

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05092

研究課題名(和文)アルツハイマー病の診断・治療に資する新規SPECTプローブの創製

研究課題名(英文)Development of novel SPECT probes for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease

研究代表者

渡邊 裕之(Watanabe, Hiroyuki)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：40710786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)は先進諸国を中心に多くの罹患者がいるが、その診断・治療法は未だ確立されていない。A β オリゴマーの生成、タウ凝集体の蓄積、神経細胞死に対応した診断法の確立は、ADの進行段階に応じた治療を行う上で重要であり、患者のQOLの維持、向上につながると考えられる。今後の患者数の増加を考慮し、多数の画像診断によるAD検査を可能にするため、PETに比べて汎用性に優れたSPECT用プローブの開発研究を行った。その結果、特にタウ凝集体について、高い結合性と優れた脳内挙動を示す新規母格(ピリドイミダゾピリミジンおよびベンゾイミダゾピリミジン)を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPECTは、用いる標識核種の物理学的半減期が長く、検査施設もPET施設の10倍程度存在することから、PETよりも汎用性に優れた臨床核医学診断を可能にする。A β オリゴマーの生成、タウ凝集体の蓄積、神経細胞死というADの進行の段階に応じて診断・治療効果判定を行うことができる。SPECTプローブの開発を行うことで、ADの汎用性の高い診断法の確立のみならず、治療薬開発における患者選定、治療効果判定への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease is a progressive degenerative brain disease and the most common form of dementia in the elderly, but diagnostic and treatment methods have not been established. Compared with positron emission tomography (PET), single photon emission computed tomography (SPECT) scanners show lower sensitivity and quantification, but are more accessible and less to use cost. Therefore, I developed SPECT probes targeting β -amyloid oligomer, tau aggregatges, and synaptic vesicle protein 2A. Among them, we found that two novel scaffolds (pyridoimidazopyridine and benzimidazopyrimidine) may be applied to develop useful tau imaging probes.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：アルツハイマー病 SPECT タウ 神経細胞死 オリゴマー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急速に進行する高齢化社会の中で、先進諸国を中心に認知症の罹患者は増加を続けており、その中でもアルツハイマー病(AD)の割合が最も多いことから、ADの予防、診断、治療法の開発が喫緊の課題となっている。AD発症までの特徴的な脳内病変としてβアミロイドタンパク質(Aβ)凝集体を主成分とする老人斑の沈着と過剰リン酸化されたタウタンパク質の凝集によって形成される神経原線維変化が知られている。老人斑の沈着はAD発症過程の最初期よりはじまり、疾患特異性が高いことから、その主成分であるAβ凝集体を標的とした診断・治療薬の開発が盛んに行われてきた。しかしながら、脳内に沈着した老人斑を除去しても患者の臨床症状の改善が見られないことや、ADの臨床症状が現れた時点では老人斑の蓄積がほぼプラトーに達していることが報告されており、Aβ凝集体を標的としたADの診断・治療のみでは不十分であると考えられる。Aβが凝集する過程で形成されるAβオリゴマーは毒性が高いことが近年の研究において報告され、新たな治療標的として考えられている。また、タウタンパク質が脳内で凝集・蓄積するだけで神経細胞障害を与えること、タウ凝集体の蓄積量とADの臨床症状がよく相関することも明らかとなってきており、タウ凝集体を標的とした診断・治療法の開発にも大きな注目が集まっている。このような状況下、近年では、1)Aβオリゴマーの生成、2)タウ凝集体の蓄積、3)神経細胞死という過程を経てADを発症するという概念が提唱され、これらを基盤としたADの病態解明および治療薬開発に関する研究が進められている。そのため、1)Aβオリゴマーの生成、2)タウ凝集体の蓄積、3)神経細胞死に対応した診断法の確立は、ADの進行段階に応じた治療を行う上で重要であり、患者のQOLの維持、向上につながると考えられる。

