

ヒト体内で産生する活性酸素種を可視化する PET 用診断薬の開発

- 1) 阪和第二泉北病院 阪和インテリジェント医療センター ホットラボ、
2) 静岡県立大学薬学部、3) 浜松ホトニクス(株)中央研究所、4) 千葉大学薬学部

堺 俊博¹⁾、江上 寛通²⁾、中川 智²⁾、金澤 奨勝³⁾、西山 新吾³⁾、荒野 泰⁴⁾、
塚田 秀夫³⁾、轟木 堅一郎²⁾、濱島 義隆²⁾、小川 洋二¹⁾、井上 修¹⁾

1.緒言

活性酸素種 (ROS) は各種虚血性疾患、炎症性疾患、中枢神経系の変性疾患、薬物の毒性発現等において重要な役割を担っていることが明らかになっている。生体内の ROS を測定する試みは以前から ESR 法や Optical Imaging 法で試みられているが、未だヒトでの計測の実用化には至っていない。そこでわれわれは、ROS と選択的に反応して生成する酸化体が、細胞内にトラップされるラジカルトラッピングトレーサ法の概念を創出し、Dihydroethidine (DHE) をリード化合物とした Positron Emission Tomography (PET) 用放射性イメージング薬剤を開発する事を目的として研究を実施した。特にヒトを対象とした測定の実用化の観点から ¹⁸F 標識の PET 用診断薬の開発を目指した。

2.方法

PET 薬剤の分子設計と標識前駆体の合成

候補化合物としてこれまでに蓄積してきた蛍光イメージングおよび ³H 標識体を用いた検討結果^{1,2)} から、Fig. 1 に示す ¹⁸F 標識 Dihydromethidine ([¹⁸F]FDHM) を候補化合物として選択した。

¹⁸F の標識導入位置としては、ROS との反応性を考慮して比較的影響が小さいと想定される 6 位のベンゼン環のパラ位とすることとした。芳香環への ¹⁸F 導入の標識前駆体については当初 tributyltin を想定し、コールドでの標識合成を試みたが、収率が悪く boronic ester 体を標識前駆体とすることとした。Fig. 2 に boronic ester 体の合成経路を記載する。4,4'-dinitro-[1,1'-biphenyl]-2-amine と 4-methoxybenzoyl chloride を出発原料に用い、10 段階の合成を行った。

