

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19390316

研究課題名（和文） アルツハイマー病の早期診断用シナプス前コリン作動性神経分子イメージング剤の開発

研究課題名（英文） Development of pre-synaptic cholinergic nervous system imaging agent for Alzheimer's disease early diagnosis

研究代表者

柴 和弘 (SHIBA KAZUHIRO)

金沢大学・学際科学実験センター・教授

研究者番号：40143929

研究成果の概要（和文）：

我々はアルツハイマー病と最も関係が深いとされるコリン作動性神経系に着目し、その中でも前シナプスに存在するアセチルコリントランスポーター(VAChT)の可視化が可能な分子イメージング剤の開発研究を行った。ベサミコールを基本骨格として、我々は新規に *o*-methylvesamicol(OMV)やシクロデカリンを有する trans-decalin-vesamicol(DV) 4-フェニルピペリジンのオルト位にヨウ素を導入した trans-decalin-*o*-iodovesamicol(DOIV)の合成を行った。[¹¹C]OMV や [¹²⁵I]DOIV はトリメチルスズ体を前駆体として、クロスカップリング反応により、いずれも放射化学的収率 30-50%,放射化学的純度 >99% で得られた。学習障害モデルサルを使って [¹¹C]OMV の脳内動態を調べた結果、コリン作動性神経系に障害のある部位で [¹¹C]OMV の有意な集積減少が見られた。しかし、OMV はシグマ受容体にも親和性を示し、VAChT 選択性は高いとは言えなかった。そこで、シグマ受容体への親和性を抑えるために DOIV を合成し、薬物阻害実験により、VAChT, シグマ受容体 (σ -1, σ -2) に対する親和性を調べた。その結果、OMV やベサミコールに比べて VAChT に対する高親和性、 σ 受容体に対する低親和性を示したことから、VAChT に対して高親和性・高選択性を有することがわかった。動物実験においても、ベサミコール同時投与により、脳集積が顕著に減少することから、[¹²⁵I]DOIV は脳内の VAChT に選択的に結合していることが分かった。以上のことより、[¹¹C]OMV の VAChT イメージング剤としての可能性、さらに VAChT に対する選択的結合性に優れた [¹²⁵I]DOIV の VAChT イメージング剤並びにアルツハイマー病の早期診断薬の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have tried to develop a molecular imaging agent of acetylcholine transporter (VAChT) for Alzheimer's disease early diagnosis, because biochemical changes of the presynaptic cholinergic system have been related to the pathogenesis of Alzheimer's disease. We synthesized (-)-[¹¹C]-methylvesamicol((-)-[¹¹C]OMV) and radioiodinated trans-decalin-*o*-iodovesamicol(DOIV) as new acetylcholine transporter imaging agents. (-)-[¹¹C]OMV binding in the ipsilateral cortex to the lesion was significantly reduced by $22.0 \pm 6.7\%$ compared with that in the contralateral region in kinetics study using disability model monkeys produced by selectively destroying the p75NTR-positive cells in the right hemisphere of the brain. DOIV exhibited in vitro a highest affinity for VAChT among our vesamicol analogs synthesized previously. These results suggested that (-)-[¹¹C]OMV may be useful in the study of dementia characterized by degeneration of the cholinergic neurotransmitter system. Furthermore, radioiodinated DOIV may be superior to (-)-[¹¹C]OMV as VAChT imaging agent.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	9,500,000	2,850,000	12,350,000

研究分野：放射性医薬品化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：アセチルコリントランスポーター、分子イメージング、SPECT、PET

