

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26293274
研究課題名(和文) 脳アミロイドアンギオパチーを標的とする核医学分子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 cerebral amyloid antipathy

研究代表者
小野 正博(Ono, Masahiro)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80336180
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳アミロイドアンギオパチー(CAA)は脳血管に アミロイドタンパク質(A β)が沈着する病態であり、高齢者の脳血管障害の主要な原因となっている。本研究ではCAAを標的とする核医学イメージングプローブの開発研究を実施した。その結果、脳実質に沈着したアミロイドへの顕著な放射能集積は示さない一方、脳血管アミロイドを選択的に描出し得る新規 ^{99m}Tc 錯体の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Cerebral amyloid angiopathy (CAA) is characterized by the deposition of amyloid aggregates in the walls of cerebral vasculature, and constitutes a major factor in intracerebral hemorrhage and vascular cognitive impairment. In this study, we carried out the development of nuclear medical imaging probes targeting CAA. As a result, we successfully developed a novel ^{99m}Tc complex that showed selective binding to CAA while it did not show marked radioactivity accumulation in senile plaques in the cortex.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：脳アミロイドアンギオパチー イメージング 金属錯体 診断

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病型認知症(AD)は、最も典型的な認知症であり、脳実質へのβアミロイドタンパク質(Aβ)を主成分とする老人斑とリン酸化タウタンパク質を主成分とする神経原線維変化の蓄積が主な病理学的特徴である。現在では、Aβの脳実質への蓄積過程がADの主たる原因であるとするアミロイドカスケード仮説が提唱されている。その一方で、AD患者の9割の脳病理所見において、脳血管壁にもAβが沈着していることが確認されている。この病態は「脳アミロイドアンギオパチー(CAA)」と呼ばれ、ADとの高い相関性が示されている他、高齢者の脳血管障害の主要な原因であり、ADに次いで患者数の多い認知症である脳血管性認知症にも密接に関連することも知られている。現在、CAAの確定診断は病理組織学的検査に依存するが、補助的に脳MRI、髄液検査などが利用されている。しかし組織学的検査は侵襲性を伴うこと、また脳MRIや髄液検査などの診断では疾患特異性が低いという問題がある。一方、脳血管Aβに特異的結合性を持つ放射性分子プローブを用いるPET/SPECTによる核医学診断は、CAAの疾患特異的な非侵襲的診断を可能にすると考えられる。

近年、ADの脳内に沈着するAβ凝集体を生体イメージングするためのPET用イメージングプローブが開発され、その臨床応用が活発に行われている。筆者らは、Aβイメージング研究の黎明期である2001年から、コンゴレッドおよびチオフラビンTを基本骨格とする種々のPET/SPECTプローブの開発研究を先駆的に行い、Aβ、タウ、プリオンなどのアミロイド凝集体を標的とする200種類以上のアミロイド結合性リガンドの化合物ライブラリーを構築するとともに、臨床研究に到達した数種のAβイメージングプローブの開発に携わってきた。CAAイメージングの観点から見た場合、これらのAβイメージングプローブは、脳血管Aβへの結合性を示すと同時に、脳移行性を付与した分子プローブであることから、脳実質に蓄積し

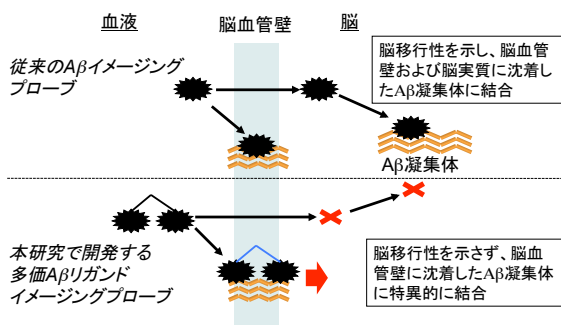


図1. 従来のAβプローブ(上)と新規多価Aβリガンドイメージングプローブとの比較(下)



