

平成21年 5月25日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790867  
 研究課題名（和文） アルツハイマー病の超早期診断に向けた脳内βセクレターゼイメージング薬の開発  
 研究課題名（英文） Development of a brain β-secretase imaging probe for the very early detection of Alzheimer's disease  
 研究代表者  
 河嶋 秀和（Kawashima Hidekazu）  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：70359438

研究成果の概要：アルツハイマー病(AD)の超早期診断を目指し、Aβペプチド産生の律速酵素であるβセクレターゼ(BACE)を標的とした分子プローブの開発を試みた。hydroxylethylamine dipeptide isoster 誘導体(HEA)を母体とする放射性ヨウ素標識化合物([<sup>125</sup>I]-HEA)を新規に合成、評価した結果、本化合物は脳内BACEに結合することがin vivoで示唆された。したがって、HEA骨格がBACEイメージング薬としての基本的性質を有することが示された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

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：アルツハイマー病、βセクレターゼ、分子イメージング、放射性医薬品

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病(AD)の罹患者数は高齢化社会の到来に伴い急増しており、介護者負担だけでなく医療行政や医療経済の面からも深刻な社会問題となっている。近年では治療薬の開発も進められつつあることから、AD早期における客観的診断基準の確立が強く望まれているものの、臨床からの期待に応えられるレベルで本疾患の病理像が診断に活用されている例は少ない。

(2) AD患者の脳には特徴的な病理像である老人斑(Aβプラーク)を認め、その形成初期段階において高い毒性を示すことが記憶や認知機能障害に深く関与すると示唆されている。すなわち、老人斑の主成分であるアミロイドβペプチド(Aβペプチド)はアミロイド前駆タンパク(APP)からβセクレターゼ(BACE)、γセクレターゼによって順次切断されることにより産生し、これらが凝集することで老人斑を形成する。切断酵素のうちBACEはAβ産生における律速酵素であり、AD脳にて生ずる一連のイベントの最上流に位置することから、本疾患病理像を解明する上で

注目されている。さらに、AD 患者剖検脳を用いた検討において、BACE のタンパク発現量および活性の増加が報告されている。

(3) これまでに開発されてきている *in vivo* 画像診断薬は、既に形成された老人斑、およびそれ以降のイベント(グリア細胞の浸潤に伴う炎症反応の惹起、神経伝達機能の変化、神経細胞死等)を対象としているが、AD の病態をより明瞭にするためには本疾患のさらに根幹から病理を追跡することが重要と考える。

## 2. 研究の目的

本研究では、AD の治療および臨床診断における BACE の定量評価に資する放射性分子イメージングプローブの創製を目的とする。すなわち、BACE への結合性を有し、同時に核医学診断に適した放射性核種を有する低分子化合物を合成するとともに、BACE イメージング薬としての有用性を基礎的に検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 新規プローブは、docking study から得られる結合自由エネルギーの指標である PMF スコアをもとに分子設計した。BACE は分子内の 2 つのアスパラギン酸残基を介した協奏反応により、基質である APP を切断する。その際の遷移状態にある APP を模倣した構造を有する BACE 阻害剤が幾つか報告されているが、これらは BACE に対する高い親和性を有していると考えられる。そこで本研究では、高い BACE 阻害活性 ( $IC_{50}=10$  nM) を有する hydroxyethylamine dipeptide isoster 誘導体 (HEA) の、*N*-[(1*S*,2*R*)-1-benzyl-3-(cyclopropylamino)-2-hydroxypropyl]-*N'*-[(1*R*)-1-(4-fluorophenyl)ethyl]-5-[methyl(methyl-sulfonyl)amino]isophthalamide (F-HEA) の構造を母核して選択した(図 1)。

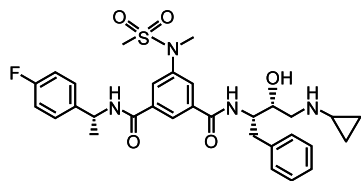


図 1 F-HEA の構造式

本骨格の分子内に SPECT 診断に適した I-123 を導入することを目指し、ヨウ素誘導体について、CACHe の docking program である BioMedCACHe (ver. 6.1, Fujitsu) を用いた BACE とのドッキングシミュレーションを行った。BACE の三次元構造は Protein Data Bank より入手し (code no. 2b8l)、結合部位は阻害剤分子から 5 Å 以内にある残基と定義した。2b8l の構造から水分子と阻害剤を抜き取った後、BACE と化合物の間の PMF スコアを計算した。

