

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591813

研究課題名(和文)アルツハイマー病の早期診断を目的としたコリントランスポーターイメージング剤の開発

研究課題名(英文)Development of the Colin transporter imaging agent for early diagnosis of Alzheimer's disease

研究代表者

柴 和弘 (Shiba, Kazuhiro)

金沢大学・学際科学実験センター・教授

研究者番号：40143929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の早期診断・重症度診断を目指して、アルツハイマー病の認知障害と関係が深いコリン作動性神経の神経伝達系の前シナプスに存在するコリントランスポーター(ChT)とアセチルコリントランスポーター(VAChT)の変化を可視化定量する分子イメージング剤の開発を目指した。ChT用プローブとして、アクリジニル骨格を有する化合物群やHC-3誘導体を合成した。また、VAChT用プローブとして光学活性体である(-)-[1-125]O1DVを合成し、in vitro, in vivo実験の結果、(-)-O1DVが優れたVAChTイメージング剤となることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We aimed at the development of the imaging probe for early diagnosis of Alzheimer's disease (AD). The cognitive impairment of AD is related to the cholinergic nerve system. we targeted the cholin transporter(ChT) and the acetylcholine transporter(VAChT) which exist in pre-synapse in cholinergic nerve. We synthesized the imaging probes with high affinity for ChT or VAChT. We could not develop a probe with high affinity for ChT in in vitro assays. However, I could synthesize a probe with high affinity for VAChT such as (-)-o-iododecalinvesamicol(O1DV). Radioiodinated O1DV ((-)-[1-125]O1DV) accumulated in rat brain through B.B.B. In vivo blocking and ex vivo autoradiography study showed that (-)-[1-125]O1DV selectively accumulated in the VAChT in rat brain. These results showed that (-)-[1-125]O1DV bound selectively to VAChT in rat brain in vivo. Radioiodinated (-)-O1DV labeled with I-123 was suggested to be useful as a VAChT imaging agent for SPECT.

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：アルツハイマー病 コリン作動性神経 分子イメージング アセチルコリントランスポーター SPECT

## 1. 研究開始当初の背景

21世紀になって早10年が経過し、我が国は超高齢化社会が益々進み、高齢者の医療費が年々増加し、国の財政を圧迫している。高齢者特有の疾患である認知症は介護から入院そして死に至るまで何年も経過することから、その人的・金銭的負担は莫大なものである。そこで、認知症、特にアルツハイマー病の予防並びに早期診断・治療による症状の軽減化・進行度遅延が大変重要になってくる。アルツハイマー病を客観的に診断するには、アルツハイマー病の病理学的変化や神経化学的变化を鋭敏に捉える放射性核種標識分子イメージング剤の開発が必要である。最近、アルツハイマー病の比較的初期から見られる老人斑の原因物質であるアミロイド蛋白を描画するイメージング剤の研究が注目を集めている。しかし、その集積とアルツハイマー病の症状が相関しないという報告や脳内での非特異的結合の割合が大きいなどの問題があり、まだ多くの課題が残されている。アルツハイマー病の神経化学的变化としてはコリン作動性神経系が注目されている。これまでに、アセチルコリンエステラーゼ (ChE) (アセチルコリン分解酵素) を描画するイメージング剤の研究が行われてきた。これは代謝型トレーサーであり、ChE 活性(数及び強さ)に反映してイメージングするものであり、ChE 活性に反映したイメージングが得られるとされている。しかし、これらの代謝型トレーサーは一般的に不安定であり、血中での分解が速いことが課題とされている。

また、コリン作動性神経系ではコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) (アセチルコリン合成酵素) やアセチルコリントランスポーター (VAChT) それにコリントランスポーター (CHT) のようなシナプス前終末部の変化が早い段階から大きいとされており、アルツハイマー病を早期の段階で発見するには ChAT、VAChT 及び CHT のようなシナプス前コリン作動性神経系を画像化する分子イメージング剤を開発することが重要と考えられる。これまでにシナプス前終末部のシナプス小胞膜に存在するアセチルコリントランスポーター (VAChT) を画像化する分子イメージング剤の研究が米国を中心として数多く研究されてきた。我々も SPECT 用の放射性ヨウ素標識 (-)-oIV 及び PET 用の (-)-[<sup>11</sup>C]OMV (研究業績を開発し、アルツハイマー病モデル動物 (ラット, サル) で前頭葉皮質や側頭葉皮質に有意な減少が見られることを示し、その有用性を報告してきた。一方、アミロイド蛋白がコリン再取り込みの調節を阻害するという報告やアセチルコリンの合成の律速段階がコリンの再取り込みであること、また、アルツハイマー病モデル動物である Tg2576 トランジェニックマウスにおいて有意なアミロイド蛋白の沈着が見られない段階での ChT の減少やアミロイド沈着が見られた老齢の Tg2576 マウスでの

