

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16778

研究課題名(和文) 脳内HDAC6PETプローブとしての18F標識テトラヒドロキノリン誘導体の開発

研究課題名(英文) Development of 18F-labeled tetrahydroquinoline derivatives for HDAC6 PET imaging

研究代表者

多胡 哲郎 (Tago, Tetsuro)

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：50780649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)ファミリーに属するHDAC6は、主に細胞質に局在している点や、ユビキチンに対する結合能を有している点などで特徴的なサブタイプである。近年の病理学的な研究から、HDAC6は脳内におけるタンパク質の異常凝集を特徴とする神経変性疾患の病変形成に関与していることが明らかとなった。本研究課題では、陽電子断層撮像(PET)用脳内HDAC6プローブの開発を目的として研究を行った。本研究が達成されれば神経変性疾患の発症機序の解明や診断に応用できると考えられる。本研究期間では18F-標識HDAC6プローブ候補を合成することが出来た。今後、臨床応用に向けた更なる評価を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は未だ根本的な治療法が確立されておらず、発症機序の解明やそれに応じた治療戦略の研究が必要である。HDAC6という酵素は神経変性疾患の脳内に蓄積する病変の形成に関与していることが明らかとなり、近年治療標的として注目を集めている。本研究では陽電子断層撮像装置(PET)で生体内のHDAC6を画像化するためのプローブの開発を行った。本研究が達成されれば、HDAC6を軸とした神経変性疾患の研究が促進されると期待できる。本研究期間で有望なHDAC6プローブ候補を開発することが出来、臨床応用に向け更なる評価を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Histone deacetylase 6 (HDAC6) is an enzyme with unique properties, such as cytoplasmic localization and ubiquitin binding. HDAC6 has emerged as an interesting therapeutic target in the treatment of neurodegenerative disorders exhibiting abnormal protein aggregation in the brain. In vivo imaging of HDAC6 by positron emission tomography (PET) should help the research and diagnosis of the disorders. In this study, we radiosynthesized and evaluated an 18F-labeled tetrahydroquinoline derivative as a PET probe for HDAC6 imaging. The 18F-labeled probe was synthesized using an automated radiosynthesizer. Preclinical studies demonstrated that this probe had a high HDAC6 selectivity and good brain permeability in mice. Further studies are warranted to clarify the clinical utility of the probe.

研究分野：放射性医薬品科学

キーワード：PET HDAC6 ユビキチン 分子イメージング 核医学 放射性医薬品

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

認知機能障害や運動障害を呈する神経変性疾患の分類は多様であるが、その多くの病理学的特徴として、異常なタンパク質凝集体の脳内における蓄積が挙げられる。アルツハイマー病(AD)ではアミロイド- β やタウタンパク質、パーキンソン病では α -シヌクレイン、筋萎縮性側索硬化症では TDP-43 といったように、タンパク質の種類や蓄積する領域の違いにより各疾患を特徴づけることが出来る。これらの病変に注目した発症メカニズムの研究は数多く行われているが、有効な根本的治療法ははまだ存在しておらず、その開発は全世界的な課題である。

近年ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)ファミリーの一員である HDAC6 が、神経変性疾患の治療標的として注目を集めている。HDAC6 は他のサブタイプと異なり主に細胞質に局在し、非ヒストンタンパク質を脱アセチル化の基質としている。また HDAC6 はユビキチン結合部位を有しており、ユビキチン化されたタンパク質を分解が行われるアグリソームに運ぶ役割も有している。病理学的な研究から HDAC6 は α -シヌクレイン病変に共局在することが明らかとなっており、病変形成に深く関与していると考えられる。

HDAC6 を標的とした治療法開発については多数報告されてきているが、HDAC6 の脳内における発現分布や、疾患の進行に伴う発現量の変化などについては不明な点が多い。HDAC6 標的治療法を開発する上で、薬の有効性や作用機序を明らかにするためにも、生体内における HDAC6 を非侵襲的に検出できる技術の開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、陽電子断層撮像法(PET)による脳内の HDAC6 イメージングを実現するための、HDAC6 選択的放射性プローブの開発を目的とした。本研究が達成されれば、神経変性疾患における HDAC6 の役割の解明や、HDAC6 を標的とした治療法の開発を大いに促進する。

3. 研究の方法

(1) ^{18}F -標識テトラヒドロキノリン誘導体の合成法確立

新規 HDAC6 プローブのフッ素-18 による放射性標識合成法の確立を行った(図1)。HDAC6 プローブのシード化合物としては、Kozikowski らによって報告された HDAC6 阻害剤である SW-100 を選択した。 ^{18}F -標識合成については、前駆体としてボロン酸ピナコールエステルを脱離基として含むメチルエステル体を使用し、近年注目されている銅触媒を使用した芳香族への ^{18}F -標識法を採用した。 ^{18}F -化後にヒドロキシルアミン水溶液を使用してメチルエステルをヒドロキサム酸に変換し、得られた目的物を分取 HPLC で精製し、製剤化した。本研究では ^{18}F -標識反応の反応溶媒や時間、温度などの検討を行い、生物学的評価に使用するのに十分な質と量で標識体が得られる最適な反応条件・精製条件を探索した。

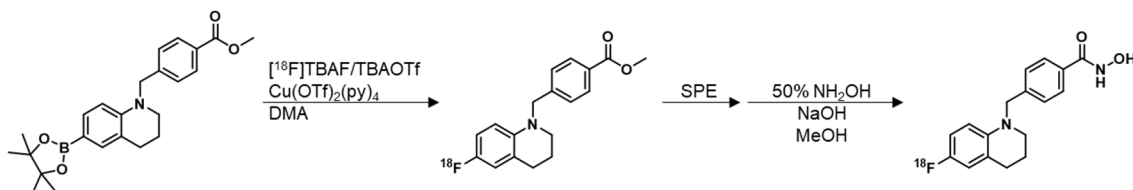


図1. 新規 HDAC6 プローブの ^{18}F -標識合成

(2) ^{18}F -標識 HDAC6 プローブの生物学的評価

HDAC6 選択性の評価

合成した HDAC6 プローブについて、市販の HDAC6 活性阻害測定キットを使用して、 IC_{50} 値を求めた。また代表的な HDAC である HDAC1 に対しても同様に IC_{50} 値を求め、化合物の HDAC6 選択性を評価した。

マウスにおける体内分布試験

合成した標識体について、マウスにおけるエキスピボ体内分布試験を実施した。標識体を正常マウスの尾静脈から投与し、一定時間後における各臓器のプローブの取り込み量を算出することで、脳内動態や代謝経路を評価した。

マウスにおける代謝解析試験

標識体をマウスに投与し、一定時間後の血液と脳における代謝物や未変化体の存在比率を解析し、代謝安定性を評価した。

インビボブロック試験

標識体と非標識体(1 mg/kg)を正常マウスに同時に投与し、小動物用 PET により頭部の撮像を行った。非標識体の投与を行わない対照群についても同様に PET 撮像を行った。得られた PET 画

像から標識体の脳内取込量を定量解析し、投与群と対照群で結果を比較することで特異的結合の有無を明らかにした。

4. 研究成果

(1) ^{18}F -標識テトラヒドロキノリン誘導体の合成法確立

新規化合物の ^{18}F -化反応は、ボロン酸ピナコールエステル前駆体の銅触媒を使用した ^{18}F -化により実施した。銅触媒に $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ を使用し、各種反応条件を検討した結果、フッ素-18 の相関移動触媒としてテトラブチルアンモニウムトリフルオロメタンスルホネート、溶媒として *N,N*-ジメチルホルムアミドを使用し、110、20 分間反応させると、70%以上の ^{18}F -化率が得られると明らかとなった。またヒドロキサム酸化反応について、固相抽出により ^{18}F -化反応溶液中の銅触媒を除くことが必要であると確認できた。自動合成装置 (MPS-200、住友重機械工業) を使用して標識化合物の全合成を行った結果、約 5%の放射化学的収率で目的物が得られた。放射化学的純度は 96%、比放射能は約 2,500 MBq/nmol であった。

(2) ^{18}F -標識 HDAC6 プローブの生物学的評価

HDAC6 選択性の評価

化合物の HDAC1、HDAC6 に対する IC_{50} 値はそれぞれ、855 nM、7 nM であり、高い HDAC6 選択的結合性が示唆された。

マウスにおける体内分布試験

標識体の投与 10 分後にマウスの脳内放射能濃度はピーク (7.86% ID/g) に達し、その後緩やかな減少を示した (図 2)。脳/血液放射能濃度比は投与後 60 分の間、約 1.7 で推移し、標識体の脳移行性が示唆された。

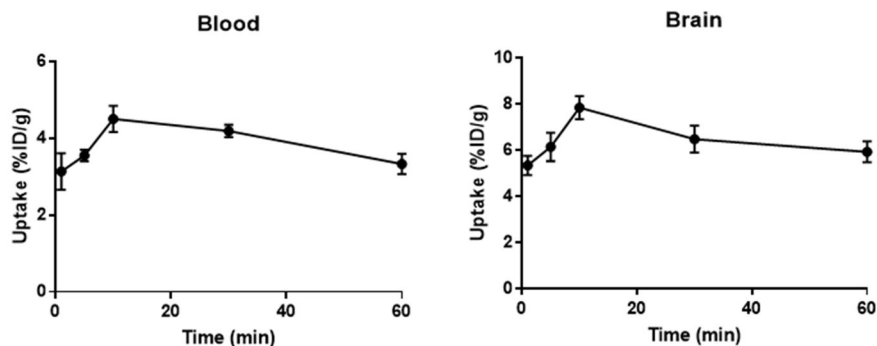


図 2. マウスの血中と脳中における標識体の時間放射能曲線

マウスにおける代謝解析試験

標識体の血漿中未変化体存在比率は投与後 15 分で約 6% であり、従って末梢において標識体は速やかに代謝されることが示唆された。一方で脳内においては未変化体の存在比率は投与後 30 分で約 79% であり、比較的安定して存在していることが示唆された。HPLC 分析の結果から、血漿中の放射性代謝物は主に、ヒドロキサム酸がカルボン酸に代謝された化合物であると確認された。

インビボブロッキング試験

標識体単独でマウスにおける PET 撮像を行った場合、脳内における放射能の集積が認められた一方で、非標識体の同時投与により脳への集積は減少した。従って標識体はマウスの脳内において HDAC6 に特異的に結合していることが示唆された。

(3) まとめ・今後の展望

本研究では PET 用脳内 HDAC6 イメージングプローブの開発を目的に、 ^{18}F -標識テトラヒドロキノリン誘導体の標識合成と生物学的評価を実施した。目的とする標識体は、ボロン酸ピナコールエステル前駆体からの銅触媒を使用した ^{18}F -標識法とヒドロキサム酸化反応からなる 2 段階反応により合成した。生物学的評価の結果、合成した標識体は高い HDAC6 選択性や脳移行性、代謝安定性などの HDAC6 プローブとして求められる特徴を有し、臨床応用の期待できるプローブであると結論付けられた。今後は標識合成法の最適化や、更なる生物学的評価として安全性試験やサルにおける PET 撮像などを実施し、臨床応用に向けた研究を進めていきたい。また血中動態の改良を目的として構造を設計した誘導体の合成も行っており、その性能評価を通じて、構造最適化による高性能なプローブの開発が可能かどうか探索していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tago Tetsuro, Toyohara Jun, Ishii Kenji	4. 巻 12
2. 論文標題 Preclinical Evaluation of an 18F-Labeled SW-100 Derivative for PET Imaging of Histone Deacetylase 6 in the Brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Chemical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 746 ~ 755
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acchemneuro.0c00774	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 多胡哲郎、豊原潤、石井賢二
2. 発表標題 脳内HDAC6 PETイメージングのための18F-標識テトラヒドロキノリン誘導体の開発
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuro Tago, Jun Toyohara, Kenji Ishii
2. 発表標題 Radiosynthesis and preliminary evaluation of a novel 18F-labeled probe for PET imaging of HDAC6 in the brain
3. 学会等名 The 11th China-Japan-Korea Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tetsuro Tago, Jun Toyohara, Kenji Ishii
2. 発表標題 Development of a PET probe for histone deacetylase 6 in the brain
3. 学会等名 第61回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多胡哲郎
2. 発表標題 [18F]F-の活性化法
3. 学会等名 PET化学ワークショップ2022
4. 発表年 2022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