

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659564

研究課題名(和文) タウオパチーの超早期診断のための GSK-3 標的核医学イメージングプローブの開発

研究課題名(英文) Development of nuclear medical imaging probes targeting GSK-3beta for early diagnosis of tauopathy

研究代表者

佐治 英郎 (Saji, Hideo)

京都大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40115853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000 円、(間接経費) 870,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タウオパチーの早期診断に資する GSK-3 標的核医学イメージングプローブの開発を目的として、GSK-3 阻害剤の一つであるマレイミド誘導体に着目し、¹²⁵I を導入したマレイミド誘導体である化合物7を設計・合成した。化合物7は、正常マウスにおける体内放射能分布実験より、脳移行性を示すことが明らかとなった。また、GSK-3 へのインビトロ結合性評価実験において、既存の GSK-3 阻害剤に比べ、高い結合性親和性を有することが示唆された。今後、プローブの構造最適化を行うことによって、GSK-3 を標的とした核医学イメージングプローブの開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to develop nuclear medical imaging probes targeting GSK-3beta, we newly designed and synthesized ¹²⁵I-labeled compound based on maleimide scaffold ([¹²⁵I]7). In biodistribution study in normal mice, [¹²⁵I]7 showed high brain uptake sufficient for in vivo imaging of GSK-3beta. In addition, in in vitro binding assay using GSK-3beta, compound 7 displayed higher binding affinity for GSK-3beta than indirubin-3'-oxime reported previously as a GSK-3beta inhibitor. These results in this study suggest that it will be feasible to develop nuclear medical imaging probes targeting GSK-3beta by further optimizing the chemical structure.

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：タウオパチー GSK-3 認知症 イメージング

1. 研究開始当初の背景

タウオパチーは微小管結合タンパク質のひとつであるタウタンパク質が過剰なリン酸化を受けて不溶性となり、細胞内に異常蓄積することが重要な発症機序と考えられる疾患の総称であり、アルツハイマー病、ピック病、進行性核上性麻痺などが含まれる。これら疾患の脳内において、過剰リン酸化タウタンパク質凝集体が沈着する前段階として、タウタンパク質の主要なリン酸化酵素である、グリコーゲンシンタースキナーゼ 3 β (GSK-3 β)の発現量が増加することが報告されている。したがって、脳内の GSK-3 β の発現を生体イメージングできる、positron emission tomography (PET)や single photon computed tomography (SPECT)用放射性プローブを利用することによって、過剰リン酸化タウ凝集体の蓄積が生じる前の早期段階でのタウオパチーの診断が可能になると考えられる。本研究では、タウオパチーの超早期・予防診断を目指して、GSK-3 β への特異的・選択的結合性を有する PET/SPECT 用プローブを設計・開発し、それを用いて GSK-3 β を体外から定量イメージングする方法の構築を計画した。

アルツハイマー病におけるタウタンパク質凝集体を標的にした PET 用分子プローブの開発に関する論文は、これまでに1報報告されているが、アミロイド β タンパク質への結合性も有すること、半減期の短い¹¹C 標識化合物であること、脳内での非特異的放射能滞留が観察されることなど、克服すべき問題が多数ある。一方、GSK-3 β を含め、タウタンパク質のリン酸化酵素を標的にした分子プローブの開発はこれまでに報告がなく、本プローブ開発は独創的な研究であると考えられる。本研究で提案する GSK-3 β イメージングプローブの開発によって、従来提案されている、リン酸化タウタンパク質の蓄積をイメージングバイオマーカーとする診断に比

