

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19689002

研究課題名（和文） アルツハイマー病の次世代型画像診断手法の開発

研究課題名（英文） Development of Imaging technique for Alzheimer's disease

研究代表者

山田 健一（YAMADA KENICHI）

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：60346806

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病は進行性の神経変性疾患であり、認知障害などを引き起こす。その原因の一つとして、アミロイドβ(Aβ)の過剰蓄積による神経細胞死が考えられている。しかしながら、生体内での毒性発現メカニズムは未だ明確でない。そこで、本研究では新たな Aβ 結合ニトロキシラジカルを開発し、Aβ 凝集塊の検出とその凝集過程の解析を行うことを目的とした。Aβ 結合ニトロキシラジカルは、6-methoxybenzothiazoleaniline から合成した。蛍光と ESR 解析の結果、合成した化合物は、Aβ に結合することがわかった。また、ESR スペクトル変化から、その凝集過程を解析することに成功した。さらに、この Aβ 認識ニトロキシラジカルは、抗酸化効果を有することを示した。以上の知見は、新規ニトロキシラジカルが、Aβ を認識し、ESR を用いて凝集過程を評価できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Alzheimer's disease is most common neurodegenerative disorder, which is characterized by progressive memory deficit, cognitive impairment and personal changes. The main pathogenesis is thought extracellular deposits of a short peptide referred to as amyloid β (Aβ), which is major component of the plaque. However, the molecular mechanism for Aβ aggregation process is not well defined. Herein, the aim of this study was to develop new Aβ binding nitroxide to detect fibrils and understand an aggregation process. Aβ binding nitroxide was designed from 6-methoxybenzothiazoleaniline. Fluorescence and ESR spectroscopic analysis demonstrated that the nitroxide banded to Aβ fibrils. Further, we succeeded in detecting of fibrillization process by analyzing the change of ESR spectrum. Another advantage of Aβ binding nitroxide was an antioxidant effect. These findings indicated that new nitroxide can detect Aβ fibrils and evaluate an aggregation process with ESR spectroscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	18,900,000	5,670,000	24,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：アミロイド、フリーラジカル、磁気共鳴、ニトロキシラジカル

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、現在国内に約 100 万人もの罹患者がおり、今後 20 年間で高齢化が進むと共に増加すると考えられる最も重要な疾患の一つである。アルツハイマー病の発症メカニズムは未だ確立してないものの、1990 年代後半に、病理学的特色として、特定の蛋白・ペプチドがアミロイド繊維を形成し脳内に蓄積することで、老人斑と呼ばれる細胞外アミロイドがほぼ全症例に出現することが報告された(Giannakopoulos, P. et al. *Brain Res Rev.* 25:217, 1997)。したがって、脳内アミロイドはアルツハイマー病の診断と治療における究極のターゲットと考えられている。このアミロイド蛋白は、凝集し蓄積しない形でもその直接的な神経毒性の他に、フリーラジカル化ペプチド (Murakami, K. et al. *JACS.* 127: 15168, 2005)として脂質過酸化を引き起こす。また、活性化ミクログリアからのフリーラジカルの産生 (Colin, K. et al. *J Neurosci.* 21:1179, 2001)や、アミロイド蛋白凝集部位とその近傍には鉄が蓄積し、フェントン反応によるフリーラジカルの生成などが報告され、フリーラジカルが神経細胞毒性を引き起こし、より重篤な障害に導くと考えられている。すなわち、アミロイド蛋白からのフリーラジカルの生成を抑制できれば、その後の治療的側面や予後を改善できると期待されている。

我々は、これまで生体丸ごとでのフリーラジカル生成を画像解析する手法の開発、並びに酸化ストレス疾患のメカニズム解明や抗酸化物質の創出などの研究を行ってきた。さらに造影剤であるニトロキシラジカルの窒素核を 14 あるいは 15 で標識したニトロキシラジカルを合成し、それぞ

