

「生体内脂質炭素ラジカルを非侵襲検出する核医学分子プローブの開発」

神戸薬科大学 薬品物理化学研究室 山崎 俊栄

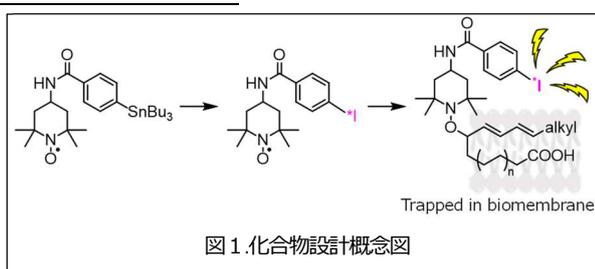
1 研究の背景と目的

脂質過酸化は脂質炭素ラジカル（以下、脂質ラジカル）の生成を起点とする酸化反応であり、連鎖的反応によって周囲へと伝播する。その結果、細胞膜の傷害だけでなく、脂質過酸化物とタンパク質や DNA との付加体が生じ、本来のタンパク質や DNA の機能まで障害される。また、これら酸化物や付加体の蓄積が、がんや神経変性疾患、老化などにおいて確認されている。これまでに、過酸化反応の起点である脂質ラジカルを標的とすることで、その後の一連の酸化反応を抑制し、病態形成をも抑制できるのではないかとの考えから、化合物開発が進められており、近年、肝がんモデル動物において脂質ラジカルの産生が増加していること、および脂質ラジカル消去処置によりがん化を抑制できることが *in vitro* 検出試薬、治療候補化合物の開発により実証されている。しかしながら、生体内で産生している脂質ラジカルがいつ、どこで、どれくらい発生しているかについては不明な点も多い。これを明らかにするには、脂質ラジカルの生体内検出手法の構築が必須であると考え、本研究では、「生体内脂質炭素ラジカルを非侵襲検出する核医学分子プローブの開発」を目的として研究を実施した。

2 研究方法・研究内容

1) 放射性同位元素標識脂質ラジカル反応性化合物の合成

これまでに開発されている脂質ラジカル高反応性化合物は図1に示すN-O上にラジカルを有するラジカル化合物（ニトロキシド）であり、炭素ラジカルとの結合生成反応が鋭敏に生じることが知られている。そこで、この基本骨格に放射性同位元素の導入を検討した。



具体的には、臨床利用されており、多種多様な放射性核種の存在するヨウ素を、既知の手法であるスズ-ヨウ素交換反応を用いることとした。このために、化合物へスズ置換基の導入を検討した（図2）。標識化合物は、別途合成した非放射性の同一構造を持つ化合物（以下、非標識体）との HPLC 保持時間などとの比較により同定した（図3）。また、メタボリックトラッピングにより標的組織に蓄積しているかを確認するため、脂質ラジカル反応性を消失させた対照化合物を合成した。

2) *in vitro* での機能性評価

1) で開発した化合物の評価を *in vitro*、培養細胞（HepG2）を用いて行った。具体的には、初めに非標識体について脂質ラジカルや他の活性酸素種との反応性を電子スピン共鳴（ESR）装置を用いて測定した。開発化合物は安定なラジカルであることから ESR 信号を与えるが、系内で発生させた脂質ラジカルと反応することでラジカルの消失に伴う信号減衰が生じることから、その変化を経時的に測定することで反応性を評価した。脂質ラジカルはリノール酸トリポキシゲナーゼとの酵素反応により発生させた（図4参照）。脂質ラジカルとの反応性を確認した後、放射性ヨウ素標識化合物を培養細胞へ添加し、細胞内への取り込み能を評価した（図5）。脂質ラジカル産生系については、アラキ

ドン酸の添加 (500  $\mu\text{M}$ ) により行った。また、対照実験として、アラキドン酸の飽和誘導体であるアラキジン酸の添加、および脂肪酸未添加条件を用いた。添加後、一定時間培養した後に、培地の除去、洗浄を行い、細胞を溶解させてから  $\gamma$  カウンターにより放射エネルギーを測定した。また、タンパク質量を測定し、細胞内取り込み量を %dose / mg protein として算出した。