1. 研究開始当初の背景

21世紀を向かえ、益々高齢化社会が進みつつある我が国では、高齢者特有の疾患である認知症、特にアルツハイマー病の早期診断・治療及び予防が重要になってくる。我々は認知性疾患の中でも特にアルツハイマー病に着目し、アルツハイマー病の早期診断を目的とした脳内分子イメージング剤の開発を目指している。アルツハイマー病を客観的に診断するには、アルツハイマー病の病理学的変化や神経化学的变化を鋭敏に捉える放射性核種(RI)標識分子イメージング剤の開発が必要である。最近、アルツハイマー病の比較的初期から見られる老人斑の原因物質であるβ-アミロイド蛋白を描画するイメージング剤の研究が注目を集めている。しかし、アルツハイマー病の症状と老人斑の数が相関しないという報告や脳内での選択的β-アミロイド蛋白結合性に問題があるとされており、まだ多くの課題が残っている。アルツハイマー病の神経化学的变化としてはアセチルコリン神経系が注目されている。これまでに、アセチルコリンエステラーゼ(ChE) (アセチルコリン分解酵素) を描画するイメージング剤の研究が行われてきた。これは代謝型トレーサーであり、ChE活性(数及び強さ)に反映してイメージングするものであり、ChE活性に反映したイメージングが得られるとされている。しかし、これらの代謝型トレーサーは一般的に不安定であり、血中での分解が速いことが課題とされている。以前より、アルツハイマー病ではコリン作動性神経系の変化が注目されてきたが、その中でもシナプス前コリン作動性神経系の変化が早期の段階から大きいと言われている。そのため、アルツハイマー病を早期の段階で発見するにはシナプス前コリン作動性神経系を画像化する分子イメージング剤を開発することが重要と考えられる。これまでに、シナプス前終末部のシナプス小

胞膜に存在するVACHTを画像化する分子イメージング剤の研究が米国を中心として数多く研究されてきた。我々もSPECT用の放射性ヨウ素標識(-)-*o*-ヨードベサミコール((-)-*o*IV)を開発し、アルツハイマー病モデル動物で前頭皮質や側頭皮質に有意な減少が見られることを示し、その有用性を報告してきた。しかし、いずれのVACHT用分子イメージング剤もシグマ受容体(シグマ受容体は老化に伴いその数が増加すると言われている)にも高い親和性を有し、その結果、早期の段階でのVACHTの変化をうまく捉えることができないと考えられた。そこで、VACHTに高い親和性を示すと共に、シグマ受容体への親和性の低い新しいVACHT用分子イメージング剤の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究ではアルツハイマー病の初期の段階から変化があるとされるシナプス前コリン作動性神経系を画像化する分子イメージング剤としてベサミコールを基本骨格とする*o*-methylvesamicol (OMV)やシクロデカリンを有するtrans-decalin-vesamicol (DV)の4-フェニルピペリジンのオルト位にヨウ素を導入したtrans-decalin-*o*-iodovesamicol (DOIV)の開発をめざした。[¹¹C]OMVはPET用の分子イメージング剤として、PETの優れた分解能や定量性を活かしたアルツハイマー病診断薬として可能性を調べた。また、以前に我々が報告した[¹²⁵I]oIVの欠点であったシグマ受容体への親和性の低いVACHT用分子イメージング剤の開発を目指して、放射性ヨウ素標識DOIVの合成及びインビボ評価を行った。最終的には、アルツハイマー病の客観的な早期診断法を確立し、複雑かつ複合的原因から発症すると考えられているアルツハイマー病の将来的な治療指針予測の可能性についての基礎的資料を提供することを目指した。

3. 研究の方法

1) (-)-OMV の合成及び標識

(-)-OMV の合成、 ^{14}C -標識化は以前に我々が報告した方法で行った。すなわち、オルトプロモベンズアルデヒドを出発原料として、グリニャー反応、Claizen-Schmidt 縮合、環化、ジボラン還元、光学分割等を経て、(-)-OMV を合成した。 ^{14}C -標識はトリメチルスズ体 (OSnV) と ^{14}C - CH_3I とのクロスカップリング反応で、自動合成装置により合成した。

2) (-)- ^{14}C -OMV のインビボ評価

アカゲザルの脳の右側を一側性にマイネルト核を破壊した学習障害モデルザルに (-)- ^{14}C -OMV (745 MBq) を投与し、投与後から 90 分間 PET による撮像を行った。関心領域 (ROI) を線条体、前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質、小脳に置いてデータを集積した。測定結果は SUV で評価した。

