

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893109

研究課題名(和文)アルツハイマー病診断のための99mTc標識 アミロイドイメージングプローブの開発

研究課題名(英文)Development of novel 99mTc labeled amyloid imaging probes for diagnosis of Alzheimer's disease

研究代表者

渡邊 裕之(Watanabe, Hiroyuki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40710786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)に特徴的な脳内病理学的変化のひとつである β -アミロイド(A β)を主成分とする老人斑の沈着は、疾患特異性が高く、また臨床症状が現れる以前から始まることから、ADの早期診断における重要な標的分子となっている。本研究では、SPECT核種の中でも汎用性に優れるTc-99mを標識核種に用いた、新規SPECT用A β イメージングプローブの開発を行った。検討の結果、PQ-C3-BATおよび1,3,4-DPOD-2P-BATが、インビトロにおいてA β に対して結合性を有すること、および正常マウスの脳内に速やかに移行し、経時的にクリアランスすることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The deposition of β -amyloid (A β) peptides in the brain is a well-established biomarker of Alzheimer's disease (AD). Since the deposition of A β plaques is considered to be the initial neurodegenerative event in AD, A β is the major target of early diagnosis and treatment for AD. In this study, we planned the development of novel probes labeled with technetium-99m (Tc-99m). Tc-99m has become the most commonly used radionuclide in diagnostic nuclear medicine. PQ-C3-BAT and 1,3,4-DPOD-2P-BAT which were developed in this study showed high affinity for A β aggregates in vitro. In addition, these probes showed initial uptake into and rapid clearance from the normal mouse brain. These results suggested that PQ-C3-BAT and 1,3,4-DPOD-2P-BAT may be potential probes for imaging A β plaques in AD brains.

研究分野：分子イメージング学

キーワード：分子イメージング 放射性医薬品 SPECT アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は、高齢者における認知症の中で最も大きな割合を占めており、今後、急速に進行する高齢化社会において、さらなる患者数の増加が予測されている。しかしながら、現在までに、ADの早期診断に有用な手法は確立されていない。

ADは、その発症段階や軽度認知障害(MCI)の段階で、記憶・認知機能の低下などの臨床症状や脳萎縮が認められる。一方、ADの脳内における特徴的病理学的変化である老人斑および神経原線維変化の蓄積は、認知機能が正常な段階から認められ、臨床症状が現れた時点では、ほぼ一定に達していることが知られている。前者の主構成成分は、βシート構造をとったβアミロイドタンパク質(Aβ)であり、後者は過剰リン酸化されたタウタンパク質である。なかでも老人斑の沈着は、AD発症過程の最も初期段階よりはじまり、疾患特異性が高いことから、老人斑の検出はADの早期診断につながると考えられている。そのため、老人斑の主構成成分であるAβは、ADの早期診断法の開発における重要な標的分子となっている。

核医学分子イメージング法は、放射線の透過性を活かした高精度かつ高感度な定量評価を行えることから、ADの早期診断に適した手法であると考えられる。そのため、これまでに多くの positron emission tomography (PET) 用 Aβイメージングプローブの開発が行われており、なかでも (E)-4-(2-(6-(2-(2-[¹⁸F] fluoroethoxy)ethoxy)ethoxy)pyridin-3-yl)vinyl)-N-methylaniline (AV-45)は、2012年4月にアメリカ食品医薬品局(FDA)に認可され、現在米国において臨床使用が開始されている。しかしながら、PET用プローブの問題点として、PET 装置を有する施設が日本国内で約300と少ないことや、使用する放射性核種の物理学的半減期が短く、汎用性が低いことが挙げられる。そのため、今後、いっそうの患者数の増加が予測されるADの診断に対応するためには、PETに比べ施設数が多く、物理的半減期の長い放射性核種を使用できるため汎用性に優れた single photon emission computed tomography (SPECT)の利用が必要となる。

老人斑の生体イメージングに求められるAβイメージングプローブの性質として、血液脳関門の透過性が十分高く、脳移行後に老人斑アミロイドへ選択的に結合し、老人斑に結合しない場合は、脳から血液へ速やかに消失するという以上3点が挙げられる。

研究代表者はこれまでに、臨床応用可能な新規 SPECT用Aβイメージングプローブの開発を目的として、¹²³Iで標識可能な 2,5-ジフェニル-1,3,4-ベンゾオキサゾールや 2-フェニルインドールをはじめとする数種の化合物の開発を行ってきた。これらの化合物は、Aβ凝集体に対する高い結合性および良好な脳内挙動を示したことから、SPECT 用 Aβイメージングプローブとして有用な性質を有することが

