

アズマ リサ

氏名(本籍)	東 里沙 (大阪府)
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	博第 52 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 5 日
学位授与の条件	学位規程第 3 条第 1 項該当者
学位論文の題名	生体内の脂質アルキルラジカルを非侵襲的に検出する 核医学イメージングプローブの開発
論文審査委員	主 査 教 授 上田 昌史 副 査 教 授 小山 豊 副 査 教 授 向 高弘

論文内容の要旨

緒言

生体内で生じた活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は、DNA、タンパク質、糖、脂質など様々な機能性分子と反応し、多様な酸化ストレス疾患の発症や進展に関与している¹。これらの機能性分子の中でも、生体膜構成成分である多価不飽和脂肪酸は活性メチレンを有するため ROS との反応性が高く、容易に連鎖的脂質過酸化反応が進行する (Fig. 1)^{2,3}。脂質過酸化反応は、脂質アルキルラジカル (L·) の生成を起点として開始され、酸素分子の付加反応や脂質の分解反応など複数の反応を経て、マロンジアルデヒド (MDA) や 4-ヒドロキシ-2-ノネナル (4-HNE) をはじめとする種々の脂質過酸化最終生成物を生じる⁴。これらの脂質過酸化最終生成物は、それ自身が細胞毒性や変異原性を有し⁵⁻⁷、また生体内の機能性分子と反応することでその働きを消失させることから、がん^{8,9}や動脈硬化^{10,11}をはじめとする種々の疾患と関連することが報告されている。

そのため、一連の脂質過酸化反応の最上流で発生する脂質ラジカルがいつ、どこで、どのくらい生成するかを明らかにできれば、その後続く反応を抑制するための新規治療薬の創出や、疾患の早期診断へと応用できることが期待される。しかしながら、脂質ラジカルは反応性が高く生体内で

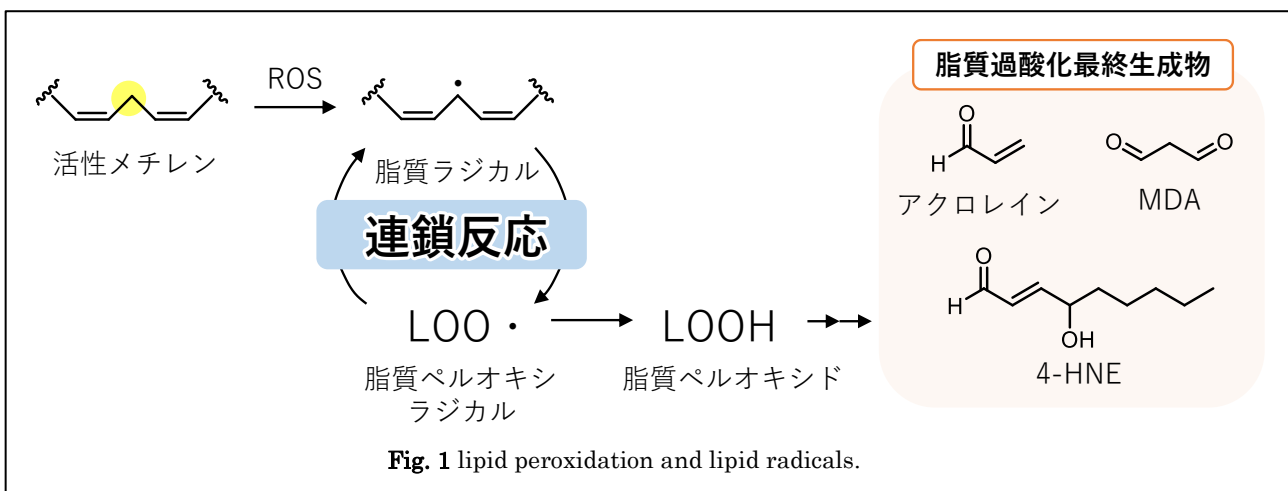


Fig. 1 lipid peroxidation and lipid radicals.

