

平成30年6月20日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15142

研究課題名(和文)ハロゲン原子の特性に着目した繊維状タウタンパク質選択的PETプローブの開発

研究課題名(英文) Development of Novel Tau Protein-Binding Compounds Based on the Alkene-to-Chloroalkene Isosteric Switch Strategy

研究代表者

鳴海 哲夫 (Narumi, Tetsuo)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：50547867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：操作性に優れた凝集タウ選択的PET薬剤の創製を目的として、PBB3の共役ジエン構造にクロロアルケンを導入したクロロアルケン型誘導体ITY11-397の開発研究を行なった。その結果、2-クロロ-5-シアノピリジンから8工程で所望のITY11-397を合成に成功した。ITY11-397の光安定性を評価したところ、対応する水素体と比較して6倍以上光安定性が向上することを明らかにした。加えて、ITY11-397は蛍光試験によって2N3R型Tauに対して高選択的に結合することを見出した。これらの成果は、共役ポリエン構造を含む機能性分子の開発研の進展に資するものである。

研究成果の概要(英文)：As part of a program aimed at identifying the utility of haloalkene-containing molecules, synthetic and evaluation studies of chloroalkene-conjugated PBB3 derivative, ITY11-397, were performed for the development of novel tau-imaging PET tracers with improved operability. ITY11-397 was designed based on the alkene-to-chloroalkene isosteric switching strategy and can be prepared in 8 steps from 2-chloro-5-cyanopyridine. Evaluation study on the photostability revealed that the photostability of ITY11-397 is 6-fold higher than that of the corresponding unsubstituted compound. In addition, ITY11-397 showed higher binding selectivity to the 2N3R-type Tau protein. The main advantage of such chloroalkene-conjugated systems lies in their simple chemical modification, making possible the application of this strategy to various molecules with acyclic conjugated system(s), which should contribute to the development of photoresistant molecules with conjugated system(s).

研究分野：創薬化学、有機合成化学、ペプチド化学

キーワード：PET薬剤 タウタンパク質 神経原繊維変化 PBB3

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) は日本における認知症患者の約半数を占めており、発症原因の一つとして神経細胞内の微小管結合性タンパク質であるタウタンパク質 (Tau protein: Tau) が異常リン酸化されたのちにシート構造を構築した神経原線維変化 (Neurofibrillary tangles; NFTs) が挙げられる。

Gomez らによって報告された NFTs の増大に伴って神経脱落が起こるという知見から<sup>1</sup>, NFTs の脳内沈着を標識することが AD 早期発見に繋がると考えられている。現在、臨床研究が進められているタウイメージング用 PET 薬剤として、放射線医学総合研究所が開発した<sup>[11C]</sup>-PBB3 1 が挙げられる<sup>2</sup>。これまで<sup>[11C]</sup>-PBB3 1 は AD 患者を対象とした臨床研究で Tau 病変を好発する側頭葉内部への高いプローブ集積が観察されていることから、PBB3 1 はアルツハイマー病の早期発見に有用であると期待されていた。しかし、PBB3 1 は 379 nm の光を 1 分間照射すると容易に異性化を起こして PBB3 isomer 2 を生成し、放射線純度が 79% まで低下することが報告されているため<sup>3</sup>、合成操作から薬物投与までを暗所で行う必要があり、操作性の向上が求められている (図 1)。このため、高い光安定性を有しながら NFTs 標識能が高い新規タウイメージング剤の開発が現在求められている。