明らかとなった。¹²³I は半減期が13.1時間、エネルギーが159 keVであり、臨床診断にも用いられている放射性核種であるが、その製造にはサイクロトロンが必要である。一方、同じ SPECT 核種である^{99m}Tcは、半減期が6.01時間、エネルギーが141keVのγ線のみを放出し、さらに⁹⁹Moとの放射平衡を利用したジェネレータシステム(⁹⁹Mo/^{99m}Tcジェネレータ)で容易に入手できることから、現在、核医学画像診断に最も汎用されている放射性核種である。しかし一般的に、遷移金属である^{99m}Tcは、同一化合物の中に標的分子との結合部位および^{99m}Tcとの錯形成部位が必要であり、脳移行性等を考慮した分子設計を行う必要があるAβイメージングプローブの開発において、¹²³I標識化合物に比べて不利な性質も有している。そのため、これまでに開発されてきた^{99m}Tc標識Aβイメージングプローブはいずれも、老人斑に対する結合性や脳移行性に問題を抱えており、臨床研究を行うまでに至っていない。そこで、研究代表者は、^{99m}Tcを標識核種に用いた新規SPECT用Aβイメージングプローブの開発を計画した。

2. 研究の目的

既存の^{99m}Tc標識Aβイメージングプローブの主な問題として、(1)老人斑に対する結合性が認められない、(2)脳移行性が低いという2点が挙げられる。これらの原因として、錯形成部位の導入に起因した分子サイズの増大が影響していると考えられる。これらの化合物の多くは、Aβ結合部位として、PET プローブとして臨床研究が行われている化合物の母核であるベンゾチアゾールなどを用い、錯形成部位をアルキル鎖を介して導入する設計となっており、その分子構造の最適化に関する研究は行われていない。そこで本研究では、2つの問題点が解決できる分子構造を明らかにし、臨床応用可能なプローブを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究において開発する、^{99m}Tc標識Aβイメージングプローブの基本構造を、(1)アミロイド結合性部位、(2)リンカー部位、(3)錯形成部位の3部位に分割し(Fig. 1)、それぞれについての検討を行うことで構造の最適化を行う。



Fig. 1. ^{99m}Tc標識Aβイメージングプローブの基本構造

(1) アミロイド結合性部位

これまでに研究代表者は、Aβ凝集体に対して高い結合親和性を示し、PETもしくは

SPECT用 β イメージングプローブとして機能し得る複数の骨格を報告してきた。本研究においては、それらの中でも特に高い結合親和性と脳移行性を示した、フェニルキノキサリン(PQ)および2,5-ジフェニル-1,3,4-オキサジアゾール(1,3,4-DPOD)を、アミロイド結合性部位に用いる化合物として検討した。

(2) リンカー部位

研究代表者らのこれまでの研究において、錯体形成部位とアミロイド結合性部位とをつなぐリンカー部位の長さが、化合物の脳移行性およびアミロイド凝集体に対する親和性に影響を与えることが示唆されている。そのため、これまでの検討において用いてきた様々な長さのアルキル鎖をはじめとする数種をリンカーとして検討した。

(3) 錯形成部位

血液脳関門の透過には、電気的に中性であることや分子量が600Da以下であることが必要とされている。そこで、錯体形成部位として、分子量が比較的小さく、Tcと電気的に中性な錯体を形成し、脳移行性が見込まれるbis-amino-bis-thiol (BAT) を用いた検討を行った。

4. 研究成果

(1) フェニルキノキサリンを母核した化合物に関する検討

アミロイド結合性部位としてジメチルアミノ基を導入したフェニルキノキサリン(PQ)を、リンカー部位として炭素数3のアルキル鎖を、錯形成部位としてBATを用いた新規 ^{99m}Tc 標識フェニルキノキサリン誘導体(^{99m}Tc]PQ-C3-BAT)を設計・合成した。

^{99m}Tc -glucoheptonate との配位子交換反応により ^{99m}Tc]PQ-C3-BATを得た。 ^{99m}Tc 標識体および対応するRe錯体をHPLC分析により比較し、得られた ^{99m}Tc 標識体の構造を推測した。 $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体を用いたインビトロ結合実験において、 ^{99m}Tc]PQ-C3-BATが $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体に対して結合親和性を有することが示された。さらに、正常マウスを用いた体内放射能分布実験において投与後2分における脳移行性およびその後の速やかなクリアランスを示した。

さらに、ADモデルマウス(Tg2576)を用いたex vivoオートラジオグラフィーを行うことで、マウス生体内に沈着したアミロイド斑に対する結合性を評価した。その結果、脳実質内に沈着したアミロイド斑へはわずかし結合しなかったものの、脳血管に沈着したアミロイド凝集体にも結合性を示し、マウス生体内における有用性が明らかとなった。

