位が、マウス血漿における安定性およびアミロイド凝集体に対する親和性に関して重要な役割を担うことを見出した。

4. 固形腫瘍の低酸素領域における CA-IX を標的としたラジオセラノスティクス用薬剤の開発に関しては、CA-IX に対する高い親和性が報告されている US を 2 分子導入した 2 価 ¹¹¹In/⁹⁰Y 錯体 (¹¹¹In/⁹⁰Y]US2) を設計・合成し、CA-IX 高発現腫瘍の SPECT イメージングおよび放射性同位元素内用療法における有用性を評価した。¹¹¹In]US2 は *in vitro* において CA-IX 高発現細胞に対する特異的結合、および *in vivo* において CA-IX 高発現腫瘍に対する特異的集積を示し、さらに、*in vitro* および *in vivo* における高い安定性を示した。また、¹¹¹In]US2 を用いた SPECT により、CA-IX 高発現腫瘍移植モデルマウスにおける腫瘍を、選択的かつ明瞭にイメージングすることに成功した。続いて、⁹⁰Y]US2 を CA-IX 高発現腫瘍移植モデルマウスに投与したところ、重篤な血液毒性を示すことなく、生理食塩水投与群と比較して、腫瘍成長が有意に遅延した。以上の結果より、¹¹¹In]US2 および ⁹⁰Y]US2 は、CA-IX を標的とした固形腫瘍の画像診断および治療を可能とすることが示され、がんのセラノスティクスに有用であることを見出した。

以上、本研究は CAA における脳血管アミロイドおよび固形腫瘍の低酸素領域における CA-IX を標的とした画像診断・治療に有効な多価放射性金属錯体の開発に成果を収めたものであり、今後、様々な疾患に対する診断および治療用放射性薬剤の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

1. Guo Z, Sadler PJ. Metals in medicine. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1999; 38: 1512-31.
2. Jadvar H, Chen X, Cai W, Mahmood U. Radiotheranostics in cancer diagnosis and management. *Radiology.* 2018; 286: 388-400.
3. Viswanathan A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Ann Neurol.* 2011; 70: 871-80.
4. Becker GA, Ichise M, Barthel H, Luthardt J, Patt M, Seese A, et al. PET quantification of ^{18}F -florbetaben binding to β -amyloid deposits in human brains. *J Nucl Med.* 2013; 54: 723-31.
5. Lundqvist R, Lilja J, Thomas BA, Lotjonen J, Villemagne VL, Rowe CC, et al. Implementation and validation of an adaptive template registration method for ^{18}F -flutemetamol imaging data. *J Nucl Med.* 2013; 54: 1472-8.
6. Iikuni S, Ono M, Watanabe H, Matsumura K, Yoshimura M, Harada N, et al. Enhancement of binding affinity for amyloid aggregates by multivalent interactions of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hydroxamamide complexes. *Mol Pharm.* 2014; 11: 1132-9.
7. Iikuni S, Ono M, Watanabe H, Matsumura K, Yoshimura M, Kimura H, et al. Imaging of cerebral amyloid angiopathy with bivalent $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hydroxamamide complexes. *Sci Rep.* 2016; 6: 25990.
8. Iikuni S, Ono M, Watanabe H, Yoshimura M, Ishibashi-Ueda H, Ihara M, et al. Novel bivalent $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -complex with *N*-methyl-substituted hydroxamamide as probe for imaging of cerebral amyloid angiopathy. *PLoS One.* 2016; 11: e0163969.
9. Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 168-81.
10. Harada H, Inoue M, Itasaka S, Hirota K, Morinibu A, Shinomiya K, et al. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nat Commun.* 2012; 3: 783.
11. Kelkar SS, Reineke TM. Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjug Chem.* 2011; 22: 1879-903.
12. Pacchiano F, Carta F, McDonald PC, Lou Y, Vullo D, Scozzafava A, et al. Ureido-substituted benzenesulfonamides potently inhibit carbonic anhydrase IX and show antimetastatic activity in a model of breast cancer metastasis. *J Med Chem.* 2011; 54: 1896-902.
13. Iikuni S, Ono M, Watanabe H, Shimizu Y, Sano K, Saji H. Cancer radiotheranostics targeting carbonic anhydrase-IX with ^{111}In - and ^{90}Y -labeled ureidosulfonamide scaffold for SPECT imaging and radionuclide-based therapy. *Theranostics.* 2018; 8: 2992-3006.
14. Pepys MB. Amyloidosis. *Annu Rev Med.* 2006; 57: 223-41.

15. Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 119-28.
16. Wong DF, Rosenberg PB, Zhou Y, Kumar A, Raymont V, Ravert HT, et al. *In vivo* imaging of amyloid deposition in Alzheimer disease using the radioligand ¹⁸F-AV-45 (florbetapir F 18). *J Nucl Med.* 2010; 51: 913-20.
17. Mathis CA, Wang Y, Holt DP, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE. Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem.* 2003; 46: 2740-54.
18. Beckett TL, Webb RL, Niedowicz DM, Holler CJ, Matveev S, Baig I, et al. Postmortem Pittsburgh Compound B (PiB) binding increases with Alzheimer's disease progression. *J Alzheimers Dis.* 2012; 32: 127-38.
19. Bernstein SL, Dupuis NF, Lazo ND, Wyttenbach T, Condron MM, Bitan G, et al. Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat Chem.* 2009; 1: 326-31.
20. Liu S. Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin $\alpha_v\beta_3$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjug Chem.* 2009; 20: 2199-213.
21. Dijkgraaf I, Kruijtz JA, Liu S, Soede AC, Oyen WJ, Corstens FH, et al. Improved targeting of the $\alpha_v\beta_3$ integrin by multimerisation of RGD peptides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007; 34: 267-73.
22. Zha Z, Choi SR, Ploessl K, Lieberman BP, Qu W, Hefti F, et al. Multidentate ¹⁸F-polypegylated styrylpyridines as imaging agents for A β plaques in cerebral amyloid angiopathy (CAA). *J Med Chem.* 2011; 54: 8085-98.
23. Nakayama M, Xu LC, Koga Y, Harada K, Sugii A, Nakayama H, et al. Hydroxamamide as a chelating moiety for the preparation of ^{99m}Tc-radiopharmaceuticals III. Characterization of various ^{99m}Tc-hydroxamamides. *Appl Radiat Isot.* 1997; 48: 571-7.
24. Mammen M, Choi SK, Whitesides GM. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1998; 37: 2754-94.
25. Thipyapong K, Uehara T, Tooyama Y, Braband H, Alberto R, Arano Y. Insight into technetium amidoxime complex: oxo technetium(V) complex of *N*-substituted benzamidoxime as new basic structure for molecular imaging. *Inorg Chem.* 2011; 50: 992-8.
26. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science.* 1996; 274: 99-102.
27. Schwefel D, Maierhofer C, Beck JG, Seeberger S, Diederichs K, Moller HM, et al. Structural basis of multivalent binding to wheat germ agglutinin. *J Am Chem Soc.* 2010; 132: 8704-19.
28. Biffi A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy: a systematic review. *J Clin Neurol.* 2011; 7: 1-9.
29. Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm.* 2002; 109: 813-36.