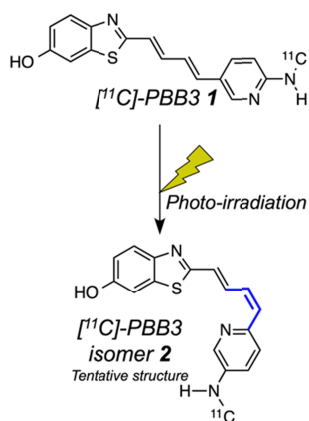


図 1. <sup>[11C]</sup>-PBB3 の光異性化。

## 2. 研究の目的

これまでに研究代表者らは、CYP の酸化的代謝に対する抵抗性を示すアルケン骨格を探索するために、サイクリックボルタンメトリーによって種々のアルケン誘導体の酸化電位を精査したところ、他の置換アルケン誘導体に比べ、クロロアルケン誘導体が顕著に高い酸化電位を有することを見出している。この知見をもとに、研究代表者らは PBB3 1 の共役ジエン構造にクロロアルケン骨格を導入することで、高い光感受性に由来する操作性を向上させ、さらに NFTs に結合可能な新規タウイメージング剤の開発を目的とし、

研究を実施した。

## 3. 研究の方法

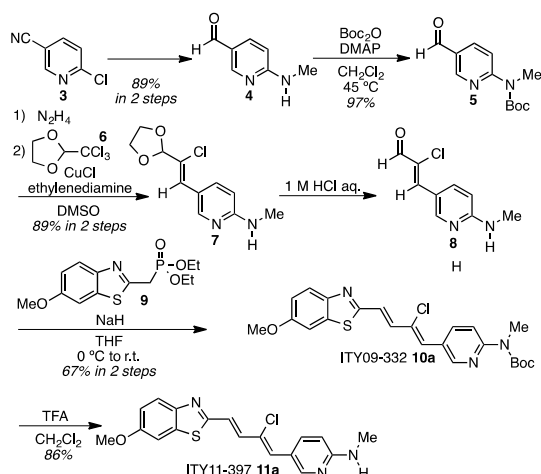
PBB3 は共役長の増加に伴い、HOMO-LUMO 間のエネルギー差が小さくなることで、光や酸化に対しては感受性となり、構造的に不安定になる。これは PBB3 の共役ジエン構造により形成された高い平面性によって容易に分子内電荷移動が起こると考え、共役ジエン構造 3 位に嵩高く、電子求引性基である塩素原子を導入することで、分子にねじれ構造を付与することで分子内電荷移動を抑制し、共役ジエン構造の電子密度を低下させることで化学的安定性が向上すると考えた。

そこで、PBB3 の共役ジエン部位にクロロアルケンを導入したクロロアルケン誘導体 ITY11-397 を設計・合成した。得られた Cl-PBB の光化学的特性をもとに、極大吸収波長付近の光を照射し、光安定性を速度論的に評価した。さらに合成した PBB3 誘導体のアミロイド β (Aβ) や Tau への結合選択性を蛍光試験によって精査した。ペプチドレベルの評価では、神経原線維変化や老人斑と同様の凝集形態取ることが明らかにされている Tau/ Aβ フラグメントペプチドを用いて蛍光試験を行った。フラグメントペプチドとして、Tau の 3R 領域 306-311 残基の 6 残基ペプチドから構成され、平行 β シート構造かつ Face-to-Face に凝集する AcPHF6 (Ac-VQIVYK-NH<sub>2</sub>), Aβ の 16-22 残基目で構成された 7 残基のペプチドで構成され、逆平行 β シート構造かつ Face-to-Face に凝集する Aβ フラグメントペプチド (Ac-KLVFFAE-NH<sub>2</sub>) を用いた。タンパク質全長レベルの評価では、42 残基のアミノ酸からなる Aβ42 および市販で購入可能な 410 残基のアミノ酸からなる 2N3R 型 Tau を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 共役ジエン構造に塩素原子を導入した PBB3 誘導体 ITY11-397 の合成

2-クロロ-5-シアノピリジン 3 を出発原料とし、既知法に従いアルデヒド 4 へと 2 工程 89% で誘導した。続いて、アルデヒド 4 に対して二炭酸ジ-tert-ブチルを作用させることで、N-Boc 保護体 5 を収率 97% で得た。アルデヒド 5 に対してヒドラジンを作用させたのちに、2-トリクロロメチル-1,3-ジオキサラン 6、塩化銅 ( ) およびエチレンジアミンを用いてジオキサラン 7 へと誘導した。さらに、塩酸を用いてアセタール加水分解を行ない、アルデヒド 8 を合成した。そして、別途調整したホスホン酸エステル 9 に水素化ナトリウムを作用させたのちに、合成したアルデヒド 8 を作用させることで、ITY09-332 10a を合成した。最後に、トリフルオロ酢酸で N-Boc 基を脱保護することで ITY11-397 11a を合成した (スキーム 1)。



