

新規 SPECT 用アミロイドイメージング プローブの開発

2016 年

眞矢 啓史

目次

1. 諸言	2
2. SPECT用アミロイドイメージングプローブの開発	6
2.1 第一章：オーロン誘導体の評価	6
2.1.1 目的	6
2.1.2 方法	7
2.1.3 結果及び考察	21
2.1.4 小括	34
2.2 第二章：イミダゾピリジン誘導体[¹²³ I]ABC577の評価	36
2.2.1 目的	36
2.2.2 方法	36
2.2.3 結果及び考察	43
2.2.4 小括	54
3. 結語	55
4. 謝辞	56
5. 参考文献	57
6. 主論文目録	60
7. 主査名及び副査名	60

1. 諸言

アルツハイマー病（以下，AD）は，認知症の原因として最も大きな割合を占める進行性の神経変性疾患である(1)．認知症のリスクファクターの一つに加齢が挙げられ，2010年に世界で約3500万人であった認知症患者数は，2030年までに6570万人に達し，その50-70%をADが占めると推測されている(2)．高齢化社会を迎えた日本においても，AD患者数の増加，並びにそれに伴う医療費の増大は重要な社会問題となっている．現在，ADの治療薬には，脳内のアセチルコリン濃度を維持させるコリンエステラーゼ阻害薬，並びに神経保護作用が期待される N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 受容体拮抗薬が使用されている．しかし，これらの薬はAD発症の根本的な原因を標的にしたものではなく，一時的な症状の改善を目的とした対症療法薬であることから，ADの発症機序に基づいた根本的治療薬の開発が強く望まれている．

ADの特徴的な脳内病理学的変化として，アミロイド- β ペプチド（以下，A β ）凝集体を主要構成成分とする老人斑と，過剰にリン酸化されたタウタンパクの凝集体よりなる神経原線維変化の出現があげられる(3)．これら病理学的変化の中でも老人斑の沈着は，AD発症過程の初期段階から脳内に生じ，臨床症状が現れる数十年前から始まることが明らかになっている(4-6)．さらに，老人斑の沈着はADの進行において重要な役割を担っていると考えられており(7-10)，老人斑の沈着を防ぐ又は脳内に沈着した老人斑を除去することを目的とした様々なADの根本的治療方法の開発が行われている(11-13)．このような脳内老人斑を標的とした治療方法の開発においては，体外から老人斑を検出し，老人斑が蓄積しているAD発症早期の被験者を同定すること，また治療前後でのA β 除去効果をモニタリングすることが重要と考えられる．

老人斑は，アミロイド前駆タンパク質 (APP) から分解酵素である β -セクレターゼ， γ -セクレターゼにより順次切り出された A β 1-40 及び A β 1-42 が凝集，線維化することで生成する (Fig. 1)．この A β 凝集体を体外より検出する方法として，放射性プローブを利用した核医学診断が有用である．核医学診断は，生体内に投与した放射性プローブから放出される放射線を単一光子断層撮像（以下，SPECT）装置又はポジトロン断層撮像（以下，PET）装置を用いて非侵襲的に体外計測し，画像化するという原理にもとづいている．A β 凝集体のイメージングを目的とした放射性プローブには，脳内 A β の蓄積情報を正確に画像化するために以下の性質が求められる(14)．

- ① 生体内へ投与後に血液脳関門を通過すること
- ② A β 凝集体に選択的に結合すること
- ③ 非結合分子が脳から速やかに消失すること

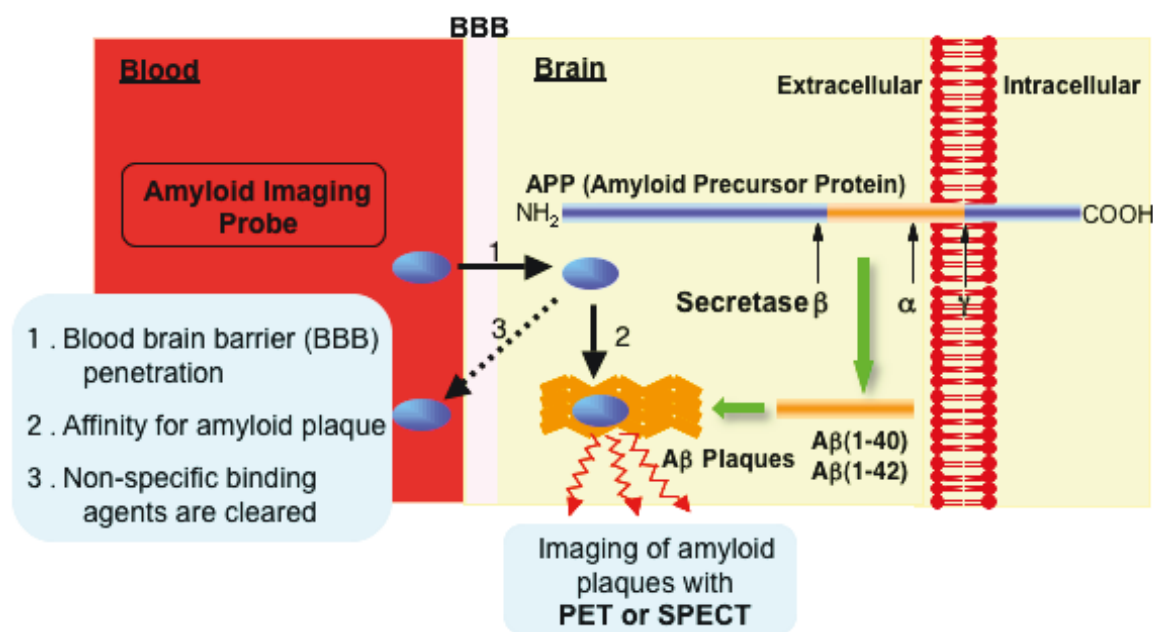


Fig. 1 Strategy for *in vivo* amyloid imaging.

近年、3つのPET用プローブ^{[18F]Florbetapir(15, 16)}, ^{[18F]Flutemetamol(17, 18)}, ^{[18F]Florbetaben(19, 20)}が、アメリカ食品医薬品局(以下, FDA)及び欧州医薬品庁に、「アルツハイマー型認知症が疑われる認知機能障害を有する患者に対して、脳内A β 凝集体の可視化を目的とする放射性医薬品」として承認された(Fig. 2)。また、本邦においても、^{[18F]Florbetapir}及び^{[18F]Flutemetamol}の合成を目的とする医療機器が同様の効能で承認されている。これらのプローブは、いずれも老人斑の蛍光染色試薬であるコンゴレッド又はチオフラビンTを基に開発された化合物であり、患者死後脳組織の病理診断を真のスタンダードにした臨床試験において、高い感度と特異度で脳内A β を検出可能であることが示されている。一方、SPECT用のA β イメージングプローブに関しては、過去にSPECT用核種である放射性ヨウ素123(以下, ^{123I})で標識した^{[123I]IMPY}が臨床で評価された(21)。しかし、^{[123I]IMPY}はPETプローブと比較し明確に脳内A β を描出することができず、AD患者と健常者での脳内集積の違いを正確に鑑別することが困難であった(22)。その他にも多くのSPECT用プローブの開発が報告されているが、非特異的な脳内集積や結合親和性等の問題により未だ実用化

に至っていない(23-26).

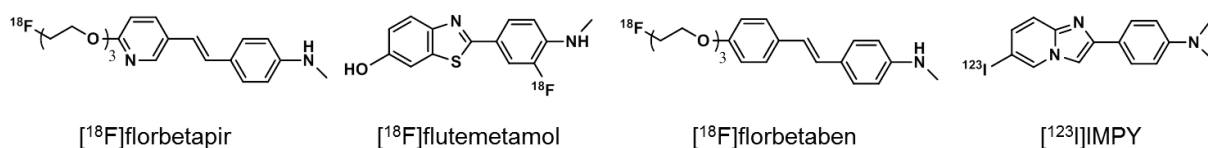


Fig. 2 Chemical structures of Aβ imaging probes.

PETは β^+ 崩壊によるポジトロンが消滅する際に放出される2本の消滅 γ 線を同時計数法により検出し, SPECTでは軌道電子捕獲 (EC) や核異性体転移 (IT) などによる単一の γ 線を検出する. PETに利用される代表的な核種としては, ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O 及び ^{18}F が挙げられる. 特に ^{18}F は, 半減期が約110分と他の核種に比較し長く (^{11}C : 約20分, ^{13}N : 約10分, ^{15}O : 約2分), 薬剤製造拠点から他施設へのデリバリーが可能であることから, 多くのPET製剤で用いられている. 一方, SPECTでは, 半減期や放出される γ 線のエネルギーが適当である $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (約6時間, 141 keV) 及び ^{123}I (約13時間, 159 keV) などの核種が臨床で使用されている. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は, 親核種である ^{99}Mo との放射平衡を利用したジェネレーターシステムにより比較的容易に入手できる核種であるが, 金属元素であることから, 標識には前駆体の分子内にキレート形成部位が必要となる. 一方, ^{123}I は, 生成に大型のサイクロトロンが必要であり, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ に比較し入手が困難であるが, 標識にキレート形成部位を必要としないといった特徴がある.

SPECT撮像では, 放射線の入射方向を限定するためのコリメータを使用するため, 計数率の低下や深さ方向での分解能の劣化が起こり, その感度や定量性はPETに比較して劣っている. 一方で, 国内の医療施設に設置されているカメラ台数及び施設数は, SPECTがPETに比較し数倍多く存在し, また, SPECTのオペレーティングコストはPETに比較し安価である. 半導体検出器を利用し, γ 線をデジタル信号に直接変換することで感度と空間分解能を改善させたSPECTカメラの開発も進められている. したがって, PETプローブと同等もしくはそれ以上の診断性能を有するSPECT用Aβイメージングプローブが開発されれば, PETよりも汎用性に優れた臨床核医学診断が実現化され, 今後罹患者の更なる増加が予想されるADの克服に大きく貢献することが期待される.

本研究では, 新規の SPECT 用 Aβ プローブの開発を目的として, オーロン誘導体(第一章) 及びイミダゾピリジン誘導体(第二章) の設計・合成を行った. 放射性核種に

は、基盤骨格が有する A β 結合性の維持及び血液脳関門の透過性を考慮し、プローブ分子内にキレート形成部位を必要としない ^{123}I を選択した。また、合成した化合物の A β イメージングプローブとしての有用性を *in vitro* 及び *in vivo* での非臨床実験及び臨床試験で評価した。これらの結果について、以下に詳述する。

2. SPECT 用アミロイドイメージングプローブの開発

2.1 第一章：オーロン誘導体の評価

2.1.1 目的

過去に小野・中山等は，従来の A β イメージングプローブの基本骨格であるコンゴレードやチオフラビン T とは異なる，新たな分子骨格の探索研究の中で，A β 線維化の抑制作用が報告されているフラボノイドに注目し，その誘導体であるフラボン及びカルコンを母体とする放射性ヨウ素標識プローブを合成した (Fig. 3) . さらに，その性能を評価し，フラボン及びカルコン誘導体が，A β 凝集体への高い結合親和性と脳への移行性を示すなど，A β イメージングプローブとしての基本的要件を満たすことを示した(27, 28). 一方，これらプローブでは，画像診断精度の低下を招く脳内での非特異的な滞留が観察され，より有用な基本骨格の探索が必要と考えられた.

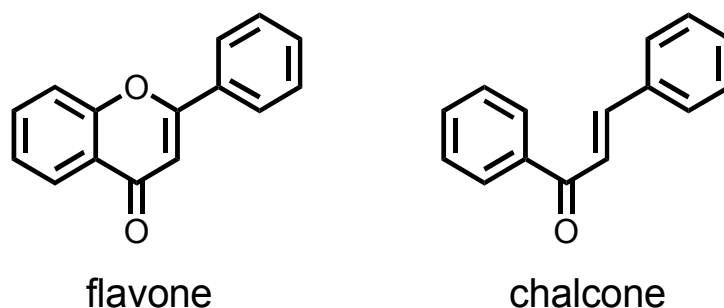


Fig. 3 Chemical structures of flavone and chalcone.

フラボン及びカルコンが脳内で非特異的な滞留性を示した要因の一つに，化合物の高い脂溶性に起因する血漿タンパク質への結合が考えられた．そこで本研究では，フラボン及びカルコンと同じフラボノイドであり，母骨格の脂溶性がこれら化合物と比較し低いオーロンを基本骨格に選択し，検討を行った．まず，オーロン骨格の5位に放射性ヨウ素を，4'位に A β 凝集体への結合に重要な役割を担っていると考えられている電子供与基（一級アミノ基，モノメチルアミノ基，ジメチルアミノ基，メトキシ基及びヒドロキシル基）を導入した．さらに，導入する数により化合物の生体内での挙動を変化させることが報告されている(24, 29, 30)エチレンオキシ鎖を1-3個導入

した化合物についても合成を行った (Fig. 4) . 合成した化合物を用いた *in vitro* での A β 凝集体との結合実験, AD モデルマウス脳切片を用いた蛍光染色, 正常マウスを用いた体内放射能分布実験及び AD 患者脳切片を用いたオートラジオグラフィ (以下, ARG) を行い, 化合物の A β イメージングプローブとしての有用性について基礎的評価を行った. なお, 本実験においては, 利便性を考慮し, 臨床で使用される ^{123}I と同位体であり, 半減期が 59.4 日と長い ^{125}I を使用した.

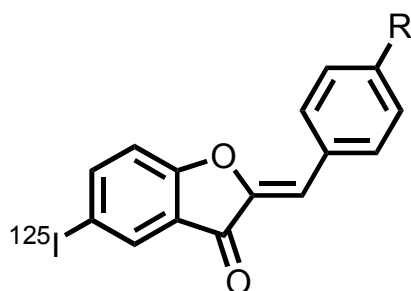


Fig. 4 Chemical structure of aurone derivatives. R = NH₂, NHCH₃, N(CH₃)₂, OCH₃, OH, OCH₂CH₂OH, (OCH₂CH₂)₂OH, and (OCH₂CH₂)₃OH.

2.1.2 方法

^{125}I は MP Biomedicals 社製 Iodine-125 (Na^{125}I , 3.7 GBq/mL) を用いた. Amyloid β -Protein(Human, 1-42) [TFA form] はペプチド研究所より購入した. 試薬は, 特記しない限り市販の一級試薬又は特級試薬を用いた. ^1H NMR の測定には Varian Gemini 300 を用い, テトラメチルシランを内部標準物質として測定した. 質量分析は, JEOL IMS-DX300 を用いて測定した. すべての動物実験は, 施設のガイドラインに従い, また長崎大学動物実験委員会の承認を得て実施した.

オーロン誘導体の合成(31)

2-(2-Methoxy-2-oxoethoxy)-5-bromobenzoic acid, methyl ester (1) の合成

2-Hydroxy-5-bromobenzoic acid, methyl ester (1.5 g, 6.49 mmol) をアセトン (10 mL) に溶解し, そこに K_2CO_3 (2.7 g, 19.5 mmol) を加えた. 続いて攪拌下 ethyl bromoacetate

(1.3 mL, 7.78 mmol) を滴下していき、3 時間加熱還流した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、精製水 100 mL を加え、酢酸エチル 100 mL で抽出した。無水硫酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、目的物 **1** を収量 1.60 g (収率 77.7%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.91 (s, 3H), 4.24 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.69 (s, 2H), 6.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H).

2-(Carboxymethoxy)-5-bromobenzoic acid (2) の合成

化合物 **1** (1.60 g, 5.04 mmol) をメタノール (10 mL) に溶かし、続いて 10% KOH (3 mL) を加えていき 2 時間反応させた。反応終了後、冷却下 1N HCl を加えていき、析出した結晶を吸引濾取し、目的物 **2** を収量 1.10 g (収率 79.4%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.81 (s, 2H), 7.02 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J* = 2.4, 2.7 Hz, 1H), 7.93 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H).

5-Bromo-3-acetoxybenzofuran (3) の合成

無水酢酸 (20 mL) と酢酸 (4 mL) の混液に化合物 **2** (100 mg, 0.36 mmol) を溶解させた。続いて、酢酸ナトリウム (1.0 g, 12.0 mmol) を加え 5 時間加熱還流した。反応終了後、反応液に精製水 100 mL を加え、クロロホルム 100 mL で抽出し、目的物 **3** を収量 78 mg (収率 86.5%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.37 (s, 3H), 7.33 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 3.6, 2.1 Hz, 1H), 4.69 (s, 2H), 7.71 (s, 1H), 8.02 (s, 1H).

5-Bromo-3(2H)-benzofuranone (4) の合成

化合物 **3** (78 mg, 0.31 mmol) をメタノール (3 mL) に溶解させ、精製水 (1 mL), 1N HCl (2 mL) を加えていき、攪拌下 3 時間加熱還流した。反応終了後、反応液を冷却し、精製水 (100 mL) を加えていった。析出した結晶を吸引濾取し、目的物 **4** を収量 15 mg (収率 22.5%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.67 (s, 2H), 7.06 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 2.1, 2.1 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H).

