

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月19日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390348

研究課題名(和文) アミロイドを標的とするSPECT用分子イメージングプローブの構築

研究課題名(英文) Development of molecular probe for SPECT imaging of amyloid in the brain

研究代表者

中山 守雄 (NAKAYAMA MORIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60164373

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでに、 ^{125}I 、 ^{11}C 、 ^{18}F で標識したフラボノイド誘導体が、 β アミロイド(A β)凝集体に対して高い親和性ならびに、脳への良好な移行性と脳からの迅速なクリアランスを示すことを報告した。本研究では、主に、核医学診断分野で最も繁用性に優れた $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を用いて標識したフラボノイド誘導体を合成し、評価した。安定で脂溶性の高い $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識体を得るための配位部位として、ジアミンジチオール型のMAMAとBATを導入した。そのうち幾つかの標識体は、A β (1-42)凝集体に対し高い結合親和性を示し、さらに、動物実験においては、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BAT-chalconeが、アミロイドの画像化に適した迅速な脳への取り込みと消失性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We have reported that ^{125}I , ^{11}C and ^{18}F labeled flavonoid derivatives showed excellent characteristics such as high affinity for β -amyloid (A β) aggregates and good uptake into and rapid clearance from the brain. In this study, we have synthesized and evaluated that novel flavonoid derivatives labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ that has become the most commonly used radionuclide in diagnostic nuclear medicine. The monoamine-monoamide dithiol (MAMA) and bis-amino-bis-thiol (BAT) were introduced to flavonoid derivatives as chelating site for the formation of stable and lipophilic $^{99\text{m}}\text{Tc}$ complexes. Some $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -flavonoid derivatives showed high binding affinity for A β (1-42) aggregates. In biodistribution experiments using normal mice, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BAT-chalcone displayed high uptake in the brain and the radioactivity washed out from the brain rapidly, which is highly desirable for A β imaging agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：アミロイド・アルツハイマー病・プリオン・SPECT・分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

疫学研究によると、現在、認知症を患っている人は、世界中で約 2400 万人に達すると推計され、さらに毎年、新たに 460 万人が発症しているといわれている。認知症に苦しむ患者さんの数は、20 年ごとに倍増し、2040 年までにはおよそ 8000 万人に増加すると推測され、このうち、アルツハイマー病関連の患者さんは 50~75% を占めるといわれている。しかしながら、現在、アルツハイマー病の確定診断を生前に行うことは難しく、信頼性の高い臨床的診断手法は複雑で限定的である。

一方、簡便で痛みを伴わない非侵襲的イメージング技術は、臨床診断法の向上によりアルツハイマー病の判定を可能にする上、治療方針の決定においても、また、患者さん自身や家族にとっても、大きな医学的意義を持つ。さらに早期での診断を可能にする新技術の開発は、特に有用なものとなる。また、この診断法は現在進められている治療薬の開発にも役立つと期待される。

2. 研究の目的

アルツハイマー病患者脳では、臨床症状が現れる以前の初期段階から A β の沈着が起こるといわれており、脳内 A β に選択的に結合する分子プローブの開発は、早期診断を実現できる可能性を持つものとなる。これまでに、米国のペンシルバニア大学やピッツバーグ大学の研究グループによって、いくつかの PET 用のアミロイド分子イメージング薬剤が報告されてきた。しかし、日本における PET 施設は、現在約 200 施設を超えるまでに増加したものの、今後予想されるアルツハイマー病患者数の増加にとっても対応できるものではない。すなわち、¹²³I、^{99m}Tc のような汎用性に優れた SPECT 用プローブの開発は必須であり、本研究では、SPECT 診断技術に対応する分子プローブ開発を集中して行うことを目的としている。

ただ、これまで PET 用に開発された分子プローブは、そのほとんどが、アミロイドの蛍光染色試薬であるコンゴーレッドおよびチオフラビン T の化学構造を基に分子設計された化合物であり、インビトロにおいて A β に高い結合性を示すものの、血液脳関門の透過性が低いこと、脳内での A β への特異的結合性が低いなどの問題を有していた。そこで、我々は、これらの合成着色料を基本骨格とする化合物以外の分子プローブの開拓が重要であると考えた。

すでに、我々は、広く植物界に分布する植物性色素であるフラボノイドの基本骨格を有する一連の化合物(フラボン、カルコン、オーロン誘導体)が、A β に高い結合親和性を有すること、正常マウス脳への高い移行性を示すことを明らかにしており、本研究でも、これらの化合物を中心に、SPECT 用薬剤への展開を行う事とした。

