

アミロイドーシスの早期診断を目的とした
核医学分子イメージングプローブの開発に関する研究

2016

吉村 優志

目 次

緒言	1	
第 1 章	アルツハイマー病の早期診断を目的とした脳内 β アミロイド標的 核医学分子イメージングプローブの開発	3
1.1.	実験方法	5
1.2.	結果および考察	18
1.3.	小括	29
第 2 章	2 型糖尿病の早期診断を目的とした膵臓内アミリン標的 核医学分子イメージングプローブの開発	30
第 1 節	単光子放出断層撮像用アミリンイメージングプローブとしての ピリジルベンゾフラン誘導体の開発	32
第 1 項	アミリン結合性化合物の探索	32
2.1.1.	実験方法	33
2.1.2.	結果および考察	35
2.1.3.	小括	39
第 2 項	単光子放出断層撮像用アミリンイメージングプローブの開発を 目的とした ^{99m}Tc 標識ピリジルベンゾフラン誘導体の開発	40
2.1.4.	実験方法	41
2.1.5.	結果および考察	47
2.1.6.	小括	55

第2節	ポジトロン断層撮像用アミリンイメージングプローブとしての フェノキシメチルピリジン誘導体の開発	56
	2.2.1. 実験方法	57
	2.2.2. 結果および考察	66
	2.2.3. 小括	74
結語		75
引用文献		77
謝辞		80

緒 言

タンパク質がミスフォールディングし、互いに重合することで形成される不溶性の線維状タンパク質は「アミロイド」と定義され、このようなアミロイドが様々な臓器の細胞外に沈着することで機能障害が惹起される疾患は「アミロイドーシス」と総称される¹。さらに、アミロイドーシスは、複数の臓器にアミロイドが沈着する全身性アミロイドーシスと特定の臓器にのみアミロイド沈着が生じる限局性アミロイドーシスの2種類に大別される¹。限局性アミロイドーシスに分類される疾患としては、アルツハイマー病(AD)や2型糖尿病(T2DM)などが該当し¹、これらの疾患はアミロイドーシスの中でも特に罹患患者数の多い疾患であり、アミロイドーシスの克服のためにはADおよびT2DMの対策がきわめて重要である。このいずれの疾患においても、臨床症状が現れた段階では根本的治療が困難な状態になっていることが示されつつあり^{2,3}、その早期診断法の確立が社会的急務となっている。

ADにおいて脳内で β アミロイド(A β)を主な構成成分とする老人斑が沈着すること、T2DMにおいて膵臓内でアミリンを主な構成成分とする膵島アミロイドが沈着することがそれぞれの疾患の特徴的な病理学的変化のひとつとして知られている¹。いずれも臨床症状が現れるよりも早期の段階から蓄積が生じることが報告されているため^{4,5}、A β およびアミリンの検出はADおよびT2DMの早期診断に有効であると考えられる。A β およびアミリンの検出には、以下に記す特性を有する核医学分子イメージング法が有効であると考えた。核医学分子イメージング法は、single photon emission computed tomography (SPECT)あるいはpositron emission tomography (PET)により体内に投与された核医学分子イメージングプローブと標的分子との生体内相互作用を非侵襲的かつ高感度に捉えることのできる画像診断法である。本研究では、ADおよびT2DMの核医学分子イメージング法による早期診断法の確立を目的として、A β およびアミリンを標的とした核医学分子イメージングプローブの開発を計画した。

A β およびアミリンを標的とした核医学分子イメージングプローブに求められる条件として、①標的分子(A β あるいはアミリン)に選択的に結合すること、②標的臓器(脳あるいは膵臓)に高い移行性を示すこと、③非結合分子が速やかに標的臓器から消失すること、が挙げられる。そこで、標的分子への結合性、生体内における挙動に着目して実験系を構築し、イメージングプローブとしての有用性に関して評価した。

ADの早期診断法の確立を目的として、これまでにA β を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発が活発に行われてきた⁶⁻¹¹。中でも、¹⁸F標識薬剤として、[¹⁸F]Florbetapir⁹、[¹⁸F]Florbetaben¹⁰、[¹⁸F]Flutemetamol¹¹の3剤がPET用A β イメージングプローブとして欧米で承認されており、ADの病態解明を目的として使用されつつある。しかし、これらの薬剤は、いずれも脳白質への非特異的な集積が高く、感度が悪いことが問題とされており、より高性能なプローブの開発が求められている¹²。

これまでの数多くのA β イメージングプローブの開発研究の結果から、脳白質への非特異的な集積はプローブの化学構造が一因であると考えられたため、既存A β イメージングプローブとは異なる母核を有する化合物の開発が有効であると考えた。そこで、A β への結合性が報告されている新規骨格であるフェニルキノキサリン(PQ)¹³を母核に選択して¹⁸F標識PET用A β イメージングプローブの開発を計画した。

置換基および標識部位の異なる6種類のPQ誘導体を設計・合成し、A β イメージングプローブとして

の有用性に関して Florbetapir と比較して評価した。A β 凝集体を用いた結合親和性評価において、4-(6-(2-fluoroethoxy)quinoxalin-2-yl)-N,N-dimethylaniline (PQ-6)が最も高い結合親和性を示し、Florbetapir と比べても 10 倍以上高い結合性を示した。AD 患者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG において、 ^{18}F PQ-6 は老人斑をきわめて明瞭に描出し、さらに、 ^{18}F Florbetapir よりも数多くの老人斑に結合性を示した。また、 ^{18}F PQ-6 の脳白質への非特異的結合は ^{18}F Florbetapir と比較してきわめて軽微だった。正常マウスを用いた体内放射能分布実験の結果、全ての ^{18}F 標識 PQ 誘導体は投与早期における高い脳移行性とその後速やかな脳からの消失を示した。良好な結合性と脳内挙動を示した ^{18}F PQ-6 についてアミロイド前駆タンパク質過剰産生遺伝子改変マウスを用いた *ex vivo* ARG を行った結果、 ^{18}F PQ-6 はマウス脳内のアミロイド斑への結合性を示した。以上の結果から、フェニルキノキサリンを母核とする ^{18}F PQ-6 は、既存の A β イメージングプローブで問題とされている脳白質への非特異的集積の低い、良好な性能を有する ^{18}F 標識 PET 用 A β イメージングプローブとして機能しうることが示された。

T2DM 膵臓内アミリンを標的とした核医学分子イメージングプローブに関しては、これまで報告が全くなかったため、まず、アミリン結合性化合物の探索を実施した。その結果、ピリジルベンゾフラン(PBF)を母核とした ^{125}I IPBF がアミリン凝集体に対して高い結合親和性を示し、T2DM 患者膵臓組織切片中の膵島アミロイドを明瞭に描出することを明らかにした。このことから、PBF を母核としたアミリンイメージングプローブの開発が可能であることを見出し、この知見をもとに、臨床汎用性の高い $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を標識核種とした PBF 誘導体を設計・合成し、SPECT 用アミリンイメージングプローブとしての有用性に関する評価を行った。その結果、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [TPBF-1 がアミリン凝集体への結合性を示し、さらに、T2DM 患者膵臓組織切片中の膵島アミロイドを明瞭に描出した。膵島アミロイド移植モデルマウスを作製し、*ex vivo* ARG を行った結果、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [TPBF-1 は膵臓内に移植したアミリン凝集体への結合性を示した。しかし、正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [TPBF-1 は投与後早期に大部分が肝臓に移行し、膵臓への移行量は低値を示した。以上の結果から、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [TPBF-1 は体内動態の改善が必要であるが、SPECT 用アミリンイメージングプローブとして有効であることが示された。

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ [TPBF-1 の体内動態の改善を目的として、6 種類の ^{18}F 標識フェノキシメチルピリジン(PMP)誘導体を設計・合成し、PET 用アミリンイメージングプローブとしての有用性に関する評価を行った。合成した全ての PMP 誘導体において、T2DM 患者膵臓組織切片中の膵島アミロイドへの結合性を認めた。また、正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、いずれの化合物も PBF 誘導体に比べて肝臓への集積を低減させることに成功した。さらに、検討した 6 種類の PMP 誘導体の中で最も良好な性質を示した 1-(4-((6-(dimethylamino)pyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)-4- ^{18}F fluorobutane-2,3-diol (^{18}F FPMP-5)について、ヒトアミリン発現遺伝子改変マウスを用いた *ex vivo* ARG を行った結果、膵臓中のアミリン凝集体への結合性を認めた。以上の結果より、 ^{18}F FPMP-5 は PET 用アミリン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。

以上、本研究は AD 脳内 A β および T2DM 膵臓内アミリンを標的とした核医学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、AD および T2DM 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。

第1章

アルツハイマー病の早期診断を目的とした 脳内 β アミロイド標的核医学分子イメージングプローブの開発

背景

アルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD)は、多くの場合初老期以降に発症し、進行性に認知機能の低下をきたす神経変性疾患である。ADは認知症の最大の原因疾患であり、その60~80%を占めるといわれている。認知症の罹患者数は、2015年時点において全世界で4,680万人、2050年には1億3,500万人に増加するものと推計されており、世界的な高齢化に伴い、AD有病者数は今後40年間で3倍になることが推定されており^{14,15}、ADへの対策の社会的重要性が高まっている。

1997年のアメリカでのdonepezilの発売を皮切りに、複数の抗コリン薬やNMDA阻害薬が開発・発売され、これらの薬剤が症候改善薬として現在のAD治療の基盤となっている。その一方で、ADの発症および進展そのものを阻止する根本治療薬の実用化が切望されており、世界中で数多くの候補薬の治験が実施されてきたが、2016年現在、第III相試験で有用性を示したものは報告されておらず、AD治療薬の開発は難航している状況にある¹⁶。この原因として多くの問題が指摘されているが、近年特に注目されているのが治療開始時期に関する問題である。近年のAD病態研究の成果から、臨床的に認知機能が顕在化する段階では、AD治療薬の効果は期待できない状態まで症状が悪化している可能性が高いと考えられるようになってきており、治療薬開発における治験対象はより早期の介入へとシフトしつつある²。このような状況の下で、ADの克服のためにはADを可能な限り早期の段階で検出し、治療介入することの必要性がますます高まっている。現在ADの診断は問診やMRIなどによる方法が一般的であるが、これらの方法では臨床症状が発現するよりも早期の段階で検出することが不可能であり、現行の診断法に替わる、新たなADの早期診断技術の確立が必要とされている。

AD脳内の病理学的特徴として、 β アミロイド($A\beta$)凝集体を主な構成成分とする老人斑が蓄積することが知られている¹⁷。老人斑は、アミロイド前駆タンパク質(APP)から、 β セクレターゼ、および、 γ セクレターゼによって順次切り出された $A\beta_{1-40}$ や $A\beta_{1-42}$ が互いに凝集し、線維化することで形成される異常構造物である⁵。老人斑の沈着は、AD発症過程の最も初期の段階から始まっていると考えられているため⁴、 $A\beta$ はADの早期診断法の開発において重要な標的分子とされている。現在までに $A\beta$ を高感度かつ非侵襲的に体外から検出することのできるpositron emission tomography (PET)やsingle photon emission computed tomography (SPECT)を用いる核医学分子イメージングプローブの開発が活発に行われてきた⁶⁻¹¹。中でも、¹⁸F標識薬剤として、^{[18F]Florbetapir}⁹、^{[18F]Florbetaben}¹⁰、^{[18F]Flutemetamol}¹¹の3剤がPET用 $A\beta$ イメージングプローブとして欧米で承認されている(Figure 1-1)。しかし、これらの薬剤は、いずれも脳白質への非特異的な集積が高く、感度が悪いことが問題とされている¹²。そこで、本研究では脳白質への非特異的集積の改善を目的として、新規¹⁸F標識 $A\beta$ イメージングプローブの開発を計画した。

これまでの数多くの $A\beta$ イメージングプローブの開発研究の結果から、脳白質への非特異的集積はプロ

ープの化学構造が一因であると考えられた。現在までに開発されている A β イメージングプローブのほとんどは, アミロイド組織染色試薬として用いられている蛍光色素の Thioflavin-T (ThT), および, Congo-Red の化学構造(Figure 1-2)を模した化合物である。そのため, 脳白質への集積を改善するには, 既存の A β イメージングプローブとは異なる母核を有する化合物の開発が有効であると考えた。すなわち, 既存化合物とは異なる母核を有する放射性ヨウ素標識フェニルキノキサリン誘導体が A β へ高い結合親和性を示し, SPECT 用 A β イメージングプローブとしての基礎的性質を示したことに着目し¹³, フェニルキノキサリン(PQ)を母核として選択し, 新規 ¹⁸F 標識 PET 用 A β イメージングプローブの開発を計画した。導入したアミノ基の種類およびフルオロエトキシ基の位置による結合親和性や体内動態への影響を検討するために, 異なる6種類の ¹⁸F 標識 PQ 誘導体([¹⁸F]PQ-1~6) (Figure 1-3)を設計・合成し, A β イメージングプローブとしての評価を行った。

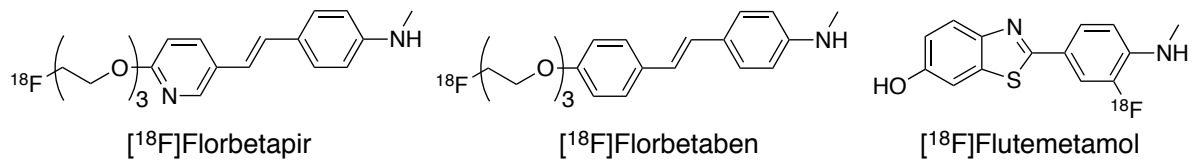


Figure 1-1. Chemical structure of [¹⁸F]Florbetapir, [¹⁸F]Florbetaben, and [¹⁸F]Flutemetamol as clinically available A β imaging probes.

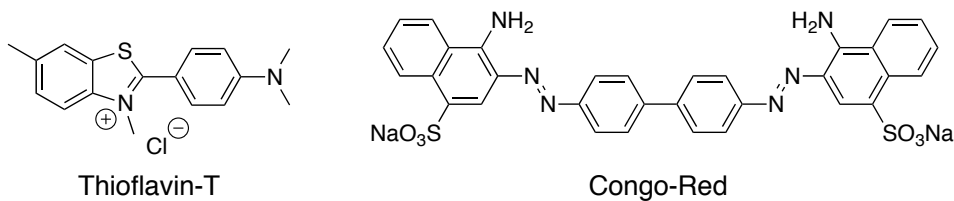


Figure 1-2. Chemical structure of Thioflavin-T and Congo-Red.

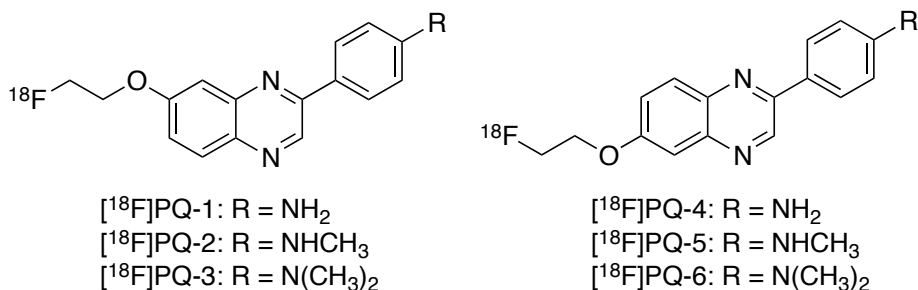


Figure 1-3. Chemical structure of ¹⁸F-labeled PQ derivatives.

1.1. 実験方法

試薬・機器

試薬は、ナカライテスク株式会社、東京化成工業株式会社、和光純薬株式会社、Sigma Aldrich 社、Ark Pharm 社から購入した。中圧分取液体クロマトグラフィー装置には、山善株式会社製自動設定中圧分取液体クロマトグラフシステム(EPCLC-W-Prep 2XY; 送液ポンプ(ミキサー内蔵): No. 580D, 検出器(波長固定型): prep UV-254W, フラクシオンコレクター: FR-260)を使用し、HI-FLASH COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 µm, カラムサイズ: L あるいは 2L) および INJECT COLUMN (充填材: シリカゲル SiOH, ポアサイズ: 60 Å, 粒子径: 40 µm, カラムサイズ: M あるいは L) を装着した。¹H-NMR には、日本電子株式会社製 JNM-AL400 あるいは JNM-ECS400 を用い、tetramethylsilane を内部標準物質として測定した。大気圧化学イオン化質量分析(APCI-MS) およびエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS) には、株式会社島津製作所製高速クロマトグラフ質量分析計 LCMS-2010 EV を用いて測定した。電子イオン化質量分析(EI-MS) には、日本電子株式会社製 GCMate II を用いて測定した。Aβペプチド(Human, 1-42) [TFA form] は、株式会社ペプチド研究所より購入した。¹²⁵I]NaI は、MP Biomedicals およびパーキンエルマー・ジャパン株式会社より購入した。¹⁸F は京都大学医学部附属病院設置の住友重機械工業社製超小型サイクロトロン CYPRIS HM-18 および太陽日酸製 [¹⁸O]H₂O を用いて製造した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC) には、株式会社島津製作所製 LC-20AD あるいは LC-20AT を使用し、検出器として紫外スペクトル検出器 SPD-20A と日立アロカメディカル株式会社製シンチレーションサーベイメーター TCS-172 あるいはユニバーサル技研株式会社製 HPLC 用放射線検出器 US-3000T を使用した。逆相 HPLC 用カラムには、ナカライテスク株式会社製 COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 4.6 mm I.D.×150 mm を使用した。放射能の測定には、パーキンエルマー社製 Wallac WIZARD 1470 あるいは Wallac WIZARD 1480, および ALOKA 社製キュリーメーター(IGC-7)を用いて測定した。イメージングプレートは、富士フイルム株式会社製 BAS-SR2025 を使用した。イメージングプレートの読み込みには富士フイルム株式会社製バイオイメージングアナライザー BAS-5000 を使用し、解析には富士フイルム株式会社製 MultiGauge を使用した。マイクロトームには、Leica Microsystems 社製クライオスタット CM1900 を使用した。蛍光染色像および免疫染色像は、株式会社キーエンス製 BZ-9000 を用いて観察した。AD 患者剖検脳組織切片は、京都大学大学院医学研究科および国立循環器病研究センター病院より提供されたものを使用した。健常者剖検脳組織切片は、BioChain 社より購入したものをを使用した。

PQ 誘導体の合成

4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-nitroaniline (**1**).

4-Amino-3-nitrophenol (2.82 g, 18.3 mmol) のテトラヒドロフラン (THF) (50 mL) 溶液に *tert*-butyldimethylchlorosilane (3.6 g, 24 mmol), imidazole (2.00 g, 29.0 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、ジエチルエーテル(100 mL×3)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **1** を収量 4.81 g (98.1%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ

7.56 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 5.79 (s, 2H), 0.98 (s, 9H), 0.19 (s, 6H).

4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)benzene-1,2-diamine (2).

化合物 **1** (9.57 g, 35.7 mmol) のメタノール(80 mL)およびジクロロメタン(40 mL)の混合溶液に, 10% Pd/C (3.00 g) を加えて, 水素雰囲気下, 室温で7時間激しく攪拌した. 反応液をセライト濾過した後, 濾液を減圧留去した. 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 2/1) で精製して目的物 **2** を収量 7.28 g (85.6%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 6.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.18 (dd, $J = 8.0, 2.4$ Hz, 1H), 3.19 (s, 4H), 0.96 (s, 9H), 0.15 (s, 6H).

7-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-(4-nitrophenyl)quinoxaline (3).

化合物 **2** (952.6 mg, 4 mmol) および 2-bromo-4'-nitroacetophenone (976.2 mg, 4 mmol) をジメチルスルホキシド(DMSO) (20 mL) に溶解し, 室温で2時間攪拌した. 反応液に超純水を加えた後, 酢酸エチル(200 mL \times 2) で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸マグネシウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **3** を収量 567.1 mg (37.2%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.22 (s, 1H), 8.43-8.36 (m, 4H), 8.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 9.2, 2.4$ Hz, 1H), 1.05 (s, 9H), 0.33 (s, 6H). MS (APCI) m/z 382 [MH^+].

3-(4-Nitrophenyl)quinoxalin-6-ol (4).

化合物 **3** (398.8 mg, 1.05 mmol) の THF 溶液(15 mL) にフッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム(TBAF) (1 M THF 溶液, 1.26 mL) を 0°C で加えた. 反応液を室温で2時間攪拌した後, 反応液に超純水を加え, 酢酸エチル(60 mL \times 2) で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸マグネシウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **4** を収量 150.1 mg (53.7%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.7 (s, 1H), 9.44 (s, 1H), 8.57 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.41 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.00 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.46 (dd, $J = 9.2, 2.4$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H).

4-(7-(2-Fluoroethoxy)quinoxalin-2-yl)aniline (5: PQ-1).

化合物 **4** (151.4 mg, 0.576 mmol) のジメチルホルムアミド(DMF)溶液(10 mL) に炭酸カリウム(159.2 mg, 1.152 mmol) を加えた. 反応液を 105°C で30分間攪拌した後, 2-fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (300 μL) を加え, 105°C でさらに4.5時間攪拌した. 反応液に超純水を加えた後, 酢酸エチル(60 mL \times 2) で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸マグネシウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をメタノール(40 mL)およびジクロロメタン(30 mL)の混合溶媒に溶解し, 10% Pd/C (100 mg) を加えた. 水素雰囲気下, 室温で0.7時間激しく攪拌した後, 反応液をセライト濾過し, 濾液を減圧留去した. 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **5** を収量 90.4 mg (55.4%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.12 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J = 9.2$ Hz,

1H), 7.40-7.37 (m, 2H), 6.83 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.93-4.79 (m, 2H), 4.44-4.35 (m, 2H). HRMS (EI) m/z calcd for $C_{16}H_{14}FN_3O$ (M^+) 283.1121, found 283.1117.

4-(7-(2-Fluoroethoxy)quinoxalin-2-yl)-*N*-methylaniline (6: PQ-2).

化合物 **5** (90.4 mg, 0.319 mmol) およびパラホルムアルデヒド (51.7 mg, 1.72 mmol) のメタノール懸濁液 (35 mL) を 0°C に冷却して、ナトリウムメトキシド (5 M メタノール溶液, 256 μL , 1.28 mmol) をゆっくり加えた。反応液を 1.5 時間加熱還流した後、室温に戻して水素化ホウ素ナトリウム (60.5 mg, 1.60 mmol) を少しずつ加えた。反応液をさらに 3 時間加熱還流した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、メタノールを減圧留去して除いた。得られた残渣に酢酸エチル (60 mL \times 2) を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **6** を収量 19.4 mg (20.5%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.13 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.95 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.38-7.35 (m, 2H), 6.74 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.93-4.79 (m, 2H), 4.44-4.35 (m, 2H), 2.94 (s, 3H). HRMS (EI) m/z calcd for $C_{17}H_{16}FN_3O$ (M^+) 297.1277, found 297.1272.

2,2-Dibromo-1-(4-(dimethylamino)phenyl)ethanone (7).

1-(4-(Dimethylamino)phenyl)ethanone (3.50 g, 21.5 mmol) を濃硫酸 (20 mL) に溶解し、 0°C で 30 分間攪拌した。 0°C で臭素 (1.12 mL, 21.8 mmol) を滴下し、室温で 12 時間攪拌した後、氷水に注ぎ込んだ。析出した固体を濾取し、氷冷した水で洗浄して目的物 **7** を収量 4.89 g (71.5%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.98 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.69-6.66 (m, 3H), 3.10 (s, 6H).

2-Bromo-1-(4-(dimethylamino)phenyl)ethanone (8).

化合物 **7** (6.84 g, 21.5 mmol) の THF 懸濁液 (40 mL) に亜リン酸ジエチル (3 mL) とトリエチルアミン (3.2 mL) の THF 溶液 (25 mL) を 0°C において滴下した後、室温で 11 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、氷水に注ぎ込んだ後、30 分間攪拌した。析出した固体を濾取し、氷冷した水で洗浄して目的物 **8** を収量 3.38 g (65.5%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.08 (s, 6H).

4-(7-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)quinoxalin-2-yl)-*N,N*-dimethylaniline (9).

化合物 **2** (476.3 mg, 2 mmol) および化合物 **8** (482.0 mg, 2 mmol) を DMSO (10 mL) に溶解し、室温で 4 時間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、酢酸エチル (100 mL \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **9** を収量 161.8 mg (21.3%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.12 (s, 1H), 8.10 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.91 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.23 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.07 (s, 6H), 1.04 (s, 9H), 0.30 (s, 6H). MS (APCI) m/z 380 [MH^+].

3-(4-(Dimethylamino)phenyl)quinoxalin-6-ol (10).

化合物 **9** (161.8 mg, 0.427 mmol) の THF 溶液(10 mL)に 0°C で TBAF (1 M THF 溶液, 512 μ L) を加えた。反応液を室温に戻し、そのまま 30 分間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、酢酸エチル(60 mL \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **10** を収量 56.0 mg (49.5%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.22 (s, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.02 (s, 6H). MS (APCI) *m/z* 266 [MH⁺].

4-(7-(2-Fluoroethoxy)quinoxalin-2-yl)-*N,N*-dimethylaniline (11: PQ-3).

化合物 **10** (56.0 mg, 0.211 mmol) の DMF 溶液(10 mL) 炭酸カリウム(58.4 mg, 0.422 mmol)を加えた。反応液を 105°C で 30 分間攪拌した後、2-fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (50 μ L)を加え、105°C でさらに 1.5 時間攪拌した。反応液に 2-fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (30 μ L)を加え、105°C でさらに 3 時間攪拌した。反応液に 2-fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (40 μ L)を加え、105°C でさらに 0.5 時間攪拌した。反応液に室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/2) で精製して目的物 **11** を収量 33.4 mg (50.8%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.14 (s, 1H), 8.11 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.37-7.34 (m, 2H), 6.84 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.93-4.79 (m, 2H), 4.44-4.35 (m, 2H), 3.07 (s, 6H). HRMS (EI) *m/z* calcd for C₁₈H₁₈FN₃O (M⁺) 311.1434, found 311.1439.

7-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)-2-(4-nitrophenyl)quinoxaline (12).

化合物 **4** (150.1 mg, 0.562 mmol) の DMF 溶液(15 mL) 炭酸カリウム(155.3 mg, 1.12 mmol)を加えた。反応液を 80°C で 1 時間攪拌した後、(2-bromoethoxy)-*tert*-butyldimethylsilane (250 μ L)を加え、80°C でさらに 終夜攪拌した。反応液に室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **12** を収量 203.8 mg (85.3%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.22 (s, 1H), 8.43-8.36 (m, 4H), 8.04 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.50-7.46 (m, 2H), 4.26 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 0.93 (s, 9H), 0.14 (s, 6H). MS (APCI) *m/z* 426 [MH⁺].

4-(7-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)quinoxalin-2-yl)aniline (13).

化合物 **12** (107.5 mg, 0.253 mmol) のメタノール(10 mL)およびジクロロメタン(5 mL)の混合溶液に 10% Pd/C (100 mg)を加えて、水素雰囲気下、室温で 0.5 時間激しく攪拌した。反応液をセライト濾過した後、濾液を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 40/1) で精製して目的物 **13** を収量 90.5 mg (90.6%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.09 (s, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.8 Hz,

2H), 7.93 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.22 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 4.07 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H). MS (APCI) m/z 396 [MH⁺].

7-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)-2-(*p*-di(*tert*-butoxycarbonyl)aminophenyl)quinoxaline (14).

化合物 **13** (90.5 mg, 0.229 mmol), di-*tert*-butyl dicarbonate (499.8 mg, 2.29 mmol), 4-dimethylaminopyridine (DMAP) (触媒量)およびトリエチルアミン(38.2 μ L)の混合物を 1.5 時間加熱還流した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL \times 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **14** を収量 64.5 mg (47.3%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.18 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.99 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.44-7.41 (m, 2H), 7.33 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.24 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.08 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 1.44 (s, 18H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H). MS (APCI) m/z 596 [MH⁺].

7-(2-Hydroxyethoxy)-2-(*p*-di(*tert*-butoxycarbonyl)aminophenyl)quinoxaline (15).

化合物 **14** (64.5 mg, 0.108 mmol)の THF 溶液(5 mL)に 0°C で TBAF (1 M THF 溶液, 130 μ L) を加えた。反応液を室温に戻し、そのまま終夜攪拌した。反応液に超純水を加えた後、酢酸エチル(60 mL \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 20/1)で精製して目的物 **15** を収量 54.0 mg で定量的に得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.19 (s, 1H), 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.02 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 7.46-7.43 (m, 2H), 7.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.30 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.09 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 1.44 (s, 18H). MS (APCI) m/z 482 [MH⁺].

2-((3-(4-((Di-*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)quinoxalin-6-yl)oxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (16).

化合物 **15** (54.0 mg, 0.112 mmol)のピリジン溶液(7 mL)を 0°C に冷却し塩化パラトルエンスルホニル (107.0 mg, 0.561 mmol)を加えた。反応液を室温に戻し、DMAP (触媒量)を加えて、そのまま終夜攪拌した。溶媒を減圧留去して除き、超純水を加えた後、得られた残渣に酢酸エチル(60 mL \times 2) を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **16** を収量 36.0 mg (50.6%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.19 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.98 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.35-7.29 (m, 6H), 4.49 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.34 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.44 (s, 18H). MS (APCI) m/z 636 [MH⁺].

4-(7-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)quinoxalin-2-yl)-*N*-methylaniline (17).

化合物 **13** (215.1 mg, 0.544 mmol)およびパラホルムアルデヒド(88.3 mg, 2.94 mmol)のメタノール懸濁液 (40 mL)を 0°C に冷却して、ナトリウムメトキシド(5 M メタノール溶液, 436 μ L, 1.28 mmol)をゆっくり加えた。反応液を 4.5 時間加熱還流した後、室温に戻して水素化ホウ素ナトリウム(102.9 mg, 2.72 mmol)を

少しずつ加えた。反応液をさらに 1 時間加熱還流した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、メタノールを減圧留去して除いた。得られた残渣に酢酸エチル(60 mL×2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製して目的物 **17** を収量 131.6 mg (59.1%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.10 (s, 1H), 8.07 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.22 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.93 (s, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H). MS (APCI) *m/z* 410 [MH⁺].

tert-Butyl (4-(7-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)quinoxalin-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate (**18**).

化合物 **17** (131.6 mg, 0.322 mmol)および di-*tert*-butyl dicarbonate (140.6 mg, 0.644 mmol)の THF 溶液(10 mL)を 2 時間加熱還流した。反応液に di-*tert*-butyl dicarbonate (562.2 mg, 2.58 mmol), DMAP (触媒量)およびトリエチルアミン(54 μL)を加えて、さらに 5 時間加熱還流した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **18** を収量 133.1 mg (81.2%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.15 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.46-7.39 (m, 4H), 4.24 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.08 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 1.49 (s, 9H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H). MS (APCI) *m/z* 510 [MH⁺].

tert-Butyl (4-(7-(2-hydroxyethoxy)quinoxalin-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate (**19**).

化合物 **18** (133.1 mg, 0.261 mmol)の THF 溶液(7 mL)に 0°C で TBAF (1 M THF 溶液, 314 μL)を加えた。反応液を室温に戻し、そのまま 2 時間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 20/1)で精製して目的物 **19** を収量 104.1 mg で定量的に得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.17 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.46-7.40 (m, 4H), 4.78 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 4.0 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 1.49 (s, 9H). MS (APCI) *m/z* 396 [MH⁺].

2-((3-(4-((*tert*-Butoxycarbonyl)(methyl)amino)phenyl)quinoxalin-6-yl)oxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**20**).