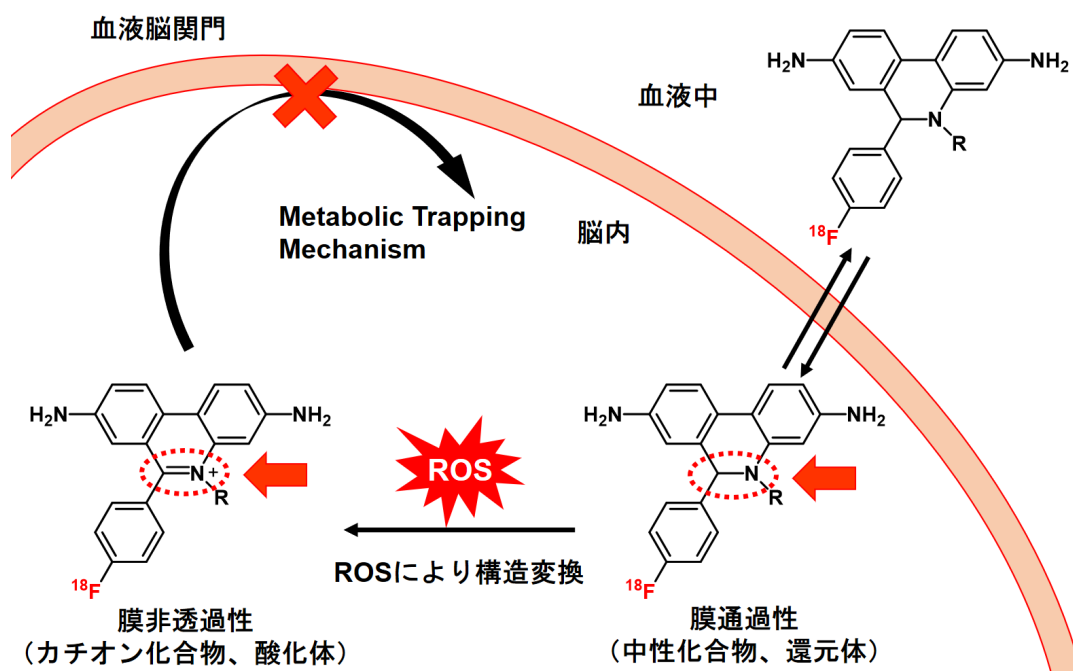


Fig.1 ラジカルトラッピング薬剤 ^{18}F FDHM による ROS 検出の原理

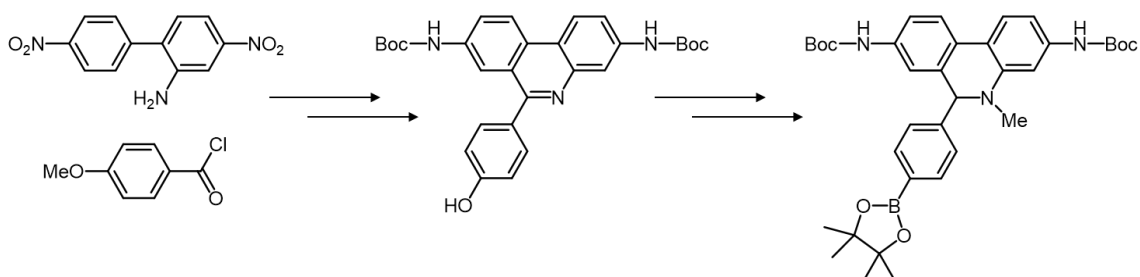


Fig.2 ^{18}F FDHM の標識前駆体となる boronic ester 体の合成経路

3.結果

^{18}F FDHM の標識合成

^{18}F は、住友重機械工業社製サイクロトロン HM-18 を用い、 $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ 反応により製造した。 ^{18}F KF を $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{Py})_4$ 触媒下 DMA/EtOH 中で 135°C , 20 min 反応させ、HCl で脱 BOC した後 NaBH_4 で還元し、HPLC にて溶出時間 15 min の目的物を分離精製した (Figs. 3,4)。半減期補正後の放射化学的収率は $5.8 \pm 2.5\%$ であった (N=4)。比放射能は $24.3 \pm 8.9 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ であった。なお、以上の標識合成反応は住友重機工業社製の自動合成装置で行った。

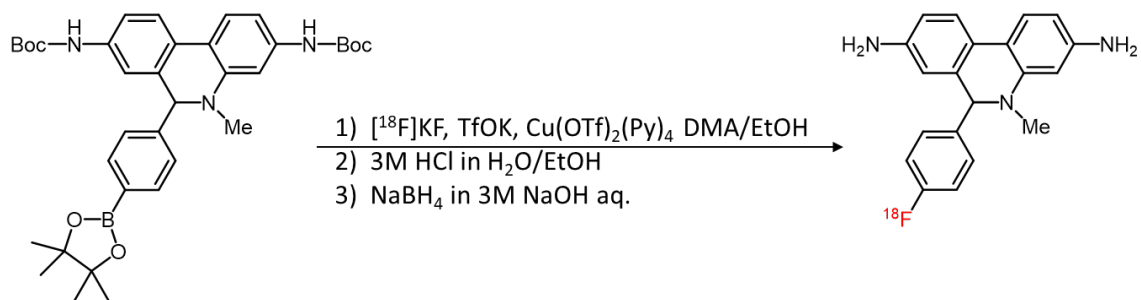


Fig. 3 $[^{18}\text{F}]\text{FDHM}$ の標識合成

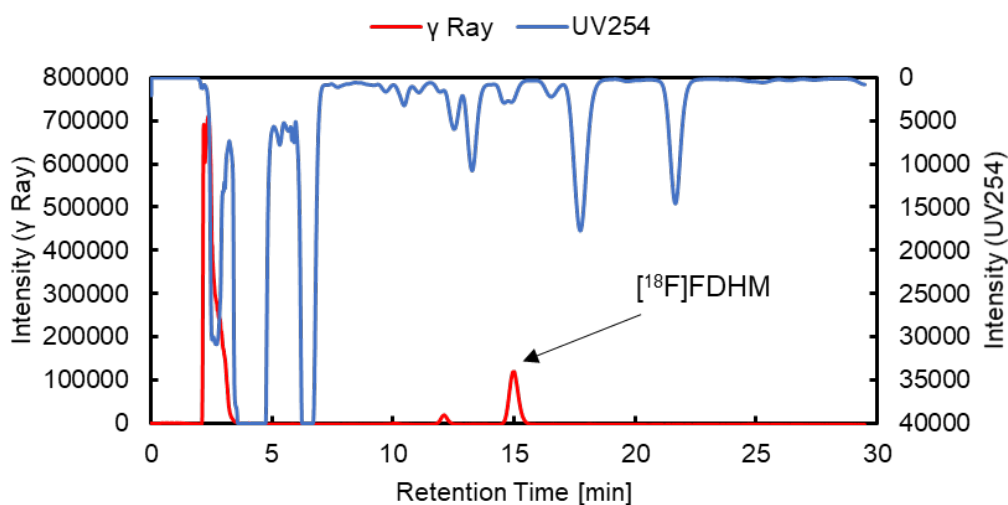
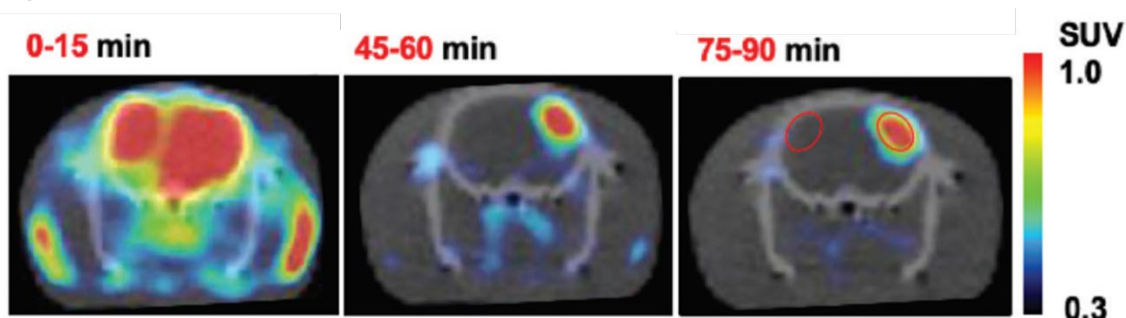