図2. 多価Aβリガンドプローブの分子設計とその応用

たAβにも結合性を示すため、CAA特異的なイメージングは困難である(図1上段)。そこで本研究では、脳血管Aβへの特異的結合性を示すAβイメージングプローブの開発を目的として、プローブ1分子に複数のAβ結合性リガンドを導入した新たな分子設計概念を考案した(図2)。すなわち、この分子設計概念で開発されるプローブは、多価効果によるAβ結合性の増強作用と分子サイズの増大による脳移行性の低下が予想され、脳血管Aβに高い結合性を示す一方で、脳移行性の低下により脳実質のAβには送達されない(図1下段)ことから、CAA特異的なイメージングを可能にすることが期待できると考えた。

AD診断におけるAβイメージングの報告以降、現在までに多くの臨床研究が実施され、AβイメージングのAD診断における有用性が認知されつつある。一方、脳血管にAβが蓄積するCAAは、高齢者の脳血管障害の主要な原因であり、ADに次いで患者数の多い認知症である脳血管性認知症にも密接に関連する。しかしながら、現在まで、CAAイメージングに関する研究は大きく進展していない現状がある。

筆者は、現在まで10年以上の間、Aβやタウをはじめとする様々なアミロイドイメージングプローブの開発研究を行い、これまでに多数のアミロイド結合性を持つオリジナル化合物の創出に成功してきた。従来のAβイメージングプローブの分子設計では、脳移行性を考慮して可能な限り小さな分子サイズの化合物を利用し、その単一リガンドを放射標識することが一般的であった。一方、本研究では、これまでの設計概念とは逆に、分子サイズの大きな多価リガンド含有プローブによるAβ結合性の増強と分子サイズの増大に伴う脳移行性の低減を目的とした新たな分子設計によってCAA特異的なイメージングプローブを開発する(図2-①)という点でこれまでに報告例のない特色・独創的な研究となっている。

また、アミロイド沈着を病的要素とするアミロイド関連疾患は、ADやCAAに加え、他にも多数存在することから、申請者が提案する分子設計概念は、他のアミロイド関連疾患のイメージングプローブ開発にも応用できる可能性(図2-②)がある。

さらに、一般的にアミロイド沈着は、凝集度の低いオリゴマーアミロイドの方が高い細胞毒性を示すことが知られている。しかしながら、オリゴマーアミロイドの生体イメージングが期待されているものの、未だ達成されておらず、その実現が強く望まれている。本研究で開発するアミロイド結合性の増強効果を持つ多価リガンド含有分子プローブは、凝集度が低いオリゴマーアミロイドの段階での結合性が期待でき、オリゴマーアミロイドの生体イメージングの実現に発展する可能性 (図2-③) もある。

さらに、本研究では、PET/SPECT 用プローブの標識核種として、ジェネレータ産生核種である、 ^{99m}Tc を用いることから、汎用性に優れた CAA イメージング技術の開発にもつながると期待される。本研究で提案する、脳血管 $\text{A}\beta$ に特異的結合性を示す PET/SPECT 用プローブによる CAA のイメージングは、CAA の早期診断に加え、CAA の発生機序の解明、CAA に関連する AD や脳血管性認知症の病態解明、CAA 関連病態解明に基づいた CAA の予防・治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。また、CAA イメージングによる早期・予防診断技術の開発の必要性は、認知症患者やその家族の生活の質の向上を図り、患者の介護による経済的・社会的負担を軽減するといった、健康長寿社会の実現においても極めて意義深いものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、新規分子設計概念に基づいた、多価 $\text{A}\beta$ リガンド含有イメージングプローブを用いて、脳血管に沈着した $\text{A}\beta$ を特異的にイメージングすることを目的とする。本研究期間内に、 ^{99m}Tc を標識核種とする CAA 特異的イメージングのための PET/SPECT 用分子プローブの開発を行い、CAA モデルマウスにおける生体 CAA イメージングを目指すこととした。

3. 研究の方法

(出典：5. 主な発表論文等に示した論文)

合成

Diethyl

(Z)-4-(N'-hydroxycarbamimidoyl)benzyl)phosphonate (1).

diethyl (4-cyanobenzyl)phosphonate (759 mg, 3.00 mmol) のエタノール (20 mL) 溶液に hydroxylamine hydrochloride (625 mg, 9.00 mmol) と トリエチルアミン (1.25 mL, 9.00 mmol) を加えた。反応液を 2 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去した後、超純水を加えた。クロロホルムを加えて抽出し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 10:1) で精製して目的物 **1** を収量 790 mg (92%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.58 (s, 1H),

7.60 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.27 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 5.76 (s, 2H), 3.98–3.91 (m, 4H), 3.24 (d, J = 21.8 Hz, 2H), 1.17 (t, J = 7.0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 150.7, 133.1, 131.6, 129.5 (2C), 125.3 (2C), 61.4 (2C), 32.0, 16.2 (2C). HRMS (EI) m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4\text{P}$ (M^+) 286.1082, found 286.1086.