30. Ellis RJ, Olichney JM, Thal LJ, Mirra SS, Morris JC, Beekly D, et al. Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology*. 1996; 46: 1592-6.
31. Esiri MM, Nagy Z, Smith MZ, Barnettson L, Smith AD. Cerebrovascular disease and threshold for dementia in the early stages of Alzheimer's disease. *Lancet*. 1999; 354: 919-20.
32. Mehndiratta P, Manjila S, Ostergard T, Eisele S, Cohen ML, Sila C, et al. Cerebral amyloid angiopathy-associated intracerebral hemorrhage: pathology and management. *Neurosurg Focus*. 2012; 32: E7.
33. Walker DA, Broderick DF, Kotsenas AL, Rubino FA. Routine use of gradient-echo MRI to screen for cerebral amyloid angiopathy in elderly patients. *Am J Roentgenol*. 2004; 182: 1547-50.
34. Johnson KA, Gregas M, Becker JA, Kinnecom C, Salat DH, Moran EK, et al. Imaging of amyloid burden and distribution in cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2007; 62: 229-34.
35. Dierksen GA, Skehan ME, Khan MA, Jeng J, Nandigam RN, Becker JA, et al. Spatial relation between microbleeds and amyloid deposits in amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2010; 68: 545-8.
36. Han BH, Zhou ML, Vellimana AK, Milner E, Kim DH, Greenberg JK, et al. Resorufin analogs preferentially bind cerebrovascular amyloid: potential use as imaging ligands for cerebral amyloid angiopathy. *Mol Neurodegener*. 2011; 6: 86.
37. Jaruszewski KM, Curran GL, Swaminathan SK, Rosenberg JT, Grant SC, Ramakrishnan S, et al. Multimodal nanoprobe to target cerebrovascular amyloid in Alzheimer's disease brain. *Biomaterials*. 2014; 35: 1967-76.
38. Matsumura K, Ono M, Yoshimura M, Kimura H, Watanabe H, Okamoto Y, et al. Synthesis and biological evaluation of novel styryl benzimidazole derivatives as probes for imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem*. 2013; 21: 3356-62.
39. Antoni G, Lubberink M, Estrada S, Axelsson J, Carlson K, Lindsjo L, et al. *In vivo* visualization of amyloid deposits in the heart with ¹¹C-PIB and PET. *J Nucl Med*. 2013; 54: 213-20.
40. Bagchi DP, Yu L, Perlmutter JS, Xu J, Mach RH, Tu Z, et al. Binding of the radioligand SIL23 to α -synuclein fibrils in Parkinson disease brain tissue establishes feasibility and screening approaches for developing a Parkinson disease imaging agent. *PLoS One*. 2013; 8: e55031.
41. Jia J, Cui M, Dai J, Liu B. ^{99m}Tc(CO)₃-labeled benzothiazole derivatives preferentially bind cerebrovascular amyloid: potential use as imaging agents for cerebral amyloid angiopathy. *Mol Pharm*. 2015; 12: 2937-46.
42. Yoshimura M, Ono M, Matsumura K, Watanabe H, Kimura H, Cui M, et al. Structure-activity relationships and *in vivo* evaluation of quinoxaline derivatives for PET imaging of β -amyloid plaques. *ACS Med Chem Lett*. 2013; 4: 31-5.
43. Choi SR, Golding G, Zhuang Z, Zhang W, Lim N, Hefti F, et al. Preclinical properties of ¹⁸F-AV-45: a PET agent for A β plaques in the brain. *J Nucl Med*. 2009; 50: 1887-94.

44. De Reuck JL. The significance of small cerebral bleeds in neurodegenerative dementia syndromes. *Aging Dis.* 2012; 3: 307-12.
45. Mecocci P, Parnetti L, Reboldi GP, Santucci C, Gaiti A, Ferri C, et al. Blood-brain-barrier in a geriatric population: barrier function in degenerative and vascular dementias. *Acta Neurol Scand.* 1991; 84: 210-3.
46. Zipser BD, Johanson CE, Gonzalez L, Berzin TM, Tavares R, Hulette CM, et al. Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2007; 28: 977-86.
47. Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, et al. The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1 α protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *J Biol Chem.* 2009; 284: 5332-42.
48. Satterlee AB, Yuan H, Huang L. A radio-theranostic nanoparticle with high specific drug loading for cancer therapy and imaging. *J Control Release.* 2015; 217: 170-82.
49. Kratochwil C, Giesel FL, Bruchertseifer F, Mier W, Apostolidis C, Boll R, et al. ²¹³Bi-DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014; 41: 2106-19.
50. Scarpa L, Buxbaum S, Kendler D, Fink K, Bektic J, Gruber L, et al. The ⁶⁸Ga/¹⁷⁷Lu theragnostic concept in PSMA targeting of castration-resistant prostate cancer: correlation of SUV_{max} values and absorbed dose estimates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2017; 44: 788-800.
51. Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel FL, Weis M, Verburg FA, Mottaghy F, et al. ²²⁵Ac-PSMA-617 for PSMA-targeted α -radiation therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer. *J Nucl Med.* 2016; 57: 1941-4.
52. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11: 393-410.
53. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006; 441: 437-43.
54. Thiry A, Dogne JM, Masereel B, Supuran CT. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: 566-73.
55. Ratcliffe PJ, Pugh CW, Maxwell PH. Targeting tumors through the HIF system. *Nat Med.* 2000; 6: 1315-6.
56. Swietach P, Hulikova A, Vaughan-Jones RD, Harris AL. New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene.* 2010; 29: 6509-21.
57. Stillebroer AB, Mulders PF, Boerman OC, Oyen WJ, Oosterwijk E. Carbonic anhydrase IX in renal cell carcinoma: implications for prognosis, diagnosis, and therapy. *Eur Urol.* 2010; 58: 75-83.
58. Ord JJ, Agrawal S, Thamboo TP, Roberts I, Campo L, Turley H, et al. An investigation into the prognostic significance of necrosis and hypoxia in high grade and invasive bladder cancer. *J Urol.* 2007; 178: 677-82.

59. Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 8405-12.
60. Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26: 299-310.
61. Hussain SA, Ganesan R, Reynolds G, Gross L, Stevens A, Pastorek J, et al. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2007; 96: 104-9.
62. Swinson DE, Jones JL, Richardson D, Wykoff C, Turley H, Pastorek J, et al. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 473-82.
63. Dorai T, Sawczuk I, Pastorek J, Wiernik PH, Dutcher JP. Role of carbonic anhydrases in the progression of renal cell carcinoma subtypes: proposal of a unified hypothesis. *Cancer Invest.* 2006; 24: 754-79.
64. Divgi CR, Pandit-Taskar N, Jungbluth AA, Reuter VE, Gonen M, Ruan S, et al. Preoperative characterisation of clear-cell renal carcinoma using iodine-124-labelled antibody chimeric G250 (¹²⁴I-cG250) and PET in patients with renal masses: a phase I trial. *Lancet Oncol.* 2007; 8: 304-10.
65. Hoeben BA, Kaanders JH, Franssen GM, Troost EG, Rijken PF, Oosterwijk E, et al. PET of hypoxia with ⁸⁹Zr-labeled cG250-F(ab')₂ in head and neck tumors. *J Nucl Med.* 2010; 51: 1076-83.
66. Muselaers CH, Oosterwijk E, Bos DL, Oyen WJ, Mulders PF, Boerman OC. Optimizing lutetium 177-anti-carbonic anhydrase IX radioimmunotherapy in an intraperitoneal clear cell renal cell carcinoma xenograft model. *Mol Imaging.* 2014; 13: 1-7.
67. Krall N, Pretto F, Mattarella M, Muller C, Neri D. A 99mTc-labeled ligand of carbonic anhydrase IX selectively targets renal cell carcinoma *in vivo*. *J Nucl Med.* 2016; 57: 943-9.
68. Krall N, Pretto F, Neri D. A bivalent small molecule-drug conjugate directed against carbonic anhydrase IX can elicit complete tumour regression in mice. *Chem Sci.* 2014; 5: 3640-4.
69. Lau J, Liu Z, Lin KS, Pan J, Zhang Z, Vullo D, et al. Trimeric radiofluorinated sulfonamide derivatives to achieve *in vivo* selectivity for carbonic anhydrase IX-targeted PET imaging. *J Nucl Med.* 2015; 56: 1434-40.
70. Lau J, Zhang Z, Jenni S, Kuo HT, Liu Z, Vullo D, et al. PET imaging of carbonic anhydrase IX expression of HT-29 tumor xenograft mice with ⁶⁸Ga-labeled benzenesulfonamides. *Mol Pharm.* 2016; 13: 1137-46.
71. Lv PC, Putt KS, Low PS. Evaluation of nonpeptidic ligand conjugates for SPECT imaging of hypoxic and carbonic anhydrase IX-expressing cancers. *Bioconjug Chem.* 2016; 27: 1762-9.

