

(論文内容の要旨)

アルツハイマー病(AD)は、記憶・学習・認知機能の障害を主な症状とする進行性の神経変性疾患である。AD 患者脳では、アミロイド前駆体タンパク(APP)が β -セクレターゼ(BACE)により切断されることでアミロイド β ペプチド(A β)が生成し、その蓄積によってアセチルコリン(ACh)神経をはじめとする中枢神経細胞が障害を受け、高次脳機能障害が発現するという A β 仮説が提唱されている。したがって、BACE やアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の分布、濃度や活性、あるいは蓄積している A β の分布や密度変化を把握することは、AD の病期診断、治療薬開発における薬効評価などに有効と考えられる。一方、核医学イメージングは、放射性化合物を体内に投与し、その化合物が生体内で相互作用する分子の分布や密度の変化を、非侵襲的に三次元的、定量的に画像として把握する分子イメージング法である。従来、臨床診断や医薬品開発において、特定の疾患で特異的に変化する分子はバイオマーカーとして利用されているが、これらは主に血中や尿中での濃度変化、すなわち全身性の情報であるため、体内局所における生体分子の変化を測定する方法の開発が強く望まれている。そこで、標的となる分子を画像バイオマーカーとして、その変化を核医学イメージングにより局所的に把握することが注目されている。このような背景のもと、本研究では、AD の臨床診断、治療薬開発、さらに AD の発現に関与する分子の相互的な繋がりを明らかにして病態解明にも有用な情報を得るために、脳局所における BACE、A β 、AChE をそれぞれ AD の画像バイオマーカーとして用いることを考え、それらの核医学イメージングに有効な分子プローブとなる放射性化合物の開発を計画した。

第 1 章 脳内 BACE の分子イメージングのための放射性分子プローブの開発

BACEによるAPPの切断はAD病理の最上流に位置する過程である。したがって、BACEはADの超早期の診断、病態把握の画像バイオマーカーとして有効であると考え、BACEのイメージプローブとして、BACE 阻害薬として報告されている naphthalene-1-carboxylic acid (3'-chloro-4'-fluoro-4-piperazin-1-yl-biphenyl-3-yl)-amide (NCFB) の C-11 メチル標識体 ($[^{11}\text{C}]\text{Me-NCFB}$) を合成し、その有効性を検討した。その結果、マウス体内動態において、 $[^{11}\text{C}]\text{Me-NCFB}$ は速やかな血液クリアランスと脳滞留性を示したものの、FRET アッセイにより BACE への親和性が低いことを認めた。そこで、さらに高い BACE 親和性を有する化合物として、BACE の基質である APP の構造に着目し、設計した I-123 標識 hydroxyethylamine dipeptide isoster 誘導体(HEA)の開発を試みた。すなわち、計算化学的手法により高い親和性が期待された *N*-[(1*S*,2*R*)-1-benzyl-3-(cyclopropylamino)-2-hydroxypropyl]-*N'*-[(1*R*)-1-(4-iodophenyl)ethyl]-5-[methyl(methylsulfonyl)amino]isophthalamide (I-HEA) を候補化合物に選択、合成した。FRET アッセイにより、I-HEA は Me-NCFB に比べて約 40 倍高い BACE 阻害活性を認めた。そこで、I-125 標識体 ($[^{125}\text{I}]\text{I-HEA}$) をアルキルスズ-放射性ヨウ素交換反応を用いて合成した。 $[^{125}\text{I}]\text{I-HEA}$ を BACE トランスフェクト細胞の培地に添加した結果、細胞への放射能集積は正常細胞と比較して有意に高値を示した。さらに、 $[^{125}\text{I}]\text{I-HEA}$ をラットに静脈内投与し、脳切片からオートラジオグラム(ARG)を得たところ、脳実質への放射能集積を認めた。この集積は BACE 阻害剤の同時投与により低下したことから、本化合物の脳内 BACE への結合性が示唆された。以上より、 $[^{125}\text{I}]\text{I-HEA}$ の BACE を標的とした分子イメージングのための放射性分子プローブとしての可能性が示された。