5-Bromo-2-[(4-nitrophenyl)methylene]-3(2H)-benzofuranone (5) の合成

化合物 4 (200 mg, 0.94 mmol) と 4-nitrobenzaldehyde (171 mg, 1.13 mmol) のクロロホルム溶液 (3 mL) に Al₂O₃ (2.7g, 26.0 mmol) を加え、2 時間攪拌した。反応終了後、クロロホルム (100 mL) で抽出した後、溶媒を減圧留去し、目的物 5 を収量 142 mg (収率 43.7%) で得た。

2-[(4-Aminophenyl)methylene]-5-bromo-3(2H)-benzofuranone (6) の合成

化合物 5 (10 mg, 0.03 mmol) のエタノール溶液 (10 mL) に、塩化スズ(II) (0.64 mg, 2.37 mmol) を攪拌下徐々に加え、2 時間加熱還流した。反応溶液を室温に戻した後、1N NaOH (100 mL) を加え、酢酸エチル (100 mL) で抽出した。無水酢酸ナトリウムで脱水後、溶媒を減圧留去し、目的物 6 を収量 7 mg (収率 79.1%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.11 (s, 2H), 6.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.90 (s, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.70 (dd, *J* = 2.1, 2.1 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H)。

5-Bromo-2-[(4-methylaminophenyl)methylene]-3(2H)-benzofuranone (7) の合成

化合物 6 (100 mg, 0.32 mmol) を dimethylsulfoxide (DMSO) 5 mL に溶解させた。続いて、反応溶液に K₂CO₃ (380 mg, 2.75 mmol) 及び CH₃I (0.15 mL, 2.40 mmol) を加え、50°C で 3 時間攪拌した。反応終了後、反応液に精製水 100 mL を加え、酢酸エチル 100 mL で抽出した。溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/2) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、目的物 7 を収量 49 mg (収率 47.5%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.92 (s, 3H), 4.21 (s, 1H), 6.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 2.1, 2.1 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H)。

5-Bromo-2-[(4-dimethylaminophenyl)methylene]-3(2H)-benzofuranone (8) の合成

化合物 4 (50 mg, 0.23 mmol) と 4-dimethylaminobenzaldehyde (35 mg, 0.24 mmol) のクロロホルム溶液に Al₂O₃ (2.7g, 26.0 mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応終了

後、クロロホルム (100 mL) で抽出した後、溶媒を減圧留去し、目的物 **8** を収量 42 mg (収率 51.9%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.09 (s, 6H), 6.70 (d, *J* = 11.4 Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H).

(Z)-2-(4-Methoxybenzylidene)-5-bromobenzofuran-3(2H)-one (9) の合成

化合物 **4** (300 mg, 1.41 mmol) と 4-methoxybenzaldehyde (192 mg, 1.41 mmol) のクロロホルム溶液に Al₂O₃ (2.7g, 26.0 mmol) を加え、20 分攪拌した。反応終了後、クロロホルム (100 mL) で抽出した後、溶媒を減圧留去し、目的物 **9** を収量 410 mg (収率 85.7%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.88 (s, 3H), 6.91 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 2.1, 2.1 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H).

(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-5-bromobenzofuran-3(2H)-one (10) の合成

化合物 **9** (300 mg, 0.91 mmol) をジクロロメタン (25 mL) に溶解させ、氷冷下、三臭化ホウ素ジクロロメタン溶液 (3.0 mL) を徐々に加えていき、15 時間反応させた。反応終了後、反応液を少量ずつ氷水に加え、ジクロロメタン層と水層で分液抽出した。溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン (3/2) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、目的物 **10** を収量 15 mg (収率 5.22%) で得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 1.23 (s, 1H), 6.92 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.96 (s, 1H), 7.56 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.88-7.92 (m, 3H), 7.95 (s, 1H). MS (EI) *m/z* 316 [M⁺].

(Z)-2-[(4-Aminophenyl)methylene]-5-tributylstannyl-3(2H)-benzofuranone (11) の合成

化合物 **6** (78 mg, 0.25 mmol) の 1,4-ジオキサン溶液 (7 mL) に、ビス (トリブチルスズ) (0.4 mL), テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (50 mg, 0.04 mmol) 及びトリエチルアミン (5 mL) を加え、120°C で 4 時間加熱した。反応溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/2) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマ

トグラフィに付し，目的物 **11** を収量 30 mg (収率 23.1%) で得た．¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.86-1.57 (m, 27H), 4.05 (s, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 0.6, 0.9 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H).

(Z)-2-[(4-Methylaminophenyl)methylene]-5-tributylstannyl-3(2H)-benzofuranone (**12**) の合成

化合物 **7** (49 mg, 0.15 mmol) の 1,4-ジオキサン溶液 (3 mL) に，ビス (トリブチルスズ) (0.4 mL) ，テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (50 mg, 0.04 mmol) 及びトリエチルアミン (5 mL) を加え，120°Cで5時間加熱した．反応溶媒を減圧留去し，残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/2) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し，目的物 **12** を収量 28 mg (収率 34.6%) で得た．¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.06-1.57 (m, 27H), 3.12 (s, 3H), 4.42 (s, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.10 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 1.2, 1.2 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.09 (s, 1H).

(Z)-2-[(4-Dimethylaminophenyl)methylene]-5-tributylstannyl-3(2H)-benzofuranone (**13**) の合成

化合物 **8** (12 mg, 0.04 mmol) の 1,4-ジオキサン溶液 (2 mL) に，ビス (トリブチルスズ) (0.3 mL) ，テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (50 mg, 0.04 mmol) 及びトリエチルアミン (5 mL) を加え，120°Cで3時間加熱した．反応溶媒を減圧留去し，残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/4) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し，目的物 **13** を収量 7.0 mg (収率 35.2%) で得た．¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.86-1.57 (m, 27H), 3.07 (s, 6H), 6.75 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 1.2, 0.9 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.95 (s, 1H).

(Z)-2-(4-Methoxybenzylidene)-5-(tributylstannyl)benzofuran-3(2H)-one (**14**) の合成

化合物 **9** (200 mg, 0.60 mmol) の 1,4-ジオキサン溶液 (10 mL) に，ビス (トリブチルスズ) (0.4 mL) ，テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (50 mg, 0.04 mmol)

及びトリエチルアミン (5 mL) を加え, 120°Cで 24 時間加熱した. 反応溶媒を減圧留去し, 残渣をクロロホルムを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し, 目的物 **14** を収量 50 mg (収率 15.3%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0.89-1.64 (m, 27H), 3.87 (s, 3H), 6.89 (s, 1H), 6.99 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.71 (dd, $J = 0.9, 0.9$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H). MS (EI) m/z 542 [M^+].

(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-5-(tributylstannyl)benzofuran-3(2H)-one (15) の合成

化合物 **10** (50 mg, 0.16 mmol) の 1,4-ジオキサン溶液 (5 mL) に, ビス (トリブチルスズ) (0.4 mL), テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (50 mg, 0.04 mmol) 及びトリエチルアミン (5 mL) を加え, 120°Cで 10 時間加熱した. 反応溶媒を減圧留去し, 残渣を酢酸エチル/ヘキサン (3/2) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し, 目的物 **15** を収量 10 mg (収率 12.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0.86-1.60 (m, 27H), 6.74 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.90 (s, 1H), 7.30 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.89 (s, 1H). MS (EI) m/z 528 [M^+].

(Z)-2-[(4-Aminophenyl)methylene]-5-iodo-3(2H)-benzofuranone (16) の合成

化合物 **11** (30 mg, 0.06 mmol) をクロロホルム (5 mL) に溶解し, その後ヨウ素のクロロホルム溶液 (1 mL, 0.25 M) を攪拌下加え, 室温で 30 分間反応させた. 飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL) を加え, 反応を終了させた. クロロホルム層を分液抽出し, 硫酸ナトリウムで乾燥, 溶媒を減圧留去後, 残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/2) を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィに付し, 目的物 **16** を収量 14 mg (収率 67.6%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 4.10 (s, 2H), 6.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.90 (s, 1H), 7.13 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 8.11 (s, 1H). MS (EI) m/z 363 [M^+].

(Z)-5-Iodo-2-[(4-methylaminophenyl)methylene]-3(2H)-benzofuranone (17) の合成

化合物 **12** (30 mg, 0.06 mmol) をクロロホルム (5 mL) に溶解し、その後ヨウ素のクロロホルム溶液 (1 mL, 0.25 M) を攪拌下に加え、室温で 20 分間反応させた。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL) を加え、反応を終了させた。クロロホルム層を分液抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/2) を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィに付し、目的物 **17** を収量 10 mg (収率 48.2%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.92 (s, 3H), 4.27 (s, 1H), 6.64 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.90 (s, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.86 (dd, *J* = 2.1, 2.1 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H). MS (EI) *m/z* 377 [M⁺].

(Z)-2-[(4-Dimethylaminophenyl)methylene]-5-iodo-3(2H)-benzofuranone (18) の合成

化合物 **13** (7 mg, 0.02 mmol) をクロロホルム (3 mL) に溶解し、その後ヨウ素のクロロホルム溶液 (0.7 mL, 0.25 M) を攪拌下に加え、室温で 20 分間反応させた。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL) を加え、反応を終了させた。クロロホルム層を分液抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/4) を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィに付し、目的物 **18** を収量 3.0 mg (収率 63.9%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.08 (s, 6H), 6.74 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.82-7.88 (m, 3H), 8.12 (s, 1H). MS (EI) *m/z* 391 [M⁺].

(Z)-2-(4-Methoxybenzylidene)-5-iodobenzofuran-3(2H)-one (19) の合成

化合物 **14** (10 mg, 0.03 mmol) をクロロホルム (3 mL) に溶解し、その後ヨウ素のクロロホルム溶液 (1 mL, 0.25 M) を攪拌下に加え、室温で 15 分間反応させた。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL) を加え、反応を終了させた。クロロホルム層を分液抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を減圧留去後、残渣をクロロホルムを溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィに付し、目的物 **19** を収量 7 mg (収率 71.5%) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.88 (s, 3H), 6.91 (s, 1H), 6.98 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.87-7.91 (m, 3H), 8.12 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H). HRMS calcd for

C₁₆H₁₁O₃I (M⁺), 377.9753; found, 377.9753.

(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-5-iodobenzofuran-3(2H)-one (20) の合成

化合物 **15** (10 mg, 0.03 mmol) をクロロホルム (3 mL) に溶解し, その後ヨウ素のクロロホルム溶液 (1 mL, 0.25 M) を攪拌下に加え, 室温で 5 分間反応させた. 飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (15 mL) を加え, 反応を終了させた. クロロホルム層を分液し, 硫酸ナトリウムで乾燥, 溶媒を減圧留去後, 残渣を酢酸エチル/ヘキサン (3/2) を溶出溶媒とするシリカゲルクロマトグラフィに付し, 目的物 **20** を収量 6 mg (収率 84.0%) で得た. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.91 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.12 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H). HRMS calcd for C₁₅H₉O₃I (M⁺), 363.9596; found, 363.9571.

Methyl 2-((ethoxycarbonyl)methoxy)-5-iodobenzoate (21) の合成

2-Hydroxy-5-iodobenzoic acid, methyl ester (2.0 g, 7.19 mmol) をアセトン (10 mL) に溶かし, そこに K₂CO₃ (2.7 g, 19.5 mmol) を加えた. 続いて攪拌下 ethyl bromoacetate (2.0 mL, 12.0 mmol) を滴下していき, 3 時間加熱還流した. 反応終了後, 溶媒を減圧留去し, 精製水 100 mL を加え, 酢酸エチル 100 mL で抽出した. 無水硫酸ナトリウムで脱水後, 溶媒を減圧留去し, 目的物 **21** を収量 2.62 g (収率 99 %) で得た. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.90 (s, 3H), 4.25 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 4.69 (s, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.71 (dd, *J* = 2.4, 2.4 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H).

2-(Carboxymethoxy)-5-iodobenzoic acid (22) の合成

化合物 **21** (2.62 g, 7.19 mmol) をメタノール (2 mL) に溶かし, 続いて 10% KOH (3.0 mL) を加えていき 5 時間反応させた. 反応終了後, 冷却下 1N HCl を加えていき, 析出した結晶を吸引濾取し, 目的物 **22** を収量 2.02 g (収率 87.2 %) で得た. ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.81 (s, 2H), 6.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 2.7, 2.4 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H).

5-Iodobenzofuran-3-yl acetate (23) の合成

無水酢酸 (30 mL) と酢酸 (6 mL) の混液に化合物 **22** (2.02 g, 6.27 mmol) を溶解させた。続いて、酢酸ナトリウム (1.5 g) を加え 24 時間加熱還流した。反応終了後、反応液に精製水 100 mL を加え、酢酸エチル 200 mL で抽出し、目的物 **23** を収量 1.45 g (収率 76.6 %) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.37 (s, 3H), 7.23 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 1.5, 1.8 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H)。

5-Iodobenzofuran-3(2H)-one (24) の合成

化合物 **23** (1.45 g, 4.80 mmol) をメタノール (18 mL) に溶解させ、精製水 (10 mL), 1N HCl (4 mL) を加えてき、攪拌下 3 時間加熱還流した。反応終了後、反応液を冷却し、精製水 (100 mL) を加えていった。析出した結晶を吸引濾取し、目的物 **24** を収量 1.17 g (収率 93.8 %) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.65 (s, 2H), 6.96 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H)。

(Z)-2-(4-Hydroxybenzylidene)-5-iodobenzofuran-3(2H)-one (20) の合成

化合物 **24** (50 mg, 0.19 mmol) と 4-hydroxybenzaldehyde (30 mg, 0.25 mmol) のクロロホルム溶液に Al₂O₃ (1.7 g, 16.4 mmol) を加え、10 時間攪拌した。反応終了後メタノール (100 mL) で抽出した後、溶媒を減圧留去し、目的物 **20** を収量 78 mg (収率 87.0 %) で得た。

(Z)-2-(4-(2-Hydroxyethoxy)benzylidene)-5-iodobenzofuran-3(2H)-one (25) の合成

化合物 **20** (194 mg, 0.53 mmol) と ethylene chlorohydrin (0.1 mL, 1.43 mmol) の DMSO (7 mL) 溶液に K₂CO₃ (3.7 g, 26.8 mmol) を加え、15 時間加熱攪拌した。反応終了後、酢酸エチル (100 mL) で抽出した。溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチルを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、目的物 **25** を収量 123 mg (収率 56.5 %) で得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.01 (s, 1H), 4.02 (s, 2H), 4.18 (t, *J* = 3.9 Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.80-7.92 (m,

3H), 8.12 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H). HRMS calcd for $C_{17}H_{13}O_4I$ (M^+), 407.9859; found, 407.9879.

(Z)-2-(4-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)benzylidene)-5-iodobenzofuran-3(2H)-one (26) の合成

化合物 **20** (150 mg, 0.41 mmol) と ethylene glycol mono-2-chloroethyl ether (0.15 mL, 1.42 mmol) の DMSO (7 mL) 溶液に K_2CO_3 (3.7 g, 26.8 mmol) を加え、5 時間加熱攪拌した。反応終了後、酢酸エチル (200 mL) で抽出した。溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチルを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、目的物 **26** を収量 56 mg (収率 30.2 %) で得た。 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.17 (s, 1H), 3.70 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.78 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.92 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.21 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 7.00 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.84-7.91 (m, 3H), 8.11 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H). HRMS calcd for $C_{19}H_{17}O_5I$ (M^+), 452.0121; found, 452.0131.

(Z)-2-(4-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)benzylidene)-5-iodobenzofuran-3(2H)-one

(27) の合成

化合物 **20** (150 mg, 0.41 mmol) と 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (0.1 mL, 0.69 mmol) の DMSO (7 mL) 溶液に K_2CO_3 (3.7 g, 26.8 mmol) を加え、6 時間加熱攪拌した。反応終了後、酢酸エチル (200 mL) で抽出した。溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチルを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、目的物 **27** を収量 140 mg (収率 67.9 %) で得た。 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 1.96 (s, 1H), 3.74-3.80 (m, 6H), 3.92 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.24 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.45 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 4.65 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.98 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.85-7.92 (m, 3H), 8.15 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H). HRMS calcd for $C_{21}H_{21}O_6I$ (M^+), 496.0383; found, 496.0381.

(Z)-2-(4-(2-Hydroxyethoxy)benzylidene)-5-(tributylstannyl)benzofuran-3(2H)-one (28) の合成

化合物 **25** (20 mg, 0.05 mmol) の 1,4-ジオキサン溶液 (3 mL) に、ビス(トリブチルスズ) (0.4 mL), テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (50 mg, 0.04 mmol)

及びトリエチルアミン (3 mL) を加え, 90°Cで5時間加熱した. 反応溶媒を減圧留去し, 残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/1) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し, 目的物 **28** を収量 7 mg (収率 25.0 %) で得た. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.86-1.61 (m, 27H), 2.06 (s, 1H), 4.02 (s, 2H), 4.16 (t, *J* = 3.6 Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.30 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.90-7.92 (m, 3H). MS (EI) *m/z* 572 [M⁺].

(Z)-2-(4-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)benzylidene)-5-(tributylstannyl)benzofuran-3(2H)-one
(29) の合成

化合物 **26** (40 mg, 0.09 mmol) の1,4-ジオキサン溶液 (5 mL) に, ビス(トリブチルスズ) (0.4 mL), テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (50 mg, 0.04 mmol) 及びトリエチルアミン (4 mL) を加え, 90°Cで7時間加熱した. 反応溶媒を減圧留去し, 残渣を酢酸エチルを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し, 目的物 **29** を収量 17 mg (収率 31.4 %) で得た. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.86-1.32 (m, 27H), 2.11 (s, 1H), 3.70 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.78 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 4.22 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 7.00 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.88-7.91 (m, 3H). MS (EI) *m/z* 616 [M⁺].

(Z)-2-(4-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)benzylidene)-5-(tributylstannyl)benzofuran-3(2H)-one (**30**) の合成

化合物 **27** (10 mg, 0.02 mmol) の1,4-ジオキサン溶液 (2 mL) に, ビス(トリブチルスズ) (0.3 mL), テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (40 mg, 0.03 mmol) 及びトリエチルアミン (4 mL) を加え, 90°Cで10時間加熱した. 反応溶媒を減圧留去し, 残渣を酢酸エチルを溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し, 目的物 **30** を収量 4 mg (収率 30.3%) で得た. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.86-1.59 (m, 27H), 2.11 (s, 1H), 3.63 (t, *J* = 3.3 Hz, 2H), 3.73-3.75 (m, 4H), 3.90 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H), 4.21 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.64-7.70

(m, 3H), 7.90 (d, $J=4.8$ Hz, 1H). MS (EI) m/z 659 [M^+].