(2) (1) で検討したヨウ素誘導体の中で、最も高い BACE 親和性が期待できた *N*-[(1*S*,2*R*)-1-benzyl-3-(cyclopropylamino)-2-hydroxypropyl]-*N'*-[(1*R*)-1-(4-iodophenyl)ethyl]-5-[methyl(methylsulfonyl)amino]isophthalamide (I-HEA) を合成した。また、放射性ヨウ素 (I-125) 標識体 ( $[^{125}I]$ I-HEA) の合成は、アルキルスズ-放射性ヨウ素交換反応の後、縮合反応を行う二段階反応にて行った。

(3) 合成した I-HEA の BACE 阻害活性は、BACE1 FRET Assay Kit (PANVERA) を用いて測定した。すなわち、BACE に切断されると蛍光を発する BACE 基質との競合反応により、I-HEA、F-HEA、ペプチド性 BACE 阻害剤 OM99-2 の BACE 阻害活性を測定した。

(4) BACE を遺伝子導入した HEK293 細胞および正常 HEK293 細胞を 37°C の HEPES 緩衝液 (pH 7.4) で洗浄した後、HEPES 緩衝液にて希釈調製した  $[^{125}I]$ I-HEA (37 kBq/1 ml) を添加し、37°C でインキュベートした。2, 5, 15, 30 分後に緩衝液を除去し、2 回洗浄した。細胞溶解液 (1% Triton X-100 含有 0.3 N 水酸化ナトリウム水溶液) を加えた後に溶液を回収し、細胞内に集積した放射能を測定した。BCA 法によりタンパク定量を行い、細胞数による取込み率の補正を行った。

(5) 各 3 ml の 1-オクタノールと 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) が入った試験管に  $[^{125}I]$ I-HEA 溶液 (111 kBq/20  $\mu$ l) を加え、1 分間  $\times$  3 回のボルテックスの後、20 分間室温で放置する操作を 3 回繰り返す、1,000 g で 5 分間遠心分離した。各層から 500  $\mu$ l ずつを採取した後、それぞれの放射能を測定し、1-オクタノール/緩衝液の放射能比から分配係数を求めた。

(6) ペントバルビタール麻酔下、雄性 SD ラット (9 週齢、250 g) の左総頸動脈より、37 kBq の  $[^3H]$  水と 37 kBq の  $[^{125}I]$ I-HEA を混合した生理食塩水 200  $\mu$ l を投与した。投与 15 秒後に断頭、投与と同側の脳皮質 (側頭部) を速やかに摘出した。組織片をアルカリ処理で溶解後、酢酸で中和した。液体シンチレーション用カクテルを加えた後、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。また、投与した混合溶液の一部を液体シンチレーションカウンターにて測定し、下式により Brain Uptake Index (BUI) を算出した。

$$BUI (\%) = \frac{[^{125}I \text{ in brain}] / [^3H \text{ in brain}]}{[\text{Injected } ^{125}I] / [\text{Injected } ^3H]} \times 100$$

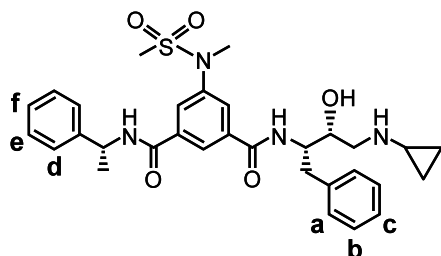
(7) 雄性 ddY マウス (6 週齢) に  $[^{125}I]$ I-HEA (8.7 MBq) を尾静脈より投与し、2, 5, 15, 30, 60 分後に経時的に屠殺した。血液を採取し、全脳を摘

出した後、組織重量、放射能を測定し、放射能の分布を% ID/g にて算出した。

(8) 雄性 SD ラット(3 週齢)に 9.25 MBq の  $^{125}\text{I}$ -I-HEA を尾静脈より投与し、10 分後に脳を摘出し、ドライアイス-ヘキサンで凍結後、厚さ 20  $\mu\text{m}$  の組織切片を作製した。この組織切片を検量線とともにイメージングプレートに 3 日間露光させ、得られた画像から、大脳皮質における単位組織重量あたりの放射能集積を定量した。また、BACE 阻害剤 (BACE Inhibitor IV, Calbiochem) 0.5 mg を同時に静脈内投与し、 $^{125}\text{I}$ -I-HEA の脳集積性の変化を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 研究代表者は、過去の検討において、PMF スコアが酵素の阻害活性に相関する可能性を示しており、PMF の値が低いほど結合安定性が高いと予想される。このことから、PMF スコアを指標として、提示する HEA において最も高い結合親和性が期待されるヨウ素導入部位を決定した。BioMedCACHe により、図 2 に示す構造中 a~f の部位にヨウ素を導入した化合物と BACE とのドッキングシミュレーションを行い、PMF スコアを算出した結果、f の位置にヨウ素を導入した化合物が最も低い数値を示し、BACE 親和性が期待された。したがって、ここにヨウ素を導入した化合物、I-HEA を BACE イメージングプローブの候補として選択した。



PMF Score of Candidates	
Position of Iodide	PMF Score
F-HEA	-101.09
-----	
a	-26.75
b	20.38
c	-44.89
d	-26.75
e	-1.42
<b>f (I-HEA)</b>	<b>-86.47</b>

図 2 PMF スコアの計算値

(2) I-HEA は、図 3 の反応式に従い合成した。出発原料からの収率は 6.2% であった。

また、 $^{125}\text{I}$ -I-HEA は図 4 の反応式に従い合成し、放射化学的収率は 3.3%、放射化学的純度 99% 以上で得た。

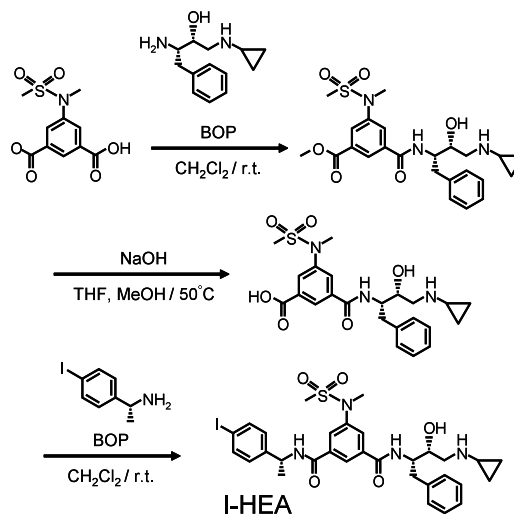


図 3 I-HEA の合成

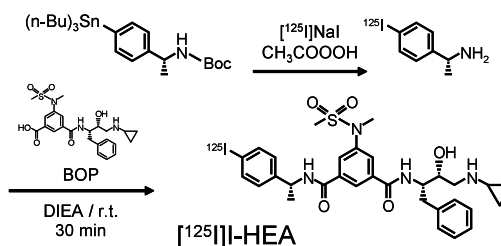


図 4  $^{125}\text{I}$ -I-HEA の合成

(3) I-HEA は BACE に対して濃度依存的な阻害を示し、その  $\text{IC}_{50}$  値は 49 nM であった。また、母体化合物 F-HEA およびペプチド性 BACE 阻害剤の OM99-2 の  $\text{IC}_{50}$  値は、それぞれ 25 nM、32 nM であった(図 5)。したがって、所期の通り I-HEA は高い BACE 阻害活性を有することが明らかとなり、BACE に対する親和性が示唆された。

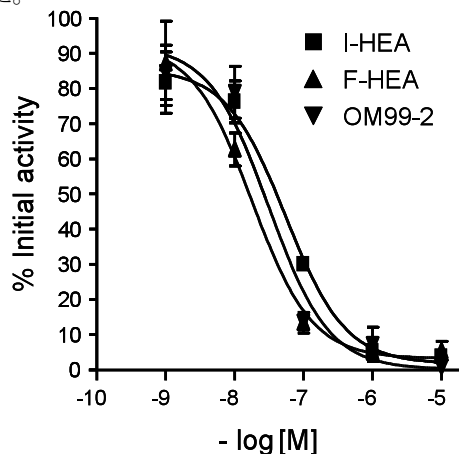


図 5 BACE 阻害曲線

(4) BACE を遺伝子導入した HEK293 細胞への  $[^{125}\text{I}]$ -HEA の取込み率を測定した結果、放射能の集積は経時的に増加し、30 分後における値はコントロールである正常 HEK293 細胞の 1.58 倍と有意に高い値を示した(図 6)。このことから、 $[^{125}\text{I}]$ -HEA は細胞内 BACE に結合することが示唆された。