れの ESR 共鳴磁場を選択的に励起させることで、性質の異なる造影剤の生体内同時分離画像解析が可能であることを示してきた。一方で、ニトロキシラジカルの不対電子密度を変えることで様々なフリーラジカルとの反応性を制御できるのではないかとの発想から、新たな「ニトロキシラジカル合成法」の開発に着手している。

したがって、造影剤であるニトロキシラジカルの反応性を制御し、アミロイド蛋白結合化合物で修飾することができれば、アミロイド蛋白に特異的な造影剤と、フリーラジカル反応を抑制する治療的側面を併せ持つ化合物を創出できる可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

脳内に蓄積したアミロイド蛋白 (A) の神経毒性発現メカニズムのひとつとして、フリーラジカルペプチドによる脂質過酸化や、A 凝集過程での過酸化水素の生成、抗酸化剤による A 凝集抑制性作用などが報告され、疾患の発症にフリーラジカルの関与が示唆されている。しかし、生体内に蓄積した A 周辺でのフリーラジカル動態やレドックス変動は不明であり、その毒性発現解明には生物個体での評価が急務である。ニトロキシラジカルは、フリーラジカル等と高い反応性を有し、磁気共鳴装置の造影剤として利用できる。しかしながら、これらニトロキシラジカルは、反応特異性などの点で課題があった。

そこで本研究では、脳内蓄積 A とレドックス変動の詳細な解析に向け、A 蛋白認識ニトロキシラジカルを新たに合成し、その評価を行うことを目的とし以下 3 点を大目標とした。

- 1) アミロイド蛋白結合・フリーラジカル感受性ニトロキシラジカルの開発
- 2) 細胞レベルでの結合能、抗酸化能の検討
- 3) 疾患モデル動物レベルでの評価

### 3. 研究の方法

ニトロキシラジカルのラジカル周囲の置換基を修飾するために、代表的なニトロキシラジカルである TEMPO の前駆化合物 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone (triacetoneamine; TAA) の 3,5 位が活性であることに注目した。我々は、この活性メチレンがケトン化合物とアルドール縮合を起こし、続いて、Grobs fragmentation に類似したペペリジン環の開裂後、アンモニアが付加すると同時に環が再形成されるといった仮説を立てた。原料に、種々のケトン化合物と  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を加え、DMSO 溶媒中、種々の条件下で反応させ、得られた 2,6-置換ピペリドン誘導体を  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{Na}_2\text{WO}_4$  を用いて酸化することで、2,6 位置換 TEMPO 誘導体を得ることに成功した。また、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  の代わりに  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を用いることで、高純度で  $^{15}\text{N}$  を含有する 2,6 位置換  $^{15}\text{N}$ -TEMPO 誘導体を合成した。

A 結合ニトロキシラジカルは、上記手法を応用しリード化合物を設計した。ピペリジン環にカルボキシル基を、あるいは BTA 骨格にトリメチルアンモニウム基を有する化合物を合成した。また、ピペリジン環の 2 位に A 結合構造を導入した。合成した化合物は、蛍光、及び  $P_{o/w}$  を測定した。

A 結合能は、Levine の方法に従い、凝集塊と各化合物をインキュベート後、上清を分取し、蛍光分析法を用いて算出した。同様に ESR にて、A との結合能を評価した。

凝集抑制能は、A と各化合物をインキュベート後、Thioflavin T 溶液を加え、蛍光強度を測定し、評価した。また、凝集過程における ESR スペクトル変化をシミュレーション解析した。