第2章 脳内 Aβイメージングのための放射性分子プローブの開発

Aβの蓄積はADに疾患特異性が高く、また神経細胞の障害に直接的に関与している。したがって、ADを発症早期の時点で鋭敏に検出する画像バイオマーカーとしてAβの蓄積状態をイメージングすることが有効であると考え、そのための放射性分子プローブの開発を計画した。そこで、リード化合物としてAβ染色試薬であるthioflavin Tと等価な電子構造を有する2-(4-methylaminophenyl)benzofuranを選択した。さらにAβに結合していない分子を速やかに脳から消失させ、画像診断上のS/N比を向上させるため、ヘテロ縮合環の置換基修飾による脂溶性の調節を検討し、benzofuran骨格の5位に水酸基を置換した化合物、^[11C]5-hydroxy-2-(4-methylaminophenyl)benzofuran (^[11C]HMBZF)を設計、合成した。

HMBZFのAβへの結合特性を検討するため、AD患者剖検脳を用いたアッセイにおいて、Aβ結合剤^[125I]IMPYを放射性リガンドとしてKi値を測定したところ、HMBZFはIMPYより高いAβへの親和性を有することが示された。^[11C]HMBZFはアミン前駆体に^[11C]CH₃OTfを反応させることにより得た。^[11C]HMBZFを正常マウスに静脈内投与し、その体内動態を検討した結果、本化合物は投与後高く脳へ移行し、また脳から速やかに洗い出されることを認めた。さらに、脳内代謝物の分析から、本化合物は脳内で安定に存在することが示された。そこで、ヒトAPPを過剰発現させたトランスジェニックマウスに^[11C]HMBZFを投与し、脳の*ex vivo* ARGを行ったところ、Aβ染色試薬のthioflavine Sによる染色部位と一致した部位に放射能集積を認め、*in vivo*で^[11C]HMBZFがAβに結合していることが示された。以上の結果から、^[11C]HMBZFが脳内Aβを標的とした分子イメージングのための放射性分子プローブとして有効な性質を有することが示された。

第3章 脳内 ACh 神経機能の分子イメージングのための放射性分子プローブの開発

ACh 神経系は高次脳機能に深く関与し、AD では AChE の活性が低下することが報告されている。そこで、AChE の分子イメージングのための放射性分子プローブの開発を計画し、AChE への高い親和性を有し、AD 治療薬として用いられている galanthamine (GAT) に着目して、C-11 標識体 (^[11C]GAT) を合成、その分子プローブとしての可能性を評価した。

^[11C]GAT は、(-)-norgalanthamine (Nor-GAT) を標識前駆体として新たに合成し、これを^[11C]CH₃OTf と反応させることにより得た。^[11C]GAT をマウスに静脈内投与し、体内の放射能分布を経時的に測定したところ、^[11C]GAT は速やかな脳移行性と脳滞留性を示すとともに、AChE の高発現が報告されている線条体に高い放射能集積を認めた。また、AChE 阻害薬の donepezil 前投与により、線条体の放射能集積量は有意に低下し、^[11C]GAT は *in vivo* で脳内の AChE に結合していることが示された。さらに、ラットを用いた PET 撮像において脳のイメージが得られた。以上の結果より、^[11C]GAT は脳内 ACh 神経機能の分子イメージングのための放射性分子プローブとなり得る可能性が示された。

以上、本研究は、AD の分子イメージングのための放射性分子プローブの開発に関して基礎的な成果を収めたものであり、今後の AD の診断、治療薬開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

アルツハイマー病(AD)患者脳では、アミロイド前駆体タンパク(APP)が β -セクレターゼ(BACE)により切断されることでアミロイド β ペプチド($A\beta$)が生成し、その蓄積によってアセチルコリン(ACh)神経をはじめとする中枢神経細胞が障害を受け、高次脳機能障害が発現すると言われている。したがって、BACE やアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の分布、濃度や活性、あるいは蓄積している $A\beta$ の分布や密度変化を把握することは、AD の病期診断、治療薬開発における薬効評価などに有効と考えられる。特に、体内局所における、それらの生体分子の変化を測定する方法の開発が強く望まれ、それを非侵襲的に可能とする核医学イメージング法のこの分野への応用が注目されている。このような背景のもと、本論文は、脳局所における BACE、 $A\beta$ 、AChE をそれぞれ AD の画像バイオマーカーとして用いるために、それらの核医学イメージングに有効な分子プローブとなる放射性化合物(放射性プローブ)の開発を計画したものである。

著者は、まず、ADの超早期の診断、病態把握の画像バイオマーカーとして有効であると考えられる脳内BACEの分子イメージング用放射性分子プローブの開発を計画し、BACE阻害薬として報告されている naphthalene-1-carboxylic acid (3'-chloro-4'-fluoro-4'-piperazin-1-yl-biphenyl-3-yl)-amide(NCFB)の C-11 メチル標識体($[^{11}\text{C}]\text{Me-NCFB}$)、BACEの基質であるAPPの構造に着目、設計した I-123 標識 hydroxyethylamine dipeptide isoster 誘導体(I-HEA)を候補化合物に選択、合成した。*in vitro* アッセイにより、I-HEA は Me-NCFB に比べてかなり高い BACE 阻害活性を認めた。さらに、 $[^{125}\text{I}]\text{I-HEA}$ を BACE トランスフェクト細胞への取込みを検討した結果、正常細胞と比較して有意に高い取込み値を示した。さらに、 $[^{125}\text{I}]\text{I-HEA}$ をラットに静脈内投与後の脳切片のオートラジオグラム(ARG)から脳実質への放射能集積を認めた。この集積は BACE 阻害剤の同時投与により低下したことから、本化合物の脳内 BACE への結合性が示唆された。以上より、 $[^{125}\text{I}]\text{I-HEA}$ の BACE を標的とした分子イメージングのための放射性分子プローブとしての可能性が示された。

次に、著者は、ADを発症早期の時点で鋭敏に検出する画像バイオマーカーとして期待される脳内 $A\beta$ イメージングのための放射性分子プローブの開発を計画し、リード化合物として $A\beta$ 染色試薬であるthioflavin Tと等価な電子構造を有する2-(4-methylaminophenyl)benzofuranを選択し、正常な脳細胞からの速やかな消失のために、ヘテロ縮合環の置換基修飾による脂溶性の調節を検討し、benzofuran骨格の5位に水酸基を置換した化合物、 $[^{11}\text{C}]\text{5-hydroxy-2-(4-methylaminophenyl)benzofuran}$ ($[^{11}\text{C}]\text{HMBZF}$)を設計、合成した。そして、その $A\beta$ への結合特性を検討した結果、HMZBFは高い $A\beta$ への親和性を有することが示された。さらに $[^{11}\text{C}]\text{HMBZF}$ を合成し、その正常マウスでの体内動態を検討した結果、本化合物は投与後高く脳へ移行し、また脳から速やかに洗い出されることを認めた。また、ヒトAPPを過剰発現させたトランスジェニックマウスでの本化合物の脳*ex vivo* ARGを行ったところ、 $A\beta$ 染色試薬のthioflavine Sによる染色部位と一致した部位に放射能集積を認め、*in vivo*で

$[^{11}\text{C}]\text{HMBZF}$ が $A\beta$ に結合していることが示された。以上の結果から、 $[^{11}\text{C}]\text{HMBZF}$ が脳内 $A\beta$ を標的とした分子イメージングのための放射性分子プローブとして有効な性質を有することが示された。

また、著者は、脳内 ACh 神経機能の分子イメージングのための放射性分子プローブの開発を

計画し、AChE への高い親和性を有する galanthamine(GAT)の C-11 標識体 (^{11}C]GAT)を合成、それをマウスに静脈内投与し、体内動態を調べたところ、本化合物は速やかな脳移行性と脳滞留性を示すとともに、AChE の高発現が報告されている線条体に高い放射能集積を認め、その集積は AChE 阻害薬の前投与により有意に低下し、 ^{11}C]GAT は *in vivo* でも脳内の AChE に結合していることが示された。さらに、ラットを用いた PET 撮像において脳のイメージが得られた。以上の結果より、 ^{11}C]GAT は脳内 ACh 神経機能の分子イメージングのための放射性分子プローブとなり得る可能性が示された。

以上、本研究は、AD の分子イメージングのための放射性分子プローブの開発に関して基礎的な成果を収めたものであり、その成果は、今後の AD の診断、治療薬開発に有益な情報を提供するものと評価される。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成21年2月26日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。