

平成 27 年 5 月 9 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670540

研究課題名(和文) AAアミロイドーシスの分子イメージングを目指した放射性標識プローブの開発

研究課題名(英文) Development of radiolabeled probes for molecular imaging of AA amyloidosis

研究代表者

向 高弘 (MUKAI, Takahiro)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30284706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：AAアミロイドーシスの核医学診断を目的に、放射性ヨウ素チオフラビン誘導体13を合成し、その評価を行った。得られた放射性ヨウ素標識体をマウス血漿中でインキュベートし安定性を検討したところ、24時間後でもほとんど分解を認めなかった。次いで、正常マウスに投与し、その生体内分布を検討した。その結果、本化合物は脳には移行しておらず、血液脳関門を通過しないことがわかった。また、血液中から速やかに放射能が消失し、投与早期から腎臓、肝臓、脾臓に高い放射能集積が認められた。甲状腺への集積は低く、脱ヨウ素化反応には安定であった。投与24時間後には約70%が排泄されており、体内からの消失は良好であった。

研究成果の概要(英文)：For nuclear imaging of AA amyloidosis, we synthesized and evaluated a radioiodinated Thioflavin T derivative 13. In mouse plasma, [I-125]13 showed high stability after 24-h incubation. In normal mice, [I-125]13 showed rapid blood clearance and high accumulation of radioactivity in kidney, liver and spleen at early time points. Little accumulation of radioactivity in brain suggested that [I-125]13 would not across the blood-brain barrier. The accumulation of radioactivity in thyroid was also very low indicating high in vivo stability against deiodination reaction. After 24 h, about 70% of radioactivity was excreted from the body.

研究分野：放射線科学

キーワード：薬学 放射線 イメージング

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチなどの慢性炎症性疾患に合併する続発性アミロイドーシスは、アミロイド線維を形成する前駆タンパク質が SAA に由来することから、AA アミロイドーシスとよばれる(図1)。AA アミロイドーシスは最初に脾臓で沈着が生じ、続いて肝臓、腎臓、消化管、全身の血管などに沈着が波及する。発症早期の脾臓や肝臓でのアミロイド沈着は無症候の場合が多く、病状が進行し腎障害によるタンパク尿や、下痢や腹痛といった消化器症状が出現した後に診断されることもまれではない。現在、アミロイドーシスと診断された後の予後は非常に悪い。治療法としては、SAA の産生をできるだけ抑えることが合理的であると考えられ、免疫抑制剤や抗サイトカイン療法などの薬物治療が施行されているが、臓器障害がほとんどない時期にアミロイドーシスの診断を行い、強力な炎症治療を病態早期より行うことが最も重要となる。AA アミロイドーシスの診断は、本邦では胃・十二指腸粘膜生検が多用されているが、臓器の生検に危険を伴う場合も多い。また、こうした組織化学診断法では、薬物治療などのモニタリングを効果的に行うことは困難である。

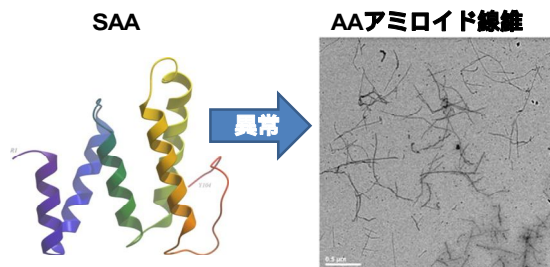
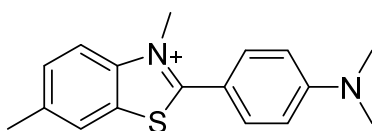


図1

アミロイドーシスは、アミロイド線維が臓器に蓄積することによって機能障害を引き起こす疾患の総称である。多くのアミロイド線維に結合する蛍光色素としてチオフラビン T(1、図2)が知られており、そのベンゾチアゾール骨格を基盤としたアミロイドイメージングプローブが開発されている。ベンゾチアゾール骨格を有する化合物の多くは蛍光性を持ち、アミロイド線維に結合する性質を持つが、その選択的結合性については未だ十分に検討されていない。



Thioflavine T (1)

図2

2. 研究の目的

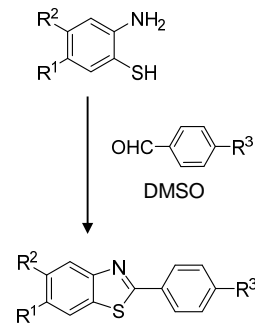
本研究では、アミロイド結合性化合物であ

るチオフラビン T のベンゾチアゾール骨格の置換基を検討することによって、特定のアミロイド線維に結合する蛍光性化合物の構造要因について検討した。また、チオフラビン T 構造を起源とした放射性ヨウ素標識体を合成し、これを投与して、体外よりアミロイドに結合した標識体の分布を検出することで、アミロイドーシスの診断を行うことを計画した。