また、我々が開発した一連の化合物は、プリオンモデル動物の脳切片の染色実験において、異常プリオンの画像化薬剤としての可能性が大きいことを確認している。すなわち A β 以外のアミロイドに対するイメージング薬剤の開発にも、フラボノイドの基本骨格を有する一連の化合物を活用する。

3. 研究の方法

(1) アミロイド結合性プローブの合成

SPECT 製剤として、一連のフラボノイド化合物(フラボン、カルコン、オーロン)のヨウ素標識体と^{99m}Tc 標識体の開発を中心に、合成を進めた。

(2) A β 蛋白との結合性の検討

(1) で合成したヨウ素化合物に関しては、A β 蛋白(1-42)を用いたインビトロ結合実験系により、解離定数(Kd)を算出し、A β 親和性の目安として、50nM 以下の Kd 値を示す化合物の抽出を行った。一方、^{99m}Tc 標識化合物は、Tc に安定同位体が存在しないため、Tc と同属のレニウムで錯体を合成してみかけの Kd 値を求めた。

(3) 異常型プリオンモデル蛋白との結合性の検討

現在、異常型プリオンを試験管内で再現する方法が、確立されていないため、リコンビナントプリオンを用いるアプローチを実施した。

本学医歯薬学総合研究科の感染分子解析学研究室で作成したリコンビナントプリオンが自己凝集性を示すことから、これを異常プリオンのモデル蛋白質としてインビトロ結合実験系を構築する。

(4) トランスジェニックマウス(Tg2576)をアルツハイマー病モデル動物に用いる検討

A β 凝集体への高い結合親和性と良好なマウス体内放射能動態を示したプローブに関して、トランスジェニックマウス (Tg2576) を AD モデル動物に用いる検討を行う。Tg マウス脳を摘出し、凍結後、マイクロームにより、脳切片を作製し、各分子プローブを、チオフラビン T で処理後の蛍光分布や免疫染色の結果と比較検討し評価を行った。

(5) プリオン感染マウスをプリオン病モデルとして用いる検討

プリオン蛋白凝集体への結合性と良好なマウス体内放射能動態を示したプローブに関して、そのプリオン斑イメージングプローブとしての有用性を評価した。

4. 研究成果

(1) カルコン誘導体の^{99m}Tc及びRe錯体の設計・合成とA β (1-42)凝集体に対する結合親和性の検討

本研究では、まず、フラボノイド化合物の中でもカルコン骨格を中心に、臨床診断上汎用性の高い SPECT 用イメージングプローブの開発を

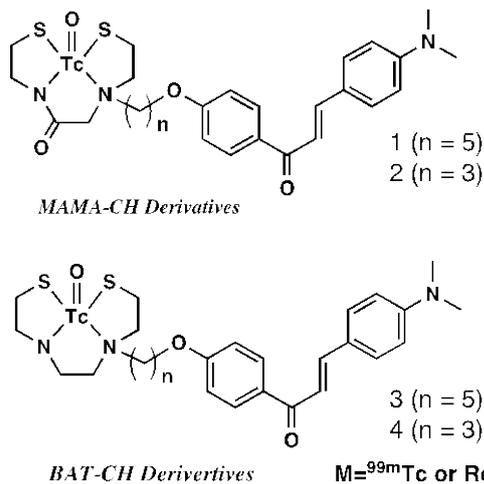


Fig. 1. Chemical structure of chalcone (CH) derivatives

目的として、新たな^{99m}Tc標識化合物を設計・合成し、そのアミロイドイメージングプローブとしての有用性について基礎的検討を行った。^{99m}Tcとの錯形成部位である monoamine-monoamide dithiol (MAMA) 及び bis-amino-bis-thiol (BAT) を導入したカルコン (CH) 誘導体を4種類 (Fig. 1) を作製し、その構造を推測するために同属元素であるReの錯体も合成した。

^{99m}Tc-glucoheptonateとの配位子交換反応により^{99m}Tc標識体を得た。^{99m}Tc標識体および対応するRe錯体をHPLC分析により比較し、得られた^{99m}Tc標識体の構造を推測した。これら4種の^{99m}Tc標識カルコン誘導体は、Aβ(1-42)凝集体を用いたインビトロ結合実験から、Aβ(1-42)凝集体に対する結合親和性を有することが示された。その結合親和性には、導入するアルキル鎖の長さの違いによる差異が認められたが、錯体部位の違いによる差異はほとんど認められなかった (Fig. 2)。

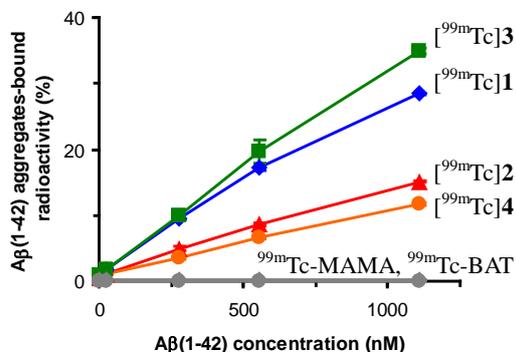


Fig. 2. Binding assay of ^{99m}Tc-labeled chalcone derivatives with Aβ(1-42) aggregates.

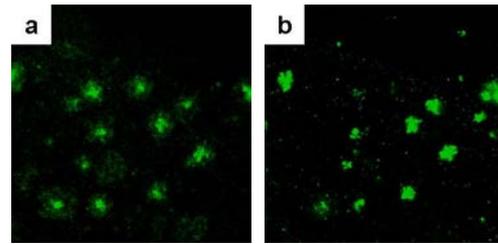


Fig.3. Fluorescent staining of Re-complex 4 on Tg2576 mouse brain sections(a). Labeled plaques were confirmed by staining of the adjacent sections with thioflavin-S(b)

アミロイド前駆蛋白を過剰発現する Tg2576 マウス脳切片を用いた蛍光染色実験において、脳切片上に化合物4のRe錯体由来の蛍光像が観察された (Figure 3a)。同時に隣接切片をアミロイド蛍光染色試薬であるチオフラビン S により染色したところ、Re錯体の蛍光染色部位と一致した (Figure 3b)。さらに、他の化合物でも同様の結果が得られ、^{99m}Tc標識カルコン誘導体はマウス脳切片上のアミロイド斑に対する結合選択性を有することが示唆された。

(2) ^{99m}Tc標識カルコン誘導体の体内放射能分布の検討

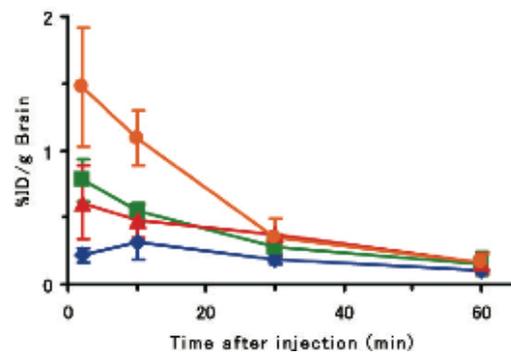


Fig. 4. Brain uptake and washout of ^{99m}Tc-labeled chalcone derivatives ◆ [^{99m}Tc]1, ■ [^{99m}Tc]3, ▲ [^{99m}Tc]2, ● [^{99m}Tc]4 in normal mice. Each value represents mean±SD for 3–6 mice at each interval.

正常マウスを用いた体内放射能分布実験においては、4種の^{99m}Tcカルコン誘導体は投与後早期における脳への移行性と、その後のクリアランスを示した (Fig. 4)。その脳移行性には、分子量及び錯体部位の違いによる影響が認められた。特に [^{99m}Tc]4 は良好な脳内放射能挙動を示した。

フラボン及びオーロンの^{99m}Tc及びRe錯体の設計・合成とAβ(1-42)凝集体に対する結合親和性の検討

さらに、一連のフラボノイド化合物について、SPECT製剤としての ^{99m}Tc 標識体の開発を中心に研究を進めた。カルコンに加えフラボン、オーロンを基本骨格に錯体形成部位を導入した数種の標識前駆体を合成し、いずれも、良好な放射化学的収率で ^{99m}Tc 標識体を得ることに成功した。