逆相 HPLC による分析

高速液体クロマトグラフィー（以下，HPLC）を用いた UV 分析には，島津製作所の紫外可視検出器 SPD-10A 及びクロマトパック C-R8A を装着した液体クロマトグラフ LC-10AT を使用した．カラムは，ナカライテスク社製 Cosmosil 5C₁₈-AR (4.6×150 mm) を用い，流速 1.0 mL/min，移動相 H₂O : acetonitrile=3 : 7 の条件で分析した．化合物 **16–20**，**25–27** を約 1 mg 量り取り，EtOH 1 mL に溶解させ試料溶液とした．調製した試料溶液を HPLC に注入した後，化合物の 254 nm における吸収を試料注入 30 分後まで記録した．

¹²⁵I 標識

1 N HCl (50 μ L) と 3% H₂O₂ (50 μ L) の混合液に Na[¹²⁵I] (3.7–7.4 MBq, 比放射能 81.4 TBq/mmol) を添加し，最後に化合物 **16–20**，**25–27** のトリブチルスズ標識前駆体のエタノール溶液 (1 mg/mL) を 50 μ L 加えた．室温で 1–2 分間反応させた後，還元剤として飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液 100 μ L を加え，反応を停止させた．飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 100 μ L を加え，反応溶液を中和後，酢酸エチルで目的物を抽出した．無水硫酸ナトリウムを充填したカラムを通し脱水した後，窒素ガスにより溶媒を留去した．¹²⁵I 標識したプローブは，それぞれ対応する非放射性化合物を標品として，逆相 HPLC (移動相 H₂O : acetonitrile=3 : 7) を用い精製した．放射能の分析には，アロカ製ユニバーサルスケラー，ガンマサーベイメーター及び日立製クロマトインテグレイター D-2500 を使用した．精製したプローブは，種々の実験に用いるまで，4°C で保存した．

A β (1-42)凝集体の調製

1 mM EDTA 含有 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い，A β (1-42)が 0.25 mg/mL の濃度になるよう調製した．37°C で 42 時間インキュベートし，これを A β (1-42)凝集体

溶液とした。調製した Aβ(1-42)凝集体溶液は、種々の実験に用いるまで-20°Cで保存した。

Aβ(1-42)凝集体を用いた飽和結合実験

[¹²⁵I]16 と非放射性化合物 16 との混合溶液 (313 nM) を順次希釈していき、最終濃度 2.4-313 nM の 10% EtOH 溶液とした。種々の濃度の混合液 100 μL 及び Aβ(1-42)凝集体溶液 (28.5 nM) 50 μL を 10% EtOH 溶液 850 μL に加え、ボロシリケートガラスチューブ (12 mm×75 mm) 内で 3 時間室温静置した。非特異的結合は、最終濃度 1 μM の非放射性化合物 16 を添加し算出した。3 時間静置後、反応溶液を M-24R cell harvester (Brandel 社) を用いて GF/B フィルター (Whatman 社) に透過させた。フィルターの放射活性をオートウェルガンマカウンター (ACR-380 ; アロカ社) で計測し、得られたデータから飽和結合曲線を作成した。GraphPad Prism (GraphPad Software 社) を用いて Scatchard 解析し、解離定数 K_d を算出した。

Aβ(1-42)凝集体を用いた競合阻害実験

非放射性化合物 16-20, 25-27 を順次希釈していき、最終濃度 0.8 nM から 12.5 μM の 10% EtOH 溶液とした。希釈した種々の濃度の非放射性化合物 50 μL, 0.02 nM の [¹²⁵I]16 溶液 50 μL 及び Aβ(1-42)凝集体溶液 (28.5 nM) 50 μL を、10% EtOH 溶液 850 μL に加え、ボロシリケートガラスチューブ (12 mm×75 mm) 内で 3 時間室温静置した。静置後、反応溶液を M-24R cell harvester (Brandel 社) を用いて GF/B フィルター (Whatman 社) に透過させた。フィルターの放射活性をオートウェルガンマカウンター (ACR-380 ; アロカ社) で計測し、得られたデータから阻害曲線を作成した。GraphPad Prism (GraphPad Software 社) を用い IC₅₀ を算出した後、下記の Cheng-Prusoff 式より阻害定数 K_i を算出した(32)。

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$$

[L] : 実験における [¹²⁵I]16 の濃度

K_d : 化合物 16 の解離定数

AD モデルマウス脳切片を用いた蛍光染色

AD モデルマウスとして 20 ヶ月齢の Tg2576 マウス (Taconic 社) を用いた。脳組織を取り出し、カルボキシメチルセルロース (4%) に入れドライアイスを用いて凍結させた後、クリオスタット (Leica 社) を用いて厚さ 10 μm の連続切片を作製した。切片は実験に用いるまで、 -80°C で保存した。化合物 **16-20**, **25-27** を 50% EtOH 溶液を用いそれぞれ 100 μM に希釈した。切片を室温に戻し風乾後、調製した化合物と 3-15 分間反応させた。50% EtOH で 1 分 \times 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i ; Nikon 社) で観察した。さらに、アミロイド染色試薬であるチオフラビン S による隣接切片の蛍光染色を行った。

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

$[^{125}\text{I}]\mathbf{16-20}$, $\mathbf{25-27}$ を 42-63 kBq/mL となるように、10% EtOH 含有生理食塩水を用いて希釈した。1 群 4-5 匹の 5 週齢 ddY 系マウス (20-25 g) に、尾静脈より 1 匹あたり 4.2-6.3 kBq (100 μL) のプローブを投与し、2, 10, 30 及び 60 分後に断頭、採血後、主要な臓器を取り出した。次いで速やかに血液及び臓器の重量を測定後、放射活性をオートウェルガンマカウンター (ACR-380 ; アロカ社) で測定した。各臓器における取込み量は、投与した全放射能 (ID) に対する血液又は臓器 1 g に存在する放射能の割合 (%ID/g) で示した。

正常マウスを用いた *ex vivo* ARG

10% EtOH 含有生理食塩水を用いて希釈した放射性リガンド $[^{125}\text{I}]\mathbf{18}$ 又は **25** (185 kBq) を、5 週齢 ddY 系マウス (20-25 g) に、尾静脈より投与した。投与 2 分及び 30 分後に断頭し、脳組織を取り出した (各時間点 n=1)。取り出した脳組織を、カルボキシメチルセルロース (4%) に入れドライアイスにより凍結させた。クリオスタットを用い厚さ 30 μm の連続切片を作製し、BAS イメージングプレート (Fujifilm 社) に 24 時間固定させた。その後、BAS-5000 スキャナーシステム (Fujifilm 社) を用いて解析した。

AD 患者脳切片を用いた *in vitro* ARG

40% EtOH 溶液を用い、放射性リガンドを 1.85 kBq/100 μ L に希釈した。AD 患者脳切片（厚さ 5 μ m, BioChain 社）を脱パラフィン処理した後、風乾し、調製した放射性リガンドと室温で一時間反応させた。その後、飽和炭酸リチウム 40% EtOH 水溶液（2分 \times 2）、40% EtOH（2分 \times 2）、精製水（30秒 \times 1）で順次洗浄した。BAS イメージングプレート（Fujifilm 社）に 24 時間固定した後、BAS-5000 スキャナーシステム（Fujifilm 社）を用い分析を行った。さらに、隣接切片を用い、抗 A β (1-42)モノクローナル抗体 BC05（Wako 社）による免疫染色を行った。

2.1.3 結果及び考察

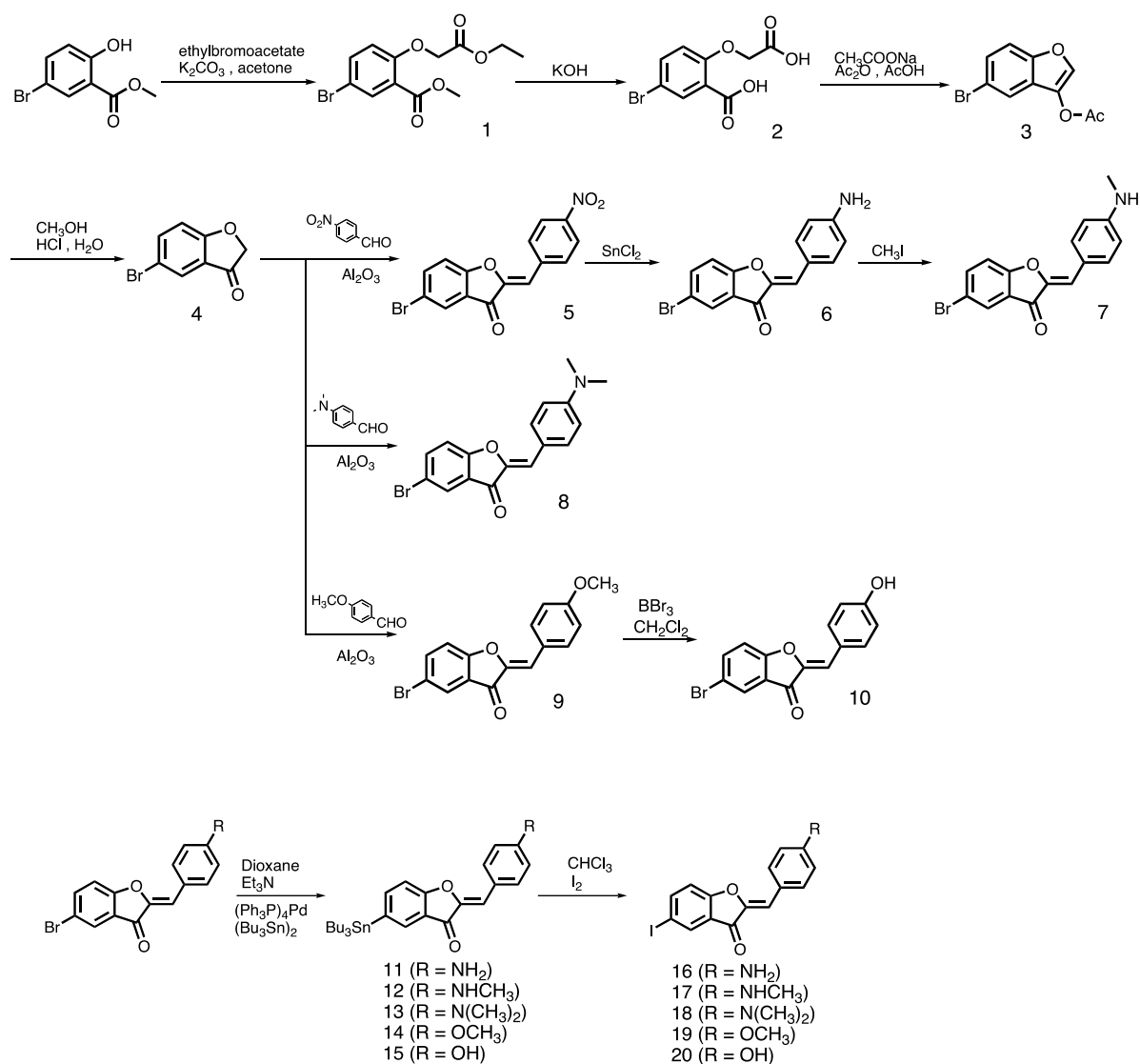
本研究では、AD に特徴的な脳内病理学的変化である老人斑へ選択的に結合する SPECT 用 A β イメージングプローブの開発を目的として、オーロンを母体骨格とする種々の ¹²⁵I 標識オーロン誘導体を新たに設計・合成した。さらに、*in vitro* における結合実験、AD モデルマウス脳切片を用いた蛍光染色、正常マウスを用いた体内放射能分布実験及び AD 患者脳切片を用いた ARG を行うことで、A β イメージングプローブとしての有用性について基礎的評価を行った。

オーロン誘導体の合成

オーロン骨格の 5 位にヨウ素、4'位に一級アミノ基、モノメチルアミノ基、ジメチルアミノ基、メトキシ基及びヒドロキシル基をそれぞれ導入した化合物 **16-20** の合成を Scheme 1 に従い行った。初めに、メチル 5-ブロモサリシレイトを出発原料とし、4 段階の反応を経て、ベンゾフラノン誘導体である化合物 **4** を合成した。次に、化合物 **4** と種々の置換基を持つベンズアルデヒドをアルドール縮合反応させることで、オーロン骨格を形成した。化合物 **4** と 4-ニトロベンズアルデヒド、4-ジメチルベンズアルデヒド又は 4-メトキシベンズアルデヒドをそれぞれクロロホルムに溶解させ、酸化アルミニウム存在下、室温で反応させることで、化合物 **5, 8** 及び **9** をそれぞれ収率 43.7%, 51.9% 及び 85.7% で得た。一級アミノ基を側鎖に導入した化合物 **6** は、化合物 **5** を SnCl₂

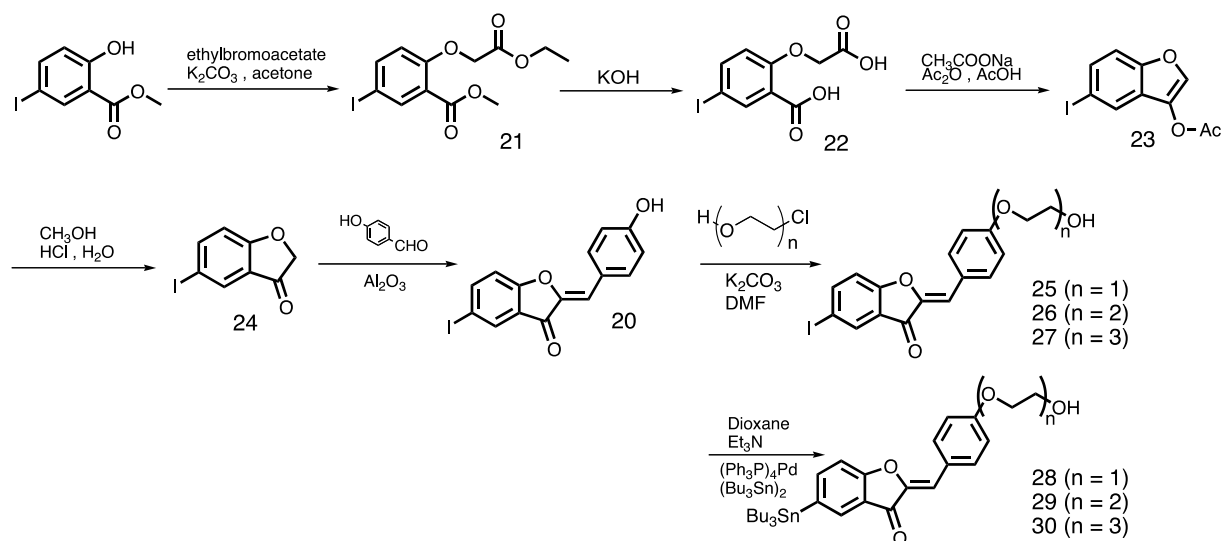
を用い還元することで、収率 79.1%で得た。さらに化合物 **6** を CH_3I によりメチル化することで、側鎖にモノメチル基を導入した化合物 **7** の合成を行った (収率 47.5%)。また、側鎖にヒドロキシル基を導入した化合物 **10** は、化合物 **9** を三臭化ホウ素を用いて脱メチル化することで収率 5.2%で得た。トリブチルスズ標識前駆体 **11-15** は、対応するブロモ化合物を用いた $\text{Pd}(0)$ を触媒とするブロモ-スズ交換反応により、それぞれ収率 23.1%, 34.6%, 35.2%, 15.3%及び 12.0%で得た。合成したトリブチルスズ標識前駆体 **11-15** とヨウ素をクロロホルム溶媒下、室温で反応させることで対応するヨウ素化合物 **16-20** をそれぞれ収率 67.6%, 48.2%, 63.9%, 71.5%及び 84.0%で得た。

Scheme 1



次に、種々のエチレンオキシ鎖を導入したオーロン誘導体の合成を Scheme 2 に従って行った。メチル 5-ヨードサリシレートを出発原料とし、上述と同様の反応を経て、ベンゾフランオン誘導体である化合物 **24** の合成を行った。続いて、ヒドロキシベンズアルデヒドとのアルドール縮合反応により化合物 **20** を合成した。化合物 **20** とエチレンクロロヒドリン、エチレングリコールモノ-2-クロロエチルエーテル又は 2-[2-(2-クロロエトキシ)エトキシ]エタノールを加熱下、塩基性条件で反応させることで、オーロン骨格の側鎖にエチレンオキシ鎖を 1-3 個導入した化合物 **25-27** を収率 56.5%、30.2%及び 67.9%で得ることに成功した。トリブチルスズ標識前駆体 **28-30** は、対応するヨウ素化合物を用いた Pd(0)を触媒とするヨウ素-スズ交換反応により、それぞれ収率 25.0%、31.4%及び 30.3%で得た。

Scheme 2



逆相 HPLC による分析

オーロン骨格の 4'位にアミノ基を導入した化合物 **16-18** は、それぞれ 4.4 分、7.1 分及び 11.2 分の保持時間を示し (Table 1) , 側鎖が一級アミノ基、モノメチルアミノ基、ジメチルアミノ基の順でその脂溶性が向上した。エチレンオキシ鎖を導入した化合物 **25-27** の保持時間はそれぞれ 3.8 分、3.7 分及び 3.6 分であり、アミノ基を導入した化合物よりも脂溶性が低いことが示唆された。また、導入したエチレンオキシ鎖の

数の違いによる保持時間への影響が認められ、エチレンオキシ鎖の数の増加に伴い、化合物の脂溶性は低下した。

Table 1 Retention time of aurone derivatives.

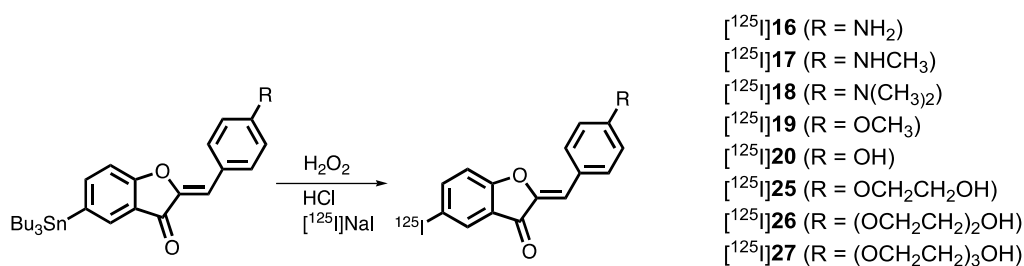
Compound	Retention time ^a
16	4.4
17	7.1
18	11.2
19	10.8
20	5.2
25	3.8
26	3.7
27	3.6

^a Reversed-phase HPLC analysis using a mixture of H₂O/acetonitrile (3/7) as a mobile phase.