の存在量が微量であることから、直接検出することが困難である。これまでに、脂質ラジカル検出手法として電子スピン共鳴 (ESR) /スピントラップ法¹²⁻¹⁴や、脂質ラジカルの酸化体である脂質ペルオキシラジカルを検出する蛍光検出手法^{15,16}、脂質ラジカルを検出する蛍光試薬 NBD-pen¹⁷が開発され、これらの手法により培養細胞や摘出臓器における脂質ラジカルの検出が可能であることが示された。しかしながら、ESR/スピントラップ法は感度が低く多量のスピントラップ剤を必要とするため、生体内でごく微量に存在する脂質ラジカルの検出には適していない。また、蛍光試薬では光の生体透過性が低いため生体深部の脂質ラジカルを非侵襲的に検出できないという課題が存在する。さらに、細胞・摘出臓器においては実際の生体内と酸素分圧が大きく異なるため、生体内で実際に生成している脂質ラジカルの量や挙動が、これまでの細胞実験や摘出臓器の結果と関連しているかは不明であり、生体内に存在する脂質ラジカルについて正確に把握できていないという問題がある。したがって、これらの問題を解決し、脂質ラジカルと疾患との関連性を解明するため、生体内の脂質ラジカルに対する選択性、定量性の高い新規検出手法の開発が必要となる。

そこで本研究では、脂質過酸化反応の起点である脂質ラジカルの生体内での挙動を非侵襲的に追跡する手法の開発を目的として、脂質ラジカル捕捉能を有するニトロキシド化合物を基盤とする核医学イメージングプローブの開発を着想した。ニトロキシドとは、アミノキシルまたはニトロキシルラジカルとも呼ばれ、NO ラジカル構造 ($>N-O\cdot$) を含むフリーラジカル分子である。一般的にニトロキシド化合物単独では常温、常圧下でも安定なフリーラジカルとして存在するため取り扱いが容易であり、さらに水溶液中でも安定に存在することが知られている。また、ニトロキシドはラジカル-ラジカルカップリング反応により脂質ラジカルと反応して、安定な共有結合 (アルコキシアミン) を形成するが、この反応はスピントラップ剤と脂質ラジカルとの反応と比較してもはるかに高い反応性を有することが知られている¹⁸。一方、核医学イメージング法は、放出される電磁波を生体外から検出し、画像化することで体内挙動や分布を可視化できる技術であり、感度が極めて高く、定量性にも優れ、生体深部の検出も可能であるという特徴を有する。この核医学イメージング法を脂質ラジカル検出プローブに応用できれば、これまで未解明であった脂質ラジカルの生体内での分布や挙動を定量的に追跡でき、疾患との関連性の解明や疾患メカニズムの解明など幅広い応用が可能になると考えられる。具体的には、放射性標識したニトロキシド化合物の設計・合成を行い、さらにその生体応用の可能性を検証すべく、以下の研究を行った。

第 1 章 ニトロキシド化合物を母体とした放射性ヨウ素標識脂質アルキルラジカル検出プローブの合成と構造解析

本研究では、誘導体化が容易な TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl) 型ニトロキシドを母体構造として選択した。はじめに、ニトロキシド誘導体への放射性ヨウ素標識法の確立を目的として、TEMPO 型ニトロキシドの 4 位に *p*-ヨードベンズアミドを導入した化合物 **1** を設計・合成した (Fig. 2)。また、標識前駆体としてトリブチルスズ基を有するニトロキシド誘導体を合成し、スズ-ヨウ素交換反応を用いて、反応時間 15 分という短時間かつ、放射化学的収率 82% という高収率

で^[125I]1を得ることに成功した。

ニトロキシド化合物 (>N-O·) は生体内に投与すると、アスコルビン酸などの還元性物質により還元され、ヒドロキシルアミン体 (>N-OH) へと変化し脂質ラジカル捕捉能が消失することが知られている。そこで、ニトロキシド近傍の立体障害が増大