Fig. 4 HPLC による $[^{18}\text{F}]\text{FDHM}$ の分離精製

$[^{18}\text{F}]\text{FDHM}$ の ROS 測定用 PET 薬剤としての評価

8 週齢の雄性ラット脳の前側線条体に Sodium Nitroprusside (SNP ; 80 nmol/ μL) をイソフルラン麻酔下で注入し、1 時間後に $[^{18}\text{F}]\text{FDHM}$ (20 MBq) を尾静脈から投与し、経時的に浜松ホトニクス社製の動物用 PET 装置 (SHR-38000) にて 90 分間左右線条体の放射能濃度の動態を計測した (N=4)。左側線条体には対象として生理食塩水を注入した。SNP は脳に直接注入すると Fenton 反応により ROS を過剰に産生し、最終的には神経細胞死を引き起こすことが明らかになっている。Fig. 5 に $[^{18}\text{F}]\text{FDHM}$ 投与後 (0-15 min)、(45-60 min) 及び (75-90 min) のラット脳における PET 断層画像を示す。 $[^{18}\text{F}]\text{FDHM}$ 投与後初期の段階では、左右の線条体ともに高い放射能集積を認めるが、時間の経過とともに生理食塩水注入側では放射能濃度の迅速な消失が観測された。一方 SNP 注入側では長時間にわたり一定量の放射能が保持され、ROS により生成した酸化物は細胞内にトラップされていることが確認された。以上の実験結果から、 $[^{18}\text{F}]\text{FDHM}$ は血液脳関門を容易に通過し (受動拡散)、ROS によってカチオン体に酸化され、酸化体は細胞内にとどまることが確認され、当初の予測通りにラジカルトラッピングトレーサとしての基本的性能を十分に満たすことが判明した。

Fig.5 SNP 注入ラット脳における ^{18}F FDHM の経時的 PET 断層画像



※ 75-90 min の赤丸は、saline (左) /SNP (右) 注入部位

4.考察

今後の検討課題

- 1) ROS は種々の疾患や加齢における機能低下の重要な原因因子であるのみならず、情報伝達の制御等にも重要な機能を担っていることが明らかになりつつある。特に多くの慢性疾患（リウマチ等の炎症性疾患、慢性腎不全、肝機能障害など）や虚血性疾患において重要な役割を果たしていることが提唱されているが、ヒトにおける実際の病態における測定例は未だ報告されていない。PET は低侵襲的かつ定量的にヒトでの特定物質の選択的測定が可能であることから、今回得られた成果をもとにして、臨床利用が可能な放射性薬剤としての実用化を目的とした詳細な製法、品質管理法等の検討を行うことが最重要課題である。
- 2) 今回用いた ^{18}F FDHM の有用性に関する検証系は SNP 注入モデル脳であるが、今後、腎、心臓など他の臓器についても適切なモデル動物を用いて本薬剤の有用性を評価したい。具体的にはシスプラチン誘発腎毒性、ドキソルビシン誘発心毒性などを想定している。

【謝辞】

本研究は静岡県立大学薬学部、浜松ホトニクス中央研究所、千葉大学薬学部との共同研究によるものである。

本研究に関連する成果は、以下の国際誌にて発表した。詳細についてはこちらを参照していただきたい。

Egami H et al., ^{18}F -Labeled dihydromethidine: positron emission tomography radiotracer for imaging of reactive oxygen species in intact brain. *Org Biomol Chem.* 2020;18(13):2387-2391.

5.文献

- 1) Abe K et al. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2014;34:1907-1913.
- 2) Hosoi R et al. *Mol Imaging.* 2019;18:1-7.