べ、より早期段階におけるタウオパチーの診断が可能になると期待できる。また、開発した GSK-3 β イメージングプローブを用いて、モデル動物における GSK-3 β の発現量とタウ蓄積の相関を経時的に追跡することで、タウオパチー発症過程の病態が明らかになりうると考えられることから、医薬品開発分野・医療分野において非常に意義深い成果が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、GSK-3 β 阻害剤の分子構造を基盤にして、計算化学を用いた理論的プローブの設計、効率合成、GSK-3 β を用いたインビトロ結合実験、病態マウスおよびアルツハイマー病患者の脳組織切片を用いたインビトロスクリーニング、体内放射能分布実験、オートラジオグラフィ、PET/SPECT イメージングなどのインビボスクリーニングを行い、GSK-3 β の生体イメージングを可能にする PET/SPECT 用分子プローブを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、タウオパチー脳内に過剰出現する GSK-3 β に特異的・選択的に結合する分子イメージングプローブを設計・開発し、それを用いて GSK-3 β を体外から非侵襲的に定量する分子イメージング法を構築する。マレイミド誘導体などのタウ凝集阻害剤を基盤とした理論的プローブ設計を行い、GSK-3 β を用いたインビトロ結合実験、病態モデルマウスおよびアルツハイマー病剖検脳組織切片を利用するインビトロスクリーニング、動物での体内分布実験、オートラジオグラフィ、PET/SPECT イメージングなどのインビボスクリーニングを経て、GSK-3 β に特異的・選択的に結合する PET/SPECT 用分子プローブを見出す。

① 分子イメージングプローブの設計・合成・標識

GSK-3 β への高い結合性が報告されている、マレイミド誘導体などの GSK-3 β 阻害剤を母核に選択し、フッ素、ヨウ素および種々の置換基 (ジメチルアミノ基、メチルアミノ基、アミノ基、メトキシ基、ヒドロキシル基など) を導入した化合物を設計・合成する。¹⁸F (PET 用) および ¹²⁵I (SPECT 用) 標識のため、それぞれの標識前駆体である、トシル体およびトリブチル体の合成も行う。

② 分子イメージングプローブのインビトロスクリーニング

(1) GSK-3 β を用いたインビトロ結合実験

①で合成した種々の化合物に関して、GSK-3 β を用いたインビトロ結合実験を行い、GSK-3 β に対する結合親和性を検討する。

(2) 病態モデルマウスおよびアルツハイマー病患者脳組織切片を用いたインビトロ結合実験

②-(1)の検討において、GSK-3 β への結合性を示した化合物に関しては、病態モデルマウスおよびアルツハイマー病患者脳組織切片を用いたインビトロ結合実験を行う。Tg マウスから作製した脳切片および患者脳組織切片を用いて、¹⁸F あるいは ¹²⁵I 標識プローブによるオートラジオグラフィおよび抗 GSK-3 β 抗体による免疫染色実験を行うことにより、プローブの GSK-3 β への結合性を評価する。

③ 分子イメージングプローブのインビボスクリーニング

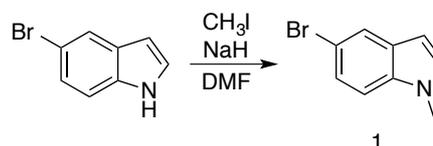
②の検討において、GSK-3 β に高い結合性を示した化合物に関して、放射標識プローブを正常マウスに投与後の体内動態を検討し、プローブの脳移行性とクリアランスを評価する。

4. 研究成果

①候補プローブの合成

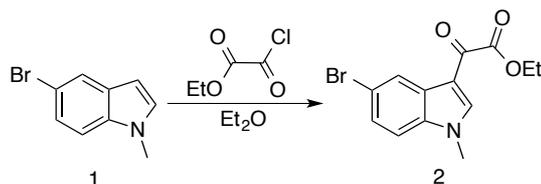
化合物 1 の合成

5-Bromoindole (330 mg, 1.69 mmol) を、ジメチルホルムアミド (2.00 ml) に溶解し、0 °C で sodium hydride (93.8 mg) および iodomethane (109 μ l, 1.75 mmol) を加えて室温で 30 分間撹拌した。反応終了後、0 °C で水を加え、1 N HCl で pH = 11 に調整した後に酢酸エチル (50 ml \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/4) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、化合物 1 を収量 335 mg (94.7%) で得た。



