

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19455

研究課題名(和文)アルツハイマー病の超早期診断に資するアミロイドオリゴマーイメージング法の開発

研究課題名(英文)Development of amyloid oligomer imaging for early diagnosis of Alzheimer'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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の発症機序に関する最近の研究において、神経毒性の高いアミロイドタンパク質(A $\beta$ )のオリゴマーが注目されている。これまでに、A $\beta$ オリゴマーを生体イメージングできるPETプローブは報告されていない。本研究では、A $\beta$ オリゴマーの生体検出技術の開発を目的として、A $\beta$ オリゴマーに結合性を持つPETトレーサーの候補化合物を設計・合成し、A $\beta$ 凝集体を用いたインビトロ実験、A $\beta$ 発現マウスを用いたインビボ実験によって、A $\beta$ オリゴマーPETトレーサーとしての有用性を評価することを計画した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A $\beta$ オリゴマーを特異的に検出できるPETトレーサーが開発できれば、現在のA $\beta$ 用PETトレーサーで問題となっている擬陽性の診断も改善され、高い精度でアルツハイマー病のPET画像診断が可能になると考えられ、その予防、診断、治療、病態研究に新たな指針を与える。

研究成果の概要(英文)：In recent research regarding the pathogenesis of Alzheimer's disease, highly toxic oligomers of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) peptides has gained much attention. However, there have been no reports regarding the development of PET imaging probes that can specifically image A $\beta$  oligomers in vivo. The objective of the present study was to develop novel in vivo imaging technique targeting A $\beta$  oligomers. In this study, we planned to design and synthesize some candidate compounds, and evaluate in vitro experiments on binding affinity to A $\beta$  aggregates and in vivo experiments using transgenic mice that overexpressed A $\beta$  aggregates.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：アミロイド オリゴマー イメージング アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化人口の増加に伴う、アルツハイマー病(AD)患者の急増は、世界的な問題であり、その克服は喫緊の課題である。AD 脳内における特徴的な病理像として、 $\beta$  アミロイドタンパク質(A $\beta$ )を主成分とする老人斑とタウタンパク質を主成分とする神経原線維変化が知られている。これら病理像の中でも、老人斑の沈着は AD 発症過程も最も初期段階から生じることから、A $\beta$  を標的とした PET トレーサーの開発がこれまで活発に行われてきた。これら A $\beta$  トレーサーを用いた多数の臨床研究の結果から、A $\beta$  の蓄積が認められるが、AD を発症しない、擬陽性群の存在が明らかとなってきた(Kemppainen et al., *Neurology*, **68**, 1603, 2007)。この原因として、従来の A $\beta$  用 PET トレーサーで検出される A $\beta$  は、凝集度が高く、神経毒性の低い典型老人斑であることが考えられる。一方、神経細胞に対する毒性の最も高い A $\beta$  凝集体は、凝集度の低い、A $\beta$  オリゴマーであることが報告されている(Haass et al., *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 101, 2007)。したがって、A $\beta$  オリゴマーを特異的に検出できる PET トレーサーが開発できれば、現在の A $\beta$  用 PET トレーサーで問題となっている、擬陽性の診断も改善され、高い精度で AD の PET 画像診断が可能になると考えられる。現在までに、A $\beta$  オリゴマーを特異的に生体イメージングできる PET トレーサーの報告はない。本研究で提案する A $\beta$  オリゴマー特異的 PET トレーサーを開発することができれば、AD の予防、診断、治療、病態研究に新たな指針を与えることから、非常に意義深い研究になると考えられる。