化合物 **19** (104.1 mg, 0.263 mmol)にピリジン溶液(10 mL)を 0°C に冷却し塩化パラトルエンスルホン(251.1 mg, 1.32 mmol)を加えた。反応液を室温に戻し、そのまま 1 時間攪拌した。反応液に DMAP (触媒量)を加えて、そのまま終夜攪拌した。溶媒を減圧留去して除き、超純水を加えた後、得られた残渣にクロロホルム(60 mL×2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製して目的物 **20** を収量 92.2 mg (63.9%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.17 (s, 1H), 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.97 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.30 (d, *J*

= 2.8 Hz, 1H), 7.27 (dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz, 1H), 4.49 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.34 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.50 (s, 9H). MS (APCI) m/z 550 [MH^+].

2-((3-(4-(Dimethylamino)phenyl)quinoxalin-6-yl)oxy)ethanol (21).

化合物 **10** (95.6 mg, 0.361 mmol)の DMF 溶液(10 mL)に炭酸カリウム(99.8 mg, 0.722 mmol)を加えた。反応液を 105°C で 0.5 時間攪拌した後、2-bromoethanol (51.2 μ L, 0.722 mmol)を加え、105°C でさらに終夜攪拌した。反応液に室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 4/1) で精製して目的物 **21** を収量 59.3 mg (53.1%)で得た。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.13 (s, 1H), 8.11 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 4.27 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.08 (t, $J = 4.0$ Hz, 2H), 3.07 (s, 6H). MS (APCI) m/z 310 [MH^+].

2-((3-(4-(Dimethylamino)phenyl)quinoxalin-6-yl)oxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (22).

化合物 **21** (58.4 mg, 0.189 mmol)のピリジン溶液(10 mL)を 0°C に冷却し塩化パラトルエンスルホン (108.1 mg, 0.567 mmol)を加えた。反応液を室温に戻し、そのまま終夜攪拌した。反応液に塩化パラトルエンスルホン(108.1 mg, 0.567 mmol)を加えて、さらに 12 時間攪拌した。溶媒を減圧留去して除き、超純水を加えた後、得られた残渣に酢酸エチル(60 mL \times 2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 2/1) で精製して目的物 **22** を収量 22.2 mg (25.4%)で得た。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.13 (s, 1H), 8.10 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.48 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.31 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.07 (s, 6H), 2.43 (s, 3H). MS (APCI) m/z 464 [MH^+].

2-Chloroquinoxalin-6-ol (23).

塩化アルミニウム (160.0 mg, 1.2 mmol) のトルエン懸濁液 (4 mL) を 0°C に冷却して 6-methoxy-2-chloroquinoxaline (97.3 mg, 0.5 mmol)を加えた。反応液を 80°C で 4 時間攪拌した後、0°C に冷却して氷冷水を加えて反応を停止した。酢酸エチル(60 mL \times 2)を加えて抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 30/1) で精製して目的物 **23** を収量 59.3 mg (65.7%)で得た。 1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.71 (s, 1H), 7.84 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H). MS (APCI) m/z 181 [MH^+].

2-Chloro-6-(2-fluoroethoxy)quinoxaline (24).

化合物 **23** (194.2 mg, 1.08 mmol)の DMF 溶液(18 mL)に炭酸カリウム(297.2 mg, 2.15 mmol)を加えた。反

応液を 80°C で 0.5 時間攪拌した後、2-fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (460 μ L)を加え、80°C でさらに 1.5 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL \times 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3, およびクロロホルム) で精製して目的物 **24** を収量 133.0 mg (54.3%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.72 (s, 1H), 7.93 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 4.92-4.78 (m, 2H), 4.43-4.34 (m, 2H). MS (APCI) m/z 227 [MH⁺].

4-(6-(2-Fluoroethoxy)quinoxalin-2-yl)aniline (25: PQ-4).

化合物 **24** (829.8 mg, 3.66 mmol)をトルエン(30 mL)およびエタノール(4.2 mL)の混合溶媒に溶解させ、4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (882.9 mg, 4.03 mmol), テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(127.1 mg, 0.110 mmol), 炭酸カリウム(2.0 M 水溶液, 4.03 mL)を加えた。反応液を 3 時間加熱還流した後、室温に戻して超純水を加え、酢酸エチル(150 mL \times 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 30/1 および酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **25** を収量 173.0 mg (16.7%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.18 (s, 1H), 8.03-7.98 (m, 3H), 7.45 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.93-4.79 (m, 2H), 4.43-4.35 (m, 2H), 3.94 (s, 2H). HRMS (EI) m/z calcd for C₁₆H₁₄FN₃O (M⁺) 283.1121, found 283.1123.

4-(6-(2-Fluoroethoxy)quinoxalin-2-yl)-*N*-methylaniline (26: PQ-5).

化合物 **25** (330.8 mg, 1.17 mmol)およびパラホルムアルデヒド(189.5 mg, 6.31 mmol)のメタノール懸濁液 (30 mL)を 0°C に冷却して、ナトリウムメトキシド(5 M メタノール溶液, 936 μ L, 4.68 mmol)をゆっくり加えた。反応液を 2.5 時間加熱還流した後、室温に戻して水素化ホウ素ナトリウム(221.3 mg, 5.85 mmol)を少しずつ加えた。反応液をさらに 1.5 時間加熱還流した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、メタノールを減圧留去して除いた。得られた残渣に酢酸エチル(70 mL \times 2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **26** を収量 188.1 mg (54.1%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.19 (s, 1H), 8.05 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.99 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.92-4.79 (m, 2H), 4.43-4.34 (m, 2H), 4.05 (s, 1H), 2.93 (s, 3H). HRMS (EI) m/z calcd for C₁₇H₁₆FN₃O (M⁺) 297.1277, found 297.1280.

4-(6-(2-Fluoroethoxy)quinoxalin-2-yl)-*N,N*-dimethylaniline (27: PQ-6).

化合物 **24** (133.0 mg, 0.587 mmol)をトルエン(5 mL)およびエタノール(0.7 mL)の混合溶媒に溶解させ、*N,N*-dimethyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (159.6 mg, 0.646 mmol), テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(20.3 mg, 0.0176 mmol), 炭酸カリウム(2.0 M 水溶液, 645 μ L)を加えた。反応

液を 6.5 時間加熱還流した後、室温に戻して超純水を加え、酢酸エチル(50 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製して目的物 **27** を収量 113.5 mg (62.8%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.20 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 4.92-4.78 (m, 2H), 4.43-4.34 (m, 2H), 3.07 (s, 6H). HRMS (EI) *m/z* calcd for C₁₈H₁₈FN₃O (M⁺) 311.1434, found 311.1441.

6-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)-2-chloroquinoxaline (**28**).

化合物 **23** (59.3 mg, 0.328 mmol)の DMF 溶液(7 mL)に炭酸カリウム(90.8 mg, 0.657 mmol)を加えた。反応液を 80°C で 0.5 時間攪拌した後、(2-bromoethoxy)-*tert*-butyldimethylsilane (140 μL)を加え、80°C でさらに 2.5 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/10)で精製して目的物 **28** を収量 101.5 mg (91.3%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.71 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.47 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 4.21 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.06 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 0.92 (s, 9H), 0.12 (s, 6H). MS (APCI) *m/z* 339 [MH⁺].

4-(6-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)quinoxalin-2-yl)aniline (**29**).

化合物 **28** (1,113 mg, 3.28 mmol)をトルエン(28 mL)およびエタノール(3.8 mL)の混合溶媒に溶解させ、4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (719.5 mg, 3.28 mmol), テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(113.7 mg, 0.0984 mmol), 炭酸カリウム(2.0 M 水溶液, 3.61 mL)を加えた。反応液を 3 時間加熱還流した後、反応液にテトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(113.7 mg, 0.0984 mmol)を加えて、さらに 1 時間加熱還流した。反応液を室温に戻して超純水を加え、酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 40/1)で精製して目的物 **29** を収量 1,425 mg を定量的に得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.17 (s, 1H), 8.02-7.96 (m, 3H), 7.41 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.21 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.95 (s, 2H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H).

6-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)-2-(*p*-di(*tert*-butoxycarbonyl)aminophenyl)quinoxaline (**30**).

化合物 **29** (698.0 mg, 1.765 mmol)の THF 溶液(18 mL)に di-*tert*-butyl dicarbonate (3,852 mg, 17.65 mmol), DMAP (21.6 mg, 0.177 mmol), およびトリエチルアミン(295 μL)を加えて 3 時間加熱還流した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(70 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **30** を収量 528.7 mg (50.3%)で得た。¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ 9.25 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 2.8, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.23 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.08 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.44 (s, 18H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H).

2-((2-(4-((Di-*tert*-butoxycarbonyl)amino)phenyl)quinoxalin-6-yl)oxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (31).

化合物 **30** (528.7 mg, 0.887 mmol)の THF 溶液(10 mL)に 0°C で TBAF (1 M THF 溶液, 1.06 mL)を加えた。反応液を室温に戻し、そのまま 2 時間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、酢酸エチル(50 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をピリジン(10 mL)に溶解し、塩化パラトルエンスルホニル(845.5 mg, 4.44 mmol)および DMAP (10.8 mg, 0.0887 mmol)を加えた。反応液を室温で 5 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去して除き、超純水を加えた後、得られた残渣に酢酸エチル(70 mL×2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **31** を収量 338.2 mg (60.0%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.24 (s, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.34-7.28 (m, 6H), 4.49 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.34 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.44 (s, 18H). MS (APCI) *m/z* 636 [MH⁺].

4-(6-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)quinoxalin-2-yl)-*N*-methylaniline (32).

化合物 **29** (712.0 mg, 1.8 mmol)およびパラホルムアルデヒド(291.9 mg, 9.72 mmol)のメタノール懸濁液 (40 mL)を 0°C に冷却して、ナトリウムメトキシド(5 M メタノール溶液, 1.44 mL, 7.2 mmol)をゆっくり加えた。反応液を 2.5 時間加熱還流した後、室温に戻して水素化ホウ素ナトリウム(340.5 mg, 9.0 mmol)を少しずつ加えた。反応液をさらに 1.5 時間加熱還流した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、メタノールを減圧留去して除いた。得られた残渣に酢酸エチル(70 mL×2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/2) で精製して目的物 **32** を収量 118.8 mg (16.1%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.18 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.96 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.42-7.39 (m, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.20 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.07 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.93 (s, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H).

tert-Butyl 4-(6-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)quinoxalin-2-yl)phenyl)(methyl)carbamate (33).

化合物 **32** (118.8 mg, 0.290 mmol)の THF 溶液(8 mL)に di-*tert*-butyl dicarbonate (632.9 mg, 2.90 mmol), DMAP (3.54 mg, 0.0290 mmol), およびトリエチルアミン(48 μL)を加えて 6 時間加熱還流した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **33** を収量 111.2 mg (75.2%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.23 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.47-7.39 (m, 4H), 4.23 (t, *J* = 4.8 Hz,

2H), 4.08 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.33 (s, 3H), 1.49 (s, 9H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H). MS (APCI) m/z 510 [MH^+].

2-((2-(4-((*tert*-Butoxycarbonyl)(methyl)amino)phenyl)quinoxalin-6-yl)oxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (34).

化合物 **33** (111.2 mg, 0.218 mmol) の THF 溶液 (5 mL) に 0°C で TBAF (1 M THF 溶液, 262 μ L) を加えた。反応液を室温に戻し、そのまま 3 時間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、酢酸エチル (60 mL \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をピリジン (5 mL) に溶解し、塩化パラトルエンスルホニル (207.8 mg, 1.09 mmol) および DMAP (2.7 mg, 0.0218 mmol) を加えた。反応液を室温で 5 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去して除き、超純水を加えた後、得られた残渣に酢酸エチル (50 mL \times 2) を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **34** を収量 72.6 mg (60.6%) で得た。¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.22 (s, 1H), 8.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.00 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.34-7.28 (m, 4H), 4.48 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.33 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.33 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 1.49 (s, 9H). MS (APCI) m/z 550 [MH^+].

4-(6-(2-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)ethoxy)quinoxalin-2-yl)-*N,N*-dimethylaniline (35).

化合物 **28** (101.5 mg, 0.299 mmol) をトルエン (2.5 mL) およびエタノール (350 μ L) の混合溶媒に溶解させ、*N,N*-dimethyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (81.3 mg, 0.329 mmol), テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム (10.4 mg, 0.00897 mmol), 炭酸カリウム (2.0 M 水溶液, 329 μ L) を加えた。反応液を 3 時間加熱還流した後、室温に戻して超純水を加え、酢酸エチル (60 mL \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **35** を収量 127.0 mg で定量的に得た。¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.19 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.96 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 4.21 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.06 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.06 (s, 6H), 0.93 (s, 9H), 0.13 (s, 6H). MS (APCI) m/z 424 [MH^+].

2-((2-(4-(Dimethylamino)phenyl)quinoxalin-6-yl)oxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (36).

化合物 **35** (127.0 mg, 0.300 mmol) の THF 溶液 (5 mL) に 0°C で TBAF (1 M THF 溶液, 360 μ L) を加えた。反応液を室温に戻し、そのまま 1 時間攪拌した。反応液に超純水を加えた後、酢酸エチル (60 mL \times 2) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をピリジン (5 mL) に溶解し、塩化パラトルエンスルホニル (286.0 mg, 1.50 mmol) および DMAP (3.67 mg, 0.030 mmol) を加えた。反応液を室温で 6 時間攪拌した後、溶媒を減圧留去して除き、超純水を加えた後、得られた残渣に酢酸エチル (60 mL \times 2) を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **36** を収量 64.0 mg (46.0%) で得た。¹H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)

δ 9.19 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.25-7.21 (m, 2H), 6.84 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.47 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.30 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.07 (s, 6H), 2.43 (s, 3H). MS (APCI) m/z 464 [MH⁺].

¹⁸F 標識 PQ 誘導体および [¹⁸F]Florbetapir の合成

¹⁸F を陰イオン交換カラム Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light Cartridge に保持させた後、K₂CO₃ 水溶液 (33.0 mM, 300 μ L) によって溶出した。MeCN (300 μ L) に Kryptofix2.2.2. (10.0 mg, 26.6 mmol) および ¹⁸F 含有 K₂CO₃ 水溶液を加え、アルゴン気流下で 120°C に加熱して共沸脱水した。MeCN (300 μ L) をさらに 2 回追加して共沸脱水操作を繰り返した。 [¹⁸F]PQ-1, [¹⁸F]PQ-2, [¹⁸F]PQ-4, [¹⁸F]PQ-5 については、それぞれ化合物 **16**, 化合物 **20**, 化合物 **31**, 化合物 **34** を標識前駆体として、各標識前駆体 (1.0 mg) が入ったバイアルに MeCN (200 μ L) に溶解した ¹⁸F 含有溶液を加え、100°C で 10 分間加熱した。さらに、1 N HCl (450 μ L) を加え、100°C で 10 分間加熱した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (500 μ L) を加えて中和し、酢酸エチル (800 μ L \times 2) を加えて抽出した後、溶媒を減圧留去した。残渣を MeCN (200 μ L) に溶解させてフィルターに通した後、逆相 HPLC (¹⁸F 標識 PQ 誘導体: MeCN/H₂O = 4/6, [¹⁸F]Florbetapir: MeCN/H₂O = 5/5) を用いて精製した。 [¹⁸F]PQ-3 および [¹⁸F]PQ-6 については、それぞれ化合物 **22** および化合物 **36** を標識前駆体として、各標識前駆体 (1.0 mg) が入ったバイアルに MeCN (200 μ L) に溶解した ¹⁸F 含有溶液を加え、100°C で 10 分間加熱した。溶液をフィルターに通した後、逆相 HPLC (MeCN/H₂O = 5/5) を用いて精製した。

LogP 値測定

1-オクタノール (3 mL) および PBS (pH 7.4, 3 mL) が入った遠心管に放射性リガンドを加え、ボルテックス (2 min) した後、4,000 \times g で 5 分間遠心分離した。各層から 500 μ L ずつ溶液を採取した後、それぞれの放射能を測定した。さらに残りの 1-オクタノール層から 1 mL を別の遠心管に移し、1-オクタノール (2 mL) および PBS (pH 7.4, 3 mL) を加えて、同様にボルテックスし、遠心分離した後、各層の放射能を測定した。この操作をもう一度繰り返し、それぞれの 1-オクタノール/PBS の放射能比から分配係数を求めた。

A β ₁₋₄₂ 凝集体の作製

PBS を用いて A β ₁₋₄₂ が 0.25 mg/mL の濃度になるように調製した。37 °C で 42 時間インキュベートすることにより、A β ₁₋₄₂ 凝集体溶液を作製した。

A β ₁₋₄₂ 凝集体を用いた結合阻害実験

A β ₁₋₄₂ 凝集体 (0.125 μ g/mL), [¹²⁵I]IMPY (6-iodo-2-(4'-dimethylamino)phenyl-imidazo[1,2]pyridine) (0.025 nM), および評価化合物 (0.5 pM – 25 μ M) を室温で 3 時間インキュベートした。混和溶液を M-24 セルハーベスターおよび GF/B フィルターを用いて吸引濾過し、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定した。得られた結果から、GraphPad Prism 5.0 を用いて結合阻害曲線を作成し、IC₅₀ を算出した。得られた IC₅₀ から、Cheng-Prusoff equation: $K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$ に基づいて、結合阻害定数 (K_i) を算出した。結合

飽和定数(K_d)は IMPY の K_d : 4.2 nM を用いた.

AD 患者および健常者脳組織切片を用いた *in vitro* オートラジオグラフィ(ARG)

パラフィン包埋された AD 患者(78 歳女性,あるいは 93 歳女性)および健常者(54 歳男性)脳組織切片を,キシレン(15 min×2), 100% EtOH (1 min×2), 90% EtOH (1 min×1), 70% EtOH (1 min×1)および超純水(2.5 min×2)で洗浄することで脱パラフィン処理を行った. ^{18}F 標識 PQ 誘導体あるいは ^{18}F Florbetapir 溶液 (3,700 kBq/mL)を添加し,室温で 1 時間インキュベートした. 50% EtOH 溶液(2 min×2)および超純水(2 min×2)で洗浄後,イメージングプレートに露光させ,バイオイメージングアナライザーにて分析を行った. さらに,隣接切片を用いて $\text{A}\beta_{1-42}$ の免疫染色を行った.

AD 患者剖検脳組織切片を用いた免疫染色

In vitro ARG で使用した AD 患者剖検脳組織切片の隣接切片を用いて, $\text{A}\beta_{1-42}$ の免疫染色を行った. 1 次抗体には,抗 $\text{A}\beta_{1-42}$ モノクローナル抗体(BC05, WAKO)を用いた. 脱パラフィン処理後,抗原の賦活化としてギ酸処理(5 min)を行った. 流水洗(5 min)した後, PBS-T (2 min×1)で洗浄した. 1 次抗体と室温で終夜反応させた後, PBS-T (5 min×3)で洗浄した. ビオチン標識抗マウス抗体と室温で 1 時間反応させた後, PBS-T (5 min×3)で洗浄した. ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体と室温で 1 時間反応させた後, PBS-T (5 min×2)および TBS (5 min×1)で洗浄した. 最後に DAB 溶液と室温で 5 分反応させた. 超純水で洗浄し,反応を停止した. 100% EtOH による脱水処理,キシレンによる透徹処理を行った後,切片を封入し,顕微鏡で観察した.

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

^{18}F PQ-1~6 および ^{18}F Florbetapir を 10% EtOH 生理食塩水で希釈した. 1 群 5 匹の 5 週齢 ddY 系雄性マウスに,尾静脈より 1 匹あたり 23.4-48.2 kBq (100 μL)の ^{18}F 標識化合物を投与し,2, 10, 30, 60 分後に屠殺,採血後,主要な臓器を摘出し,重量と放射能を測定した.

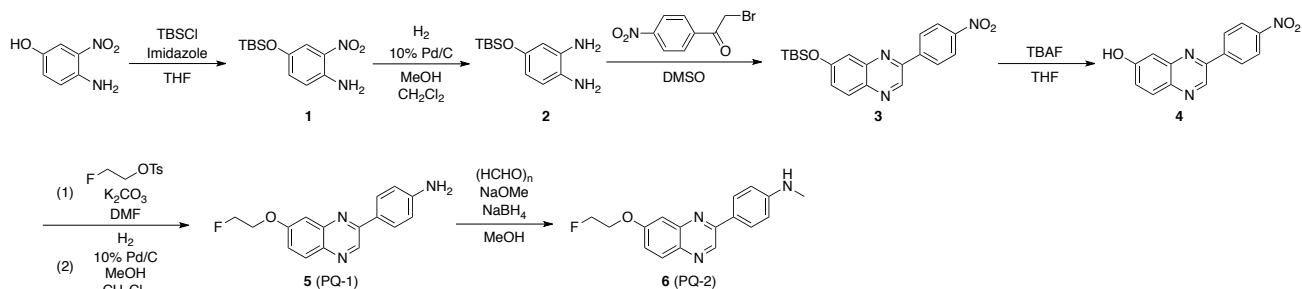
APP 過剰発現遺伝子改変(*Tg2576*)マウスを用いた *ex vivo* ARG

10% EtOH 生理食塩水に溶解した ^{18}F PQ-3 溶液(55.5 MBq, 200 μL)を 20 ヶ月齢雌性の *Tg2576* マウスに, 10% EtOH 生理食塩水に溶解した ^{18}F PQ-6 溶液(55.5 MBq, 200 μL)を 24 ヶ月齢雌性の *Tg2576* マウスおよび野生型マウスに尾静脈より投与した. 投与 60 分後に屠殺後,直ちに脳を摘出し, SCEM compound で包埋して,ドライアイス-ヘキサンバスで凍結させた. その後,マイクロトームを用いて 30 μm 厚の凍結切片を作製した. 切片をイメージングプレートに露光させ,バイオイメージングアナライザーにて分析を行った. さらに,同一切片に Thioflavin-S (ThS)の 50% EtOH 溶液(100 μM)を添加し, 50% EtOH で洗浄した後,蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行い,脳内アミロイド斑の局在を確認した.

1.2. 結果と考察

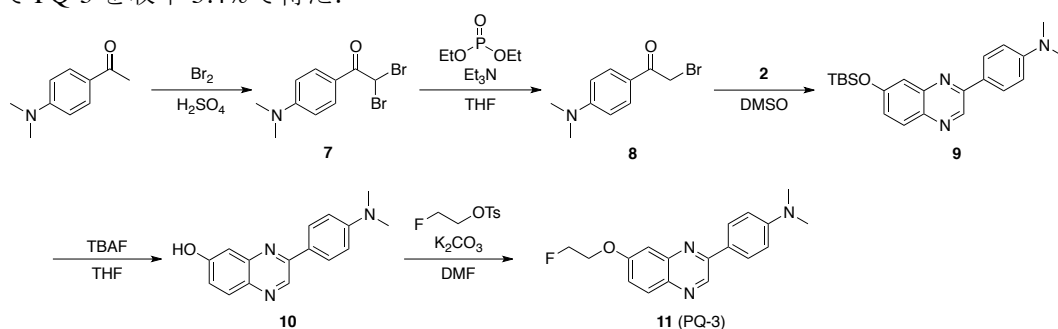
PQ 誘導体の合成

Scheme 1-1 に PQ-1~2 の合成経路を示す. 4-Amino-3-nitrophenol を出発原料として 2 工程を経て化合物 **2** を収率 84.0% で得た. 化合物 **2** と 2-Bromo-4'-nitroacetophenone を反応させることで PQ 骨格を形成させ, さらに 2 工程を経て PQ-1 を収率 11.1% で得た. さらに PQ-1 をメチル化することで, PQ-2 を収率 20.5% で得た.



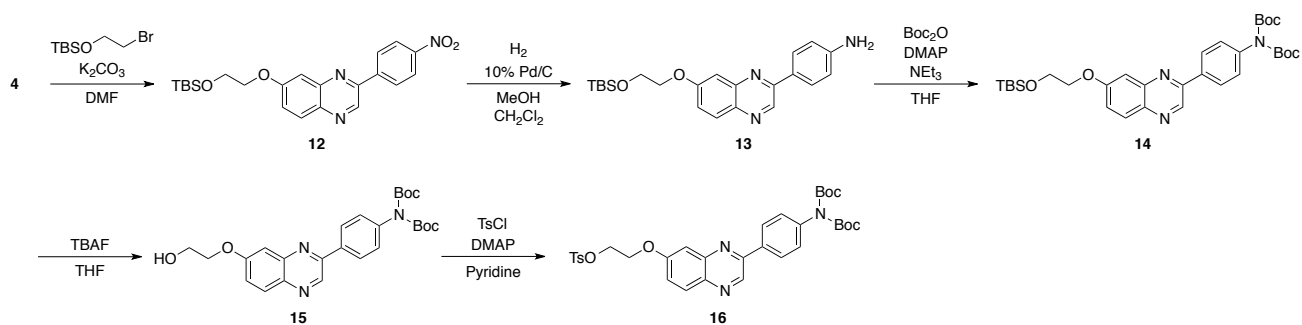
Scheme 1-1. Synthetic route for PQ-1~2.

Scheme 1-2 に PQ-3 の合成経路を示す. 1-(4-(Dimethylamino)phenyl)ethanone を出発原料として 2 工程を経て化合物 **8** を収率 46.8% で得た. さらに, 化合物 **2** と反応させることで PQ 骨格を形成させ, さらに 2 工程を経て PQ-3 を収率 5.4% で得た.



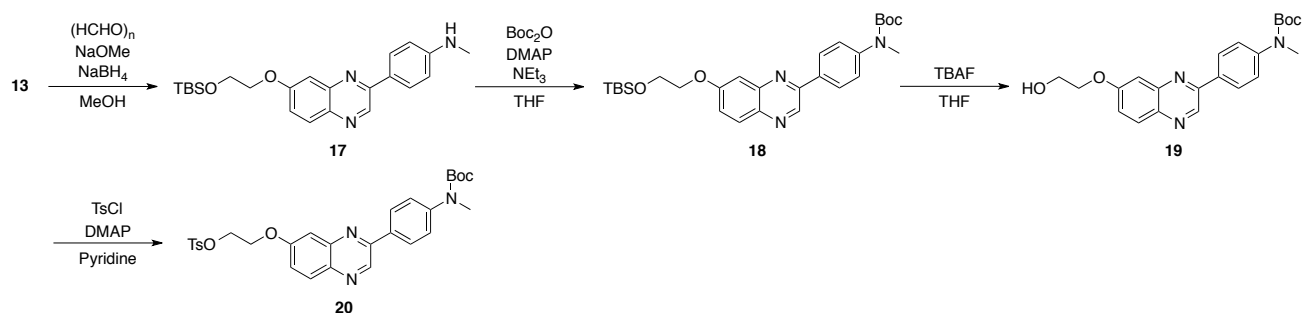
Scheme 1-2. Synthetic route for PQ-3.

Scheme 1-3 に [¹⁸F]PQ-1 の ¹⁸F 標識前駆体の合成経路を示す. 化合物 **4** を出発原料として 5 工程を経て化合物 **16** を収率 18.5% で得た.



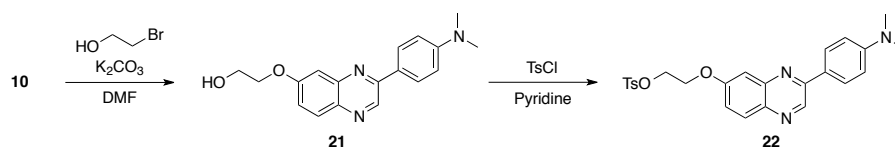
Scheme 1-3. Synthetic route for the precursor of [¹⁸F]PQ-1.

Scheme 1-4 に $[^{18}\text{F}]\text{PQ-2}$ の ^{18}F 標識前駆体の合成経路を示す。化合物 **13** を出発原料として 4 工程を経て化合物 **20** を収率 30.7% で得た。



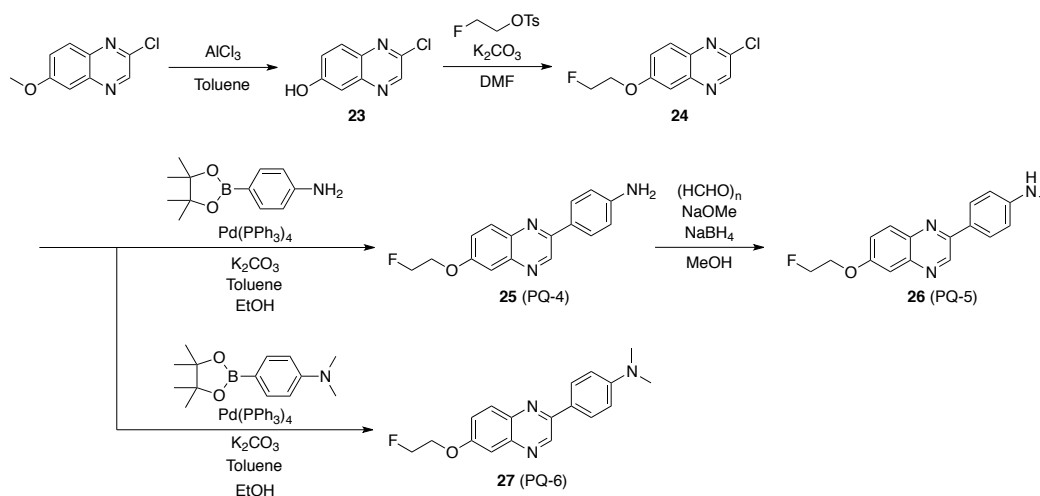
Scheme 1-4. Synthetic route for the precursor of $[^{18}\text{F}]\text{PQ-2}$.

Scheme 1-5 に $[^{18}\text{F}]\text{PQ-3}$ の ^{18}F 標識前駆体の合成経路を示す。化合物 **10** を出発原料として 2 工程を経て化合物 **22** を収率 13.5% で得た。



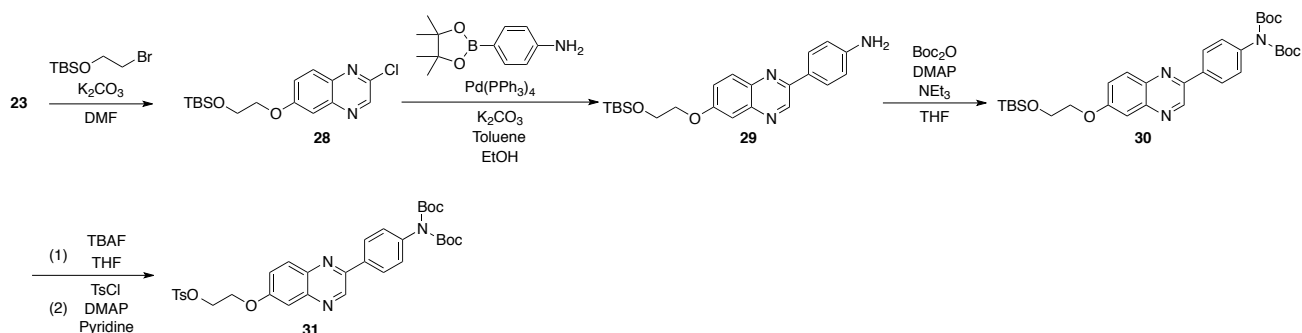
Scheme 1-5. Synthetic route for the precursor of $[^{18}\text{F}]\text{PQ-3}$.

Scheme 1-6 に PQ-4~6 の合成経路を示す。6-Methoxy-2-chloroquinoxaline を出発原料として 2 工程を経て化合物 **24** を収率 35.7% で得た。さらに、鈴木・宮浦カップリングにより PQ 骨格を形成させ、PQ-4 および PQ-6 をそれぞれ収率 16.7% および 62.8% で得た。PQ-5 は PQ-4 をメチル化することで収率 54.1% で合成した。



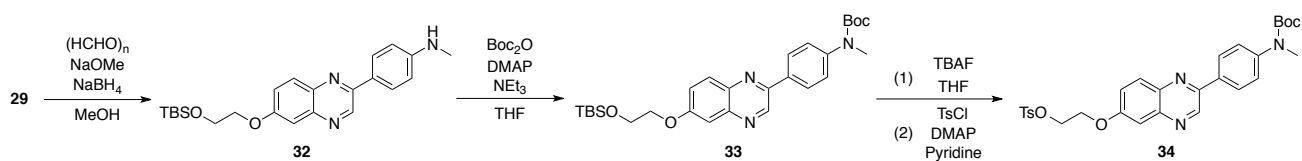
Scheme 1-6. Synthetic route for PQ-4~6.