画像解析は、合成した化合物を造影剤とし

て、オーバーハウザー効果 MRI を用いて行った。

### 4. 研究成果

TAA に cyclohexanone や tetrahydro-4H-pyran-4-one などのケトン化合物を反応させることで、容易に TEMPO 系ニトロキシラジカルの 2,6 位を置換することに成功した。一方、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を用いると、 $^{15}\text{N}$  で標識された高純度の TEMPO 誘導体を得ることができた。以上の結果から、この反応は、原料中の環の窒素が外来の塩化アンモニウムの窒素によって置き換わり、アンモニアが付加することが示唆された。また、簡便に高純度  $^{15}\text{N}$ -TEMPO 誘導体を得られ、高感度画像化のための造影剤としても利用できることが示された。一方、ピペリジン系ニトロキシラジカルの 2,6 位置換体は、アスコルビン酸に対する反応性が全く異なることがわかった。テトラエチル基を有するニトロキシラジカルは、アスコルビン酸とほとんど反応せず、オーバーハウザー効果 MRI などの造影剤としても利用可能であった。さらに興味深いことに、ニトロキシラジカルのラジカル周囲を修飾することで、酸化還元電位が変化することがわかり、反応特異性を制御できることが示された。そこでこの手法を応用し、A 結合ニトロキシラジカルの合成に着手した。2-Amino-6-methoxy-benzothiazole を出発原料とし、BTA を基本骨格とした A 認識化合物を 5 種類合成した。

合成した化合物は、いずれの化合物も Thioflavin T-A 凝集塊の蛍光と重ならないことが分かった。また、 $P_{o/w}$  は化合物間で大きく異なった。さらに、今回合成した A 蛋白認識ニトロキシラジカルは、基本骨格の BTA と同様の  $\text{ex}354 \text{ nm}$ 、 $\text{em}435 \text{ nm}$  で蛍光を示した。

次に、A 結合能を評価したところ、いずれの化合物も濃度依存的に結合量が増加した。A 結合能には、化合物の疎水性が関与し、水溶性が増すと、凝集塊との疎水性相互作用が減少すると考えられる。さらに、ESR

を用いて凝集塊との相互作用を観察したところ、凝集塊の ESR スペクトルでのみ線形が異方性を示した。これは、凝集塊との結合により、ニトロキシルラジカルの運動性が低下したためと考えられる。さらに、シミュレーションの結果から、ESR スペクトルが 3 つの成分の重ね合わせで、同一化合物が異なる環境場に存在すること、すなわち、A が異なる 3 つの環境場に存在することが示唆された。さらに興味深いことに、A のインキュベーション時間変化と共に ESR スペクトル成分比が変化した。また、抗酸化剤であるクルクミンの添加はこの変化を抑制した。一方、ニトロキシルラジカルを A と同時にインキュベートすると、A 凝集塊形成を抑制することを電子顕微鏡を用いて明らかにした。

また、PC-12 細胞を A (25-35) にて処理後、ニトロキシルラジカルを添加し X-band ESR 測定を行った。その結果、carboxy-TEMPO では A 処置群でも対照群と比較して変化がないのに対し、新規化合物添加群では A 処置によりシグナル消失速度が有意に亢進することがわかり、細胞レベルでも A による酸化ストレス変化を捉えることができた。そして、ニトロキシルラジカルは、磁気共鳴法を用いて脳機能を鋭敏にとらえることができ、特に、ミトコンドリアでの機能異常と関連性があることを明らかにした。

以上の結果より、今回新たに合成したニトロキシルラジカルは、A の凝集を有意に抑制し、A 結合能と抗酸化作用の両方が併せ持つことがわかった。今後、さらに研究を進めることによって、生体におけるレドックス動態や A 凝集状態をより詳細に解析できると考えている。