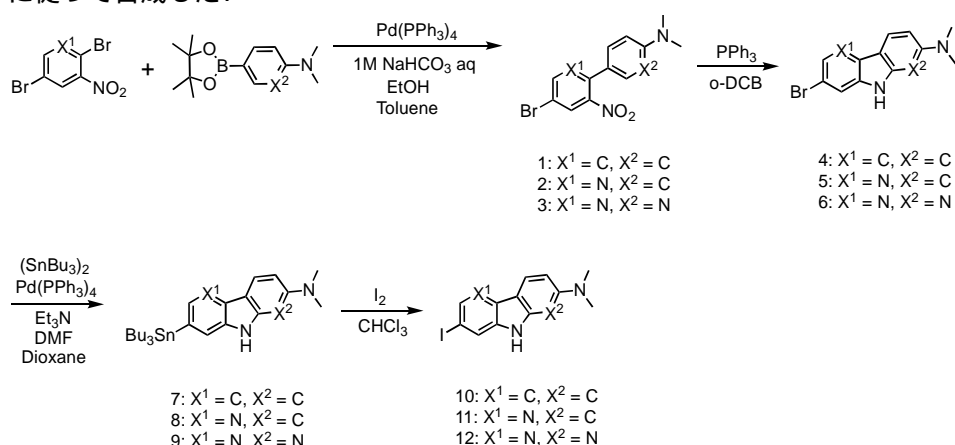
2. 研究の目的

ADは先進諸国を中心に多くの罹患者がいるが、その診断・治療法は未だ確立されていない。近年では、1)Aβオリゴマーの生成、2)タウ凝集体の蓄積、3)神経細胞死という過程を経てADを発症するという概念を基盤として、病態解明および治療薬開発に関する研究が進められており、これらに対応したADの診断法の確立が求められている。そこで本研究では、1)Aβオリゴマー、2)タウ凝集体、3)神経細胞死の指標となりうるシナプス小胞タンパク2Aを標的とした核医学分子イメージングプローブを開発することを目的とする。今後の患者数の増加を考慮し、多数の画像診断によるAD検査を可能にするため、PETに比べて汎用性に優れたSPECT用プローブの開発研究を行う。以降の項では、最も研究が進捗したタウ凝集体を標的としたSPECT用プローブの開発研究について示す。

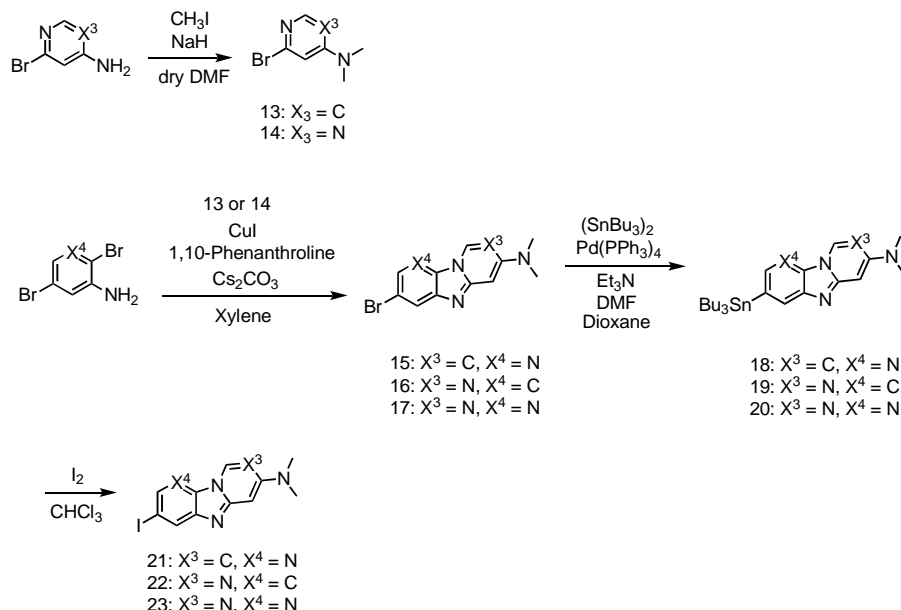
3. 研究の方法

含窒素三環系化合物の合成

カルバゾール、ピリドインドールおよびピロロジピリジン誘導体はScheme 1に従って、ピリドイミダゾピリミジン、ベンゾイミダゾピリミジンおよびピリドイミダゾピリミジンはScheme 2に従って合成した。