Scheme 1-7 に $[^{18}\text{F}]\text{PQ-4}$ の ^{18}F 標識前駆体の合成経路を示す。化合物 **23** を出発原料として 4 工程を経て化合物 **31** を収率 27.6% で得た。



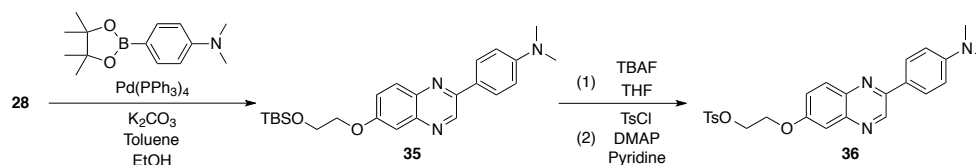
Scheme 1-7. Synthetic route for the precursor of $[^{18}\text{F}]\text{PQ-4}$.

Scheme 1-8 に $[^{18}\text{F}]\text{PQ-5}$ の ^{18}F 標識前駆体の合成経路を示す。化合物 **29** を出発原料として 3 工程を経て化合物 **34** を収率 7.3% で得た。



Scheme 1-8. Synthetic route for the precursor of $[^{18}\text{F}]\text{PQ-5}$.

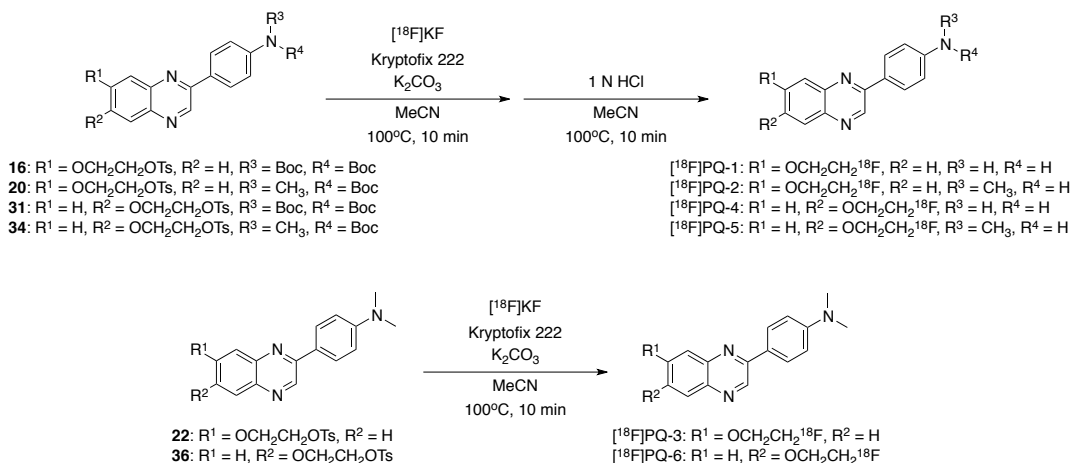
Scheme 1-9 に $[^{18}\text{F}]\text{PQ-6}$ の ^{18}F 標識前駆体の合成経路を示す。化合物 **28** を出発原料として 2 工程を経て化合物 **36** を収率 46.0% で得た。



Scheme 1-9. Synthetic route for the precursor of $[^{18}\text{F}]\text{PQ-6}$.

¹⁸F 標識 PQ 誘導体の合成

Scheme 1-10 に ¹⁸F 標識経路を示す。 [¹⁸F]PQ-3 および [¹⁸F]PQ-6 は [¹⁸F]KF および Kryptofix 2.2.2 によるフッ素化の 1 工程を経て、 [¹⁸F]FPMP-1, 2, 4, 5 はフッ素化に加えて、酸性条件下における脱保護の 2 工程を経て合成した。各 ¹⁸F 標識体は Table 2-4 に示す放射化学的収率(20-34%)で、放射化学的純度 95%以上で得た。



Scheme 1-10. Radiolabeling of [¹⁸F]PQ-1~6.

Table 1-1. Radiochemical yields of [¹⁸F]PQ-1~6.

Compound	Radiochemical yields (%) [*]
[¹⁸ F]PQ-1	25.9 ± 12.5
[¹⁸ F]PQ-2	20.1 ± 8.9
[¹⁸ F]PQ-3	31.3 ± 16.0
[¹⁸ F]PQ-4	34.0 ± 9.5
[¹⁸ F]PQ-5	22.7 ± 5.5
[¹⁸ F]PQ-6	19.6 ± 11.4

^{*}Values are expressed as the means ± standard errors of 3-8 independent determinations.

Aβ₁₋₄₂凝集体を用いた結合阻害実験による結合親和性評価

合成した PQ 誘導体の Aβ に対する結合親和性を定量的に評価するために、Aβ への高い結合親和性を示し、コントロール化合物として多用される [¹²⁵I]IMPY⁹ を競合リガンドとして Aβ₁₋₄₂凝集体を用いた競合阻害実験を行った。また、既存 Aβ イメージングプローブと比較するために、Florbetapir を同じ条件で評価した。結果を Table 1-2 に示す。PQ 誘導体の結合阻害定数(K_i)は 0.895 nM と非常に高い親和性から 1,180 nM と比較的低い親和性まで幅広い親和性を示し、置換基の種類および導入位置が親和性に大きく影響することが示唆された。アミノ基に関しては級数に応じてジメチルアミノ基(PQ-3, PQ-6) > モノメチルアミノ基(PQ-2, PQ-5) > 第 1 級アミノ基(PQ-1, PQ-4) という順列となり、この傾向は先行研究の結果と一致した。

¹⁸⁻²⁰. フルオロエトキシ基に関してはキノキサリンの6位に導入された誘導体(PQ-4~6, $K_i = 0.895\sim 242$ nM)は7位に導入された誘導体(PQ-1~3, $K_i = 111\sim 1,180$ nM)よりも高い親和性を示し、放射性核種による標識位置も結合性に大きく影響することが明らかとなった。PQ誘導体の中で、PQ-6が最も高い親和性($K_i = 0.895$ nM)を示し、これはフルオロエトキシ基が6位という違いのみのPQ-3の親和性($K_i = 111$ nM)の100倍以上高い値であった。さらに、PQ-6の親和性は、 $A\beta$ イメージングプローブとして臨床応用されているFlorbetapirの親和性($K_i = 12.8$ nM)よりも10倍以上高く、 $A\beta$ イメージングプローブとしてきわめて有効な性質を示すことが示唆された。

Table 1-2. Inhibition constants for the binding of [¹²⁵I]IMPY to $A\beta_{1-42}$ aggregates.

Compound	K_i (nM)*
PQ-1	1,180 ± 370
PQ-2	758 ± 83.8
PQ-3	111 ± 13.2
PQ-4	242 ± 29.0
PQ-5	15.7 ± 1.28
PQ-6	0.895 ± 0.141
Florbetapir	12.8 ± 2.10
IMPY	7.21 ± 1.23

*Values are expressed as the means ± standard errors of 6-13 independent determinations.

AD患者および健常者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

[¹⁸F]PQ-1~6および[¹⁸F]Florbetapirの老人斑への結合性を評価するためにAD患者脳組織切片を用いて *in vitro* ARGを行った。その結果をFigure 1-4に示す。結合阻害実験において高い結合親和性を示した[¹⁸F]PQ-5 ($K_i = 15.7$ nM)および[¹⁸F]PQ-6 ($K_i = 0.895$ nM)において、灰白質への顕著な放射能集積を認めた(Figure 1-4E, F)。隣接切片を用いた $A\beta_{1-42}$ の免疫染色の結果(Figure 1-4I)から、老人斑が灰白質に局限して沈着していることを確認し、[¹⁸F]PQ-6の放射能集積との局在の一致を認めた。中程度の結合親和性を示した[¹⁸F]PQ-3 ($K_i = 111$ nM)は、わずかに老人斑を描出する程度にとどまった(Figure 1-4C)。 K_i 値が242 nM以上の低い結合性を示した[¹⁸F]PQ-1, [¹⁸F]PQ-2, および[¹⁸F]PQ-4は老人斑への結合性を示さず、脳白質への非特異的結合のみ認められた(Figure 1-4A, B, D)。以上から、AD患者脳組織切片中の老人斑への結合性は $A\beta_{1-42}$ 凝集体を用いた結合阻害実験から得られた親和性の結果ときわめて良好な相関を示すことが明らかとなった。

PQ誘導体の中で最も老人斑を明瞭に描出した[¹⁸F]PQ-6と[¹⁸F]Florbetapirの結果を比較すると、[¹⁸F]PQ-6は[¹⁸F]Florbetapirより多くの老人斑を描出しており(Figure 1-4F, G)、これはPQ-6の親和性がFlorbetapirと比べて10倍以上高いことと一致する。[¹⁸F]PQ-6の老人斑への高い結合性は、AD脳内の老人斑蓄積をより感度良く検出できる可能性を示すものであり、臨床応用されている $A\beta$ イメージングプローブの検出限界よりも早期の段階からAD発症を検出しうる。これは、ADの早期診断方法の確立を目指す上で大きなメリットであると考えられる。さらに、[¹⁸F]PQ-6は[¹⁸F]Florbetapirに比べて脳白質への非特異的な集積

がきわめて軽微であり(Figure 1-4F, G), また, 健常者脳組織切片に対してもほとんど結合性が認められなかったことから(Figure 1-4H), 正常脳組織への非特異的結合もないことが明らかとなり, 現在臨床応用されている A β イメージングプローブで問題とされている脳白質への高い非特異的集積を改善できる可能性があると考えられる.

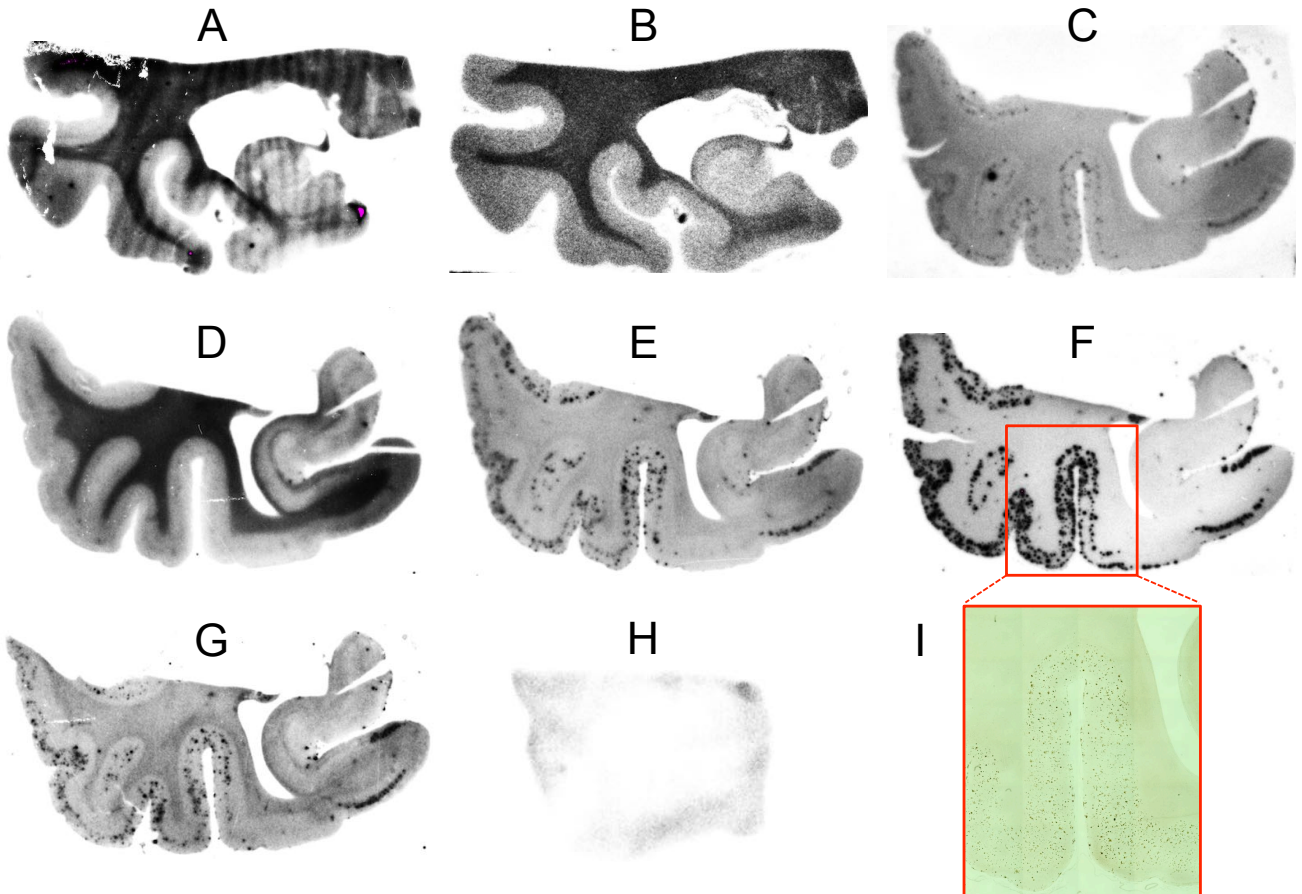


Figure 1-4. *In vitro* autoradiography of [^{18}F]PQ-1 (A), [^{18}F]PQ-2 (B), [^{18}F]PQ-3 (C), [^{18}F]PQ-4 (D), [^{18}F]PQ-5, [^{18}F]PQ-6 (F), and [^{18}F]Florbetapir (G) with brain sections from AD patients. *In vitro* autoradiography of [^{18}F]PQ-6 in a healthy control brain section (H). Immunohistochemical staining with an antibody against A β_{1-42} in the AD brain section (I).

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

各 ^{18}F 標識 PQ 誘導体の脳移行性を評価するために, 正常マウスを用いて体内放射能分布実験を行った. また, コントロールとして [^{18}F]Florbetapir に関しても同様の実験を行った. その結果を Figure 1-5, Table 1-3, および Table 1-4 に示す. 全ての ^{18}F 標識 PQ 誘導体は投与後 2 分あるいは 10 分の脳内放射能(Brain $_{2\text{ min}}$ あるいは Brain $_{10\text{ min}}$)は 4.69~7.59%ID/g と高い値を示し, 良好な脳移行性を認めた. さらに, ^{18}F 標識 PQ 誘導体の投与後早期での脳移行性は [^{18}F]PQ-1 を除いて [^{18}F]Florbetapir (Brain $_{2\text{ min}}$ 4.90%ID/g)よりも高いものであった. 全ての ^{18}F 標識 PQ 誘導体について, 脳内放射能は経時的な減少を示した(Brain $_{60\text{ min}}$

1.48~3.08%ID/g). 正常マウス脳内には A β 沈着がないため, ^{18}F 標識 PQ 誘導体の脳内からの経時的な消失は正常脳組織からのクリアランスを示すものであり, A β イメージングプローブとして必須の性質であり, PQ 誘導体の有効性を支持する.

全ての ^{18}F 標識 PQ 誘導体は, 投与後早期では肝臓および腎臓に集積し(Liver_{2 min} 5.30~11.93%ID/g, Kidney_{2 min} 8.65~11.92%ID/g), その後経時的な腸への集積を示した(Intestine_{60 min} 8.19~22.13%ID/g). また, 骨への顕著な集積は認められなかったことから(Bone_{60 min} 2.86~5.40%ID/g), 生体内における脱フッ素化は生じないことが示唆された.

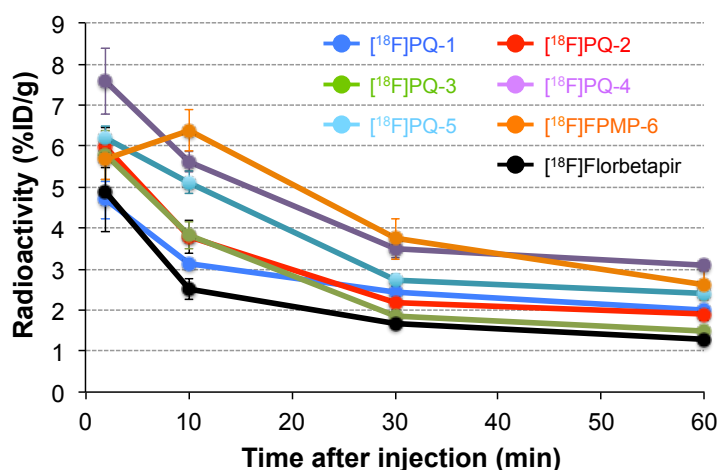


Figure 1-5. Comparison of brain uptake of radioactivity after injection of [^{18}F]PQ-1~6 and [^{18}F]Florbetapir into normal mice (n = 5).

Table 1-3. Comparison of brain uptake and washout of [^{18}F]PQ-1~6 and [^{18}F]Florbetapir in normal mice.*

Compound	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[^{18}F]PQ-1	4.69 (0.46)	3.12 (0.10)	2.42 (0.22)	1.99 (0.08)
[^{18}F]PQ-2	5.96 (0.48)	3.77 (0.40)	2.18 (0.22)	1.91 (0.15)
[^{18}F]PQ-3	5.78 (0.60)	3.82 (0.33)	1.85 (0.09)	1.48 (0.07)
[^{18}F]PQ-4	7.59 (0.82)	5.63 (0.25)	3.50 (0.24)	3.08 (0.12)
[^{18}F]PQ-5	6.19 (0.30)	5.11 (0.28)	2.73 (0.16)	2.41 (0.12)
[^{18}F]PQ-6	5.67 (0.48)	6.39 (0.51)	3.73 (0.50)	2.61 (0.37)
[^{18}F]Florbetapir	4.90 (0.99)	2.52 (0.25)	1.65 (0.11)	1.29 (0.08)

*Each value represents the mean (SD) for 5 animals.

Table 1-4. Biodistribution of ¹⁸F labeled PQ derivatives.^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[¹⁸ F]PQ-1 (LogP 1.57)				
Blood	2.71 (0.20)	2.95 (0.14)	3.44 (0.24)	3.27 (0.22)
Liver	9.18 (1.45)	12.06 (1.82)	8.76 (1.01)	6.52 (0.93)
Kidney	11.14 (1.59)	6.36 (0.21)	5.00 (0.52)	3.30 (0.38)
Intestine	4.22 (0.33)	8.56 (1.29)	13.42 (1.45)	21.80 (5.00)
Spleen	3.77 (0.52)	4.86 (0.79)	3.94 (0.45)	3.72 (0.24)
Pancreas	6.13 (0.57)	4.98 (0.26)	3.60 (0.57)	2.73 (0.23)
Heart	8.76 (1.24)	5.30 (0.77)	4.52 (0.38)	4.53 (0.66)
Lung	8.18 (1.21)	5.67 (0.68)	4.70 (0.41)	4.05 (0.17)
Stomach ^b	1.26 (0.05)	1.98 (0.15)	2.70 (0.53)	2.97 (1.57)
Brain	4.69 (0.46)	3.12 (0.10)	2.42 (0.22)	1.99 (0.08)
Bone	2.71 (0.53)	3.08 (0.45)	4.12 (0.41)	5.20 (1.67)
[¹⁸ F]PQ-2 (LogP 1.80)				
Blood	3.37 (0.46)	3.83 (1.24)	3.10 (0.34)	3.40 (0.32)
Liver	6.84 (1.50)	11.72 (0.58)	7.95 (1.32)	6.95 (0.68)
Kidney	11.78 (2.51)	7.55 (0.36)	3.92 (0.45)	3.12 (0.41)
Intestine	3.46 (0.75)	12.48 (2.77)	20.27 (2.55)	22.13 (2.95)
Spleen	2.71 (0.44)	4.53 (0.62)	3.33 (0.66)	3.17 (0.62)
Pancreas	5.42 (0.13)	4.91 (0.95)	2.60 (0.25)	2.73 (0.31)
Heart	7.42 (0.53)	4.41 (0.17)	3.17 (0.15)	3.92 (0.64)
Lung	6.71 (0.24)	4.98 (0.56)	3.34 (0.55)	4.06 (0.99)
Stomach ^b	1.13 (0.18)	2.11 (0.55)	1.56 (0.34)	2.73 (2.44)
Brain	5.96 (0.48)	3.77 (0.40)	2.18 (0.22)	1.91 (0.15)
Bone	1.86 (0.53)	2.67 (0.54)	4.84 (3.97)	5.35 (1.16)
[¹⁸ F]PQ-3 (LogP 1.98)				
Blood	2.26 (0.22)	1.92 (0.68)	2.43 (0.17)	2.38 (0.25)
Liver	11.93 (1.35)	11.67 (0.80)	7.11 (1.56)	5.30 (0.82)
Kidney	8.65 (0.88)	5.19 (0.88)	3.30 (0.27)	3.52 (1.21)
Intestine	3.24 (0.43)	7.95 (1.28)	16.17 (1.71)	17.9 (3.64)
Spleen	3.67 (0.40)	2.89 (0.37)	2.31 (0.21)	1.74 (0.05)
Pancreas	6.82 (0.80)	3.51 (0.25)	2.31 (0.19)	1.60 (0.18)
Heart	6.12 (0.79)	3.48 (0.56)	2.43 (0.12)	2.22 (0.08)
Lung	5.74 (0.48)	4.02 (0.32)	2.80 (0.15)	2.20 (0.15)
Stomach ^b	1.07 (0.20)	2.54 (0.88)	2.02 (0.63)	1.42 (0.22)
Brain	5.78 (0.60)	3.82 (0.33)	1.85 (0.09)	1.48 (0.07)
Bone	2.45 (0.43)	1.93 (0.09)	2.35 (0.39)	2.86 (0.36)
[¹⁸ F]PQ-4 (LogP 1.59)				
Blood	3.86 (0.48)	4.39 (0.49)	4.66 (0.13)	5.10 (0.36)
Liver	5.30 (1.33)	6.58 (0.47)	4.90 (0.29)	4.88 (0.30)
Kidney	11.92 (2.02)	7.08 (0.69)	4.67 (0.50)	3.93 (0.39)
Intestine	3.69 (0.44)	5.48 (0.85)	6.67 (0.52)	8.19 (0.69)
Spleen	3.54 (1.53)	5.36 (1.35)	4.55 (0.31)	4.81 (0.75)

Pancreas	6.21 (0.99)	5.08 (0.78)	3.76 (0.37)	3.94 (0.47)
Heart	7.55 (0.95)	5.35 (0.70)	5.07 (0.39)	6.10 (0.35)
Lung	8.28 (0.96)	5.60 (0.67)	5.21 (0.17)	5.56 (0.43)
Stomach ^b	1.68 (0.26)	2.67 (0.32)	3.31 (0.59)	2.71 (0.30)
Brain	7.59 (0.82)	5.63 (0.25)	3.50 (0.24)	3.08 (0.12)
Bone	2.01 (0.43)	2.57 (0.50)	3.23 (0.56)	5.40 (1.06)
[¹⁸ F]PQ-5 (LogP 1.86)				
Blood	3.91 (0.22)	3.35 (0.43)	3.83 (0.18)	4.15 (0.31)
Liver	8.81 (1.00)	9.29 (0.40)	7.07 (0.19)	6.10 (0.41)
Kidney	9.86 (0.77)	6.40 (0.62)	4.14 (0.31)	3.08 (0.21)
Intestine	3.40 (0.34)	8.06 (0.95)	12.13 (2.05)	13.37 (1.03)
Spleen	3.14 (0.55)	3.76 (0.55)	3.07 (0.32)	2.99 (0.21)
Pancreas	6.47 (0.75)	3.88 (0.52)	2.72 (0.29)	2.64 (0.34)
Heart	6.12 (0.45)	3.93 (0.40)	3.20 (0.32)	3.80 (0.22)
Lung	8.13 (1.13)	5.10 (0.74)	3.94 (0.33)	3.92 (0.11)
Stomach ^b	1.32 (0.21)	1.86 (0.38)	2.44 (0.62)	2.00 (0.76)
Brain	6.19 (0.30)	5.11 (0.28)	2.73 (0.16)	2.41 (0.12)
Bone	2.81 (0.52)	2.12 (0.11)	2.86 (0.45)	4.26 (0.29)
[¹⁸ F]PQ-6 (LogP 1.99)				
Blood	2.66 (0.50)	2.29 (0.25)	2.98 (0.29)	3.26 (0.37)
Liver	10.33 (1.00)	9.83 (0.22)	6.91 (0.81)	6.65 (0.90)
Kidney	10.65 (0.96)	6.66 (0.45)	4.19 (0.78)	3.30 (0.39)
Intestine	2.56 (0.10)	5.27 (0.27)	9.82 (1.43)	12.27 (0.79)
Spleen	2.86 (0.66)	4.09 (0.33)	2.66 (0.57)	3.07 (0.68)
Pancreas	6.55 (0.63)	4.74 (0.42)	2.73 (0.50)	2.74 (0.19)
Heart	8.50 (1.40)	4.19 (0.47)	3.29 (0.68)	3.74 (0.72)
Lung	8.94 (1.76)	4.59 (1.07)	3.51 (0.44)	3.39 (0.14)
Stomach ^b	1.09 (0.05)	1.64 (0.28)	1.98 (0.47)	2.06 (0.46)
Brain	5.67 (0.48)	6.39 (0.51)	3.73 (0.50)	2.61 (0.37)
Bone	2.65 (0.61)	2.34 (0.36)	2.97 (0.78)	4.22 (1.27)
[¹⁸ F]Florbetapir (LogP 1.82)				
Blood	3.32 (0.56)	2.68 (0.45)	2.56 (0.22)	2.06 (0.16)
Liver	8.44 (1.21)	15.85 (2.75)	13.13 (1.40)	10.30 (1.28)
Kidney	10.63 (1.55)	8.72 (0.82)	9.17 (2.57)	5.91 (1.50)
Intestine	3.45 (0.53)	5.79 (0.51)	9.08 (1.52)	11.75 (2.56)
Spleen	2.45 (0.42)	2.20 (0.13)	1.78 (0.21)	1.49 (0.19)
Pancreas	4.57 (0.67)	3.20 (0.26)	2.52 (0.28)	1.77 (0.21)
Heart	6.70 (1.36)	3.07 (0.29)	2.12 (0.11)	1.17 (0.09)
Lung	6.54 (0.88)	3.75 (0.38)	2.99 (0.43)	2.35 (0.24)
Stomach ^b	1.83 (0.24)	5.10 (0.82)	5.95 (1.06)	6.84 (3.34)
Brain	4.90 (0.99)	2.52 (0.25)	1.65 (0.11)	1.29 (0.08)
Bone	1.48 (0.24)	1.30 (0.15)	2.01 (0.35)	3.48 (0.38)

^aEach value represents the mean (SD) for 5 animals.

^bExpressed as %ID/organ.

APP 過剰発現遺伝子改変(Tg2576)マウスを用いた *ex vivo* ARG

A β イメージングプローブとして最も適した性質を有していると考えられた¹⁸F]PQ-6 について、APP 過剰発現遺伝子改変マウスである Tg2576 マウス(24-month-old, female)および同月齢の野生型マウスを用いた *ex vivo* ARG を行った。Tg2576 マウスは、12 ヶ月齢より脳内でアミロイド斑の蓄積がはじまり²¹、A β への結合性を *in vitro* および *in vivo* で評価する上で一般的に用いられる AD モデル動物である^{22, 23}。Tg2576 マウスにおいて、野生型マウスには認められない多数のスポット状の放射能集積が認められ (Figure 1-6A)、その集積部位は同一切片を用いた ThS によるアミロイド蛍光染色の陽性部位と一致した (Figure 1-6D)。一方、野生型マウスでは、大脳皮質には顕著な放射能集積は認められず (Figure 1-6B)、ThS 蛍光染色においてもアミロイド斑は確認されなかった (Figure 1-6E)。これらの結果から、¹⁸F]PQ-6 は生体内においても脳内 A β への特異的結合を示すことが明らかとなった。¹⁸F]PQ-3 についても Tg2576 マウス (20-month-old, female)を用いて同様の評価を実施したが、脳内のアミロイド斑への結合性はほとんど認められなかった (Figure 1-6C, F)。この結果は A β への結合親和性が PQ-6 に比べて 100 倍以上低いこと、および、AD 患者脳組織切片上の老人斑への結合性がわずかしか認められなかったことと一致する。

¹⁸F]PQ-6 は、ヒト脳組織切片を用いた *in vitro* ARG において脳白質への非特異的結合がほとんど認められなかったにもかかわらず、本検討では Tg2576 マウスおよび野生型マウスのいずれにおいても ThS 蛍光染色とは一致しない放射能集積が認められた (Figure 1-6A, B)。Figure 1-6 の脳切片上で集積が認められた部位は脳梁、外包、前交連、および嗅索であり、これらの部位はミエリン鞘が高密度に発現しているため、¹⁸F]PQ-6 はマウス脳内においてミエリン鞘にも結合性を示すことが示唆された。一方、¹⁸F]Florbetapir は Tg2576 マウスを用いた同様の検討において脳白質への非特異的結合がほとんど認められなかったことが報告されているが²⁴、ヒトにおける臨床画像では脳白質への高い集積が指摘されているのが現状である。これらのことから、ヒトとマウスでの脳白質への結合性にはやや乖離が認められることが推察される。その原因の詳細は明らかではないが、¹⁸F]PQ-6 の脳白質への結合性はマウス特有の性質である可能性もあり、今後の詳細な検討が期待される。

以上の結果より、マウス脳内での非特異的結合が認められたものの、¹⁸F]PQ-6 が生体内においてアミロイド斑に対して結合性を有することが明らかとなった。

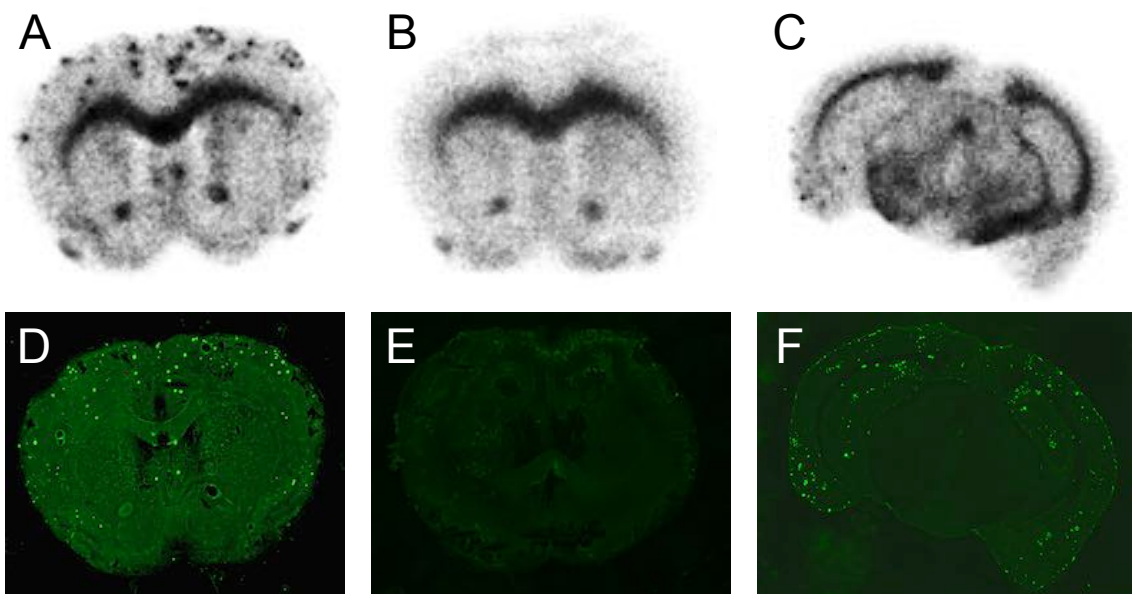


Figure 1-6. *Ex vivo* autoradiogram from *Tg2576* (A) and wild-type mouse (B) with [^{18}F]PQ-6. *Ex vivo* autoradiogram from *Tg2576* with [^{18}F]PQ-3 (C). The same sections (A, B, and C) were stained with ThS (D, E, and F, respectively).