**スキーム 1.** 共役ジエン構造に塩素原子を導入した ITY11-397 の合成

## (2) ITY11-397 の光照射に対する安定性

合成した共役ジエン構造に塩素原子を有する ITY09-332 **10a** と、それに対応する水素体: ITY08-298 **10b** に極大吸収波長付近の光を照射して、基質が 50% 分解されるまでに要する時間 ( $t_{50}$ ) を算出することで基質の光安定性を速度論的に評価した。水素体 **10b** の  $t_{50}$  は 180 秒であったのに対して、塩素体 **10a** の  $t_{50}$  は 1,200 秒となり、水素体と比較して 6 倍以上光安定性が向上することを明らかにした。

## (3) ITY11-397 の凝集タンパク質に対する結合選択性

### A $\beta$ フラグメントペプチドおよび Tau フラグメントペプチドでの評価

AD 発症の原因とされる凝集タンパク質には Tau が凝集した神経原線維変化とアミロイド  $\beta$  (Amyloid  $\beta$ : A $\beta$ ) が水素結合を介して  $\beta$ シート構造を形成した老人斑が挙げられる。そこで、前項までに合成した塩素置換体 ITY11-397 **11a** と、それに対応する水素体: ITY11-402 **11b** のアミロイド  $\beta$  (A $\beta$ ) や Tau への結合選択性を蛍光試験によって精査した。

ITY11-402 **11b** のみを溶解させた 3-モルホリノプロパン-1-スルホン酸緩衝液に対し、A $\beta$  フラグメントペプチドを添加したところ、緩衝液の蛍光強度は 1.5 倍の増大に止まった。一方で、同じく水素体 **11b** を溶解させた緩衝液に Tau フラグメントペプチドを添加した結果、蛍光強度が 3.6 倍まで増大したことから水素体 **11b** は PBB3 と同様に Tau への選択的結合能を有していること、PBB3 の水酸基をメトキシ基に置換しても Tau/ A $\beta$  への結合選択性は保持されることが示唆された。続いて、塩素置換体 ITY11-397 **11a** を溶解させた MOPS 緩衝液に A $\beta$  フラグメントペプチドを添加して緩衝液の蛍光強度を測定したところ、1.2 倍の増大に止まった。一方で、塩素置換体 **11a** の緩衝液に Tau フラグメントペプチ

ドを添加したところ、その蛍光強度は 4.6 倍まで増大したことから塩素置換体 **11a** は Tau に対して選択的結合能を有していることを明らかにした。

## A $\beta$ 42 および 2N3R 型 Tau での評価

この結果から、ITY11-402 **11b** が Tau に対して選択的に結合することが明らかになった。同様にして、塩素置換体 ITY11-397 **11a** のリン酸緩衝液に A $\beta$ 42 を添加して蛍光強度を測定した結果、蛍光強度は 1.2 倍に止まった。一方で、ITY11-397 **11a** の HEPES 緩衝液に 2N3R 型 Tau を添加すると蛍光強度は 5.1 倍増大した。この結果から、ITY11-397 **11a** は ITY11-402 **11b** と同様に 2N3R 型 Tau に対して選択的結合能を示した。