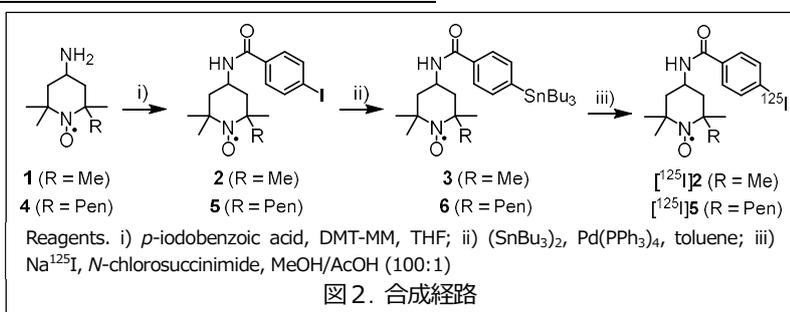
### 3) モデル動物での検証

健常マウス、モデルマウスに標識化合物を投与し体内分布を比較・評価した。がん移植モデルには HepG2 細胞 ( $3 \times 10^6$  cells) を移植した。具体的な評価法については、化合物投与から一定時間後肝臓、腎臓、心臓等の各臓器を採取し、重量を測った後に  $\gamma$  カウンターを用いて放射エネルギーを測定した。

## 3 研究成果

### 1) 放射性同位元素標識脂質ラジカル反応性化合物の合成

ニトロキシドへの放射性ヨウ素を標識検討の第一段階として、ニトロキシドには生物系実験に汎用され、かつ脂質ラジカル捕捉効果の報告もある TEMPO 系ニトロキシドを選択



した。TEMPO は 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-*N*-oxyl の略であり、ピペリジン環の 4 位に化学修飾可能な置換基を持たせることが可能である。一方で、低分子化合物の放射性ヨウ素の標識法として、スズ-ヨウ素交換反応が広く知られており、芳香族スズ化合物を前駆体として合成することが多い。そこで、出発原料には市販品を容易に入手可能であり、アミノ基を TEMPO 化合物の 4 位に有する 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (化合物 1) を用い、これに芳香族スズ置換基を導入した化合物 3 を合成する方法を考案した (図 2)。最終的には標識した [125I]2 を同定するために、非放射性ヨウ素アナログである化合物 2 が必要となることから、まず初めに化合物 1 と *p*-iodobenzoic acid とを縮合させ化合物 2 を得ることとした。実際に、脱水縮合剤である DMT-MM を用いて反応を行ったところ、化合物 2 を 79% の収率で得ることができた。次に、スズ-ハロゲン交換反応により化合物 3 の合成を試みた。パラジウム触媒とビストリブチルスズを用いてスズ化を行ったところ、化合物 2 と 3 はカラムクロマトグラフィーにて十分に分離可能であり、51% の収率で化合物 3 を得た。化合物 3 は MS 測定により同定し、MS スペクトルは、Sn に由来する典型的なピークパターンを示した。以上の結果により、放射性ヨウ素の標識前駆体の合成法を確立したことから、脂質ラジカルに対して高い反応性を示す化合物 4 についても、同様に合成を進め、化合物 5 及び化合物 6 を得た。

続いて <sup>125</sup>I 標識を検討した。条件として、*N*-chlorosuccinimide (NCS) を酸化剤とし、酸性条件下 (MeOH/AcOH=100:1) 室温にて 15 分混和させ、HPLC 測定をおこなったところ、約 9 分に目的物とみられるピークを確認できた。そこで、このピークを分取し、非標識体である化合物 2 と同時注入による HPLC 測定を行ったところ、約 9 分に UV と RI の両方のピークが検出され、[125I]2 であることを確認できた。従って、本反応条件に

より化合物 **3** から **2** への  $^{125}\text{I}$  標識が可能であることが明らかとなった。このときの放射化学的収率は 82% であり、放射学的純度は >95% であった。また、同条件で反応時間を 5, 10, 15, 30 分と変化させても、その放射化学的収率はほとんど変化しなかった。さらに、NCS の代わりにクロラミン T を酸化剤として反応を行った場合も同様に高収率・高純度で標識が可能であった。

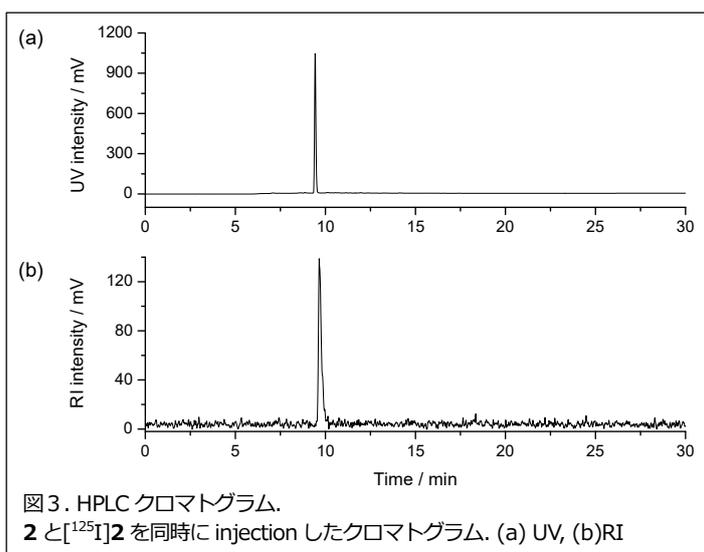


図3. HPLC クロマトグラム。  
**2** と  $^{125}\text{I}$  を同時に injection したクロマトグラム。(a) UV, (b) RI