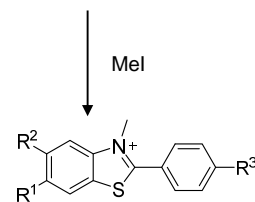
3. 研究の方法

(1) ベンゾチアゾール誘導体の合成

4-(dimethylamino)benzaldehyde, 4-nitrobenzaldehyde, または 4-iodobenzaldehyde に種々のアミノベンゼンチオールを反応させ、ベンゾチアゾール誘導体を合成した。さらに、7、8、9、13 についてはヨードメタンを用い、ベンゾチアゾール骨格の窒素原子上に選択的にメチル基を導入し、4 級アミンを得た(図3、4)。



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
2: Br	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
3: CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
4: H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
5: CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>
6: CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	I



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
7: Br	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
8: CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
9: H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

図3

(2) 蛍光特性評価

合成した化合物について、各種溶媒(ベンゼン、ジエチルエーテル、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、アセトニトリル、DMSO、エタノール)を用いて溶液を作製し、蛍光分光光度計で測定した。

(3) 放射性ヨウ素標識

トリブチルスズ体である 12 のカウンターイオンを I から OH に交換したものを標識前

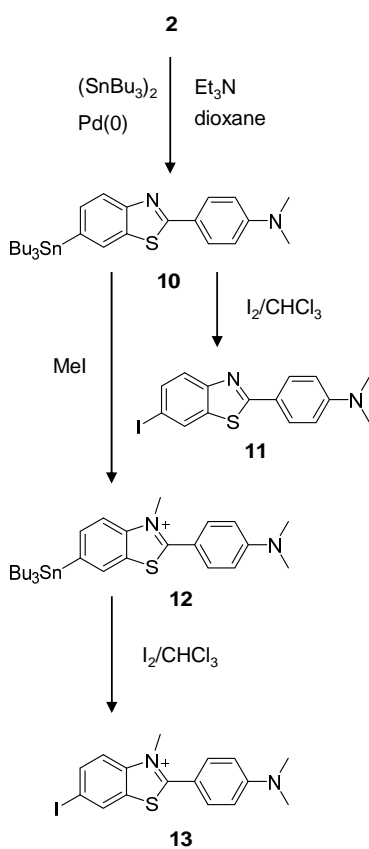


図 4

駆体とし、スズ - 放射性ヨウ素交換反応により行った。

#### (4) 放射性ヨウ素標識体の安定性評価

放射性ヨウ素標識体をリン酸緩衝液 (pH 7.4)、マウス血漿にそれぞれ加え、37 で 24 時間インキュベートし、経時的に HPLC にて分析した。

#### (5) 放射性ヨウ素標識体の生体内分布

放射性ヨウ素標識体を ddY マウス (6 週齢) に静脈内投与し、経時的に血液を採取した後、各臓器を摘出し、カウンタによる放射能測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ベンゾチアゾール誘導体の合成

	Yield (%)	CLogP
<b>2:</b>	84	5.35
<b>3:</b>	46	5.40
<b>4:</b>	51	4.46
<b>5:</b>	50	4.88
<b>6:</b>	33	6.26
<b>7:</b>	28	0.54
<b>8:</b>	100	0.61
<b>9:</b>	100	-0.33
<b>10:</b>	47	12.65
<b>11:</b>	43	5.61
<b>12:</b>	96	7.86
<b>13:</b>	100	0.80

図 5

$R^1, R^2, R^3$  にそれぞれ電子供与性または電子求引性基を導入したベンゾチアゾール誘導体 (**2-13**) を合成した。収率および CLogP 値を図 5 に示す。7-9、13 はベンゾチアゾール骨格の窒素原子上にメチル基を導入したことにより、低い CLogP を示した。