3) DOIV の合成及び標識

オルトプロモベンズアルデヒドを出発原料として、(-)-OMV の合成と同様の方法で合成を行った。DOIV の合成の場合には、シクロヘキセンオキシドの代わりに trans-decaline-2,3-oxide を用いた。 ^{125}I -標識はトリメチルスズ体と ^{125}I - NaI のスズ-ヨウ素置換反応により行った。すなわち、トリメチルスズ体、 ^{125}I - NaI (37MBq) をギ酸存在下、過酸化水素水を加え、室温下、20 分間攪拌後、二亜硫酸ナトリウム水溶液とアンモニア水と処理した。Sep-Pak-C18 カートリッジを通してエタノール溶出を行い、これを HPLC (Zorbax RX-C18, 4.6 mm x 250 mm, アセトニトリル:水:エタノールアミン=90:10:0.2) を用いて精製することにより、 ^{125}I -DOIV を得た。

4) DOIV のインビトロ評価

合成した DOIV の VACHT 親和性及びシグマ受容体 ($\sigma-1$ 、 $\sigma-2$) 親和性を調べるためにインビトロ薬物阻害実験を行った。

① ラット脳・肝臓組織の試料調製

SD ラット脳及び肝臓ホモジナイズの核分画を取り除いた後、超遠心機 (55,000 × g、60 分間) により、シナプスを多く含む P2, P3 分画を得た。

② VACHT, シグマ受容体親和性

ラジオリガンドとして、VACHT 親和性用に 10nM [^3H] vesamicol、 $\sigma-1$ 受容体用に 5nM [^3H] pentazocine、 $\sigma-2$ 受容体用に 5nM [^3H] DTG を用いた。DOIV を含む調査薬物は 10^{-5} ~ 10^{-10}M の 10 種類の濃度で調べた。反応は 37°C で行い、反応時間は VACHT で 60 分、シグマ受容体で 90 分とした。データはグラフパッドソフトにより行い、親和性の強さを

Ki 値で評価した。

5) DOIV のインビボ評価

SD ラット (230 g - 280 g) に ^{125}I -DOIV (185 kBq) を投与した。投与後 60 分後に屠殺し、血液、線条体、大脳皮質、小脳、その他の脳部位を摘出し、放射能をオートガンマカウンター (Aloka, 7010) で測定した。測定結果は %dose/g で評価した。

4. 研究成果

1) (-)-OMV の合成及び標識

(-)-OMV はオルトプロモベンズアルデヒドを出発原料として、10 行程で通算収率約 4% で合成できた。また、(-)- ^{14}C -OMV の標識合成は OSnV と ^{14}C - CH_3I とのクロスカップリング反応により、HPLC 精製後で、放射化学的収率約 36%、放射化学的純度 98% 以上、比放射能約 11TBq/mmol で標識できた。

2) (-)- ^{14}C -OMV のインビボ評価

学習障害モデルザルに (-)- ^{14}C -OMV を投与し、PET の時間-放射能曲線を図-1 に示す。脳の障害部位である右側と正常部位である左側では明らかに (-)- ^{14}C -OMV の放射能集積に違いが視覚的に観察できる。また、右脳 (障害部) と左脳 (正常部) の線条体、前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質の放射能集積を SUV 値で評価し、それぞれ比較した。その結果を表-1 に示す。右脳の大脳皮質の SUV は左脳の大脳皮質と比較すると、右脳の前頭葉、側頭葉及び後頭葉で $27.5 \pm 2.7\%$ 、 $19.3 \pm 2.2\%$ 、 $14.6 \pm 3.2\%$ 、左脳に比べて減少していた。