¹²⁵I 標識

Scheme 3 に ¹²⁵I 標識経路を示す。目的とする ¹²⁵I 標識体 **16–20**, **25–27** は, 3% H₂O₂ を酸化剤として用いたスズ-ヨウ素交換反応により得た。¹²⁵I 標識体の同定は, それぞれに対応する非放射性化合物を用いた HPLC 分析により行った。これら 8 化合物の放射化学的収率は 25–57% であり, 放射化学的純度 95% 以上であることを確認した。

Scheme 3



Aβ(1-42)凝集体を用いた飽和結合実験

^{[125]I}**16** と Aβ 凝集体との結合親和性を評価するために, Aβ(1-42)凝集体を用いた飽和結合実験を行った。各濃度における Aβ 凝集体への特異的な結合をプロットすることで, 飽和結合曲線を作成した。さらに Scatchard 解析することで K_d 値を算出したと

ころ 7.9 ± 1.3 nM であった (Fig. 5) . この結果より, $[^{125}\text{I}]\mathbf{16}$ は $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体に対し高い結合親和性を有することが示された. また, Scatchard 解析の結果が直線性を示したことから, オーロン誘導体と $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体との結合様式が単一であることが示唆された.

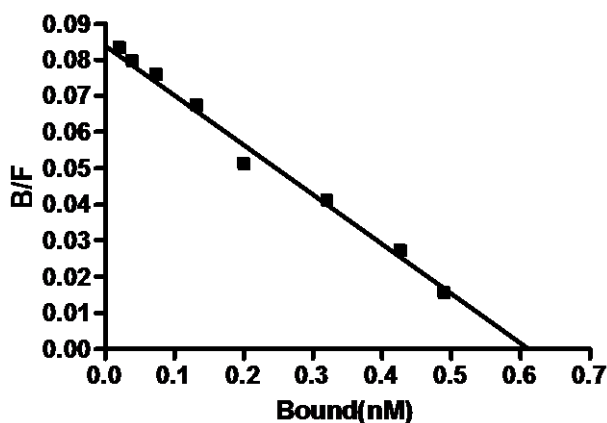


Fig. 5 Scatchard plot of $[^{125}\text{I}]\mathbf{16}$ binding to $\text{A}\beta(1-42)$ aggregates.

$\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体を用いた競合阻害実験

非放射性化合物 $\mathbf{16-20}$, $\mathbf{25-27}$ の $\text{A}\beta$ 凝集体に対する結合親和性を評価するために, $[^{125}\text{I}]\mathbf{16}$ を放射性リガンドとして使用し, $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体を用いた競合阻害実験を行った. 得られたデータより阻害曲線を作成し, K_i 値を算出した (Table 2) .

Table 2 Inhibition constants (K_i) of aurone derivatives for the binding of ligands to $\text{A}\beta(1-42)$ aggregates.

Compound	K_i (nM) ^a
16	2.7 ± 0.2
17	1.2 ± 0.1
18	6.8 ± 0.5
19	2.9 ± 0.4
20	1.3 ± 0.3
25	1.1 ± 0.1
26	3.4 ± 0.3
27	2.6 ± 0.3

^a Data are the mean \pm SEM for two independent measurements done in triplicate.

競合阻害実験の結果，すべてのオーロン誘導体が $[^{125}\text{I}]\mathbf{16}$ の $\text{A}\beta$ 凝集体に対する結合を阻害した．側鎖に一級アミノ基，モノメチルアミノ基及びジメチルアミノ基を導入した化合物 **16-18** は，それぞれ K_i 値が， 2.7 ± 0.2 ， 1.2 ± 0.1 及び 6.8 ± 0.5 nM を示し， $\text{A}\beta$ 凝集体への高い結合親和性が認められた．導入したアミノ基の級数の変化による結合性への顕著な影響は認められなかった．メトキシ基及びヒドロキシル基を側鎖に導入した化合物 **19** 及び **20** も，アミノ基を導入した化合物と同様に高い結合性を示した（それぞれ K_i 値が， 2.9 ± 0.4 及び 1.3 ± 0.3 nM）．エチレンオキシ鎖を 1-3 個導入した化合物 **25-27** は，それぞれ K_i 値が， 1.1 ± 0.1 ， 3.4 ± 0.3 及び 2.6 ± 0.3 nM を示し，そのエチレンオキシ鎖の数に関わらず，高い結合親和性を示した．これらの結果より，今回合成したオーロン誘導体は，側鎖に導入した置換基に関わらず， $\text{A}\beta$ 凝集体に対する結合性を有することが示された．オーロン誘導体が $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体に対し高い結合親和性を示したことから，AD 患者脳内における初期の神経病理学的変化であり， $\text{A}\beta(1-42)$ を主要な構成成分とすることが知られているびまん性の老人斑を検出できる可能性が示された．

AD モデルマウス脳切片を用いた蛍光染色

AD モデルマウス（Tg2576，20 ヶ月齢）脳切片を用いた蛍光染色を行った結果，すべてのオーロン誘導体を用いた染色において，マウス脳切片上に蛍光染色像が観察された（Fig. 6a-d, i-l）．それぞれの隣接切片を，アミロイド蛍光染色試薬であるチオフラビン S で染色した結果，オーロン誘導体の染色箇所と一致した（Fig. 6e-h, m-p）．これらの結果より，オーロン誘導体が，マウス脳切片上の $\text{A}\beta$ 凝集体に対し結合性を有することが示された．また，オーロン誘導体の脳血管アミロイドに対する結合も観察された．

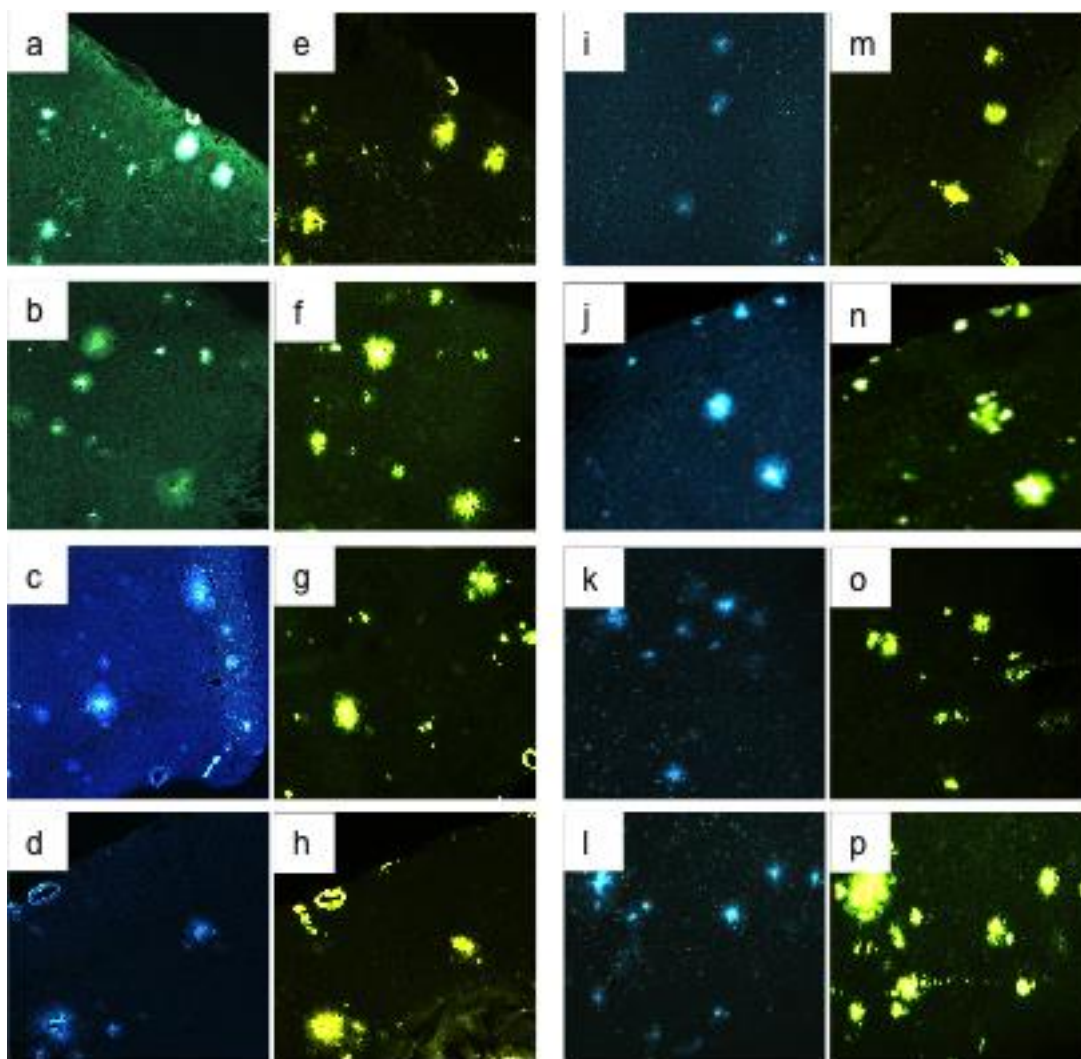


Fig. 6 Neuropathological staining of compounds **16-20** (a-d, i), **25-27** (j-l) in 10- μ m sections from a mouse model of AD. Labeled plaques were confirmed by staining of the adjacent sections with thioflavin S (e-h, m-p).

正常マウスを用いた放射能分布実験

正常マウスを用いた体内放射能分布実験及び *ex vivo* ARG を行うことで、オーロン誘導体の脳への取込みとその後のクリアランスについて検討した。 [125 I]**16-19** を正常マウスに投与後の脳内における放射能挙動を Fig. 7A に示す。側鎖にアミノ基を導入した化合物 **16-18** は、投与 2 分後において、それぞれ 4.6 ± 0.3 , 3.2 ± 0.5 及び $1.9 \pm 0.4\%$ ID/g が脳へ取り込まれ (Fig. 7A and Table 3), 投与早期における脳移行性を有することが示された。特に側鎖に一級アミノ基を導入した化合物 **16** は、脳への高い移行性を示した。側鎖にメトキシ基を導入した化合物 **19** は、アミノ基を導入した化合

物に比べ、脳への取込みは低かった（投与 2 分後において $1.7 \pm 0.4\% \text{ID/g}$ ）。化合物の単純拡散による脳取込みに影響する重要な要因の一つに、化合物の脂溶性が挙げられる(14)。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{16-19}$ では、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{16} < [^{125}\text{I}]\mathbf{17} < [^{125}\text{I}]\mathbf{19} < [^{125}\text{I}]\mathbf{18}$ の順で、脂溶性が高いことが HPLC 分析で確認されている。これら化合物の間では、脂溶性が高いほど脳への取込みが低くなっていることから、化合物の脂溶性を $[^{125}\text{I}]\mathbf{16}$ と同程度又はより低くすることが有利と考えた。投与 30 分後の脳内における $[^{125}\text{I}]\mathbf{16-19}$ の値は $0.1-0.5\% \text{ID/g}$ を示し (Table 3)，投与 2 分後の値の 7-14% まで減少した。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{20, 25-27}$ の結果を Fig. 7B 示す。側鎖にヒドロキシル基を導入した化合物 **20** は、投与 2 分後において $3.1 \pm 0.4\% \text{ID/g}$ ，種々のエチレンオキシ鎖を導入した化合物 **25-27** はそれぞれ、 4.5 ± 0.3 ， 3.7 ± 0.2 及び $2.8 \pm 0.2\% \text{ID/g}$ が脳へ取り込まれた (Fig. 7B and Table 3)。側鎖にエチレンオキシ鎖を一つ導入した化合物 **25** は、導入していない化合物 **20** と比較して投与早期の脳への移行性が高かった。一方、導入するエチレンオキシ鎖の数を増加させていくとその脳への取込みは低下した。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{20, 25-27}$ の脂溶性は、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{27} < [^{125}\text{I}]\mathbf{26} < [^{125}\text{I}]\mathbf{25} < [^{125}\text{I}]\mathbf{20}$ の順で高く、合成した誘導体すべてでは、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{27} < [^{125}\text{I}]\mathbf{26} < [^{125}\text{I}]\mathbf{25} < [^{125}\text{I}]\mathbf{16} < [^{125}\text{I}]\mathbf{20} < [^{125}\text{I}]\mathbf{17} < [^{125}\text{I}]\mathbf{19} < [^{125}\text{I}]\mathbf{18}$ の順となった。脳への取込みは、化合物 **16** 及び **25** が最も高く、そこをピークに脂溶性が高く／低くなるに従って低下したことから、これら化合物の脂溶性が血液脳関門透過性の面では至適であると考えた。また、投与 30 分後の $[^{125}\text{I}]\mathbf{20, 25-27}$ の値は $0.2-0.4\% \text{ID/g}$ を示し (Table 3)，投与 2 分後の値の 5-12% まで減少した。特に、化合物 **25** は 5% まで減少したことから、オーロン誘導体の中でも正常マウス脳において優れたクリアランス能を有することが示された。したがって化合物 **25** は、他のオーロン誘導体と比較し脳内での非特異的結合が少なく、*in vivo* における画像診断において、高い signal-to-noise 比の画像が得られる可能性が示された。

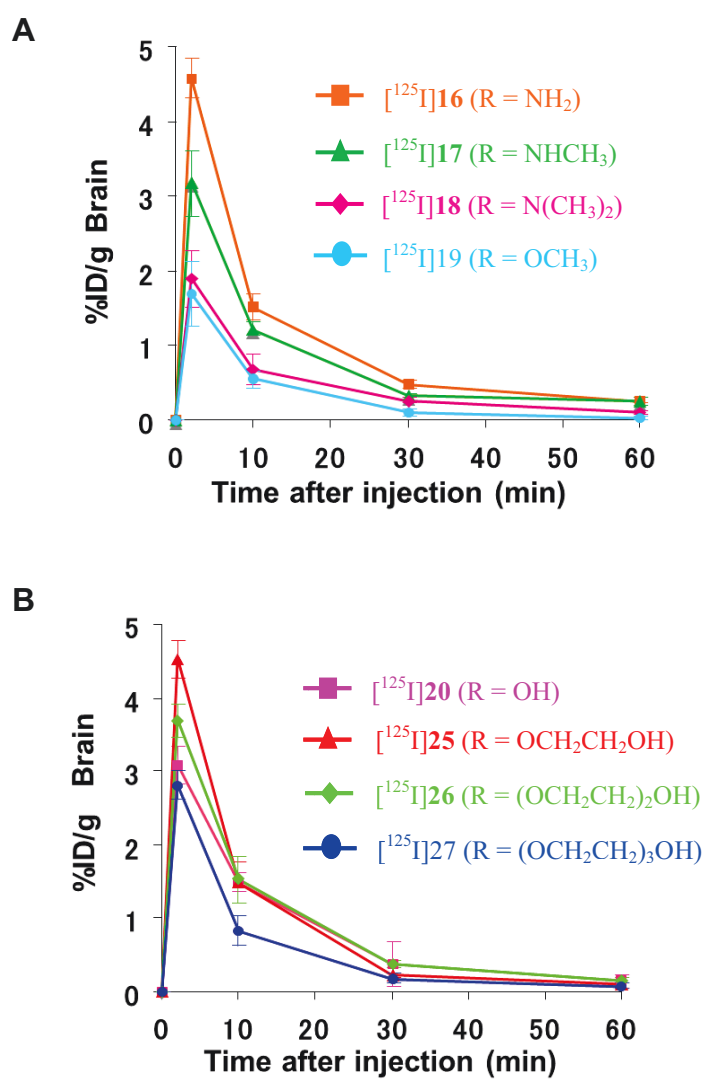


Fig. 7 Brain uptake and washout of aurone derivatives in normal mice (n = 4 or 5).

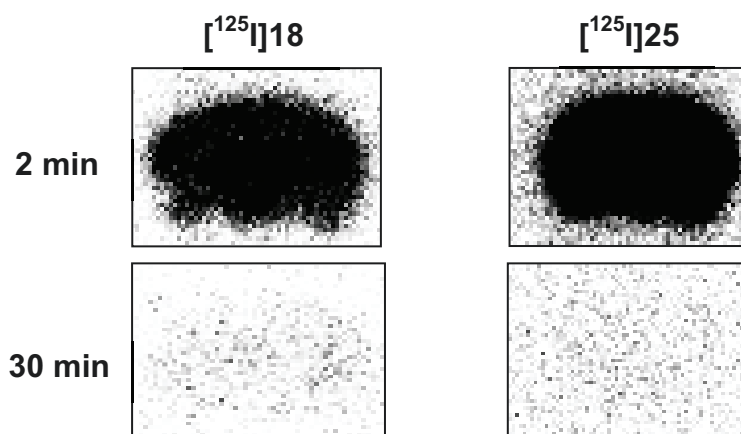


Fig. 8 *Ex vivo* ARG with [¹²⁵I]18, 25 in normal mice.

正常マウスを用いた *ex vivo* ARG を¹²⁵I]18 及び¹²⁵I]25 を用いて行った結果、投与 2 分後における脳切片上において高い放射能の集積が観察された (Fig. 8) . 一方、投与 30 分後の脳切片上では顕著な放射能の集積は観察されなかった. この結果からも、投与された化合物が脳へと移行し、その後速やかにクリアランスされていることが確認された. 各臓器における放射能分布の結果を Table 3 に示す. いずれのオーロン誘導体も、主に肝臓からの胆管、腸管への排泄経路を取ることが示された. 生体内で化合物からの脱ヨウ素化が起こった場合、外れたヨウ素は主に甲状腺や胃などへ集積する. オーロン誘導体では、¹²⁵I]19 及び¹²⁵I]20 の胃への放射能集積は低かったが、¹²⁵I]25 を含めたその他の化合物では、胃への集積が確認され、生体内での脱ヨウ素化が懸念された. また、オーロン誘導体では、脳への集積に比較した高い血中放射能滞留が観察され、*in vivo* 画像読影時のノイズになる可能性が示された.