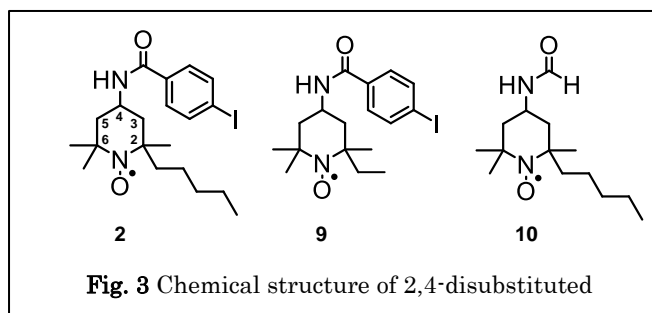
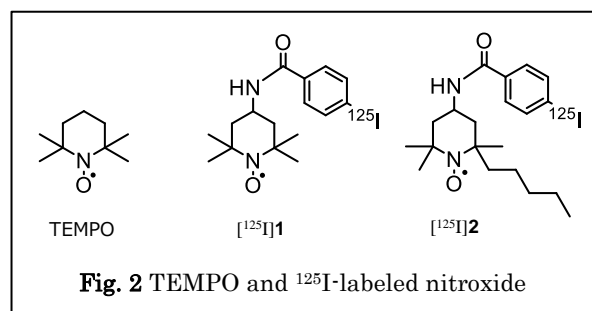
することで還元抵抗性が向上すると考え、側鎖に嵩高いペンチル基を有する化合物 **2** (Fig. 2) を合成した。化合物 **2** は、TEMPO 型ニトロキシドの 2 位と 4 位が不斉炭素となるため、立体異性体 (ジアステレオマー) である **2a**、**2b** として分離した。その後、化合物 **1** と同様の方法で **2a**、**2b** の放射性ヨウ素標識を行ったところ、それぞれ放射化学的収率 80% 以上の高収率で標識に成功した。次に、生体内でのラジカルとしての寿命を評価するために、アスコルビン酸に対する還元反応性評価を行った。ペンチル基を有する **2a**、**2b** はメチル基を有する **1** よりも二次反応速度定数が小さく、アスコルビン酸に対して還元されにくいことが示された。また、立体異性体である **2a**、**2b** を比較すると、**2b** より **2a** の方が還元されにくいことが示された。

ニトロキシド化合物における還元反応性は、ラジカルとしての寿命や反応選択性に影響することから、生体応用を考えるにあたり重要な因子となる。しかしながら、これまでに 2,4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体の立体異性が反応性に及ぼす影響について言及した報告は存在しない。そこで、2,4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体の立体異性による反応性の違いを精査するため、2,4 位の置換基が異なるニトロキシド誘導体 **9**、**10** を設計・合成し (Fig. 3)、アスコルビン酸との還元反応性を評価した。2,4 位のどちらにも嵩高い置換基が結合した化合物 **2**

では、立体異性による還元反応性に違いが見られた一方で、2,4 位の片側のみが嵩高い化合物 **9** 及び **10** では立体異性による反応性に違いが見られなかった。そのため、2,4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体のアスコルビン酸との還元反応性には立体構造が関与すると考えられた。

次に、化合物 **2a**、**2b** の立体構造を同定すべく、X 線結晶構造解析を目的として化合物 **2a**、**2b** の結晶化を検討したが、化合物 **2** はペンチル基の自由度が高く結晶化が困難であった。そこで、側鎖にエチル基を有する化合物 **9a**、**9b** を結晶化し、X 線結晶構造解析を行うことで、化合物 **9a** (2R*4R*) および **9b** (2R*4S*) の立体構造を同定した。その構造を基に、NMR や ESR、シリカゲルクロマトグラフィーでの溶出順序などの結果を照らし合わせ、化合物 **2a** が 2R*4R*、**2b** が 2R*4S* であると推定した。

さらに、これまで *in vitro* で行ってきた還元反応性評価の結果と同様の結果を *in vivo* でも得られるか検証するため、マウス脳における還元速度を *in vivo* ESR により評価した。その結果、**2a** の還元速度定数は **2b** よりも有意に低く、*in vitro* での評価結果が生体内での還元反応性の結果を反映し