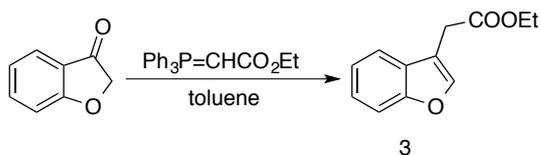
化合物 2 の合成

1 (334 mg, 1.60 mmol) をジエチルエーテル (2.00 ml) に溶解した。Ethyl chlorohydroxylate (380 μ l, 3.39 mmol) をテトラヒドロフラン (1.3 ml) に溶解し、0 °C で 1 溶液に加えた。30 分後に室温に戻し、12 時間撹拌した。Sodium ethoxide (300 mg, 4.41 mmol) をエタノール (1.50 ml) に溶解し、-72 °C で反応溶液に加えた。室温に戻し、水を加えて反応を停止させた後、酢酸エチル (50 ml \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/2) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、化合物 2 を収量 470 mg (95.3%) で得た。



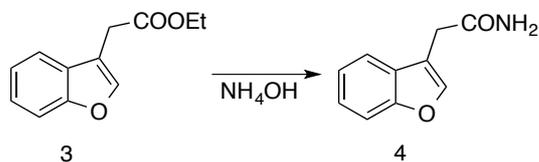
化合物 3 の合成

3-Coumaranone (500 mg, 3.73 mmol)をトルエン (12.0 ml) に溶解し、Triphenylcarbethoxymethylenephosphorane (1.96 g, 5.63 mmol)を加え、攪拌下 24 時間加熱還流させた。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/2)を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、化合物 **3** を収量 610 mg (80.1%) で得た。



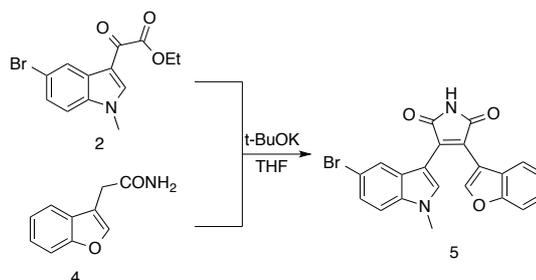
化合物 **4** の合成

3 (142 mg, 0.696 mmol)を 28%アンモニア水 (66.0 ml)に溶解し、室温で 12 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、酢酸エチル(50 ml × 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。再び溶媒を減圧留去し、化合物 **4** を収量 61.4 mg (50.4%) で得た。



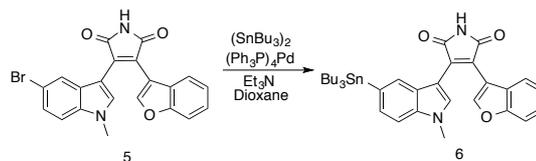
化合物 **5** の合成

2 (106 mg, 0.340 mmol)および **4** (60 mg, 0.340 mmol)をテトラヒドロフラン(3.00 ml)に溶解した。t-BuOK (148 mg)をテトラヒドロフラン (1.50 ml)に溶解し、0 °Cで反応溶液に加えた。室温に戻し、2 時間攪拌した後に 2 N HCl で反応を停止させ、酢酸エチル(50 ml × 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/1)を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、化合物 **5** を収量 82.6 mg (57.7%)で得た。



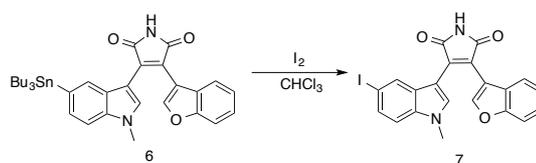
化合物 **6** の合成

5 (42.1 mg, mmol)を 1,4-ジオキサン(5.00 ml)に溶解し、ビス(トリブチルスズ) (400 μl)、テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (50.0 mg)、トリエチルアミン (4.00 ml)加えて、攪拌下 3 時間加熱還流させた。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/4)を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、化合物 **6** を収量 12.0 mg (19.0%)で得た。