これまでに、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  を始めとする多数の A $\beta$  検出用 PET トレーサーの開発が行われ、現在では、 $[^{18}\text{F}]\text{Flutemetamol}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{Florbetapir}$ ,  $[^{18}\text{F}]\text{Florbetaben}$  の 3 剤が FDA に認可され、臨床現場で実用化されているところである。しかし、いずれの PET トレーサーも、A $\beta$  の凝集度が低く、かつ、神経細胞毒性の高い、A $\beta$  オリゴマーではなく、A $\beta$  の凝集度が高く、かつ、神経細胞毒性の低い、典型老人斑を選択的に画像化することから、アミロイド PET では陽性にも関わらず、AD を発症しない被験者が多数存在する。したがって、既存の PET トレーサーによるアミロイド PET の利用は、AD ではないことを診断する、除外診断に限定される。これには、既存 PET トレーサーが、真に神経毒性を持つ、A $\beta$  オリゴマーへの結合を反映していないことが大きな要因であると考えられる。したがって、真の AD の早期診断を目的とした PET トレーサーには、神経毒性の高い A $\beta$  オリゴマーへ特異的に結合する必要があると考えられる。

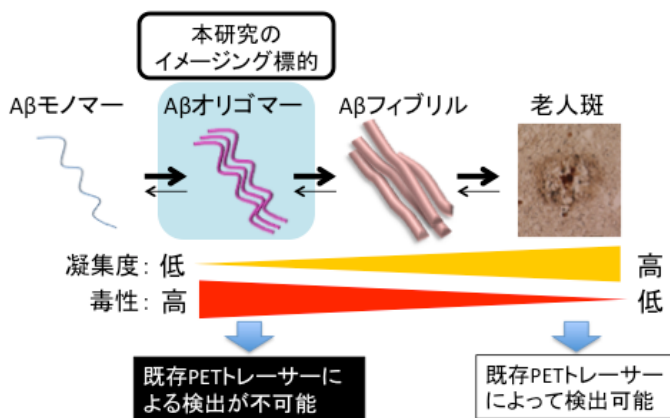


図 1. A $\beta$  の凝集度と毒性の関係および PET トレーサーでの検出能

## 2. 研究の目的

本研究では、A $\beta$  オリゴマーの生体イメージングのための PET トレーサーの開発を目的として、まず被験化合物の A $\beta$  オリゴマー結合性に関する評価実験系の構築を行い、それを用いたリード化合物の探索研究を行った。

## 3. 研究の方法

### BODIPY 27 の合成

#### 4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (1) の合成

3,5-Dimethylpyrrole-2-carboxyaldehyde (246 mg, 2.0 mmol) と 2,4-dimethylpyrrole (206  $\mu\text{L}$ , 2.0 mmol) をクロロホルム (10 mL) に溶解し、氷冷下  $\text{POCl}_3$  (186  $\mu\text{L}$ ) を徐々に加えた。室温で 2.5 時間攪拌後、 $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  (1.26 mL) および  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.26 mL) を加え、室温でさらに 10 分間攪拌した。反応液に精製水を加えた後、クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 2 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーによって精製し、203 mg (収率 : 40.9%) の化合物 **1** を得た。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.24 (s, 6H), 2.52 (s, 6H), 6.04 (s, 2H), 7.04 (s, 1H). MS  $m/z$  248 ( $\text{M}^+$ ).

#### 5-(4-(Dimethylamino)phenyl)furan-2-carbaldehyde (2) の合成

5-Formyl-2-furan boronic acid (500 mg, 2.5 mmol)、4-bromo-*N,N*-dimethylaniline (500 mg, 2.5 mmol)、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (50 mg, 0.04 mmol) を 1,4-ジオキサン

(15 mL)に溶解し、2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液 (10 mL)を加えて12時間還流した。室温に戻し精製水を加えた後、クロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧留去後、ヘキサンを加えて析出した結晶を吸引濾取し、131 mg (収率 : 49.3%)の化合物**3**を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.04 (s, 6H), 6.63 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 9.54 (s, 1H). MS *m/z* 215 (M<sup>+</sup>).

#### 4,4-Difluoro-3-*{(E)-[2-[5-(4-dimethylaminophenyl)furanyl]ethenyl]}*1,5,7-trimethyl-4-bora-3a,4a-diaz-a-s-indacene (**3**: BODIPY 27)の合成

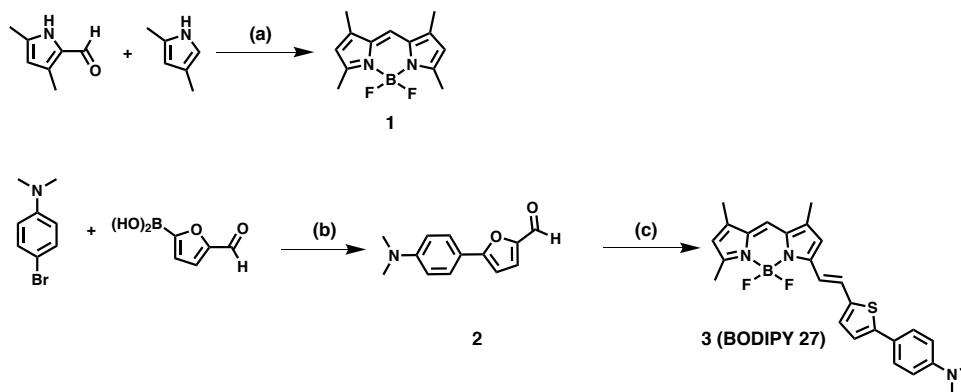
化合物**1** (124 mg, 0.5 mmol)をトルエン (5 mL)に溶解し、化合物**2** (108 mg, 0.5 mmol)を加えた。さらに、酢酸 (429 μL)とピペリジン (429 μL)を加え14時間還流した。溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 2を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーにより粗精製した後、クロロホルムを溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し1.32 mg (収率 : 0.6%)の化合物**3**を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.26 (s, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.60 (s, 3H), 3.02 (s, 6H), 6.06 (s, 1H), 6.55 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 3.2 Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.75 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.97 (s, 1H), 7.04 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), MS *m/z* 446 (M<sup>+</sup>).

#### Aβオリゴマー結合性に関する評価実験

Aβオリゴマーに結合する化合物の探索を目的として、Aggregation process monitoring assayを行った。Amyloid β-Protein (Human, 1-40) (Code: 4307-v, Lot: 651109, Peptide Institute, INC.) 0.55 mg (0.13 μmol)をヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) 130 μLに溶解し、40 μLずつに分注した。HFIPを留去し-80 °Cで保存した。実験に用いるときに、65 μMになるようにPBSに溶解した。この溶液を37°C、300 rpmで振盪した。インキュベート開始から1, 2, 3, 4, 5, 6, 24時間後に採取し10倍に希釈した。希釈Aβ溶液132 μL, PBS 168 μL, 評価化合物のエタノール溶液30 μLを混合し、約10 minインキュベートした。その後、各サンプルの蛍光強度または蛍光スペクトルを測定した。PBS 300 μLと評価化合物のEtOH溶液30 μLの混合溶液をコントロールとした。測定値から以下の式で計算した値を用いてグラフを作製した ( $F/F_0 = (\text{評価化合物の蛍光強度} - \text{バックグラウンド}) / (\text{コントロールの蛍光強度} - \text{バックグラウンド})$ )。評価化合物として、市販の4-aminofluorescein, rhodamine B, 7-hydroxy-4-methylcoumarin, 3,6-diaminoacridine-HCl, curcumin, および申請者が設計・合成した化合物であるPP-BTA-1 (Ono et al., *Bioorg Med Chem*, 17, 7002-7, 2009), DTM-1, DTM-2, DTM-3 (Watanabe et al., *Chem Commun*, 51, 17124-7, 2015), BODIPY 27を用いた。

#### 4. 研究成果

BODIPY 27はScheme 1に従って合成した。



Scheme 1. (a) CHCl<sub>3</sub>, POCl<sub>3</sub>, BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N; (b) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 1,4-dioxane, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; (c) **1**, toluene, piperidine, AcOH

評価化合物のうち、市販の4-aminofluorescein, rhodamine B, 7-hydroxy-4-methylcoumarin および 3,6-diaminoacridine-HCl の  $F/F_0$  はすべてのタイムポイントにおいて1程度であり、アミロイド凝集体検出試薬であるチオフラビン T (ThT) の  $F/F_0$  値 5~20 に比較して低値を示した。したがって、これらの化合物は Aβ<sub>40</sub> の単量体、オリゴマーおよび繊維のいずれも検出できないと考えられた。一方、curcumin の蛍光強度は ThT と同様に上昇したことから、curcumin は ThT と同程度の凝集度の Aβ凝集体を検出すると考えられた。

DTM-1, 2, 3 はいずれも5時間後以降に蛍光強度が上昇した。ThT の蛍光上昇と同様の経過であったことから、これらの化合物は curcumin と同様に、ThT と同様の凝集度の Aβ凝集体に結合することが示唆された。PP-BTA-1 では 680 nm の蛍光波長で算出した場合、ThT と同じタイムポイントから蛍光強度の上昇が観察された。一方で、620 nm 付近の蛍光強度は、ThT より早いタイムポイントから蛍光上昇が認められた。この結果より、PP-BTA-1 は ThT よりも凝集

度の低いA $\beta$ 凝集体、すなわちA $\beta$ オリゴマーを検出する可能性が示唆された。BODIPY 27は3時間後から蛍光強度の上昇が認められたが、ThTの蛍光上昇よりも早期であったため、A $\beta$ オリゴマーを含む繊維状A $\beta$ 凝集体以外の形態のA $\beta_{40}$ を検出していると考えられた。

以上の結果から、本研究にて評価した化合物の中で、PP-BTA-1はA $\beta$ オリゴマー特異的PETトレーサーのリード化合物となる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Watanabe H, Yoshimura M, Sano K, Shimizu Y, Kaide S, Nakamoto Y, Togashi K, Ono M, Saji H. Characterization of Novel 18F-Labeled Phenoxymethylpyridine Derivatives as Amylin Imaging Probes. *Mol Pharm*, 15(12) 5574-5584 (2018).
- (2) Watanabe H, Saji H, Ono M. Novel Fluorescence Probes based on the Chalcone Scaffold for In vitro Staining of  $\beta$ -Amyloid Plaques. *Bioorg Med Chem Lett*, 28(19) 3242-3246 (2018).
- (3) Kaide S, Ono M, Watanabe H, Shimizu Y, Nakamoto Y, Togashi K, Yamaguchi A, Hanaoka H, Saji H. Conversion of Iodine to Fluorine-18 Based on Iodinated Chalcone and Evaluation for  $\beta$ -Amyloid PET Imaging. *Bioorg Med Chem*, 26(12) 3352-3358 (2018).
- (4) Kawai R, Araki M, Yoshimura M, Kamiya N, Ono M, Saji H, Okuno Y. Core Binding Site of a Thioflavin-T-derived Imaging Probe on Amyloid  $\beta$  Fibrils Predicted by Computational Methods. *ACS Chem Neurosci*, 9(5) 957-966 (2018).

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) Masahiro Ono  
Development of Radiopharmaceuticals for Alzheimer's Disease (Keynote Lecture),  
The 10th China-Japan-Korea Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (Xiamen, China),  
November, 2018.
- (2) 貝出 翔, 渡邊 裕之, 辰巳 悠華, 志水 陽一, 佐治 英郎, 小野 正博  
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  
第58回日本核医学会学術総会(沖縄) 2018年11月
- (3) 小野 正博  
認知症の診断・治療に資する分子イメージング(招待講演)  
創剤フォーラム 第24回若手研究会(神戸) 2018年9月
- (4) 貝出 翔, 渡邊 裕之, 志水 陽一, 佐治 英郎, 小野 正博  
タウの生体イメージングを目的としたSPECTプローブの開発  
タウ研究ミーティング2018(京都) 2018年9月
- (5) 小野 正博  
認知症の診断・治療のための分子イメージング(招待講演)  
Joint Symposium on Dementia(京都) 2018年6月
- (6) 貝出 翔, 小野 正博, 渡邊 裕之, 志水 陽一, 佐治 英郎  
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  
日本薬学会 第138年会(金沢) 2018年3月
- (6) 小野 正博  
分子イメージングによるトランスレーショナルリサーチ(招待講演)  
第16回OMIC事業推進セミナー(岡山) 2018年2月

〔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〕

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名: 渡邊 裕之

ローマ字氏名: WATANABE, Hiroyuki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。