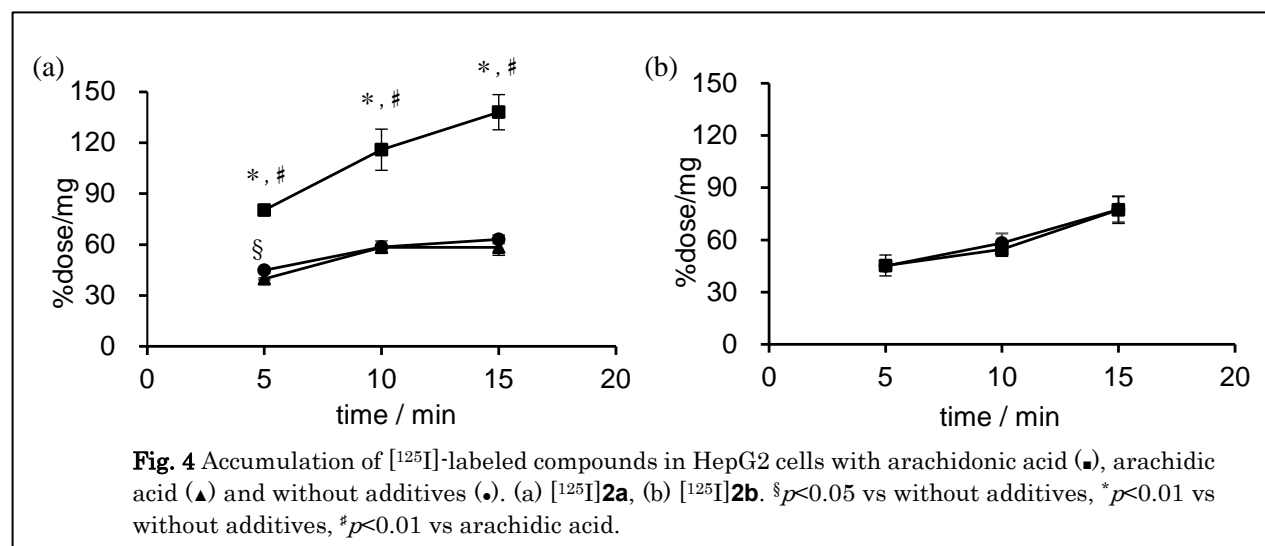


たことが示された。

第2章 放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物の生体内脂質ラジカル検出プローブとしての基礎的評価

2章では、1章で合成した新規脂質ラジカル検出プローブの生体応用に向けた基礎的評価を行った。一般的に、ニトロキシド化合物は脂質ラジカルへの高い選択性を示し、ROSなどのほかのラジカル種との反応性は低いことが知られている¹⁹。化合物**2a**、**2b**におけるROS及び脂質ラジカルとの反応性についてESRを用いて評価したところ、脂質ラジカルとの反応においてのみニトロキシド由来のESRシグナルの減衰が観測された。そのため、ニトロキシド化合物**2a**、**2b**においてもROS分子種とは反応せず、脂質ラジカルと選択的に反応することが示された。さらに、アラキドン酸由来脂質ラジカルとニトロキシド誘導体^[125I]**2a**またはメトキシアミン誘導体^[125I]**3a**を反応させ逆相HPLCにより分析すると、^[125I]**3a**では化合物^[125I]**3a**由来の放射能ピークのみが検出された一方で、^[125I]**2a**では複数の放射能ピークが検出された。また、アラキドン酸由来脂質ラジカルと**2a**を反応させLC/MSを行うと、脂質ラジカル付加体と考えられる分子イオンピークが複数検出された。以上の結果より、脂質ラジカルと化合物**2a**のニトロキシド部位が反応することで、複数の脂質ラジカル付加体が生成することが確認された。

細胞集積性評価では、不飽和脂肪酸であるアラキドン酸を添加し脂質ラジカルを発生させた細胞における化合物^[125I]**2a**、^[125I]**3a**の細胞取り込み量を評価した (Fig. 4)。また、対照実験として脂質ラジカルを発生しない飽和脂肪酸であるアラキジン酸を細胞に添加し同様に評価した。^[125I]**2a**の細胞への放射能取り込み量を比較すると、アラキジン酸添加群では脂肪酸非添加群と同等の低い放射能集積を示した一方で、アラキドン酸添加群では脂肪酸非添加群より有意に高い放射能集積を示した。また、化合物^[125I]**2a**とメトキシアミン誘導体^[125I]**3a**において、脂肪酸非添加群では同程度の放射能集積を示し、^[125I]**3a**はアラキドン酸添加群においても脂肪酸非添加群と同程度の放射能集積を示した。これは、^[125I]**2a**がアラキドン酸由来脂質ラジカルと反応し、脂溶性が向上した脂質ラジカル付加体へと変化したことで細胞内に滞留したと考えられる。