1.3. 小括

本章において、既存の A β イメージングプローブで問題とされている脳白質への非特異的集積を改善することを目的として、既存プローブが有する母核とは異なるフェニルキノキサリン(PQ)を母核とした ^{18}F 標識 PQ 誘導体を開発し、新規 PET 用 A β イメージングプローブとしての有用性に関する評価を行ない、以下に述べる結果を得た。

- (1) 種々の置換基を導入した 6 種類の ^{18}F 標識 PQ 誘導体を合成した。
- (2) A β_{1-42} 凝集体を用いた *in vitro* 結合阻害評価において、PQ-6 は最も高い結合親和性を示し、A β イメージングプローブとして臨床応用されている Florbetapir と比較しても 10 倍以上高い親和性を示した。
- (3) AD 患者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG において、 ^{18}F PQ-6 は ^{18}F Florbetapir よりも数多くの老人斑を明瞭に描出した。また、 ^{18}F PQ-6 の脳白質部位への非特異的結合は ^{18}F Florbetapir と比べて低く、脳白質への集積を改善しうる可能性を示した。
- (4) 正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、全ての ^{18}F 標識 PQ 誘導体は投与早期の高い脳移行性とその後速やかな脳内からの放射能消失を示した。
- (5) Tg2576 マウスを用いた *ex vivo* ARG において、 ^{18}F PQ-6 は脳内に蓄積したアミロイド斑に対する特異的結合性を示した。

以上の結果より、フェニルキノキサリンを母核とした ^{18}F PQ-6 は、既存の A β イメージングプローブよりも良好な性能を有する PET 用 A β イメージングプローブとして機能する可能性が示された。

第 2 章

2 型糖尿病の早期診断を目的とした 膵臓内アミリン標的核医学分子イメージングプローブの開発

背景

糖尿病はインスリン作用の不足に基づく慢性の高血糖を主徴とする代謝疾患群である²⁵。インスリンは生体で血糖レベルを下げる唯一のホルモンであり、その生合成・分泌は膵β細胞に限局される。インスリン作用の不足の原因には、膵β細胞からの供給不足、あるいはインスリン標的臓器におけるインスリン抵抗性の増大が関与する。慢性高血糖状態により脂肪やタンパク質などの主要な栄養素の代謝異常も同時に引き起こされ、さらには、糖尿病に特有な慢性合併症（糖尿病網膜症・糖尿病腎症・糖尿病神経障害）を生じ、この慢性合併症が糖尿患者の QOL を低下させ寿命を短くしている。実際、糖尿病罹患者は非罹患者と比べて寿命が統計上 4.6 歳短くなることが報告されている²⁶。世界保健機関(WHO)は、2014 年現在で全世界に 4 億 2200 万人（成人人口の 8.5%）の糖尿病罹患者が存在すると推定しており²⁷、2006 年には WHO および国際糖尿病連合(IDF)が世界各国に働きかけ、その世界的脅威を認知する国連決議が行われた²⁸。高齢化、急速な都市化や食生活の変化、身体活動度の低下などの影響により、今なお世界的に糖尿病有病者数は増加の一途をたどっており、2035 年には 5 億 9200 万人に増加すると IDF は予測しており²⁹、糖尿病対策は世界的に社会的急務とされている。

糖尿病はその成因によって、1 型糖尿病、2 型糖尿病、その他の特定の機序・疾患によるもの、妊娠糖尿病の 4 つに大きく分類される。中でも 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)は糖尿病罹患者の 90-95%を占めるとされる。T2DM は発症の病態も原因も不均一であり、多彩な経過をたどる疾患であるが、インスリン抵抗性および膵β細胞機能不全は共通する病態である。現在 T2DM の診断は、血糖値および耐糖能の異常を判断することにより行われているが³⁰⁻³²、T2DM と診断されてから食事療法や運動療法を実施しても十分な治療効果が得られないことも多く、薬剤による長期間の血糖管理を強いられる³。そのため、T2DM を早期に確定診断しうる手法の確立が必要とされる。

T2DM 発症過程において膵β細胞量(β-cell mass, BCM)が進行的に減少すると考えられており、T2DM 患者では健常者の 50%未満まで BCM が減少しているという報告例もある³³⁻³⁵。このため、BCM の定量による T2DM の早期診断や病状把握を目的として、膵β細胞を標的にした数多くの核医学分子イメージングプローブの開発研究が世界的に展開されており³⁶⁻³⁹、将来的に膵β細胞イメージングが T2DM の進行度を把握する上で必要なツールになりうると考えられる。しかし、T2DM 発症初期ではインスリン抵抗性を代償するべく、膵β細胞の増殖を促し、インスリン分泌量を増強させることが推測されている^{40,41}。すなわち、BCM は単調に減少するわけではなく、発症初期の段階では増大すると想定され、膵β細胞イメージングだけで T2DM の早期診断を達成することは困難であると考えられる。

T2DM の特徴的な病理学的変化として、膵臓内に膵島アミロイドが沈着することが知られている。膵島アミロイドは 37 残基のペプチドであるアミリンによって主に構成されており、死後剖検において

T2DM 患者の 90%以上で膵島アミロイドの沈着が確認されている⁴²。アミリンの詳細な生理作用は未だに解明されていないが⁴³、アミリン凝集体が膵β細胞への毒性を示すことが報告されていることから、このアミロイドの膵島への蓄積が T2DM の一因となっていると考えられる⁵。さらに、膵島アミロイドの蓄積量がモデル動物とヒトの両方において BCM の減少量と相関し、ひいては T2DM の重症度と相関すること、また、サルにおいて高血糖症状に先行して膵島アミロイド蓄積が開始していることから、膵島アミロイドの蓄積は T2DM の発症および進行に関して重要な役割を担っていると考えられる⁵。

以上のことから、膵島アミロイドの生体イメージングは T2DM の早期診断に貢献しうると考え、膵臓内アミリンを標的とした核医学分子イメージングプローブの開発を計画した。

第1節

単光子放出断層撮像用アミリンイメージングプローブとしての ピリジルベンゾフラン誘導体の開発

第1項 アミリン結合性化合物の探索

現在までに膵臓内アミリンを標的にした核医学分子イメージングプローブの報告はなく、アミリンイメージングプローブを開発するにあたり、まず、アミリンに高い親和性で結合する化合物の探索から開始した。

膵島アミロイドはアルツハイマー病(AD)脳内に β アミロイド(A β)凝集体として蓄積する老人斑と同じくアミロイドに分類される異常構造物であり、その分子中に β シート構造を豊富に含有する。A β イメージングプローブは老人斑中の β シート構造に結合するように分子設計されているため、老人斑だけでなく β シート構造を豊富に含む他のアミロイドにも結合性を示す可能性は高いと考えられる。実際、A β イメージングプローブとして臨床応用されている $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ について心アミロイドーシスの診断への応用研究が実施されており、その有効性が示されつつある^{44,45}。以上のことから、A β イメージングプローブの中にアミリンに結合性を示す化合物が存在すると考えた。そこで、著者の所属研究室で開発された $[^{125}\text{I}]\text{IPBF}$ ⁴⁶が、アミロイドの蛍光染色試薬として用いられている Thioflavin-T (ThT)と類似した母核を有すること、および、A β への高い結合親和性を示し AD 患者脳組織切片中の老人斑を明瞭に描出したこと、の2点に着目して $[^{125}\text{I}]\text{IPBF}$ のアミリンへの結合性を検討することとした。

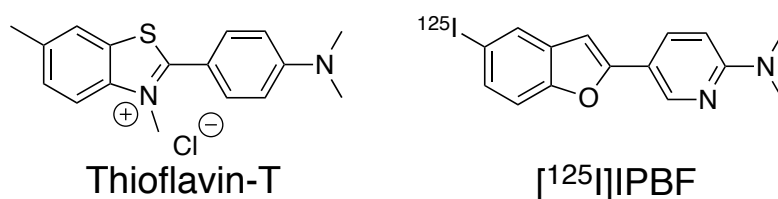


Figure 2-1. Chemical structure of thioflavin-T and $[^{125}\text{I}]\text{IPBF}$.

2.1.1. 実験方法

試薬・機器

第1章と同じ試薬・機器を使用した。Amylin (Human) は、株式会社ペプチド研究所より購入した。T2DM患者膵臓組織切片および健常者膵臓組織切片は、BioChain社より購入したものをを使用した。

アミリン凝集体の作製

アミリンをDMSOに溶解し、さらに20 mM Tris/HCl-100 mM NaCl (pH 7.5)で希釈し、100 μ Mの溶液に調製することで作製した。

アミリン凝集体を用いた結合飽和実験

アミリン凝集体(25 nM)、および、非標識体を加えて濃度調製した 125 I]IPBF (0.39-12.5 nM)を室温で3時間インキュベートした。非特異的結合はIPBF (200 nM)およびThT (10 mM)をさらに加えることで評価した。混和溶液をM-24セルハーベスターおよびGF/Bフィルターを用いて吸引濾過し、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定した。得られた結果から、GraphPad Prism 5.0を用いて飽和曲線を作成し、解離定数(K_d)および最大結合量(B_{max})を算出した。

IPBFを競合リガンドとした結合阻害実験

アミリン凝集体(25 nM)、 125 I]IPBF (0.025 nM)、および評価化合物(0.5 pM – 25 μ M)を室温で3時間インキュベートした。混和溶液をM-24セルハーベスターおよびGF/Bフィルターを用いて吸引濾過し、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定した。得られた結果から、GraphPad Prism 5.0を用いて結合阻害曲線を作成し、 IC_{50} を算出した。得られた IC_{50} から、Cheng-Prusoff equation: $K_i = IC_{50}/(1+[L]/K_d)$ に基づいて、結合阻害定数(K_i)を算出した。 K_d は結合飽和実験で得られた結果を用いた。

T2DM患者および健常者膵臓組織切片を用いた *in vitro* オートラジオグラフィ(ARG)

パラフィン包埋されたT2DM患者(69歳女性)および健常者(28歳男性)膵臓組織切片を、キシレン(15 min \times 2)、100% EtOH (1 min \times 2)、90% EtOH (1 min \times 1)、70% EtOH (1 min \times 1)および超純水(2.5 min \times 2)で洗浄することで脱パラフィン処理を行った。 125 I]IPBF溶液 (370 kBq/mL)を添加し、室温で1時間インキュベートした。50% EtOH溶液(1 min \times 2)および蒸留水(1 min \times 1)で洗浄後、イメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。さらに、同一切片を用いてThioflavin-S (ThS)によるアミロイド蛍光染色、隣接切片を用いてアミリンおよびA β の免疫染色を行った。

T2DM患者および健常者膵臓組織切片を用いた Thioflavin-S (ThS)蛍光染色

In vitro ARGを行った切片にThSの50% EtOH溶液(100 μ M)を添加し、超純水で洗浄した。乾燥後、蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行った。

T2DM 患者および健常者膵臓組織切片を用いた免疫染色

In vitro ARG で使用した T2DM 患者あるいは健常者膵臓組織切片の隣接切片を用いて、アミリンおよび A β の免疫染色を行った。アミリンの免疫染色における 1 次抗体には、抗アミリンポリクローナル抗体 (T-4150, Peninsula Laboratories) を、A β の免疫染色における 1 次抗体には、抗 A β_{1-42} モノクローナル抗体 (BC05, WAKO) および抗 A β_{1-40} モノクローナル抗体 (BA27, WAKO) を用いた。脱パラフィン処理後、アミリン免疫染色では、抗原賦活化として 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中におけるオートクレーブ (121°C, 15 min) を行い、PBS-T (5 min \times 2) で洗浄した。A β 免疫染色では、抗原賦活化としてギ酸処理 (5 min) を行い、流水洗 (5 min) 後、PBS-T (2 min \times 1) で洗浄した。1 次抗体と室温で終夜反応させた後、PBS-T (5 min \times 3) で洗浄した。ビオチン標識抗ウサギ抗体あるいはビオチン標識抗マウス抗体と室温で 1.5 時間反応させた後、PBS-T (5 min \times 3) で洗浄した。ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体と室温で 1 時間反応させた後、PBS-T (5 min \times 2) および TBS (5 min \times 1) で洗浄した。最後に DAB 溶液と室温で 5 分反応させた。超純水で洗浄し、反応を停止した。100% EtOH による脱水処理、キシレンによる透徹処理を行った後、切片を封入し、顕微鏡で観察した。

2.1.2. 結果と考察

アミリン凝集体を用いた $[^{125}\text{I}]$ IPBF の結合飽和実験

$[^{125}\text{I}]$ IPBF のアミリン凝集体への結合親和性を評価するために結合飽和実験を行った。アミリン凝集体に結合した放射能から IPBF の物質量を計算し、得られた結合飽和曲線(Figure 2-2)より算出したアミリン凝集体に対する K_d 値は 8.31 nM, B_{\max} は 7,130 pmol/mg protein となり, $[^{125}\text{I}]$ IPBF はアミリン凝集体に対して高い結合親和性を有していることを認めた。

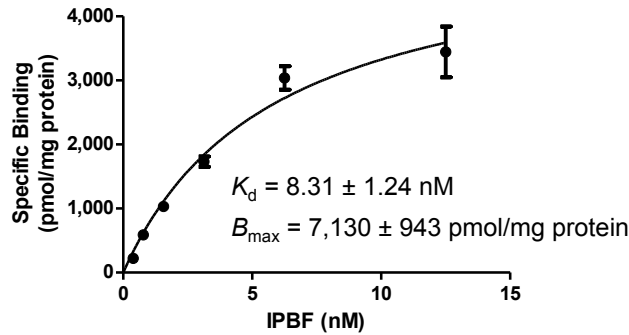


Figure 2-2. Saturation curve of $[^{125}\text{I}]$ IPBF for amylin aggregates.

$[^{125}\text{I}]$ IPBF を競合リガンドとした結合阻害実験

$[^{125}\text{I}]$ IPBF と既報 $\text{A}\beta$ イメージングプローブのアミリン凝集体に対する結合親和性を比較するため, $[^{125}\text{I}]$ IPBF を競合リガンドとした結合阻害実験を行った。既報 $\text{A}\beta$ イメージングプローブとしては, 臨床応用されている Florbetapir, ピリジルベンゾフラン誘導体の FPYBF-1⁴⁷, ピリジルベンゾオキサゾール誘導体の PBOX-3⁴⁸, フェニルキノキサリン誘導体の PQ-6⁴⁹, および, SPECT 用 $\text{A}\beta$ イメージングプローブとして臨床研究が実施された 6-iodo-2-(4-*N,N*-dimethylamino)-phenylimidazo [1,2-*a*]pyridine (IMPY)⁸ を選択した(Figure 2-3)。得られた結合阻害曲線から IC_{50} 値を算出し, その値から K_i 値を算出した。その結果, K_i 値は 2.66 nM と非常に高い親和性から 501 nM と比較的低い親和性まで幅広い親和性を示した(Table 2-1)。中でも, Florbetapir は, 第 1 章において $\text{A}\beta$ 凝集体に K_i 値 12.8 nM と高い親和性を示し(Table 1-2), さらに, AD 脳サンプルへの親和性も K_d 値 3.51 nM と非常に高いことが報告されているにもかかわらず²¹, アミリン凝集体に対しては K_i 値 501 nM と低い値となり, 脳内 $\text{A}\beta$ 凝集体と膵島アミリン凝集体とでは親和性に大きな差が生じた。これは, $\text{A}\beta$ 凝集体, アミリン凝集体ともに, 分子中に β シート構造を有しているが, その β シート構造を構成するアミノ酸配列が異なるために, それぞれの凝集体で結合様式に差異が生じたためと考えられる。ピリジルベンゾフランを母核にもつ IPBF と FPYBF-1 は, いずれも $\text{A}\beta$ 凝集体だけでなくアミリン凝集体に対しても高い結合親和性を示し, さらに, IPBF は今回評価した化合物の中で膵島アミリン凝集体に対して最も高い結合親和性を示した。

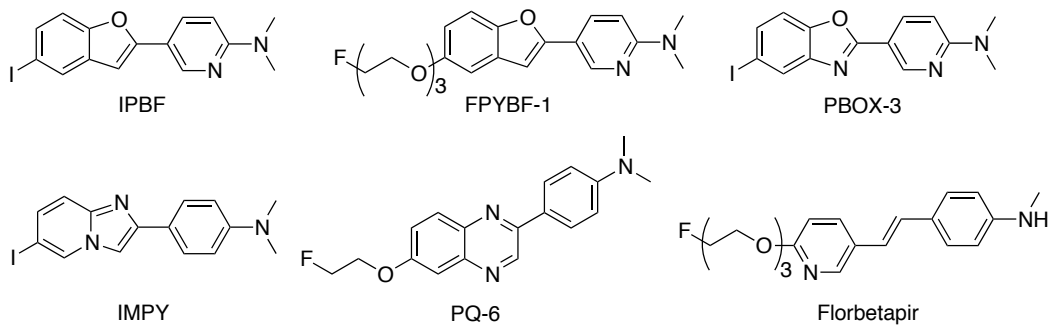


Figure 2-3. Chemical structure of previously reported Aβ imaging probes.

Table 2-1. Comparison of binding affinity of previously reported Aβ imaging probes for amylin aggregates.

Compound	K_i (nM)*
IPBF	2.66 ± 0.554
FPYBF-1	12.5 ± 1.67
PBOX-3	34.1 ± 8.62
IMPY	71.8 ± 10.1
PQ-6	61.4 ± 8.75
Florbetapir	501 ± 40.8

*Values are the means \pm standard errors of 3-4 independent determinations.

さらに、IPBFの高い結合親和性の因子を明らかにするため、置換基の異なるPBF誘導体(Figure 2-4)のアミリン凝集体への親和性を同様に算出し、比較した(Table 2-2)。ジメチルアミノ基を削除したIPBF-1は K_i 値609 nMとなり、ジメチルアミノ基がアミリン凝集体への結合に関して重要な因子の一つであることが示唆された。一方、ヨウ素をフルオロオキシエチレン基に変換したFPYBF-1は K_i 値12.5 nM、ヨウ素を削除したPBFは K_i 値73.9 nMとなり、ヨウ素も結合親和性に関与していると示唆されたが、この置換基の変換が結合親和性に与える影響は比較的小さいことが認められた。

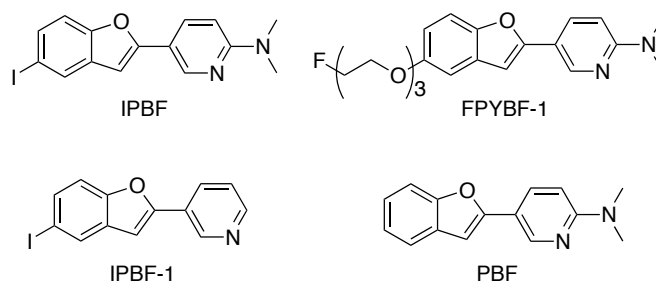


Figure 2-3. Chemical structure of pyridyl benzofuran derivatives.

Table 2-2. Comparison of binding affinity of pyridyl benzofuran derivatives for amylin aggregates.

Compound	K_i (nM)*
IPBF	2.66 ± 0.554
FPYBF-1	12.5 ± 1.67
PBF	73.9 ± 5.68
IPBF-1	609 ± 94.9

*Values are the means \pm standard errors of 3-4 independent determinations.

T2DM 患者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG

[¹²⁵I]IPBF の膵臓内アミリンへの選択的な結合性を評価するため、T2DM 患者および健常者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG を行った。その結果、T2DM 患者膵臓組織切片において顕著な放射能集積が認められた(Figure 2-4A)。さらに、その集積部位は、隣接切片を用いたアミロイド蛍光染色試薬の Thioflavin-S (ThS)による蛍光染色(Figure 2-4B)、および、抗アミリン抗体によるアミリン免疫染色(Figure 2-4C)のそれぞれの陽性部位と一致しており、[¹²⁵I]IPBF は膵島アミロイドへ特異的に結合していることが明らかとなった。ところで、膵島アミロイドは、主にアミリンの沈着により生じるが、一部 A β の沈着も関与していることが報告されている⁵⁰。このため、T2DM 患者膵臓組織切片の抗 A β_{1-40} 抗体および抗 A β_{1-42} 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、いずれの染色像においても陽性部位は認められなかったため(Figure 2-4D, E), [¹²⁵I]IPBF の膵島アミロイドへの結合性はアミリンへの結合性を反映したものであることが確認された。一方、健常者膵臓組織切片では目立った放射能集積は認められなかった(Figure 2-4F)。この隣接切片の ThS 蛍光染色では陽性部位は認められなかったが(Figure 2-4G)、アミリン免疫染色において多数の陽性部位が認められた(Figure 2-4H)。これは、正常な膵 β 細胞中に含有されるアミリンであると考えられる。すなわち、[¹²⁵I]IPBF は膵 β 細胞を含む正常な組織にはほとんど結合性を示さず、このことはアミリンイメージングにおいて非特異的な集積がきわめて少ないということを意味し、膵島アミロイド中の β シート構造を標的とする本研究の分子設計が、結合親和性だけでなく、結合特異性に関しても有効であると考えられる。

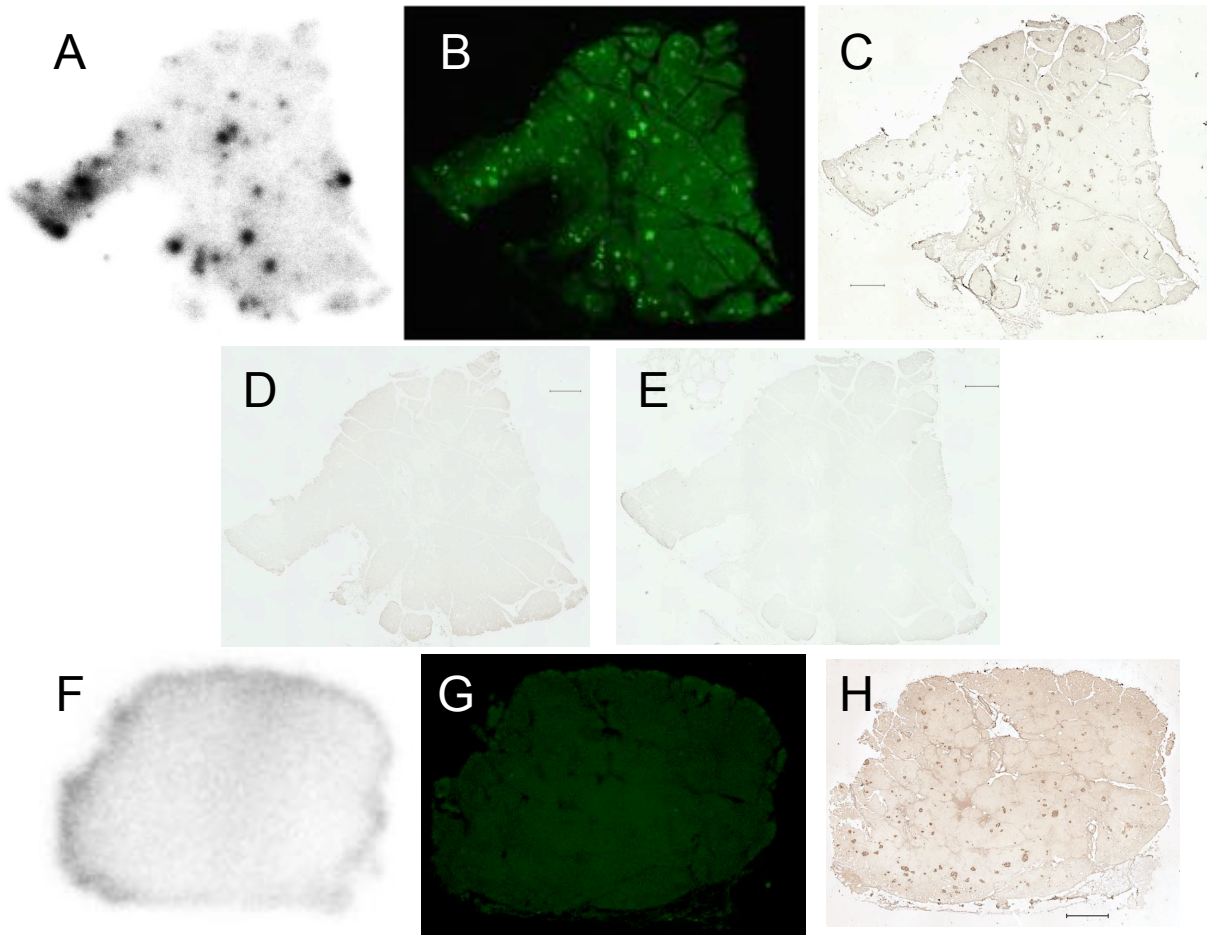


Figure 2-4. *In vitro* autoradiography of [¹²⁵I]IPBF (A), ThS staining (B), and immunohistochemical staining with an antibody against amylin (C), Aβ₁₋₄₂ (D), or Aβ₁₋₄₀ (E) in pancreatic sections from a T2DM patient. *In vitro* autoradiography of [¹²⁵I]IPBF (F), ThS staining (G), and immunohistochemical staining with an antibody against amylin (H) in the healthy control pancreatic sections.

2.1.3. 小括

本項において、まず、アルツハイマー病脳内の β アミロイド(A β)を標的とした A β イメージングプローブが2型糖尿病膵臓内に蓄積するアミリンに対しても結合性を示すと考え、A β イメージングプローブとして高い性能を有することが報告されており、ピリジルベンゾフランを母核に持つ ^{125}I IPBF を用いて、アミリンへの結合性に関して基礎的に評価し、以下に述べる結果を得た。

- (1) アミリン凝集体を用いた結合飽和実験において、 ^{125}I IPBF はアミリンへの高い結合親和性を示した。
- (2) ^{125}I IPBF を競合リガンドとした結合阻害実験において、既存 A β イメージングプローブの中でもピリジルベンゾフラン誘導体はアミリンへの高い結合親和性を示し、特に IPBF は最も高い結合性を示した。
- (3) T2DM 患者および健常者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG において、膵 β 細胞内の正常アミリンには結合せず、膵島アミロイド中の凝集アミリンにのみ結合性を示した。

以上の結果より、 ^{125}I IPBF は AD 脳内 A β だけでなく、T2DM 膵臓内アミリンにも結合性を示すことが明らかとなり、ピリジルベンゾフランを母核としたアミリンイメージングプローブ開発の可能性を示した。

第2項 単光子放出断層撮像用アミリンイメージングプローブの開発を目的とした^{99m}Tc標識ピリジルベンゾフラン誘導体の開発

^{99m}Tcは、6.01時間の半減期で141 keVの1本のγ線のみを放出するという核医学診断用核種として理想的な性質を有するとともに、⁹⁹Mo-^{99m}Tcジェネレータにより得られるという入手の容易性、さらにはさまざまな体内動態を示す多くの化合物に導くことが可能であるという化学的性質のために、現在核医学診断に最も広く用いられている。以上を踏まえて、臨床汎用性の高いアミリンイメージングプローブの開発を目指し、^{99m}Tcを標識核種としたPBF誘導体の開発を計画した。

¹²⁵Iなどの放射性ハロゲン元素と異なり、^{99m}Tcなどの放射性金属核種ではキレート構造が不可欠であるため、PBFにリンカーを介して二官能性キレートと結合させることで新規プローブを設計した。二官能性キレートには、^{99m}Tcと容易に安定な^{99m}Tc-トリカルボニル錯体を形成することのできるイミノ二酢酸(IDA)および*N,N*-ジピコリルアミン(DPA)を選択した⁵¹。これらの^{99m}Tc錯体は比較的嵩高い構造であるため、結合親和性への影響を抑えるために、アミリンへの結合に必要な部位と錯体部位とができるだけ離れるように、PBFとキレート構造の間にスペーサーとしてトリエチレングリコールを導入した。また、IPBFへのリンカーの導入は、前項で親和性への影響が小さいことが明らかとなったIPBFのヨウ素の位置に導入した。以上を踏まえて、新規^{99m}Tc標識PBF誘導体として、^{[99mTc]TPBF-1}および^{[99mTc]TPBF-2}の2つの化合物(Figure 2-5)を設計・合成し、アミリンイメージングプローブとして評価した。

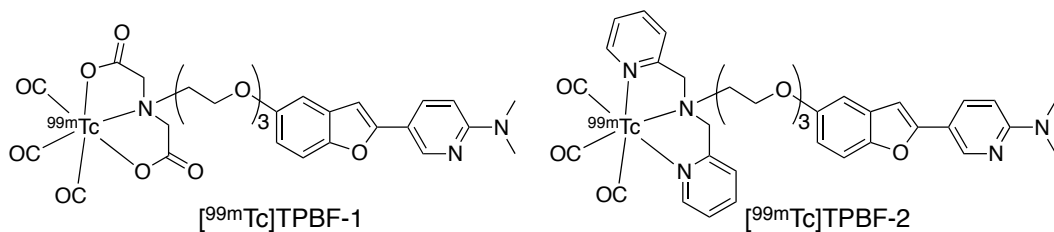


Figure 2-5. Chemical structure of ^{[99mTc]TPBF-1} and ^{[99mTc]TPBF-2}.

2.1.4. 実験方法

試薬・機器

第1章および第2章第1節第1項と同じ試薬・機器を使用した。また、¹H-NMRには、日本電子株式会社製 JNM-ECS400 あるいは JNM-ECA500 を使用した。大気圧化学イオン化質量分析(APCI-MS)およびエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)には、株式会社島津製作所製高速クロマトグラフ質量分析計 LCMS-2020 を用いて測定した。高速原子衝撃質量分析(FAB-MS)には、日本電子株式会社製 GCMate II を用いて測定した。マイクロウェーブ照射装置は、CEM社製 DISCOVER LABMATE を使用した。分取用 TLC (PTLC)は和光純薬株式会社製NH₂シリカゲル 60F₂₅₄プレート・ワコー(層厚0.5 mm)を使用した。リサイクル分取 HPLC は日本分析工業株式会社製 LC-9101 を用い、GPC カラムは JAIGEL-2H カラムを用い、クロロホルムを移動相として使用した。Na^{99m}TcO₄ は日本メジフィジックス株式会社より購入した。Isolink kit は Paul Scherrer Institute より購入した。

PBF 誘導体の合成

Di-tert-butyl 2,2'-((2-(2-(2-(tosyloxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)azanediyl)diacetate (1).

Triethylene glycol bis(*p*-toluenesulfonate) (1.10 g, 2.4 mmol)の DMF 溶液(5 mL)に di-tert-butyl iminodiacetate (490.6 mg, 2.0 mmol)および炭酸セシウム(977.5 mg, 3.0 mmol)を加えて、60°C で 10 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製して目的物 **1** を収量 433.6 mg (40.8%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.16 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), m (3.62-3.48, 10H), 2.92 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.45 (s, 18H).

5-Iodo-*N,N*-dimethylpyridine-2-amine (2).

2-Amino-5-iodopyridine (1.10 g, 5 mmol)の酢酸懸濁液(20 mL)にパラホルムアルデヒド(1.50 g, 50 mmol)およびシアノ水素化ホウ素ナトリウム(942.6 mg, 15 mmol)を加えた。室温で 24 時間攪拌した後、氷と 2 N NaOH 水溶液を順に加えて反応を停止し、酢酸エチル(100 mL×2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/5)で精製して目的物 **2** を収量 1.162 g (93.7%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.05 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 249 [MH⁺].