(Z)-4-((E)-4-(Dimethylamino)styryl)-N'-hydroxybenzimidamide (2).

1 (100 mg, 0.350 mmol) および 4-(dimethylamino)benzaldehyde (52 mg, 0.350 mmol) の DMF (10 mL) 溶液に sodium methoxide (5 M メタノール溶液, 0.14 mL, 0.700 mmol) をゆっくり加え、室温で 3 時間攪拌した。析出した固体を濾取し、超純水で洗浄後、シリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 10:1) で精製して目的物 **2** を収量 30 mg (31%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.60 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.51 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.44 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.17 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.77 (s, 2H), 2.94 (s, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 150.6, 150.0, 138.4, 131.2, 129.2, 127.6 (2C), 125.5 (2C), 125.4 (2C), 124.8, 122.9, 112.2 (2C), 39.9 (2C). HRMS (EI) m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}$ (M^+) 281.1528, found 281.1532.

2-(4-(Dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazole-6-carbonitrile (3).

2-bromobenzo[d]thiazole-6-carbonitrile (1165 mg, 5.00 mmol)、 N,N -dimethyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (1483 mg, 6.00 mmol) および $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (577 mg, 0.500 mmol) の 2 M Na_2CO_3 (aq.) / ジオキサン (1:1, 40 mL) 混合溶液を 2 時間加熱還流した。反応溶液を室温に戻した後、酢酸エチル (150 mL) と超純水 (150 mL) を加えた。析出した固体を濾取して目的物 **3** を収量 1061 mg (76%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.64 (s, 1H), 8.04 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.05 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2 - d_2) δ 173.1, 157.4, 153.3, 135.4, 129.8, 129.6 (2C), 126.4, 122.8, 120.6, 119.4, 112.0 (2C), 107.5, 40.3 (2C). HRMS (EI) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{S}$ (M^+) 279.0830, found 279.0827.

(Z)-2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-N'-hydroxybenzo[d]thiazole-6-carboximidamide (4).

化合物 **1** の合成反応と同様の反応を行い、目的物 **4** を化合物 **3** から収率 58% で得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.71 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.90 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.1 Hz, 1H),

6.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.89 (s, 2H), 3.03 (s, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ 168.5, 154.2, 152.3, 150.5, 133.7, 129.6, 128.5 (2C), 123.9, 121.2, 120.0, 118.7, 111.8 (2C), 39.7 (2C). HRMS (EI) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$ (M^+) 312.1045, found 312.1043.

(Z)-4-(Dimethylamino)- N^2 -hydroxybenzimidamide (5).

化合物 **1** の合成反応と同様の反応を行い、目的物 **5** を 4-(dimethylamino)benzotrile から収率 34% で得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.25 (s, 1H), 7.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.58 (s, 2H), 2.91 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 151.0, 150.7, 126.1 (2C), 120.8, 111.4 (2C), 39.9 (2C). HRMS (EI) m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ (M^+) 179.1058, found 179.1061.

(Z)-2-(4-(Dimethylamino)phenyl)- N^2 -(ethoxycarbonyloxy)benzo[d]thiazole-6-carboximidamide (6).

化合物 **4** (50 mg, 0.16 mmol) の DMF (10 mL) 溶液にクロロ炭酸エチル (18 μL , 0.19 mmol) とトリエチルアミン (44 μL , 0.32 mmol) を加えた。反応液を室温で 1 時間攪拌した。超純水 (50 mL) を加えた後、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 10:1) で精製して目的物 **6** を収量 16 mg (25%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.35 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.24–4.19 (m, 2H), 3.04 (s, 6H), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). MS (ESI) m/z 385 [MH^+].