72. Peeters SG, Dubois L, Lieuwes NG, Laan D, Mooijer M, Schuit RC, et al. [¹⁸F]VM4-037 microPET imaging and biodistribution of two *in vivo* CAIX-expressing tumor models. *Mol Imaging Biol.* 2015; 17: 615-9.
73. Minn I, Koo SM, Lee HS, Brummet M, Rowe SP, Gorin MA, et al. [⁶⁴Cu]XYIMSR-06: A dual-motif CAIX ligand for PET imaging of clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016; 7: 56471-9.
74. Minn I, Lee HS, Koo SM, Ahn HH, Rowe S, Gorin M, et al. [¹⁷⁷Lu]XYIMSR-01, a theranostic for targeting carbonic anhydrase IX. *J Nucl Med.* 2016; 57 (Suppl 2): S53.
75. Yang X, Minn I, Rowe SP, Banerjee SR, Gorin MA, Brummet M, et al. Imaging of carbonic anhydrase IX with an ¹¹¹In-labeled dual-motif inhibitor. *Oncotarget.* 2015; 6: 33733-42.
76. Milenic DE, Brady ED, Brechbiel MW. Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 488-99.
77. De Leon-Rodriguez LM, Kovacs Z, Esqueda-Oliva AC, Miranda-Vera AD. Highly regioselective *N*-trans symmetrical diprotection of cyclen. *Tetrahedron Lett.* 2006; 47: 6937-40.
78. Zhang Y, Anderson M, Weisman JL, Lu M, Choy CJ, Boyd VA, et al. Evaluation of diarylureas for activity against plasmodium falciparum. *ACS Med Chem Lett.* 2010; 1: 460-5.
79. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, et al. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol.* 2001; 158: 905-19.
80. Bao B, Groves K, Zhang J, Handy E, Kennedy P, Cuneo G, et al. *In vivo* imaging and quantification of carbonic anhydrase IX expression as an endogenous biomarker of tumor hypoxia. *PLoS One.* 2012; 7: e50860.
81. Smith KS, Ferry JG. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiol Rev.* 2000; 24: 335-66.
82. Supuran CT, Scozzafava A, Casini A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev.* 2003; 23: 146-89.
83. Neri D, Supuran CT. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10: 767-77.
84. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46: 3-26.
85. Jung HS, Han J, Shi H, Koo S, Singh H, Kim HJ, et al. Overcoming the limits of hypoxia in photodynamic therapy: a carbonic anhydrase IX-targeted approach. *J Am Chem Soc.* 2017; 139: 7595-602.
86. Askoxylakis V, Ehemann V, Rana S, Kramer S, Rahbari NN, Debus J, et al. Binding of the phage display derived peptide CaIX-P1 on human colorectal carcinoma cells correlates with the expression of carbonic anhydrase IX. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 13030-48.

87. Hunakova L, Bodo J, Chovancova J, Sulikova G, Pastorekova S, Sedlak J. Expression of new prognostic markers, peripheral-type benzodiazepine receptor and carbonic anhydrase IX, in human breast and ovarian carcinoma cell lines. *Neoplasma*. 2007; 54: 541-8.
88. Sansone P, Piazzini G, Paterini P, Strillacci A, Ceccarelli C, Minni F, et al. Cyclooxygenase-2/carbonic anhydrase-IX up-regulation promotes invasive potential and hypoxia survival in colorectal cancer cells. *J Cell Mol Med*. 2009; 13: 3876-87.
89. Dubois L, Lieuwes NG, Maresca A, Thiry A, Supuran CT, Scozzafava A, et al. Imaging of CA IX with fluorescent labelled sulfonamides distinguishes hypoxic and (re)-oxygenated cells in a xenograft tumour model. *Radiother Oncol*. 2009; 92: 423-8.
90. Pan J, Lau J, Mesak F, Hundal N, Pourghasian M, Liu Z, et al. Synthesis and evaluation of ¹⁸F-labeled carbonic anhydrase IX inhibitors for imaging with positron emission tomography. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2014; 29: 249-55.
91. Akurathi V, Dubois L, Celen S, Lieuwes NG, Chitneni SK, Cleynhens BJ, et al. Development and biological evaluation of ^{99m}Tc-sulfonamide derivatives for *in vivo* visualization of CA IX as surrogate tumor hypoxia markers. *Eur J Med Chem*. 2014; 71: 374-84.
92. Akurathi V, Dubois L, Lieuwes NG, Chitneni SK, Cleynhens BJ, Vullo D, et al. Synthesis and biological evaluation of a ^{99m}Tc-labelled sulfonamide conjugate for *in vivo* visualization of carbonic anhydrase IX expression in tumor hypoxia. *Nucl Med Biol*. 2010; 37: 557-64.
93. Li G, Passebosch-Faure K, Lambert C, Gentil-Perret A, Blanc F, Oosterwijk E, et al. The expression of G250/mn/CA9 antigen by flow cytometry: its possible implication for detection of micrometastatic renal cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 89-92.
94. Muselaers CH, Boers-Sonderen MJ, van Oostenbrugge TJ, Boerman OC, Desar IM, Stillebroer AB, et al. Phase 2 study of lutetium 177-labeled anti-carbonic anhydrase IX monoclonal antibody girentuximab in patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2016; 69: 767-70.
95. Oosterwijk E. Carbonic anhydrase expression in kidney and renal cancer: implications for diagnosis and treatment. *Subcell Biochem*. 2014; 75: 181-98.
96. Aung W, Tsuji AB, Sudo H, Sugyo A, Ukai Y, Kouda K, et al. Radioimmunotherapy of pancreatic cancer xenografts in nude mice using ⁹⁰Y-labeled anti- $\alpha_6\beta_4$ integrin antibody. *Oncotarget*. 2016; 7: 38835-44.
97. Orozco JJ, Balkin ER, Gooley TA, Kenoyer A, Hamlin DK, Wilbur DS, et al. Anti-CD45 radioimmunotherapy with ⁹⁰Y but not ¹⁷⁷Lu is effective treatment in a syngeneic murine leukemia model. *PLoS One*. 2014; 9: e113601.