化合物 **7** の合成

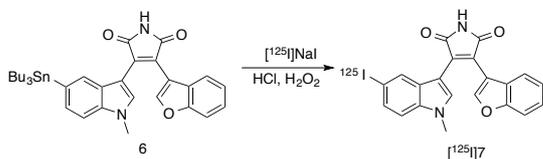
6 (63.1 mg, mmol)をクロロホルム(5.00 ml)に溶解し、50 mg/ml に調整したヨウ素のクロロホルム溶液を 1.5 ml 加えた。室温で 10 分間攪拌した後、クロロホルム(50 ml × 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/1)を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、化合物 **7** を収量 45.8 mg (97.9%)で得た。



化合物 **7** の ¹²⁵I 標識

標識前駆体であるトリブチルスズ化合物 **6** の

エタノール溶液(50 μ L), 3%(W/V) H_2O_2 (50 μ L)を加え、2 分間室温で反応した。飽和亜硫酸ナトリウム水溶液(100 μ L)を加えて反応を停止させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(100 μ L)を加えて反応溶液を中和した。酢酸エチルを加えて抽出し、無水硫酸ナトリウムを充填したパスツールピペットに通液して脱水した後、窒素気流化で溶媒を留去した。放射性ヨウ素標識化合物は、それぞれ対応する非放射性化合物 **7** を標準物質として逆相 HPLC で分離精製し、放射化学的収率 30%、放射化学的純度 99%以上で目的とする $[^{125}I]$ **7**を得た。



$[^{125}I]$ **7** の正常マウス体内放射能分布実験

$[^{125}I]$ **7** を 15%EtOH 含有生理食塩水で希釈した。1 群 5 匹の 5 週齢 ddY マウス(雄 26-28 g)に、尾静脈より 1 匹あたり 0.18 μ Ci (100 μ l) に調製したリガンドを投与し、2, 10, 30, 60 分後に断頭、採血後、臓器を取り出し、 γ カウンターで放射能を測定した(Table 1)。

Table 1. Biodistribution of radioactivity after injection of $[^{125}I]$ **7** in normal mice^a.

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
	$[^{125}I]$ 7			
Blood	1.77 (0.03)	1.06 (0.08)	0.92 (0.08)	0.69 (0.13)
Liver	20.5 (2.67)	27.6 (3.68)	24.1 (1.48)	17.5 (2.42)
Kidney	11.2 (0.76)	7.52 (0.42)	3.82 (0.21)	2.62 (0.53)
Intestine	2.14 (0.20)	5.48 (0.54)	13.0 (2.17)	27.0 (1.25)
Spleen	3.64 (0.45)	2.61 (0.24)	1.59 (0.16)	1.22 (0.33)
Pancreas	4.22 (1.02)	4.14 (0.55)	2.71 (0.29)	1.77 (0.48)
Heart	14.6 (1.58)	4.48 (0.15)	2.17 (0.28)	1.36 (0.31)
Lung	14.3 (2.28)	4.83 (0.99)	2.61 (0.35)	1.69 (0.43)

Stomach ^b	1.22 (0.15)	2.10 (0.62)	2.47 (1.12)	4.40 (3.70)
Brain	1.71 (0.09)	1.79 (0.25)	1.28 (0.10)	1.00 (0.21)

^aExpressed as % injected dose per gram. Each value represents the mean (SD) for 5 animals.

^bExpressed as % injected dose per organ.