以上の結果より、目的とする  $^{125}\text{I}$  標識化合物を高純度、高収率で得ることに成功した。これまで、ニトロキシドの放射性ヨウ素標識は先例がなく、初めて実証することができた。

同様に、化合物 **6** についても NCS を酸化剤とする条件で標識検討を行ったところ、放射化学的収率が 85%、放射化学的純度は >99% と高収率・高純度で  $^{125}\text{I}$  **5** を得ることに成功した。

## 2) *in vitro* での機能性評価

化合物 **2** および **5** の脂質ラジカルに対する反応性を測定した。化合物 **2** に関する結果を図 4 に示す。

化合物 **2** はリノール酸-リポキシゲナーゼ反応系において、経時的かつ顕著に ESR 信号の減衰を示した。一方で、スーパーオキシドやヒドロキシルラジカル、過酸化水素、次亜塩素酸などの活性酸素種に対しては、ESR 信号は変化せず、

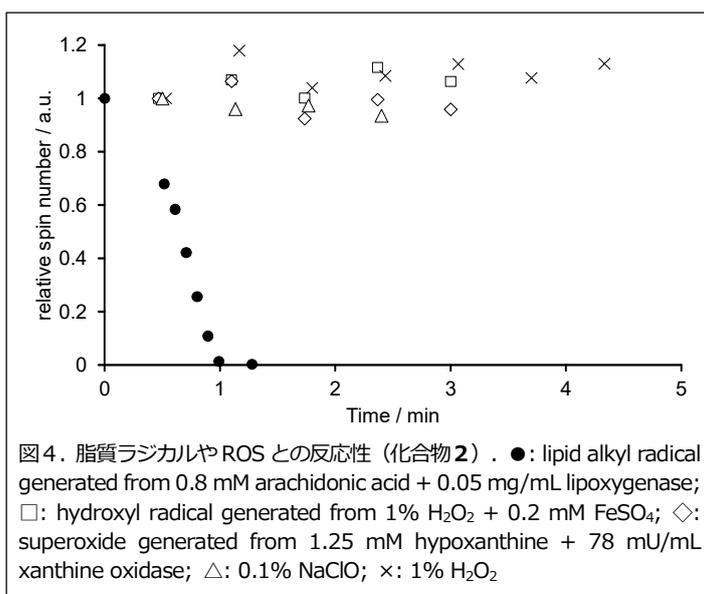


図4. 脂質ラジカルや ROS との反応性 (化合物 **2**) . ●: lipid alkyl radical generated from 0.8 mM arachidonic acid + 0.05 mg/mL lipoxygenase; □: hydroxyl radical generated from 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 0.2 mM  $\text{FeSO}_4$ ; ◇: superoxide generated from 1.25 mM hypoxanthine + 78 mU/mL xanthine oxidase; △: 0.1%  $\text{NaClO}$ ; ×: 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$

反応性を示さなかった。これまでにも、ニトロキシドが脂肪酸とリポキシゲナーゼとの反応系において、脂質ラジカルとの付加体を形成することが報告されており、今回開発した化合物についても、同様に脂質ラジカルとの反応性を示したものと考えられる。また、化合物 **5** についても化合物 **2** と同様に脂肪酸-リポキシゲナーゼ系では ESR 信号の減衰が観測されたが、ヒドロキシルラジカルなどの活性酸素種発生系では信号の減衰が観測されなかった。以上より、開発した化合物は脂質ラジカルに対して高い選択性を示すことが確認できた。

続いて、培養細胞において開発化合物が脂質ラジカル発生時に細胞に貯留するかどうかを検討した。  $^{125}\text{I}$  **2** とともにアラキドン酸を添加した場合と添加しなかった場合とでは、15 分まで経時的に取り込み量が増大した (図 5)。また、アラキドン酸と同様の疎水性を示すが脂質過酸化を促進しないアラキジン酸を添加した場合と比較しても、アラキドン酸を添加した場合において、細胞取り込み量の有意な増大が見られた。このことから、化合

物は添加脂肪酸の影響に依らず、脂質ラジカルの発生にตอบสนองして細胞へ貯留することが示唆された。また、 $[^{125}\text{I}]5$ についても、細胞取り込みを検討したところ、 $[^{125}\text{I}]2$ と同様にアラキドン酸添加（脂質ラジカル産生）時においてのみ優位に細胞取り込み量の増大が認められた。

