

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19827

研究課題名(和文)分子イメージングによる全身性アミロイドーシスの早期診断法の開発

研究課題名(英文)Development of imaging probes for systemic amyloidosis diseases

研究代表者

萩森 政頼 (HAGIMORI, Masayori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：40446125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、全身性アミロイドーシスの早期診断と治療モニタリングを目指し、多様な全身性アミロイド線維に一樣に結合する核医学イメージングプローブと、それぞれの全身性アミロイド線維に選択性を持つ蛍光イメージングプローブの開発を行った。チオフラビンTをベースに設計・合成した放射性ヨウ素標識体[125I]1は、SAA繊維およびA_β繊維に同程度の親和性を保持しており、また、AAアミロイドーシスの病態モデルマウスにおいて、AAアミロイドーシスの好発部位である脾臓、腎臓、肝臓で高い放射能集積が認められた。また、蛍光プローブについては、置換基の検討により、各アミロイド線維に選択的を示す化合物の合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：For diagnosis and monitoring therapeutic efficacy of systemic amyloidosis diseases, we planned to develop a nuclear imaging probe with similar binding affinities to a variety of amyloid fibrils and fluorescent probes with a selective binding affinity to a specific amyloid fibril. Radioiodine labelled compound [125I]1 based on the structure of thioflavine T showed similar binding affinities to SAA fibril and A_β fibril. In AA amyloid model mice, considerable accumulation of radioactivity was observed in predilection sites of AA amyloid such as the spleen, kidney, and liver. In addition, we synthesized fluorescent probes with a selective binding affinity to a specific amyloid fibril by investigating substituent groups.

研究分野：薬学

キーワード：全身性アミロイドーシス 早期診断 核医学イメージングプローブ 蛍光イメージングプローブ

1. 研究開始当初の背景

アミロイド繊維の細胞外蓄積により引き起こされるアミロイドーシスは、これまでに約 30 種類ほど報告され、また、本邦において難治性疾患克服研究事業の対象疾患の一つに挙げられており、アミロイド蓄積を精度よく評価できる診断法の開発は急務となっている。アミロイド線維は、タンパクやペプチドが分子内もしくは分子間においてシート構造を呈することが特徴であり、シート構造に親和性を有するコンゴレッドで染色され、偏光顕微鏡下で緑色偏光を呈すること、電子顕微鏡観察で、幅 10 nm 程度で枝分かれのない線維構造が見られること、

X線回折や円二色性測定によってシート構造であること、などが共通の条件となっている。コンゴレッドと同様、チオフラビン T もシート構造を認識するとされ、アミロイド線維を染色する蛍光色素としてよく利用されているとともに、これらをリード化合物として、アルツハイマー型認知症の原因タンパク質アミロイド (A) ペプチドから成るアミロイド線維に選択的に結合する分子イメージングプローブが盛んに研究されている。特に、アルツハイマー病の脳アミロイド蓄積では、質的診断に優れた核医学イメージングにおいて有効なアミロイドイメージング剤の開発がされており、現在、PET 撮像の標準化と普及に向けた取り組みが行われている。一方、全身性アミロイドーシスでは、限局性に分類される脳アミロイドーシスと同様に原因タンパク質の臓器への沈着によって引き起こされているが、その確定診断は臨床症状が疑われた後、医師による組織学的所見に依って行われ、また、病型によっては遺伝子検査、血液検査、脳脊髄液検査が必要であるため、早期診断のみならず治療効果のモニタリング等を困難にしている。そのため、全身性アミロイドーシスを早期に診断するためのイメージング剤の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、全身性アミロイドーシスの早期診断、治療効果のモニタリングの達成を目的に、全身性アミロイドーシスに由来するアミロイド線維を認識する分子イメージングプローブを開発することにした。アミロイド線維は原因タンパク質がそれぞれで異なるが、アミロイド結合性化合物はシート構造というアミロイド線維の共通構造を認識するのみであり、原理的にはあらゆるアミロイドに対して結合すると考えられる。実際、古典的アミロイド結合性化合物であるコンゴレッドとチオフラビン T は多様なアミロイド線維に結合することが知られている。一方で申請者らは先行研究において、新規に合成したチオフラビン T 誘導体において、全身性に分類される血清アミロイド A (SAA) に由来する AA アミロイド線維とは反応しないことを