GSK-3 β への結合性評価

化合物 **7** の GSK-3 β に対する阻害活性を GSK-3 β Kinase Enzyme System (Promega, Catalog #: V1991)および ADP-Glo™ Kinase assay Kit (Promega, Catalog #: V9101)を用いて測定する方法を用いた。また、ポジティブコントロールとして既存の GSK-3 β 阻害剤である indirubin-3'-oxime¹⁾を用いた。実験は、Promega protocol applications guide に準じて行った²⁾。今回実験に用いた希釈溶液は、緩衝液 (40 mM Tris-HCl, pH7.5, 20 mM MgCl₂, 50 μ M DTT and 0.1 mg/mL BSA) を使用した。化合物は、10 μ M (1% DMSO を含む最終濃度) を始めとし、緩衝液で 5 倍ずつ希釈し、10 種類の濃度を調整した。得られた各濃度の化合物を 384 ウェルプレートの各ウェルに 2 μ L ずつ添加した(ependorf, 0030621670)。さらに、希釈したキナーゼ溶液を各ウェルに 4 μ L (20 ng)ずつ添加し、室温で 10 分インキュベートした。続いて、ATP (10 μ M) と Poly(Glu, Tyr) (2 μ g)基質の混合溶液を各ウェルに 4 μ L ずつ添加し、室温で一時間インキュベートした。ADP-Glo™ Reagent (ADP-Glo™ Kinase Assay, Promega)を各ウェルに 10 μ L ずつ添加し、室温で 40 分間反応させた。さらに、Kinase Detection Reagent (ADP-Glo™ Kinase Assay, Promega)を各ウェルに 20 μ L ずつ添加し、室温で一時間反応させた後、Luminescence Counter 1420 ARVO™ Light (Perkin Elmer, Japan)を用いて発光量を測定した。得られたデータから、GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.)を用いて、用量反応曲線および IC₅₀を算出した。用量反応曲線を Figure 1 に示す。この曲線より算出した化合物 **7** の IC₅₀ は 148.9 nM であった。一方、コントロール化

化合物は 203.8 nM を示した。この結果より、本研究で開発した化合物 **7** は、既存の GSK-3 β 阻害剤より GSK-3 β への高い結合親和性を有することが示唆された。

1) *J. Biol. Chem.*, **276**, 251, 2001.

2) *J. Biomol Screen*, **17**, 885, 2012.

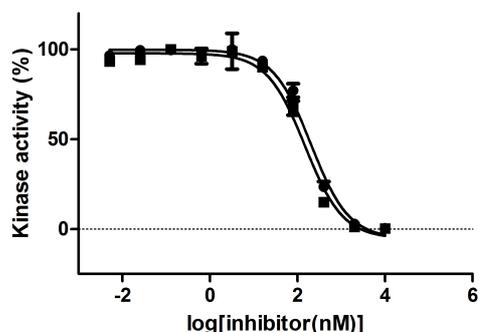


Figure 1. Inhibition curve in GSK-3 β kinase enzyme system using ADP-Glo™ kinase assay kit (■: 化合物 **7**, ○: indirubin-3'-oxime).

まとめ

本研究では、GSK-3 β イメージングプローブの開発を目的として、GSK-3 β 阻害剤の一つであるマレイミド誘導体に着目し、¹²⁵I を導入したマレイミド誘導体である化合物 **7** を設計・合成した。化合物 **7** は、正常マウスにおける体内放射能分布実験より、脳移行性を示すことが明らかとなった。また、GSK-3 β へのインビトロ結合性評価実験において、既存の GSK-3 β 阻害剤に比べ、高い結合性親和性を有することが示唆された。今後、プローブの構造最適化を行うことによって、GSK-3 β のインビボイメージングプローブの開発の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Ono M, Saji H. Molecular Approaches to the Treatment, Prophylaxis, and Diagnosis of Alzheimer's Disease: Novel PET/SPECT imaging probes for diagnosis of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacological Science*, **118**, 338-344, 2012.
- ② Matsumura K, Ono M, Kimura H, Ueda M, Nakamoto Y, Togashi K, Okamoto Y, Ihara M,

Takahashi R, Saji H. ¹⁸F-Labeled phenyl benzothiazole for in vivo imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *ACS Medicinal Chemistry Letter*, **3**, 58-62, 2012.

- ③ Matsumura K, Ono M, Yoshimura M, Kimura H, Watanabe H, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. Synthesis and biological evaluation of novel styryl benzimidazole derivatives as probes for imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**(11), 3356-62 (2013).

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐治英郎
京都大学薬学研究科・教授
研究者番号：40115853

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小野正博
京都大学薬学研究科・准教授
研究者番号：80336180

天満 敬
京都大学薬学研究科・助教
研究者番号：80336180

木村寛之
京都大学放射性同位元素総合センター・助教
研究者番号：50437240

上田真史
岡山大学医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：4038167