

京都大学	博士 (薬学)	氏名	渡 邊 裕 之
論文題目	アルツハイマー病の早期診断および治療薬開発に資する分子イメージングプローブの開発に関する研究		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>近年、急速な高齢化に伴い、アルツハイマー病(AD)患者の増加が大きな社会問題となっており、その診断および治療法の開発が強く望まれている。</p> <p>ADにおいて、特徴的病理学的変化の一つとして、脳内における<math>\text{A}\beta</math>-アミロイドタンパク質(<math>\text{A}\beta</math>)を主成分とする老人斑の沈着がある。この老人斑の沈着はADの症状が起こるよりもかなり以前から始まることから、現在、<math>\text{A}\beta</math>はADの早期診断法および治療薬の開発における重要な標的分子となっている。この<math>\text{A}\beta</math>を標的にしたADの早期診断には、脳内に蓄積した<math>\text{A}\beta</math>を高感度かつ高精度に体外から検出することのできる、<math>\text{A}\beta</math>に結合する放射性化合物をイメージングプローブとして用いる核医学分子イメージング法、特に汎用性に優れるシングルフォトン断層撮像法(SPECT)の利用が期待されている。一方、<math>\text{A}\beta</math>を標的とする治療薬の開発の基礎段階においては、組織切片や動物を対象として、多数の候補化合物を簡便にスクリーニングできる手法が有効であることから、組織切片や動物での実験において簡便に用いることのできる<math>\text{A}\beta</math>結合性蛍光プローブをバイオマーカーとする光イメージング法の利用が有効である。しかし、これまでに<math>\text{A}\beta</math>を標的としたSPECTイメージングおよび光イメージングに適した分子プローブは開発されていない。そこで、本研究では、これら2つのイメージング法に対応したプローブの開発を計画した。</p> <p>第1章 脳内<math>\beta</math>-アミロイドの核医学分子イメージングプローブの開発</p> <p>SPECT用脳内<math>\text{A}\beta</math>イメージングプローブに求められる条件として、1)老人斑へ選択的に結合すること、2)血液脳関門を通過すること、3)SPECT用放射性核種の導入が可能であることがあげられる。そこで、老人斑アミロイド蛍光染色試薬であるチオフラビンTをリード化合物として選択し、脳移行性、SPECTイメージングに適した放射性ヨウ素-123の効率良い導入を考慮したピリジルベンゾオキサゾール(PBOX)誘導体を設計・合成した。合成したPBOX誘導体は、<i>in vitro</i>競合阻害実験において<math>\text{A}\beta</math>(1-42)凝集体に対して結合親和性を示した。また、これらの化合物は、正常マウスを用いた体内放射能分布実験において投与早期での高い脳移行性とその後の速やかなクリアランス、AD患者脳切片を用いた<i>in vitro</i>オートラジオグラフィ(ARG)において老人斑に対する選択的結合性を示した。さらに、これらのPBOX誘導体の中で最も老人斑を明瞭に描出した5-(5-iodo-2-benzoxazolyl)-<i>N,N</i>-dimethyl-2-pyridinamine (PBOX-3) について、アミロイド斑を過剰産生するトランスジェニック(<i>Tg2576</i>)マウスを用いたSPECT撮像</p>			

および*ex vivo* ARGを行った結果、SPECT撮像では、*Tg2576*マウスの脳において、野生型マウスに比べ高い放射能集積を認め、また、*Tg2576*マウス脳切片での*ex vivo* ARGにおいて、チオフラビンSの蛍光染色部位と一致した放射能集積を認めた。これらの結果より、PBOX-3がSPECT用A $\beta$ イメージングプローブとして有用であることが示された。