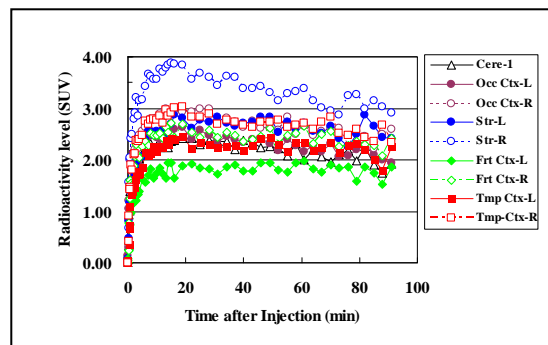


図-1 学習障害モデルザルにおける (-)- ^{14}C -OMV の時間-放射能曲線

表-1 学習障害モデルザル脳の障害側と健常側の (-)- ^{14}C -OMV 集積比

	健常側	障害側
前頭葉	100	72.5
側頭葉	100	80.7
後頭葉	100	85.4
線条体	100	76.0

このことから、(-)-[¹¹C]OMV はシナプス前コリン作動性神経変化を鋭敏に捉える PET 用分子イメージングであると考えられた。

3) DOIV の合成及び標識

DOIV はオルトプロモベンズアルデヒドを出発原料として、7 行程で通算収率約 14% で合成できた。構造は NMR, Mass 等による確認している。[¹²⁵I]DOIV の標識合成は decalin-o-Stannylvesamicol (OSnDV) と [¹²⁵I]NaI とのスズ-ヨウ素置換反応により、HPLC 精製後で、放射化学的収率約 30~50%、放射化学的純度 99% 以上で標識できた。

4) DOIV のインビトロ評価

DOIV、decalin-vesamicol (DV) 及び vesamicol (VES) の VAcHT 親和性、シグマ受容体 (σ -1、 σ -2) 親和性を図-2 及び表-2 に示す。DOIV は vesamicol より VAcHT に対して高い親和性を示した。また、シグマ受容体 (σ -1、 σ -2) に対する親和性は vesamicol よりも低く、VAcHT に対する選択的親和性が高いことがわかった。

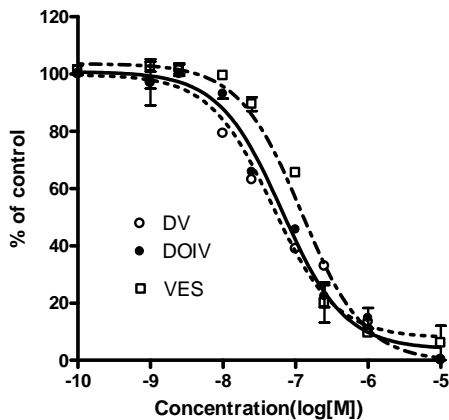


図-2 VAcHT 親和性

表-2 VAcHT, シグマ受容体に対する親和性

	Ki (nM)		
	VAcHT	σ -1	σ -2
DOIV	23.8	235	93.1
DV	15.9	45.3	58.2
VES	44.4	19.4	77.9

5) DOIV のインビボ評価

[¹²⁵I]DOIV は投与後 60 分におけるラット血液中での放射能は 0.08 %dose/g と低いことが分かった。ラット脳の各部位での集積は線条体が最も高く、1.61 %dose/g であった。大脳皮質は 0.14 %dose/g、小脳は 1.43 %dose/g であった。また、これらの集積は vesamicol 同時投与により、阻害されることから、インビボでの [¹²⁵I]DOIV の脳集積分布は VAcHT の脳内分布に反映したものであることがわか

る。以上のことから、放射性ヨウ素標識 DOIV は SPECT 用の優れた VAcHT 分子イメージング剤であり、シナプス前コリン作動性神経変化を鋭敏に捉えることができると考えられた。

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)

1. Shiba, K., Nishiyama, S., Tsukada, H., Ishiwata, K., Kawamura, K., Ogawa, K., Mori, H.: The potential of (-)-o-[¹¹C]methyl vesamicol for diagnosing cholinergic deficit dementia. Synapse Vol.63 (2009), 167-171, 査読有

2. Akhter, N., Shiba, K., Ogawa, K., Tsuji, S., Kinuya, S., Nakajima, K and Mori, H.: A Change of in Vivo Characteristics Depending on Specific Activity of Radioiodinated (+)-2-[4-(4-iodophenyl)piperidino] cyclohexanol [(+)-pIV] as a Ligand for Sigma Receptor Imaging. Nucl. Med. Biol. Vol.35 (2008), 29-34, 査読有

3. Waarde, AV., Shiba, K., de Jong, JR., Ishiwata, K., Dierckx, RA and Elsinga, PH.: Rapid Reduction of σ 1-Receptor Binding and 18F-FDG Uptake in Rat Gliomas After In vivo Treatment with Doxorubicine. J Nucl. Med. Vol. 48 (2007), 1320-1326, 査読有