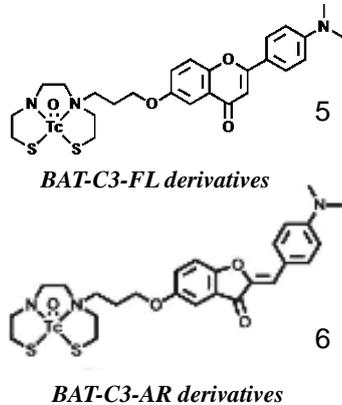


Fig. 5. Chemical structure of flavon(FL) and aurone (AR) derivatives

また、 $\text{A}\beta$ (1-42)凝集体を用いたインビトロ結合実験から、いずれの ^{99m}Tc 標識フラボノイド化合物も、アミロイド凝集体に対する結合親和性を有することが示された。

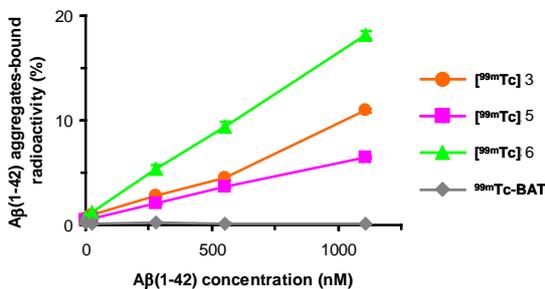


Fig. 6. Binding assay of ^{99m}Tc -BAT-C3-flavonoids with $\text{A}\beta$ (1-42) aggregates. Each data point was obtained from three separate experiments.

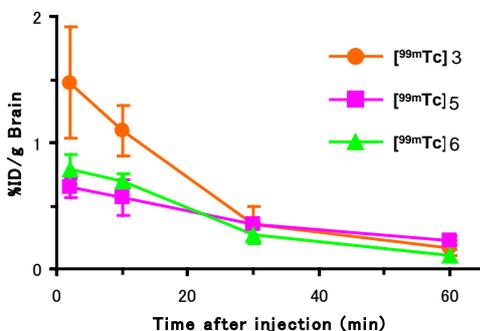


Fig. 7. Brain uptake and washout of ^{99m}Tc -BAT-C3-flavonoids in normal mice. Each data point was

obtained from three to six separate experiments.

一方、 Tc と同族のレニウム(Re)の錯体を合成し、 Tg2576 マウス脳切片を用いて蛍光染色実験を行った結果、脳切片上に Re 錯体由来の蛍光像が観察され、 ^{99m}Tc 標識フラボノイド化合物はマウス脳切片上のアミロイド斑に対する選択的結合性を有することが確認できた。

(3) 放射標識フラボノイド誘導体のプリオン病の画像診断薬剤としての応用性の検討

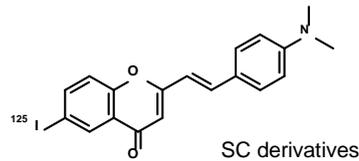


Fig. 8. Chemical structure of Styrylchromone (SC) derivatives.

これまでに開発した、一連の標識体を用いて、BSEプリオン感染モデルマウス脳切片との蛍光染色実験を行ったところ、フラボン、カルコンおよびオーロンでは脳切片上に顕著な蛍光像は観察されなかった。一方、フラボノイドの類縁体であるスチリルクロモンでは、脳切片上に化合物由来の蛍光像が確認された。この蛍光像は免疫染色による染色部位と一致したことから、スチリルクロモン誘導体は PrP^{Sc} への結合性を有することが示された。

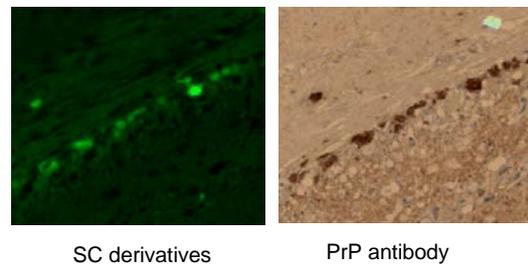


Fig.9. Imaging of PrP^{Sc} in brain sections of BSE adapted mouse (22-weeks infected).

そこで、これらの化合物の、異常型プリオン凝集体(PrP^{Sc})への親和性を定量的に評価するため、アミロイド様特性を示すリコンビナントマウスプリオンタンパク質(rMoPrP)を作成し、 PrP^{Sc} モデルとするインビトロ結合実験を進めた。その結果、フラボノイド及びスチリルクロモン誘導体間で結合親和性(Kd値)に差は認められなかったものの、スチリルクロモン誘導体はフラボノイド誘導体に比べて、 Bmax が大きいという結果が得られた。この様に、インビトロ結合実験からも、 PrP^{Sc} の画像化を行う上で、スチリルクロモンは有望な基本骨格となりうるものと評

価できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① T. Fuchigami, M. Haratake, Y. Magata, T. Haradahira, M. Nakayama : Synthesis and characterization of [¹²⁵I]2-IodoN-[(S)-{(S)-1-methylpiperidin-2-yl}(phenyl)methyl]3-trifluoromethyl-benzamide as novel imaging probe for glycine transporter 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, **19**, 6245-6253, 2011.
- ② H. Watanabe, M. Ono, H. Kimura, S. Kagawa, R. Nishii, T. Fuchigami, M. Haratake, M. Nakayama, H. Saji : A dual fluorinated and iodinated radiotracer for PET and SPECT imaging of β -amyloid plaques in the brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, **21**, 6519-6522, 2011.
- ③ M. Ono, H. Watanabe, R. Watanabe, M. Haratake, M. Nakayama, H. Saji : Diphenylpropynone derivatives as probes for imaging β -amyloid plaques in Alzheimer's brains, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, **21**, 117-120, 2011,
- ④ M. Ono, Y. Fuchi, T. Fuchigami, N. Kobashi, H. Kimura, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama: Novel benzofurans with ^{99m}Tc complexes as probes for imaging cerebral β -amyloid plaques, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, **1**, 443-447, 2010.
- ⑤ M. Ono, R. Ikeoka, H. Watanabe, H. Kimura, T. Fuchigami, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama : ^{99m}Tc/Re complexes based on flavone and aurone as SPECT probes for imaging cerebral β -amyloid plaques. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, **20**, 5743-5748, 2010,
- ⑥ M. Ono, R. Ikeoka, H. Watanabe, H. Kimura, T. Fuchigami, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama : Synthesis and Evaluation of Novel Chalcone Derivatives with ^{99m}Tc/Re Complexes as Potential Probes for Detection of β -Amyloid Plaques. *ACS Chemical Neuroscience*, 査読有, **1**, 598-607, 2010.
- ⑦ H. Watanabe, M. Ono, M. Haratake, N. Kobashi, H. Saji, M. Nakayama : Synthesis and characterization of novel phenylindoles as potential probes for imaging of β -amyloid plaques in the brain, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, **18**, 4740-4746, 2010.
- ⑧ M. Ono, R. Watanabe, H. Kawashima, Y. Cheng, H. Kimura, H. Watanabe, M. Haratake, H. Saji and M. Nakayama, Fluoro-pegylated chalcones as positron

emission tomography probes for *in vivo* imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 査読有, **52**, 6394-6401, 2009.

- ⑨ H. Watanabe, M. Ono, R. Ikeoka, M. Haratake, H. Saji and M. Nakayama, Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazoles for detecting β -amyloid plaques in the brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 査読有, **17**, 6402-6406, 2009.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 山下有紀, 小川綾華, 祖母井香織, 淵上剛志, 原武 衛, 小野正博, 佐野和憲, 新 竜一郎, 西田教行, 中山守雄: アミロイドイメージングプローブとしてのクロモン誘導体の評価. 日本薬学会 第 132 年会, 2012 年 3 月 30 日(札幌)
- ② 淵上剛志, 高野晶寛, Balazs Gulyas, Zhisheng Jia, Sjoerd J. Finnema, Jan D. Andersson, 間賀田泰寛, 原武 衛, 中山守雄, Halldin Christer : [¹¹C]N-Methyl-SSR504734 の脳内 glycine transporter 1 を標的とした PET イメージング剤としての有用性評価. 第 11 回放射線医薬品・画像診断薬研究会, 2011 年 12 月 3 日(京都)
- ③ 山下有紀, 小川綾華, 小野正博, 淵上剛志, 原武 衛, 中山守雄: アミロイドイメージングプローブとしての¹²⁵I 標識カルコン誘導体の合成と評価. 第 51 回 日本核医学会学術総会, 2011 年 10 月 28 日(つくば)
- ④ 小川綾華, 渡邊裕之, 小野正博, 新 竜一郎, 西田教行, 山下有紀, 淵上剛志, 原武 衛, 中山守雄: アミロイドイメージングプローブとしてのスチリルクロモン誘導体の評価. 第 51 回 日本核医学会学術総会, 2011 年 10 月 28 日(つくば)
- ⑤ 中山守雄, 下川研太, 針谷峻平, 岩竹真弓, 淵上剛志, 原武 衛: 臨床用 PET のための⁶⁸Ge/⁶⁸Ga ジェネレータシステムの開発-酸性基を導入した N-メチルグルカミン型樹脂の分離特性の検討-. 日本分析化学会 第 60 年会, 2011 年 9 月 16 日(名古屋)
- ⑥ T. Fuchigami, A. Takano, Y. Magata, M. Haratake, M. Nakayama, and C. Halldin : Synthesis and preliminary evaluation of a C-11 labeled N-{phenyl(piperidin-2-yl)methyl}benzamide derivative for visualization of glycine transporter 1 with PET. The 19th International Symposium on Radiopharmaceutical Science. 2011 年 8 月 30 日(アムステルダム)
- ⑦ M. Nakayama : *In vivo* imaging agents