## 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9件)

1. Sakai, K., Yamada, K., Yamasaki, T., Kinoshita, Y., Mito, F., Utsumi, H. Effective 2,6-substitution of piperidine nitroxyl radical by carbonyl compound. *Tetrahedron* 66:2311-2315, 2010. 査読有
2. Benial, AM., Utsumi, H., Ichikawa, K., Murugesan, R., Yamada, K., Kinoshita, Y., Naganuma, T., Kato, M. Dynamic nuclear polarization studies of redox-sensitive nitroxyl spin probes in liposomal solution. *J. Magn. Reson.* 204(1):131-8. 2010. 査読有
3. Yamato M, Kudo W, Shiba T, Yamada KI, Watanabe T, Utsumi H. Determination of reactive oxygen species associated with the degeneration of dopaminergic neurons during dopamine metabolism. *Free Radic. Res.* 44(3):249-57., 2010. 査読有
4. Yamato, M., Shiba, T., Yamada, K., Watanabe, T., and Utsumi, H. Noninvasive assessment of the brain redox status after transient middle cerebral artery occlusion using Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29(10): 1655-1664., 2009. 査読有
5. Kinoshita, Y., Yamada, K., Yamasaki, T., Sadasue, H., Sakai, K., and Utsumi, H. Development of novel nitroxyl radicals for controlling reactivity with ascorbic acid. *Free Radic. Res.* 43: 565-571., 2009. 査読有
6. Yamato, M., Shiba, T., Yamada, K., Watanabe, T., and Utsumi, H. Separable detection of lipophilic- and hydrophilic-phase free radicals from the ESR spectrum of nitroxyl radical in transient MCAO mice. *Free Radic. Res.* 43: 844-851., 2009. 査読有
7. Yamada, K., Kinoshita, Y., Yamasaki, T., Sadasue, H., Mito, F., Nagai, M., Matsumoto, S., Aso, M., Suemune, H., Sakai, K., and Utsumi, H. Synthesis of nitroxyl radicals for Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging. *Arch. Pharm.*

- (Weinheim) 341: 548-553., 2008. 査読有
8. Kudo, W., Yamato, M., Yamada, K., Kinoshita, Y., Shiba, T., Watanabe, T., and Utsumi, H. Formation of TEMPOL-hydroxylamine during reaction between TEMPOL and hydroxyl radical: HPLC/ECD study. *Free Radic. Res.* 42: 505-512., 2008. 査読有
  9. Shiba, T., Yamato, M., Kudou, W., Ichikawa, K., Yamada, K., Watanabe, T., and Utsumi, H. Analysis of nitroxyl spin probes in mouse brain by X-band ESR with microdialysis technique. *J. Pharm. Sci.* 97: 4101-4107., 2008. 査読有

〔学会発表〕(計15件)

1. Yamada, K., Sakai, K., Utsumi, H. Synthesis of 2,6-disubstituted and 15N-labeled TEMPO Derivatives. *EPR2008: A Joint Conference of 13<sup>th</sup> In Vivo EPR Spectroscopy and Imaging 10<sup>th</sup> International EPR Spin Trapping/Spin Labeling.* Sep. 28-30, 2008, Fukuoka.
2. Kinoshita, Y., Yamada, K., Sadasue, H., Yamasaki, T., Sakai, K., and Utsumi, H. Stability Evaluation for 2,6-substituted TEMPO Derivatives in the Reduction Process. *SPIN 2008: 5<sup>th</sup> International Conference on Nitroxide Radicals.* Sep. 7-11, 2008, Ancona, Italy.
3. Sadasue, H., Yamasaki, T., Yamada, K., Sakai, K., and Utsumi, H. Synthesis and Evaluation of Novel Nitroxyl Radicals binding to amyloid beta protein. *The 4<sup>th</sup> JSPS core-to core Program Seminar International In Vivo Redox Symposium.* Nov. 4-5, 2007, Shizuoka.
4. 山田健一、「生体内フリーラジカル反応の可視化に向けた新規ニトロキシラジカルの開発」, 第61日本酸化ストレス学会学術集会、2008年6月19~20日、京都
5. 山田健一、「オーバーハウザー効果MR

Iを用いた生体内レドックス変動の画像解析」, ナノICTシンポジウム、nano tech 2008、2008年2月13~15日、東京

6. 山田健一、「オーバーハウザー効果MRIによる生体内レドックスの可視化」, 第7回日本抗加齢医学会総会、「先端技術を応用した活性酸素研究の現状と将来」シンポジスト 2007年7月20~21日、京都

〔産業財産権〕  
出願状況(計1件)

名称：ニトロキシラジカルの合成法  
発明者：内 英雄、酒井 浄、山田 健一  
権利者：国立大学法人九州大学  
種類：特許権  
番号：PCT/JP2008/051899  
出願年月日：2008年1月30日  
国内外の別：国外

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：

6. 研究組織

(1)研究代表者  
山田 健一 (YAMADA KENICHI)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：60346806

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：