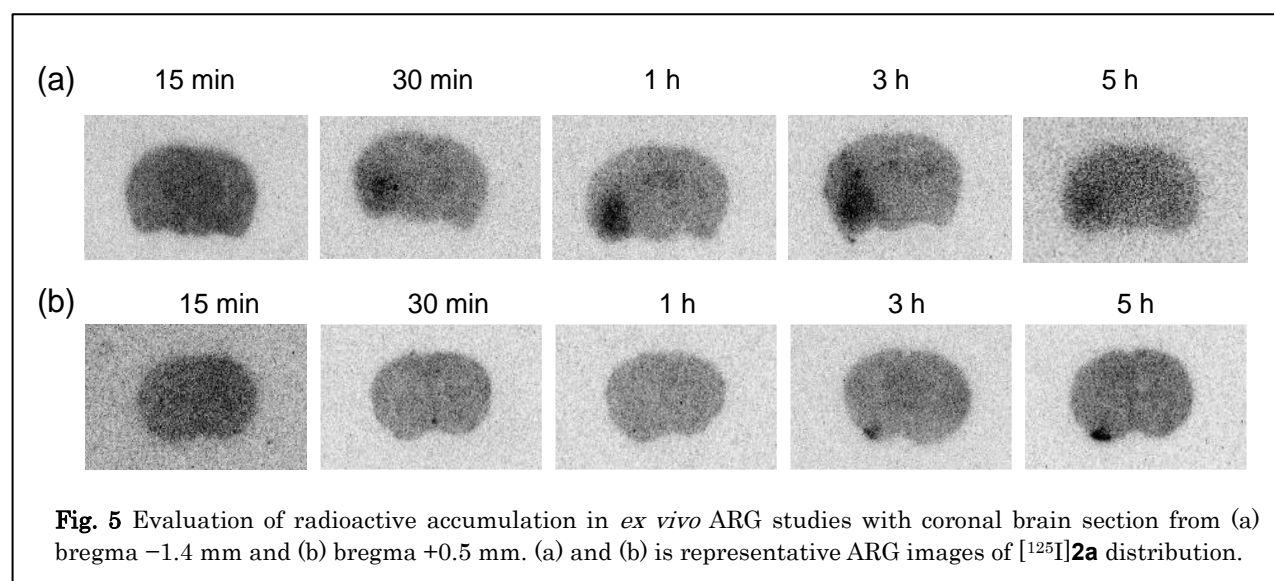


正常マウスを用いた体内動態評価では、マウスに $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ を投与し、2分から24時間後までの各時間後に各臓器を摘出し放射能を測定した。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ は投与後早期に全身に分布し、その後徐々にクリアランスされ、投与24時間後には大半が体内から消失していた。さらに、甲状腺への放射能集積は0.1%dose以下と低いことから、*p*-ヨードベンズアミドに導入された放射性ヨウ素は脱離せず、生体内の脱ヨウ素に対する安定性が高いことが示唆された。次に、四塩化炭素により誘発した炎症モデルマウス（脂質過酸化亢進モデル）を用いて化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ の放射能分布評価を行った。肝臓、腎臓、脾臓、肺などの、四塩化炭素の投与により脂質過酸化が起こると考えられる臓器では、ニトロキシド誘導体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ はメトキシアミン誘導体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ よりも有意に高い放射能集積を示した。化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ と $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ は正常マウスで同等の生体内分布を示していたことから、四塩化炭素の投与により生じた脂質ラジカルを $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ のニトロキシドラジカル部位が捕捉し、それぞれの臓器に集積したと考えられる。以上より、化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ を用いることで、生体内で脂質ラジカルが産生される部位・量を追跡できる可能性が示された。

第3章 一過性中大脳動脈閉塞モデルにおける脂質ラジカルの追跡

脳虚血再灌流後には脳内の脂質過酸化反応が亢進し過酸化物質が増加することが報告されている²⁰⁻²³。一方で、これらの過酸化物質の最上流に位置する脂質ラジカルがいつ、どの部位で発生しているかを捉えた例はない。第3章では、脳虚血再灌流後に発生する脂質ラジカルの脳内挙動を追跡することを目的として、化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ を用いてマウス一過性中大脳動脈閉塞モデル（transient middle cerebral artery occlusion; tMCAO）における放射能分布評価を行った。

tMCAO（1時間虚血）マウスに化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ を投与し、その後作製した脳の凍結切片をオートラジオグラフィ（ARG）で分析することにより脳内放射能分布評価を行った（Fig. 5）。脳の解剖学的な位置である bregma から-1.4 mm の位置の脳における冠状切片では、再灌流15分後の虚血側と非虚血側で集積に差は確認されなかったが、再灌流から30分、1、3、5時間後では虚血側の脳に高い放射能集積が見られた。さらに、bregma から+0.5 mm の位置の脳における冠状切片では、再灌流か



ら 15、30 分、1 時間後では虚血側と非虚血側で放射能集積に差は見られなかったが、再灌流の 3、5 時間後では虚血側の嗅結節付近の部位に有意に高く集積した。これらの結果より、脳虚血再灌流後の脂質ラジカルの生成は部位や時間により変化する可能性が示された。

次に、脳虚血再灌流で生じた脂質ラジカルとニトロキシド誘導体 **2a** が反応し、共有結合を有する脂質ラジカル付加体が生成していることを確認するため、LC/MS により分析を行った。再灌流から 1 時間後および 5 時間後に化合物 **2a** を投与すると、虚血側の大脳半球で様々な脂質ラジカル付加体の分子イオンピークが確認された。また、再灌流から 5 時間後と 1 時間後の虚血側の大脳半球を比較すると、5 時間後の方が多くの脂質ラジカル付加体が検出された。以上より、脳虚血再灌流後に生じた脂質ラジカルを **2a** が捕捉することで、共有結合を有する脂質ラジカル付加体が生成することを明らかにした。

最後に、フリーラジカル消去作用を示し脂質過酸化を抑制する脳保護薬エダラボンを tMCAO マウスに投与し、化合物 [¹²⁵I]**2a** の放射能分布評価を行った。まず、bregma から +0.5 mm の位置における再灌流から 5 時間後の放射能分布を評価したところ、再灌流の 30 分前、5 分前、5 分後、30 分後にエダラボンを投与した群では、エダラボン非投与群と同程度の放射能集積を示したが、再灌流の 1 時間後、3 時間後にエダラボンを投与した群では、エダラボン非投与群と比較して有意に放射能集積が抑制された。一方、bregma から -1.4 mm の位置の脳における、再灌流の 5 時間後の放射能分布評価では、エダラボンの投与タイミングを変化させてもエダラボン非投与群との間に集積の差は見られなかった。以上の結果から、エダラボンの投与タイミングにより脂質ラジカルの消去作用が変化すること、及び、エダラボンは脳内のすべての部位で脂質ラジカルを抑制するのではなく、消去能を発揮する部位および脂質ラジカル分子には特異性がある可能性が考えられた。

以上より、本研究で開発した放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物 **2a** が脳虚血再灌流後に発生した脂質ラジカルを捉えるプローブとして機能することが示された。脳梗塞の治療として、脳内で発生したフリーラジカルおよび脂質ラジカルを消去する新規脳保護薬の開発が求められているが、本化合物を利用することでその効果判定や投与タイミングの検討に繋げることができると考えられる。

本研究では、脂質過酸化反応の起点である脂質ラジカルの生体内での挙動を非侵襲的に追跡する手法の開発を目的に、(1) ニトロキシドを母体化合物とした放射性ヨウ素標識脂質アルキルラジカル検出プローブの合成と構造解析、(2) 放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物の生体内脂質ラジカル検出プローブとしての基礎的評価、(3) 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける脂質ラジカルの追跡、について検討した。本研究で開発した放射性ヨウ素標識 TEMPO 型ニトロキシド化合物 **2a** を応用すれば、従来の手法では困難であった、生体内の脂質ラジカルを非侵襲的に可視化することや分子種の同定が可能となり、酸化ストレス疾患の発症や進展に関わる脂質ラジカルや脂質過酸化反応の役割を明確にできると強く確信している。

