

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15655

研究課題名(和文) 脳内ユビキチン陽性病変のイメージングを目的としたPET用HDAC6プローブの開発

研究課題名(英文) Development of PET probes for HDAC6 imaging

研究代表者

多胡 哲郎 (Tago, Tetsuro)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：50780649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳内ヒストンデアセチラーゼ6(HDAC6)の画像化のための、PET用プローブ開発を目的とした。まずこれまでに開発した18F-標識ツバスタチンA類縁体についての評価を実施した。癌細胞を使用した結合性試験や、マウスにおける脳内取り込み試験を行った結果、本化合物は高いHDAC6選択的結合性を示した一方、脳内移行性に乏しいことが明らかとなった。そこで脳移行性の報告されているSW-100をシードとした新規18F-標識体の合成に着手した。ボロン酸前駆体と銅触媒を使用し、目的とする標識中間体が最大60%ほどの18F-化効率で得られることが分かり、現在は自動合成装置による合成最適化を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴い発症率の増加するパーキンソン病などの神経変性疾患は、日本のような超高齢化社会において喫緊の課題であると言えるが、根本的治療法はまだ開発されていない。治療法開発のためにも、正確な鑑別診断技術や治療効果の測定方法の確立が重要である。

ヒストンデアセチラーゼ6(HDAC6)は細胞質に存在するタンパク質の脱アセチル化を担う酵素であるが、神経変性疾患の脳内において蓄積するタンパク質病変の形成に関与することが明らかとなっており、神経変性疾患の治療標的として注目されている。本研究が開発を目指すHDAC6のPETイメージング技術は、このHDAC6標的治療薬の開発を促進することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we radiosynthesized and evaluated an 18F-labeled analog of tubastatin A, a histone deacetylase 6 (HDAC6) selective inhibitor, for in vivo HDAC6 imaging with positron emission tomography (PET). The 18F-labeled analog demonstrated a high HDAC6 selectivity in a cancer cell uptake study. Meanwhile, a brain uptake study in mice revealed a poor blood-brain barrier permeability of the 18F-labeled analog, suggesting a limitation for studies into neurodegenerative diseases.

We also started radiosynthesis of an 18F-labeled analog of SW-100, which is a brain penetrant HDAC6 inhibitor. Using a boronic acid precursor and Cu catalyst, the 18F-intermediate was obtained with a non-isolated radiochemical yield of 60%. Automation of the radiosynthesis is currently underway.

研究分野：放射性医薬品科学

キーワード：PET HDAC6 ユビキチン 分子イメージング 核医学 放射性医薬品

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴い発症リスクの上昇するアルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患は、日本のような超高齢化社会においては喫緊の課題であると言えるが、根本的な治療法はまだまだ存在しない。病理学的にはこれら神経変性疾患には脳内において異常なタンパク質病変の形成が認められるという共通点があり、アルツハイマー病ではアミロイド やタウ、パーキンソン病では シヌクレイン、筋萎縮性側索硬化症では TDP-43 といったように、蓄積するタンパク質の種類や部位が各疾患を特徴づけている。各タンパク質病変は臨床的な症状の表れる数～十数年以上前から脳内に蓄積し始めており、従ってその蓄積を予防、除去することが出来れば、これら神経変性疾患の根本的治療につながると考えられる。

ヒストンデアセチラーゼ 6 (HDAC6) はヒストンなどのタンパク質の脱アセチル化を担う酵素群である HDAC ファミリーの一つのサブタイプである。HDAC6 は他のサブタイプとは異なり、核内ではなく主に細胞質に局在している点、脱アセチル化活性中心が 2 つある点、ユビキチン結合ドメインを有しておりポリユビキチン化されたタンパク質を分解が行われる封入体に運ぶ役割も持つ点などの特徴がある。結果として、ユビキチン陽性である シヌクレインなどの病変には HDAC6 も共同在していることが剖検脳標本を使用した病理学的な研究からも明らかとなっている (*Neuropathology* 2011;31:561)。従って HDAC6 は神経変性疾患の脳内におけるタンパク質病変の形成に関与していると考えられ、神経変性疾患の新しい治療標的として注目されている (*Mol Neurodegener* 2013;8:7)。

タンパク質病変を標的とした治療法の効果判定には、生体内における病変の形成を検出・定量できる技術が必要であるが、その一つとして、病変選択的に結合する放射性標識薬剤(プローブ)を使用したポジトロン断層撮像法 (PET) がある。開発されたプローブの多くは低分子化合物であり、各タンパク質凝集体のクロス シート構造の違いを認識し、選択性を獲得している。AD の A 病変のイメージング研究が最も進んでいるが、タウの PET プローブの開発も近年相次いで報告されており、A とタウのイメージングによる AD の早期確定診断法が確立される日は近いと言える。以上の流れを受け、シヌクレインや TDP-43 の PET プローブ開発へ注目が集まっているが、いまだ有望なプローブの報告はない。

2. 研究の目的

本研究課題では、PET によるユビキチン陽性病変イメージングのための脳内 HDAC6 プローブ開発を目的とする。そのために、脳内移行性を有する HDAC6 選択的阻害剤の放射性標識法を確立し、続いてその生物学的評価により PET 用 HDAC6 プローブとしての有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者はこれまでに、HDAC6 選択的阻害剤であるツバスタチン A (*J Am Chem Soc* 2010;132:10842) をシード化合物とした ^{18}F -標識化合物の開発を行っている (図 1、 ^{18}F 1)。本研究では ^{18}F 1の生物学的評価を行い、その脳内 HDAC6 イメージングプローブとしての有用性を評価した。

^{18}F 1の脳移行性評価として、マウスにおける小動物用 PET 試験を実施した。ddY マウス(雄、8週齢、1群4匹)の尾静脈から、シクロスポリン A 注射液 (25 mg/kg) または同容量の生理食塩水を投与し、30分後にマウスを麻酔にかけた状態で ^{18}F 1の注射液 (17.7 ± 1.6 MBq) を投与した。投与後 60 分間の PET 撮像を行い、脳内の時間-放射能曲線や積算画像の作成を行った。結果を比較し、 ^{18}F 1の脳移行性や P 糖蛋白質阻害の影響を評価した。

^{18}F 1の HDAC6 選択的結合性の評価として、A549 ヒト肺癌細胞を使用した細胞取り込み試験を実施した。 1×10^5 cells/0.5 mL の濃度で 48 ウェルプレートに A549 細胞を接種し、2日間培養を行った。各ウェルの培地を除去後に、 ^{18}F 1のメディウム溶液を 125 μL (74 kBq) 阻害剤のメディウム溶液を 125 μL ずつ添加し、37 °C で 60 分間インキュベートした。培地を除去後、0.5 mL 冷 PBS で 3 回洗浄を行い、0.2 M NaOH (0.25 mL) で細胞を溶解、回収し、各ウェルの放射能を測定した。阻害剤無添加のウェルにおける放射能を 100% とし、阻害曲線を描き IC50 値を算出した。

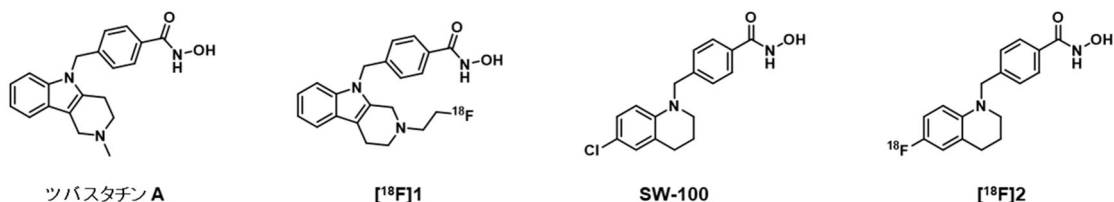


図1. HDAC6阻害剤と ^{18}F -標識体の化学構造

(2) テトラヒドロキノリン誘導体である SW-100 は脳移行性を有する HDAC6 選択的阻害剤である (ACS Chem Neurosci 2019;10:1679)。研究代表者は SW-100 をシード化合物とした ^{18}F -標識類縁体を設計し、本化合物の標識合成を行った (図2、 ^{18}F 2)。

^{18}F 2 の非放射性標品と標識前駆体の合成を行った。非放射性標品の合成について、6-フルオロ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリンと 4-(プロモメチル)安息香酸メチルを結合させた後に、50% ヒドロキシルアミンと水酸化ナトリウムのメタノール溶液と反応させ、目的物を合成した。また標識前駆体であるボロン酸エステル体については、6-クロロ-1,2,3,4-テトラヒドロキノリンと 4-(プロモメチル)安息香酸メチルを結合させた後に、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 存在下でビス(ピナコラト)ジボロンと反応させ、目的物を合成した。

ボロン酸エステル体を前駆体とし、銅触媒存在下での ^{18}F -化反応の最適化を行った。乾燥させた ^{18}F KF/ K_2CO_3 /Kryptofix 222 と前駆体を、 $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ 存在下で加熱し反応させた。反応溶液を radio-TLC で分析し、 ^{18}F -標識効率を算出した。

4. 研究成果

(1) ^{18}F 1 の生物学的評価

^{18}F 1 の脳移行性評価として、P 糖タンパク質阻害条件下マウスにおける小動物用 PET 試験を実施した (図2)。結果、コントロール条件においては ^{18}F 1 はマウスの脳にほぼ取り込まれず、投与後 60 分までの取り込み量は standardized uptake value (SUV) にして 0.2 以下であった。一方で P 糖タンパク質阻害条件としてシクロスポリン A を事前投与したマウスにおいても、 ^{18}F 1 の脳内取り込み量は $\text{SUV} < 0.2$ であり、従って ^{18}F 1 は P 糖タンパク質の基質ではないと示唆された。

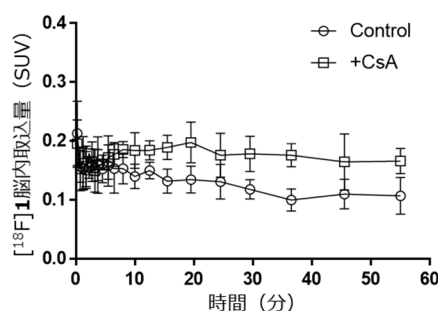


図2. ^{18}F 1 の時間-放射能曲線 (○: コントロール; □: シクロスポリンA投与)

^{18}F 1 の HDAC6 選択的結合性の評価として、ヒト肺癌細胞への取り込みに対する HDAC6 選択的阻害剤や HDAC8 選択的阻害剤を使用した

阻害実験を行った。HDAC6 選択的阻害剤であるツバスタチン A や ACY-1215 は ^{18}F 1 の細胞への取り込みを濃度依存的に阻害し、 IC_{50} 値はそれぞれ 31.0 nM、86.2 nM であった。一方で HDAC8 選択的阻害剤である PCI-34051 による取り込み阻害は認められず、 IC_{50} 値は $>2,000$ nM であった。以上より ^{18}F 1 は高い HDAC6 選択的結合性を有していることが示唆された。

(2) ^{18}F 2 の標識合成

^{18}F 2 の非放射性標品は原料から 2 段階の反応により合成できた (収率: 約 80%)。ボロン酸エステル前駆体は原料から 2 段階の反応により合成できた (収率: 約 70%)。

ボロン酸エステル前駆体と銅触媒を使用し、 ^{18}F -化反応の最適化を行った (図3)。乾燥させた状態の ^{18}F KF/ K_2CO_3 /Kryptofix 222 (30-100 MBq/0.36 mg/1.71 mg) に前駆体 (5.0 mg) と $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ (3.6 mg) の DMF 溶液 (500 μL) を添加し、110 $^\circ\text{C}$ で 20 分間反応させたところ、約 40% の ^{18}F -標識効率を得られた。一方で反応溶媒を最適化した結果、DMF の代わりに DMA を使用することで、同様な反応条件で約 60% の ^{18}F -標識効率を得られることが明らかとなった。

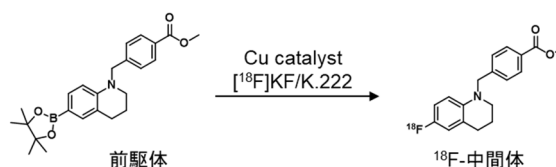


図3. ^{18}F -中間体の ^{18}F -標識反応スキーム

(3) まとめ・今後の展望

本研究では脳内 HDAC6 の PET によるイメージングを目的に HDAC6 プロープの開発を行った。まずツバスタチン A 類縁体である ^{18}F 1 の評価の結果、HDAC6 選択的結合性は高いことが明らかとなったが、血液脳関門透過性に乏しく、神経変性疾患を対象とした研究に用いることは難しいと結論付けられた。そこで新たな HDAC6 プロープ候補として、血液脳関門透過性が報告されている SW-100 の類縁体の ^{18}F -標識体の合成に着手した。非標識標品やボロン酸前駆体は比較的容易に合成でき、また銅触媒を使用した ^{18}F -化も十分な収率で進行することが明らかとなった。現在は自動合成装置を使用した ^{18}F 2 の標識合成条件最適化を進めており、続けて生物学的評価も実施していく予定である。 ^{18}F 2 が脳内 HDAC6 のイメージングプロープとして有用であることが示されれば、HDAC6 を標的とした研究や治療薬開発が促進され、将来的な神経変性疾患の克服に寄与すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tago T, Toyohara J, Sengoku R, Murayama S, Ishii K	4. 巻 44
2. 論文標題 Monoamine Oxidase B Binding of 18F-THK5351 to Visualize Glioblastoma and Associated Gliosis: An Autopsy-Confirmed Case	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 507-509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/RLU.0000000000002564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tago T, Toyohara J, Harada R, Furumoto S, Okamura N, Kudo Y, Takahashi-Fujigasaki J, Murayama S, Ishii K	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Characterization of the binding of tau imaging ligands to melanin-containing cells: putative off-target-binding site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Nuclear Medicine	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12149-019-01344-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tago Tetsuro, Toyohara Jun, Ishii Kenji	4. 巻 63
2. 論文標題 Radiosynthesis and preliminary evaluation of an 18F-labeled tubastatin A analog for PET imaging of histone deacetylase 6	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 85 ~ 95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jlcr.3823	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tago, T., Toyohara, J., Ishii, K
2. 発表標題 Preliminary biological evaluation of radioligands for PET imaging of histone deacetylase 6
3. 学会等名 EANM'18（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tago, T., Toyohara, J., Ishii, K
2. 発表標題 Radiosynthesis and preliminary biological evaluation of a 18F-labeled probe for histone deacetylase 6 PET imaging
3. 学会等名 The 10th China-Japan-Korea Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 多胡哲郎
2. 発表標題 F-18化学
3. 学会等名 PET化学ワークショップ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多胡哲郎、豊原潤、石井賢二
2. 発表標題 HDAC6イメージングを目的とした18F-標識ツバスタチンA類縁体の標識合成と生物学的評価
3. 学会等名 第14回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多胡哲郎
2. 発表標題 F-18
3. 学会等名 PET化学ワークショップ
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----