3-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one (7).

化合物 **6** (87 mg, 0.23 mmol) の 1 M NaOH (aq.)/DMF (1:1, 40 mL) 混合溶液を室温で 1 時間攪拌した。酢酸 (5 mL) を加えた後、反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL) で中和し、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 5:1) で精製して目的物 **7** を収量 15 mg (20%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.50 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.05 (s, 6H). MS (ESI) m/z 339 [MH^+].

3-(2-(4-(Dimethylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl)-4-methyl-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one (8).

ヨウ化メチル (5.5 μL , 0.088 mmol) と炭酸カ

リウム (18 mg, 0.13 mmol) を化合物 **7** (15 mg, 0.044 mmol) の DMF (5 mL) 溶液に加えた。反応液を室温で 3 時間攪拌した後、超純水 (50 mL) を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1:1) で精製して目的物 **8** を収量 9 mg (58%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.48 (s, 1H), 8.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.28 (s, 3H), 3.05 (s, 6H). MS (ESI) m/z 353 [MH^+].

(Z)-2-(4-(dimethylamino)phenyl)- N^2 -hydroxy- N -methylbenzo[d]thiazole-6-carboximidamide (9).

化合物 **8** (15 mg, 0.043 mmol) の 1 M NaOH (aq.)/DMF (1:1, 10 mL) 混合溶液を 90 °C で 14 時間攪拌した。反応液に 1 M HCl (aq.) を 0 °C で加えて中和した後、クロロホルムで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 10:1) で精製し、さらに逆相 HPLC [リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.4)/アセトニトリル = 3:2 (0 min) to 3:7 (30 min)] で精製して目的物 **9** を収量 5 mg (36%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9.67 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 5.84–5.79 (m, 1H), 3.03 (s, 6H), 2.63 (d, $J = 5.2$ Hz, 3H). MS (ESI) m/z 327 [MH^+].

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識反応

化合物 **2**、**4**、または **5** (0.2 mg) の酢酸/エタノール混合溶液 (1:4, 200 μL) に $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 溶液 (100 μL) および酒石酸すず (II) 水和物 (3.0 mM 水溶液, 15 μL) を加えた。反応液を室温で 30 分間静置し、逆相 HPLC [リン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.4)/アセトニトリル = 3:2 (0 min) to 3:7 (30 min)] を用いて精製した。

$\text{A}\beta$ (1–42) 凝集体を用いた結合実験

$\text{A}\beta$ (1–42) 凝集体 PBS 溶液 (最終 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 μL)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ham 錯体 30% エタノール溶液 (8.3 kBq, 50 μL)、30% エタノール溶液 (900 μL) を混和し、室温で 3 時間静置した。混和溶液を Brandel 社製 M-24 セルハーベスター および Whatman 社製 GF/B フィルターを用いて吸引濾過し、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定した。得られた結果から、B/F 分離前後の放射能比を算出した。

$\text{A}\beta$ (1–40) および $\text{A}\beta$ (1–42) 凝集体を用いた結合阻害実験

$\text{A}\beta$ (1–40) または $\text{A}\beta$ (1–42) 凝集体 PBS 溶液 (最終 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 μL)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ham 錯体

30%エタノール溶液(8.3 kBq, 50 μ L)、PIB30%エタノール溶液(最終 64 pM-125 μ M)、30%エタノール溶液(850 μ L)を混和し、室温で3時間静置した。混和溶液を Brandel 社製 M-24 セルハーベスターおよび Whatman 社製 GF/B フィルターを用いて吸引濾過し、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定した。得られた結果から、GraphPad Prism 5.0 を用いて結合阻害曲線を作成し、50%阻害濃度 IC₅₀ を算出した。

