

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04260

研究課題名(和文) パーキンソン病における シヌクレインを標的とする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 that target alfa-synuclein in Parkinson's disease

研究代表者

小野 正博 (Ono, Masahiro)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：80336180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)はドパミン神経細胞の減少を主因とする神経変性疾患である。このドパミン神経細胞死には、シヌクレインタンパク質( $\alpha$ -syn)凝集体を主成分とするレビー小体の関与が指摘されている。本研究の目的は、PD患者脳内に沈着した $\alpha$ -syn凝集体に特異的結合性を示す核医学分子イメージングプローブを開発することである。本研究では $\alpha$ -synイメージングプローブの候補化合物を合成・評価し、その有用性を明らかにした。 $\alpha$ -synを標的とした分子イメージング法の開発は、PDの早期診断を可能にするのみならず、その発症過程の病態解明、治療薬の開発支援にも貢献し得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発する新規プローブを用いたシヌクレインの生体イメージングが可能となれば、パーキンソン病(PD)の早期診断への応用が期待できる。さらに、アミロイドイメージングおよびタウイメージングと組み合わせると、生体融合脳イメージングによる鑑別診断への応用も可能になると考えられる。治療薬のスクリーニングのツールとしても応用可能であることから、シヌクレインを標的分子とするPDの創薬研究への貢献も期待できる。さらに、シヌクレイン凝集体は、認知症の中でも患者数の多いレビー小体型認知症(DLB)においても観察される病理学的変化であり、DLBの診断・創薬研究への応用の可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease (PD) is one of major neurodegenerative disorders. It is generally known that Lewy body composed of  $\alpha$ -synuclein aggregates shows high toxicity to neuronal cells. The aim of this study is to develop nuclear medical imaging probes that specifically bind to  $\alpha$ -synuclein aggregates deposited in the brain of PD patients. We designed and synthesized some candidate compounds as  $\alpha$ -synuclein imaging probes, and evaluated their utility by performing in vitro and in vivo experiments. The development of this new molecular imaging technique may lead to not only early diagnosis of PD but also elucidation of pathogenesis and development of therapeutics of PD.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード： $\alpha$ -synuclein imaging Parkinson's disease

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は、中脳黒質にあるドパミン神経細胞の減少を主因とする神経変性疾患である。神経変性疾患の中では、アルツハイマー病(AD)に次いで患者数が多く、運動機能の障害の症状を中心とする神経変性疾患の中では最も罹患者数の多い疾患である。現在、PDの早期診断法および治療法は開発されていないことから、PDの早期診断・治療に対する社会的ニーズは高く、その早急な開発が強く望まれている。PDの特徴的な病理学的変化として、中脳黒質や青斑核における神経細胞の減少とともに、これら部位の残存した神経細胞にレビー小体とよばれる細胞内封入体を認める。弧発性PDで認められるレビー小体の主要な構成成分は $\alpha$ シヌクレインタンパク質( $\alpha$ -syn)であることが知られている。 $\alpha$ -synは、正常な状態では特定の折りたたみ構造を持たずに可溶性の単量体として存在するが、 $\beta$ シート構造を形成し、高濃度に発現すると $\beta$ シート構造に富んだ、オリゴマーおよび線維状アミロイド凝集体を形成する。細胞内封入体を形成するまでの、この凝集体の生成過程のオリゴマーや線維状アミロイドの細胞毒性がPDの原因物質として注目されている。

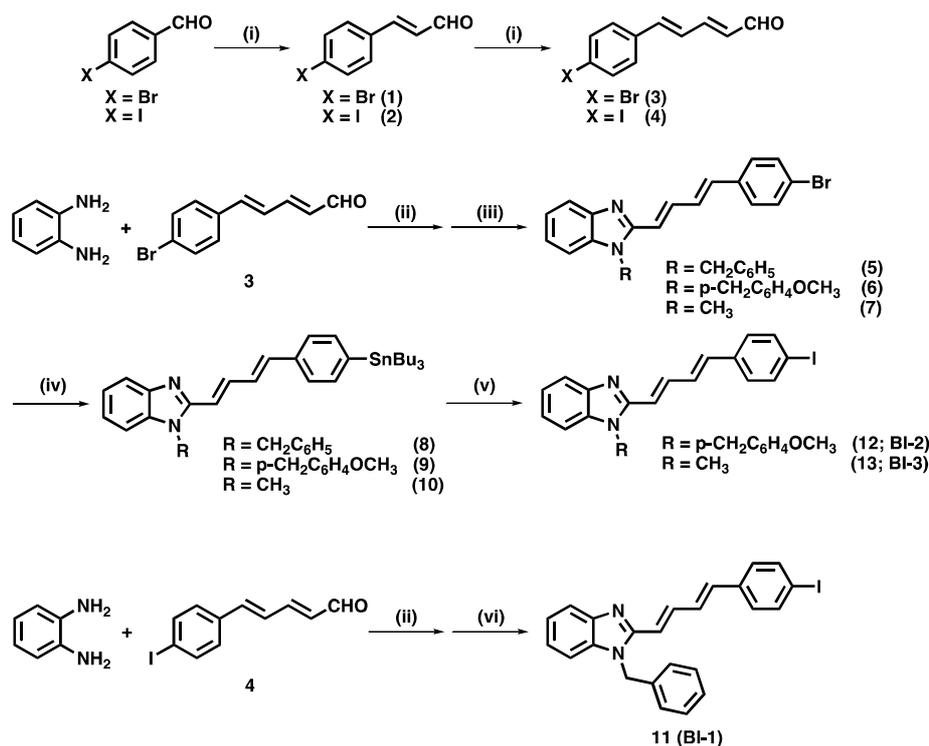
### 2. 研究の目的

本研究の目的は、 $\alpha$ -syn イメージングプローブの候補化合物を合成し、それら化合物群から、インビトロ結合実験における $\alpha$ -synへの高い選択的結合性、正常マウスにおける高い脳移行性と速やかな消失性を示し、さらに病態モデルマウスにおける $\alpha$ -syn凝集体のインビボイメージングを可能とする化合物を見出し、その $\alpha$ -syn凝集体イメージングプローブとしての有用性を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### ベンゾイミダゾール(BI)誘導体の合成

BI誘導体(BI-1, BI-2, BI-3)はScheme 1に従って合成した。



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (i) 1) (1, 3-dioxolan-2-yl)methyl-triphenylphosphonium bromide, 18-crown-6, NaH, THF, rt; 2) 20% HCl, THF, rt; (ii)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , DMF, 105°C; (iii) 1) NaH, DMF, 0°C; 2) (bromomethyl)benzene, 1-(chloromethyl)-4-methoxybenzene, or iodomethane, DMF, rt; (iv)  $(\text{SnBu}_3)_2$ ,  $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ , dioxane,  $\text{Et}_3\text{N}$ , 95°C; (v)  $\text{I}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$ , rt; (vi) 1) NaH, DMF, 0°C; 2) (bromomethyl)benzene, DMF, rt.

### 蛍光飽和実験による解離定数 ( $K_d$ )の算出

最終濃度が 0-20  $\mu\text{M}$  になるように希釈した BI 誘導体および最終濃度が 2.2  $\mu\text{M}$  になるように調製した  $\alpha\text{-syn}$  またはアミロイド  $\beta$  ( $\text{A}\beta$ )凝集体を混合した。室温で 30 分間インキュベートした後、蛍光プレートリーダー(M200PRO, TECAN 社製)を用いて各濃度における蛍光波長を測定し、GraphPad Prism 5.0 で飽和曲線を作成することで  $K_d$  値を求めた。

### 蛍光染色

PD およびアルツハイマー(AD)患者剖検脳組織切片を、キシレン(15 分 $\times$ 2), 100% EtOH (1 分 $\times$ 2), 90% EtOH (1 分 $\times$ 1), 70% EtOH (1 分 $\times$ 1)および精製水(2.5 分 $\times$ 2)で洗浄することで脱パラフィン処理を行った。BI-2 の 50% EtOH 溶液(200  $\mu\text{M}$ )を添加し、室温で 15 分間インキュベートした後に、Nuance FX (Caliper Life Sciences 社製)を備え付けた蛍光顕微鏡(Eclipse 80i, ニコン社製)を用いて蛍光観察を行った。

### $\alpha\text{-syn}$ の免疫染色

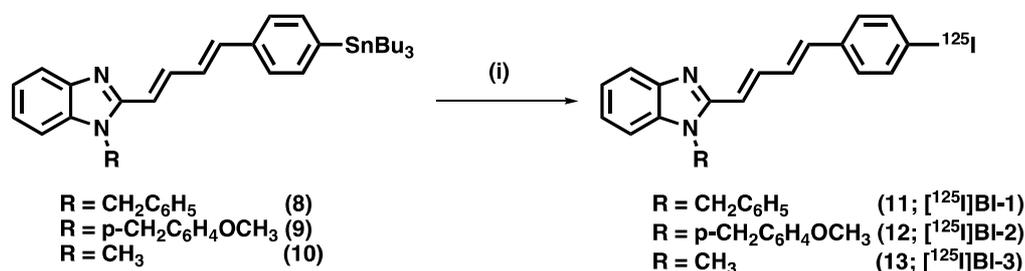
蛍光染色と同一切片を用いて、 $\alpha\text{-syn}$  の免疫染色を行った。ギ酸処理を行った後、1 次抗体として抗リン酸化  $\alpha\text{-syn}$  抗体(pSyn#64)を用いて 4  $^\circ\text{C}$  で 3 時間反応させた。PBST(5 分 $\times$ 3)で洗浄した後、Alexa Fluor 647 で標識された 2 次抗体と 4  $^\circ\text{C}$  で 1 時間反応させた。次いで、PBST(5 分 $\times$ 1)で洗浄した後に、蛍光顕微鏡(FSX100, オリンパス社製)を用いて蛍光観察を行った。

### $\text{A}\beta$ の免疫染色

蛍光染色と同一切片を用いて、 $\text{A}\beta$  の免疫染色を行った。ギ酸処理を行った後、1 次抗体として抗  $\text{A}\beta$  抗体(BC05)を用いて室温で 1 時間反応させた。PBST (5 分 $\times$ 3)で洗浄した後、Alexa Fluor 488 で標識された 2 次抗体と室温で 1 時間反応させた。次いで、PBST (5 分 $\times$ 1)で洗浄した後に、蛍光顕微鏡(FSX100, オリンパス社製)を用いて蛍光観察を行った。

### $^{125}\text{I}$ 標識 BI 誘導体の合成

Scheme 2 に従って BI 誘導体の  $^{125}\text{I}$  標識を行った。得られた  $^{125}\text{I}$  標識化合物は、それぞれ対応する非放射性化合物を標品として逆相 HPLC (水 : アセトニトリル = 3 : 7)で分離精製した。精製は島津社製 HPLC 分析装置およびナカライ社製カラム(COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II, 4.6  $\times$  150 mm) を用いて行った。



Scheme 2. Reagents and conditions: (i) [ $^{125}\text{I}$ ]NaI, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 1 N HCl, rt.

## 正常マウスにおける体内放射能分布実験

1 群 5 匹の正常マウス(ddY マウス、5 週齢、雄性)に、10%EtOH 含有生理食塩水に溶解した  $[^{125}\text{I}]\text{BI}$  誘導体(20 kBq/100  $\mu\text{L}$ )を尾静脈より投与し、2, 10, 30, 60 分後に屠殺、採血後、主要な臓器を取り出した。血液および各臓器の重量と放射能とを測定し、単位重量あたりの放射能集積量 % ID/g (% injected dose/g)を算出した。

## 4. 研究成果

### 結合飽和実験

BI 誘導体は、 $\alpha\text{-syn}$  および  $\text{A}\beta$  凝集体に結合した際に蛍光強度の上昇を示すことから、その作用を用いた蛍光飽和実験を行い、 $K_d$  値を算出した (Table 1)。その結果、BI-1, BI-2 および BI-3 の  $\alpha\text{-syn}$  凝集体に対する  $K_d$  値はそれぞれ 485, 99.5, 874 nM となった。また  $\text{A}\beta$  凝集体に対する  $K_d$  値は 179, 727, 271 nM であり、BI-2 のみ  $\text{A}\beta$  に対して  $\alpha\text{-syn}$  凝集体への選択的結合性を示した。

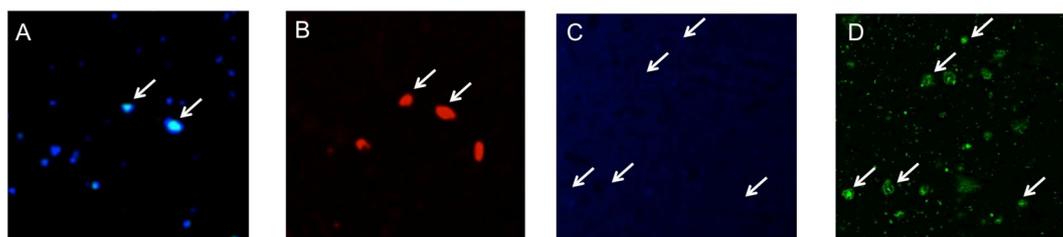
**Table 1.**  $K_d$  values of BI derivatives for recombinant  $\alpha\text{-syn}$  and  $\text{A}\beta$  aggregates

Compounds	$K_d$ (nM) <sup>a</sup>	
	$\alpha\text{-syn}$	$\text{A}\beta$
BI-1	485 $\pm$ 160	179 $\pm$ 59.1
BI-2	99.5 $\pm$ 20.8	727 $\pm$ 227
BI-3	874 $\pm$ 169	271 $\pm$ 67.3

<sup>a</sup>Values are the mean  $\pm$  standard error of the mean for three independent experiments.

### 蛍光染色および免疫染色

PD 患者脳内に蓄積した  $\alpha\text{-syn}$  凝集体および AD 患者脳内に蓄積した  $\text{A}\beta$  凝集体への結合親和性を詳細に検討するため、PD および AD 患者剖検脳組織切片を用いた蛍光染色および免疫染色を行った。その結果、PD 患者の脳組織切片上において BI-2 由来の複数の蛍光スポットが認められた一方で、AD 患者脳切片においては目立った蛍光スポットは観察されなかった。さらに、同一切片を用いた抗リン酸化  $\alpha\text{-syn}$  抗体による免疫染色において、BI-2 によって得られた蛍光染色陽性部位と一致する免疫染色陽性部位が認められた (Figure 2)。



**Figure 2.** Fluorescence staining of BI-2 in midbrain sections from a PD patient (A) and cortical sections from an AD patient (C). Immunohistochemical staining with fluorescent antibody against  $\alpha\text{-syn}$  (B) and  $\text{A}\beta$  (D).

### 正常マウスを用いた体内動態評価

正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行い、BI 誘導体の脳内挙動を評価した (Table 2)。その結果、 $[^{125}\text{I}]\text{BI-3}$  は投与後 2 分における脳内移行性 (1.89% ID/g) およびその後のクリアランス (投与後 30 分で 1.0% ID/g, 投与後 60 分で 0.53% ID/g) を示した。一方で、 $[^{125}\text{I}]\text{BI-1}$  および  $[^{125}\text{I}]\text{BI-2}$  の投与後 2 分での脳移行性は低く (0.52 および 0.56% ID/g)、その後の滞留傾向も認められた。また、いずれの化合物も投与早期における肝臓への高い集積 (投与後 2 分で 11.1-30.6% ID/g) を示し、その後、経時的に腸への集積 (投与後 60 分で 11.6-17.8% ID/g) を示した。また、脱ヨウ素化代謝の指標となる甲状腺への顕著な集積は認められなかった (投与後 60 分で 0.07-0.14% ID)。

**Table 2.** Biodistribution of radioactivity after intravenous injection of [<sup>125</sup>I]BI-1, [<sup>125</sup>I]BI-2, and [<sup>125</sup>I]BI-3 in normal mice<sup>a</sup>

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[ <sup>125</sup> I]BI-1				
Blood	4.98 (0.85)	1.66 (0.37)	1.07 (0.25)	0.75 (0.09)
Liver	29.93 (2.57)	19.33 (3.35)	13.79 (1.73)	9.18 (1.13)
Kidney	10.49 (0.57)	8.72 (1.56)	5.99 (0.92)	4.52 (0.71)
Intestine	1.64 (0.23)	5.82 (1.74)	11.23 (2.39)	17.02 (3.85)
Spleen	5.05 (1.30)	3.32 (0.74)	2.05 (0.23)	1.60 (0.21)
Pancreas	2.90 (0.52)	3.21 (0.40)	2.76 (0.45)	2.07 (0.48)
Heart	11.84 (1.28)	7.74 (1.75)	3.93 (0.63)	2.21 (0.50)
Lung	15.31 (3.61)	4.19 (1.14)	2.58 (0.36)	1.70 (0.44)
Stomach <sup>b</sup>	0.86 (0.19)	1.23 (0.82)	2.27 (0.75)	1.57 (0.63)
Brain	0.52 (0.06)	0.54 (0.11)	0.61 (0.08)	0.65 (0.09)
Thyroid <sup>b</sup>	0.12 (0.04)	0.10 (0.03)	0.08 (0.02)	0.07 (0.03)
[ <sup>125</sup> I]BI-2				
Blood	4.78 (0.92)	1.53 (0.28)	1.06 (0.20)	0.61 (0.09)
Liver	30.57 (7.60)	25.63 (6.19)	18.03 (5.79)	13.06 (3.34)
Kidney	9.34 (1.58)	8.35 (1.81)	6.91 (2.07)	4.36 (1.06)
Intestine	1.38 (0.41)	3.60 (0.68)	8.82 (2.83)	11.55 (3.20)
Spleen	4.38 (1.02)	3.34 (0.93)	2.01 (0.62)	1.46 (0.40)
Pancreas	2.34 (0.43)	2.74 (0.54)	2.72 (0.68)	1.50 (0.70)
Heart	9.58 (1.61)	7.36 (1.97)	3.81 (0.90)	1.79 (0.51)
Lung	15.30 (3.26)	6.10 (2.12)	2.82 (0.91)	1.56 (0.48)
Stomach <sup>b</sup>	0.55 (0.12)	1.11 (0.91)	2.34 (1.89)	1.50 (0.42)
Brain	0.56 (0.13)	0.48 (0.10)	0.52 (0.03)	0.45 (0.07)
Thyroid <sup>b</sup>	0.12 (0.06)	0.19 (0.10)	0.13 (0.03)	0.14 (0.07)
[ <sup>125</sup> I]BI-3				
Blood	2.88 (0.95)	1.83 (0.55)	1.37 (0.41)	0.94 (0.15)
Liver	11.08 (0.78)	15.77 (2.22)	14.03 (5.00)	9.23 (2.41)
Kidney	7.90 (0.64)	6.78 (1.35)	6.45 (1.84)	7.69 (1.19)
Intestine	1.61 (0.24)	5.25 (0.60)	11.62 (2.79)	17.38 (2.49)
Spleen	1.57 (0.40)	2.67 (0.29)	1.79 (0.46)	1.18 (0.20)
Pancreas	3.47 (0.21)	4.68 (1.66)	1.60 (0.48)	1.02 (0.15)
Heart	7.89 (0.59)	2.48 (0.58)	1.46 (0.51)	1.01 (0.27)
Lung	6.00 (1.08)	3.18 (1.10)	2.10 (0.59)	1.38 (0.22)
Stomach <sup>b</sup>	0.75 (0.12)	1.49 (0.84)	2.56 (1.20)	3.96 (0.90)
Brain	1.89 (0.18)	1.87 (0.30)	1.00 (0.33)	0.53 (0.09)
Thyroid <sup>b</sup>	0.05 (0.04)	0.06 (0.01)	0.08 (0.03)	0.14 (0.02)

<sup>a</sup>Expressed as % injected dose per gram. Each value represents the mean (SD) for 5 animals.

<sup>b</sup>Expressed as % injected dose per organ.

以上の結果より、結合選択性および脳移行性の向上のためのさらなる構造の最適化を行う必要があるものの、ベンゾイミダゾール骨格は  $\alpha$ -syn イメージングプローブとしての基礎的性質を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe H, Ariyoshi T, Ozaki A, Ihara M, Ono M, Saji H	4. 巻 25
2. 論文標題 Synthesis and biological evaluation of novel radioiodinated benzimidazole derivatives for imaging $\alpha$ -synuclein aggregates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem	6. 最初と最後の頁 6398-6403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2017.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe H, Ono M, Ariyoshi T, Katayanagi R, Saji H	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel benzothiazole derivatives as fluorescent probes for detection of $\alpha$ -amyloid and $\alpha$ -synuclein aggregates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ACS Chem Neurosci	6. 最初と最後の頁 1656-1662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchemneuro.6b00450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有吉 泰亮, 渡邊 裕之, 小野 正博, 佐治 英郎
2. 発表標題 シヌクレインイメージングプローブの開発を目的とした新規ベンゾイミダゾール誘導体の合成と評価
3. 学会等名 第12回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 貝出 翔, 渡邊 裕之, 志水 陽一, 飯國 慎平, 長谷川 成人, 伊東 恭子, 小野 正博
2. 発表標題 シヌクレインの生体イメージングを目的としたビスキノリン誘導体の合成および評価
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	渡邊 裕之 (Watanabe Hiroyuki)		