#### (2) 蛍光特性評価

合成した化合物はすべて蛍光を示し、溶媒の極性によって波長が変化した。蛍光強度については、4 級アミン (**7-9**、**13**) にすること

表 1 UV-Vis absorption property

Solvent	absorption maximum (nm) (log $\epsilon$ ) <sup>a</sup>				
	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
benzene	362 (4.76)	356 (4.57)	356 (4.71)	357 (4.26)	328 (4.28)
diethyl ether	355 (4.74)	350 (3.78)	349 (4.67)	349 (3.08)	324 (3.95)
chloroform	365 (4.85)	355 (4.43)	357 (4.67)	264 (4.29)	317 (4.33)
dichloromethane	365 (4.81)	357 (4.57)	357 (4.87)	357 (4.39)	327 (4.20)
acetone	311 (4.56)	354 (4.57)	354 (4.68)	352 (4.15)	326 (4.57)
acetonitrile	364 (4.71)	356 (4.57)	356 (4.62)	301 (4.36)	323 (4.36)
DMSO	373 (4.31)	362 (4.49)	363 (4.53)	357 (3.86)	328 (4.37)
ethanol	365 (4.76)	358 (4.42)	357 (4.64)	350 (3.91)	323 (4.34)

Solvent	absorption maximum (nm) (log $\epsilon$ ) <sup>a</sup>				
	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>13</b>
benzene	363 (4.14)	354 (4.31)	299 (3.91)	364 (4.66)	298 (4.12)
diethyl ether	356 (3.98)	350 (3.86)	272 (0)	358 (4.30)	453 (3.51)
chloroform	265 (4.37)	265 (4.29)	286 (4.39)	361 (4.57)	264 (4.18)
dichloromethane	321 (4.18)	352 (4.29)	303 (4.37)	368 (4.52)	298 (4.14)
acetone	326 (4.23)	345 (4.37)	326 (4.11)	365 (4.74)	328 (4.01)
acetonitrile	314 (4.10)	346 (4.30)	301 (4.36)	366 (4.54)	295 (4.19)
DMSO	318 (4.20)	344 (3.92)	306 (4.12)	370 (4.38)	322 (3.87)
ethanol	317 (4.15)	345 (4.26)	306 (4.12)	365 (4.62)	321 (3.76)

<sup>a</sup>Molar absorption coefficient

表 2 Fluorescence property

Solvent	emission maximum (nm) (RI) <sup>a</sup>				
	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
benzene	408 (1.000)	408 (0.361)	405 (0.947)	ND <sup>b</sup>	387 (0.023)
diethyl ether	404 (1.000)	402 (0.461)	399 (0.759)	391 (0.001)	ND <sup>b</sup>
chloroform	411 (1.000)	404 (0.258)	405 (0.730)	ND <sup>b</sup>	377 (0.015)
dichloromethane	417 (1.000)	408 (0.976)	409 (1.068)	ND <sup>b</sup>	378 (0.014)
acetone	427 (1.000)	413 (0.926)	416 (1.101)	ND <sup>b</sup>	380 (0.010)
acetonitrile	428 (1.000)	416 (0.602)	419 (2.727)	ND <sup>b</sup>	382 (0.055)
DMSO	441 (1.000)	423 (1.880)	429 (2.023)	439 (0.004)	380 (0.055)
ethanol	428 (1.000)	419 (0.758)	420 (0.889)	ND <sup>b</sup>	378 (0.013)

Solvent	emission maximum (nm) (RI) <sup>a</sup>				
	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>11</b>	<b>13</b>
benzene	410 (0.260)	405 (0.247)	405 (0.013)	414 (0.438)	429 (0.010)
diethyl ether	404 (0.337)	402 (0.284)	402 (0.008)	402 (0.332)	420 (0.001)
chloroform	410 (0.157)	402 (0.121)	392 (0.007)	406 (0.256)	434 (0.005)
dichloromethane	417 (0.220)	407 (0.473)	411 (0.010)	415 (0.201)	439 (0.008)
acetone	427 (0.284)	414 (0.485)	416 (0.010)	419 (0.087)	444 (0.002)
acetonitrile	428 (0.371)	415 (0.514)	420 (0.023)	425 (0.101)	420 (0.011)
DMSO	443 (0.305)	424 (0.563)	430 (0.015)	443 (0.507)	446 (0.005)
ethanol	429 (0.241)	419 (0.417)	421 (0.006)	422 (0.454)	433 (0.002)

<sup>a</sup>Relative intensity of fluorescence by using 2 as the standard compound.

<sup>b</sup>Not determined

により低くなり、また R<sup>3</sup> にニトロ基のような電子求引性基を導入した化合物も低い値を示した(表 1、2)。

### (3) 放射性ヨウ素標識

[<sup>125</sup>I]13 は、標識前駆体として 12 を用い酸化剤、pH 等の反応条件を検討したところ(表 3)、酸性条件下(pH 5)、酸化剤として N-chlorosuccinimide を用いると最も収率良く、放射化学的収率 41.0%、放射化学的純度 99.9%で得ることができた。

表 3 Radioiodination condition

カウンターイオン	酸化剤	pH	放射化学的収率(%)
OH <sup>-</sup>	過酸化水素 50μL, 3% w/v	5	0
		7	0
	N-chlorosuccinimide 50μL, 1mg/ml	5	41.0
		7	24.5
	クロラミンT 50μL, 1mg/ml	5	0
		7	12.3
Cl <sup>-</sup>	過酸化水素 50μL, 3% w/v	5	0
		7	0
	N-chlorosuccinimide 50μL, 1mg/ml	5	38.2
		7	30.8
	クロラミンT 50μL, 1mg/ml	5	32.1
		7	26.4

### (4) 放射性ヨウ素標識体の安定性評価

得られた [<sup>125</sup>I]13 をリン酸緩衝液(pH 7.4)もしくはマウス血漿でインキュベートし安定性を検討したところ、いずれの場合も 24 時間後も安定であった(図 6)。

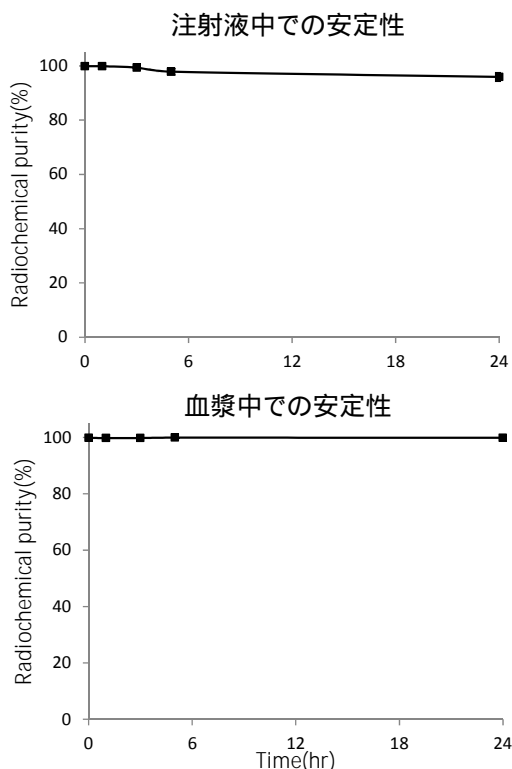


図 6

### (5) 放射性ヨウ素標識体の生体内分布

正常マウスを用いて [<sup>125</sup>I]13 の生体内分布を検討した。その結果、脳には移行しておらず、血液脳関門を通過していないことがわかった(図 7)。また、血液中から速やかに放射能が消失し、投与直後から腎臓、肝臓、脾臓に高い放射能集積が認められた。甲状腺への集積は低く、脱ヨウ素反応には安定であった。投与 24 時間後には約 70%が排泄されており、体内からの消失は良好であることが示された。

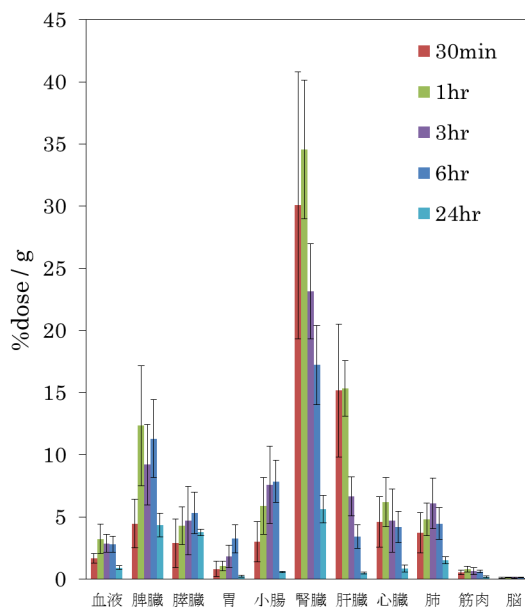


図 7

### 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)

[学会発表](計 2 件)

平野優里, 萩森政頼, 長谷川純子, 田中将史, 向高弘: アミロイド結合性を有するベンゾチアゾール誘導体の合成及び蛍光特性の評価, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 27 日 ~ 30 日, 熊本市総合体育館(熊本)

長谷川純子, 平野優里, 田中将史, 小野正博, 萩森政頼, 佐治英郎, 向高弘: チオフラビン T 誘導体のアミロイド線維選択性の評価, 第 63 回日本薬学会近畿支部大会, 2013 年 10 月 12 日, 同志社女子大学(京田辺)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

向高弘 (MUKAI, Takahiro)  
神戸薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 30284706

(2)連携研究者

田中 将史 (TANAKA, Masafumi)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40411904

萩森 政頼 (HAGIMORI, Masayori)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40446125