Tg2576 および野生型マウスを用いた ex vivo ARG

20%エタノール含有生理食塩水に溶解した ^{99m}Tc-Ham 錯体 (18.5 MBq, 150 μ L) を 29 か月齢雌性の Tg2576 マウスおよび野生型マウスに尾静脈より投与した。投与 30 分後に安楽死させ、直ちに脳を摘出し、SECTION-LAB 社製 Super Cryoembedding Medium (SCEM) compound で包埋して、ドライアイスへヘキサンバスで凍結させた。その後、マイクロトームを用いて 30 μ m 厚の凍結切片を作製した。切片をイメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析した。ARG 実験後、同一切片に Thioflavin-S の 50%エタノール溶液を添加し、50%エタノールで洗浄後、蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行い、脳内アミロイド斑の局在を確認した。さらに同一切片を用いて CD31 の免疫染色を行った。PBST (5 分間 \times 3) 中で静置した後、切片を抗 CD31 1 次抗体溶液(SZ31, Abcam)と室温で終夜反応させた。PBST (5 分間 \times 3) 中で静置した後、Dako 社製抗ウサギ 2 次抗体と室温で 3 時間反応させた。PBST (5 分間 \times 3) 中で静置した後、Merck 社製 diaminobenzidine と室温で 5 分間反応させ、超純水で洗浄し、反応を停止させた。100% エタノールによる脱水処理、キシレンによる透徹処理を行った後、切片を封入し、顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) ^{99m}Tc 標識前駆体の合成

各標識前駆体の合成を示した。いずれの前駆体も Ham の導入はニトリルとヒドロキシルアミンとの 1 段階反応により行った。スチルベンはフォスフォネートとアルデヒドとの縮合反応により目的とするスチルベン誘導体を合成した。ベンゾチアゾールはスズキカップリングにより基本骨格を形成後、Ham を導入し、目的とするベンゾチアゾール誘導体を合成した。

(2) ^{99m}Tc 標識

Ham を導入したジメチルアミノベンゼンを還元剤の存在下、^{99m}TcO₄⁻ と反応させることで DAB を作製した。スチルベンについては、スチルベンとジメチルアミノベンゼンを混和し、テクネチウムと反応させることで SB1 を作製した。SB2 はスチルベンのみをテクネ

チウムと反応させることで得た。ベンゾチアゾールについても同様な操作を行い、BT1、BT2 を作製した。

(3) A β 結合性評価-1

HPLC により分離・精製した 5 種類の ^{99m}Tc 錯体を用いて、A β への結合性を評価した。錯体と A β 凝集体を混和後、B/F 分離を行い、A β に結合した錯体の割合を算出した。その結果、アミロイドリガンドを導入していない DAB は A β への結合性を示さない一方でスチルベン、ベンゾチアゾールともに 1 価、2 価錯体は、A β 結合性を有することが示された。

(4) A β 結合性評価-2

結合阻害実験を行うことで、それぞれの錯体の A β 結合性を評価した。競合リガンドには、アミロイドイメージング用 PET プローブとしての有用性が示されている PIB を用いた。一定放射能量の各錯体と A β 凝集体の存在下、種々の濃度の PIB を加えて、A β に結合した放射能を測定し、50%阻害濃度 IC₅₀ を算出した。この実験での IC₅₀ は、各錯体の存在下における PIB の IC₅₀ を算出しているの、IC₅₀ の値が高いほど、各錯体が PIB により阻害されにくいことを意味する。すなわち、IC₅₀ の値が高いほど各錯体の A β 結合性が強いということを示す。1 価から 2 価錯体にするによりスチルベンにおいては 23 倍、ベンゾチアゾールにおいては 10 倍の結合性の向上が認められた。また、作製した錯体の中では SB2 が最も強い A β 結合性を示した。

(5) Ex Vivo ARG

^{99m}Tc-SB2 を用いて、脳内アミロイドを過剰産生する Tg2576 マウスを用いた ex vivo オートラジオグラフィ(ARG)を行った。SB2 を投与 30 分後に、マウスを屠殺、脳組織切片を作製し、ARG を行った。野生型マウスにおいては顕著な放射能集積が観測されなかった一方、Tg2576 マウスにおいては多数の放射能スポットが観測された。同一切片におけるアミロイド蛍光染色剤であるチオフラビン S (アミロイドの局在を示す) による蛍光像は、Tg2576 マウス脳切片中に検出された放射能スポットはアミロイドの局在と一致したことから、SB2 がマウス脳内に沈着したアミロイドに結合することが示唆された。