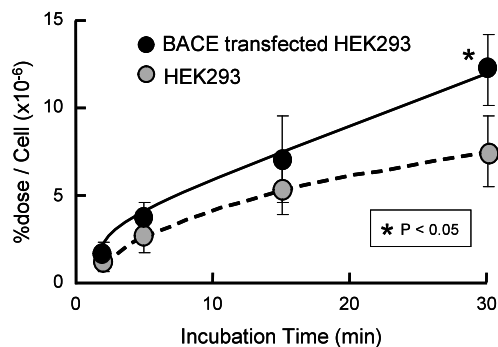


図 6 BACE 遺伝子導入細胞への  $[^{125}\text{I}]$ -HEA の取込み

(5) I-HEA の脂溶性を、1-オクタノールと 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた分配係数の対数値として求めたところ  $2.64 \pm 0.01$  であり、本プローブは脳への移行が期待できる脂溶性を有していることが明らかとなった。

(6)  $[^{125}\text{I}]$ -HEA の BUI は  $18.3 \pm 7.7\%$  であり、本プローブの投与後早期における脳移行性が示された。

(7) マウスを用いた体内放射能分布実験において、脳への放射能集積量は投与後 10 分の時点で  $0.10\%$  ID/g を示した。したがって、本化合物は血液脳関門を透過し、脳へ移行することを認めた(図 7)。

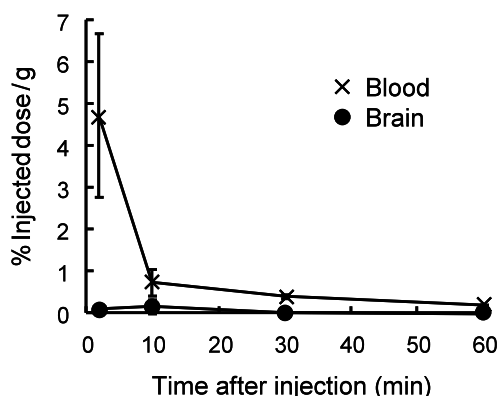


図 7  $[^{125}\text{I}]$ -HEA のマウス脳への取込み

(8) Ex vivo オートラジオグラフィの結果、 $[^{125}\text{I}]$ -HEA は脳実質に集積を認めた。また、大脳皮質での単位組織重量あたりの放射能集積

は、BACE 阻害剤の同時投与によって 46% まで有意に低下した(図 8)。したがって、 $[^{125}\text{I}]$ -HEA は末梢投与後に血液脳関門を透過し、脳内 BACE に結合することが示唆された。

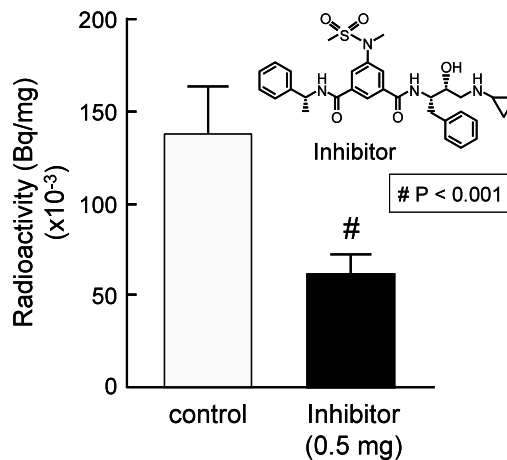


図 8  $[^{125}\text{I}]$ -HEA の脳 ex vivo オートラジオグラフィ

以上の結果から、HEA 骨格が in vivo BACE イメージング薬としての基本的性質を有することが示された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

- ① 河合 知喜、河嶋 秀和、木村 寛之、小野 正博、佐治 英郎、アルツハイマー病における脳内  $\beta$ -セクレターゼイメージングを目的とした hydroxyethylamine dipeptide isoster 誘導体の合成と評価、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、京都
- ② Kawashima H, Kawai T, Kuge Y, Saji H, A Novel Non-peptidergic Tracer for PET Imaging of BACE1 Density in Alzheimer's Disease Brain、2008 World Molecular Imaging Congress、2008 年 9 月 12 日、Nice (France)
- ③ 河合 知喜、河嶋 秀和、木村 寛之、久下 裕司、佐治 英郎、アルツハイマー病における脳内  $\beta$ -セクレターゼイメージングを目的とした hydroxyethylamine dipeptide isoster 誘導体の標識合成、日本分子イメージング学会第 4 回学術総会、2008 年 5 月 22 日、埼玉

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河嶋 秀和 (Kawashima Hidekazu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：70359438

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし