

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04269

研究課題名(和文) PETマイクロドーズ試験による認知症治療薬としてのイソプロテレノールの用量設定

研究課題名(英文) PET microdose study for finding appropriate dose of isoproterenol as a disease modifying treatment of dementia

研究代表者

伊藤 健吾 (Ito, Kengo)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・治験・臨床研究推進センター・センター長

研究者番号：70184653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：イソプロテレノールは、アルツハイマー病における神経細胞脱落を抑制する薬剤として報告されたが、そのために必要な脳内最低有効濃度を、ヒトにおいて副作用なく達成できるかどうかは明らかではない。本研究では、C-11で標識したイソプロテレノールを健常ラットに投与し、陽電子断層撮像および血液放射能分析を行い、平衡状態における血漿中と脳内の濃度比は2程度であることを明らかにした。また、11C-イソプロテレノールの放射性薬剤としてのヒトにおける安全性を評価したところ、被曝線量、毒性に問題はなかったが、受容体刺激活性が低いID体においても薬理作用が強く、マイクロドーズ試験を実施することは困難と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、既存治療薬の新たな薬効の発見によって、アルツハイマー病の病態に基づいた新規治療薬を開発する過程において、最適な用量を決定するためのマイクロドーズ試験で行うプロセスをラットにおいて実施したものである。今後の同様な創薬に応用可能な学術的意義を有し、実際の創薬の効率を向上させうる社会的意義も有している。同様のプロセスを臨床で実施することによって、直接的に至適容量を決定できる可能性があるが、今回のように活性が非常に高い物質の場合は解決すべき技術的な課題があることも明確になった。

研究成果の概要(英文)：Isoproterenol has been reported to have the potential as a drug for the treatment of Alzheimer's disease by inhibiting the aggregation of tau protein. It is critical to know if potentially effective therapeutic levels of isoproterenol can be achieved, maintaining safe plasma levels without any untoward pharmacological effects. We found that the concentration of C-11 labeled isoproterenol in the rat brain at equilibrium was about two-fold higher than in the plasma using positron emission tomography and blood analysis. However, a microdosing study in humans was not able to conduct because of the high potency of the drug, causing increases in heart rates even with a dose of 11C-isoproterenol for positron emission tomography study.

研究分野：脳神経核医学

キーワード：イソプロテレノール マイクロドーズ試験 陽電子断層撮像法 PET

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病の治療戦略

アルツハイマー病は、認知症の原因の約半数を占める、進行性の認知機能障害をきたす疾患である。その治療にはアセチルコリンエステラーゼ阻害剤や NMDA 受容体阻害薬が用いられるが、病状の進行を抑制する作用は十分ではない。さらに、アルツハイマー病の主要病理である老人斑の構成成分である アミロイドを除去する目的で、アミロイド抗体の臨床試験が行われたが、老人斑は除去されたものの認知機能低下の進行は抑制されなかった (Holmes et al. Lancet, 2008)。そこで、より神経脱落や認知機能低下と密接に関係が明らかになっているもう一つの主要病理である、神経原線維変化を標的とした創薬が試みられている (Giacobini et al. Nat. Rev. Neurol. 2013)。

神経原線維変化はタウ線維で構成されており、タウ蛋白の単量体がシステイン残基を介してオリゴマーを形成し、システイン以外の領域での結合が加わって顆粒状タウオリゴマーとなり、これが結合しあってタウ線維になる事が明らかになっている (Sahara et al. Eur. J. Neurosci. 2007)。この顆粒状タウオリゴマーの神経毒性が強いことより、神経脱落の阻止を目的として顆粒状タウオリゴマーの形成を阻害する物質が探索され、カテコール化合物にタウ蛋白凝集抑制作用がある事が明らかになった (Soeda et al. Nat commun, 2015)。

(2) イソプロテレノールによるタウ蛋白凝集抑制

イソプロテレノールはカテコール化合物で、アドレナリン 受容体アゴニストとして徐脈の治療に認可された薬剤である (図 1)。前述のタウ凝集抑制作用を認め、かつ血液脳関門透過性を認めるため、アルツハイマー病の治療薬として有望と考えられる。イソプロテレノールをタウ発現モデルマウスに長期経口投与したところ、コントロール群に比べてタウ凝集の抑制、神経細胞脱落の抑制、行動異常の軽減を認めた (図 2、Soeda et al. Nat commun, 2015)。しかし、イソプロテレノールをタウ凝集抑制薬としてヒトに応用するにあたり、マウスによる検討でタウ凝集抑制作用をきたすための脳内最低有効濃度であった 1.4 nM が、副作用の懸念が少ない臨床認用量の範囲で達成できるかは明らかではない。

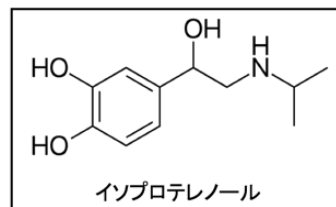


図 1、イソプロテレノールの構造式

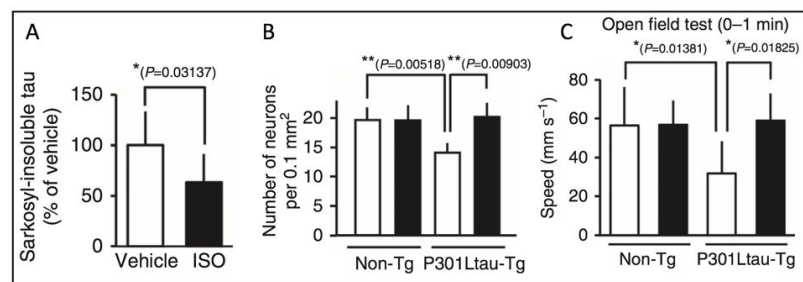


図 2、タウ発現モデルマウス (P301L) におけるイソプロテレノール長期投与によるタウ凝集の抑制 (A)、神経細胞脱落の抑制 (B)、行動異常の軽減 (C) 効果

(3) PET を用いた用量設定試験

ポジトロン断層撮影 (PET) は、<sup>11</sup>C や <sup>18</sup>F のようなポジトロン (陽電子) 放出核種で標識した薬物を生体内に投与し、標識薬物の生体内における動態を明らかにする方法である。この方法は、ヒト生体において薬剤の作用部位における濃度を非侵襲的に測定するための唯一の方法である。申請者らはこれまでに <sup>11</sup>C 標識化アセトンとノルアドレナリンを用いた還元的アミノ化反応によりイソプロテレノールの <sup>11</sup>C 標識を可能にした (図 3、分子イメージング国際会議 2016、特許出願済)。

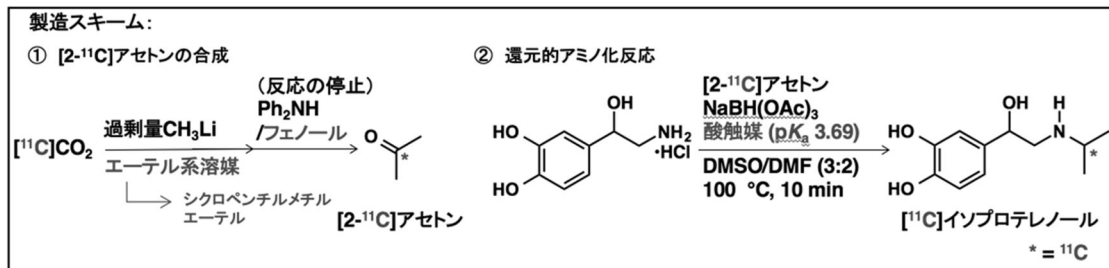


図 3、<sup>11</sup>C 標識化アセトンとノルアドレナリンを用いた還元的アミノ化反応によるイソプロテレノールの <sup>11</sup>C 標識体合製法

## 2. 研究の目的

本研究では、この <sup>11</sup>C-イソプロテレノールの安全性を評価の上、放射性薬剤としてヒトに投与し、PET で全身/脳ダイナミック撮像と血漿中薬剤濃度を同時測定すること (PET マイクロドーズ試験) で、イソプロテレノールのヒトにおける全身動態、脳移行性、血漿中濃度-脳内濃度関係を明らかにし、タウ凝集抑制としてのイソプロテレノールの適切な用量設定を可能にすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) <sup>11</sup>C-イソプロテレノールの製造プロセスの最適化

<sup>11</sup>C-イソプロテレノールの合成は、<sup>11</sup>C 標識化アセトンとノルアドレナリンを用いた還元的アミノ化反応により可能となったが (図 3) 本研究の究極的な目的はイソプロテレノールを新規アルツハイマー病治療薬として開発することであるため、信頼性のある動態評価を行うには使用する PET 薬剤はその品質が保証される必要がある。そこで、日本核医学会の指針「分子イメージング臨床研究に用いる PET 薬剤についての基準、I. 製造基準」(第 3.1 版、2015 年 12 月) に基づいた製造、品質管理を行うため、製造プロセスの最適化を行った。

### (2) ラットにおける <sup>11</sup>C-イソプロテレノールの脳内移行性評価

<sup>11</sup>C-イソプロテレノールを申請者の所属する研究センターにおいて合成し、CrI:CD(SD) ラット (8 週齢) に投与後、小動物用 PET-CT カメラ (GAMMA MEDICA-IDEAS 社製 FX-3200) を用いて頭部のダイナミック撮像を行った。また、同時に頻回に動脈採血を行い、血漿中の放射能濃度を測定した。また、radio-HPLC 装置を用いて、血漿中の放射性代謝物分析を行った。得られたラット PET 画像は、ラットの T2-weighted MR 画像テンプレートにレジストレーションし、脳構造に沿った三次元的な関心領域を設定し、組織中の時間放射能曲線を得た。組織中及び血漿中の時間放射能曲線よりコンパートメントモデル解析を行い、<sup>11</sup>C-イソプロテレノールの分布容積を算出し、<sup>11</sup>C-イソプロテレノールのラットにおける血漿中濃度-脳内濃度関係を明らかにした。

### (3) <sup>11</sup>C-イソプロテレノールの経時的体内分布およびヒト被曝線量評価

<sup>11</sup>C-イソプロテレノールを投与した時に受ける被曝線量をマウスにおいて評価する。米国核医学会 MIRD 法に従い、単位放射能あたりの実効線量を推定した。具体的には、雄性 ddY マウスに申請者の所属する研究センターにおいて合成した <sup>11</sup>C-イソプロテレノール注射液 0.1 mL (約 5 MBq) を尾静脈投与し、1, 5, 15, 30, 60 及び 90 分後に屠殺し、放射能の体内分布を計算した (各群 4 匹、計 24 匹)。この放射能の経時的な体内分布をヒト体内分布に重量換算後に被曝線量推定ソフト OLINDA/EXM によって MIRD 法に基づく実効線量を推定した。

### (4) <sup>11</sup>C-D-イソプロテレノールの毒性評価、薬理効果評価

<sup>11</sup>C-イソプロテレノールの有効成分であるイソプロテレノールは、医薬品として承認され臨床的に使用されている (インタビューフォーム)。一方、後述の検討の結果、注射剤として承認されている L 体ではなく、L 体とほぼ同等のタウ凝集抑制効果を認め、受容体刺激活性が低い異性体である D 体の <sup>11</sup>C-D-イソプロテレノールを PET 用放射性薬剤として使用する方針としたため、D-イソプロテレノールの毒性評価が必要となった。そこで、日本核医学会の指針「分子イメージング臨床研究に用いる PET 薬剤についての基準、II. 非臨床安全性基準」(2011 年 11 月一部修正) に従い D-イソプロテレノールの拡張型単回投与毒性試験を実施した。

具体的には、D-イソプロテレノールの PET 用放射性薬剤としての臨床投与容量の 100 倍となる 4 µg/kg を雌雄各 15 匹の CrI:CD(SD) ラットに単回静脈内投与し、投与翌日に 10 匹及び投与後 14 日に 5 匹を剖検して、毒性について検討する。対照群 (雌雄各 15 匹) には溶媒を同様の方法で投与し比較する。検討項目は、一般状態、体重、摂餌量、血液学的検査、

血液生化学的検査、剖検及び器官重量とした。

また薬理効果評価として、CrI:CD(SD)ラット（8週齢）に D-イソプロテレノールを 4 μg/kg 経静脈投与し、脈拍を経時的に評価した。

#### 4. 研究成果

<sup>11</sup>C-イソプロテレノールの合成は、<sup>11</sup>C二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)を放射性前駆体とする[2-<sup>11</sup>C]アセトンの合成と、ノルエピネフリンと[2-<sup>11</sup>C]アセトンの還元的アルキル化反応との連続自動合成によって行い、最適な還元剤と酸触媒の組み合わせの選択を進めることで、<sup>11</sup>C 標識 PET 製剤として最大収量 2 GBq、比放射能 100 GBq/μmol、放射科学純度>99%を達成し、一般的な臨床用 PET 製剤と同程度の品質での合成が可能となった。

健常ラットにおいて、経静脈投与された <sup>11</sup>C-イソプロテレノールは、脳内の放射能は SUV 0.5 程度の早いピークと洗い出しを認め、平衡状態における血漿中と脳内の濃度比である分布容積は 2 mL/cm<sup>3</sup> 程度であった(図 4)。脳内放射能の代謝物分析を行ったところ、脳内放射能はおもに未変化体由来であったため、ヒトにおいても PET を用いてイソプロテレノールの脳移行性が評価可能であると考えられた。

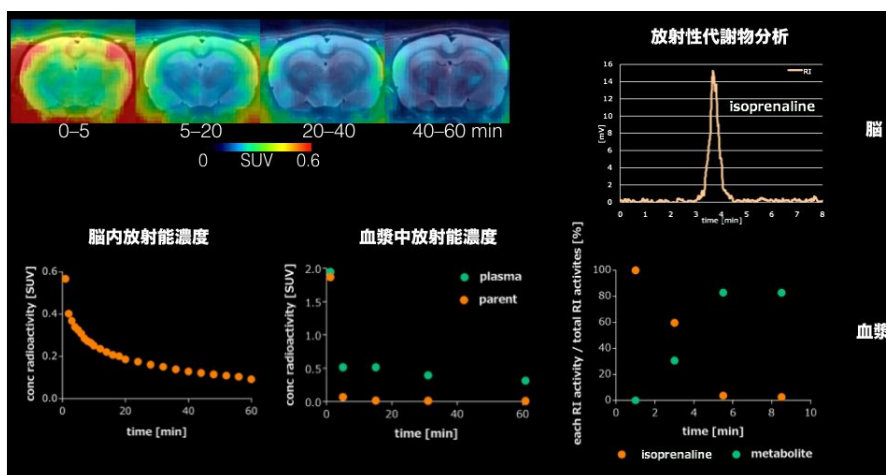


図 4、<sup>11</sup>C 標識イソプレナリンの健常ラットにおける脳内・血漿中動態、代謝物分析

<sup>11</sup>C 標識イソプロテレノール注射液投与後の雄性 ddY マウスにおける臓器等の放射能分布の経時変化を評価した(図 4)。投与後 1 分では、腎臓、心臓、肺、肝臓の順に高い放射能濃度を認めたが、その集積は時間とともに急速に減少した。一方で、膀胱壁への集積は、投与後 5-60 分まで高値を示し、その後減少した。脾臓、上部大腸、精巣、筋肉、骨、脳への集積は相対的に低かった。この放射能経時分布から、ヒトに <sup>11</sup>C-イソプロテレノール注射液を投与した場合の成人ヒト各臓器における吸収線量は、膀胱壁で最も高く、腎臓、下部大腸の順に高値を示した(図 5)。これらの吸収線量に基づいて計算された実効線量は、ヒト成人男性で 5.9 μSv/MBq、女性で 7.5 μSv/MBq であると推定された。したがって、<sup>11</sup>C 標識イソプロテレノール注射液は、被曝線量に関して一般的な <sup>11</sup>C 標識 PET 薬剤と同等の安全性を有していると考えられた。

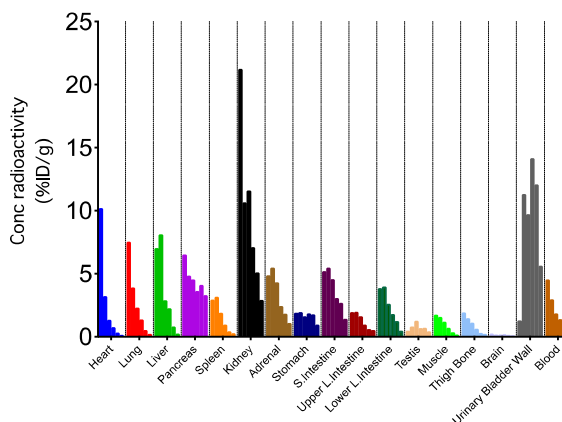


図 4、<sup>11</sup>C 標識イソプロテレノール注射液投与後の雄性 ddY マウスにおける臓器等の放射能分布の経時変化（投与 1, 5, 15, 30, 60 及び 90 分後）

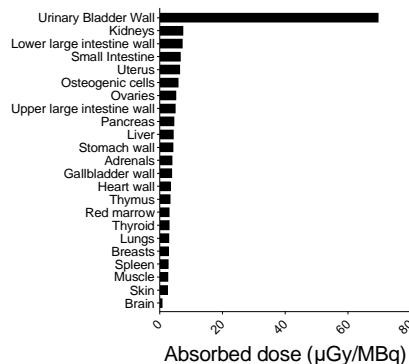


図 5、<sup>11</sup>C 標識イソプレナリン注射液投与後の成人女性各臓器における吸収線量

しかし、ヒトにおいてイソプロテレノールの経静脈投与は、0.5 μg の経静脈ボラス投与で、自覚症状を伴わずかな脈拍の上昇（3 拍/分）を認めていた（Khalsa et al. 2009）。したがって、上述の品質の PET 製剤の投与においても人への投与量はイソプロテレノール 0.5 μg 相当となり、薬理作用をきたすことが予測された。そこで、イソプロテレノールの薬理作用に対する対策として、イソプロテレノール(DL 体)とほぼ同等のタウ凝集抑制効果を認め、受容体刺激活性が低い異性体である D 体への変更を検討し、その <sup>11</sup>C 標識合成に成功した。D-イソプロテレノールの受容体刺激活性は DL 体の 1/50 程度と報告されている(Dornhorst and Herxheimer 1958)。

D-イソプロテレノールの安全性評価として、GLP 基準下で拡張型単回毒性試験を実施した結果、対照群を含む投薬群で淡赤色、緑もしくは赤褐色の尿が観察された以外、投薬に起因する異常はみられなかった。従って、D-イソプロテレノール L-酒石酸塩の 4 μg/kg をラットに単回静脈内投与しても毒性はみられなかった。一方、D-イソプロテレノール 4 μg/kg をラットに経静脈投与した時の薬理作用を評価したところ、最大 16%程度の脈拍の増加を認めた。受容体刺激活性が低い D-イソプロテレノールにおいても、現状の比放射能 37 GBq/μmol 程度の規格では、薬理作用を認める用量の 1/100 以下の用量であることを要件とするマイクロドーズ試験を実施することは困難と考えられた。

## 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 Ikenuma Hiroshi, Koyama Hiroko, Kajino Naoya, Kimura Yasuyuki, Ogata Aya, Abe Junichiro, Kawasumi Yasuhiro, Kato Takashi, Takashima Akihiko, Ito Kengo, Suzuki Masaaki	4. 巻 29
2. 論文標題 Synthesis of (R,S)-isoproterenol, an inhibitor of tau aggregation, as an 11C-labeled PET tracer via reductive alkylation of (R,S)-norepinephrine with [2-11C]acetone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2107 ~ 2111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.07.005	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 Ogata Aya, Kimura Yasuyuki, Ikenuma Hiroshi, Yamada Takashi, Abe Junichiro, Koyama Hiroko, Suzuki Masaaki, Ichise Masanori, Kato Takashi, Ito Kengo	4. 巻 -
2. 論文標題 Brain pharmacokinetics and biodistribution of 11C-labeled isoproterenol in rodents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nucmedbio.2020.06.002	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Ikenuma H, Koyama H, Kajino N, Kimura Y, Ogata A, Abe J, Kawasumi Y, Kato T, Suzuki M, Ito K
2. 発表標題 Synthesis of 11C-Labeled (R,S)-Isoproterenol and Preclinical PET Study
3. 学会等名 The World Molecular Imaging Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ikenuma H, Koyama H, Kimura Y, Abe J, Kawasumi K, Ogata A, Kato T, Ito K, Suzuki M.
2. 発表標題 Synthesis of highly-qualified 11C-labeled (R,S)-isoproterenol aimed at a clinical study
3. 学会等名 The 12th Asia Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ogata A, Kimura Y, Ikenuma H, Koyama H, Seki C, Yamada T, Suzuki M, Kato T, Ito K.
2. 発表標題 Brain penetration of isoproterenol as a drug of dementia measured in rats with a micro-PET
3. 学会等名 The 12th Asia Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池沼 宏、古山浩子、木村泰之、阿部潤一郎、川角保広、小縣 綾、加藤隆司、伊藤健吾、鈴木正昭
2. 発表標題 臨床研究を目的とした11C標識化(R,S)-イソプロテレノールの高効率合成法の開発
3. 学会等名 第57回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小縣 綾、木村泰之、池沼 宏、古山浩子、関千江、山田貴史、鈴木正昭、加藤隆司、伊藤健吾
2. 発表標題 認知症治療薬としてのイソプロテレノールの小動物PETを用いたラット脳内移行性の検討
3. 学会等名 第57回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池沼宏、古山浩子、木村泰之、阿部潤一郎、川角保広、小縣綾、山田貴史、加藤隆司、伊藤健吾、鈴木正昭
2. 発表標題 Improved (R,S)-[11C]isoproterenol formulation toward clinical study
3. 学会等名 第59回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikenuma H, Ogata A, Kimura Y, Koyama H, Abe J, Yamada T, Ichise M, Kato T, Suzuki M, Ito K
2. 発表標題 Formulation of 11C-labeled (R,S)-isoproterenol and pharmacokinetic studies in rats.
3. 学会等名 Brain & Brain PET 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	木村 泰之 (Kimura Yasuyuki)  (20423171)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・室長  (83903)	
研究分担者	関 千江 (Seki Chie)  (40443080)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 脳機能イメージング研究部・研究員(任常)  (82502)	
研究分担者	古山 浩子 (Koyama Hiroko)  (50402160)	岐阜大学・工学部・准教授  (13701)	
研究分担者	山田 貴史 (Yamada Takashi)  (50531860)	名古屋経済大学・人間生活科学部管理栄養学科・准教授  (33923)	
研究分担者	加藤 隆司 (Kato Takashi)  (60242864)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・室長  (83903)	



## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 啓介  (Suzuki Keisuke)  (70635408)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・治験・臨床研究推進センター・部長    (83903)	
研究分担者	鈴木 正昭  (Suzuki Masaaki)  (90093046)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・研究員    (83903)	
研究協力者	池沼 宏  (Ikenuma Hiroshi)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・研究技術員    (83903)	
研究協力者	小縣 綾  (Ogata Aya)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・流動研究員    (83903)	