Table 3 Biodistribution of radioactivity after injection of aurone derivatives in normal mice^a.

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[¹²⁵I]16				
Blood	3.64 (0.78)	4.38 (0.52)	2.87 (0.82)	2.35 (1.38)
Liver	9.17 (3.45)	8.48 (2.84)	7.64 (2.19)	5.85 (1.09)
Kidney	10.87 (2.95)	13.12 (4.30)	12.05 (5.44)	4.95 (1.82)
Intestine	3.12 (0.85)	5.06 (1.51)	15.47 (5.48)	18.30 (7.21)
Spleen	2.29 (0.36)	1.64 (0.29)	0.84 (0.29)	0.92 (0.07)
Heart	6.77 (0.74)	2.69 (0.49)	1.30 (0.41)	0.98 (0.25)
Stomach ^b	3.27 (1.68)	6.51 (1.45)	9.15 (5.27)	7.98 (4.77)
Brain	4.57 (0.27)	1.51 (0.17)	0.49 (0.06)	0.26 (0.03)
[¹²⁵I]17				
Blood	4.16 (0.98)	2.72 (1.01)	2.84 (1.48)	2.41 (0.70)
Liver	11.26 (2.81)	9.70 (2.78)	6.11 (2.16)	4.91 (0.72)

Kidney	9.91 (2.00)	11.44 (2.76)	6.00 (2.14)	3.52 (0.77)
Intestine	3.06 (1.11)	6.59 (3.43)	10.34 (4.91)	14.04 (2.87)
Spleen	2.37 (0.41)	1.28 (0.19)	0.86 (0.14)	0.75 (0.17)
Heart	5.07 (0.47)	2.17 (0.34)	0.98 (0.21)	0.84 (0.37)
Stomach ^b	3.29 (0.48)	7.00 (2.79)	6.38 (4.33)	6.22 (3.98)
Brain	3.17 (0.45)	1.22 (0.09)	0.32 (0.02)	0.24 (0.05)

[¹²⁵I]18

Blood	2.69 (0.29)	1.96 (0.34)	1.48 (0.15)	0.94 (0.25)
Liver	10.21 (1.87)	7.86 (2.25)	5.60 (0.59)	4.33 (0.76)
Kidney	7.84 (1.92)	8.31 (3.19)	10.37 (2.34)	4.51 (1.43)
Intestine	1.65 (0.35)	5.37 (1.10)	9.50 (1.45)	11.85 (2.70)
Spleen	1.76 (0.28)	0.81 (0.31)	0.51 (0.10)	0.37 (0.11)
Heart	3.80 (0.60)	1.36 (0.66)	0.55 (0.29)	0.45 (0.11)
Stomach ^b	1.78 (0.48)	1.27 (0.70)	3.19 (0.71)	2.21 (1.11)
Brain	1.89 (0.38)	0.69 (0.21)	0.26 (0.04)	0.11 (0.03)

[¹²⁵I]19

Blood	3.16 (0.82)	1.51 (0.23)	0.95 (0.19)	0.70 (0.60)
Liver	6.87 (2.18)	5.16 (0.73)	2.76 (0.40)	1.86 (0.83)
Kidney	7.26 (2.18)	7.00 (1.49)	4.93 (1.52)	2.43 (1.17)
Intestine	1.59 (0.51)	4.70 (1.46)	11.67 (3.56)	9.02 (3.14)
Spleen	1.45 (0.56)	0.74 (0.10)	0.48 (0.10)	0.43 (0.14)
Heart	3.84 (1.04)	1.06 (0.10)	0.37 (0.09)	0.25 (0.12)
Stomach ^b	0.39 (0.20)	0.89 (0.48)	0.42 (0.13)	0.82 (0.46)
Brain	1.69 (0.43)	0.54 (0.12)	0.11 (0.05)	0.03 (0.02)

[¹²⁵I]20

Blood	3.14 (0.39)	2.77 (0.28)	1.75 (0.38)	0.87 (0.28)
-------	-------------	-------------	-------------	-------------

Liver	6.05 (1.49)	6.63 (1.08)	4.23 (0.63)	4.45 (3.14)
Kidney	11.08 (2.96)	11.22 (2.26)	5.82 (1.11)	2.43 (1.04)
Intestine	2.11 (0.75)	6.12 (0.83)	12.67 (2.13)	14.87 (5.42)
Spleen	2.18 (0.48)	1.36 (0.83)	0.69 (0.14)	0.42 (0.02)
Heart	6.23 (0.63)	2.57 (0.41)	0.98 (0.14)	0.42 (0.14)
Stomach ^b	0.93 (0.28)	1.46 (0.23)	1.22 (0.72)	1.89 (1.01)
Brain	3.07 (0.39)	1.48 (0.19)	0.37 (0.07)	0.14 (0.12)

[¹²⁵I]25

Blood	4.97 (0.96)	3.88 (1.09)	2.38 (0.85)	1.24 (0.35)
Liver	13.4 (3.20)	13.3 (2.59)	7.60 (1.95)	5.27 (0.64)
Kidney	11.3 (1.23)	10.8 (2.58)	6.09 (2.43)	2.50 (1.30)
Intestine	2.78 (0.42)	7.83 (2.22)	17.82 (3.58)	20.93 (4.46)
Spleen	2.72 (0.28)	1.02 (0.22)	0.50 (0.13)	0.21 (0.09)
Heart	6.30 (0.65)	2.30 (0.46)	0.83 (0.15)	0.72 (0.58)
Stomach ^b	1.88 (0.41)	3.23 (2.58)	5.15 (4.43)	1.45 (0.78)
Brain	4.51 (0.25)	1.48 (0.28)	0.24 (0.03)	0.09 (0.04)

[¹²⁵I]26

Blood	3.61 (0.74)	5.18 (2.54)	1.11 (0.73)	0.68 (0.45)
Liver	12.5 (3.21)	11.6 (1.75)	9.31 (2.66)	7.12 (4.05)
Kidney	12.0 (0.99)	10.3 (1.17)	5.75 (1.53)	2.55 (1.12)
Intestine	2.35 (1.33)	8.18 (2.32)	19.7 (7.86)	26.38 (5.95)
Spleen	2.26 (0.53)	1.56 (0.45)	0.78 (0.26)	0.45 (0.21)
Heart	6.04 (0.38)	2.77 (0.94)	1.21 (0.66)	0.66 (0.57)
Stomach ^b	1.71 (0.38)	5.65 (6.63)	5.00 (2.83)	6.58 (4.59)
Brain	3.69 (0.22)	1.53 (0.31)	0.38 (0.05)	0.16 (0.03)

[¹²⁵I]27

Blood	2.98 (0.64)	4.62 (2.17)	0.83 (0.64)	0.51 (0.31)
Liver	12.95 (3.43)	11.20 (1.51)	8.34 (1.98)	7.70 (3.93)
Kidney	11.58 (1.13)	9.66 (2.28)	5.84 (1.79)	2.41 (1.22)
Intestine	2.52 (0.39)	7.50 (4.85)	17.95 (7.53)	22.64 (5.89)
Spleen	2.26 (0.65)	1.40 (0.23)	0.84 (0.23)	0.56 (0.24)
Heart	5.67 (1.02)	2.24 (0.56)	1.40 (0.49)	0.39 (0.68)
Stomach ^b	3.29 (1.47)	4.73 (5.14)	7.45 (4.62)	7.61 (5.20)
Brain	2.81 (0.19)	2.32 (0.21)	0.18 (0.06)	0.08 (0.04)

^a Each value represents the mean (SD) for 4-5 animals.

^b Expressed as % injected dose per organ.

AD 患者脳切片を用いた *in vitro* ARG

体内放射能分布実験において、良好な脳内挙動を示した化合物**25**のAD患者脳切片上の老人斑に対する結合性を検討した (Fig. 9)。健常人由来の脳切片 (Fig. 9C) においては、特異的な放射能集積が認められなかったのに対し、AD患者由来の脳切片 (Fig. 9A) では、局所的に高い放射能集積が確認された。隣接切片の免疫染色の結果、健常人由来の脳切片上ではA β の蓄積が認められなかった (Fig. 9D)。一方、AD患者由来の脳切片上にはA β の蓄積が認められ (Fig. 9B)、その染色箇所がARGにおける放射能集積箇所と一致した。これらの結果より、化合物**25**は、AD患者脳切片上のA β 凝集体に対し結合性を有することが示された。

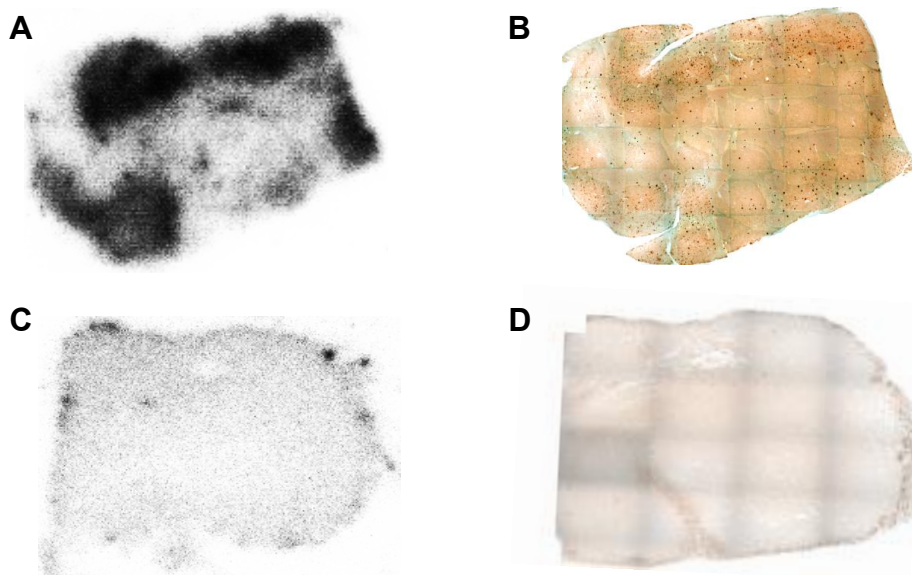


Fig. 9 (A) *In vitro* ARG of [125 I]**25** reveals a distinct labeling of amyloid plaques in AD brain sections. (C) Under similar conditions, there is very little labeling of [125 I]**25** in control brain section. (B and D) The presence and localization of plaques in the sections were confirmed with immunohistochemical staining using a monoclonal A β antibody.

2.1.4 小括

本研究では、種々の置換基を導入したオーロン誘導体を合成し、また、それぞれに対応するトリブチルスズ標識前駆体を用いたスズ-ヨウ素交換反応により、 125 I標識**16-20**、**25-27**を良好な放射化学的収率（25-57%）で得た。A β (1-42)凝集体を用いた競合阻害実験では、側鎖に導入した置換基に関わらず、いずれのオーロン誘導体もA β (1-42)凝集体に対し高い結合親和性を示した（ K_i 値1-7 nM）。ADモデルマウス脳切片を用いた蛍光染色では、マウス脳切片上のA β 凝集体に対する結合性が確認された。さらに、正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、オーロン誘導体は投与早期の高い脳移行性とその後の速やかなクリアランスを示し、フラボン及びカルコンで問題となっていた脳内滞留性を低減することを認めた。特に化合物**25**は良好な脳内放射能挙動を示した。ヒト脳切片を用いたARGにおいて、化合物**25**は、AD患者脳組織切片上の老人斑に対する結合性を示した。一方、オーロン誘導体の血中での高い放射能滞留が確認された。

以上の結果より、放射性ヨウ素標識オーロン誘導体**25**は、AD患者脳内の老人斑を

描出するSPECT用A β イメージングプローブとしての基本的要件を満たすが、血中での放射能滞留が臨床使用で問題となることが懸念された。

2.2 第二章：イミダゾピリジン誘導体^[123I]ABC577 の評価

2.2.1 目的

オーロン誘導体は、Aβ への結合性を示したものの、高い血中滞留が確認され、*in vivo* での読影の妨げとなる可能性が考えられた。そこで本研究では、Aβ 結合性を有し、かつ脳内の非特異的結合及び血中滞留性が低い Aβ イメージングプローブの開発を目的とした。母体骨格には、過去に優れた脳/血液集積比を示すことが報告されているイミダゾピリジン骨格を選択し(33)、その 2 位にピリジン環を導入、さらにピリジン環の 4 位に N 原子を介して electron-rich なトリアゾール環を導入した化合物：^[123I]ABC577 を設計・合成した (Fig. 10)。また、非臨床での^[123I]ABC577 の性能を、AD 患者脳組織を用いた飽和結合実験及び *in vitro* ARG, 並びに正常ラットを用いた体内放射能分布実験で検討した。さらに、first-in-human 臨床試験を実施し、^[123I]ABC577 のヒトでの安全性及び有効性を評価した。なお、本研究では、放射性核種に臨床で使用される ¹²³I を用い評価した。

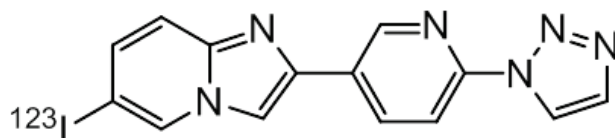


Fig. 10 Chemical structure of ^[123I]ABC577.

2.2.2 方法

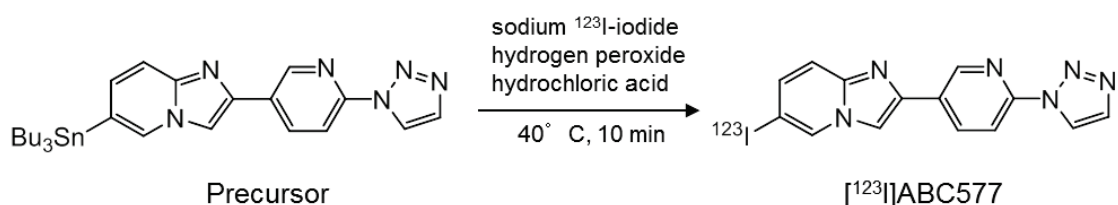
AD 患者脳組織（前頭葉，86 歳女性；前頭葉，87 歳女性；前頭葉，79 歳男性；海馬，73 歳男性）及び正常脳組織（前頭葉，44 歳女性）は、Analytical Biological Services 社より購入した。各組織における Aβ 及びリン酸化タウの蓄積は、抗 Aβ モノクローナル抗体 82E1（Immuno-Biological Laboratories 社）及び抗リン酸化タウモノクローナル抗体 AT8（Innogenetics 社）を用いた免疫組織学的染色で確認した。蛍光顕微鏡は、キーエンス社製の BZ-9000 を用いた。Wistar ラットは日本エスエルシー株式会社から購入し、餌及び水を十分に与え、適切な温度（18–28°C）、湿度（30–80%）及び明暗周期（8 時点灯 20 時消灯）の管理下で飼育した。すべての動物実験は、日本メジフィ

ジックス株式会社 生物実験委員会の審議のもと、創薬研究所所長（実施機関の長）により承認された実験計画に基づき実施した。

[¹²³I]ABC577 の標識合成

[¹²³I]ABC577 の標識前駆体及び標準物質 ABC577 はナード研究所に委託合成した。トリブチルスズ標識前駆体を用いたスズ-ヨウ素交換反応により、[¹²³I]ABC577 を合成した (Scheme 4)。[¹²³I]ABC577 標識の放射化学的収率は 3–57% であり、放射化学的純度が 94% 以上、比放射能が 100 GBq/μmol 以上であることを確認した。非臨床試験と臨床試験では、異なる [¹²³I]ABC577 の標識・精製方法を用いた。詳細は以下の通り。

Scheme 4



①非臨床試験用

トリブチルスズ標識前駆体のアセトニトリル溶液 (1 mg/mL) 90 μL を 2 N HCl (85 μL), 30% H₂O₂ (10 μL) 及び Na[¹²³I] (60 μL) の混合液に添加した。40°C で 10 分間反応させた後、反応溶液を逆相 HPLC を用いて精製した。HPLC のカラムには YMC PackPro C8 (4.5 × 150 mm) を用い、流速 1 mL/min, 移動相: 0.1% TFA 含有 80% アセトニトリル溶液の条件で実施した。[¹²³I]ABC577 を含むフラクションに 5 mL の水を添加し、固相抽出カートリッジ (Sep-Pak C18 Light ; Waters 社) に通液した。カートリッジを 1 mL の水で洗浄した後、1 mL のジエチルエーテルを用いて最終製剤用バイアル (1% tween80 含有 50 mM システイン溶液を添加済み) に溶出した。その後、アルゴンガスでジエチルエーテルを蒸発させた。

②臨床試験用

同様にトリブチルスズ標識前駆体と Na[¹²³I]溶液を HCl 及び H₂O₂ 存在下、40°C で

10 分間反応させた。その後、反応溶液に亜硫酸水素ナトリウムの飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を添加し、反応を停止させたのち、逆相 HPLC を用い精製した。HPLC のカラムには Eclipse XDB-C18 (9.4×250 mm) を用い、流速 4 mL/min, 移動相 : 0.2% トリエチルアミン含有 75%メタノール溶液の条件で実施した。 [¹²³I]ABC577 を含むフラクションに 10 mL の水を添加し、固相抽出カートリッジ (Sep-Pak tC18 Light ; Waters 社) に通液した。カートリッジを 10 mL の水で洗浄したのち、2 mL のエタノールを用いて最終製剤用バイアル (15 mL の生理食塩液を添加済み) に、0.2–0.22 μm の無菌フィルターを介して溶出した。

AD 患者脳ホモジネートを用いた飽和結合実験

Aβ の蓄積を免疫染色で確認した前頭葉組織の灰白質を白質 (Aβ 非沈着部位) から分離し、組織ホモジナイザーを用いてリン酸緩衝生理食塩液 (以下, PBS) の脳組織ホモジネートを調製した。調製した脳組織ホモジネートは実験に使用するまで -80°C で保管した。 [¹²³I]ABC577 と ABC577 の混合溶液 (25 nM) を順次希釈していき、最終濃度 0.2–25 nM の 0.1%ウシ血清アルブミン (以下, BSA) 含有 PBS 溶液とした。種々の濃度の混合液 100 μL, 脳組織ホモジネート溶液 50 μL (組織重量 25 μg) を 0.1%BSA 含有 PBS 100 μL に加え、22°C で 3 時間インキュベートした。非特異的結合は最終濃度 1 μM の Pittsburgh compound B を添加して算出した。インキュベート後、反応溶液を MultiScreen HTS Vacuum Manifold システム (Merck Millipore 社) を用いて GF/B フィルターに透過させた。フィルターの放射活性をオートウェルガンマカウンター (ARC-7001 ; 日立アロカメディカル株式会社) で計測した後、得られたデータを GraphPad Prism (GraphPad Software 社) を用いて単一結合サイトモデルにフィッティングし、解離定数 (K_d) 及び最大結合定数 (B_{max}) を算出した。

ヒト脳切片を用いた *in vitro* ARG

AD 患者脳組織切片及び対照切片 (厚さ 5 μm) をクリオスタット (Leica Microsystems 社) を用いて作製した。切片を PBS に 15 分, 5 分, 5 分間浸し、続いて 1%BSA 含有

PBS に浸した。10 kBq/mL に調整した ^{123}I ABC577 溶液と切片を室温で 30 分間反応させた。反応終了後、1%BSA 含有 PBS で 5 分洗浄、続いて PBS で 5 分×2 回洗浄した。非特異的結合は、非標識化合物 ABC577 を ^{123}I ABC577 溶液に最終濃度 5 μM となるよう添加して評価した。洗浄した切片を風乾した後、BAS イメージングプレート (Fujifilm 社) に 16 時間固定、その後 BAS-2500 スキャナーシステム (Fujifilm 社) 又は Typhoon FLA7000 IP システム (GE healthcare 社) を用い分析した。ARG に使用した切片の隣接切片を用い、抗 A β モノクローナル抗体 (82E1) 及び抗リン酸化タウモノクローナル抗体 (AT8) による免疫染色を実施した。

正常ラットを用いた体内放射能分布実験

計 21 匹の甲状腺ブロック処理 (ルゴール溶液: ヨウ素 0.5 mg/mL, ヨウ化カリウム 1 mg/mL を強制経口投与) を実施した Wistar ラット (129–142 g) に、 ^{123}I ABC577 (4 MBq) を尾静脈より投与した。投与 5 分, 30 分, 1 時間, 3 時間, 6 時間, 14 時間及び 24 時間後に屠殺した (各時間点 n=3)。主要な臓器を摘出後に重量を測定し、放射活性をシングルチャンネルアナライザー (応用光研工業株式会社) で計測した。各臓器における取込み量は、投与した全放射能 (ID) に対する血液又は臓器 1 g に存在する放射能の割合 (%ID/g) で示した。

SPECT 試験

当該試験は、Institute for Neurodegenerative Disorders and Molecular NeuroImaging (New Haven, CT) において、New England Institutional Review Board 及び FDA により承認されたプロトコルに従い実施した。手書きの同意文書を、すべての被験者又は被験者の介護者 (probable AD 患者で本人による取得が困難な場合) から、試験登録前及び試験手順の変更前に取得した。

被験者情報

若年健康成人 (平均年齢 24.5 歳, 以下 YHCs) 及び AD 患者 (平均年齢 66.8 歳) を

それぞれ3名ずつ登録した (Table 4)。AD患者は一般のデータベース等から、YHCsは、介護者又はMolecular NeuroImaging社のデータベースを利用して登録した。

Table 4 Demographics and neuropsychologic results

Study ID#	Age at Imaging	Gender	MMSE	CDR	[¹⁸ F]Florbetapir scan
HC01	26	Male	30	0	-
HC02	22	Male	30	0	-
HC03	25	Male	28	0	-
AD01	66	Female	25	0.5	Positive
AD02	67	Female	26	1	Positive
AD03	66	Male	15	1	Positive

AD患者の登録では、50歳以上で、NINCDS/ADRDAのprobable ADの基準及びDSM-IV-TRのdementia of Alzheimer's typeの基準に該当し、clinical dementia rating (以下、CDR)スコアが0.5、1又は2である被験者を選択した。さらに、医薬品として承認されているPET用Aβイメージングプローブ:[¹⁸F]Florbetapir (Amyvid™;Eli Lilly社)を用いた撮像を全てのAD患者に実施し、中程度から重度のAβ凝集体の沈着が脳内に認められることを視覚評価で確認した。

YHCsの登録では、20歳~30歳の男性で、認知機能低下の臨床症状がなく、CDRスコアが0かつMini-Mental State Examination (MMSE)が28以上の基準を満たす被験者を選択した。一親等以内にAD患者がいる場合、並びに臨床所見やMRI検査でAD以外の神経変性疾患や脳卒中、脳血管障害の疑いが持たれた場合は、試験から除外した。また、MRI検査が禁忌である者や、アルコール又は薬物の乱用経験がある者、直近の1年間で15 mSvを超える放射線被ばくを受けている者等は試験から除外した。

SPECT 撮像

被験者のスクリーニング、並びにSPECT及びPET画像の位置合わせのリファレンスに使用するため、脳のMRI撮像 (T1及びT2強調画像)を実施した。 [¹²³I]ABC577

投与の 30 分前に、被験者の甲状腺への被ばくを抑制するため、甲状腺ブロック処置（飽和ヨウ化カリウム水溶液を 10 滴経口投与）を行った。すべての被験者に約 185 MBq の ^{123}I]ABC577 を単回静脈内投与し、10 mL の生理食塩液でフラッシュした。経時的な SPECT 画像を低エネルギー高分解能ファンビームコリメータを搭載した研究用 3 ヘッド SPECT 装置（PICKER PRISM 3000XP ; Philips 社）を用いて撮像した。

YHCs における SPECT 撮像は、 ^{123}I]ABC577 投与後、3 つの 90 分間のセッション：0–90 分（6×10 分、2×15 分）、120–210 分（4×22.5 分）及び 240–330 分（4×22.5 分）で実施した。AD 患者は、 ^{123}I]ABC577 投与後 150 分から 240 分の 90 分間に撮像した（4×22.5 分）。 ^{123}I から放出される γ 線を検出するため、 $159\text{ keV} \pm 20\%$ のエネルギーウィンドウ、収集ステップ角度 3° の条件で撮像し、得られたプロジェクションデータを Iteration 4, Subset 20 の条件で ordered subset expectation maximization（以下、OSEM）再構成した。また、線減弱係数を 0.11 cm^{-1} とし、Chang 法により減弱補正を行った。キャリブレーションファクターを算出するため、放射能濃度既知のファントムのプロジェクションデータも同様に収集し、再構成した。

代謝物分析

血漿中代謝物の分析のため、YHCs では ^{123}I]ABC577 投与 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240 及び 300 分後に、AD 患者では投与 180, 210 及び 240 分後に静脈血を採取した。除タンパクのため、血漿 1 mL にアセトニトリル 1 mL を添加し、激しく混和した後、3000 g で 10 分間遠心し、上清を逆相 HPLC システムで分析した。カラムには Phenomenex Luna C18(2)（10×250 mm）を用い、流速 4 mL/min、移動相：0.2% トリエチルアミン含有 75% メタノール溶液の条件で実施した。放射能の検出には γ 線検出器（LabLogic Systems 社）を用いた。得られたクロマトグラム上の ^{123}I]ABC577 のピーク面積値をすべての放射性ピークの内面積の合計値で除することで、血漿中に存在する ^{123}I]ABC577 の未変化体の割合を算出した。

SPECT 画像解析

SPECT 画像の解析は FusionViewer ソフトウェアパッケージ (AZE 社) を用いて実施した。解析実施時に SPECT 画像を MRI 画像 (T1 強調) とフュージョンした。Volume of interests (以下, VOIs) を MRI 画像上の前頭葉, 頭頂葉, 側頭葉, 後頭葉, 前帯状回, 後帯状回, 白質及び小脳に設定した後, 当該 VOIs を SPECT 画像上に移し, 解析に使用した。放射能濃度既知のファントム撮像データから算出したキャリブレーションファクターを使用し, 各 VOI における平均の放射能濃度を算出した。平均の放射能濃度を体重及び投与量で補正し, standardized uptake value (以下, SUV) を算出した。また, 各領域における SUV を小脳の SUV で除することで, 対照領域を小脳とする SUV ratio (以下, SUVR) を算出した。脳内の各領域における time-activity curve を SUV 単位 (g/mL) 及び SUVR 単位で作成し, また 90 分間の平均の SUVR を算出した (AD は投与後約 150–240 分, YHCs は投与後約 120–210 分)。前頭葉, 頭頂葉, 側頭葉, 後頭葉, 前帯状回及び後帯状回の SUVR を相加平均したものを皮質の SUVR とした (34, 35)。

核医学専門医による ^{123}I]ABC577 SPECT 画像読影を盲検下で実施した。AD 患者では ^{123}I]ABC577 投与後 150–240 分の積算画像を, YHCs は投与後 120–210 分の積算画像を用いた。画像の評価は, AD 患者脳内で $\text{A}\beta$ が蓄積することが剖検等で確認されている領域 (外側側頭葉, 前頭葉, 帯状回, 頭頂葉及び楔前部) への ^{123}I]ABC577 の集積に基づき実施した。判定は, 上述の領域への ^{123}I]ABC577 集積の有無により, positive 又は negative にスコア化した。なお, カメラの問題により, HC02 の二回目のイメージングセッションの撮像が実施できなかったため, HC02 では 45 分間の積算データを用いた。

^{18}F]Florbetapir PET 撮像及び画像解析

^{18}F]Florbetapir PET 撮像は Siemens 社製の ECAT EXACT HR+カメラを用いて実施した。370 MBq の ^{18}F]Florbetapir を単回静脈内投与後 50–65 分にスタティックスキャンを実施した。 ^{68}Ge 外部線源を用いたトランスミッションスキャンを実施し, 補正計数

を算出，減弱補正を行った．エミッションデータは，2D OSEM 法により再構成した．PET 画像の解析は FusionViewer ソフトウェアパッケージ（AZE 社）を用いて実施した．解析時に PET 画像を MRI 画像（T1 強調）とフュージョンし，SPECT 画像解析で使した VOIs と同じ VOI セットを用い，各 VOI における平均の放射能濃度を算出した．さらに小脳放射能濃度で除することで SUVR を算出した．前頭葉，頭頂葉，側頭葉，後頭葉，前帯状回及び後帯状回の SUVR を相加平均したものを皮質の SUVR とした．核医学専門医による^[18F]Florbetapir PET 画像（50–65 分の積算画像）の読影を Eli Lilly 社が提供する方法に基づき実施し，positive 又は negative にスコア化した．本試験には，^[18F]Florbetapir PET positive の AD 患者のみを登録した．

2.2.3 結果及び考察

本研究では，既に臨床で使用されている PET プローブと同等の性能を持つ SPECT プローブを開発することを目的とし，イミダゾピリジン誘導体である^[123I]ABC577 をデザイン，非臨床実験でその A β イメージングプローブとしての性能を評価した．さらに，ヒトでの安全性及び有効性を，YHCs 及び AD 患者を対象とした臨床試験で評価した．

AD 患者脳ホモジネートを用いた飽和結合実験

飽和結合実験では，ヒト *in vivo* での性能を正確に予測するために，未固定の凍結脳組織を使用した．A β 凝集体の沈着を確認した AD 患者死後脳組織から作製したホモジネートを用いた飽和結合実験の結果，^[123I]ABC577 の A β 凝集体への結合は飽和性を示し，また特異的であることが示唆された (Fig. 11)．^[123I]ABC577 の結合データは，単一結合サイトモデルを用いた解析に良くフィッティングした ($r^2=0.97$)．Scatchard 解析により算出した K_d 値は 1.83 nM であり， B_{max} は 1235 fmol/mg tissue であった．脳内 A β の描出に臨床で成功している PET プローブである^[18F]Florbetapir と ¹¹C-Pittsburgh compound B の AD 患者脳ホモジネートに対する K_d 値はそれぞれ 3.7 nM(15)及び 1.4 nM(36)であることが報告されており，^[123I]ABC577 がヒト脳内 A β を

イメージングするのに十分な結合親和性を有することが示唆された。

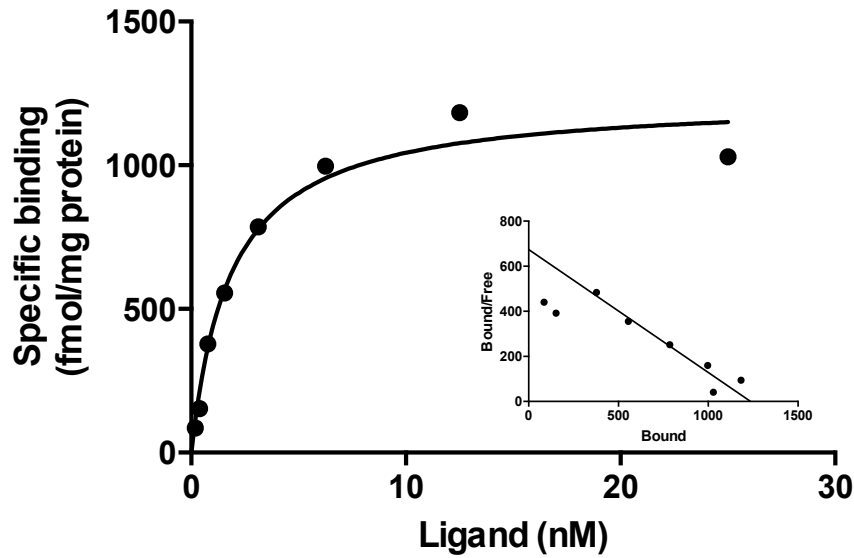


Fig. 11 Scatchard analysis of saturation binding assay for post-mortem Alzheimer's disease brain homogenates.

ヒト脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

飽和結合実験と同様に未固定の凍結脳組織を使用した。[¹²³I]ABC577の結合特性を評価するため、4名のAD患者と1名の対照被験者の脳切片を用いた。免疫染色でAβの蓄積が多く認められタウの蓄積が殆ど確認できなかった切片では、対照切片に比較した[¹²³I]ABC577の顕著な集積増加が灰白質領域（Aβ蓄積領域）に確認された（Fig. 12A and 12B）。[¹²³I]ABC577の集積は非標識体のABC577を添加することで、ほぼ完全に阻害され、[¹²³I]ABC577の集積が特異的であることが示された（data not shown）。Aβの蓄積がない白質領域では、AD患者切片と対照切片の間で[¹²³I]ABC577の集積に差は確認されなかった。Aβ及びタウの蓄積が共に確認された切片では、[¹²³I]ABC577の集積は、免疫染色でAβの蓄積が確認された部位にのみ認められ、タウの蓄積領域では確認されなかった（Fig. 12C）。これらの結果から、[¹²³I]ABC577はAβに対する結合性は高く、一方でタウへの結合性は低いことが示された。

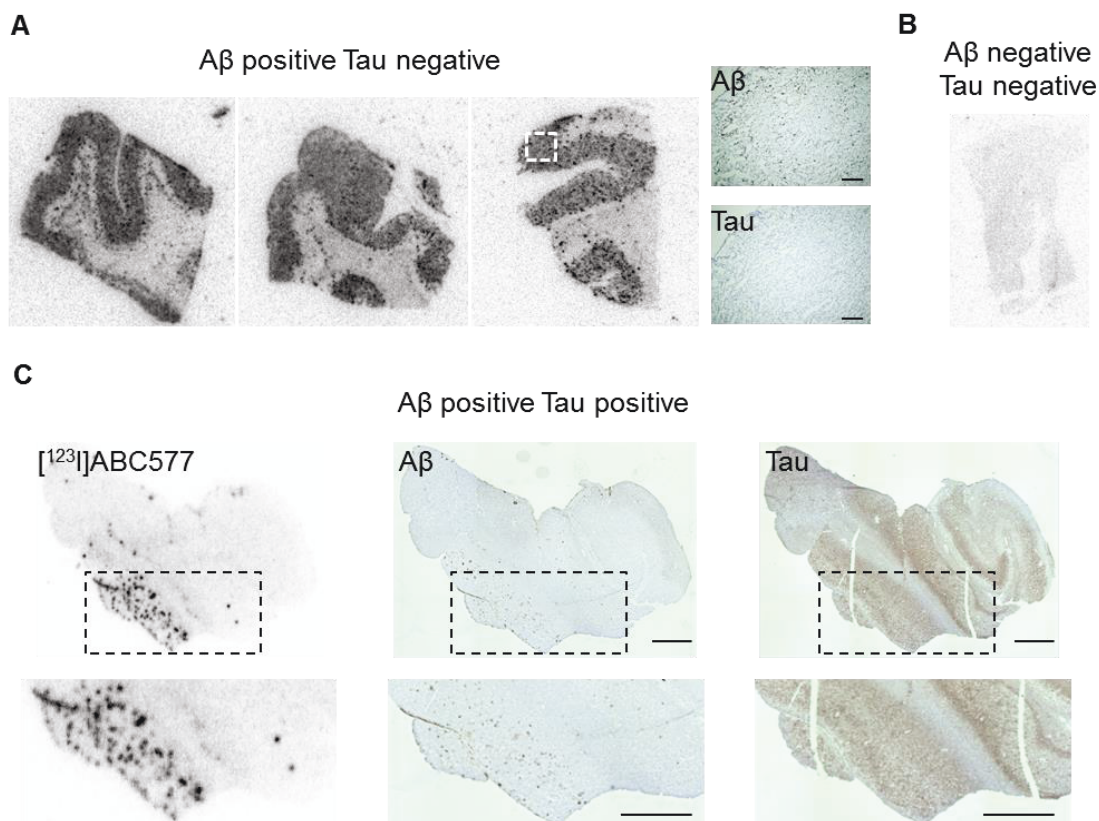


Fig. 12 *In vitro* autoradiograms of [^{123}I]ABC577 with different types of human brain sections. (A) Distinct labeling was observed on Alzheimer's disease brain sections with abundant A β plaques but minimal PHF-tau. Immunostaining results in the area indicated by the white square are presented at a higher magnification. Scale bars = 0.5 mm. (B) Labeling was not observed on the control brain section. (C) Distribution of [^{123}I]ABC577-labeling colocalized with A β plaques but did not highlight PHF-tau pathology. (C, top row) Low magnification. (C, bottom row) High magnification from the framed areas. Scale bars = 2 mm.

正常ラットを用いた体内放射能分布実験

正常ラットを用いた体内放射能分布実験を実施し、 $[^{123}\text{I}]\text{ABC577}$ の脳への取込みとその後のクリアランスについて検討した。 $[^{123}\text{I}]\text{ABC577}$ の正常ラットでの体内分布データを Table 5 に示す。 $[^{123}\text{I}]\text{ABC577}$ は、静脈内投与後速やかな全身分布と血中からのクリアランスを示し、その後、尿中及び糞中へ排泄された。オーロン誘導体で問題となった血中滞留性は確認されなかった。 $[^{123}\text{I}]\text{ABC577}$ は主に肝臓、小腸、腎臓及び副腎に集積した。投与5分後において、 $[^{123}\text{I}]\text{ABC577}$ は0.788 %ID/gが脳へ取り込まれ、投与早期における優れた脳移行性を有することが示された。また、投与60分後の脳内における値は0.044 %ID/gであり、 $[^{123}\text{I}]\text{ABC577}$ が、正常ラット脳へ移行後に

速やかにクリアランスされることが示された。血液脳関門透過性は A β イメージングプローブ開発における重要なファクターの一つである。 [¹²³I]ABC577 は、正常脳への高い取込みだけでなく、速やかなクリアランスを示したことから、 *in vivo* での撮像において高い signal-to-noise 比の画像を投与後早期から取得できる可能性が示された。

Table 5 Percentage of injected dose per gram of each tissue and organ after injection of [¹²³I]ABC577

Tissues/ Organs (%ID/g)	Time after the administration of [¹²³ I]ABC577						
	5 min	30 min	1 hour	3 hour	6 hour	14 hour	24 hour
Brain	0.788 ± 0.097	0.154 ± 0.103	0.044 ± 0.023	0.006 ± 0.001	0.006 ± 0.001	Not detected	Not detected
Lungs	1.032 ± 0.045	0.399 ± 0.266	0.142 ± 0.040	0.065 ± 0.002	0.101 ± 0.029	0.012 ± 0.001	0.002 ± 0.003
Heart	0.685 ± 0.053	0.200 ± 0.143	0.073 ± 0.019	0.035 ± 0.003	0.049 ± 0.013	Not detected	Not detected
Blood	0.400 ± 0.055	0.200 ± 0.059	0.121 ± 0.015	0.084 ± 0.004	0.103 ± 0.026	0.015 ± 0.002	0.007 ± 0.001
Liver	3.505 ± 0.291	1.222 ± 0.232	0.618 ± 0.091	0.230 ± 0.015	0.183 ± 0.013	0.041 ± 0.003	0.032 ± 0.004
Pancreas	1.081 ± 0.022	0.276 ± 0.087	0.099 ± 0.032	0.035 ± 0.002	0.046 ± 0.012	0.005 ± 0.005	Not detected
Spleen	1.097 ± 0.062	0.291 ± 0.161	0.110 ± 0.044	0.055 ± 0.005	0.062 ± 0.008	0.007 ± 0.006	0.004 ± 0.006
Stomach	0.665 ± 0.192	0.802 ± 0.231	0.866 ± 0.014	0.997 ± 0.308	1.016 ± 0.455	0.059 ± 0.009	0.024 ± 0.008
Small Intestine	2.839 ± 0.292	9.766 ± 3.797	12.720 ± 0.886	1.505 ± 0.424	0.674 ± 0.099	0.064 ± 0.010	0.022 ± 0.008
Large Intestine	0.235 ± 0.049	0.118 ± 0.003	0.139 ± 0.032	10.147 ± 0.134	11.376 ± 0.942	0.609 ± 0.274	0.122 ± 0.026
Kidneys	2.289 ± 0.051	1.547 ± 0.286	0.714 ± 0.211	0.105 ± 0.002	0.111 ± 0.010	0.020 ± 0.001	0.011 ± 0.001
Adrenals	19.872 ± 7.455	12.269 ± 4.479	7.750 ± 0.994	0.687 ± 0.346	0.207 ± 0.017	Not detected	Not detected
Muscle	0.471 ± 0.061	0.101 ± 0.024	0.045 ± 0.012	0.019 ± 0.002	0.024 ± 0.007	0.003 ± 0.001	0.000 ± 0.001
Bone	0.503 ± 0.085	0.126 ± 0.057	0.065 ± 0.013	0.042 ± 0.005	0.051 ± 0.010	Not detected	Not detected
Red marrow	0.993 ± 0.272	0.179 ± 0.188	0.107 ± 0.018	0.047 ± 0.013	0.075 ± 0.024	Not detected	Not detected

Data are expressed as mean ± SD, n = 3 per group

SPECT 試験

[¹²³I]ABC577 のヒト脳内 A β 描出の可能性を 3 名の YHCs 及び AD 患者において評価した。当該試験において [¹²³I]ABC577 は高い忍容性を示し、重篤な有害事象は認められず、また臨床検査及び心電図等において臨床的に有意な変化は観察されなかった。

YHCs の皮質平均、小脳及び白質の time-activity curves (SUV 単位) を Fig. 13A に示す。 [¹²³I]ABC577 は投与後速やかに脳内に移行し、すべての脳領域で高い取込みを示した (SUV の最大値が約 2.5)。脳内への集積は可逆的であり、白質を含むすべての領域から速やかにクリアランスされ、投与後 330 分では SUV が約 0.2 まで低下した。

AD 患者の SPECT 撮像は、 [¹²³I]ABC577 投与後 SUVR が一定になった後から開始することを目的とし、YHCs の結果に基づき投与後 150–240 分で実施した (4 \times 22.5 分)。

Fig. 13B 及び 13C に皮質の平均及び後部帯状回における AD 患者 (150–240 分) 及び YHCs (0–330 分) の time-activity curves (SUVR 単位) を示す。被験者 AD01 及び被験者 AD03 において YHCs に比較し高い SUVR 値が確認された。被験者 AD02 に関しては、他の AD 患者に比較してやや低い SUVR 値を示したが、すべての時間点において YHCs と比較した後部帯状回での集積増加が確認された。撮像時間中の SUVR の変化は AD 患者及び YHCs とともに小さかった。

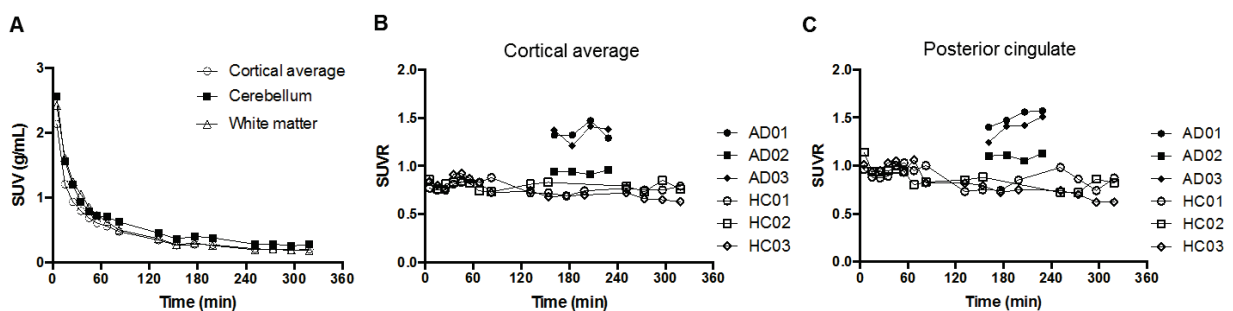


Fig. 13 Time-activity curves for [¹²³I]ABC577. (A) Regional time-activity curves (SUV units) for healthy controls. (B and C) Individual cortical-to-cerebellar SUVR time-activity curves for cortical average (B) and posterior cingulate (C) of healthy controls (0–330 min) and Alzheimer’s disease patients (150–240 min).

代謝物解析の結果 (回収率: 平均 90%以上), [¹²³I]ABC577 は投与後速やかに代謝されることが示され、投与 60 分後の未変化体の割合は約 10%であった (Fig. 14)。

AD 患者の血液サンプルは投与 180 分以降のみでしか採取していないため、投与後早期での情報は不明であるが、AD 患者と YHCs の間で代謝物の割合に大きな違いは確認されなかった。すべての被験者サンプルで、親化合物よりも極性が高い単一の放射性代謝物が確認された。

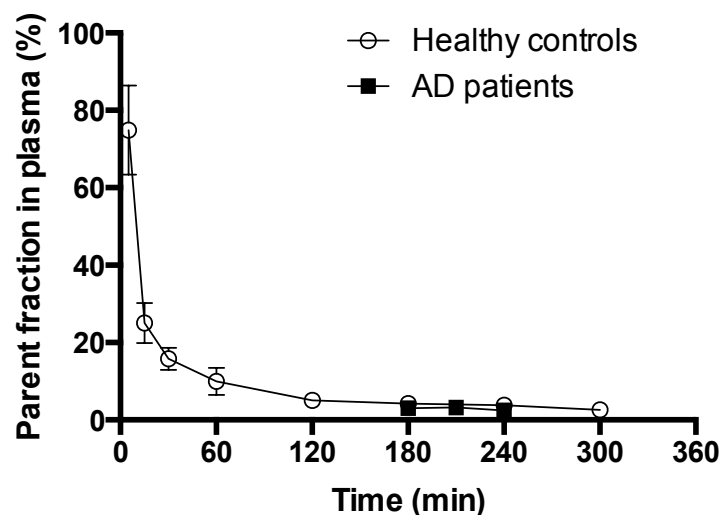


Fig. 14 [^{123}I]ABC577 parent fraction in plasma over time in healthy controls and Alzheimer's disease patients.

YHCs (120–210 分) 及び AD 患者 (150–240 分) における [^{123}I]ABC577 の 90 分積算 SPECT 画像を Fig. 15 に示す。SPECT 画像は、小脳への取込み量で標準化し (SUVR 単位) , すべて同じカラースケール 0.4–2.8 で表示した。AD 患者では、 $\text{A}\beta$ の蓄積領域として報告されている領域 (前頭葉, 頭頂葉, 側頭葉, 前帯状回及び後帯状回) に [^{123}I]ABC577 の集積が確認された。被験者 AD01 及び被験者 AD03 では、後部帯状回, 楔前部, 側頭葉及び頭頂葉において高い集積が認められた。被験者 AD02 に関しては、他の AD 患者に比較してやや低い集積が後部帯状回, 楔前部及び頭頂葉で観察された。一方, YHCs では、上述の $\text{A}\beta$ の蓄積が予測される領域への [^{123}I]ABC577 の集積は確認されず、脳全体への均一で低い非特異的な集積のみが認められた。SPECT 画像上で、白質への非特異的な集積は AD 患者及び YHCs 共にほとんど確認されなかった。

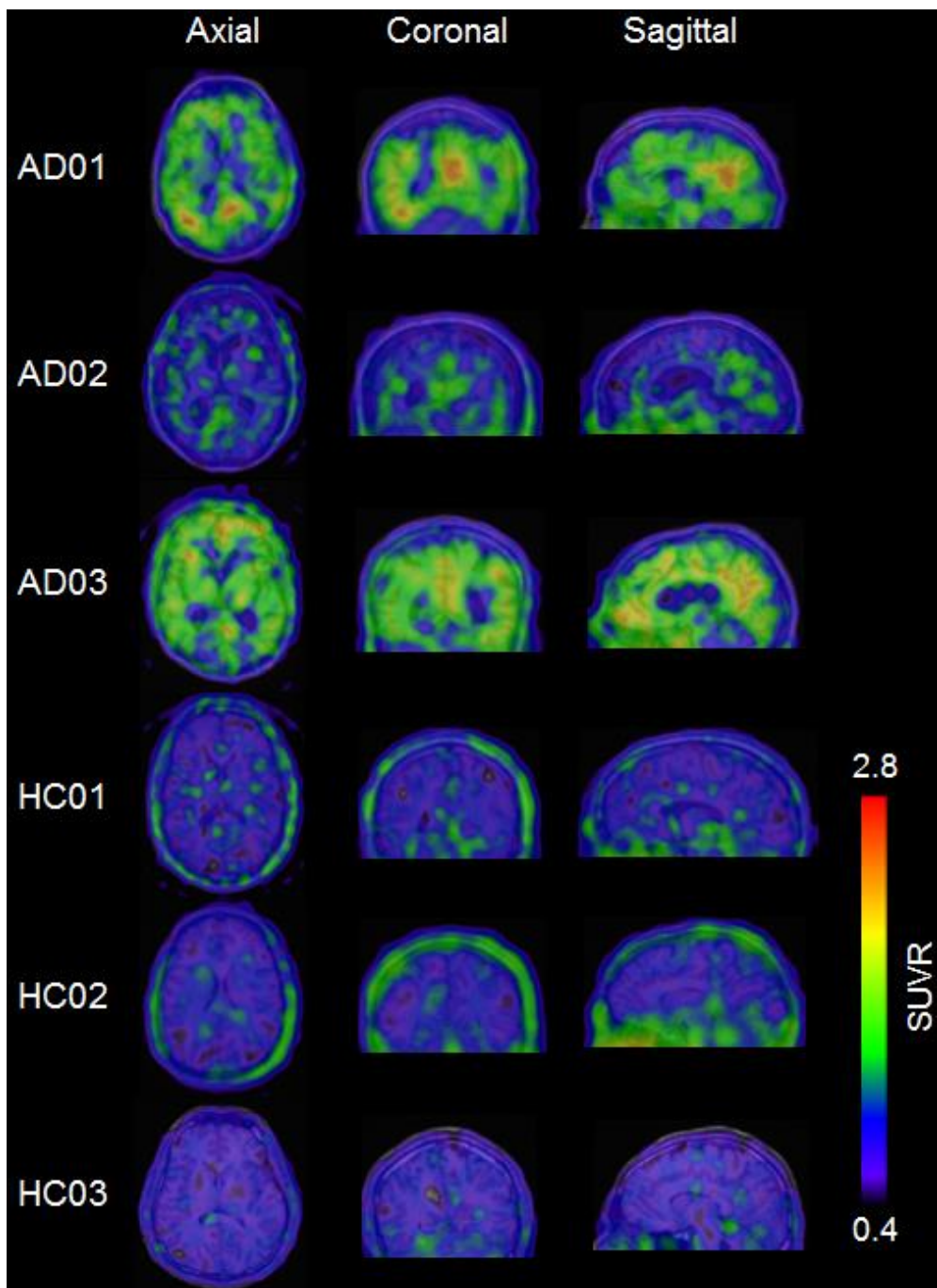


Fig. 15 [^{123}I]ABC577 SPECT images over 90 min of acquisition in three healthy controls and three Alzheimer's disease patients. SPECT images are overlaid on individual coregistered MR images.

核医学専門医による盲検下での SPECT 画像読影の結果, すべての AD 患者と YHCs が正確に鑑別された. また, 異なる撮像時間 (22.5, 45 及び 90 分間) の SPECT 画像を解析した結果, 撮像時間の違いによる画像の質に対する影響は大きくなかった (Fig. 16). したがって, [^{123}I]ABC577 (185 MBq) を投与 150 分後から撮像した場合, 22.5

分から 45 分間の撮像時間で、脳内取込みを評価するのに十分な画像を得られる可能性が示された。

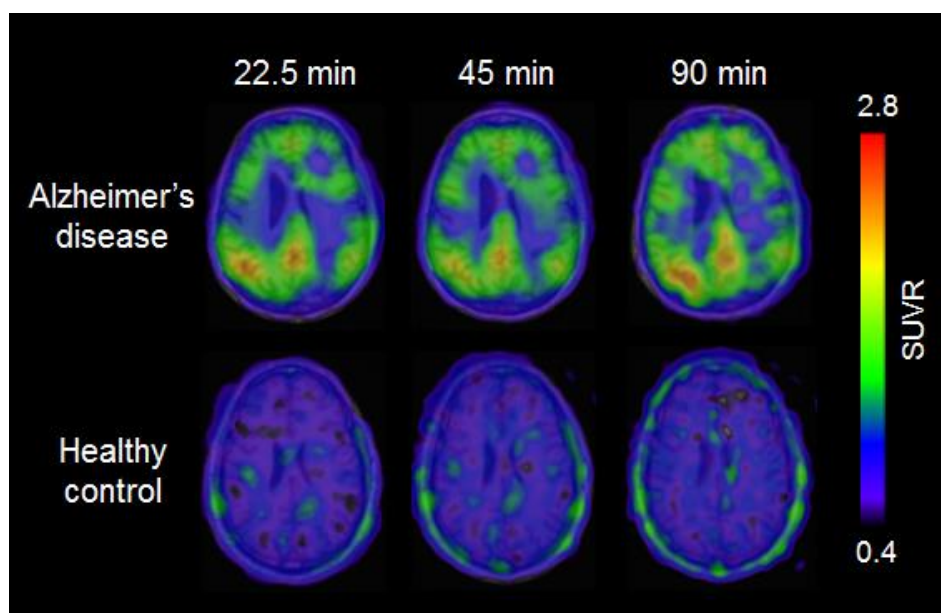


Fig. 16 Comparison of axial SPECT images of different scan lengths (22.5, 45, and 90 min) at constant scan start time (150 min for Alzheimer's disease and 120 min for healthy control) for one representative Alzheimer's disease patient (AD01) and one healthy control (HC01). SPECT images are overlaid on individual coregistered MR images.

$[^{123}\text{I}]\text{ABC577}$ の 90 分間の平均の SUVR 値を Table 6 に示す。皮質領域において、AD 患者の SUVR は YHCs と比較して 20–70%高い値を示した。AD と YHCs で最も差があった領域は後部帯状回であり（平均値±標準偏差， 1.40 ± 0.22 versus 0.84 ± 0.04 ），最も差が低かったのは後頭葉であった（平均値±標準偏差， 1.01 ± 0.11 versus 0.83 ± 0.10 ）。皮質領域の平均の SUVR は，AD 患者で 1.26 ± 0.25 ，YHCs で 0.80 ± 0.04 であり，これは AD 患者の皮質平均のシグナルが，YHCs に比較し約 58%強いことを示す。 $[^{18}\text{F}]\text{Florbetapir}$ の皮質での SUVR 値は，AD 患者及び YHCs（55 歳以下）で，それぞれ 1.42 ± 0.24 及び 1.00 ± 0.05 であることが過去に報告されており(35)，これは AD 患者の皮質平均のシグナルが，YHCs に比較し約 42%強いことに相当する。試験の対象被験者や画像解像度及び評価方法等が異なるため，直接今回の試験と過去に報告されている試験のデータを比較することは困難であるが，これらの結果は， $[^{123}\text{I}]\text{ABC577}$

が, 既存の PET プローブと同程度の AD と YHCs 間での集積比を示す画像を提供できる可能性を示すものである.

Table 6 Regional SUVR values of [¹²³I]ABC577 and [¹⁸F]Florbetapir

Region	[¹²³ I]ABC577		[¹⁸ F]Florbetapir
	Healthy controls (n = 3)	Alzheimer's disease (n = 3)	Alzheimer's disease (n = 3)
Frontal cortex	0.74 ± 0.03	1.22 ± 0.32	1.29 ± 0.13
Parietal cortex	0.77 ± 0.03	1.23 ± 0.26	1.37 ± 0.21
Temporal cortex	0.85 ± 0.07	1.39 ± 0.32	1.32 ± 0.15
Occipital cortex	0.83 ± 0.10	1.01 ± 0.11	1.12 ± 0.25
Anterior cingulate	0.78 ± 0.05	1.28 ± 0.30	1.28 ± 0.05
Posterior cingulate	0.84 ± 0.04	1.40 ± 0.22	1.48 ± 0.11
Subcortical white matter	0.80 ± 0.01	0.98 ± 0.09	1.62 ± 0.16
Cortical average	0.80 ± 0.04	1.26 ± 0.25	1.31 ± 0.10

Data are expressed as mean ± SD

[¹⁸F]Florbetapir PET の平均の SUVR 値及び 15 分間の積算画像 (投与後 50–65 分) を Table 6 及び Fig 17 に示す. また, [¹⁸F]Florbetapir PET 画像と同じ断面の [¹²³I]ABC577 SPECT 画像も併せて Fig. 17 に示す. [¹⁸F]Florbetapir の集積は既存の報告の通り, Aβ の蓄積が予測される皮質領域に確認された. [¹²³I]ABC577 及び [¹⁸F]Florbetapir の取込みはいずれも後部帯状回及び側頭葉で高く, 後頭葉で低かった. 両プローブの脳内集積パターンは比較的類似しており, また過去の論文で報告されている [¹⁸F]Florbetapir 以外の臨床で使用されている PET プローブの集積領域とも一致するものであった(19, 37, 38). *In vitro* での結合実験の結果も踏まえ, これらの結果は [¹²³I]ABC577 が AD 患者脳内で Aβ に特異的に結合していることを示唆するものである.

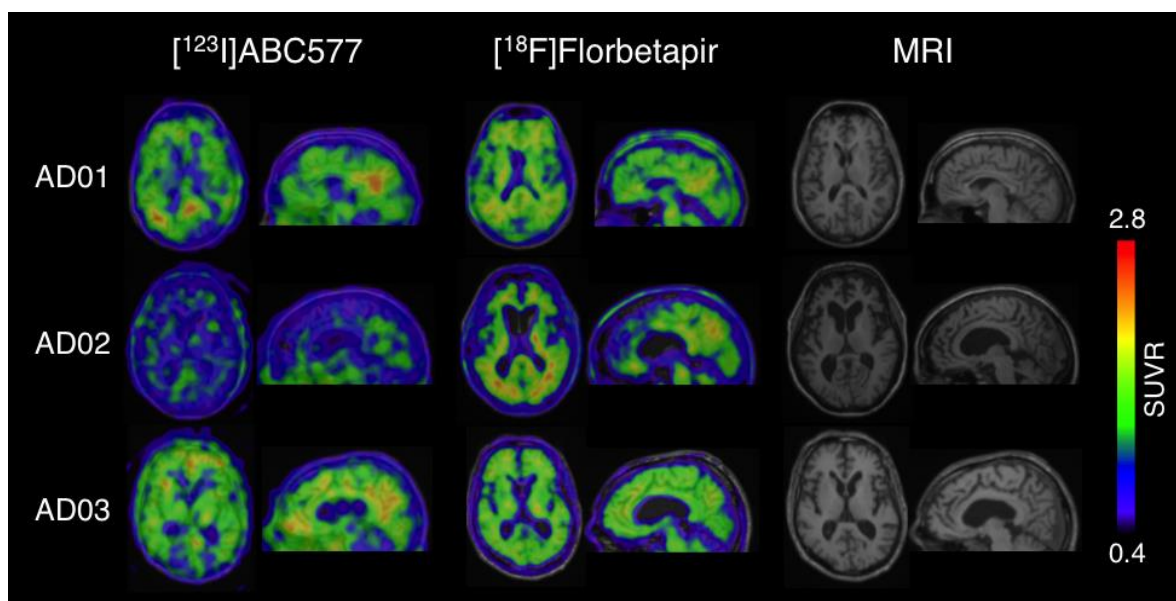


Fig. 17 [^{123}I]ABC577 SPECT images from 150–240 min post-injection (left) and [^{18}F]Florbetapir PET images from 50–65 min post injection (middle) in the Alzheimer’s disease patients. Co-registered magnetic resonance images are shown on the right.

白質への非特異的集積は、 ^{123}I]ABC577の方が ^{18}F]Florbetapirよりも低く、SUVRはそれぞれ 0.98 ± 0.09 及び 1.62 ± 0.16 であった。現在臨床で用いられているPET用 $\text{A}\beta$ イメージングプローブの一つの問題として、白質への非特異的な集積が高く、特異的集積の読影を困難にしていることが挙げられる(39)。YHCsにおける ^{123}I]ABC577 SPECT像では、灰白質と白質への集積に大きな違いは認められず、またAD患者では、白質領域に比較して顕著に高い灰白質領域への ^{123}I]ABC577の集積が確認された。一方、同一のAD患者において、灰白質領域への集積と同程度又はより高い白質への ^{18}F]Florbetapirの非特異的集積が観察された(Fig. 17 and Table 6)。これらの結果から、 ^{123}I]ABC577は臨床において既存のPETプローブよりも非特異的結合が低い画像を提供できる可能性が示された。 ^{123}I]ABC577の非特異的集積が低い要因として、非臨床データで示された非特異的結合が低い化合物の性質に加え、 ^{123}I]ABC577は生体内投与後に速やかに極性が高い化合物に代謝されるため、それ以降、放射性物質が脳内に取り込まれないことが考えられた。非特異的集積の低い画像は、より容易で信頼度が高い臨床評価を可能にすると考えられる。

当該試験は first-in-human 臨床試験であり、 ^{123}I]ABC577の $\text{A}\beta$ イメージングプローブ

ブとしての性能を予備的に評価するためにデザインした。したがって、症例数は各群3名と少なく、統計的解析による評価や撮像条件及び定量法の最適化検討は実施していない。さらに、対照群での脳内 A β 蓄積の可能性を排除するため、実際の臨床使用で対象となることが予想される age-matched の高齢者ではなく、YHCs を登録した。今後、age-matched 高齢者を含んだ大規模な臨床試験で、当該試験で得られた結果を検証し、また撮像・解析方法の最適化を進めていく必要がある。

2.2.4 小括

新規 SPECT 用 A β イメージングプローブとして、イミダゾピリジン誘導体 [^{123}I]ABC577 をデザイン・合成した。AD 患者脳ホモジネートを用いた飽和結合実験において、[^{123}I]ABC577 は A β への高い結合親和性 (K_d 値 1.83 nM) を示し、また *in vitro* ARG では A β に対する選択的結合性を示した。さらに、正常ラットを用いた体内放射能分布実験において、[^{123}I]ABC577 は良好な脳内挙動を示し、オーロン誘導体で問題となった血中滞留性は認められなかった。First-in-human 臨床試験では、[^{123}I]ABC577 の安全性と高い忍容性が確認された。[^{123}I]ABC577 の脳内集積パターンは、AD 患者と YHCs で異なり、視覚判定及び半定量的解析 (SUV_R 評価) のいずれにおいても両群を鑑別することができた。また、[^{123}I]ABC577 が、既存の PET プローブに比較し白質への非特異的集積が低いという特徴を有することが明らかになった。

以上の結果から、[^{123}I]ABC577 の SPECT 用 A β イメージングプローブとしての有用性が示された。

3. 結語

新規のSPECT用A β イメージングプローブとして、A β への高い結合親和性と良好な脳内挙動を示すオーロン誘導体及び ^{123}I ABC577を見出した。特に ^{123}I ABC577は、臨床試験において高い忍容性と、AD患者とYHCsの正確な鑑別能を示し、また既存のPETプローブに比較して白質への非特異的集積が低い特徴が確認された。大規模臨床試験による更なる検証は必要であるが、これらの結果は ^{123}I ABC577が脳内A β の検出に有用なSPECT用イメージングプローブとして認知症患者のAD画像診断に資することを強く示唆する。

4. 謝辞

本研究の終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 荒野 泰 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

同時に、本研究において懇切なる御指導と御教示を戴きました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 中山 守雄 教授、京都大学大学院薬学研究科 小野 正博 准教授、崇城大学大学院薬学研究科 原武 衛 教授に心から感謝の意を表します。

学位論文審査において貴重な御指導と御教示を戴きました千葉大学大学院薬学研究院 村山 俊彦 教授、千葉大学大学院薬学研究院 石橋 正己 教授、千葉大学大学院薬学研究院 小椋 康光 教授、千葉大学大学院薬学研究院 秋田 英万 教授に御礼申し上げます。

本研究全般にわたり、多くの有益な御助言を戴きました千葉大学大学院薬学研究院 上原 知也 准教授、大坂市立大学大学院医学研究科 森 啓 特任教授、京都大学大学院薬学研究科 佐治 英郎 教授、大阪大学大学院医学系研究科 白神 宜史 特任准教授（元 日本メジフィジックス株式会社 創薬研究所 所長）、日本メジフィジックス株式会社 吉村 弘一 修士、日本メジフィジックス株式会社 玉上 浩 修士、日本メジフィジックス株式会社 谷藤 樹之 修士、日本メジフィジックス株式会社 田中 昭広 修士にそれぞれ謹んで御礼申し上げます。さらに、実験を進めるに当たり御助言と御協力を戴きました日本メジフィジックス株式会社 奥村 侑紀 修士、大西 崇子 修士、正山 祥生 博士、小林 良平 修士、岩崎 禎 修士、富沢 幸枝 研究員、白井 千尋 研究員、討論に参加して戴きました千葉大学大学院薬学研究院分子画像薬品学研究室の方々に深く感謝いたします。

5. 参考文献

1. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2011;7:263-269.
2. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* 2013;9:63-75 e62.
3. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82:239-259.
4. Aisen PS, Petersen RC, Donohue MC, et al. Clinical Core of the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: progress and plans. *Alzheimers Dement.* 2010;6:239-246.
5. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2012;367:795-804.
6. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, et al. Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 2013;12:357-367.
7. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992;256:184-185.
8. Roberson ED, Mucke L. 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science.* 2006;314:781-784.
9. Sperling RA, Laviolette PS, O'Keefe K, et al. Amyloid deposition is associated with impaired default network function in older persons without dementia. *Neuron.* 2009;63:178-188.
10. Huijbers W, Mormino EC, Schultz AP, et al. Amyloid-beta deposition in mild cognitive impairment is associated with increased hippocampal activity, atrophy and clinical progression. *Brain.* 2015.
11. Reiman EM, Langbaum JB, Fleisher AS, et al. Alzheimer's Prevention Initiative: a plan to accelerate the evaluation of presymptomatic treatments. *J Alzheimers Dis.* 2011;26 Suppl 3:321-329.
12. Sperling R, Mormino E, Johnson K. The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials. *Neuron.* 2014;84:608-622.
13. Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, et al. Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med.* 2014;275:251-283.
14. Mathis CA, Mason NS, Lopresti BJ, Klunk WE. Development of positron emission tomography beta-amyloid plaque imaging agents. *Semin Nucl Med.* 2012;42:423-432.
15. Choi SR, Golding G, Zhuang Z, et al. Preclinical properties of ¹⁸F-AV-45: a PET agent for Aβ plaques in the brain. *J Nucl Med.* 2009;50:1887-1894.
16. Clark CM, Schneider JA, Bedell BJ, et al. Use of florbetapir-PET for imaging

beta-amyloid pathology. *JAMA*. 2011;305:275-283.

17. Nelissen N, Van Laere K, Thurfjell L, et al. Phase 1 study of the Pittsburgh compound B derivative ¹⁸F-flutemetamol in healthy volunteers and patients with probable Alzheimer disease. *J Nucl Med*. 2009;50:1251-1259.

18. Vandenberghe R, Van Laere K, Ivanoiu A, et al. ¹⁸F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial. *Ann Neurol*. 2010;68:319-329.

19. Rowe CC, Ackerman U, Browne W, et al. Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with ¹⁸F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol*. 2008;7:129-135.

20. Barthel H, Gertz HJ, Dresel S, et al. Cerebral amyloid-beta PET with florbetaben (¹⁸F) in patients with Alzheimer's disease and healthy controls: a multicentre phase 2 diagnostic study. *Lancet Neurol*. 2011;10:424-435.

21. Newberg AB, Wintering NA, Plossl K, et al. Safety, biodistribution, and dosimetry of ¹²³I-IMPY: a novel amyloid plaque-imaging agent for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Nucl Med*. 2006;47:748-754.

22. Kung MP, Weng CC, Lin KJ, Hsiao IT, Yen TC, Wey SP. Amyloid plaque imaging from IMPY/SPECT to AV-45/PET. *Chang Gung Med J*. 2012;35:211-218.

23. Kung HF, Kung MP, Zhuang ZP, et al. Iodinated tracers for imaging amyloid plaques in the brain. *Mol Imaging Biol*. 2003;5:418-426.

24. Qu W, Kung MP, Hou C, Benedum TE, Kung HF. Novel styrylpyridines as probes for SPECT imaging of amyloid plaques. *J Med Chem*. 2007;50:2157-2165.

25. Ono M, Cheng Y, Kimura H, et al. Development of novel ¹²³I-labeled pyridyl benzofuran derivatives for SPECT imaging of beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2013;8:e74104.

26. Chen CJ, Bando K, Ashino H, et al. In Vivo SPECT Imaging of Amyloid-beta Deposition with Radioiodinated Imidazo[1,2-a]Pyridine Derivative DRM106 in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Nucl Med*. 2015;56:120-126.

27. Ono M, Yoshida N, Ishibashi K, et al. Radioiodinated flavones for in vivo imaging of beta-amyloid plaques in the brain. *J Med Chem*. 2005;48:7253-7260.

28. Ono M, Haratake M, Mori H, Nakayama M. Novel chalcones as probes for in vivo imaging of beta-amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorg Med Chem*. 2007;15:6802-6809.

29. Zhang W, Oya S, Kung MP, Hou C, Maier DL, Kung HF. F-18 Polyethyleneglycol stilbenes as PET imaging agents targeting Abeta aggregates in the brain. *Nucl Med Biol*. 2005;32:799-809.

30. Stephenson KA, Chandra R, Zhuang ZP, et al. Fluoro-pegylated (FPEG) imaging agents targeting Abeta aggregates. *Bioconjug Chem*. 2007;18:238-246.

31. Gormemis AE, Ha TS, Im I, et al. Benzofuroindole analogues as potent BK(Ca) channel openers. *Chembiochem*. 2005;6:1745-1748.

32. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 1973;22:3099-3108.
33. Kung MP, Hou C, Zhuang ZP, et al. IMPY: an improved thioflavin-T derivative for in vivo labeling of beta-amyloid plaques. *Brain Res.* 2002;956:202-210.
34. Mintun MA, Larossa GN, Sheline YI, et al. [¹¹C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology.* 2006;67:446-452.
35. Joshi AD, Pontecorvo MJ, Clark CM, et al. Performance characteristics of amyloid PET with florbetapir F 18 in patients with alzheimer's disease and cognitively normal subjects. *J Nucl Med.* 2012;53:378-384.
36. Mathis CA, Wang Y, Holt DP, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE. Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem.* 2003;46:2740-2754.
37. Rowe CC, Ng S, Ackermann U, et al. Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology.* 2007;68:1718-1725.
38. Nyberg S, Jonhagen ME, Cselenyi Z, et al. Detection of amyloid in Alzheimer's disease with positron emission tomography using [¹¹C]AZD2184. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2009;36:1859-1863.
39. Rowe CC, Villemagne VL. Brain amyloid imaging. *J Nucl Med Technol.* 2013;41:11-18.

6. 主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による.

1. Maya Y, Okumura Y, Kobayashi R, Onishi T, Shoyama Y, Barret O et al. Preclinical properties and human in vivo assessment of ^{123}I -ABC577 as a novel SPECT agent for imaging amyloid-beta. *Brain* 2016;139:193-203.
2. Maya Y, Ono M, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Novel radioiodinated auronones as probes for SPECT imaging of beta-amyloid plaques in the brain. *Bioconjugate chemistry* 2009;20:95-101.
3. Ono M, Maya Y, Haratake M, Ito K, Mori H, Nakayama M. Auronones serve as probes of beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 2007;361:116-21.

7. 主査名及び副査名

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた.

主査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	薬学博士	荒野 泰
副査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	薬学博士	村山俊彦
副査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	理学博士	石橋正己
副査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	薬学博士	小椋康光
副査	千葉大学大学院教授 (薬学研究院)	薬学博士	秋田英万