ChT の減少並びに VAChT の増加が報告されたことなどから、アルツハイマー病の早期診断にとって、コリン再取り込み部位である ChT の変化を調べることが重要であり、さらに、重症度診断をする場合は VAChT と ChT の変化を調べ比較することが重要であると考えるようになった。

## 2. 研究の目的

本研究では新しい放射性核種標識 ChT 及び VAChT 分子イメージング剤を開発し、アルツハイマー病の客観的早期診断及び重症度診断及び将来的な治療指針予測の可能性について検討する。世界では ChT 分子イメージング剤の開発研究として、これまでに ChT に高い親和性を有するヘミコリニウム - 3 (HC-3) を利用した放射性核種標識 HC-3 の報告しかない。それも HC-3 自体が水溶性であり、血液 - 脳関門を通過できないため、インビボで脳内に集積しないため、新たな構造を有する化合物を見つけ出す必要がある。

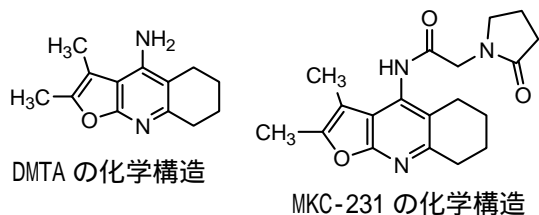
我々は網羅的な文献検索により ChT のコリン再取り込み能力を増強させるアクリジン類似構造を有する脂溶性化合物の存在を見つけた。そこで、このアクリジン類似化合物を基本構造とする化合物の誘導体を合成し、構造活性相関を調べることにより、ChT に高い親和性を有する化合物を見つけ出し、放射性核種標識分子イメージング剤の開発を目指すとともに、さらに選択性に優れた新しい VAChT イメージング剤の開発も目指す。

## 3. 研究の方法

### 3-1) コリントランスポーター (ChT) イメージングプローブの開発

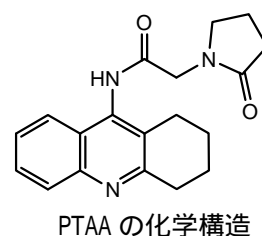
#### 3-1-1) DMTA 及び MKC-231 の合成

2-amin0-4,5-dimethyl-3-furancarbonitril を出発原料として、Chiaki H, et al らの方法<sup>1)</sup>を応用して、それぞれ2工程、3工程で合成した。



#### 3-1-2) PTAA の合成

Tacrine (THA) を出発原料として、Chiaki H, et al らの方法<sup>1)</sup>を応用して、それぞれ2工程で合成した。



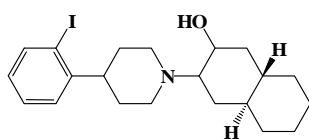
### 3-1-3) 合成した ChT プロープの *in vitro* 評価

合成した 4 つの化合物の ChT 親和性を調べるために *in vitro* 薬物阻害実験を行った。ラジオリガンドとして 5 nM [<sup>3</sup>H]hemicholinium-3([<sup>3</sup>H]HC-3)を用いた。合成した 4 つの化合物 (DMTA, MKC-231, THA, PTAA)は 10<sup>-4</sup> ~ 10<sup>-10</sup>M の 9 種類の濃度で調べた。反応は室温(23 )で、反応時間 30 分で行った。

### 3-2) アセチルコリントランスポーター (VChT)イメージングプローブの開発

#### 3-2-1) O1DV の合成

o-bromobenzaldehyde を出発原料とし、既報の合成経路に従って、7 工程でラセミ体 O1DV((+/-)-O1DV)を合成した。



(+/-)-O1DV の化学構造

#### 3-2-2) O1DV の立体異性体分離

合成したラセミ体 O1DV を CHIRAL PAK IA カラムを用いた HPLC により、立体異性体分離を行った。移動相にはヘキサン：ジクロロメタン：ジエチルアミンの 80：20：0.1 の混合溶媒を用いた。カラム温度は 40、流速は 1.9 mL/min とし、UV は吸収波長 240 nm で測定した。分離したそれぞれの光学活性体は、旋光度計により、比旋光度を測定し、旋光性(+),(-)を決定した。