見出した。そこで、多様な全身性アミロイドーシスを早期診断するためには、古典的アミロイド結合性化合物の構造を保持した核医学イメージングプローブで全身性アミロイド線維の存在を一次スクリーニングし、それぞれのアミロイド線維に選択的な蛍光イメージングプローブを用いてどの全身性アミロイドーシスかを特定する、といった方法を考え(図 1)、多様な全身性アミロイド線維に一樣に結合する核医学イメージングプローブと、それぞれの全身性アミロイド線維に選択的に結合する蛍光イメージングプローブを開発することを計画した。

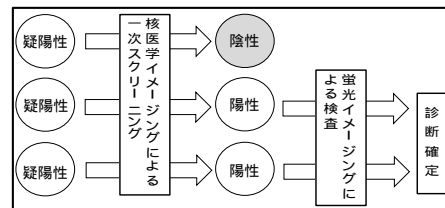


図 1

3. 研究の方法

(1) 核医学イメージングプローブの合成 (コールド体)

放射性核種としては放射性ヨウ素を選択し、チオフラビン T の構造に大きな影響がないようにベンゾチアゾール環にヨウ素原子を導入した化合物 1 を設計した。本研究では、全身性アミロイド線維を標的としていることから、ベンゾチアゾール環の窒素原子上のカチオンは残した。

(2) アミロイド線維への結合親和性評価

アミロイド線維としては、全身性アミロイドーシスに分類される AA アミロイド線維 (SAA 繊維) と限局性アミロイドーシスに分類される脳アミロイドーシスの A 繊維を用い、蛍光法によりそれぞれに対する結合親和性を評価した。

(3) 放射性ヨウ素標識化合物 [¹²⁵I]1 の合成

標識前駆体としてトリプチルスズ体を合成し、スズ ヨウ素交換反応により放射性ヨウ素標識を行った。

(4) 注射液中および血漿中での安定性

緩衝液またはマウス血しょう中に、放射性ヨウ素標識体 [¹²⁵I]1 を加えたのちに、37 °C でインキュベートし、経時的に HPLC にて化学形を分析することにより評価した。

(5) AA アミロイドーシスの病態モデルマウスにおける体内動態評価

ICR マウス (11 週齢) に amyloid enhancing factor (AEF) とフロイント完全アジュバントを混和した溶液を皮下投与することにより作製した AA アミロイドーシスの病態モデルマウスに [¹²⁵I]1 を静脈内投与し、その体内放射能分布を 6、24 時間後に臓器を摘出して評価した。コントロールとしては、AEF とフロ

イント完全アジュバントの代わりにPBSを皮下投与したマウスを用いた。

(6) Ex vivo オートラジオグラフィ

AA アミロイドーシスの病態モデルマウスに¹²⁵I]1を投与後、凍結切片を作製し、オートラジオグラフィとチオフラビンSによる蛍光染色を行った。

(7) 蛍光イメージングプローブの合成

チオフラビンTをベースに、側鎖を変えることによってそれぞれのアミロイド繊維に高い選択性を付与することを目的に合成を行った。

(8) 蛍光特性評価

得られた化合物について、蛍光特性（励起波長、蛍光波長、蛍光量子収率）の評価を行った。

(9) アミロイド繊維への結合親和性評価

アミロイド繊維としては、全身性アミロイドーシスのSAA繊維と限局性アミロイドーシスに分類される脳アミロイドーシスのA繊維を用い、蛍光法によりそれぞれに対する結合親和性を評価した。

4. 研究成果

(1) 核医学イメージングプローブの合成（コールド体）

化合物1は図2に従って行った。2-amino-5-bromobenzenethiolを出発物質として4-(dimethylamino)benzaldehydeとの縮環反応により定量的に2を得た後、(Bu₃Sn)₂を反応させ、スズ体3を収率50.2%で得た。次に、MeIを用いて4にメチル基を導入した4級アミン合成した後に、I₂との反応により定量的に化合物1を得た。