(6) 結語

本研究では、アミロイドリガンドを 2 分子導入した 2 価 ^{99m}Tc-Ham 錯体を新たに設計・合成し、アミロイド凝集体への結合性を評価したところ、1 価、2 価錯体が A β 結合性を有することが示された。さらに PIB を用いた競合阻害実験では、アミロイドリガンドの錯体への導入数の増加に伴う A β 結合性の向上が認められた。そこで、最も強い結合性を示した SB2 を用いて、Tg2576 マウスでの ex

vivo ARG を行ったところ、SB2 は脳内アミロイドを明瞭に描出することに成功した。以上の結果から、2 価 ^{99m}Tc -Ham 錯体を基盤とした分子設計が CAA イメージングプローブの開発において有効である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Iikuni S, Ono M, Watanabe H, Matsumura K, Yoshimura M, Harada N, Kimura H, Nakayama M, Saji H. Enhancement of Binding Affinity for Amyloid Aggregates by Multivalent Interactions of ^{99m}Tc -Hydroxamamide Complexes. *Mol Pharm*, 査読有, 11, 2014, 1132-1139.

DOI: 10.1021/mp400499y.

② Iikuni S, Ono M, Watanabe H, Yoshimura M, Ishibashi-Ueda H, Ihara M, Saji H.

Novel Bivalent ^{99m}Tc -Complex with N-Methyl-Substituted Hydroxamamide as Probe for Imaging of Cerebral Amyloid Angiopathy. *PLoS ONE*, 査読有, 11, 2016, e0163969.

DOI: 10.1371/journal.pone.0163969.

③ Iikuni S, Ono M, Watanabe H, Matsumura K, Yoshimura M, Kimura H, Ishibashi-Ueda H, Okamoto Y, Ihara M, Saji H. Imaging of Cerebral Amyloid Angiopathy with Bivalent ^{99m}Tc -Hydroxamamide Complexes. *Sci Rep*, 査読有, 6, 2016, 25990.

DOI: 10.1038/srep25990.

[学会発表] (計 5 件)

① 飯國 慎平、小野 正博、渡邊 裕之、木村 寛之、佐治 英郎、2 価 ^{99m}Tc 錯体を用いた脳アミロイドアンギオパチーの生体イメージング、第 12 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマ・フォーラム、2014 年 7 月、箱根

② 飯國 慎平、小野 正博、渡邊 裕之、木村 寛之、佐治 英郎、脳アミロイドアンギオパチーの核医学イメージングを目的とした 2 価 ^{99m}Tc 錯体の開発、第 54 回日本核医学会学術総会、2014 年 11 月、大阪

③ 飯國 慎平、小野 正博、渡邊 裕之、木村 寛之、佐治 英郎、脳アミロイドアンギオパチーの核医学イメージングを目的とした ^{99m}Tc 標識ベンゾチアゾール誘導体の開発、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月、神戸

④ 飯國 慎平、小野 正博、渡邊 裕之、

木村 寛之、佐治 英郎、脳アミロイドアンギオパチーイメージングを目的とした新規 2 価 ^{99m}Tc 錯体の合成と評価、第 55 回日本核医学会学術総会、2015 年 11 月、東京

⑤ 小野 正博、多価 ^{99m}Tc 錯体を用いる脳アミロイドアンギオパチーの核医学イメージング、第 56 回日本核医学会学術総会、2016 年 11 月、名古屋

[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]

研究室 HP

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byotai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 正博 (ONO, Masahiro)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80336180

(2) 連携研究者

天満 敬 (TEMMA, Takashi)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90378787

木村 寛之 (KIMURA, Hiroyuki)

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

佐野 紘平 (SANO, Kohei)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00546476

渡邊 裕之 (WATANABE, Hiroyuki)

京都大学・大学院薬学研究科・研究員

研究者番号：40710786

猪原 匡史 (IHARA, Masafumi)

国立循環器病研究センター・脳血管内科・医長

研究者番号：00372590

(3) 研究協力者

松村 憲志 (MATSUMURA, Kenji)

京都大学・大学院薬学研究科・大学院生

吉村 優志 (YOSHIMURA, Masashi)

京都大学・大学院薬学研究科・大学院生

飯國 慎平 (IIKUNI, Shimpei)

京都大学・大学院薬学研究科・大学院生