4. Kawamura, K., Tsukada, H., Shiba, K., Tsuji, C., Harada, N., Kimura, Y and Ishiwata, K.: Synthesis and evaluation of fluorine -18-labeled SA4503 as a selective sigma1 receptor ligand for positron emission tomography. Nucl. Med. Biol. Vol. 34 (2007), 571-577, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 小坂孝史、鶴野いずみ、北村 陽二、小川結加、太田朱音、小川数馬、柴 和弘: vesamicol 類縁体 0-iodo-trans-decalinvesamicol (OIDV) の新規 VAcHT イメージング剤としての可能性 日本薬学会第 131 年会 2011 年 3 月 28 日~31 日 静岡県立大学 (静岡県)

2. 柴 和弘: 脳の機能及び脳疾患の診断と分子イメージング 北陸原子力懇談会 2011 年 3 月 17 日 金沢都ホテル (石川県)

3. 柴 和弘: 「PET 及び SPECT 用インビボ分子イメージング剤の開発研究-脳神

経機能の可視化を目指してー」2009年11月24日、富山大学生命科学先端研究センター学術セミナー（富山県）

4. 柴 和弘：「アルツハイマー病の早期診断を目的とした放射性医薬品研究の展望」金沢大学市民公開講座ー市民のための放射能・放射線の話ー、2009年9月6日、金沢大学サテライトプラザ（石川県）

5. Shiba. K : Ligand for vesicular acetylcholine transporter. 2009 BIO INTERNATIONAL CONVENTION” (BIO2009) . 2009.5.18-21, Georgia World Congress Center (USA)

6. N. Akhter, K. Shiba, K. Ogawa, S. Tsuji, K. Nakajima, S. Kinuya, H. Mori; Depending on Species Specificity Influence of Difference Metabolic Function in the Biodistribution of Radiolabeled Sigma Ligand as the Tumor Seeking Agent. 38th Annual Scientific Meeting of the Australian and New Zealand Society of Nuclear Medicine 2008. 1-6 May, 2008 Conrad Jupiters (Australia)

7. N. Akhter, K. Shiba, K. Ogawa, S. Tsuji, K. Nakajima, S. Kinuya, H. Mori; Influence of different metabolic function by the species specificity in the biodistribution of radiolabeled sigma ligand as a tumor seeking agent. 55th SNM Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine. 14-18 June, 2008 New Orleans Convention Center (USA)

8. 柴 和弘, トランスポーター分子イメージングを利用した脳神経変性疾患の早期診断法に関する研究. トランスポーター研究会北陸地方部, 2007年9月29日 小杉文化ホール（富山県）

9. Akhter. N, Shiba. K, Ogaw. K, Kinuya. S, Nakajima. K and Mori. H : In-vivo characteristics of high and low specific activity radioiodinated (+)-2-[4-(4-iodophenyl) piperidino] cyclohexanol [(+)-pIV] for imaging sigma-1 receptor in brain. INTERNATIONAL CONFERENCE ON RADIOPHARMACEUTICAL THERAPY (ICRT-2007) 2007.9.3-7, Ulaanbaatar (Mongolia)

10. Shiba. K, Ogawa. K, Torashima. T, Hirai. H, Akhter. N, Kinuya. S, Mori. H : Potential usefulness of the D2R reorter gene imaging by IBF as a gene therapy

monitoring for cerebellar disorder. 54th SNM annual meeting of the Society of Nuclear Medicine. 2007.6.2-6, Washington Convention Center (USA)

11. Kawamura. K, Tsukada. H, Shiba. K, Tsuji. C, Harada. N, Kimura. Y, Ishiwata. K : ¹⁸F-labeled SA4503 as a selective signal receptor ligand for PET. A preconference Summer School to BRAIN07 and BRAINPET07, under the auspices of the International Society for Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2007.5.17-19, Translational Research Informatics Center (Hyogo)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴 和弘 (SHIBA KAZUHIRO)

金沢大学・学際科学実験センター・教授

研究者番号：40143929