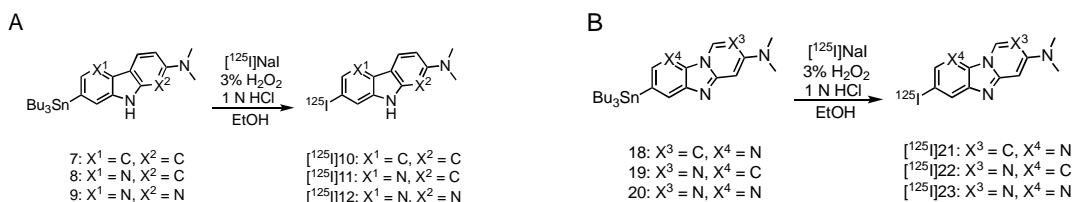
Scheme 1. Synthetic route of carbazole, pyridoindole, and pyrrolo-dipyrindine derivatives.



Scheme 2. Synthetic route of pyridoimidazopyridine, benzimidazopyrimidine, and pyridoimidazopyrimidine derivatives.

放射性ヨウ素標識

Scheme 3 に従って各誘導体の I-125 標識を行った。得られた I-125 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 で分離精製した。



Scheme 3. Radioiodination reaction of carbazole, pyridoindole, and pyrrolodipyridine derivatives (A), and pyridoimidazopyridine, benzimidazopyrimidine, and pyridoimidazopyrimidine derivatives (B).

AD 患者剖検脳切片を用いた免疫染色

タウの免疫染色における 1 次抗体には, 抗リン酸化タウモノクローナル抗体(AT8)を, Aβ の免疫染色における 1 次抗体には, 抗 Aβ(1-42)モノクローナル抗体(BC05)を用いた。抗原賦活化には 0.01 M クエン酸緩衝液(pH 6.0)中におけるオートクレーブ(15 分)およびギ酸処理(5 分)を行った。流水で 5 分間, PBS-Tween 20 (2 分×1)洗浄した。1 次抗体溶液と室温で 1 時間反応させたのち, PBS-Tween 20 (5 分×1)洗浄した。ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO と室温で 30 分間反応させた後, PBS-Tween 20 (3 分×3)および TBS (5 分×1)で洗浄した。最後に, DAB 溶液と室温で 1 分間反応させた。精製水(1 分×1)で洗浄し, 反応を停止した。脳組織切片を封入した後, 顕微鏡で観察した。

AD 患者剖検脳切片を用いた *in vitro* オートラジオグラフィー (ARG)

AD 患者剖検脳切片を, キシレン(15 分×2), 100% EtOH (1 分×2), 90% EtOH (1 分×1), 70% EtOH (1 分×1)および精製水(2.5 分×2)で洗浄することで脱パラフィン処理を行った。I-125 標識化合物の 10% EtOH 溶液(370 kBq/mL)を添加し, 室温で 2 時間インキュベートした。50%EtOH (1 時間×1)および精製水(1 分×1)で洗浄後, イメージングプレートに終夜露光させた後パイオイメージングアナライザーにて分析を行なった。得られた画像に関しては脳白質および灰白質に関心領域を設定し, 定量解析を行なった。

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 および 0.1% Tween 80 含有生理食塩水に溶解した I-125 標識化合物 (27.8 kBq/100 μL)を尾静脈より投与し, 2, 10, 30, 60 分後に屠殺, 採決後, 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を測定し, 単位重量あたりの放射能集積量(% injected dose (ID)/g)を算出した。

4. 研究成果

AD 患者剖検脳切片を用いた免疫染色

タウと A β との選択的結合性を明確にするために、タウと A β の蓄積量が異なる二種類の AD 患者脳組織切片を用いた。タウおよび A β の蓄積分布を免疫染色によって調べた結果、切片 No.1 は灰白質に A β の蓄積のみが確認され、切片 No.2 は灰白質に A β とタウの両方の蓄積が認められた。したがって、高性能なタウイメージングプローブとして機能するためには、両切片のうち、タウの蓄積が認められた切片 No.2 にのみ放射能が集積し、さらに、その集積がタウの蓄積分布と一致する必要があると考えられた。

AD 患者剖検脳切片を用いた *in vitro* ARG

カルバゾール([¹²⁵I]10)、ピロロジピリジン([¹²⁵I]12)およびピリドイミダゾピリミジン([¹²⁵I]23)誘導体では、既存の A β イメージングプローブである IMPY と同様に、No.1 および No.2 の両切片の灰白質に放射能集積が認められた(Figure 1A, B, E, F, K, L, O, and P)。このことより、これら 3 化合物が A β に対する結合性を有することが示唆された。一方、ピリドイミダゾピリミジン([¹²⁵I]21)およびベンゾイミダゾピリミジン([¹²⁵I]22)誘導体では、以前に報告したタウプローブである BIP-NMe₂ と同様に、切片 No.2 のみに放射能集積が認められた(Figure 2G, H, I, J, M, and N)。このことより、これら 2 化合物がタウへの選択的結合性を示すことが明らかとなった。またピリドインドール誘導体([¹²⁵I]11)では、いずれの切片に対しても顕著な放射能集積は観察されなかった。

次いで、No.1 および No.2 の両切片の灰白質および白質にそれぞれ関心領域を設定し、各領域における単位面積当たりの放射能集積量を定量することで、*in vitro* ARG の結果からタウへの結合親和性および結合選択性を評価した (Figure 2)。その結果、ピリドイミダゾピリミジン([¹²⁵I]21)およびベンゾイミダゾピリミジン([¹²⁵I]22)誘導体では、タウ陽性の切片 No.2 の灰白質に、他の部位と比べて顕著に高い放射能集積が認められ、これらがタウに対して高い結合親和性を示すことが明らかとなった。さらに、この切片 No.2 の灰白質における放射能集積量(c)と、切片 No.1 の灰白質における放射能集積量(a)との比を算出することで、A β に対するタウへの結合選択性を評価した (Table 1)。その結果、ピリドイミダゾピリミジン([¹²⁵I]21)およびベンゾイミダゾピリミジン([¹²⁵I]22)誘導体は、3.2、6.2 と高い値を示した。特にベンゾイミダゾピリミジン([¹²⁵I]22)誘導体は、BIP-NMe₂ (7.1)と同等の値を示したことから、タウに対して高い結合選択性を示すことが明らかとなった。以上より、母核内の窒素原子の位置および数によってタウ結合性に変化が認められること、およびピリドイミダゾピリミジン([¹²⁵I]21)およびベンゾイミダゾピリミジン([¹²⁵I]22)誘導体がタウに対する結合親和性および結合選択性を示すことが明らかとなった。

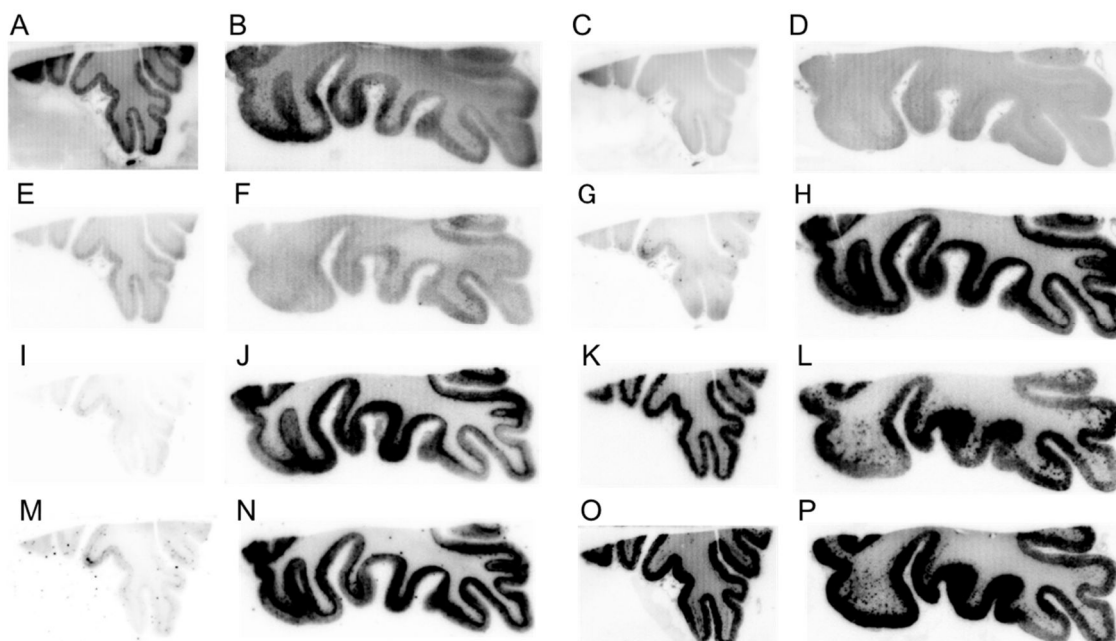


Figure 1. Comparison of *in vitro* autoradiography of [¹²⁵I]10 (A and B), [¹²⁵I]11 (C and D), [¹²⁵I]12 (E and F), [¹²⁵I]21 (G and H), [¹²⁵I]22 (I and J), [¹²⁵I]23 (K and L), [¹²⁵I]BIP-NMe₂ (M and N), and [¹²⁵I]IMPY (O and P) in brain sections from an AD patient. A, C, E, G, I, K, M, and O show results in No.1 (A β (+)/tau(-)) brain sections. B, D, F, H, J, L, N, and P show results in No.2 (A β (+)/tau(+)) brain sections.

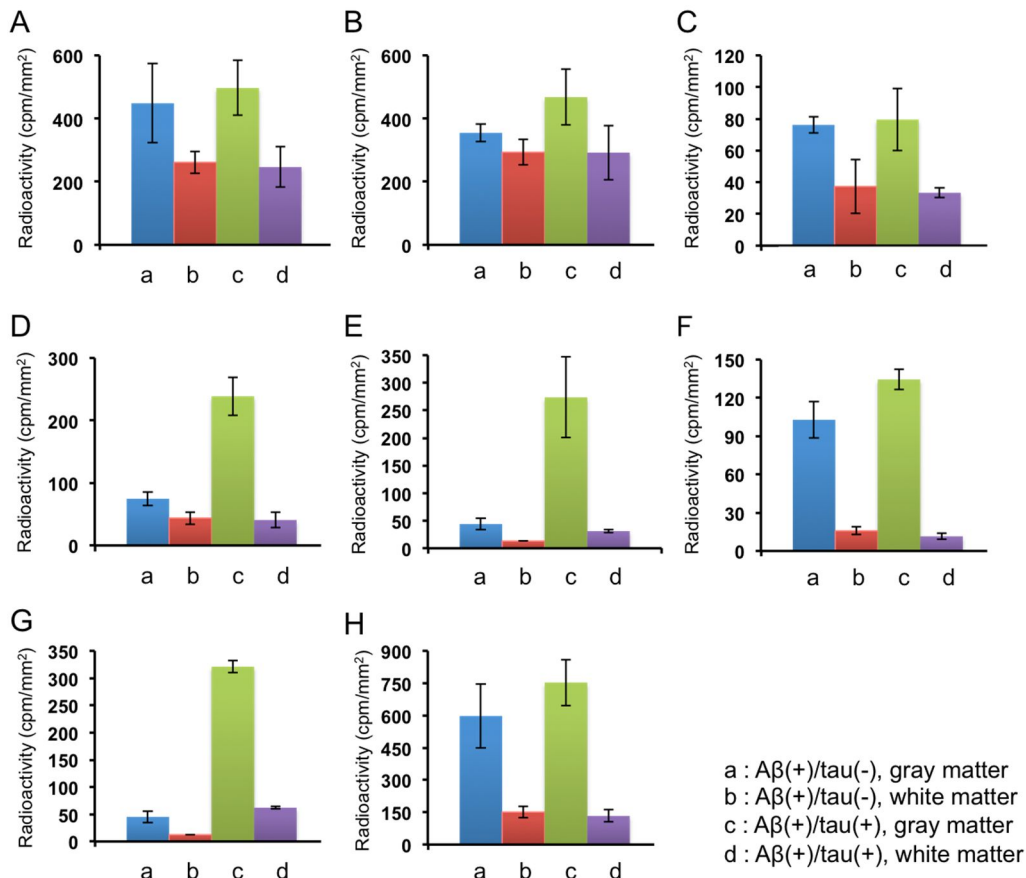


Figure 2. Quantitative analysis of [¹²⁵I]10 (A), [¹²⁵I]11 (B), [¹²⁵I]12 (C), [¹²⁵I]21 (D), [¹²⁵I]22 (E), [¹²⁵I]23 (F), [¹²⁵I]BIP-NMe₂ (G), and [¹²⁵I]IMPY (H) on *in vitro* autoradiography of AD brain sections.

Table 1. Ratio of radioactivity accumulation in the gray matter of Aβ(+)/tau(+) (c) against Aβ(+)/tau(-) brain sections (a).

compd	c/a ratio
[¹²⁵ I]10	1.1
[¹²⁵ I]11	1.3
[¹²⁵ I]12	1.0
[¹²⁵ I]21	3.2
[¹²⁵ I]22	6.2
[¹²⁵ I]23	1.3
[¹²⁵ I]BIP-NMe ₂	7.1
[¹²⁵ I]IMPY	1.3

正常マウスにおける体内放射能分布実験

正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行い、I-125 標識各化合物の脳内挙動を評価した。その結果、ARG 実験においてタウ結合性を示したピリドイミダゾピリミジン([¹²⁵I]21)およびベンゾイミダゾピリミジン([¹²⁵I]22)誘導体は、投与後 2 分における高い脳移行性(5.73 および 5.66% ID/g)およびその後のクリアランス(投与後 30 分で 0.21 および 0.19% ID/g, 投与後 60 分で 0.14 および 0.10% ID/g)を示した。また、本評価で用いた 6 化合物はいずれも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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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, Kishimoto T, Kaide S, Tarumizu Y, Tatsumi H, Iikuni S, Ono M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Characterization and Optimization of Benzimidazopyrimidine and Pyridoimidazopyridine Derivatives as Tau-SPECT Probes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 805 ~ 811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.1c00071	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 Kaide S, Watanabe H, Shimizu Y, Tatsumi H, Iikuni S, Nakamoto Y, Togashi K, Ihara M, Saji H, Ono M.	4. 巻 27
2. 論文標題 18F-labeled benzimidazopyridine derivatives for PET imaging of tau pathology in Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3587 ~ 3594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.06.039	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, Tatsumi H, Kaide S, Shimizu Y, Iikuni S, Ono M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure-Activity Relationships of Radioiodinated 6,5,6-Tricyclic Compounds for the Development of Tau Imaging Probes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 120 ~ 126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.9b00456	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 Kaide S, Ono M, Watanabe H, Kitada A, Yoshimura M, Shimizu Y, Ihara M, Saji H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Structure-Activity Relationships of Radioiodinated Benzoimidazopyridine Derivatives for Detection of Tau Pathology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 478 ~ 483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.8b00092	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 Kaide S, Ono M, Watanabe H, Shimizu Y, Nakamoto Y, Togashi K, Yamaguchi A, Hanaoka H, Saji H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Conversion of iodine to fluorine-18 based on iodinated chalcone and evaluation for β -amyloid PET imaging	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3352 ~ 3358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.05.001	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, Saji H, Ono M.	4. 巻 28
2. 論文標題 Novel fluorescence probes based on the chalcone scaffold for in vitro staining of β -amyloid plaques	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 3242 ~ 3246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.08.009	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, 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 α -synuclein aggregates	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	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,	4. 巻 137
2. 論文標題 Development of SPECT Probes for In Vivo Imaging of β -Amyloid and Tau Aggregates in the Alzheimer's Disease Brain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1361-1365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.17-00156	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroyuki Watanabe, Sho Kaide, Yuta Tarumizu, Yoichi Shimizu, Simpei Iikuni, Masahiro Ono
2. 発表標題 Synthesis and evaluation of 18F-labeled benzimidazopyridine derivatives as novel PET tracers for tau imaging
3. 学会等名 23rd International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Kaide, Hiroyuki Watanabe, Yoichi Shimizu, Shimpei Iikuni, Hideo Saji, Masahiro Ono
2. 発表標題 Development of PET/SPECT Imaging Probes Based on Benzimidazopyridine Scaffold for Detection of Tau Pathology in Alzheimer's Disease
3. 学会等名 The 11th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊 裕之, 岸本 峻明, 貝出 翔, 垂水 勇太, 飯國 慎平, 小野 正博
2. 発表標題 含窒素縮合3環系構造を基盤とした新規SPECT用タウイメージングプローブの開発
3. 学会等名 第141年会日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本峻明, 渡邊裕之, 辰巳悠華, 貝出 翔, 垂水勇太, 飯國慎平, 志水陽一, 小野正博
2. 発表標題 アルツハイマー病脳内タウを標的とするSPECT用プローブの開発を目的とした125I標識ベンゾイミダゾピリミジン誘導体の構造活性動態相関研究
3. 学会等名 第140年会日本薬学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垂水勇太, 渡邊裕之, 貝出 翔, 飯國慎平, 志水陽一, 小野正博
2. 発表標題 新規PET用タウイメージングプローブの開発を目的とした18F標識ベンゾイミダゾピリジン誘導体の合成と評価
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 貝出 翔, 渡邊裕之, 志水陽一, 飯國慎平, 伊東恭子, 小野正博
2. 発表標題 ヒト剖検脳切片を用いたBIP-NMe2に関する生化学評価
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 貝出 翔, 渡邊裕之, 志水陽一, 辰巳悠華, 飯國慎平, 小野正博
2. 発表標題 アルツハイマー病脳内タウのPETイメージングを目的とした18F標識ベンゾイミダゾピリジン誘導体の開発
3. 学会等名 第17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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 貝出 翔, 渡邊 裕之, 辰巳 悠華, 志水 陽一, 佐治 英郎, 小野 正博
2. 発表標題 ベンゾイミダゾピリジン骨格を基盤とする新規PET用タウイメージングプローブの開発
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 垂水 勇太, 渡邊 裕之, 貝出 翔, 飯國 慎平, 志水 陽一, 小野 正博
2. 発表標題 アルツハイマー病脳内タウのPETイメージングを目的とした18F標識ベンゾイミダゾピリジン誘導体の構造活性動態相関
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2019年

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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡邊裕之
2. 発表標題 アルツハイマー病脳の アミロイド、タウの生体イメージングに資する放射性プローブの開発
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 貝出 翔, 小野正博, 渡邊裕之, 志水陽一, 佐治英郎
2. 発表標題 アルツハイマー病脳内タウを標的とした放射性ヨウ素標識ベンゾイミダゾピリジン誘導体に関する構造活性相関研究
3. 学会等名 第138年会日本薬学会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------