

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07632

研究課題名(和文)パーキンソン病の病態解明に資する変異型LRRK2を標的としたPETプローブの開発

研究課題名(英文) Development of a PET probe targeting mutant LRRK2 to elucidate the pathogenesis of Parkinson's disease.

研究代表者

森 若菜 (Mori, Wakana)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 先進核医学基盤研究部・研究員

研究者番号：30835442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)は根本的な原因が未だに不明な点が多く、治療法はまだ確立されていない。しかし、原因遺伝子は同定されており、その中でも高頻度で認められている病変遺伝子として Leucine rich-repeat kinase 2(LRRK2)の変異が報告されている。本研究では、未だに解明されていないPDの病態解明に資する変異型LRRK2を標的とするPETプローブを開発し、小動物においてLRRK2に対する有効性を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、LRRK2に対して有用な化合物をリード化合物とし、標識合成可能な化合物を選定した。前駆体および標品の合成に成功し、さらに短寿命核種の標識化合物も安定的に効率よく合成に成功した。In vitro ARGにおいてそれぞれの集積に差が出たため、さらにLRRK2に対して親和性が高い化合物を見つけることでPDの病態解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The underlying causes of Parkinson's disease (PD) remain largely unknown, and a cure has yet to be established. However, causative genes have been identified, and mutations in Leucine rich-repeat kinase 2 (LRRK2) have been reported as one of the most frequently observed hospital genes. In this study, we developed a PET probe that targets mutant LRRK2, which contributes to the elucidation of the pathogenesis of PD, which is still unknown, and examined its efficacy against LRRK2 in small animals.

研究分野：放射線化学

キーワード：LRRK2 パーキンソン病

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は世界中で多くの人が罹患している進行形の神経変性疾患であり、神経伝達物質の一つであるドーパミンを産生するニューロンが変性することで運動機能が低下する病気である。しかし、PDの根本的な原因は不明点が多く、症状をコントロールする治療法はあるものの、根本的治療法はまだ確立されていない。遺伝子パーキンソン病の原因因子としてLeucine rich-repeat kinase 2(LRRK2)の変異が知られている。LRRK2は巨大なマルチドメインタンパク質であり、脳内だけでなく末梢組織にも広く分布しており、神経機能のみならず免疫応答においても重要な役割を持つと考えられている。LRRK2のPD関連変異体のうち最も頻度の高いG2019S型はLRRK2のキナーゼ活性を亢進させ、原因タンパクであるタウタンパクの異常なリン酸化を引き起こすことが知られている。しかしながら、LRRK2変異に起因する神経病変には多様性があり、不明な点が多い。このことからLRRK2の生理機能とLRRK2遺伝子変異による神経変異の機序を解明することは、PDのみならず広範な神経変性疾患の病態解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

LRRK2遺伝子の突然変異は家族性パーキンソン病において、もっとも高頻度で認められている病原因子であると報告されている。

本研究では、この病原因子である変異型LRRK2に対して優れた特性を示している化合物(ピラゾール骨格含有)をリード化合物とし、計算科学的手法を用いて候補化合物を複数デザインし、なかでも優れた特性を示した化合物に対して短寿命核種(^{11}C や ^{18}F など)で標識することで、家族性のみならずPDの根本的な病態を明らかにするために、変異型LRRK2を標的とした新しいPETプローブの開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではパーキンソン病の原因遺伝子であるLRRK2をターゲットとする ^{11}C 及び ^{18}F で標識された化合物を開発し、小動物において有効性を明らかにする。

(1)化合物設計

ターゲット分子であるLRRK2はタンパク質構造が明らかになっていないので、分子モデリングソフトを用いて多くのタンパク質構造が登録されているPDBデータから引用した変異型LRRK2と変異型LRRK2に対して阻害作用をもち、5員環および6員環の副素式芳香化合物を有する既存化合物(PF-06447475)をリード化合物とした候補化合物をドッキングして相互作用を確認した。

(2)化合物の合成

短寿命核種(^{11}C : $t_{1/2}=20$ 分、 ^{18}F : $t_{1/2}=110$ 分)で標識できる候補化合物(4種類)を既存の合成法を基に4-5ステップで合成した。また、標識合成に必要な前駆体(3種類)も合成した。前駆体に関しては標識反応の効率を上げるため、不純物が含まれないよう十分に精製を行った。(純度97%以上)

(3) 標識合成

標識合成はサイクロトロンより製造される ^{11}C と ^{18}F を用いて自動合成装置で標識合成を行った。今回は放射性合成中間体に $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{TEAF}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{FEtBr}$ を使用した。原料 1 と $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ 、原料 2 と $[^{18}\text{F}]\text{TEAF}$ 、原料 3 と $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ または $[^{18}\text{F}]\text{FEtBr}$ という組み合わせで標識合成を行った。

(4) 有用性評価

得られた標識薬剤を用いて小動物での実験を行った。

In vitro ARG：正常ラット脳の凍結切片を作製し、バッファーの中に入れ、放射薬剤とインキュベートを行ったあと、脳切片上の放射能を測定し、ARG 画像を得た。また、LRRK2 拮抗薬(PF-06447475)を用いることにより、放射性薬剤が LRRK2 に対して特異性や選択性があるのかを判断し、特異結合を算出した。

ラット PET：放射性薬剤をラットに投与し、PET で脳を撮像、時間-放射能曲線を求めた。また、LRRK2 拮抗薬(PF-06447475、MLi-2)を投与することで、脳内における LRRK2 の特異結合を算出した。

4. 研究成果

(1) 化合物設計・化合物の合成：短寿命核種で標識できる化合物を決定し、目的化合物および標識合成に必要な原料を合成した。出発原料には市販品であるピロールピリミジン誘導体を使用した。まず初めにシリル基で保護(収率：53%)し、その後、モルホリンと反応させ(収率：62%)、カップリング反応でベンゼン体を導入させた。得られた化合物の脱保護を行うため、TFA で反応させたのち、水を加えさらに反応させることで、3 種類の標品が得られた。(2steps 収率：50%(3-Methylphenyl 体:4)、18%(3-Fluorophenyl 体:5)、43%(3-Methoxyphenyl 体:6))

また、標識合成に必要な前駆体として 3-Bpin-phenyl 体(pyrrolo-N-H:1、pyrrolo-N-Si 保護:2) および 3-hydroxyphenyl 体(3) の合成に成功し、さらに、標品である 3-Fluoroethoxyphenyl 体(7)は生成した 3-hydroxyphenyl 体(3)にフルオロエチルトリフレート反応させることで得られることができた。

(2) 標識合成(図 1 参照)：原料 1 に *t*-BuOK、*t*BuMe₂P G2 を DMF に溶かし、中間体($[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$) と反応させたところ、収量： 1.1 ± 0.2 GBq、比放射能： 320 ± 25 GBq/ μmol で得られた。通常の高速メチル化反応では K_2CO_3 、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ などを使用するが、これらを使用したところ反応がスムーズに進まず、十分に目的物が得られないことが判明したため、上記のような触媒を使用した。また、原料 2 には、中間体に $[^{18}\text{F}]\text{TEAF}$ を使用し ^{18}F 化を行ったところ、収量： 0.9 ± 0.3 GBq、比放射能： 27 ± 13 GBq/ μmol だった。さらに原料 3 と $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ または $[^{18}\text{F}]\text{FEtBr}$ をそれぞれ反応させるとそれぞれ収量： 1.7 ± 0.4 GBq、 0.25 ± 0.02 GBq、比放射能： 45 ± 13 GBq/ μmol 、 115 ± 10 GBq/ μmol で得られた。

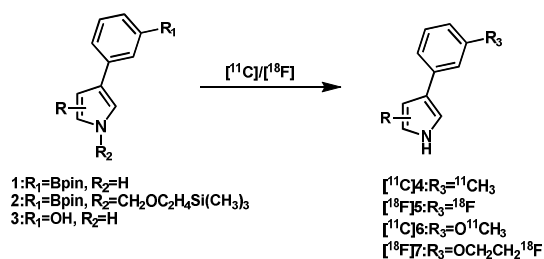


図1: 標識合成

(3)有用性評価

In vitro ARG: [¹¹C]4、[¹⁸F]5、[¹¹C]6、[¹⁸F]7
はそれぞれ大脳皮質、海馬、線条体など
LRRK2 が発現している部位への放射能集
積が確認された。(図2 参照)また、LRRK2
拮抗薬(PF-06447475)を用いたところ、
control より放射能集積が減ったのが確
認された。

なかでも[¹⁸F]5はLRRK2に対して多くの

特異結合を示し、[¹⁸F]7が一番S/N比が比較的高いことが確認された。

ラットPET：正常ラットを用いて行い、SUVは1.5ほどの値を示したが、脳内にはあま
り放射能集積が見られなかった。

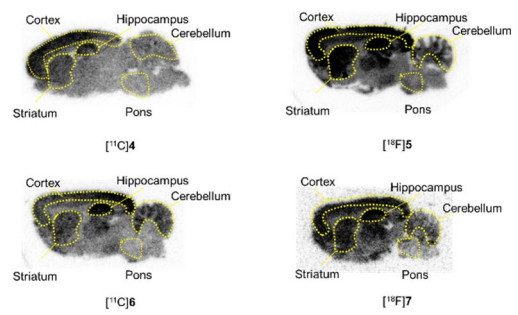


図2. In vitro ARG 画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森 若菜、念垣 信樹、山崎 友照、藤永 雅之、張 明栄
2. 発表標題 LRRK2をターゲットとする新規PETプローブの合成及び動物評価
3. 学会等名 第63回 日本核医学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森 若菜、念垣 信樹、山崎 友照、熊田 勝志、藤永 雅之、張 明栄
2. 発表標題 Radiosynthesis and evaluation of a new PET tracer for imaging of leucine-rich repeat kinase 2.
3. 学会等名 ISRS2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究分担者	藤永 雅之 (Fujinaga Masayuki) (70623726)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 先進核医学基盤研究部・主幹研究員 (82502)	
研究分担者	山崎 友照 (Yamasaki Tomoteru) (80627563)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 先進核医学基盤研究部・主任研究員 (82502)	

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
---------	---------