(2) 2,5-ジフェニル-1,3,4-オキサジアゾールを母核とした化合物に関する検討

アミロイド結合性部位としてジメチルアミノ基を導入した2,5-ジフェニル-1,3,4-オキサ

ジアゾール(1,3,4-DPOD)を、リンカー部位として三重結合を有する2-propyneを、錯形成部位としてBATを用いた新規 ^{99m}Tc 標識2,5-ジフェニル-1,3,4-オキサジアゾール誘導体(^{99m}Tc]1,3,4-DPOD-2P-BAT)を設計・合成した(Fig. 2)。

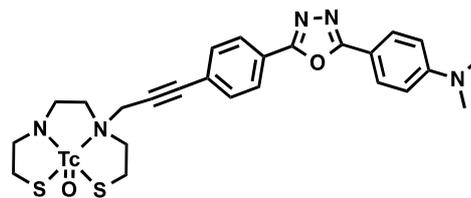


Fig. 2. ^{99m}Tc]1,3,4-DPOD-2P-BAT の化学構造

^{99m}Tc -glucoheptonate との配位子交換反応により ^{99m}Tc]1,3,4-DPOD-2P-BATを良好な放射化学的収率で得た。 $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体を用いたインビトロ結合性実験において、 ^{99m}Tc]1,3,4-DPOD-2P-BATは、 $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体の濃度依存的な結合親和性を示した(Fig. 3)。

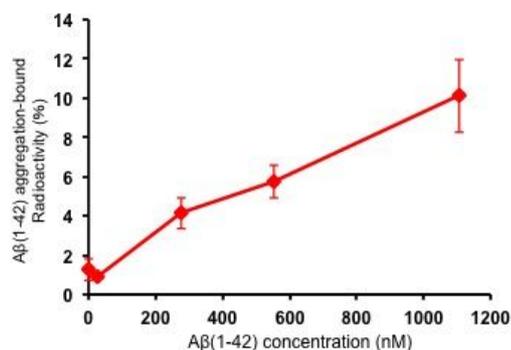


Fig. 3. ^{99m}Tc]1,3,4-DPOD-2P-BAT の $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体に対する結合性評価

さらに、正常マウスを用いた体内放射能分布実験の結果、投与後2分において0.68% ID/gの脳移行性を示した。さらに投与後30分には0.44% ID/gの値を示したことから、本化合物が脳から経時的にクリアランスされることが示唆された。

以上の結果より、3重結合を有するリンカーが、アルキル鎖と同様に ^{99m}Tc を標識核種に用いた新規SPECT用 β イメージングプローブの開発を行う際に有用なリンカーのひとつであることが明らかとなった。

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)

Watanabe H, Ono M, Kimura H, Matsumura K, Yoshimura M, Iikuni S, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. Novel radioiodinated 1,3,4-oxadiazole derivatives with improved in vivo properties for SPECT

imaging of β -amyloid plaques. *Med. Chem. Commun.*, 2014, 5, 82-85, DOI : 10.1039/c3md00189j 査読有

Watanabe H, Ono M, Iikuni S, Yoshimura M, Matsumura K, Kimura H, Saji H. A ^{68}Ga complex based on benzofuran scaffold for the detection of β -amyloid plaques. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24, 4834-4837, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.08.058>, 査読有

Watanabe H, Ono M, Iikuni S, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. Synthesis and Biological Evaluation of ^{123}I -Labeled Pyridyl Benzoxazole Derivatives: Novel β -Amyloid Imaging Probes for Single-Photon Emission Computed Tomography. *RSC Adv.*, 2015, 5, 1009-1015, DOI : 10.1039/c4ra10742j 査読有

Watanabe H, Ono M, Saji H. Novel PET/SPECT Probes for Imaging of Tau in Alzheimer's Disease. *ScientificWorldJournal*, 2015, 2015, 124192. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/124192>, 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

渡邊 裕之, 小野 正博, 飯國 慎平, 木村 寛之, 佐治 英郎. ピリジルベンゾオキサゾールを母核とした SPECT 用アミロイドイメージングプローブの開発. 第 53 回日本核医学会, 2013 年 11 月, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono, Hiroyuki Kimura, Hideo Saji. Molecular imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease with single photon emission computed tomography. The 37th NAITO CONFERENCE, 2014 年 7 月, ヒルトンニセコビレッジ(北海道ニセコ町)

渡邊 裕之, 小野 正博, 木村 寛之, 佐治 英郎. β -アミロイドおよびタウの生体イメージングを目的とした SPECT プローブの開発. 第 54 回日本核医学会, 2014 年 11 月, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 裕之 (WATANABE HIROYUKI)

京都大学・大学院薬学研究科・特定助教

研究者番号 : 40710786

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし