

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659605

研究課題名(和文) 脳内 シヌクレイン・イメージングPET分子プローブの開発

研究課題名(英文) Development of PET molecular probes for imaging alpha-synuclein in the brain

研究代表者

豊原 潤 (Toyohara, Jun)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・専門副部長

研究者番号：50425659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シヌクレインの凝集体を選択的に画像化するPET分子プローブの開発を目的として、設計、合成、標識合成ならびに生物学的評価を行った。文献上シヌクレインへの結合性が報告されているフェノチアジン系5化合物とポリフェノール系1化合物の合成、標識合成とインビボ評価を行ったところ、フェノチアジン系4化合物において高い放射化学的収率で標識体を得、小動物専用PETにてシヌクレイン・イメージングに適した脳内動態を示すことが確認された。一方、フェノチアジン系1化合物とポリフェノール系1化合物は脳への集積性を示さなかった。フェノチアジン系化合物がリード化合物として有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Five phenothiazine and a polyphenol derivatives were radiolabeled as potential PET molecular imaging probes for alpha-synuclein imaging in the brain. The four of five phenothiazine derivatives were successfully radiolabeled by ^{11}C -methyl iodide or ^{11}C -methyl triflate in a good yield with high specific activity. Dedicated small animal PET imaging showed these phenothiazine derivatives crossed the blood-brain barrier (BBB) with rapid washout from the brain. Another one-phenothiazine and polyphenol derivatives did not cross the BBB.

In conclusion, our initial studies suggested that phenothiazine derivatives are good candidate for in vivo imaging of alpha-synuclein aggregation in the brain. Further structural optimizations of these compounds are needed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射性医薬品・造影剤

1. 研究開始当初の背景

(1) シヌクレインの凝集はパーキンソン病、認知症を伴うパーキンソン病およびレビー小体型認知症などシヌクレイノパチーに共通の神経病理学的な特徴である。過去 20 年間の臨床診断基準や神経画像診断法の発展は、シヌクレイノパチーの検出や鑑別診断に大きく貢献してきた。現在では、シヌクレインに対する抗体を用いた髄液検査も行われている。しかし、髄液検査では脳内のシヌクレイン凝集体の分布や密度を評価できない。死後脳の免疫組織学的な研究から、認知症を伴うパーキンソン病のシヌクレイン凝集体は脳幹・延髄から始まり、脳前部を進行し、黒質線条体や大脳皮質へ至る経過を辿ると考えられている (Braak et al., *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211, McKeith et al., *Neurology* 2005;65:1863-1872)。したがって、シヌクレインを検出可能な低分子の PET 分子プローブが開発できれば、シヌクレイノパチーの病期診断、早期診断やシヌクレイン凝集阻害剤などの根本的治療薬の開発に貢献できると考えられる。しかしながら、シヌクレインを特異的に検出可能な PET 分子プローブは開発されていない。

(2) シヌクレインの凝集体はアルツハイマー病やタウオパチーの原因と考えられるアミロイドやタウたんぱく質の凝集体と同じシート構造を形成する。アミロイドイメージングプローブとして開発された PET 分子プローブの中にはシヌクレインに結合する化合物も報告されているが、シヌクレインに選択的ではない (Fodero-Tavolette et al., *Eur J Pharmacol* 2009;617:54-58)。

(3) シヌクレイノパチーは、アルツハイマー病やプリオン病、ハンチントン舞踏病などコンフォーメーション異常に伴う不溶性たんぱく質の凝集を原因とするコンフォーメーション病と総括される疾患に属している。そのため、シヌクレインの PET 分子プローブの開発で得られる知見は、これらの疾患に対する PET 分子プローブの開発にとって有用である。細胞外に結合部位が存在するアミロイドプローブと異なり、細胞内の封入体に結合部位が存在するシヌクレインの PET 分子プローブの開発は、従来の PET 分子プローブが未到達の領域であり、全く新しい知見が得られると考えられる。

(4) シヌクレイノパチーによるレビー小体型認知症の患者は、欧米ではアルツハイマー病に次いで多く、日本でも高齢者の認知症患者の 2 割がレビー小体型認知症 (アルツハイマー病は 4 割) と高頻度である。したがって、シヌクレインの PET 分子プローブの実用化は、認知症対策の基本である、認知症の早期診断とその根本的治療法の開発に大きく貢献するものと期待される。

2. 研究の目的

本研究ではシヌクレインの凝集体を選択的に画像化する PET 分子プローブの開発を目指し、分子プローブの設計、合成、標識合成ならびに生物学的評価を行い、臨床応用可能な候補化合物を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 候補化合物として、文献上シヌクレインへの選択的な結合性が報告されているフェノチアジン系 5 化合物の標識前駆体および標準品のコールド体 5 化合物の計 10 化合物を合成した。また、特許文献等でシヌクレインへの結合性が示されているポリフェノール系 1 化合物の合成を実施した。

(2) 標識前駆体の C-11 標識は、標識試薬として C-11 標識メチルトリフレートまたはヨウ化メチルを用いたヘテロ原子のメチル化反応により実施した。放射性標識化合物は HPLC によって精製し、性能評価試験に使用した。

(3) 脳を画像化する PET 分子プローブとしての基本的な性能を動物実験にて評価した。正常マウスもしくはラットに放射性標識化合物を投与し、体内放射能分布を検討する。ここでは、シヌクレインの画像化に必要な投与後早期の脳移行性およびその後の脳からの早い消失性を確認した。

(4) 組換えシヌクレインおよびアミロイドペプチドの凝集体および凝集線維に対して放射性標識化合物を用いたインビトロ結合実験を行い、それぞれの変性たんぱく質に対する結合親和性を測定した。

4. 研究成果

(1) 合成したフェノチアジン系化合物およびポリフェノール系化合物の標識前駆体およびコールド化合物の構造式を示す (表 1)。ClogP 値はポリフェノール系の B-1 が最も低く 1.69、フェノチアジン系では A-1 から A-5 の順で、それぞれ 2.2、4.8、3.6、3.8、5.7 であった。

(2) フェノチアジン系化合物では、ペルフェナジン系の 1 化合物 (A-4) を除き、いずれの化合物も通常の C-11 標識方法である、メチルトリフレートまたはヨウ化メチルを使用するメチル化法で収率よく (30%-80%) 標識体を得ることが可能であった (表 2)。A-4 は、アセトニトリル溶媒中 tetrabutylammonium hydroxide (TBAOH) を塩基として使用することにより、C-11 メチルトリフレートから 3%の収率で目的物を得ることに成功した (表 2)。ポリフェノール系化合物の B-1 はメチル化の反応点が複数有るた

め、収率は低かったが、評価試験に用いる標識体を得ることに成功した。

表1．合成実施した評価化合物リスト

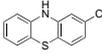
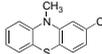
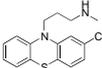
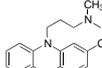
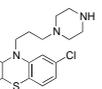
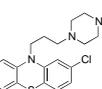
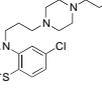
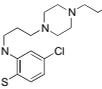
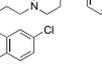
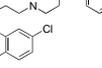
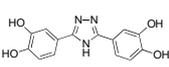
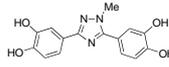
化合物	標識前駆体	コールド体
A-1		
A-2		
A-3		
A-4		
A-5		
B-1		

表2．標識合成検討詳細 (A-1~A-5)

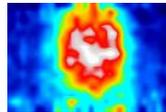
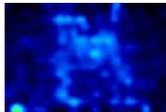
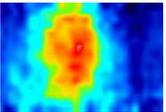
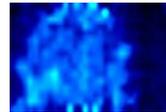
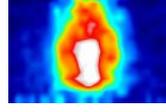
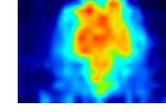
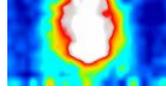
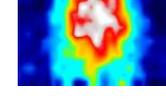
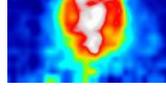
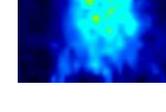
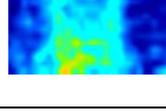
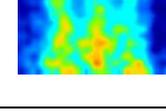
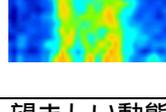
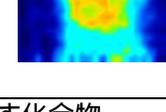
化合物	溶媒	塩基	C-11	温度	収率 %
A-1*	Acetone	NaOH 当量	MeOTf	室温	1.8
	Acetone	NaOH 2当量	MeOTf	室温	2.9
	DMF	NaH 過剰	MeI	120 1分	30.6
A-2	Acetone	無し	MeOTf	室温	75.7
A-3	Acetone	無し	MeOTf	室温	81.6
A-4	DMF	NaH 過剰	MeI	120 1分	0.0
	DMF	NaH 過剰	MeI	120 5分	Trace
	DMF	NaH 過剰**	MeI	120 5分	0.6
	DMF	TBAOH 過剰	MeOTf	80 5分	0.0
	DMF	TBAOH 過剰	MeI	60 10分	0.0
	MeCN	TBAOH 過剰	MeOTf	80 5分	2.9
A-5	Acetone	無し	MeOTf	室温	0.0
	DMF	NaH 過剰	MeI	120 1分	39.4

*0.25 mg 使用

**30 分前処理

(3) 正常ラットに放射性標識化合物 (A-1~A-5) を投与し、シヌクレインの画像化に必要な投与後早期の脳移行性と後期の脳からの洗い出しを検討した。その結果、脂溶性の高いA-5を除いて、A-1~A-4までの化合物は投与後早期の脳への高い取り込みと脳からの放射能の洗い出しを認めた(表3、図1)。中でも、A-1とA-4が望ましい動態を示した。脳移行性を認めなかったA-5はサイクロスポリンAでP糖たんぱく質を阻害すると脳への取り込み増大を認めたことから、P糖たんぱく質の基質であることが示唆された。B-1については、正常マウスを用いた体内分布試験を行い脳への放射能集積性について検討した。その結果、B-1の脳への放射能集積を認めなかった(表4)。ポリフェノール系化合物の脳移行性が悪いのはその低い脂溶性によるものと考えられた。

表3．標識化合物の脳集積画像

化合物	早期 0-10 分	後期 40-70 分
PiB ⁺		
A-1		
A-2		
A-3		
A-4		
A-5		
A-5 + Cys.A		

*対照薬：望ましい動態を示す化合物

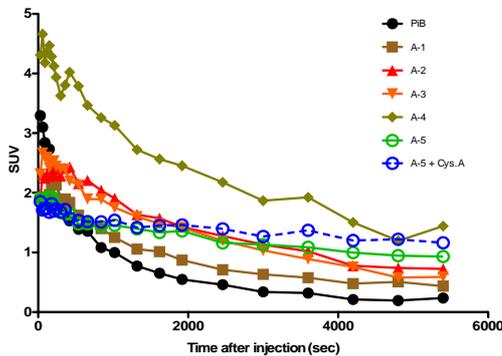


図1．標識化合物の脳時間放射能曲線

表4．化合物 B-1 の脳集積 (%ID/g) (n=5)

臓器	2分	10分
血液	1.59 ± 0.28	0.14 ± 0.05
脳	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.01

(4) フェノチアジン系 5 化合物について、アミロイド凝集体ならびにシヌクレイン凝集体への結合特異性を評価した。その結果、いずれの化合物も凝集体への特異的結合に比べて、フィルターやキャリアーたんぱく (BSA) への非特異的結合が大きく、インビトロ結合性試験からは特異的結合性を示すデータは得られなかった。同時に検討したスタンダードの PiB や BF227 化合物の特異的結合が僅かであったことから、使用したリコンビナント凝集たんぱく質の高次構造による結合性の問題や候補化合物の高い脂溶性に問題があるものと考えられた。今回の結果から、評価系としてリコンビナントたんぱく質を用いる方法には限界があると考えられ、ヒト死後脳の利用や凍結切片を用いたオートラジオグラフィ等の手法を採用するべきであると考えられた。

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3件)

Toyohara, J., Kobayashi, T., Mita, S. and Ishiwata, K. Application of [¹¹C]SA4503 to selection of novel sigma₁ selective agonists. Nucl. Med. Biol., 査読有, Vol.39, 2012, 1117-1121.
DOI:10.1016/j.nucmedbio.2012.06.004

Toyohara, J., Sakata, M. and Ishiwata, K. Re-evaluation of in vivo selectivity of [¹¹C]SA4503 to sigma₁ receptors in the brain: contributions of emopamil binding protein. Nucl. Med. Biol., 査読有, Vol.39, 2012, 1049-1052.
DOI:10.1016/j.nucmedbio.2012.03.002

Toyohara, J., Sakata, M. and Ishiwata, K. Roles of sigma₁ receptors in the

mechanisms of action of CNS drugs. Trans. Neurosci., 査読有, Vol.3, 2012, 294-299.
DOI:10.2478/s13380-012-0030-0

[学会発表](計6件)

豊原 潤, PETプローブ開発の基礎, PETサマーセミナー2013, 2013年8月23日~2013年8月25日, 金沢

Okamoto, M., Matsui, A., Kitagawa, Y., Toyohara, J., Ishiwata, K., Yoshimoto, M. and Shimizu, I., Synthesis and evaluation of a fluorine-18-labeled 7 α -(3-fluoropropyl)estradiol, 2013年5月12日~2013年5月17日, Jeju.

豊原 潤, 坂田宗之, 織田圭一, 石井賢二, 石渡喜二, 新規 PET 薬剤開発から first-in-human study まで 多施設共同研究への取り組み, 第52回日本核医学会学術総会, 2012年10月11日~2012年10月13日, 札幌

豊原 潤, 化学薬学セッション: PET 薬剤の理解のために PET 医師のための化学薬学の時間, PETサマーセミナー2012, 2012年8月31日~2012年9月2日, 松本

Toyohara, J., Sakata, M. and Ishiwata, K. Dose sigma₁ ligand [¹¹C]SA4503 bind to the emopamil binding protein in the brain in vivo? The 9th international symposium on functional neuroreceptor mapping of the living brain, 2012年8月9日~2012年8月11日, Baltimore.

Toyohara, J., Sigma receptors, International symposium on PET and SPECT in neurology and psychiatry, 2012年4月23日~2012年4月25日, Groningen.

[図書](計1件)

Toyohara, J. and Ishiwata, K. World scientific publishing Co., Trends on the role of PET in drug development. 2012, 193-218.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊原 潤 (TOYOHARA, Jun)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・専門副部長
研究者番号：5 0 4 2 5 6 5 9

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

石渡 喜一 (ISHIWATA, Kiichi)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
研究者番号：5 0 1 4 3 0 3 7

坂田 宗之 (SAKATA, Muneyuki)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号：0 0 4 0 3 3 2 9

石井 賢二 (ISHII, Kenji)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長
研究者番号：1 0 2 3 1 1 3 5

織田 圭一 (ODA, Keiichi)
地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号：7 0 2 2 4 2 3 5