学 術 雜 誌 公 表 論 文

第 1 章 脳アミロイドアンギオパチーの早期診断を目的とした

脳血管アミロイド標的 2 価 ^{99m}Tc 錯体の開発

Enhancement of binding affinity for amyloid aggregates by multivalent interactions of ^{99m}Tc -hydroxamamide complexes.

Shimpei Iikuni, Masahiro Ono, Hiroyuki Watanabe, Kenji Matsumura, Masashi Yoshimura, Naoya Harada, Hiroyuki Kimura, Morio Nakayama, Hideo Saji.

平成 26 年 3 月発行 *Molecular Pharmaceutics* 第 11 巻第 4 号 1132 頁～1139 頁に掲載

Imaging of cerebral amyloid angiopathy with bivalent ^{99m}Tc -hydroxamamide complexes.

Shimpei Iikuni, Masahiro Ono, Hiroyuki Watanabe, Kenji Matsumura, Masashi Yoshimura, Hiroyuki Kimura, Hatsue Ishibashi-Ueda, Yoko Okamoto, Masafumi Ihara, Hideo Saji.

平成 28 年 5 月発行 *Scientific Reports* 第 6 巻 Article number: 25990 に掲載

Novel bivalent ^{99m}Tc -complex with *N*-methyl-substituted hydroxamamide as probe for imaging of cerebral amyloid angiopathy.

Shimpei Iikuni, Masahiro Ono, Hiroyuki Watanabe, Masashi Yoshimura, Hatsue Ishibashi-Ueda, Masafumi Ihara, Hideo Saji.

平成 28 年 9 月発行 *PLOS ONE* 第 11 巻第 9 号 Article number: e0163969 に掲載

第 2 章 固形腫瘍の画像診断・治療を目的とした

炭酸脱水酵素-IX 標的セラノステイクス用 2 価 $^{111}\text{In}/^{90}\text{Y}$ 錯体の開発

Cancer radiotheranostics targeting carbonic anhydrase-IX with ^{111}In - and ^{90}Y -labeled ureidosulfonamide scaffold for SPECT imaging and radionuclide-based therapy.

Shimpei Iikuni, Masahiro Ono, Hiroyuki Watanabe, Yoichi Shimizu, Kohei Sano, Hideo Saji.

平成 30 年 4 月発行 *Theranostics* 第 8 巻第 11 号 2992 頁～3006 頁に掲載

謝 辞

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

本研究の遂行において、多くの有益な御助言と御協力を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 渡邊 裕之 助教に厚く御礼申し上げます。

懇切なる御指導を戴きました、大阪薬科大学 天満 敬 教授、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 上田 真史 教授、福井大学高エネルギー医学研究センター 牧野 顕 准教授、京都薬科大学 木村 寛之 准教授、神戸薬科大学 佐野 紘平 講師、京都大学医学部附属病院 志水 陽一 助教、京都薬科大学 有光 健治 助教、昭和薬科大学 尾江 悟 助教、大阪薬科大学 近藤 直哉 助教、京都薬科大学 屋木 祐亮 研究員に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり御協力を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 松村 憲志 博士、吉村 優志 博士、土井 雄貴 修士、片柳 莉果子 学士、北田 彩音 学士に深く感謝申し上げます。

脳アミロイドアンギオパチー患者剖検脳組織切片を御提供戴きました、京都大学大学院医学研究科 高橋 良輔 教授、国立循環器病研究センター病院 猪原 匡史 部長、植田 初江 部長、岡本 洋子 博士に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり討論に参加して戴きました、京都大学大学院薬学研究科 小川 祐 博士、松田 洋和 博士、西郡 寛太郎 博士、原田 直弥 博士、松岡 大航 博士、丁寧 修士、神戸 香織 修士、三平 崇太郎 学士、友池 文佳 学士をはじめとする病態機能分析学分野の方々に深く感謝申し上げます。

最後に、著者が研究に専念できるように支え、いつも応援して戴きました、家族に衷心より感謝申し上げます。