#### 3-2-3) 光学異性体 O1DV の構造決定

HPLC により、光学分割した(-)-O1DV 及び(+)-O1DV を X 線結晶構造解析により、絶対構造を決定した。

#### 3-2-4) (-)-O1DV 及び(+)-O1DV の *in vitro* 評価

(-)-O1DV 及び(+)-O1DV の VChT 親和性及びシグマ受容体 ( -1、 -2) 親和性を調べるために *in vitro* 薬物阻害実験を行った。

#### ラット脳・肝臓組織の試料調製

S Dラット脳及び肝臓ホモジナイズの核分画を取り除いた後、超遠心機(55,000 × g、60 分間)により、シナプスを多く含む P2、P3 分画を得た。

#### VChT, シグマ受容体親和性

ラジオリガンドとして、VChT 親和性用に 10nM [<sup>3</sup>H]vesamicol、 - 1 受容体用に 5nM [<sup>3</sup>H]pentazocine、 - 2 受容体用に 5nM [<sup>3</sup>H]DTG を用いた。(-)-O1DV 及び(+)-O1DV 含む調査薬物は 10<sup>-5</sup> ~ 10<sup>-10</sup>M の 10 種類の濃度で調べた。反応は 37 で行い、反

応時間は VChT で 60 分、シグマ受容体で 90 分とした。データはグラフパッドソフトにより行い、親和性の強さを Ki 値で評価した。

#### 3-2-5) *In vivo* 評価

##### *In vivo* 阻害実験

S Dラット (230 g - 280 g) に <sup>125</sup>I で標識した(-)-[<sup>125</sup>I]O1DV 又は(+)-[<sup>125</sup>I]O1DV (185 kBq)と 3 種の阻害薬物((+/-)-vesamicol、(+)-pentazocine、(+)-3-(3-hydroxyphenyl)-N-propylpiperidine((+)-3-PPP)を同時投与し、投与後 60 分での脳内集積率の変化を調べた。

(-)-[<sup>123</sup>I]O1DV オートラジオグラフィ実験  
臨床核種である <sup>123</sup>I で標識した(-)-[<sup>123</sup>I]O1DV(18.5 MBq)を S Dラットに投与し、60 分後に屠殺し、脳を摘出し、脳切片を作製し、イメージングプレートを用いて *ex vivo* オートラジオグラムを得た。

## 4. 研究成果

### 4-1) コリントランスポーター (ChT) イメージングプローブの開発

DMTA, MAC-231 及び PTAA の出発原料からの通算収率はそれぞれ 43.1%, 28.0%及び 73.4% だった。化学構造は NMR および質量分析により決定した。

#### 4-1-1) 合成した ChT プロープの *in vitro* 評価

合成した DMTA, MKC-231, THA 及び PTAA の ChT 親和性は THA の IC<sub>50</sub>=10<sup>-5</sup>M が最高で、他の化合物は ChT に対する親和性を示さなかった。逆に、MKC-231 は結合の増加が見られた (図 - 1)。

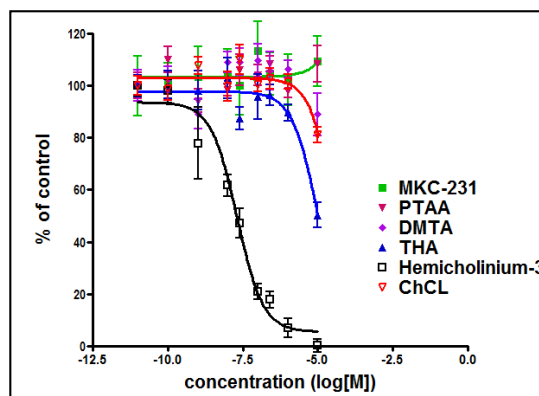


図 - 1 ChT 親和性

### 4-2) アセチルコリントランスポーター (VChT)イメージングプローブの開発

#### 4-2-1) O1DV の合成

(+/-)-O1DV は出発原料から通算収率 7.4% で合成した。

4-2-2) 光学異性体 01DV の分離と構造決定  
 (-)-01DV の塩酸塩結晶のX線構造解析結果と立体構造式を図 - 2 に示す。

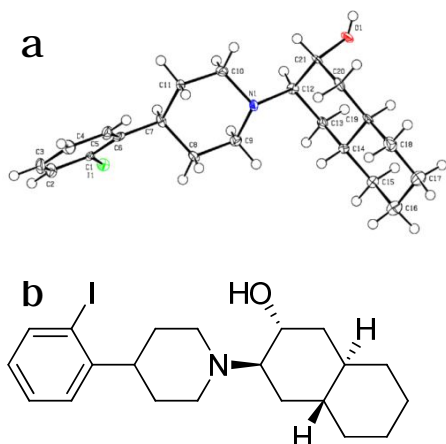


図 - 2 結晶構造(a)と化学構造(b)

4-2-3) (-)-01DV 及び(+)-01DV の *in vitro* 評価

光学異性体である(-)-01DV と(+)-01DV で VAcHT 親和性および選択性に違いが見られた。すなわち、(-)-01DV は VAcHT 親和性が  $K_i=22.1$  nM と(+)-01DV ( $K_i=79.0$  nM) に比べて約 4 倍高く、また、VAcHT 親和性と 受容体親和性の比も(+)-01DV より優れており、高い VAcHT 選択性を示すことがわかった。

表 - 1 VAcHT, 受容体親和性

Compounds	$K_i$ (nM)		
	VAcHT	$\alpha$ -1	$\alpha$ -2
(-)-01DV	22.1 ± 4.3	168 ± 47.2	59.9 ± 10.6
(+)-01DV	79.0 ± 19.9	316 ± 26.3	101 ± 18.8
(+/-)-01DV	21.8 ± 4.7	164 ± 26.7	85.3 ± 15.7
DV	8.6 ± 2.5	74.4 ± 12.0	65.9 ± 12.1
(+/-)-vesamicol	23.3 ± 3.3	19.4 ± 3.0	70.0 ± 16.6
pentazocine	-	8.7 ± 1.9	2210 ± 653
DTG	-	94.3 ± 19.4	36.5 ± 4.4

3-2-4) *In vivo* 評価

*In vivo* 阻害実験の結果、(-)- $^{125}$ I]01DV は(+/-)-vesamicol の同時投与により脳全体の集積が約 70%以上減少した。また、受容体リガンドの(+)-pentazocine や(+)-3-PPP を同時投与した際の集積率とコントロールとの集積率に有意な差はみられなかった。一方、(-)- $^{125}$ I]01DV も(+/-)-vesamicol により集積が減少したが、阻害率は約 50%であった。また、他の阻害剤による有意な阻害効果はみられなかった。

(-)- $^{123}$ I]01DV の *ex vivo* オートラジオグラフィ実験の結果、VAcHT 密度の高い大脳皮質、線条体、対角帯、視床、扁桃核、三叉神経核、顔面神経核の描出に成功した。また、0.125  $\mu$ mol の(+/-)-vesamicol の同時投与により、脳全体の放射能集積が減少するとともに、上記の部位への集積も顕著に減少した。

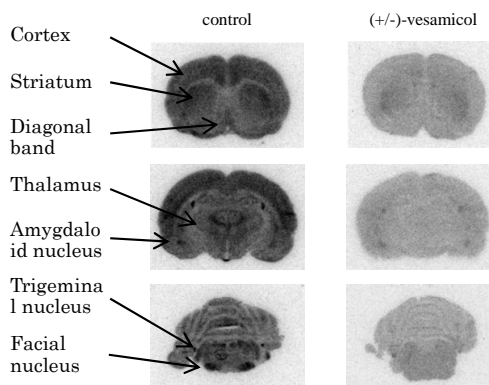


図 - 3 (-)- $^{123}$ I]01DV のオートラジオグラム

以上のことから、01DV の光学異性体である(-)-01DV は *in vivo* VAcHT 分子イメージング剤としての優れた性質を有することがわかった。今後、(-)- $^{123}$ I]01DV による SPECT 撮像を行うことにより、SPECT 用 VAcHT イメージング剤として可能性を検討していくことが重要である。

#### 参考文献

1) Chaki, H., Yamabe, H., Sugano, M., et al. Design and Syntheses of 4-acylaminopyridine derivatives: novel high affinity choline uptake enhancers II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 5 (1995), 1493-1500.

#### 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 2 件)

1. Kozaka, T., Uno, I., Kitamura, Y., Miwa, D., Aziz, M.A., Ogawa, K., Shiba, K. Regional brain imaging of vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) using  $o$ - $^{125}$ I]iodo-trans-decalin vesamicol as a new potential imaging probe. *Synapse*. (査読有), Vol. 68, (2014), 107-113. DOI: 10.1002/syn.21720.
2. Kozaka, T., Uno, I., Kitamura, Y., Miwa, D., Ogawa, K., Shiba, K. Syntheses and *in vitro* evaluation of decalinvesamicol analogues as potential imaging probes for vesicular

acetylcholine transporter (VAcHT). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (査読有), Vol.20 (2012), 4936-4941. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.06.040>.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Azim, MA., Kozaka T., Uno, I., Miwa, D., Kitamura, Y., Ogawa, K., Kawai, K., Makino, A., Kiyono, Y and Shiba, K. Evaluation of radiolabeled o-bromo-decalinvesamicol (OBDV) as a PET ligand for the Vesicular Acetylcholine Transporter (VAcHT). International Workshop on Molecular Functional Imaging for Brain and Gynecologic Oncology. ユアーズホテルフクイ(福井市) 2014年3月3-4日.
2. 三輪大輔, 小阪孝史, 鶴野いずみ, 北村陽二, Azim Mohammad A., 河村和紀, 小川数馬, 川井恵一, 柴和弘. 脳内小胞アセチルコリントランスポーター(VAcHT)のPETイメージングプローブ [<sup>11</sup>C]OMDV の開発, 第11回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、清水テルサおよび三保園ホテル(静岡市)、2013年8月29, 30日.
3. 鶴野いずみ, 小阪孝史, 三輪大輔, 北村陽二, Azim Mohammad A., 小川数馬, 川井恵一, 柴和弘. VAcHT イメージング用 [<sup>125</sup>I]OBDV のジアステレオマー分離と in vivo 脳内動態変化. 第11回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、清水テルサおよび三保園ホテル(静岡市)、2013年8月29, 30日.
4. Kozaka T., Miwa D, Uno I, Kitamura Y., Azim MA, Ogawa K, Kinuya S, Kawai K, Shiba K. The development of potential vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) PET imaging probes. 2013 SNMMI 60th annual meeting. Vancouver Convention Centre, Vancouver, BC, Canada, June 8-12, 2013.
5. Uno I, Kozaka T., Kitamura Y, Miwa D, Azim MA, Ogawa K, Kawai K, Taki J, Kinuya S, Shiba K. In vivo evaluation of radioiodinated o-iodo-trans-decalinvesamicol (O I D V) as a vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) imaging agent. 2013 SNMMI 60th annual meeting. Vancouver Convention Centre, Vancouver, BC, Canada, June 8-12, 2013.
6. 小阪孝史, 三輪大輔, 鶴野いずみ, 北村陽二, Mohammad Anwer-ul AZIM, 川村和紀, 小川数馬, 川井恵一, 柴和弘: アルツハイマー病の早期診断を目的とした新規 PET 用 VAcHT イメージング剤 [<sup>11</sup>C]OMDV の合成と in vivo 評価、日本薬学会第133年会(パシフィコ横浜、横浜市) 2013年3月27日~30日.
7. 鶴野いずみ, 小阪孝史, 三輪大輔, 北村陽二, Mohammad Anwer-ul AZIM, 小川数馬, 川井恵一, 柴和弘: OBDV のジアステレオマー分離とその選択的 VAcHT イメージング剤としての評価、日本薬学会第133年会(パシフィコ横浜、横浜市) 2013年3月27日~30日.
8. 小阪孝史, 三輪大輔, 鶴野いずみ, 北村陽二, Azim Mohammad Anwar-ul, 小川数馬, 川井恵一, 絹谷清剛, 柴和弘: PET 用 VAcHT イメージング剤の開発研究, 第12回放射性医薬品・画像診断薬研究会(京都テルサ, 京都市), 2012年12月15日.
9. 鶴野いずみ, 小阪孝史, 三輪大輔, 北村陽二, 道関美祐, 小川数馬, 川井恵一, 河原 栄, 柴和弘, 前シナプスコリン作動性神経描画用新規 VAcHT イメージング剤の開発, 第7回日本分子イメージング学会総会・学術大会、アクトシティ浜松(浜松市) 2012年5月24日~25日.
10. 鶴野いずみ, 小阪孝史, 北村陽二, 小川数馬, 川井恵一, 絹谷清剛, 柴和弘: VAcHT イメージング用新規プローブの合成とその評価, 第11回放射性医薬品・画像診断薬研究会(京都市), 2011年12月3日.
11. 小阪孝史, 鶴野いずみ, 北村陽二, 小川数馬, 川井恵一, 絹谷清剛, 柴和弘: Vesamicol 誘導体を用いた新規 VAcHT イメージング剤の開発, 第51回日本核医学会学術総会(筑波市), 2011年10月29日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柴 和弘 (SHIBA KAZUHIRO)  
金沢大学・学際科学実験センター・教授  
研究者番号: 40143929

### (2) 研究分担者

北村 陽二 (KITAMURA YOJI)  
金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
研究者番号: 10368483

小阪 孝史 (KOZAKA TAKASHI)  
金沢大学・学際科学実験センター・助教  
研究者番号: 50579836