ITY11-402 **11b** を溶解させたリン酸緩衝液に 42 残基のアミノ酸からなる A $\beta$ 42 を添加したのちに培養し、添加前の緩衝液と蛍光強度を比較した結果、1.2 倍の増大に止まった。一方で、ITY11-402 **11b** を溶解させた 2-[4-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-1-イル]エタンスルホン酸 (HEPES) 緩衝液に 2N3R 型 Tau を添加したのちに培養し、その蛍光強度を添加前の緩衝液と比較すると、2.2 倍の蛍光強度の増大が見られた。これらの結果から、ITY11-402 **11b** は Tau に対して選択的に結合することが明らかになった。そこで、同様に蛍光試験により ITY11-397 **11a** の A $\beta$ 42 や 2N3R 型 Tau に対する選択的結合能を検討した。ITY11-397 **11a** を溶解させたリン酸緩衝液に A $\beta$ 42 を添加したのちにその蛍光強度を測定した結果、A $\beta$ 42 を添加前の緩衝液と比較して蛍光強度の増大は 1.2 倍に止まった。一方で ITY11-397 **11a** を溶解させた HEPES 緩衝液に 2N3R 型 Tau を添加すると蛍光強度が 5.1 倍増大したことから ITY11-397 **11a** は ITY11-402 **11b** と同様に 2N3R 型 Tau に対して選択的結合能を示した (表 1)。これらの結果から、共役ジエン構造の 3 位に塩素原子を導入しても Tau/ A $\beta$  への結合選択性は変化しないことが明らかになった。

表 1. ITY11-397 および ITY11-402 の蛍光試験による A /Tau 結合選択性の評価

| Compd      | Experiment No. | Fold Increase (FI) <sup>a</sup> |                                     |
|------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|
|            |                | FI <sub>2N3R tau</sub>          | FI <sub>A<math>\beta</math>42</sub> |
| <b>11a</b> | ITY11-397      | <b>5.1</b>                      | 1.2                                 |
| <b>11b</b> | ITY11-402      | 2.2                             | 1.2                                 |

<sup>a</sup> Fold Increase = fluorescence intensity of the probe bound to tau fibrils (or A $\beta$ )/fluorescence intensity of the probe (unbound, free).

## < 引用文献 >

- Gomez-Isla, T.; Hollister, R.; West, H.; Mui, S.; Growon, J. H.; Petersen, R. C.; Parisi, J. E.; Hyman, B. T. *Ann. Neurol.* **1997**, *41*, 17-24.  
 Maruyama, M.; Shimada, H.; Suhara, H.; Ji, B.; Maeda, J.; Zhang, M. R.; Trojanowski,

J. Q.; Lee, V. M.; Ono, M.; Masamoto, K.; Takano, H.; Sahara, N.; Iwata, N.; Okamura, N.; Furumoto, S.; Kudo, Y.; Chang, Q.; Saido, T. C.; Takashima, A.; Jang, M. K.; Aoki, I.; Ito, H.; Higuchi, M. *Neuron* **2013**, 79, 1094-1108.

Hashimoto, H.; Kawamura, K.; Igarashi, N.; Takei, M.; Fujishiro, T.; Aihara, Y.; Shiomi, S.; Muto, M.; Ito, T.; Furutsuka, K.; Yamasaki, T.; Yui, J.; Xie, L.; Ono, M.; Hatori, A.; Nemoto, K.; Suhara, T.; Higuchi, M.; Zhang, M. R. *J. Nucl. Med.* **2014**, 55, 1532-1538.

## 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 4件)

Microwave-Assisted Synthesis of Azacoumarin Fluorophores and the Fluorescence Characterization. Takano, H.; Narumi, T.; Nomura, W.; Tamamura, H. *J. Org. Chem.* **2017**, 82, 2739-2744. (査読有り)

The role of chemisorption for push-pull chromophores on SiO<sub>2</sub> surfaces in non-electrically poling host-guest NLO polymers. Sugita, A.; Ito, K.; Sato, Y.; Suzuki, R.; Sato, K.; Narumi, T.; Mase, N.; Takano, Y.; Matsushita, T.; Tasaka, S.; Kawata, Y. *J. Photochem. Photobiol., A: Chem.* **2017**, 340, 35-45. (査読有り)