5-(5-Methoxybenzofuran-2-yl)-*N,N*-dimethylpyridin-2-amine (3).

5-Methoxybenzofuran-2-boronic acid (959.9 mg, 5 mmol)をジオキサン(25 mL)に溶解させ、化合物 **2** (1.24 g, 5 mmol), テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(577.8 mg, 0.5 mmol), 2 M 炭酸ナトリウム水溶液(5 mL)を加えた。反応液を 105°C で 2.5 時間攪拌した後、室温に戻して超純水を加え、酢酸エチル(60

mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/3)で精製して目的物 **3** を収量 788.8 mg (58.8%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 6.83 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 6.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.16 (s, 6H).

2-(6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)benzofuran-5-ol (4).

化合物 **3** (788.8 mg, 2.94 mmol)のジクロロメタン溶液(15 mL)を-78°Cに冷却し、1 M 三臭化ホウ素ジクロロメタン溶液(14.7 mL)を滴下して加えた。反応液を0°Cで0.5時間攪拌した後、室温に戻してそのまま1時間攪拌した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および2 N 塩酸を加えて反応を停止させるとともに中和した後、クロホルム(70 mL)および酢酸エチル(70 mL)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製して目的物 **4** を収量 500.8 mg (67.0%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.14 (s, 1H), 8.60 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.92 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.87 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.67 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 3.09 (s, 6H).

Di-tert-butyl

2,2'-((2-(2-(2-((2-(6-(dimethylamino)pyridin-3-yl)benzofuran-5-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)azanediyl)diacetate (5).

化合物 **1** (265.8 mg, 0.5 mmol)のDMF溶液(5 mL)に化合物 **4** (127.1 mg, 0.5 mmol)および炭酸セシウム(244.4 mg, 0.75 mmol)を加えた。反応液を60°Cで6時間攪拌した後、反応液を室温に戻し、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 3/1)で精製して目的物 **5** を収量 249.9 mg (81.4%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.86 (dd, *J* = 8.3, 2.3 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J* = 8.9, 2.3 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.57 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 4.16 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.87 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.74-3.72 (m, 2H), 3.66-3.63 (m, 4H), 3.50 (s, 4H), 3.15 (s, 6H), 2.96 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.45 (s, 18H). MS (ESI) *m/z* 614 [MH⁺].

2,2'-((2-(2-(2-((2-(6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)benzofuran-5-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)azanediyl)diacetic acid (L¹) (6).

化合物 **5** (249.9 mg, 0.407 mmol)のジクロロメタン溶液(5 mL)にトリフルオロ酢酸(TFA) (1 mL)を加えて、室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣をHPLC(カラム:ナカライテスク株式会社Cosmosil 5C₁₈-AR-II 20 x 250 mm column, 移動相: 5 mL/min, MeCN / H₂O / TFA = 40/60/0.1)で精製して目的物 **6** を収量 83.9 mg (41.1%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.38 (dd, *J* = 9.7, 2.0 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.44 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.97 (dd, *J* =

9.2, 2.6 Hz, 1H), 4.22 (s, 4H), 4.19-4.17 (m, 2H), 3.89-3.87 (m, 4H), 3.75-3.74 (m, 2H), 3.68-3.66 (m, 2H), 3.59-3.57 (m, 2H), 3.34 (s, 6H). MS (ESI) m/z 502 [MH⁺].

fac-[Re(CO₃)L¹] (7: Re-1).

化合物 **6** (20 mg, 0.040 mmol)のメタノール溶液(2 mL)に triaquatricarbonylrhenium bromide (21 mg, 0.052 mmol)を加え, さらに 2 N NaOH 水溶液を加えて pH 7 に調整した後, マイクロウェーブ照射下で 1 分間 110°C に加熱した. 溶媒を減圧留去し, 得られた残渣を HPLC (カラム: ナカライテスク株式会社製 Cosmosil 5C₁₈-AR-II 20 x 250 mm column, 移動相: 5 mL/min, MeCN / H₂O / TFA = 30/70/0.1 (0 min) ~ 80/20/0.1 (60 min))で精製して目的物 **7** を収量 24.3 mg (79.2%)で得た. ¹H NMR (500 MHz, pyridine-*d*₅) δ 8.95 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.47 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.06 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.58 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.26 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 4.22-4.11 (m, 4H), 3.85 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.81-3.78 (m, 4H), 3.65-3.58 (m, 4H), 2.97 (s, 6H). MS (ESI) m/z 770 [M]. HRMS (FAB+) m/z calcd for C₂₈H₃₁N₃O₁₁Re [MH₂⁺] 772.1516, found 772.1517.

2-(2-(2-((2-(6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)benzofuran-5-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (8).

化合物 **4** (479.7 mg, 1.89 mmol)の DMF 溶液(10 mL)に炭酸セシウム(923.7 mg, 2.84 mmol)および triethylene glycol bis(*p*-toluenesulfonate) (4.33 g, 9.45 mmol)を加えた. 反応液を 60°C で 2 時間攪拌した後, 反応液を室温に戻し, 超純水を加え, 酢酸エチル(80 mL×2)で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **8** を収量 756.9 mg (74.2%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.87 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.00 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.58 (d, *J* = 9.0, 1H), 4.18-4.13 (m, 4H), 3.85 (t, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.72-3.62 (m, 6H), 3.16 (s, 6H), 2.42 (s, 3H). MS (ESI) m/z 541 [MH⁺].

5-(5-(2-(2-(2-(bis(pyridin-2-ylmethyl)amino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)benzofuran-2-yl)-*N,N*-dimethylpyridin-2-amine (L²) (9).

化合物 **8** (54.0 mg, 0.1 mmol)の DMF 溶液(1 mL)に bis(2-pyridinmethyl)amine (90 μL, 0.5 mmol)および炭酸カリウム(69.1 mg, 0.5 mmol)を加えた. 反応液を 80°C で 5 時間攪拌した後, 反応液を室温に戻し, 超純水を加え, 酢酸エチル(20 mL×2)で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 得られたアミノシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 3/1) およびリサイクル HPLC (移動相: クロロホルム)で精製して目的物 **9** を収量 40.1 mg (70.6%)で得た. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (s, 1H), 8.51 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 7.86 (dd, *J* = 9.2, 2.6 Hz, 1H), 7.64-7.56 (m, 4H), 7.34 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.11 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.83 (dd, *J* = 7.7, 2.6 Hz, 1H), 6.73 (s,

1H), 6.57 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.13 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H), 3.90 (s, 4H), 3.86 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 3.72-3.59 (m, 6H), 3.15 (s, 6H), 2.84 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H). MS (ESI) m/z 568 [MH^+].

fac-[Re(CO₃)L²] (10: Re-2).

化合物 **9** (28.4 mg, 0.050 mmol)のエタノール溶液(1 mL)に triaquatricarbonylrhenium bromide (30.3 mg, 0.075 mmol)を加え、マイクロウェーブ照射下で1分間 110°C に加熱した。反応液を室温に戻してセライト濾過した後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をアミノプロピル PTLC (クロロホルム/メタノール = 10/1)および HPLC (カラム: ナカライテスク株式会社製 Cosmosil 5C₁₈-AR-II 20 x 250 mm column, 移動相: 5 mL/min, MeCN / H₂O / TFA = 40/60/0.1 (0 min) ~ 80/20/0.1 (60 min))で精製して目的物 **10** を収量 14.4 mg (30.3%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CD₃CN) δ 8.70 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 8.56 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.18 (dd, $J = 9.4, 2.0$ Hz, 1H), 7.71-7.69 (m, 2H), 7.34-7.30 (m, 3H), 7.20 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 7.07 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H), 7.01-7.00 (m, 2H), 6.77 (dd, $J = 9.2, 2.9$ Hz, 1H), 4.79-4.71 (m, 4H), 4.14-4.13 (m, 2H), 3.97-3.91 (m, 4H), 3.86-3.85 (m, 2H), 3.75-3.72 (m, 4H), 3.25 (s, 6H). HRMS (FAB+) m/z calcd for C₃₆H₃₇N₅O₇Re [M^+] 838.2251, found 838.2252.

^{99m}Tc 標識体の合成

Na^{99m}TcO₄ (185-370 MBq)を含有した生理食塩水(1 mL)を Isolink kit バイアルに加えて、100°C で20分間加熱した。室温に戻した後、2 N 塩酸を加えて pH 7 に調整し、^{99m}Tc 含有溶液(300 μ L)を化合物 **6** (1.0 mg)のメタノール溶液(300 μ L)あるいは化合物 **9** (1.0 mg)のエタノール溶液(300 μ L)と混和し、マイクロウェーブ照射下で5分間 110°C に加熱した。有機溶媒をアルゴン気流下で留去した後、逆相 HPLC ([^{99m}Tc]TPBF-1: MeCN/H₂O/TFA = 25/75/0.1 (0-10 min) ~ 60/40/0.1 (30 min), [^{99m}Tc]TPBF-2: MeCN/H₂O/TFA = 30/70/0.1 (0 min) ~ 55/45/0.1 (30 min))を用いて精製した。

Log P 値測定

1-オクタノール(3 mL)および PBS (pH 7.4, 3 mL)が入った遠心管に放射性リガンドを加え、ボルテックス(30 sec \times 3)した後、4,000 \times g で5分間遠心分離した。各層から 500 μ L ずつ溶液を採取した後、それぞれの放射能を測定した。さらに残りの1-オクタノール層から 1 mL を別の遠心管に移し、1-オクタノール(2 mL)および PBS (pH 7.4, 3 mL)を加えて、同様にボルテックスし、遠心分離した後、各層の放射能を測定した。この操作をもう一度繰り返し、それぞれの1-オクタノール/PBS の放射能比から分配係数を求めた。

アミリン凝集体の作製

第2章第1節第1項と同様の方法を用いて行った。

アミリン凝集体を用いた *in vitro* 結合性評価

^{99m}Tc 標識 PBF 誘導体(4.8 kBq)およびアミリン凝集体(6.25-100 nM)を室温で3時間インキュベートした。

混和溶液を M-24 セルハーベスターおよび GF/B フィルターを用いて吸引濾過し、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定した。

IPBF を競合リガンドとした結合阻害実験

第 2 章第 1 節第 1 項と同様の方法を用いて行った。

T2DM 患者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG

パラフィン包埋された T2DM 患者(69 歳女性)および健常者(28 歳男性)膵臓組織切片を、キシレン(15 min × 2), 100% EtOH (1 min × 2), 90% EtOH (1 min × 1), 70% EtOH (1 min × 1)および超純水(2.5 min × 2)で洗浄することで脱パラフィン処理を行った。 [^{99m}Tc]TPBF-1 あるいは [^{99m}Tc]TPBF-2 溶液 (555 kBq/mL)を添加し、室温で 1 時間インキュベートした。超純水(1 min × 2)で洗浄後、イメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。さらに、同一切片を用いて ThS によるアミロイド蛍光染色、隣接切片を用いてアミリンの免疫染色を行った。

T2DM 患者および健常者膵臓組織切片を用いた ThS 蛍光染色

第 2 章第 1 節第 1 項と同様の方法を用いて行った。

T2DM 患者および健常者膵臓組織切片を用いた免疫染色

第 2 章第 1 節第 1 項と同様の方法を用いて行った。

マウス血漿中における安定性評価

5 週齢 ddY 系雄性マウスをイソフルランで麻酔して心臓採血を行った。採取した血液は 1,000 × g で 30 分間遠心分画し、上清を回収することで血漿を得た。 [^{99m}Tc]TPBF-1 あるいは [^{99m}Tc]TPBF-2 の 10% EtOH 生理食塩水溶液(50 μL)およびマウス血漿サンプル(250 μL)を混合し、37°C で 2 時間インキュベートした。メタノール(600 μL)を加えた後、10,000 × g で 5 分間遠心分画した。上清を回収してナカライテスク株式会社製 Cosmonice Filter (S) (0.45 μm, 4 mm)で処理した後、逆相 HPLC で分析した。

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

[^{99m}Tc]TPBF-1 あるいは [^{99m}Tc]TPBF-2 を 10% EtOH 生理食塩水で希釈した。1 群 5 匹の 5 週齢 ddY 系雄性マウスに、尾静脈より 1 匹あたり 15.1-20.2 kBq (100 μL)の化合物を投与し、2, 10, 30, 60 分後に屠殺、採血後、主要な臓器を摘出し、重量と放射能を測定した。

膵島アミロイドモデルマウスの作製

アミリン凝集体は、アミリン(0.55 mg)を DMSO (10 μL)に溶解後、20 mM Tris/NaCl-100 mM NaCl (pH 7.5) (90 μL)で希釈することで作製した。8-10 週齢の BALB/c-*nu/nu* 雄性マウスをイソフルランで麻酔し、左背

側部を 10 mm 程度切開し、アミリン凝集体(50 μ L)を腓尾部の 2-3 箇所に分けて、29 ゲージの固定針シリンジを用いて注入した。コントロールマウスには、DMSO (5 μ L)と 20 mM Tris/NaCl-100 mM NaCl (pH 7.5) (45 μ L)の混合溶液を注入した。膵臓を腹部に戻し、絹製縫合糸を用いて切開部を縫合した。膵島アミロイドモデルマウスおよびコントロールマウスを用いた評価は、全て施術 1 日後に実施した。

膵島アミロイドモデルマウスの膵臓組織染色

膵島アミロイドモデルマウスを屠殺後、直ちに膵臓を摘出し、SCEM compound で包埋し、ドライアイス-ヘキサナバスで凍結させた。その後、マイクロトームを用いて 30 μ m 厚の凍結切片を作製した。

ThS 蛍光染色は、ThS の 50% EtOH 溶液(100 μ M)を切片に添加し、超純水で洗浄した後、蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行った。

アミリンの免疫染色は、1 次抗体に抗アミリンモノクローナル抗体(R10/99, GeneTex Inc.)を用いて行った。抗原賦活化として 10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)中におけるオートクレーブ(121°C, 15 min)を行い、PBS (3 min \times 2)で洗浄した。1 次抗体と室温で終夜反応させた後、PBS (3 min \times 3)で洗浄した。ビオチン標識抗マウス抗体と室温で 1.5 時間反応させた後、PBS (3 min \times 3)で洗浄した。ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体と室温で 1 時間反応させた後、PBS (3 min \times 2)および TBS (3 min \times 1)で洗浄した。最後に DAB 溶液と室温で 5 分反応させた。超純水で洗浄し、反応を停止した。最後に切片を封入し、顕微鏡で観察した。

膵島アミロイドモデルマウスを用いた膵臓集積評価

[^{99m}Tc]TPBF-1 を 10% EtOH 生理食塩水で希釈した。1 群 5 匹の膵島アミロイドモデルマウスおよびコントロールマウスに、尾静脈より 1 匹あたり 26.1 kBq (100 μ L)の化合物を投与し、60 分後に屠殺後、膵臓を摘出し、重量と放射能を測定した。

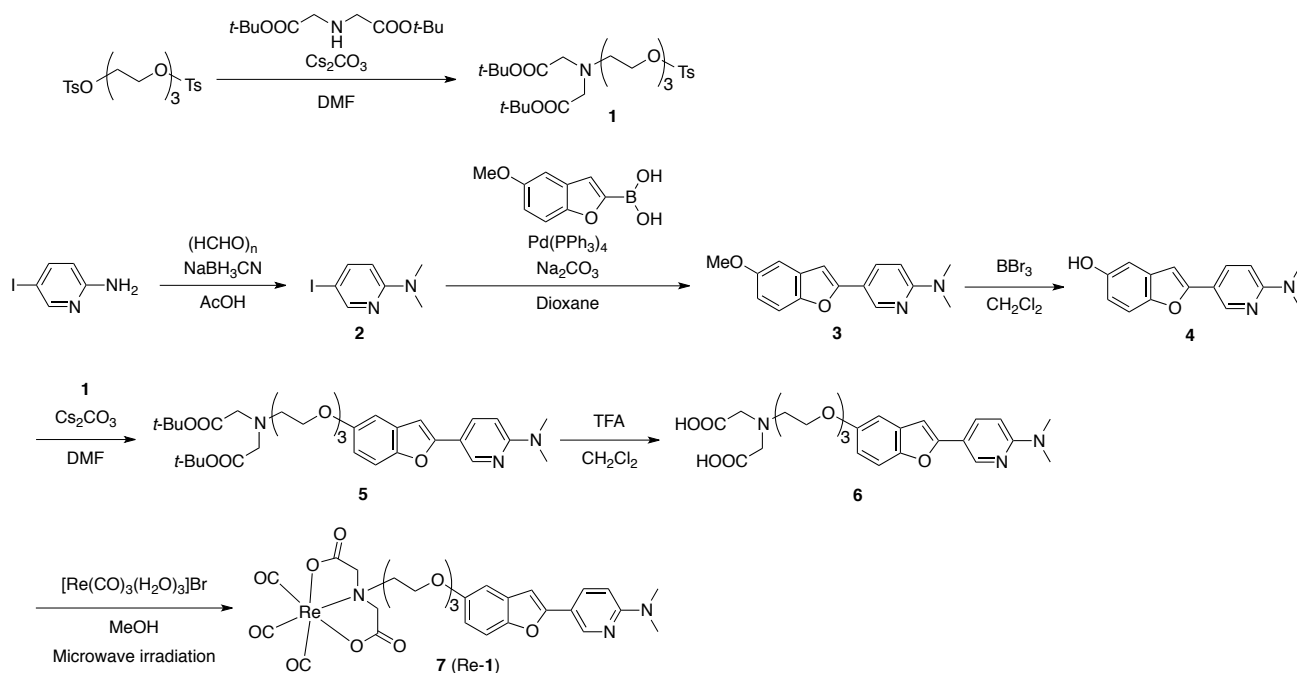
膵島アミロイドモデルマウスを用いた *ex vivo* ARG

10% EtOH 生理食塩水に溶解した[^{99m}Tc]TPBF-1 (66.6 MBq, 200 μ L)あるいは[^{99m}Tc]TPBF-2 (29.6 MBq, 200 μ L)を、膵島アミロイドモデルマウスあるいはコントロールマウスに尾静脈より投与した。投与 30 分後に屠殺後、直ちに膵臓を摘出し、マイクロトームを用いて 30 μ m 厚の凍結切片を作製した。切片をイメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。さらに、同一切片を用いて ThS によるアミロイド蛍光染色を行った。

2.1.5. 結果と考察

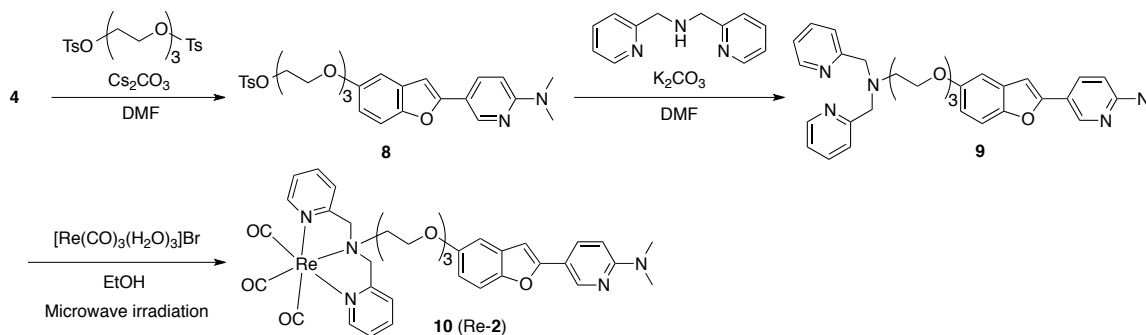
TPBF-1 および TPBF-2 の合成

Scheme 2-1 に $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 の標識前駆体および Re 錯体 (Re-1) の合成経路を示す。2-Amino-5-iodopyridine を出発原料として、鈴木・宮浦カップリングによるピリジルベンゾフラン骨格の形成を経て、6 段階の反応で標識前駆体を 4.9% の収率で得た。さらに、マイクロウェーブ照射加熱下で triaquatricarbonylrhenium bromide と反応させることで Re-1 を収率 79.2% で得た。



Scheme 2-1. Synthetic route for the precursor of $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 and Re-1.

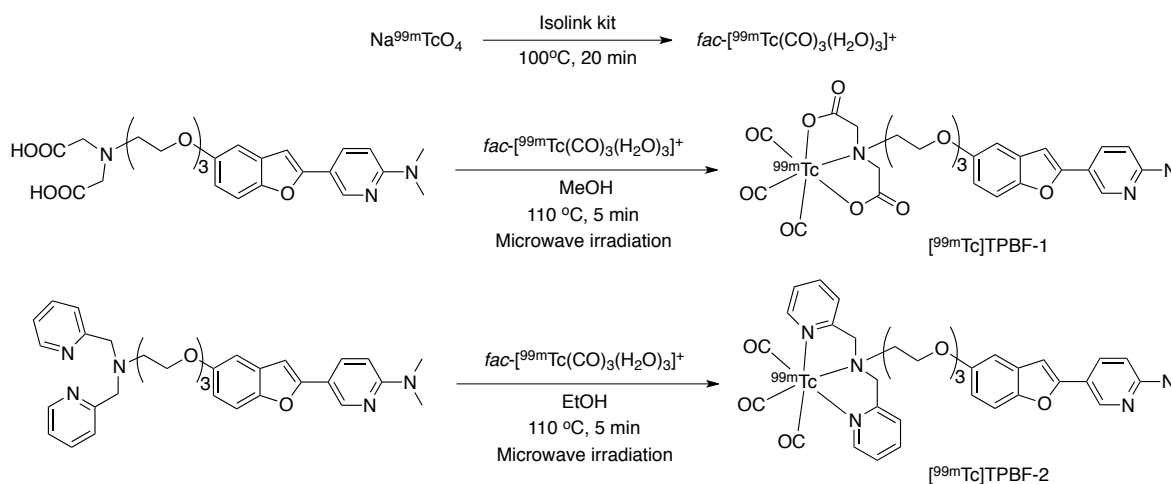
Scheme 2-2 に $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-2 の標識前駆体および Re 錯体 (Re-2) の合成経路を示す。化合物 4 から 2 段階の反応で標識前駆体を 52.4% の収率で得た。さらに、マイクロウェーブ照射加熱下で triaquatricarbonylrhenium bromide と反応させることで Re-2 を収率 30.3% で得た。



Scheme 2-2. Synthetic route for the precursor of $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-2 and Re-2.

^{99m}Tc 標識 PBF 誘導体の合成

Scheme 2-3 に [^{99m}Tc]TPBF-1 および [^{99m}Tc]TPBF-2 の ^{99m}Tc 標識経路を示す。まず, Isolink kit に Na^{99m}TcO₄ 溶液を加えて 100°C で 20 分間加熱し, *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ を調製した。2 N NaOH 水溶液を適量加えて pH 7.0 に調製した後, 標識前駆体を加えて, マイクロウェーブ照射下 110°C で 5 分間加熱し, [^{99m}Tc]TPBF-1 および [^{99m}Tc]TPBF-2 をそれぞれ放射化学定収率 73.5% および 54.3%, 放射化学的純度 95% 以上で得た。



Scheme 2-3. Radiolabeling of [^{99m}Tc]TPBF-1 and [^{99m}Tc]TPBF-2.

アミリン凝集体を用いた *in vitro* 結合性評価

[^{99m}Tc]TPBF-1 および [^{99m}Tc]TPBF-2 の結合性を評価するために, アミリン凝集体を用いた *in vitro* 結合性評価を行った。その結果, いずれの化合物もアミリンの濃度依存的な結合性が認められたが, [^{99m}Tc]TPBF-1 は [^{99m}Tc]TPBF-2 に比較して高い結合親和性を有することが示された(Figure 2-5)。

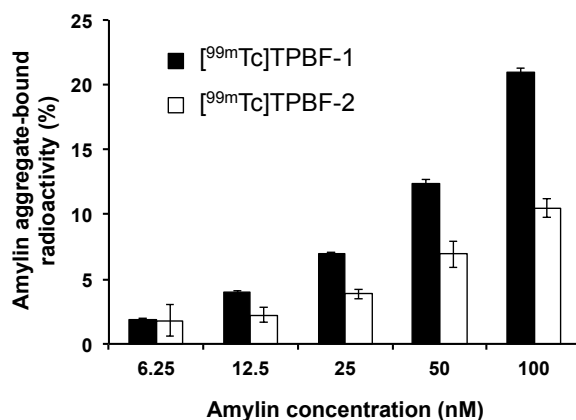


Figure 2-5. Binding of [^{99m}Tc]TPBF-1 and [^{99m}Tc]TPBF-2 with amylin aggregates.

Values are the means ± standard errors of three independent determinations.

[¹²⁵I]IPBF を競合リガンドとした結合阻害実験

[^{99m}Tc]TPBF-1 および [^{99m}Tc]TPBF-2 の結合親和性を定量的に評価するために [¹²⁵I]IPBF を競合リガンドとした結合阻害実験を行った。 ^{99m}Tc には安定同位体が存在しないため、同族元素である Re の錯体を非標識体として代用することで評価した。 その結果、 [^{99m}Tc]TPBF-1 の非標識体に対応する Re-1 の K_i 値は 146 nM, [^{99m}Tc]TPBF-2 の非標識体に対応する Re-2 の K_i 値は 3,430 nM となり、 Re-1 は Re-2 に比べて 20 倍以上高い結合親和性を示した (Table 2-3)。 この結果は、 ^{99m}Tc 標識体を用いた結合性評価の結果を支持している。

[^{99m}Tc]TPBF-1 と [^{99m}Tc]TPBF-2 の親和性の違いは、トリカルボニル錯体部位の立体的な嵩高さの違いに起因すると考えられる。 DPA は IDA に比較してより嵩高い構造のため、アミリン凝集体との結合への影響が大きく、大幅に親和性が低減したと考えられる。 また、 IDA は ^{99m}Tc 及び Re と錯体を形成した際、1 価の負電荷を帯びるのに対して、DPA は錯体を形成すると 1 価の正電荷を帯びることが知られており⁵¹、この電荷の違いが親和性に影響を与えた可能性も考えられる。

[^{99m}Tc]TPBF-1 は [^{99m}Tc]TPBF-2 に比べると高い結合親和性を示したが、 IPBF (K_i 値 2.66 nM) と比較すると親和性は大幅に減少する結果となった。 [^{99m}Tc]TPBF-1 の分子設計において、錯形成部位はコンパクトな錯体を形成する IDA を選択しており、さらに、錯体部位の結合性への影響を低減するためにスペーサーとしてトリエチレングリコールを導入している。 しかし、このような錯体部位への分子設計上の配慮にもかかわらず親和性の低減が認められたことから、錯体部位の結合性への影響は極めて大きいことが示唆された。

Table 2-3. Inhibition study with [¹²⁵I]IPBF.

Compound	K_i (nM)*
Re-1	146 ± 47.5
Re-2	3,430 ± 447
IPBF	2.66 ± 0.554

*Values are expressed as the means ± standard errors of three independent determinations.

T2DM 患者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG

^{99m}Tc 標識 PBF 誘導体に関して、T2DM 患者および健常者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG を行った。その結果、TPBF-2 では顕著な放射能集積は認められなかった(Figure 2-6G)。一方、 ^{99m}Tc [TPBF-1 では、T2DM 患者膵臓組織において多数の放射能集積部位が認められ(Figure 2-6A)、さらに、これらの部位の局在は、隣接切片を用いた ThS 染色陽性部位(Figure 2-6B)およびアミリン免疫染色陽性部位(Figure 2-6C)と一致した。また、 ^{99m}Tc [TPBF-1 は健常者膵臓組織切片に対して結合性を示さず(Figure 2-6D)、正常組織への非特異的集積はきわめて低いことが示された。これらの結果は結合性評価および結合阻害実験の結果と一致しており、膵島アミロイドへの結合性は親和性の差異を反映したものであると考えられる。

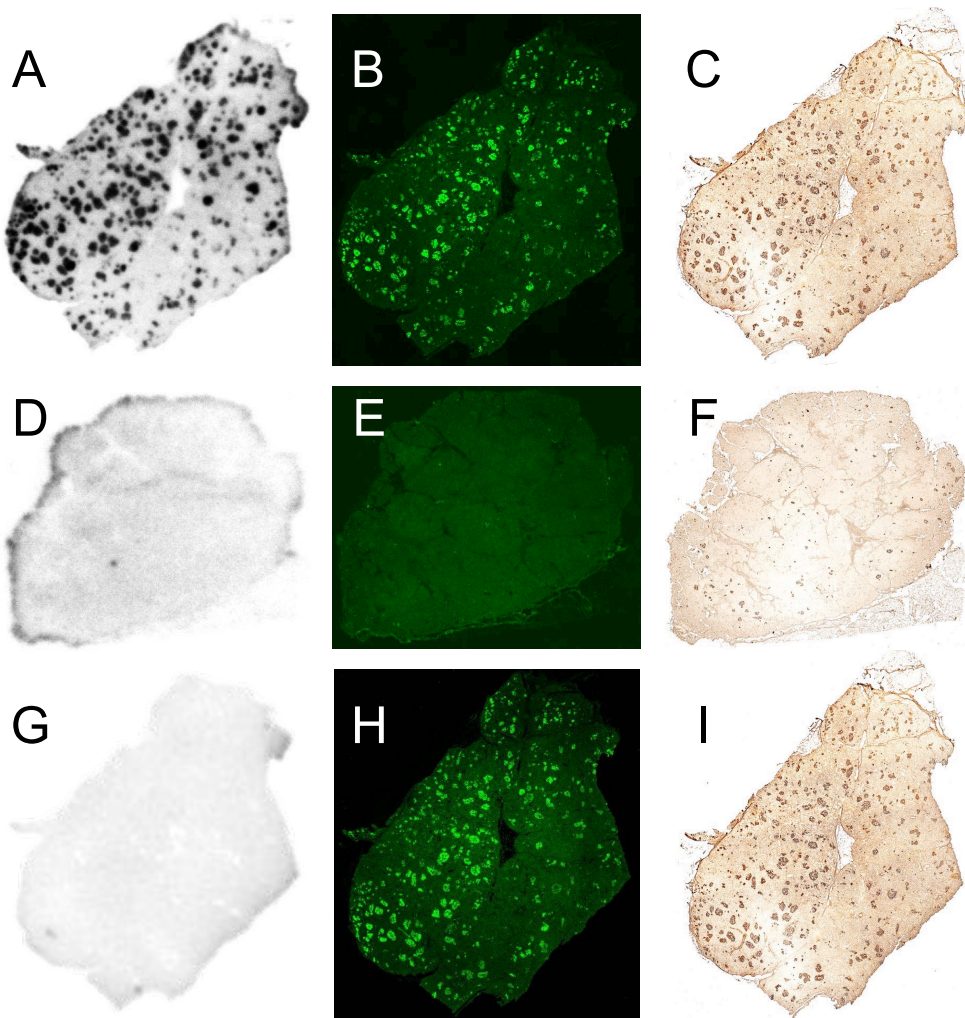


Figure 2-6. *In vitro* autoradiography of ^{99m}Tc [TPBF-1 (A), ThS staining (B), and immunohistochemical staining with an antibody against amylin (C) using pancreatic sections from a T2DM patient. *In vitro* autoradiography of ^{99m}Tc [TPBF-1 (D), ThS staining (E), and immunohistochemical staining with an antibody against amylin (F) in the healthy control pancreatic sections. *In vitro* autoradiography of ^{99m}Tc [TPBF-2 (G), ThS staining (H), and immunohistochemical staining with an antibody against amylin (I) using pancreatic sections from a T2DM patient.

マウス血漿中における安定性評価

[^{99m}Tc]TPBF-1 および [^{99m}Tc]TPBF-2 の安定性を評価するために、マウス血漿中における分解物を評価した。その結果を Figure 2-7 に示す。それぞれの化合物の ^{99m}Tc 標識体をマウス血漿中で 2 時間インキュベートした後も分解物は認められなかったため、これらの化合物はマウス血漿中において十分に安定であることが示された。

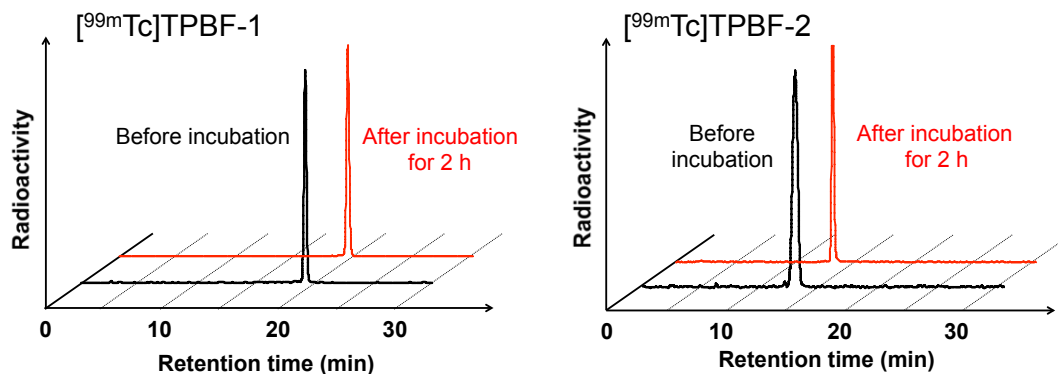


Figure 2-7. Stability of [^{99m}Tc]TPBF-1 and [^{99m}Tc]TPBF-2 in the mouse plasma.

正常マウスを用いた放射能体内分布評価

[^{99m}Tc]TPBF-1 および [^{99m}Tc]TPBF-2 の体内動態を評価するために、正常マウスにおける放射能分布実験を行った。その結果を Figure 2-8 および Table 2-4 に示す。いずれの化合物も投与初期における膵臓への移行性は低値を示した（投与後 2 分における膵臓放射能は、 [^{99m}Tc]TPBF-1 は 0.74 %ID/g, [^{99m}Tc]TPBF-2 は 1.37%ID/g）。 [^{99m}Tc]TPBF-1 は投与後早期に肝臓へ大部分が移行し、その後経時的に腸へ移行した。 [^{99m}Tc]TPBF-2 についても同様に投与後早期に肝臓に集積し、経時的な腸への移行を認めたが、体外への排泄には腎排泄も関与していることが示された。

この実験系では、アミリン蓄積のない正常マウスを用いているため、膵臓における放射能の挙動は、投与後早期に高く移行すること、および、正常組織への非特異的な集積を示さず速やかな膵臓から消失すること、の 2 点が求められる。しかし、今回評価した化合物はいずれも膵臓への移行量は低値を示した。特に、 [^{99m}Tc]TPBF-1 は投与した大部分が肝臓を介した排泄を受けていると示唆され、このことが膵臓への移行性を減じている一因であると考えられる。一般的に、脂溶性の高い低分子化合物は、主に肝臓から排泄され、その後腸管に移行する傾向にある。 [^{99m}Tc]TPBF-1 の母核であるピリジルベンゾフランは比較的脂溶性の高い骨格であるため、この脂溶性が一因となっていると考えられる。しかし、 [^{99m}Tc]TPBF-1 の LogP 値は 1.74 と中程度であり、LogP 値が 2.18 と [^{99m}Tc]TPBF-1 よりも脂溶性の高い [^{99m}Tc]TPBF-2 よりも肝臓集積量が高いため、 [^{99m}Tc]TPBF-1 の肝臓への集積性はその脂溶性によるものだけではないと考えられる。 [^{99m}Tc]TPBF-1 と同じく錯体形成部位に IDA を有する放射性リガンドは多数報告されており、中には、脂溶性が低い、あるいは、中程度であるにもかかわらず肝臓へ高く集積するものもいくつか報告されている^{52, 53}。このことから、 [^{99m}Tc]TPBF-1 の肝臓への集積性には、IDA の特性が関与しているものと考えられる。

膵臓の近傍に位置する肝臓などの臓器への高い集積は、アミリンの生体イメージングにおいてノイズ

となるため、その実現において大きな障害になりうる。そのため、肝臓への集積量の低減、および膀胱への移行量の増大を指向した、さらなる構造最適化が必要になる。

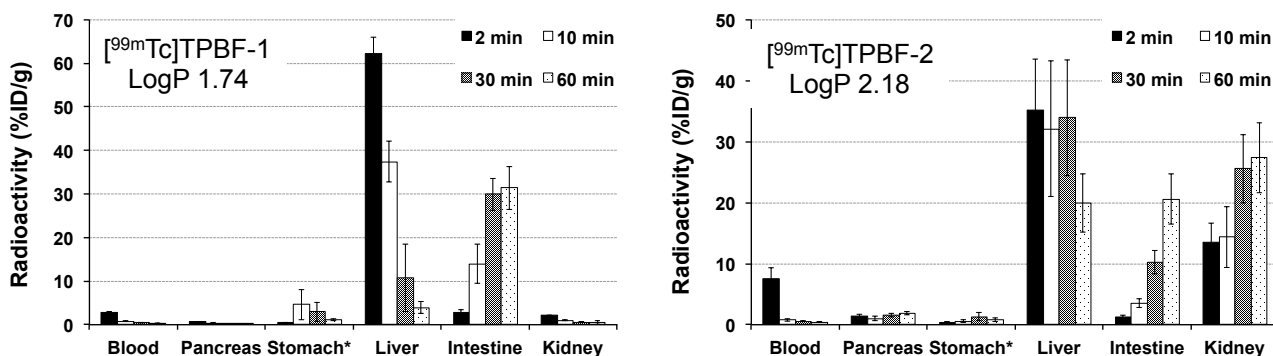


Figure 2-8. Biodistribution of $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 and $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-2 in normal mice.

*Expressed as %ID/organ.

Table 2-4. Biodistribution of $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 and $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-2 in normal mice.^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
$[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 (LogP 1.74)				
Blood	2.84 (0.26)	0.78 (0.08)	0.44 (0.04)	0.35 (0.02)
Pancreas	0.74 (0.07)	0.29 (0.14)	0.14 (0.04)	0.11 (0.01)
Stomach ^b	0.42 (0.12)	4.60 (3.54)	2.99 (2.21)	1.12 (0.25)
Liver	62.12 (3.82)	37.42 (4.67)	10.77 (7.76)	3.95 (1.40)
Intestine	2.89 (0.60)	13.93 (4.49)	29.91 (3.67)	31.37 (4.98)
Kidney	2.10 (0.07)	1.02 (0.10)	0.58 (0.11)	0.48 (0.41)
Spleen	1.25 (0.10)	0.33 (0.03)	0.22 (0.04)	0.18 (0.02)
Lung	3.66 (0.26)	1.19 (0.40)	0.70 (0.28)	0.58 (0.19)
Heart	1.36 (0.07)	0.49 (0.08)	0.25 (0.05)	0.16 (0.01)
Brain	0.08 (0.01)	0.02 (0.01)	0.15 (0.31)	0.02 (0.00)
$[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-2 (LogP 2.18)				
Blood	7.55 (1.75)	0.81 (0.22)	0.55 (0.05)	0.41 (0.07)
Pancreas	1.37 (0.35)	0.99 (0.36)	1.59 (0.31)	1.92 (0.30)
Stomach ^b	0.40 (0.06)	0.59 (0.24)	1.30 (0.64)	0.77 (0.28)
Liver	35.15 (8.37)	32.10 (11.08)	33.90 (9.51)	19.94 (4.75)
Intestine	1.26 (0.32)	3.53 (0.69)	10.28 (1.95)	20.57 (4.12)
Kidney	13.54 (3.13)	14.35 (4.97)	25.54 (5.60)	27.33 (5.70)
Spleen	2.48 (0.77)	1.42 (0.41)	1.38 (0.36)	1.06 (0.25)
Lung	4.42 (1.09)	2.46 (0.48)	2.11 (0.73)	1.33 (0.45)
Heart	2.39 (0.25)	1.20 (0.35)	1.56 (0.44)	1.78 (0.49)
Brain	0.19 (0.04)	0.05 (0.00)	0.04 (0.01)	0.04 (0.01)

^aEach value represents the mean (SD) for 5 animals.

^bExpressed as %ID/organ.

膵島アミロイドモデルマウスの膵臓組織染色

In vitro でアミリンへの結合性を示した $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 に関して、生体中でのアミリンへの結合性を評価するために、膵島アミロイドモデルマウスを作製した。モデルマウスは BALB/c-*nu/nu* マウスの膵臓にアミリン凝集体を直接注入することで作製した。移植したアミリン凝集体がマウス膵臓内に保持されているか確認するために、膵臓の凍結切片を作製し、ThS 蛍光染色およびアミリン免疫染色を実施した。その結果、膵臓中に ThS 蛍光染色の陽性部位が存在したことから(Figure 2-9A), 膵臓内にアミロイドが存在することを確認した。さらに、ThS 染色陽性部位とアミリン免疫染色陽性部位が一致したことから(Figure 2-9B), この膵臓内のアミロイドはアミリンで構成されることが明らかとなり、移植したアミリン凝集体がマウス膵臓内に保持されていることが示された。

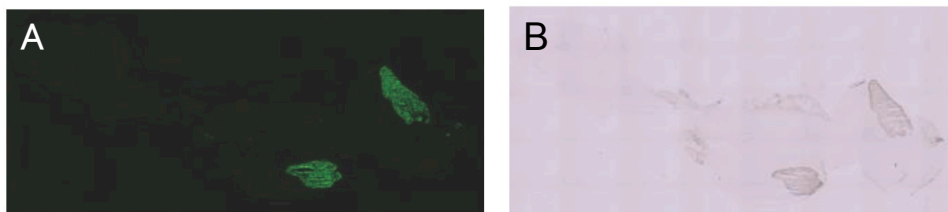


Figure 2-9. Orthotopic amylin aggregate implantation. (A) Thioflavin-S staining with a pancreatic section from a mouse with transplanted amylin aggregates. (B) Immunohistochemical staining with an anti-amylin antibody of an adjacent section.

膵島アミロイドモデルマウスを用いた膵臓集積評価

$[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 の生体中での膵臓内アミリンへの集積性を評価するために、膵島アミロイドモデルマウスを用いた膵臓集積評価を行った。また、アミリン凝集体を含有しない Tris-NaCl 緩衝液のみをマウス膵臓内に注入したものをコントロールマウスとして実験に使用した。 $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 をマウスに尾静脈内投与して 1 時間後の膵臓への集積を比較したところ、有意差は認められなかったものの、モデルマウスでは 0.470%ID/g, コントロールマウスでは 0.296%ID/g とモデルマウス膵臓において 1.6 倍高い集積性を示したことから(Figure 2-10), 生体内においてもアミリンへ集積することを確認した。

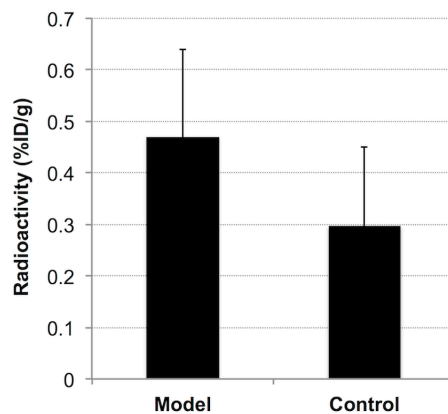


Figure 2-10. Accumulation of $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 in the pancreas of islet amyloid model and control mice at 1 h post-injection.

膵島アミロイドモデルマウスを用いた *ex vivo* ARG

[^{99m}Tc]TPBF-1 および [^{99m}Tc]TPBF-2 のマウス膵臓内における放射能局在を評価するために、膵島アミロイドモデルマウスを用いた *ex vivo* ARG を行った。 [^{99m}Tc]TPBF-1 はモデルマウス膵臓内において顕著に集積する部位が認められ(Figure 2-11A), その集積部位は同一膵臓切片の ThS 蛍光染色の陽性部位と一致し(Figure 2-11B), [^{99m}Tc]TPBF-1 のモデルマウスへの集積は移植したアミリン凝集体への結合を反映したものであることが明らかとなった。また、コントロールマウスにおいても同様の評価を行ったところ、モデルマウスほどの放射能集積は認められず(Figure 2-11C), ThS 蛍光染色も陽性部位は認められなかった(Figure 2-11D)。しかし、モデルマウスおよびコントロールマウスの双方において、ThS 染色陽性部位とは一致しない集積部位が多少認められたため(Figure 2-11A, C), 非特異的な集積も示すことが判明した。ヒト膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG では非特異的な集積はほとんど認められなかったため、生体中の膵臓では *in vitro* とは異なり正常組織においてもある程度結合性を示すことが考えられるが、詳細な原因は明らかではない。

一方、 [^{99m}Tc]TPBF-2 はモデルマウス膵臓において目立った放射能集積部位は認められなかった(Figure 2-11E)。この結果は *in vitro* でのアミリンへの結合親和性の低さを反映したものであると考えられる。

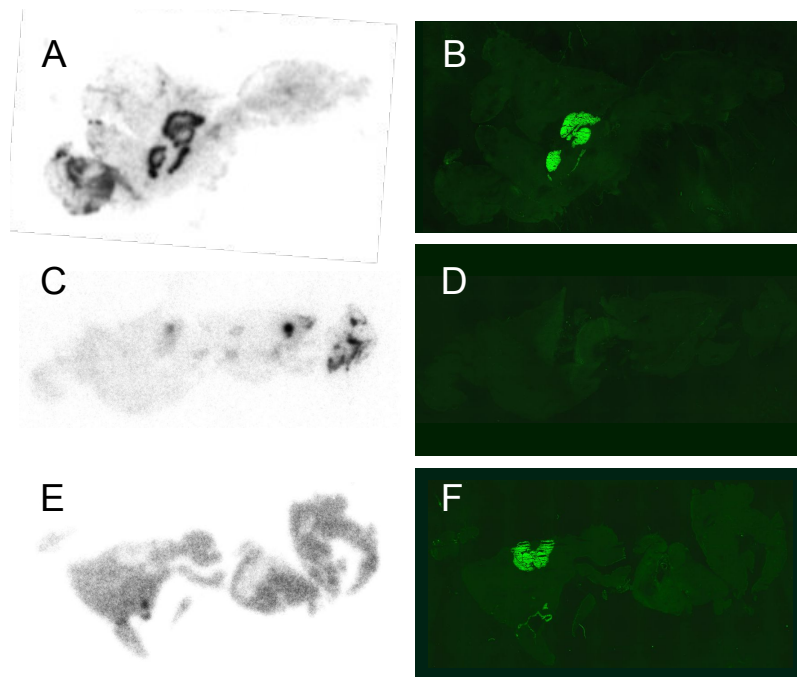


Figure 2-11. *Ex vivo* autoradiography with the islet amyloid model and control mice. (A, E) Autoradiograms of [^{99m}Tc]TPBF-1 and [^{99m}Tc]TPBF-2 using the model mice with amylin aggregates transplanted into the pancreas, respectively. (C) Autoradiogram of [^{99m}Tc]TPBF-1 using the control mouse. (B, D, F) Thioflavin-S staining with the same sections, respectively.

2.1.6. 小括

本節において、前項でアミリンイメージングプローブとしての可能性が示されたピリジルベンゾフラン誘導体について、臨床汎用性の高い核医学分子イメージングプローブの開発を目的として、SPECT用核種として最も利用されている ^{99m}Tc を標識核種とした新規ピリジルベンゾフラン誘導体を設計・合成し、アミリンイメージングプローブとしての有用性を評価し、以下に述べる結果を得た。

- (1) 異なる錯体形成部位を有する2つの ^{99m}Tc 標識ピリジルベンゾフラン誘導体を合成した。
- (2) アミリン凝集体を用いた *in vitro* 結合性評価において、 $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 は $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-2 に比べて高い結合性を示し、Re錯体を用いた評価から、その結合親和性の差は20倍以上あることが示唆された。
- (3) T2DM患者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG において、 $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 は膵島アミロイドへの結合性を示した。
- (4) 正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、 $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 は膵臓への移行量は低値を示した。また、膵臓の近傍に位置する肝臓に高い集積性を示したことから、体内動態改善の必要性が示唆された。
- (5) 膵島アミロイドモデルマウスを外科的手法により作製した。移植したアミリン凝集体がマウス膵臓内に保持されることを確認した。
- (6) 膵島アミロイドモデルマウスを用いた *ex vivo* ARG において、 $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 はマウス膵臓内に移植したアミリン凝集体に結合性を示した。

以上の結果より、ピリジルベンゾフランを母核とした $[^{99m}\text{Tc}]$ TPBF-1 は、体内動態の改善が必要ではあるが、SPECT用アミリンイメージングプローブとして有効である可能性が示された。

第2節

ポジトロン断層撮像用アミリンイメージングプローブとしての フェノキシメチルピリジン誘導体の開発

第2章第1節において、ピリジルベンゾフランを母核とした ^{99m}Tc TPBF-1が、SPECT用アミリンイメージングプローブとして基礎的性質を有することが示された。しかし、TPBF-1は母核であるピリジルベンゾフランの脂溶性が比較的高いこと、また、錯体形成部位のIDAが肝臓に集積性を示す特性を有していると考えられることから、生体内へ投与後早期に大部分が肝臓に移行してしまい、さらに、脾臓への移行性は低値を示すことが明らかとなった。そこで、本研究では、肝臓への集積を低減すること、および、脾臓への初期取り込み量を増大すること、の2点を目的として更なる構造最適化を行うこととした。

まず、母核であるピリジルベンゾフランの炭素を1つ除いた化学構造であるフェノキシメチルピリジン(PMP)を新規母核として採用し、炭素数減少による脂溶性の低減を目指した。置換基には、第2章第1節第1項でアミリンへの結合性に大きく関与することが示唆されたジメチルアミノ基だけでなく、より極性の高いモノメチルアミノ基を導入した化合物も評価することとした。標識核種に関しては、放射性ヨウ素は脂溶性が高いこと、また、金属元素は配位子が必要であり、第2章第1節第2項より金属錯体部位の親和性への影響が大きく、コンパクトな錯体を形成するIDAは肝臓への集積性が疑われたことから、放射性ヨウ素、放射性金属核種以外の新たな標識核種を検討することとした。そこで、PET用核種として最も臨床で利用されている放射性核種である ^{18}F が、コンパクトな水溶性リンカーを介して導入できるという点に着目し、PET用アミリンイメージングプローブとして6種類の ^{18}F 標識PMP誘導体(^{18}F FPMP-1~6)を設計・合成し、第2章第1節と同様の方法を用いて評価した。

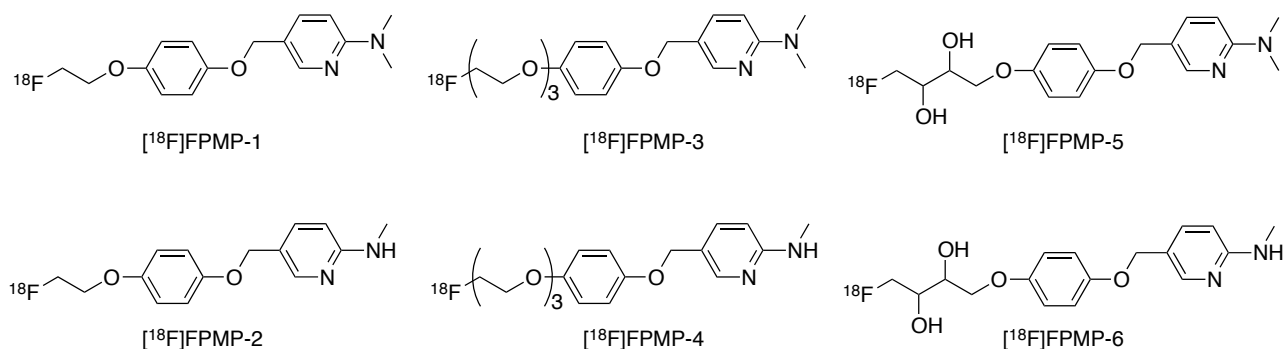


Figure 2-12. Chemical structure of ^{18}F labeled PMP derivatives.

2.2.1. 実験方法

試薬・機器

第1章および第2章第1節と同じ試薬・機器を使用した。また、高速原子衝撃質量分析(FAB-MS)には、日本電子株式会社製 JMS-700 を用いて測定した。

PMP 誘導体の合成

Methyl 6-(dimethylamino)nicotinate (11).

Methyl 6-aminonicotinate (1.52 g, 10 mmol)を酢酸(40 mL)に溶解し、パラホルムアルデヒド(3.0 g, 100 mmol)およびシアノ水素化ホウ素ナトリウム(1.88 g, 30 mmol)を加えた。室温で23時間攪拌した後、0°Cに冷却して2 N NaOH水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチル(100 mL×2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/3)で精製して目的物 **11** を収量 1.54 g (85.5%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.80 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 8.00 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.17 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 181 [MH⁺].

(6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)methanol (12).

脱水 THF (20 mL)を-78°Cに冷却して、水素化アルミニウムリチウム(655 mg, 17.3 mmol)を少しずつ加え、さらに、化合物 **11** (1.56 g, 8.63 mmol)の脱水 THF 溶液(20 mL)を滴下して加えた。-78°Cで4.5時間攪拌した後、0°Cでさらに1時間攪拌した。0°Cで超純水(3 mL), 2 N NaOH水溶液(3 mL), 超純水(3 mL)を順に加えて反応を停止し、セライト濾過した後、酢酸エチル(70 mL×2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 5/1)で精製して目的物 **12** を収量 1.02 g (77.4%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 6.51 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.53 (s, 2H), 3.09 (s, 6H), 1.70 (s, 1H). MS (ESI) *m/z* 153 [MH⁺].

Methyl 6-(methylamino)nicotinate (13).

Methyl 6-chloronicotinate (2.0 g, 11.7 mmol)の DMF 溶液(20 mL)にメチルアミン(30%メタノール溶液, 4 mL)を加え、50°Cで19時間攪拌した。反応液を室温に戻し、超純水を加え、酢酸エチル(70 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製して目的物 **13** を収量 764.1 mg (39.4%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 5.05 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.99 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H). MS (ESI) *m/z* 167 [MH⁺].

(6-(Methylamino)pyridin-3-yl)methanol (14).

脱水 THF (15 mL)を-78°Cに冷却して、水素化アルミニウムリチウム(349.1 mg, 9.20 mmol)を少しずつ加

え、さらに、化合物 **13** (764.1 mg, 4.60 mmol)の脱水 THF 溶液(15 mL)を滴下して加えた。-78°C で 3 時間攪拌した後、0°C でさらに 2 時間攪拌した。0°C で超純水(3 mL), 2 N NaOH 水溶液(3 mL), 超純水(3 mL)を順に加えて反応を停止し、セライト濾過した後、酢酸エチル(70 mL×2)を加えて抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム/メタノール = 10/1) で精製して目的物 **14** を収量 355.3 mg (55.9%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.01 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.53 (s, 2H), 2.91 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H), 1.94 (s, 1H). MS (ESI) *m/z* 139 [MH⁺].

2-(4-Hydroxyphenoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**15**).

4-(Benzyloxy)phenol (2.0 g, 10 mmol)の DMF 溶液(15 mL)に炭酸カリウム(2.76 g, 20 mmol)および 1,2-bis(tosyloxy)ethane (7.4 g, 20 mmol)を加えて、70°C で 12 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製した。生成物をメタノール(30 mL)および THF (10 mL)の混合溶媒に溶解し、10% Pd/C (100 mg)を加えて、水素雰囲気下、50°C で 4 時間激しく攪拌した。反応液を室温に戻した後、セライト濾過し、濾液を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **15** を収量 706.6 mg (22.9%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.67 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.53 (s, 1H), 4.33 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.45 (s, 3H). MS (APCI) *m/z* 309 [MH⁺].

2-(2-(2-(4-Hydroxyphenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**16**).

4-(Benzyloxy)phenol (2.0 g, 10 mmol)の DMF 溶液(15 mL)に炭酸カリウム(2.76 g, 20 mmol)および triethylene glycol bis(*p*-toluenesulfonate) (7.4 g, 16.1 mmol)を加えて、70°C で 7 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(70 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製した。生成物をメタノール(15 mL)および THF (6 mL)の混合溶媒に溶解し、10% Pd/C (200 mg)を加えて、水素雰囲気下、50°C で 2.5 時間激しく攪拌した。反応液を室温に戻した後、セライト濾過し、濾液を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製して目的物 **16** を収量 1.935 g (48.9%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 9.5 Hz, 2H), 4.55 (s, 1H), 4.16 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.05 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.79 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.69 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.66-3.60 (m, 4H) 2.43 (s, 3H). MS (APCI) *m/z* 397 [MH⁺].

2-(4-((6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**17**).

化合物 **15** (308.4 mg, 1 mmol)の THF 溶液(10 mL)に化合物 **12** (152.2 mg, 1 mmol), トリフェニルホスフィ

ン (393.4 mg, 1.5 mmol)を加えた. 反応液を 0°C に冷却し, アゾジカルボン酸ジイソプロピル(DIAD) (303.3 mg, 1.5 mmol)の THF 溶液(5 mL)を滴下して加えた. 反応液を室温に戻し, そのまま 8.5 時間攪拌した. トリフェニルホスフィン (78.7 mg, 0.3 mmol)および DIAD (60.7 mg, 0.3 mmol)を加え, さらに室温で 18.5 時間攪拌した. 溶媒を減圧留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **17** を収量 121 mg (27.3%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.51 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.53 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.34 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.09 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.09 (s, 6H), 2.45 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 443 [MH⁺].

2-(4-((6-(Methylamino)pyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**18**).

化合物 **15** (277.5 mg, 0.9 mmol)の THF 溶液(6 mL)に化合物 **14** (138.2 mg, 1 mmol), トリフェニルホスフィン (524.6 mg, 2 mmol)を加えた. 反応液を 0°C に冷却し, DIAD (404.4 mg, 2 mmol)の THF 溶液(3 mL)を滴下して加えた. 反応液を室温に戻し, そのまま 5 時間攪拌した. 溶媒を減圧留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 3/1) およびリサイクル HPLC で精製して目的物 **18** を収量 83.5 mg (21.6%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.53 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.72 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.84 (s, 2H), 4.79 (s, 1H), 4.34 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.10 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 2.93 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 2.45 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 429 [MH⁺].

2-(2-(2-(4-((6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**19**).

化合物 **16** (396.5 mg, 1 mmol)の THF 溶液(6 mL)に化合物 **12** (152.2 mg, 1 mmol), トリフェニルホスフィン (393.4 mg, 1.5 mmol)を加えた. 反応液を 0°C に冷却し, DIAD (303.3 mg, 1.5 mmol)の THF 溶液(2 mL)を滴下して加えた. 反応液を室温に戻し, そのまま 20 時間攪拌した. 溶媒を減圧留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 3/1) で精製して目的物 **19** を収量 279.1 mg (52.6%)で得た. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.53 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.16 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.06 (t, *J* = 4.5 Hz, 2H), 3.79 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H), 3.70 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.67-3.60 (m, 4H), 3.09 (s, 6H), 2.43 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 531 [MH⁺].

2-(2-(2-(4-((6-(Methylamino)pyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate (**20**).

化合物 **16** (396.5 mg, 1 mmol)の THF 溶液(6 mL)に化合物 **14** (138.2 mg, 1 mmol), トリフェニルホスフィン (393.4 mg, 1.5 mmol)を加えた. 反応液を 0°C に冷却し, DIAD (303.3 mg, 1.5 mmol)の THF 溶液(2 mL)を滴下して加えた. 反応液を室温に戻し, そのまま 17 時間攪拌した. 溶媒を減圧留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 3/1) で精製して目的物 **20** を収量 115.1 mg (22.3%)で

得た. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.42 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.68 (s, 1H), 4.16 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 4.06 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 3.80 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H), 3.66-3.60 (m, 4H), 2.93 (d, $J = 5.5$ Hz, 3H), 2.43 (s, 3H). MS (ESI) m/z 517 [MH^+].

5-((4-(2-Fluoroethoxy)phenoxy)methyl)-*N,N*-dimethylpyridin-2-amine (21: FPMP-1).

化合物 **17** (88.5 mg, 0.2 mmol)の THF 溶液(7 mL)に TBAF (1 M THF 溶液, 0.8 mL, 0.8 mmol)を加えた. 反応液を 2 時間加熱還流した後, 反応液を室温に戻し, 超純水を加え, 酢酸エチル(70 mL \times 2)で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **21** を収量 30.0 mg (51.6%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 6.91-6.85 (m, 4H), 6.53 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.79-4.68 (m, 2H), 4.20-4.13 (m, 2H), 3.09 (s, 6H). HRMS (FAB+) m/z calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{FN}_2\text{O}_2$ [MH^+] 291.1509, found 291.1506.

5-((4-(2-Fluoroethoxy)phenoxy)methyl)-*N*-methylpyridin-2-amine (22: FPMP-2).

化合物 **18** (68.6 mg, 0.16 mmol)の THF 溶液(6 mL)に TBAF (1 M THF 溶液, 0.64 mL, 0.64 mmol)を加えた. 反応液を 2 時間加熱還流した後, 反応液を室温に戻し, 超純水を加え, 酢酸エチル(60 mL \times 2)で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 3/1) で精製して目的物 **22** を収量 33.2 mg (75.1%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, 1H), 6.91-6.85 (m, 4H), 6.41 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.81-4.67 (m, 2H), 4.57 (s, 1H), 4.21-4.12 (m, 2H), 2.93 (d, $J = 5.2$ Hz, 3H). HRMS (FAB+) m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{FN}_2\text{O}_2$ [MH^+] 277.1352, found 277.1359.

5-((4-(2-(2-(2-Fluoroethoxy)ethoxy)ethoxy)phenoxy)methyl)-*N,N*-dimethylpyridin-2-amine (23: FPMP-3).

化合物 **19** (159.2 mg, 0.3 mmol)の THF 溶液(6 mL)に TBAF (1 M THF 溶液, 1.2 mL, 1.2 mmol)を加えた. 反応液を 2 時間加熱還流した後, 反応液を室温に戻し, 超純水を加え, 酢酸エチル(70 mL \times 2)で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 3/1) で精製して目的物 **23** を収量 67.8 mg (59.7%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 6.89-6.83 (m, 4H), 6.53 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.62-4.51 (m, 2H), 4.09 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 3.84 (t, $J = 4.5$ Hz, 2H), 3.80-3.71 (m, 6H), 3.09 (s, 6H). HRMS (FAB+) m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{FN}_2\text{O}_4$ [MH^+] 379.2033, found 379.2043.

5-((4-(2-(2-(2-Fluoroethoxy)ethoxy)ethoxy)phenoxy)methyl)-*N*-methylpyridin-2-amine (24: FPMP-4).

化合物 **20** (87.8 mg, 0.17 mmol)の THF 溶液(6 mL)に TBAF (1 M THF 溶液, 0.68 mL, 0.68 mmol)を加えた.

反応液を 2.5 時間加熱還流した後、反応液を室温に戻し、超純水を加え、酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をアミノプロピルシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 3/1) で精製して目的物 **24** を収量 39.7 mg (64.1%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 6.89-6.84 (m, 4H), 6.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.64-4.50 (m, 3H), 4.09 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.84 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.81-3.70 (m, 6H), 2.93 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H). HRMS (FAB+) *m/z* calcd for C₁₉H₂₆FN₂O₄ [MH⁺] 365.1877, found 365.1884.

(5-(4-(Benzyloxy)phenoxy)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl 4-methylbenzenesulfonate (25).

4-(Benzyloxy)phenol (1.0 g, 5 mmol)の DMF 溶液(10 mL)に炭酸カリウム(1.38 g, 10 mmol)および (-)-1,4-di-*O*-tosyl-2,3-*O*-isopropylidene-L-threitol (2.82 g, 6 mmol)を加えて、70°C で 21 時間攪拌した。反応液を室温に戻した後、超純水を加え、酢酸エチル(70 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/5) で精製して目的物 **25** を収量 1.64 g (66.0%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.44-7.31 (m, 6H), 6.89 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.26 (dd, *J* = 9.6, 3.2 Hz, 1H), 4.20-4.05 (m, 5H), 3.93 (dd, *J* = 9.6, 4.8 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.38 (s, 3H). MS (APCI) *m/z* 499 [MH⁺].

(5-(4-Hydroxyphenoxy)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl 4-methylbenzenesulfonate (26).

化合物 **25** (1.64 g, 3.29 mmol)をメタノール(25 mL)および THF (10 mL)の混合溶媒に溶解し、10% Pd/C (150 mg)を加えて、水素雰囲気下、50°C で 7 時間激しく攪拌した。反応液を室温に戻した後、セライト濾過し、濾液を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **26** を収量 1.01 g (75.2%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.78-6.72 (m, 4H), 4.54 (s, 1H), 4.26 (dd, *J* = 9.6, 3.2 Hz, 1H), 4.20-4.05 (m, 4H), 3.93 (dd, *J* = 9.2, 4.0 Hz, 1H), 2.44 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.38 (s, 3H). MS (APCI) *m/z* 409 [MH⁺].

(5-(4-((6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl 4-methylbenzenesulfonate (27).

化合物 **26** (408.5 mg, 1 mmol)の THF 溶液(6 mL)に化合物 **12** (152.2 mg, 1 mmol), トリフェニルホスフィン (393.4 mg, 1.5 mmol)を加えた。反応液を 0°C に冷却し、DIAD (303.3 mg, 1.5 mmol)の THF 溶液(3 mL)を滴下して加えた。反応液を室温に戻し、そのまま 19 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **27** を収量 339.5 mg (62.6%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.53 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.53 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.26 (dd, *J* = 10.0, 3.2 Hz, 1H), 4.20-4.05 (m, 4H), 3.93 (dd, *J* = 9.2, 4.0 Hz, 1H), 3.10 (s, 6H), 2.43 (s, 3H),

1.41 (s, 3H), 1.38 (s, 3H). MS (ESI) m/z 543 [MH⁺].

(2,2-Dimethyl-5-(4-((6-(methylamino)pyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)-1,3-dioxolan-4-yl)methyl 4-methylbenzenesulfonate (28).

化合物 **26** (408.5 mg, 1 mmol)の THF 溶液(6 mL)に化合物 **14** (138.2 mg, 1 mmol), トリフェニルホスフィン (393.4 mg, 1.5 mmol)を加えた. 反応液を 0°C に冷却し, DIAD (303.3 mg, 1.5 mmol)の THF 溶液(3 mL)を滴下して加えた. 反応液を室温に戻し, そのまま 16 時間攪拌した. 溶媒を減圧留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 3/1) およびアミノプロピルシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **28** を収量 231.2 mg (43.7%)で得た. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.52 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.41 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.59 (s, 1H), 4.26 (dd, *J* = 10.5, 3.5 Hz, 1H), 4.20-4.06 (m, 4H), 3.93 (dd, *J* = 9.5, 4.5 Hz, 1H), 2.93 (d, *J* = 5.0 Hz, 3H), 2.43 (s, 3H), 1.41 (s, 3H), 1.38 (s, 3H). MS (ESI) m/z 529 [MH⁺].

5-((4-((5-(Fluoromethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)oxy)phenoxy)methyl)-*N,N*-dimethylpyridin-2-amine (29).

化合物 **27** (271.3 mg, 0.5 mmol)の THF 溶液(7 mL)に TBAF (1 M THF 溶液, 2.0 mL, 2.0 mmol)を加えた. 反応液を 5.5 時間加熱還流した後, 反応液を室温に戻し, 超純水を加え, 酢酸エチル(60 mL×2)で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/3) で精製して目的物 **29** を収量 69.2 mg (35.5%)で得た. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.53 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.71-4.50 (m, 2H), 4.28-4.13 (m, 3H), 4.01 (dd, *J* = 10.5, 3.5 Hz, 1H), 3.09 (s, 6H), 1.47 (s, 6H). MS (ESI) m/z 391 [MH⁺].

5-((4-((5-(Fluoromethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)oxy)phenoxy)methyl)-*N*-methylpyridin-2-amine (30).

化合物 **28** (157.6 mg, 0.3 mmol)の THF 溶液(5 mL)に TBAF (1 M THF 溶液, 1.2 mL, 1.2 mmol)を加えた. 反応液を 4 時間加熱還流した後, 反応液を室温に戻し, 超純水を加え, 酢酸エチル(70 mL×2)で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 無水硫酸ナトリウムで脱水し, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 1/1) で精製して目的物 **30** を収量 81.2 mg (72.4%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.71-4.48 (m, 2H), 4.30-4.13 (m, 3H), 4.01 (dd, *J* = 9.2, 5.2 Hz, 1H), 2.93 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H), 1.47 (s, 6H). MS (ESI) m/z 377 [MH⁺].

1-(4-((6-(Dimethylamino)pyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)-4-fluorobutane-2,3-diol (31: FPMP-5).

化合物 **29** (69.2 mg, 0.177 mmol)のメタノール溶液(6 mL)に 2 N 塩酸メタノール溶液(2 mL)を加え, 室温で 2.5 時間攪拌した. 反応液を 0°C に冷却し, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および 2 N 水酸化ナトリウ

ム水溶液を加えて中和した後、酢酸エチル(20 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 3/1)で精製して目的物 **31** を収量 38.5 mg (62.0%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.53 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.66-4.47 (m, 2H), 4.08-4.03 (m, 4H), 3.10 (s, 6H), 2.63 (br, 2H). HRMS (FAB+) *m/z* calcd for C₁₈H₂₄FN₂O₄ [MH⁺] 351.1720, found 351.1718.

1-Fluoro-4-(4-((6-(methylamino)pyridin-3-yl)methoxy)phenoxy)butane-2,3-diol (**32**: FPMP-6).

化合物 **30** (77.8 mg, 0.207 mmol)のメタノール溶液(6 mL)に 2 N 塩酸メタノール溶液(2.5 mL)を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応液を 0°C に冷却し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および 2 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて中和した後、酢酸エチル(30 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール = 10/1)で精製して目的物 **32** を収量 53.3 mg (76.7%)で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.02 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.55 (dd, *J* = 9.6, 4.4 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.13-5.05 (m, 2H), 4.09 (s, 2H), 4.58-4.31 (m, 2H), 4.01-3.96 (m, 1H), 3.83-3.80 (m, 3H), 2.75 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H). HRMS (FAB+) *m/z* calcd for C₁₇H₂₂FN₂O₄ [MH⁺] 337.1564, found 337.1563.

¹⁸F 標識 PMP 誘導体の合成

¹⁸F を陰イオン交換カラム Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light Cartridge に保持させた後、K₂CO₃ 水溶液(33.0 mM, 300 μL)によって溶出した。MeCN (300 μL)に Kryptofix2.2.2. (10.0 mg, 26.6 mmol)および ¹⁸F 含有 K₂CO₃ 水溶液を加え、アルゴン気流下で 120°C に加熱して共沸脱水した。MeCN (300 μL)をさらに 2 回追加して共沸脱水操作を繰り返した。^{[18F]FPMP-1, [18F]FPMP-2, [18F]FPMP-3, [18F]FPMP-4}については、それぞれ化合物 **17**, 化合物 **18**, 化合物 **19**, 化合物 **20** を標識前駆体として、各標識前駆体(1.0 mg)が入ったバイアルに MeCN (200 μL)に溶解した ¹⁸F 含有溶液を加え、100°C で 10 分間加熱した。反応液を室温に戻した後、溶媒をアルゴン気流下で留去した。残渣を移動相(100 μL)に溶解し逆相 HPLC (^{[18F]FPMP-1} および^{[18F]FPMP-3}: MeCN/20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 = 40/60, ^{[18F]FPMP-2} および^{[18F]FPMP-4}: MeCN/20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 = 32/68)を用いて精製した。^{[18F]FPMP-5, [18F]FPMP-6}については、それぞれ化合物 **27**, 化合物 **28** を標識前駆体として、各標識前駆体(1.0 mg)が入ったバイアルに MeCN (200 μL)に溶解した ¹⁸F 含有溶液を加え、100°C で 10 分間加熱した。さらに、2 N 塩酸(100 μL)を加え、さらに 100°C で 5 分間加熱した。室温に戻して飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(300 μL)を加えて中和し、酢酸エチル(500 μL×2)を加えて抽出した後、溶媒をアルゴン気流下で留去した。残渣を移動相(100 μL)に溶解し逆相 HPLC (^{[18F]FPMP-5}: MeCN/20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 = 28/72, ^{[18F]FPMP-6}: MeCN/20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 = 20/80)を用いて精製した。

Log P 値測定

第 2 章第 1 節と同様の方法を用いて行った。

T2DM 患者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG

パラフィン包埋された T2DM 患者(69 歳女性)および健常者(28 歳男性)膵臓組織切片を, キシレン(15 min × 2), 100% EtOH (1 min × 2), 90% EtOH (1 min × 1), 70% EtOH (1 min × 1)および超純水(2.5 min × 2)で洗浄することで脱パラフィン処理を行った。 [¹⁸F]FPMP-1~6 (370 kBq/mL)を添加し, 室温で 1 時間インキュベートした。 10% EtOH (1 min × 2), 超純水(30 sec × 1)で洗浄後, イメージングプレートに露光させ, バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。 さらに, 同一切片を用いて ThS によるアミロイド蛍光染色, 隣接切片を用いてアミリンの免疫染色を行った。

T2DM 患者膵臓組織切片を用いた ThS 蛍光染色

第 2 章第 1 節と同様の方法を用いて行った。

T2DM 患者膵臓組織切片を用いた免疫染色

第 2 章第 1 節と同様の方法を用いて行った。

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

[¹⁸F]FPMP-1~6 を 10% EtOH 生理食塩水で希釈した。 1 群 5 匹の 5 週齢 ddY 系雄性マウスに, 尾静脈より 1 匹あたり 23.6-63.5 kBq (100 μL)の ¹⁸F 標識化合物を投与し, 2, 10, 30, 60 分後に屠殺, 採血後, 主要な臓器を摘出し, 重量と放射能を測定した。

[¹⁸F]FPMP-5 の血液中代謝物分析

正常マウスとして 5 週齢 ddY 系雄性マウスを用いた。 [¹⁸F]FPMP-5 の 10%EtOH 生理食塩水溶液(22.2-29.6 MBq, 150 μL)を尾静脈より投与した。 投与後 2 分, 30 分, 60 分後に屠殺し, 血液を採取した。 アセトニトリル(400 μL) を加えて血中タンパク質を変性させ, 4 °C, 4,000 × g で 5 分間遠心した。 得られた上清にさらにアセトニトリル(400 μL) を加えた後, 4 °C, 4,000 × g で 5 分間遠心した。 得られた上清は, ナカライテスク株式会社製 Cosmonice Filter (S) (0.45 μm, 4 mm)で処理した後, 逆相 HPLC によって分析した。

[¹⁸F]FPMP-5 の膵臓内代謝物分析

正常マウスとして 5 週齢, 雄性の ddY マウスを用いた。 [¹⁸F]FPMP-5 の 10%EtOH 生理食塩水溶液 (22.2-29.6 MBq, 150 μL)を尾静脈より投与した。 投与後 2 分, 30 分, 60 分後に屠殺し, 速やかに膵臓を摘出した。 TBS (400 μL)中でホモジネートを作製し, アセトニトリル(400 μL) を加えてタンパク質を変性させ, 4,000 × g, 4 °C で 5 分間遠心分離後, 上清を採取した。 さらにアセトニトリル(400 μL) を加えた後, 4 °C, 4,000 × g で 5 分間遠心した。 得られた上清は, ナカライテスク株式会社製 Cosmonice Filter (S) (0.45

μm, 4 mm)で処理した後, 逆相 HPLC によって分析した.

ヒトアミリン発現遺伝子改変マウス

FVB/N-Tg(Ins2-IAPP)RHFSocl/J および B6.C3-A^{vy}/J は The Jackson Laboratory から購入した. ヘミ接合型の FVB/N-Tg(Ins2-IAPP)RHFSocl/J とヘテロ接合型の B6.C3-A^{vy}/J を交配し, アグーチ遺伝子座に A^{vy}/A を有し, かつヒトアミリン遺伝子を有する遺伝子改変マウス(hIAPP^{Tg}-A^{vy}/A マウス)を作製した. また, アグーチ遺伝子座に A^{vy}/A を有し, かつヒトアミリン遺伝子をもたないものをコントロールマウス(NonTg-A^{vy}/A マウス)とした. いずれのマウスも 45 kcal%脂肪含有高脂肪飼料(D12451, Research Diets)で飼育した.

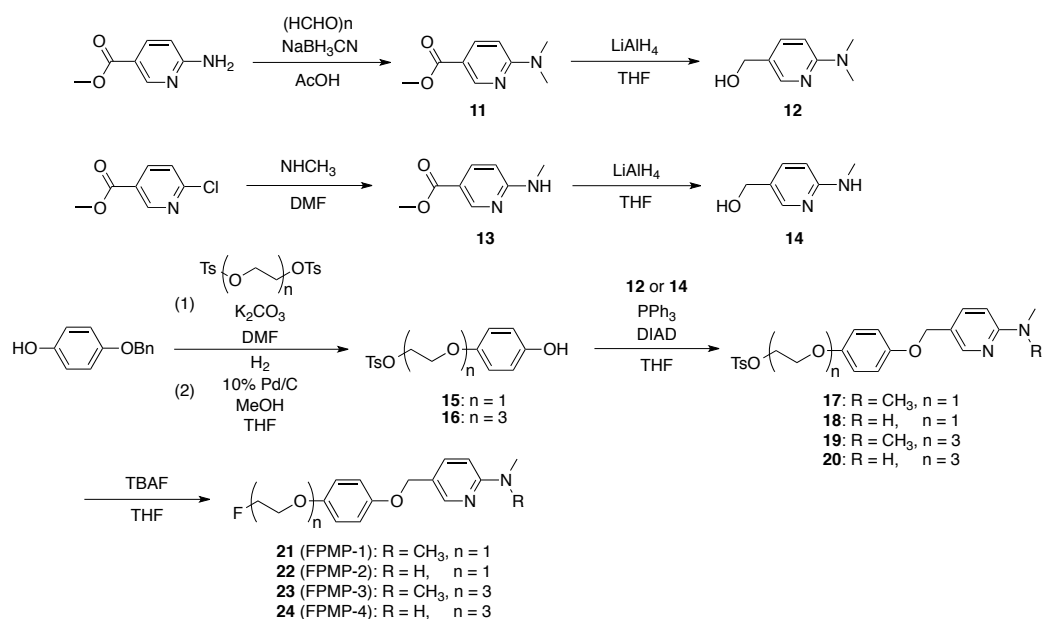
ヒトアミリン発現遺伝子改変マウスを用いた *ex vivo* ARG

10% EtOH 生理食塩水に溶解した [¹⁸F]FPMP-5 (74.0 MBq, 150 μL)を, 21 ヶ月齢雄性の hIAPP^{Tg}-A^{vy}/A マウスあるいは NonTg-A^{vy}/A マウスに尾静脈より投与した. 投与 60 分後に屠殺後, 直ちに膵臓を摘出し, 30 μm 厚の凍結膵臓切片を作製した. 切片をイメージングプレートに露光させ, バイオイメージングアナライザーにて分析を行った. さらに, 隣接切片を用いて ThS によるアミロイド蛍光染色, 抗アミリン抗体によるアミリン免疫染色を行った. ThS 蛍光染色およびアミリン免疫染色は第 2 章第 1 節と同様の方法を用いて行った.

2.2.2. 結果と考察

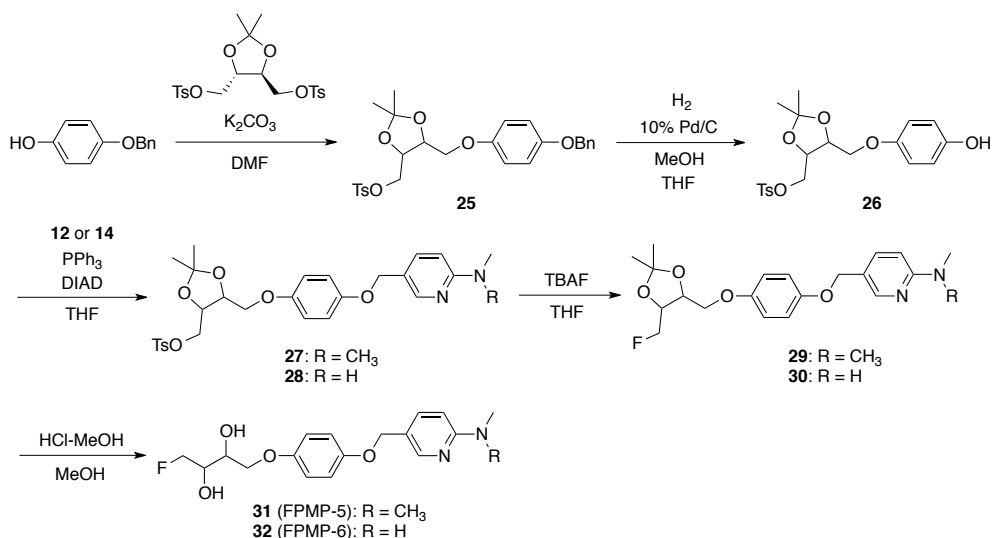
PMP 誘導体の合成

Scheme 2-4 に FPMP-1~4 およびそれぞれの ^{18}F 標識前駆体の合成経路を示す. Methyl 6-aminonicotinate, あるいは Methyl 6-chloronicotinate を出発原料として, 光延反応によって PMP 骨格を形成し, 4 段階の反応で標識前駆体を 1.1~17.2%の収率で得た. 各標識前駆体にフッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウムフルオリドを反応させて 51.6~75.1%の収率で FPMP-1~4 を得た.



Scheme 2-4. Synthetic route for FPMP-1~4 and each precursor for ^{18}F labeling.

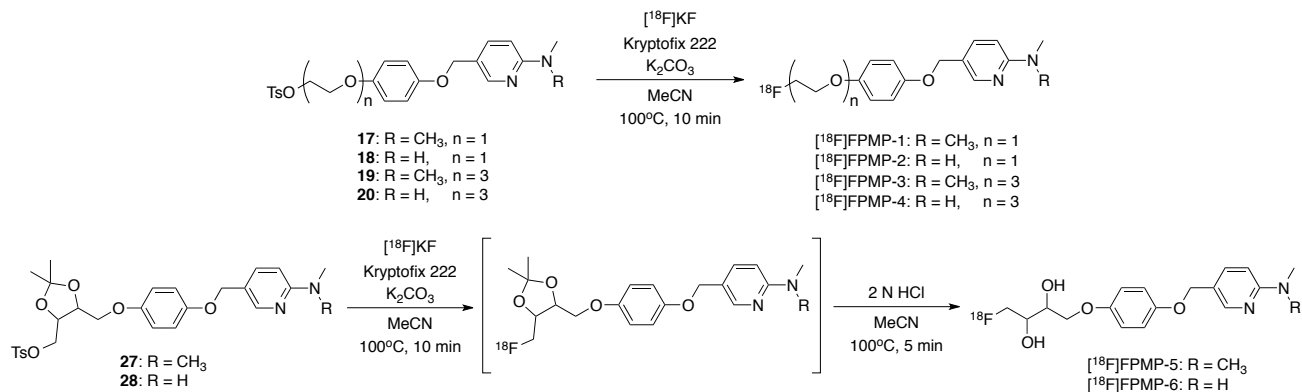
Scheme 2-5 に FPMP-5~6 およびそれぞれの ^{18}F 標識前駆体の合成経路を示す. 4-(Benzyloxy)phenol を出発原料として, 光延反応を含む 3 段階の反応で標識前駆体を 21.7~31.1%の収率で得た. 各標識前駆体にフッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウムフルオリドを反応させ, さらに酸性条件下における脱保護を行い, 2 工程 22.0~55.5%の収率で FPMP-5~6 を得た.



Scheme 2-5. Synthetic route for FPMP-5~6 and each precursor for ^{18}F labeling.

¹⁸F 標識 PMP 誘導体の合成

Scheme 2-6 に ¹⁸F 標識経路を示す. [¹⁸F]FPMP-1~4 は [¹⁸F]KF および Kryptofix 2.2.2 によるフッ素化の 1 工程を経て, [¹⁸F]FPMP-5~6 はフッ素化に加えて, 酸性条件下における脱保護の 2 工程を経て合成した. 各 ¹⁸F 標識体は Table 2-4 に示す放射化学的収率(13-44%)で, 放射化学的純度 95%以上で得た.



Scheme 2-5. Radiolabeling of [¹⁸F]FPMP-1~6.

Table 2-4. Radiochemical yields of [¹⁸F]FPMP-1~6.

Compound	Radiochemical yields (%) [*]
[¹⁸ F]FPMP-1	42.2 ± 7.2
[¹⁸ F]FPMP-2	34.3 ± 4.4
[¹⁸ F]FPMP-3	44.4 ± 7.0
[¹⁸ F]FPMP-4	42.2 ± 7.8
[¹⁸ F]FPMP-5	21.1 ± 1.7
[¹⁸ F]FPMP-6	13.3 ± 3.0

^{*}Values are expressed as the means ± standard errors of 3-8 independent determinations.

T2DM 患者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG

¹⁸F 標識 PMP 誘導体に関して, T2DM 患者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG を行い, 膵島アミロイドへの結合性を評価した. その結果, いずれの化合物においても結合性が認められたが, 膵島アミロイドを描出する明瞭性には差が認められ, 化合物によって結合親和性が異なることが示唆された(Figure 2-13A~H). [¹⁸F]FPMP-1~5 は, いずれも明瞭に膵島アミロイドを描出しており, 十分な結合親和性を有していることを認めた(Figure 2-13A~E). しかし, [¹⁸F]FPMP-6 は膵島アミロイドを描出しているが, 比較的不明瞭であり, また, 描出している膵島アミロイドの数も他の化合物に比べて少なく, 他の化合物に比べて親和性が低いことが示唆された(Figure 2-13F).

AD 脳内 Aβを標的にしたイメージングプローブでは置換基に, PMP 誘導体と同じくジメチルアミノ基やモノメチルアミノ基を有しているものが数多く報告されており, 一般的に結合親和性はジメチルアミノ基を持つ方がモノメチルアミノ基を持つものより高い傾向にある¹⁵⁻¹⁷. 本研究で評価した化合物に関してもその傾向が見受けられ, ジメチルアミノ基を有する化合物([¹⁸F]FPMP-1, 3, 5)の方が膵島アミロイドを明瞭に描出する結果となった.

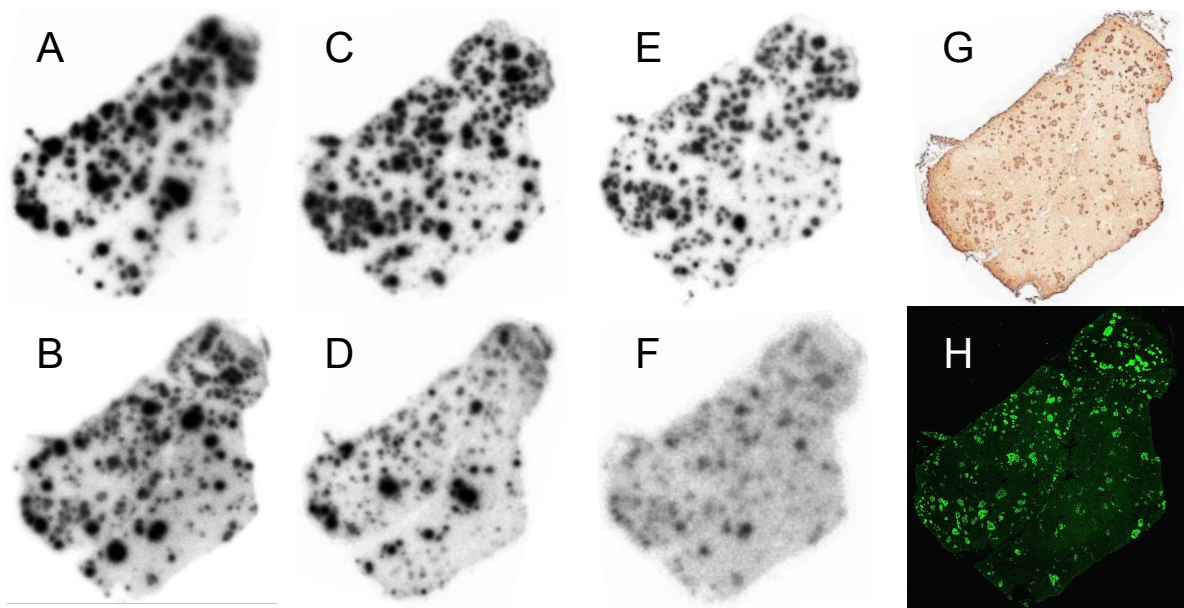


Figure 2-13. *In vitro* autoradiography of [^{18}F]FPMP-1 (A), [^{18}F]FPMP-2 (B), [^{18}F]FPMP-3 (C), [^{18}F]FPMP-4 (D), [^{18}F]FPMP-5 (E), and [^{18}F]FPMP-6 (F) with pancreatic sections from a T2DM patient. Adjacent sections were also stained with an antibody against amylin (G), and ThS (H).

正常マウスを用いた放射能体内分布評価

各化合物の体内動態を評価するために、正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行った。その結果を Figure 2-14, Table 2-5, および Table 2-6 に示す。全ての PMP 誘導体は、TPBF-1 に比べて肝臓への集積は大幅に低い値となった(Figure 2-14B)。また、全ての PMP 誘導体は、投与早期における高い膵移行性およびその後の膵臓からの速やかな消失を示した(Figure 2-14A)。全ての化合物に関して膵臓への移行量は [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TPBF-1 に比べて高く、特に [^{18}F]FPMP-5 および [^{18}F]FPMP-6 は投与後 2 分における膵臓放射能が 6.00%ID/g および 5.92%ID/g と高い値を示した(Table 2-5)。また、これらの化合物は投与後 2 分と 60 分の膵臓放射能比(Pancreas_{2 min/60 min})が 3.92 および 8.70 と高い値を示し、正常組織からの良好な消失性が認められた(Table 2-5)。

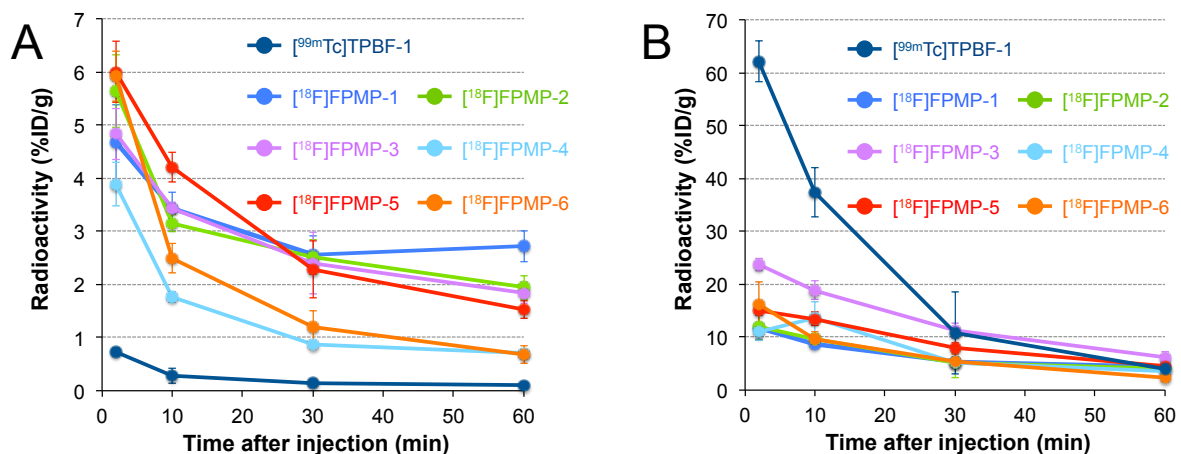


Figure 2-14. Comparison of pancreas uptake (A) and liver uptake (B) of radioactivity after injection of [^{18}F]FPMP-1~6 and [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]TPBF-1 into normal mice (n = 5).

Table 2-5. Comparison of pancreas uptake and washout of [¹⁸F]FPMP-1~6 and [^{99m}Tc]TPBF-1 in normal mice.*

Compound	Time after injection (min)				Pancreas _{2 min/60 min}
	2	10	30	60	
[¹⁸ F]FPMP-1	4.67 (0.72)	3.44 (0.31)	2.56 (0.36)	2.72 (0.29)	1.71
[¹⁸ F]FPMP-2	5.64 (0.69)	3.16 (0.16)	2.52 (0.33)	1.94 (0.23)	2.91
[¹⁸ F]FPMP-3	4.83 (0.48)	3.44 (0.12)	2.40 (0.58)	1.84 (0.19)	2.62
[¹⁸ F]FPMP-4	3.89 (0.41)	1.75 (0.09)	0.87 (0.04)	0.71 (0.02)	5.47
[¹⁸ F]FPMP-5	6.00 (0.58)	4.20 (0.27)	2.28 (0.53)	1.53 (0.17)	3.92
[¹⁸ F]FPMP-6	5.92 (0.47)	2.50 (0.28)	1.19 (0.32)	0.68 (0.17)	8.70
[^{99m} Tc]TPBF-1	0.74 (0.07)	0.29 (0.14)	0.14 (0.04)	0.11 (0.01)	6.94

*Each value represents the mean (SD) for 5 animals.

Table 2-6. Biodistribution of ¹⁸F labeled PMP derivatives.^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
	[¹⁸ F]FPMP-1 (LogP 2.35)			
Blood	3.50 (0.48)	3.37 (0.30)	3.51 (0.30)	3.88 (0.15)
Pancreas	4.67 (0.72)	3.44 (0.31)	2.56 (0.36)	2.72 (0.29)
Stomach ^b	2.66 (1.02)	7.44 (0.89)	7.63 (1.06)	7.12 (2.87)
Liver	11.77 (2.25)	8.68 (0.64)	5.41 (0.58)	4.47 (0.29)
Intesitine	3.17 (0.60)	4.81 (0.73)	6.58 (1.75)	7.84 (1.66)
Kidney	6.98 (1.25)	5.74 (0.42)	4.69 (1.55)	3.74 (0.82)
Spleen	2.69 (0.43)	2.95 (0.19)	2.47 (0.28)	2.86 (0.17)
Lung	5.51 (0.82)	3.70 (0.20)	3.29 (0.61)	3.29 (0.20)
Heart	5.32 (0.94)	4.16 (1.51)	2.96 (0.27)	3.78 (0.26)
Brain	4.24 (0.68)	2.70 (0.26)	2.37 (0.11)	2.30 (0.08)
Bone	2.31 (0.65)	2.75 (0.42)	2.87 (0.92)	4.89 (0.65)
	[¹⁸ F]FPMP-2 (LogP 2.10)			
Blood	3.14 (0.36)	2.85 (0.24)	3.39 (0.22)	2.92 (0.23)
Pancreas	5.64 (0.69)	3.16 (0.16)	2.52 (0.33)	1.94 (0.23)
Stomach ^b	3.18 (0.52)	7.88 (0.85)	13.27 (3.39)	11.31 (1.30)
Liver	11.93 (2.48)	9.55 (0.53)	5.22 (2.96)	4.08 (0.32)
Intesitine	4.80 (0.70)	4.93 (0.26)	7.28 (0.31)	7.29 (0.46)
Kidney	10.49 (0.99)	5.66 (0.31)	5.44 (0.85)	5.25 (1.38)
Spleen	3.48 (0.20)	2.38 (0.15)	2.41 (0.17)	2.24 (0.25)
Lung	5.63 (0.37)	3.34 (0.27)	3.18 (0.21)	2.73 (0.20)
Heart	4.46 (0.54)	2.77 (0.14)	2.85 (0.30)	2.65 (0.27)
Brain	5.01 (0.37)	2.41 (0.16)	2.12 (0.16)	1.60 (0.11)
Bone	1.92 (0.33)	1.85 (0.09)	3.07 (0.55)	4.56 (0.53)
	[¹⁸ F]FPMP-3 (LogP 2.16)			
Blood	4.58 (0.16)	4.01 (0.59)	3.32 (0.34)	1.83 (0.61)
Pancreas	4.83 (0.48)	3.44 (0.12)	2.40 (0.58)	1.84 (0.19)
Stomach ^b	3.61 (0.81)	9.41 (2.38)	14.14 (1.25)	15.71 (4.01)
Liver	23.68 (1.16)	18.84 (1.73)	11.23 (1.37)	6.22 (1.07)

Intesitine	4.00 (0.52)	6.17 (0.46)	9.39 (1.75)	17.21 (6.68)
Kidney	9.86 (0.92)	8.91 (1.04)	8.68 (1.77)	4.47 (1.56)
Spleen	3.07 (0.27)	3.02 (0.27)	2.09 (0.34)	1.95 (0.32)
Lung	6.05 (0.73)	3.96 (0.41)	2.71 (0.36)	1.72 (0.35)
Heart	5.04 (0.54)	3.31 (0.43)	2.29 (0.22)	1.74 (0.16)
Brain	2.83 (0.16)	1.63 (0.15)	0.85 (0.11)	0.74 (0.07)
Bone	3.65 (1.14)	4.33 (1.12)	2.94 (1.75)	4.03 (1.23)
[¹⁸ F]FPMP-4 (LogP 2.00)				
Blood	3.41 (0.45)	3.73 (0.59)	2.39 (0.15)	1.17 (0.16)
Pancreas	3.89 (0.41)	1.75 (0.09)	0.87 (0.04)	0.71 (0.02)
Stomach ^b	2.62 (0.28)	6.28 (0.81)	5.98 (1.45)	4.57 (1.70)
Liver	11.04 (1.65)	13.56 (3.21)	5.24 (1.01)	3.58 (0.33)
Intesitine	4.21 (0.39)	5.16 (0.72)	5.86 (1.47)	11.93 (3.51)
Kidney	10.75 (1.60)	11.36 (1.14)	13.98 (4.32)	8.03 (3.31)
Spleen	2.81 (0.36)	1.56 (0.17)	0.88 (0.11)	0.73 (0.08)
Lung	3.85 (0.44)	2.87 (0.28)	1.76 (0.07)	1.03 (0.16)
Heart	3.92 (0.46)	2.25 (0.34)	1.27 (0.12)	0.93 (0.11)
Brain	2.83 (0.40)	0.81 (0.05)	0.35 (0.03)	0.32 (0.03)
Bone	1.56 (0.22)	1.49 (0.13)	1.06 (0.39)	1.23 (0.09)
[¹⁸ F]FPMP-5 (LogP 1.86)				
Blood	5.68 (0.47)	3.45 (1.69)	2.53 (0.24)	1.20 (0.29)
Pancreas	6.00 (0.58)	4.20 (0.27)	2.28 (0.53)	1.53 (0.17)
Stomach ^b	3.50 (0.77)	10.51 (1.10)	13.25 (3.09)	14.45 (4.31)
Liver	15.02 (0.53)	13.45 (1.34)	8.09 (0.94)	4.55 (0.85)
Intesitine	3.75 (0.47)	5.38 (0.87)	10.33 (2.31)	19.54 (3.70)
Kidney	7.03 (0.62)	6.43 (0.63)	8.64 (1.45)	4.25 (2.16)
Spleen	3.61 (0.56)	3.22 (0.23)	2.21 (0.44)	1.50 (0.26)
Lung	6.67 (0.50)	4.97 (0.27)	3.34 (0.69)	1.70 (0.32)
Heart	5.25 (0.29)	3.65 (0.32)	2.44 (0.37)	1.48 (0.27)
Brain	3.35 (0.23)	2.17 (0.08)	0.92 (0.17)	0.52 (0.06)
Bone	2.67 (0.35)	2.60 (0.23)	2.98 (0.24)	3.10 (0.73)
[¹⁸ F]FPMP-6 (LogP 1.45)				
Blood	5.96 (0.78)	5.14 (0.55)	2.50 (0.47)	0.83 (0.47)
Pancreas	5.92 (0.47)	2.50 (0.28)	1.19 (0.32)	0.68 (0.17)
Stomach ^b	3.91 (1.08)	6.15 (0.54)	8.02 (1.39)	4.50 (1.62)
Liver	16.28 (4.24)	9.72 (1.32)	5.53 (1.23)	2.24 (0.67)
Intesitine	4.53 (0.52)	4.89 (0.56)	10.36 (3.94)	17.67 (11.89)
Kidney	10.91 (1.21)	15.29 (0.37)	11.83 (3.24)	6.24 (4.65)
Spleen	4.79 (0.52)	2.98 (0.28)	1.12 (0.22)	0.68 (0.20)
Lung	5.59 (0.87)	4.04 (0.21)	2.25 (0.47)	0.83 (0.35)
Heart	5.12 (0.36)	2.87 (0.21)	1.39 (0.17)	0.74 (0.26)
Brain	2.11 (0.16)	1.02 (0.10)	0.23 (0.03)	0.13 (0.02)
Bone	2.25 (0.19)	1.97 (0.19)	1.61 (0.35)	1.32 (0.51)

^aEach value represents the mean (SD) for 5 animals.

^bExpressed as %ID/organ.

以上の結果より、良好な膵島アミロイドへの結合性および膵臓への移行性を示した ^{18}F FPMP-5に関して、アミリンイメージングプローブとしてのより詳細な評価を行うこととした。

^{18}F FPMP-5の血液中代謝物分析

^{18}F FPMP-5をマウスに投与後、血液中に存在する放射性代謝物を逆相 HPLC によって分析した。その結果を Figure 2-15 および Table 2-7 に示す。 ^{18}F FPMP-5 は、マウスに投与後、未変化体に比べて極性の高い代謝物が生成することが示された(Figure 2-15)。また、未変化体は Table 2-7 に示す割合で血液中に存在していた。

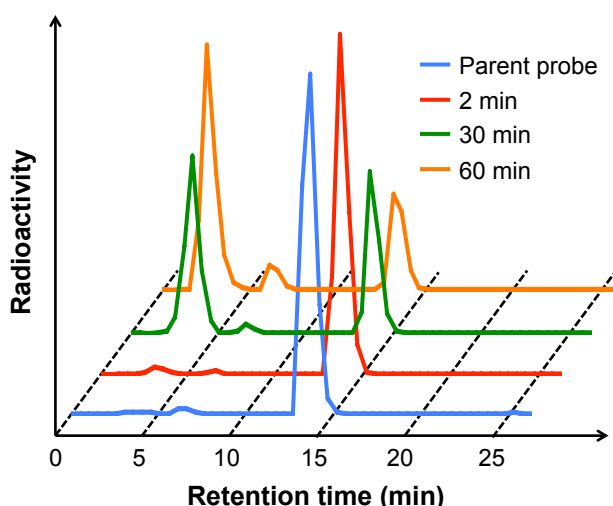


Figure 2-15. HPLC analysis of radioactivity in blood after injection of ^{18}F FPMP-5 into normal mice.

Table 2-7. Percentages of the parent probe in blood at 2, 30, and 60 min postinjection into normal mice.

Time after injection (min)	Percentage of the parent probe*
2	93.1 ± 3.4
30	41.8 ± 18.0
60	27.5 ± 5.6

*Values are the mean ± standard error for three independent experiments.

^{18}F FPMP-5の膵臓内代謝物分析

^{18}F FPMP-5をマウスに投与後、膵臓内に存在する放射性代謝物を逆相 HPLC によって分析した。その結果を Figure 2-16 および Table 2-8 に示す。 ^{18}F FPMP-5 は、マウスに投与後、血液中と同様の代謝物が認められた(Figure 2-16)。このことから、 ^{18}F FPMP-5 は膵臓内では基本的に代謝は受けず、血液中に存在する代謝物がそれぞれ同程度膵臓に移行していることが示唆された。また、膵臓内の未変化体は Table 2-8 に示す割合で存在していた。

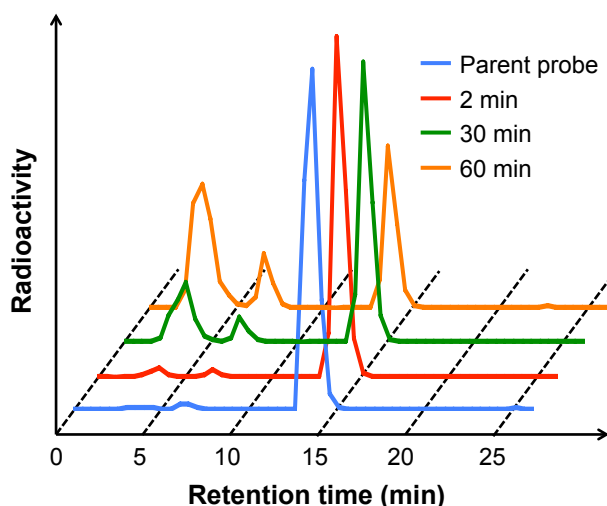


Figure 2-16. HPLC analysis of radioactivity in the pancreas after injection of [^{18}F]FPMP-5 into normal mice.

Table 2-8. Percentages of the parent probe in the pancreas at 2, 30, and 60 min postinjection into normal mice.

Time after injection (min)	Percentage of the parent probe*
2	93.7 \pm 1.6
30	60.8 \pm 18.6
60	36.3 \pm 10.4

*Values are the mean \pm standard error for 3-4 independent experiments.

ヒトアミリン発現遺伝子改変マウスを用いた *ex vivo* ARG

[^{18}F]FPMP-5 の生体中での膵臓内アミリンへの集積性を評価するために、ヒトアミリン発現遺伝子改変マウス(hIAPP^{Tg}-A^{+/+}A マウス)および非遺伝子改変マウス(NonTg-A^{+/+}A マウス)を用いた *ex vivo* ARG を行った。hIAPP^{Tg}-A^{+/+}A マウスは、4 ヶ月齢で膵島アミロイドの沈着が生じ、10 ヶ月齢ではその沈着が顕著に認められ、高血糖症状を呈することが報告されている^{54, 55}。

NonTg-A^{+/+}A マウスの膵臓では、ThS 蛍光染色において陽性部位は存在せず(Figure 2-17D), [^{18}F]FPMP-5 の顕著な放射能集積も認められなかった(Figure 2-17C)。一方で、hIAPP^{Tg}-A^{+/+}A マウスの膵臓では ThS 蛍光染色において膵島アミロイドが確認された(Figure 2-17B)。また、NonTg-A^{+/+}A マウスとは異なり、[^{18}F]FPMP-5 の放射能局在が認められた(Figure 2-17A)。この放射能集積部位は、隣接切片を用いた ThS 蛍光染色およびアミリン免疫染色の陽性部位といずれも一致した(Figure 2-17E, F, G)。しかし、膵島アミロイドの存在しない部位にも放射能集積部位が認められ、非特異的な結合も示すことが示唆された(Figure 2-17A)。以上から、[^{18}F]FPMP-5 は非特異的な結合も認められたが、生体中の膵島アミロイドに結合性を示すことが明らかとなり、アミリンイメージングプローブとして有効である可能性が示された。

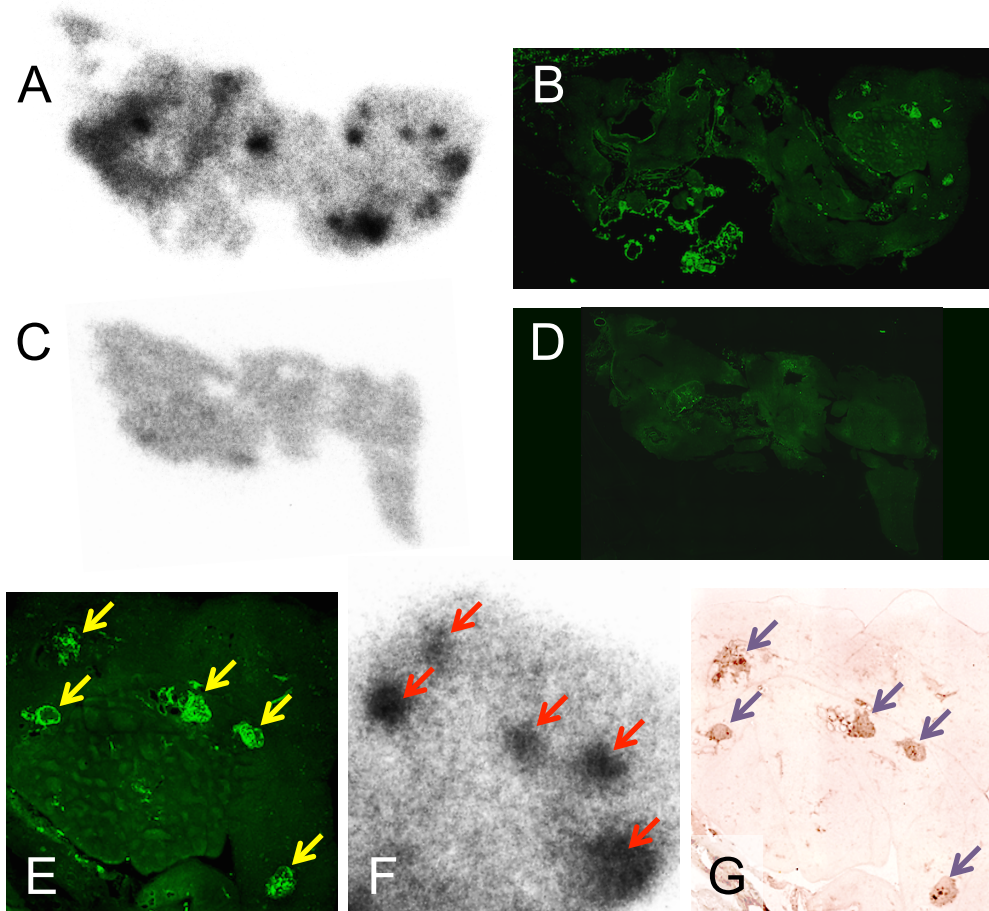


Figure 2-17. *Ex vivo* autoradiography with hIAPP^{Tg}-A^{vy}/A and NonTg- A^{vy}/A mouse. (A, C) Autoradiograms of [¹⁸F]FPMP-5 using hIAPP^{Tg}-A^{vy}/A mouse and NonTg-A^{vy}/A mouse, respectively. (B, D) Thioflavin-S staining with the adjacent sections, respectively. (E, F) High magnification images of A and B, respectively. (G) Amylin immunohistochemical staining with adjacent section.

2.2.3. 小括

本節において、前節で示した ^{99m}Tc [TPBF-1]よりも高性能なアミリンイメージングプローブの開発を目的として、ピリジルベンゾフラン誘導体をリード化合物とした構造最適化を行った。母核には、ピリジルベンゾフランから炭素を1つ除したフェノキシメチルピリジンを採用し、種々の置換基およびリンカーを導入した ^{18}F 標識フェノキシメチルピリジン誘導体を設計・合成し、その有用性に関する評価を行い、以下に述べる結果を得た。

- (1) 2種類の置換基および3種類のリンカーをそれぞれ組み合わせた6種類の ^{18}F 標識フェノキシメチルピリジン誘導体を合成した。
- (2) T2DM患者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG において、 ^{18}F [FPMP-1~5] は膵島アミロイドに対する十分な結合性を示した。
- (3) 正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、全てのフェノキシメチルピリジン誘導体で ^{99m}Tc [TPBF-1]に比べて肝臓集積を大幅に低減することに成功した。さらに、全てのフェノキシメチルピリジン誘導体は投与早期に膵臓への高い移行性、およびその後の速やかな膵臓からの消失を示した。中でも ^{18}F [FPMP-5]および ^{18}F [FPMP-6]は特に高い膵移行性を示した。
- (4) ヒトアミリン発現遺伝子改変マウスを用いた *ex vivo* ARG において、 ^{18}F [FPMP-5]は膵臓内に蓄積したアミリンへの結合性を示した。

以上の結果より、フェノキシメチルピリジンを母核とした ^{18}F [FPMP-5]がPET用アミリンイメージングプローブとして機能する可能性が示された。

結 語

本研究では、アミロイドーシスの代表的な疾患であるアルツハイマー病および 2 型糖尿病の早期診断を目的として、AD 脳内 A β および T2DM 膵臓内アミリンを標的とした核医学分子イメージングプローブの開発を行い、以下に述べる結果を得た。

1. AD 脳内 A β を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発に関しては、既存の ^{18}F 標識 PET 用 A β イメージングプローブで問題とされている脳白質への高い非特異的集積の改善を目的として、新規骨格であるフェニルキノキサリンを母核とする6種類の PQ 誘導体を設計・合成し、PET 用 A β イメージングプローブとしての有用性について、臨床応用されている Florbetapir と比較して評価した。A β 凝集体を用いた結合親和性評価において、PQ-6 が最も高い結合親和性を示し、Florbetapir と比べても 10 倍以上高い結合性を示した。AD 患者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG において、 ^{18}F PQ-6 は老人斑をきわめて明瞭に描出し、さらに、 ^{18}F Florbetapir よりも数多くの老人斑に結合性を示した。また、 ^{18}F PQ-6 の脳白質への非特異的結合は ^{18}F Florbetapir と比較してきわめて軽微だった。正常マウスを用いた体内放射能分布実験の結果、全ての ^{18}F 標識 PQ 誘導体は投与早期における高い脳移行性とその後の速やかな脳からの消失を示した。良好な結合性と脳内挙動を示した ^{18}F PQ-6 について APP 過剰産生遺伝子改変マウスを用いた *ex vivo* ARG を行った結果、 ^{18}F PQ-6 はマウス脳内のアミロイド斑への結合性を示した。以上の結果から、フェニルキノキサリンを母核とする ^{18}F PQ-6 は、既存の A β イメージングプローブよりも良好な性能を有する PET 用 A β イメージングプローブとして機能しうることを見出した。
2. T2DM 膵臓内アミリンを標的とした核医学分子イメージングプローブの開発を目的として、まず、アミリン結合性化合物の探索を実施した結果、ピリジルベンゾフランを母核とした ^{125}I IPBF がアミリン凝集体に対して高い結合親和性を示し、T2DM 患者膵臓組織切片中の膵島アミロイドを明瞭に描出することを明らかにした。このことから、ピリジルベンゾフランを母核としたアミリンイメージングプローブの開発が可能であることを見出した。この知見をもとに、臨床汎用性の高い $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を標識核種とした 2 種類の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識 PBF 誘導体を設計・合成し、SPECT 用アミリンイメージングプローブとしての有用性に関する評価を行った。評価した化合物の中で、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ TPBF-1 がアミリン凝集体への高い親和性を示し、さらに、T2DM 患者膵臓組織切片中の膵島アミロイドへの結合性を示した。膵島アミロイド移植モデルマウスを作製し、*ex vivo* ARG を行った結果、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ TPBF-1 は膵臓内に移植したアミリン凝集体への結合性を認めた。正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ TPBF-1 は投与後早期に大部分が肝臓に移行し、膵臓への移行量は低値を示した。以上の結果から、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ TPBF-1 は体内動態の改善が必要であるが、SPECT 用アミリン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。

3. [^{99m}Tc]TPBF-1 の体内動態の改善を目的として、6 種類の ^{18}F 標識フェノキシメチルピリジン誘導体を設計・合成し、PET 用アミリンイメージングプローブとしての有用性に関する評価を行った。正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、全ての ^{18}F 標識 PMP 誘導体は、[^{99m}Tc]TPBF-1 で問題となった肝臓への高い集積性を低減することに成功し、さらに膵臓への高い移行性を示した。中でも、[^{18}F]FPMP-5 および[^{18}F]FPMP-6 は特に高い膵臓への移行性を示した。T2DM 患者膵臓組織切片を用いた *in vitro* ARG において、[^{18}F]FPMP-5 は膵島アミロイドを明瞭に描出した。良好なアミリンへの結合性と膵移行性を示した[^{18}F]FPMP-5 について、ヒトアミリン発現遺伝子改変マウスを用いた *ex vivo* ARG を行った結果、[^{18}F]FPMP-5 は膵臓内に蓄積したアミリンへの結合性を示した。以上の結果より、フェノキシメチルピリジンを母核とした[^{18}F]FPMP-5 が PET 用アミリンイメージングプローブとして機能しうることを見出した。

以上、本研究は AD 脳内 Ab および T2DM 膵臓内アミリンを標的とした核医学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、AD および T2DM 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。

引用文献

1. J. D. Sipe *et al.*, Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* **23**, 209-213 (2016).
2. S. Sindi, F. Mangialasche, M. Kivipelto, Advances in the prevention of Alzheimer's disease. *F1000Prime Rep* **7**, 50 (2015).
3. J. B. Buse *et al.*, How do we define cure of diabetes? *Diabetes Care* **32**, 2133-2135 (2009).
4. C. R. Jack *et al.*, Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol* **9**, 119-128 (2010).
5. L. Marzban, K. Park, C. B. Verchere, Islet amyloid polypeptide and type 2 diabetes. *Exp Gerontol* **38**, 347-351 (2003).
6. W. E. Klunk *et al.*, Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* **55**, 306-319 (2004).
7. Z. Cselényi *et al.*, Clinical validation of ¹⁸F-AZD4694, an amyloid- β -specific PET radioligand. *J Nucl Med* **53**, 415-424 (2012).
8. M. P. Kung *et al.*, IMPY: an improved thioflavin-T derivative for in vivo labeling of β -amyloid plaques. *Brain Res* **956**, 202-210 (2002).
9. C. M. Clark *et al.*, Use of florbetapir-PET for imaging β -amyloid pathology. *JAMA* **305**, 275-283 (2011).
10. C. C. Rowe *et al.*, Imaging of amyloid β in Alzheimer's disease with ¹⁸F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol* **7**, 129-135 (2008).
11. R. Vandenberghe *et al.*, ¹⁸F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial. *Ann Neurol* **68**, 319-329 (2010).
12. C. C. Rowe *et al.*, Head-to-head comparison of ¹¹C-PiB and ¹⁸F-AZD4694 (NAV4694) for β -amyloid imaging in aging and dementia. *J Nucl Med* **54**, 880-886 (2013).
13. M. Cui, M. Ono, H. Kimura, B. Liu, H. Saji, Novel quinoxaline derivatives for in vivo imaging of β -amyloid plaques in the brain. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 4193-4196 (2011).
14. R. Brookmeyer, E. Johnson, K. Ziegler-Graham, H. M. Arrighi, Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **3**, 186-191 (2007).
15. Alzheimer's Association. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* **12**, 459-509 (2016)
16. S. O. Bachurin, E. V. Bovina, A. A. Ustyugov, Drugs in clinical trials for Alzheimer's disease: The Major Trends. *Med Res Rev*, in press (2017).
17. D. J. Selkoe, Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**, 741-766 (2001).
18. W. Zhang, M. P. Kung, S. Oya, C. Hou, H. F. Kung, ¹⁸F-labeled styrylpyridines as PET agents for amyloid plaque imaging. *Nucl Med Biol* **34**, 89-97 (2007).
19. M. Ono *et al.*, Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Med Chem* **52**, 6394-6401 (2009).
20. M. Ono *et al.*, ¹⁸F-labeled flavones for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorg*

Med Chem **17**, 2069-2076 (2009).

21. T. Kawarabayashi *et al.*, Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **21**, 372-381 (2001).
22. A. Snellman *et al.*, Pharmacokinetics of [^{18}F]flutemetamol in wild-type rodents and its binding to beta amyloid deposits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **39**, 1784-1795 (2012).
23. M. Ono, H. Watanabe, H. Kimura, H. Saji, BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral β -amyloid plaques. *ACS Chem Neurosci* **3**, 319-324 (2012).
24. S. R. Choi *et al.*, Preclinical properties of ^{18}F -AV-45: a PET agent for A β plaques in the brain. *J Nucl Med* **50**, 1887-1894 (2009).
25. A. D. Association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **37 Suppl 1**, S81-90 (2014).
26. B. H. Bardenheier *et al.*, Disability-free life-years lost among adults aged ≥ 50 years with and without diabetes. *Diabetes Care* **39**, 1222-1229 (2016).
27. World Health Organization, World Health Organization diabetes fact sheet #32. Available from www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/, accessed Jan 2015. (2015)
28. M. Silink, United Nations Resolution 61/225 - what does it mean to the diabetes world? *Int J Clin Pract Suppl*, 5-8 (2007).
29. L. Guariguata *et al.*, Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract* **103**, 137-149 (2014).
30. W. H. Herman, S. S. Fajans, Hemoglobin A $_{1c}$ for the diagnosis of diabetes: practical considerations. *Pol Arch Med Wewn* **120**, 37-40 (2010).
31. D. B. Sacks, A1C versus glucose testing: a comparison. *Diabetes Care* **34**, 518-523 (2011).
32. S. E. Inzucchi, Clinical practice. Diagnosis of diabetes. *N Engl J Med* **367**, 542-550 (2012).
33. A. E. Butler *et al.*, β -Cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 102-110 (2003).
34. E. J. de Koning, S. Bonner-Weir, T. J. Rabelink, Preservation of β -cell function by targeting β -cell mass. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 218-227 (2008).
35. J. Rahier, Y. Guiot, R. M. Goebbels, C. Sempoux, J. C. Henquin, Pancreatic β -cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* **10 Suppl 4**, 32-42 (2008).
36. V. Fagerholm *et al.*, Assessment of islet specificity of dihydrotetrabenazine radiotracer binding in rat pancreas and human pancreas. *J Nucl Med* **51**, 1439-1446 (2010).
37. M. P. Kung *et al.*, In vivo imaging of β -cell mass in rats using ^{18}F -FP-(+)-DTBZ: a potential PET ligand for studying diabetes mellitus. *J Nucl Med* **49**, 1171-1176 (2008).
38. P. B. Clark *et al.*, Neurofunctional imaging of the pancreas utilizing the cholinergic PET radioligand [^{18}F]4-fluorobenzyltrozamicol. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **31**, 258-260 (2004).
39. A. Hubalewska-Dydejczyk, A. Sowa-Staszczak, M. Tomaszuk, A. Stefańska, GLP-1 and exendin-4 for

- imaging endocrine pancreas. A review. Labelled glucagon-like peptide-1 analogues: past, present and future. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **59**, 152-160 (2015).
40. G. C. Weir, D. R. Laybutt, H. Kaneto, S. Bonner-Weir, A. Sharma, β -Cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S154-159 (2001).
 41. G. C. Weir, S. Bonner-Weir, Five stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 3**, S16-21 (2004).
 42. J. W. Höppener, B. Ahrén, C. J. Lips, Islet amyloid and type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **343**, 411-419 (2000).
 43. P. Westermark, A. Andersson, G. T. Westermark, Islet amyloid polypeptide, islet amyloid, and diabetes mellitus. *Physiol Rev* **91**, 795-826 (2011).
 44. S. P. Lee *et al.*, ^{11}C -Pittsburgh B PET imaging in cardiac amyloidosis. *JACC Cardiovasc Imaging* **8**, 50-59 (2015).
 45. G. Antoni *et al.*, In vivo visualization of amyloid deposits in the heart with ^{11}C -PIB and PET. *J Nucl Med* **54**, 213-220 (2013).
 46. M. Ono *et al.*, Development of novel ^{123}I -labeled pyridyl benzofuran derivatives for SPECT imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e74104 (2013).
 47. M. Ono *et al.*, Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Med Chem* **52**, 6394-6401 (2009).
 48. H. Watanabe *et al.*, Synthesis and biological evaluation of ^{123}I -labeled pyridyl benzoxazole derivatives: novel β -amyloid imaging probes for single-photon emission computed tomography. *RSC Advances* **5**, 1009-1015 (2015).
 49. M. Yoshimura *et al.*, Structure-activity relationships and in vivo evaluation of quinoxaline derivatives for PET imaging of β -amyloid plaques. *ACS Med Chem Lett* **4**, 596-600 (2013).
 50. J. Miklossy *et al.*, Beta amyloid and hyperphosphorylated tau deposits in the pancreas in type 2 diabetes. *Neurobiol Aging* **31**, 1503-1515 (2010).
 51. N. Harada *et al.*, Effective synthesis of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tricarbonyl complexes by microwave heating. *J Organomet Chem* **696**, 3745-3749 (2011).
 52. D. Djokic, D. Jankovic, L. Stamenkovic, I. Pirmettis, Chemical and biological evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3$ and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ complexes of some IDA derivatives. *J Radioanal Nucl Chem* **260**, 471-476 (2004).
 53. K. Serdons, T. Verduyck, J. Cleynhens, G. Bormans, A. Verbruggen, Development of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -thioflavin-T derivatives for detection of systemic amyloidosis. *J Labelled Compd Radiopharm* **51**, 357-367 (2008).
 54. W. Soeller *et al.*, Islet amyloid-associated diabetes in obese A^{vy}/a mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Diabetes* **47**, 743-750 (1998).
 55. A. E. Butler, J. Janson, W. C. Soeller, P. C. Butler, Increased β -cell apoptosis prevents adaptive increase in β -cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes* **52**, 2304-2314 (2003).

謝 辞

本研究の終わりに鑑み、終始御懇意なる御指導と御鞭撻を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 佐治 英郎 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

同時に、本研究の遂行および本論文の作成において、終始懇切なる御指導と御教示を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 小野 正博 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行において、多くの有益な御助言と御協力を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 渡邊 裕之 助教ならびに京都薬科大学 木村 寛之 准教授に厚く御礼申し上げます。

懇切なる御指導を戴きました、国立循環器病研究センター研究所画像診断医学部 天満 敬 室長、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 上田 真史 准教授、福井大学高エネルギー医学研究センター 牧野 顕 准教授、神戸薬科大学 佐野 紘平 講師、京都大学医学部附属病院 志水 陽一 助教、京都薬科大学 有光 健治 助教、昭和薬科大学 尾江 悟 助教、国立循環器病研究センター研究所画像診断医学部 近藤 直哉 研究員に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり御協力を戴きました、京都大学大学院薬学研究科 松村 憲志 博士、程 妍 博士、土井 雄貴 修士、片柳 莉果子 学士、飯國 慎平 学士、北田 彩音 さん、貝出 翔 さんに深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり必要な手技を御教示戴きました、京都大学大学院薬学研究科 原田 直弥 博士、屋木 祐亮 博士、平田 武史 修士、出口 諄 学士に深く感謝申し上げます。

アルツハイマー病患者剖検脳組織切片を御提供戴きました、京都大学大学院医学研究科 高橋 良輔 教授、国立循環器病研究センター病院 猪原 匡史 部長、岡本 洋子 博士に深く感謝申し上げます。

¹⁸F を御提供戴きました京都大学医学部附属病院放射線部の方々に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり討論に参加して戴きました、京都大学大学院薬学研究科 小川 祐 博士、松田 洋和 博士、西郡 寛太郎 博士、荒井 貴大 修士、神戸 香織 修士、三嶋 睦 学士、米澤 晶 学士、松岡 大航 学士をはじめとする病態機能分析学分野の方々に深く感謝申し上げます。

最後に、研究に専念できるように支え、応援して戴いた家族、友人に心より感謝申し上げます。