based on flavonoids for amyloid's plaques in the brains of patients with alzheimer's disease. The Pharmaceutical Society of Korea(韓国薬学会), 2011年4月21日(釜山)

- ⑧ 小川綾華, 渡邊裕之, 小野正博, 新 竜一郎, 西田教行, 小橋信弥, 瀧口 徹, 淵上剛志, 原武 衛, 中山守雄: アミロイドイメーシングプローブとしてのスチリルクロモン誘導体の評価. 日本薬学会第131年会, 2011年3月30日(静岡)
- ⑨ 渡邊裕之, 小野正博, 木村寛之, 淵上剛志, 原武 衛, 佐治英郎, 中山守雄: オーロンを基本骨格としたβアミロイドイメーシングプローブの開発. 第50回 日本核医学会学術総会, 2010年11月12日(埼玉)
- ⑩ 小橋信弥, 原武 衛, 淵上剛志, 中山守雄: ¹²⁵I標識キナクリン及び関連化合物のアミロイドイメーシングプローブとしての評価. 第50回 日本核医学会学術総会, 2010年11月11日(埼玉)
- ⑪ 小川綾華, 渡邊裕之, 小野正博, 淵上剛志, 原武 衛, 中山守雄: 老人斑アミロイドイメーシングプローブとしてのスチリルクロモン誘導体の評価. 第50回 日本核医学会学術総会, 2010年11月11日(埼玉)
- ⑫ M. Nakayama, R. Ikeoka, M. Ono, T. Fuchigami, M. Haratake: Synthesis and evaluation of novel chalcone derivatives with ^{99m}Tc complexes for detection of β-amyloid plaques. 第20回 金属の関与する生物関連反応シンポジウム, 2010年6月25日(徳島)
- ⑬ 渡邊裕之, 小野正博, 真矢啓史, 淵上剛志, 原武 衛, 佐治英郎, 中山守雄: オーロンを基本骨格とするPET/SPECTハイブリッド型アミロイドイメーシングプローブの開発. 第5回 日本分子イメーシング学会総会・学術集会, 2010年5月22日～23日(滋賀)
- ⑭ 渕 靖史, 池岡諒一, 小野正博, 淵上剛志, 原武 衛, 中山守雄: 老人斑アミロイドイメーシング薬剤開発のための^{99m}Tc標識ベンゾフラン誘導体の合成と評価. 日本薬学会第130年会, 2010年3月30日(岡山)
- ⑮ 渡邊裕之, 小野正博, 原武 衛, 中山守雄: フェニルインドール誘導体のβアミロイドイメーシングプローブとしての基礎的評価. 日本薬学会第130年会, 2010年3月29日(岡山)
- ⑯ 渡邊裕之, 小野正博, 原武 衛, 中山守雄: フェニルインドールを基本骨格とする新規βアミロイドイメーシングプローブの開発. 第49回日本核医学会学術総会,

2009年10月1日(旭川)

- ⑰ 池岡諒一, 小野正博, 原武 衛, 中山守雄: フラボノイド化合物を母核とする^{99m}Tc標識アミロイドβイメーシングプローブの合成と評価. 第49回日本核医学会学術総会, 2009年10月1日(旭川)

[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]

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 守雄 (NAKAYAMA MORIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 60164373

(2) 研究分担者

原武 衛 (HARATAKE MAMORU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 40325668

荒野 泰 (ARANO YASUSHI)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 90151167

(H21→H22: 連携研究者)

(3) 連携研究者

石原 淳 (ISHIHARA JYUN)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 80250413

西田 教行 (NISHIDA NORIYUKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 40333520