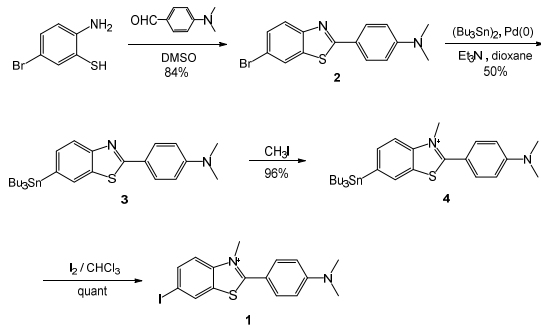


図2 化合物1の合成

(2) アミロイド繊維への結合親和性評価

化合物1はチオフラビンTと同様に蛍光性を示すことから、各アミロイド繊維に対する解離定数(Kd値)を蛍光法で評価した。その結果、化合物1は、A繊維に対して0.24 μM、SAA繊維に対して0.10 μMであり、ほぼ同様の結合親和性を示すことがわかった。

(3) 放射性ヨウ素標識化合物¹²⁵I]1の合成

放射性ヨウ素標識は、容易であり、その後

の分離精製が有利なスズヨウ素交換反応で行うこととし、標識前駆体4を用いて行ったが反応は全く進行しなかった。そこで、カチオン性化合物4のカウンターイオンをI⁻からOH⁻に変えたところ、酸化剤としてはN-クロロスクシンイミドを用いた条件において、放射化学的収率41%、放射化学的純度99%以上、比放射能2.2 GBq/μmol以上で¹²⁵I]1を得ることができた。

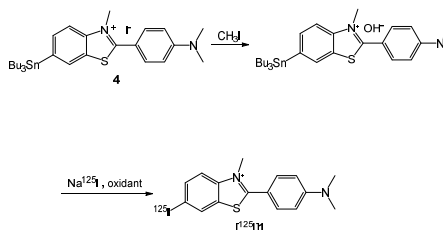


図3 放射性ヨウ素標識

(4) 注射液中および血漿中での安定性

¹²⁵I]1は注射液中およびマウス血しょう中において、24時間経過においてもほぼ壊れず高い安定性を示した。

(5) AA アミロイドーシスの病態モデルマウスにおける体内動態評価

病態モデルマウスでは、AAアミロイドーシスの好発部位である脾臓、腎臓、肝臓でコントロールの健常マウスより高い放射能集積が認められた(図4)。

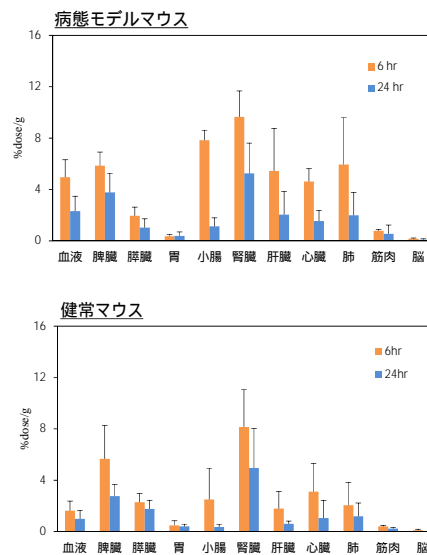


図4 ¹²⁵I]1の体内動態評価

(6) Ex vivo オートラジオグラフィ

AAアミロイドーシスの病態モデルマウスではオートラジオグラフィの集積部分とチオフラビンSによる蛍光部分がほぼ一致した。このことから投与した標識体が沈着したアミロイドに結合していることが考えられる。

(7) 蛍光イメージングプローブの合成

各種 *o*-aminothiophenol と benzaldehyde を DMSO 中で反応させ、化合物 2-7 を良好な収率で合成した(図 5)。また、化合物 7 のニトロ基の還元を行い、8 を収率 64% で合成した。

Compound	R ¹	R ²	Yield (%)
2	Br	N(CH ₃) ₂	55
3	Br	N(C ₂ H ₅) ₂	94
4	Br	NO ₂	31
5	H	N(CH ₃) ₂	52
6	H	N(C ₂ H ₅) ₂	47
7	H	NO ₂	60
8	H	NH ₂	64

図 5

(8) 蛍光特性評価

得られた化合物について、励起波長($E_{x_{max}}$)、蛍光波長($E_{m_{max}}$)、蛍光量子収率()の測定を行った(図 6)。化合物 2-7 の励起波長は 346-367 nm であり、蛍光波長は 422-430 nm であった。化合物 8 の蛍光波長は 410 nm であり、R² にアミノ基を導入することにより短波長シフトしたと考えられる。蛍光量子収率については、R² に電子供与性置換基を持つ 2,3,5,6,8 において高くなり、特に R¹ にプロモ基を持つ 1,2 は非常に大きな値を示した。一方、R² に強い電子求引基であるニトロ基をもつ化合物 4 と 7 では、蛍光が非常に弱くなった。