以上より、開発化合物は、脂質ラジカルとの反応による脂溶性の増大により、細胞内に滞留するものと考えられる。

### 3) モデル動物での検証

$[^{125}\text{I}]5$  の健常マウスにおける体内動態の結果を図6に示す。投与直後では特に肝臓への集積が高かった。つづいて、がん移植モデルマウスへ $[^{125}\text{I}]5$ を投与したところ、他の臓器と同程度の集積でありがんへの突出した集積は認められなかった。そこで、他の脂質ラジカル産生モデルで現在

予備的に検討を進めているところではあるが、脂質ラジカルとの反応性を消失させた対照化合物と比較して、脂質ラジカル産生部位での集積量の増大が認められている。今後も引き続き、様々なモデルを用いたプローブの有用性の検討が求められる。

## 4 生活や産業への貢献および波及効果

過酸化脂質は種々の疾患で増加していることが報告されている。例えば、高脂血症患者では、血漿中ホスファチジルコリンペルオキシド濃度が健常者に比べて高く、また、動脈硬化では血中の酸化LDLが発症に寄与していることが知られている。また、心血管疾患のみならず、認知症患者においても血漿中の過酸化脂質量が優位に増大していることが多数報告されている。さらに、がん患者では、多価不飽和脂肪酸の過酸化産物であるアルデヒド類と、タンパク質やDNAとの付加体の形成が確認されており、この修飾変化が機能傷害を誘導し、がんの発症と進展に寄与しているのではないかと考えられている。このようなことから、生体内の過酸化脂質を測定することは健康状態の把握に有用である。その方法の一つとして、血液生化学検査は、患者からの検体を比較的容易に採取できることから上記のように多数の疾患で研究報告例があるものの、血液生化学検査の結果だけでは疾患の鑑別が難しい。過酸化脂質の起点となる部位を生体内で検出可能とする本研究は、このような過酸化脂質関連疾患の鑑別を可能とする診断法の開発に貢献できるものと期待している。

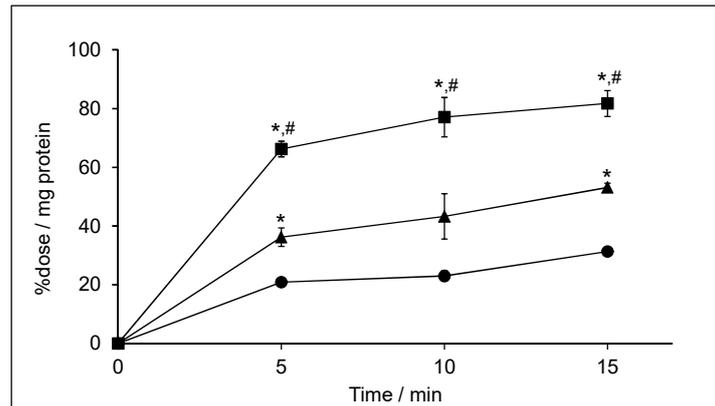


図5. 細胞内滞留性（化合物2）. アラキドン酸(■)、アラキジン酸(▲)を添加、あるいは脂肪酸未添加(●)処理したHepG2細胞に対する $[^{125}\text{I}]2$ の細胞内滞留性を経時的に測定。\*  $p < 0.01$  vs 脂肪酸未添加, #  $p < 0.01$  vs アラキジン酸。

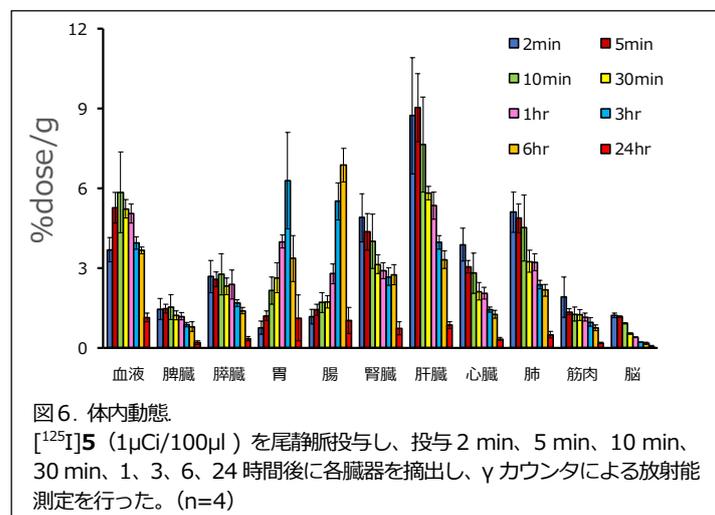


図6. 体内動態。 $[^{125}\text{I}]5$  ( $1\mu\text{Ci}/100\mu\text{l}$ )を尾静脈投与し、投与2 min、5 min、10 min、30 min、1、3、6、24時間後に各臓器を摘出し、 $\gamma$ カウンタによる放射能測定を行った。(n=4)