参考文献

- 1) Valko M., *et al.*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007;**39**(1):44-84.
- 2) Yin H., *et al.*, *Chem. Rev.*, 2011;**111**(10):5944-5972.
- 3) Niki E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005;**338**(1):668-676.
- 4) Yadav R. K., *et al.*, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2018;**135**:21-26.
- 5) Tudek B., *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, 2017;**107**:77-89.
- 6) Niedernhofer L. J., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003;**278**(33):31426-31433.
- 7) Esterbauer H., *et al.*, *Mutat. Res. Genet. Toxicol.*, 1990;**238**(3):223-233.
- 8) Marnett L. J., *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2012;**77**(12):5224-5238.
- 9) Santos C. R., *et al.*, *FEBS J.*, 2012;**279**(15):2610-2623.
- 10) Uchida K., *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, 2000;**28**(12):1685-1696.
- 11) Stocker R., *et al.*, *Physiol. Rev.*, 2004;**84**(4):1381-1478.
- 12) Stolze K., *et al.*, *Acta Biochim. Pol.*, 2000;**47**(4):923-930.
- 13) Buettner G. R., *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, 1987;**3**(4):259-303.
- 14) Qian S. Y., *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, 2003;**35**(1):33-44.
- 15) Krumova K., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012;**134**(24):10102-10113.
- 16) Drummen G. P. C., *et al.*, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002;**33**(4):473-490.
- 17) Yamada K., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2016;**12**(8):608-613.
- 18) Bagryanskaya EG., *et al.*, *Chem. Rev.*, 2014;**114**(9):5011-5056.
- 19) Takeshita K., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.*, 2002;**1573**(2):156-164.
- 20) Lee H. K., *et al.*, *Nutrients*, 2022;**14**(7):1380.
- 21) Zhang Q., *et al.*, *Front. Pharmacol.*, 2023;**14**:1-14.
- 22) Yu H., *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 2020;**57**(2):500-508.
- 23) Mršić-Pelčić J., *et al.*, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2017;**121**(6):453-464.

論文審査の結果の要旨

脂質過酸化の起点である脂質アルキルラジカル（以下、脂質ラジカル）が種々の酸化ストレス関連疾患に寄与することが報告されているが、生体内の脂質ラジカルを非侵襲的かつ選択的に検出する手法はいまだ確立されていない。本学位論文では、放出される電磁波を生体外から検出可能である核医学イメージング技術に着目し、生体内の脂質ラジカルを非侵襲的かつ選択的に検出する新規核医学イメージングプローブを開発した。まず、脂質ラジカルに対して反応性を示すニトロキシド化合物に放射性ヨウ素を導入したプローブを設計・合成し、種々のラジカル種を用いて反応選択性評価を実施すると、本プローブの脂質ラジカルへの選択的な反応性が示された。そこで、炎症モデルマウスに本プローブおよび、脂質ラジカルとの反応性を消失させた対照化合物を投与し集積性評価を行った結果、脂質過酸化の亢進が知られている種々の臓器へ本プローブが有意に高く集積した。次に、マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルに本プローブを投与し、放射能分布評価を行ったところ、虚血側の脳でのみ有意に高い放射能集積が示された。また、脳の部位により集積が確認される時間が変化していたことから、脳の部位により脂質ラジカルの生成タイミングが異なる可能性が示された。さらに、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンをマウス一過性中大脳動脈閉塞モデルに投与すると、脳の部位毎に脂質ラジカルの生成抑制効果に変化することが示されたことから、本プローブが脳内の脂質ラジカルを追跡可能であることを示した。

以上のように、本研究で開発した放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物を応用すれば、従来の手法では困難であった、酸化ストレス疾患の発症や進展に関わる脂質ラジカルや脂質過酸化反応の役割を明確にでき、新たな医薬品開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

上記の論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。