## 第2章 脳内 $\beta$ -アミロイドの近赤外蛍光分子イメージングプローブの開発

生体蛍光イメージングにおいては、生体透過性が高い近赤外領域(650-900 nm)に蛍光波長を持つA $\beta$ イメージングプローブの開発を計画した。そのために、低分子量、電氣的に中性かつ分子修飾が容易であるボロンジピロメテン(BODIPY)を蛍光母核として選択し、A $\beta$ 凝集体への結合に有効性が期待される置換基を導入した数種のBODIPY誘導体(BAPs)を設計・合成した。合成したBAPsは、*in vitro*結合実験においてA $\beta$ (1-42)凝集体に対して結合親和性を示し、また、*Tg2576*マウスを用いた*in vitro*蛍光染色においてマウス脳切片上のアミロイド斑を明瞭に描出した。そこで、上記の実験で最も良好な結果を示した4,4-difluoro-3- $\{(E)\text{-}\{2\text{-}(5\text{-dimethylaminothienyl)ethenyl}\}\text{-}1\text{-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BAP-2)}$ に関して、*Tg2576*マウスおよび野生型マウスを用いた*ex vivo*実験および*in vivo*撮像を行った結果、*ex vivo*実験では、マウス脳内に蓄積したアミロイド斑にBAP-2由来の複数の蛍光像が観察されたが、*in vivo*撮像においては*Tg2576*マウスと野生型マウスの蛍光集積に有意な差は認められなかった。そこで、BODIPYの特性に起因する頭皮への非特異的集積がその一因として考え、BODIPYの置換部位をBODIPYと同様に強い電子吸引基であるジシアノ基に変換した数種の化合物を設計・合成した。各化合物は、BAPsと同等のA $\beta$ イメージングプローブとして有効な基礎的性質を示したが、特に、2- $\{(2E,4E)\text{-}5\text{-}(5\text{-}(dimethylamino)thiophen-2-yl)pent-2,4\text{-dienylidene}\}malononitrile$  (DTM-2)は、*Tg2576*マウスにおける*in vivo*撮像の結果、野生型マウスに比べて高い蛍光集積を示し、さらに、摘出後の*Tg2576*マウス脳切片でアミロイド斑に結合したDTM-2由来の蛍光像が観察された。以上の結果より、DTM-2が脳内A $\beta$ の光イメージング法に有効な近赤外蛍光A $\beta$ イメージングプローブであることを見出した。

以上、本研究は脳内のA $\beta$ の核医学および蛍光による生体イメージングに有効な分子プローブの開発に成果を収めたものであり、これらの知見は、ADの早期診断および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)

近年、急増するアルツハイマー病(AD)の診断、治療法の開発が切望されていることから、本論文では、ADの症状が出る以前から起こる $\alpha$ -アミロイドタンパク質(A $\beta$ )凝集体、老人斑の脳内沈着に着目し、A $\beta$ を標的にした、ADの早期診断のための核医学分子イメージングプローブおよびAD治療薬開発のための化合物スクリーニング用バイオマーカーとしての光イメージング分子プローブの開発を計画したものである。

著者は、まず、脳内A $\beta$ の核医学イメージングプローブの開発を目指して、A $\beta$ の蛍光染色試薬であるチオフラビンTをリード化合物として選択し、脳移行性、核医学イメージングに適した放射性核種<sup>123</sup>Iの効率良い導入を考慮したピリジルベンゾオキサゾール(PBOX)誘導体を設計・合成した。合成したPBOX誘導体はA $\beta$ (1-42)凝集体に対する結合親和性、正常マウスを用いた体内放射能分布実験、AD患者脳切片を用いた*in vitro*オートラジオグラフィにおいてA $\beta$ の核医学イメージングプローブとして良好な性質を示した。さらに、これらの中で最も有効な性質を示した5-(5-iodo-2-benzoxazolyl)-N,N-dimethyl-2-pyridinamine (PBOX-3) について、アミロイド斑を過剰産生するトランスジェニック(Tg2576)マウスでのSPECT撮像を行った結果、野生型マウスに比べて脳への高い放射能集積を認め、また*ex vivo* ARGを行った結果、脳切片でチオフラビンSの蛍光染色部位と一致した放射能集積を認めた。これらの結果より、PBOX-3がSPECT用A $\beta$ イメージングプローブとして有効であることを見出した。

また、生体蛍光イメージングにおいては、近赤外領域に蛍光波長を持つ光イメージングプローブの開発を目指して、ボロンジピロメテン(BODIPY)を蛍光母核として選択、これに置換基を導入した数種のBODIPY誘導体(BAPs)を設計・合成した。これらのBAPsはA $\beta$ (1-42)凝集体に対する結合親和性、Tg2576マウスを用いた*in vitro*蛍光染色で良好な性質を示した。しかし、Tg2576マウスを用いた*ex vivo*実験および*in vivo*撮像実験では、頭皮への高い非特異的集積が観察された。そこで、BODIPYの置換部位を強い電子吸引基であるジシアノ基に変換した数種の化合物を設計・合成し、検討した結果、特に、2-((2E,4E)-5-(5-(dimethylamino)thiophen-2-yl)penta-2,4-dienylidene)malononitrile (DTM-2) が、Tg2576マウスでの*in vivo*撮像、摘出後の脳切片での実験で良好な結果を示した。以上の結果より、DTM-2が脳内A $\beta$ の光イメージング法に有効な近赤外蛍光A $\beta$ イメージングプローブとなり得ることを見出した。

以上、本研究は脳内のA $\beta$ の核医学および蛍光による生体イメージングに有効な分子プローブの開発に成果を収めたものであり、これらの知見は、ADの早期診断および治療薬開発に有益な情報を提供するものを与えるものと評価される。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。さらに、平成25年2月28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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降