Compound	$E_{x_{max}}$ (nm)	$E_{m_{max}}$ (nm)	ϕ
2	346	430	0.75
3	372	429	0.80
4	359	430	0.04
5	359	422	0.59
6	359	424	0.37
7	367	423	0.07
8	346	410	0.37

図 6

(9) アミロイド繊維への結合親和性評価

化合物 2-8 と AA アミロイド線維または A 線維との親和性の指標となる解離定数(Kd 値)を蛍光法で評価した(図 7)。化合物 2,4,5,8 は A より SAA に対して高い結合親和性を示し、化合物 3,5,7 は SAA より A に対して高い結合親和性を示した。また蛍光スペクトルにおいて、R² にジアルキルアミノ基を持つ 2,3,5,6 は、SAA 線維と結合した場合は、極大蛍光波長が結合前と比べて約 20-40 nm 短波長側にシフトした(図 8)

	kd value (μM)	
	SAA	A
1	1.0	1.5
2	0.7	0.4
3	1.6	2.1
4	1.0	2.0
5	6.4	1.0
6	1.5	0.06
7	1.8	-

図 7

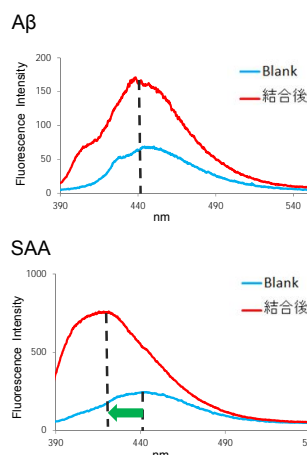


図 8 化合物 2 と A 線維または SAA 線維結合後の蛍光スペクトル変化

本研究では、A 線維と SAA 線維をモデル線維として用い、それぞれに同様に結合性を示す放射性ヨウ素標識体と、それぞれに異なる結合親和性と蛍光性を示す蛍光性イメージングプローブの開発を行った。以上の結果は、多様な全身性アミロイドーシスの早期診断のためのイメージングプローブとなり得る可能性を有していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- (1) M. Hagimori, Y. Shigemitsu, R. Murakami, K. Yokota, Y. Nishimura, N. Mizuyama, B.C. Wang, C.K. Tai, S.L. Wang, T.L. Shih, K.D. Wu, J.W. Lu, Z.S. Huang, S.C. Tseng, J.W. Lu, H.H. Wei, J. Nagaoka, T. Mukai, S. Kawashima, K. Kawashima, Y. Tominaga: 2-Pyridone-based fluorophores containing 4-dialkylamino-phenyl group: Synthesis and fluorescence properties in solutions and in solid state, *Dyes and Pigments*, **124**, 196-202 (2016) (査読有)
- (2) M. Hagimori, K. Yokota, A. Fukuda, Y. Nishimura, R. Satodani, B.C. Wang, H.H. Wei, S.L. Wang, Y. Shigemitsu, Y. Tominaga: Synthesis of indeno

[1,2-d]pyrimidin-5-ones and their fluorescence in solid state, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **53**, 414-420 (2016) (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 山内 健生、萩森 政頼、平野 優里、向 高弘：全身性アミロイドーシス診断を目指した放射性ヨウ素標識化合物の体内動態評価、第66回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016.10.15、大阪薬科大学(大阪府・大阪市)
- (2) 萩森 政頼、平野 優里、山内 健生、向 高弘：全身性アミロイドーシスの核医学イメージングを目指した放射性ヨウ素標識化合物の開発、第3回アミロイドーシス研究会学術集会、2015.8.21、KKRホテル(東京都・千代田区)
- (3) 船崎 彩、村本 華奈子、萩森 政頼、向 高弘：蛍光性ベンゾチアゾール誘導体の合成及びアミロイドタンパク質に対する選択性の評価、第65回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015.10.17、大阪大谷大学(大阪府・大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩森 政頼 (HAGIMORI, Masayori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：40446125