Tuning the Catalyst Reactivity of Imidazolylidene Catalysts through Substituent Effects on the N-Aryl Groups. Kyan, R.; Sato, K.; Mase, N.; Watanabe, N.; Narumi, T. *Org. Lett.* **2017**, 19, 2750-2753. (査読有り)

Synthesis of a self-assembling gold nanoparticle-supported organocatalyst for enamine-based asymmetric aldol reactions. Soti, P. L.; Yamashita, H.; Sato, K.; Narumi, T.; Toda, M.; Watanabe, N.; Marosi, G.; Mase, N. *Tetrahedron* **2016**, 72, 1984-1990. (査読有り)

### 〔学会発表〕(計 10件)

今井智之, 佐藤浩平, 間瀬暢之, 渡辺修治, 鳴海哲夫. アミド結合等価性に着目した新規アミロイド結合性化合物の創製研究. 日本薬学会第 138 年会(金沢). 2018 年.

今井智之, 佐藤浩平, 間瀬暢之, 渡辺修治, 鳴海哲夫. 高い光安定性を有する新規タウタンパク質イメージング剤の創製研究. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2017. 2017 年.

鳴海哲夫, ペプチドミメティックを基

盤とする創薬研究. 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2017. 2017 年.

Narumi, T. Exploring the amide-to-alkene isosteric switch strategy in peptide science. 第 54 回ペプチド討論会. 2017 年.

Imai, T., Sato, K., Mase, N., Narumi, T. Development of novel amyloid  $\beta$  peptide-binding compounds based on the alkene-to-amide isosteric switch strategy. 第 54 回ペプチド討論会. 2017 年.

Narumi, T. Exploring the amide-to-alkene isosteric switch strategy in peptide-based drug discovery. International Postgraduate Symposium in Biotechnology 2017 (IPSB2017). 2017 年.

Imai, T., Narumi, T. Synthesis and Chemical Stability of Photolysis and Oxidation Reaction of Chloroalkene-Containing PBB3 Analogue for Tau Imaging. International Postgraduate Symposium in Biotechnology 2017 (IPSB2017). 2017 年.

今井智之, 佐藤浩平, 間瀬暢之, 渡辺修治, 鳴海哲夫. タウイメージングを指向したクロロアルケン骨格含有 PBB3 誘導体の合成と光安定性の評価. 日本薬学会第 137 年会(仙台). 2017 年.

Imai, T., Chiba, T., Sato, K., Mase, N., Watanabe, N., Narumi, T. Synthesis and Chemical Stability of Photolysis and Oxidation Reaction of Chloroalkene-Containing PBB3 Analogue for Tau Imaging. 第 53 回ペプチド討論会. 2016 年.

今井智之, 佐藤浩平, 間瀬暢之, 渡辺修治, 鳴海哲夫. 含塩素共役ジエン化合物の合成と化学的安定性の評価. 第 62 回日本薬学会東海支部大会. 2016 年.

### 〔図書〕(計 2件)

Narumi, T., et al., *Peptide Science 2017*, I. Fujii (Ed.), The Japanese Peptide Society, "Exploring the amide-to-alkene isosteric switch strategy in peptide science", and "Development of novel amyloid  $\beta$  peptide-binding compounds based on the alkene-to-amide isosteric switch strategy", 印刷中, 2018

Narumi, T., et al., *Peptide Science 2016*, K. Akaji (Ed.), The Japanese Peptide Society, Synthesis and Chemical Stability of Photolysis and Oxidation Reaction of Chloroalkene-Containing PBB3 Analogue for Tau Imaging, 2017, 49-50.

### 〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：凝集タンパク質の検出に適した化合物  
発明者：鳴海哲夫，今井智之，佐藤浩平，間瀬暢之  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許願 2017-147991 号  
出願年月日：平成 28 年 7 月 31 日  
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://wvp.shizuoka.ac.jp/tenarumi/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鳴海 哲夫 (Narumi, Tetsuo)

静岡大学・工学部・准教授

研究者番号：50547867

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )