

脳タンパク質凝集体を標的とした
核医学分子イメージングプローブの開発に関する研究

2021

貝出 翔

目次

緒言	1
第1章 Tau凝集体を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発	4
第1節 ベンゾイミダゾピリジン誘導体に関する構造活性相関研究	
1.1.1. 実験方法	7
1.1.2. 結果および考察	16
1.1.3. 小括	25
第2節 ベンゾイミダゾピリジンを母核とした陽電子断層撮像用 Tau イメージングプローブの開発	26
1.2.1. 実験方法	27
1.2.2. 結果および考察	34
1.2.3. 小括	42
第2章 α -Syn凝集体を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発	43
第1節 ビスキノリン誘導体を基盤とした陽電子断層撮像用 α -Syn イメージングプローブの開発	45
2.1.1. 実験方法	46
2.1.2. 結果および考察	51
2.1.3. 小括	59

第2節	α -Syn 凝集体への結合選択性の向上を目指したカルコン類縁体の 合成と評価	60
	2.2.1. 実験方法	61
	2.2.2. 結果および考察	68
	2.2.3. 小括	78
第3節	カルコン類縁体を基盤とした陽電子断層撮像用 α -Syn イメージングプローブの開発	79
第1項	カルコン類縁体を基盤とした脳内挙動の改善/	79
	2.3.1. 実験方法	81
	2.3.2. 結果および考察	85
	2.3.3. 小括	89
第2項	カルコン類縁体を基盤とした構造最適化検討/	90
	2.3.4. 実験方法	92
	2.3.5. 結果および考察	98
	2.3.6. 小括	105
結語		106
引用文献		108
謝辞		115

緒 言

神経変性疾患とは脳および脊髄に存在する中枢神経において、認知機能や運動機能に関連する細胞群が徐々に障害を受け、脱落する疾患の総称であり、本疾患群にはアルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症などが含まれる。特に、AD および PD はその罹患者数の多さから神経変性疾患における代表疾患とされているものの¹、確定診断は剖検病理に依拠しており、現在のところ生前の確定診断法は存在しない。両疾患は加齢に伴い発生率・有病率が上昇することが知られており²、急速な高齢化社会が到来する現代において、AD および PD の患者数増加が社会問題であり、その有効な早期診断法および根本治療法の確立が喫緊の課題とされる。両疾患に共通する病理所見として、タンパク質のミスフォールディングにより形成される凝集体が脳内に異常沈着することが知られている。AD においては老人斑および神経原線維変化の主要構成成分であるアミロイド β タンパク質(A β)凝集体およびタウタンパク質(Tau)凝集体が^{3,4}、PD においてはレビー小体・レビー神経突起の主要構成成分である α -シヌクレインタンパク質(α -Syn)凝集体が認められる^{5,6}。これらのうち、Tau 凝集体および α -Syn 凝集体はそれぞれ AD および PD の病期の進展と密接に関連することが報告されており⁷⁻¹⁰、本疾患の早期・確定診断における有用なバイオマーカーとなり得るだけでなく、疾患修飾薬の開発における有用な標的候補となる可能性を秘めている。そのため、Tau 凝集体および α -Syn 凝集体を体外から検出する手法の開発が期待されている。

核医学イメージング法は、放射性核種で標識された分子イメージングプローブと、陽電子断層撮像法(PET)・単光子放出断層撮像法(SPECT)などの核医学診断法を用いて、生体の生命現象を画像化する技術である。細胞・分子レベルの標的を体深部まで非侵襲的かつ高感度で検出することが可能であることから、頭蓋骨に覆われる脳に存在する標的を体外から検出する場合、核医学イメージング法が有効なアプローチとされる。実際、脳の生体イメージング研究において、核医学イメージング法の有用性が報告されていることから¹¹、AD および PD の早期診断・治療薬開発においても、Tau 凝集体および α -Syn 凝集体を標的とした核医学イメージング法の開発は極めて有効な手段であると考えられた。本研究では、プローブ開発の側面から、これら脳タンパク質凝集体を標的とした核医学イメージング法を開発を計画した。標的に対する結合性および脳内挙動の 2 点に関して実験系を構築し、イメージングプローブの設計・合成を行い、その有用性を評価した。

現在まで、Tau イメージング研究は世界中で活発に展開され、第一世代・第二世代と称されるプローブが複数報告されており、一部については臨床研究においてその有用性が検証されている^{12,13}。ベンゾイミダゾピリジン(BIP)母核に、SPECT 用核種として放射性ヨウ素を、置換基としてジメチルアミノ基を導入した^{123/125}I]BIP-NMe₂が Tau イメージングプローブとしての基礎的性質を示したという著者の所属分野の過去の知見を基に¹⁴、本研究では BIP を母核としてより高性能な SPECT 用 Tau イメージングプローブの開発を計画した。そこで、種々のアミノ基を導入した放射性ヨウ素標識 BIP 誘導体を設計・合成し、その有用性を評価した。その結果、エチルアミノ基を導入した

[^{123/125}I]BIP-NHEt が SPECT 用 Tau イメージングプローブとして最も優れた Tau 凝集体への結合性およびマウスにおける脳移行性を示した¹⁵。この知見を基に、定量性や空間分解能に優れる PET 用プローブの開発を計画した。 [^{123/125}I]BIP-NHEt をリード化合物として、エチルアミノ基を介して放射性フッ素を導入した BIP 誘導体を設計・合成した。 [¹⁸F]IBIPF1 は Tau 凝集体を選択的かつ明瞭に描出し、高いマウス脳移行性および代謝安定性を示した。以上の結果より、 [¹⁸F]IBIPF1 は PET 用 Tau 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¹⁶。

現在までに α -Syn イメージングプローブの開発研究が活発に展開されているものの、いずれも α -Syn 凝集体への結合選択性または脳移行性に乏しく、本課題を克服し、前臨床研究の段階において脳内の α -Syn 凝集体を生体で選択的かつ明瞭に描出するプローブを開発することが急務である¹⁷。本研究では、優れた α -Syn イメージングプローブを開発する上でリードとなる化合物を選定するため、京都大学大学院薬学研究科および著者の所属分野が保有する化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行うことで、 α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示す化合物を探索した。その結果、 α -Syn イメージングプローブの開発に向けた有用なリード化合物として、KPTJ10017 および IDP-3 を見出した。そこで、まずは KPTJ10017 の化学構造を基盤として、ヒドロキシ基を介してフルオロエチル基を導入した放射性フッ素標識ビスキノリン(BQ)誘導体を設計・合成した。競合阻害実験の結果、BQ2 は α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示した。また、 [¹⁸F]BQ2 はマウス脳移行性を示し、 [¹⁸F]BQ2 が α -Syn イメージングプローブとしての基礎的性質を有することが示唆された。一方、本プローブは、既存の α -Syn イメージングプローブと同様、 $A\beta$ 凝集体への高い結合親和性を示した点で α -Syn 凝集体への結合選択性に乏しく、新たなプローブ開発が求められた¹⁸。次に、カルコン類縁体 IDP-3 をリード化合物とした分子設計を行った。導入する置換基の変換が α -Syn 凝集体への結合性を保持したまま $A\beta$ 凝集体への結合親和性を低下させる有効なアプローチであると考え、カルコン類縁体構造に種々のアリール置換基を導入することで、 α -Syn 凝集体への結合親和性および結合選択性に関する構造活性相関を検討した。その結果、特に PHNP-3 は、 α -Syn 凝集体への最も高い結合親和性および結合選択性を示し、BQ 誘導体に認められていた課題の克服に成功した。したがって、 [^{123/125}I]PHNP-3 が α -Syn イメージングプローブの開発に向けた有望なリード化合物となり得ることが示された。一方、 [¹²⁵I]PHNP-3 のマウス脳移行性は [¹⁸F]BQ2 と比べても低値を示したことから、脳内挙動に改善の余地を残した¹⁹。本課題の克服に向け、計算科学的手法として Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) アルゴリズムを用いて CNS MPO score を算出することで、マウスにおける脳内挙動を改善する合理的な分子設計を行い、 α -Syn 凝集体に対する選択的結合性およびマウス脳移行性を示すカルコン類縁体([¹⁸F]FPHNP-3)を得た。一方、脳内に α -Syn 凝集体を接種したモデルマウスを作製し、本プローブを用いて PET/CT 撮像を行った結果、 α -Syn 凝集体の明瞭な描出には至らなかった。そこで、CNS MPO score とその構成パラメーターとの相関性に着目した構造最適化を図り、水溶性リンカーを導入したカルコン類縁体を設計・合成した。 [¹⁸F]FHCL-2 を用いて PET イメージングを行った結果、マウス生体内の α -Syn 凝集体を画像化することに成功した。以上の結果より、 [¹⁸F]FHCL-2 は PET 用 α -Syn イメージングプローブとして有用である可能性が示された。

以上，本研究は AD および PD における Tau 凝集体および α -Syn 凝集体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成果を収めたものであり，AD および PD 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．

これらの結果について，以下に詳述する．

第1章

Tau 凝集体を標的とした 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、加齢に伴う記憶・認知機能の障害を特徴とする進行性の神経変性疾患である。AD は神経変性疾患の中で最も罹患者数の多い疾患であり、神経変性疾患全体の3分の2以上を占める²⁰。世界的な高齢化社会の到来に伴い、AD 罹患者数は今後も増加の一途を辿るとされており、AD への対策が社会的急務である²¹。現在のAD 診断は問診やMRIにより行われ、確定診断は剖検病理に依拠しているため、生前の確定診断は不可能とされている。そのため、現行の診断法に替わる新たな診断技術の確立が求められている。また、従来のAD 治療はコリンエステラーゼ阻害薬やN-Methyl-D-aspartic acid (NMDA)受容体阻害薬による進行抑制を中心とする対症療法が中心であった²²。近年、疾患の根本原因に焦点を当てた原因療法が提唱され、AD 病理所見を標的とした疾患修飾薬の開発が注目を集めている²³。

AD 患者に認められる病理所見として、老人斑および神経原線維変化の脳内沈着が挙げられる。いずれもタンパク質のミスフォールディングにより異常に形成される凝集体を主要構成成分とし、老人斑はアミロイドβタンパク質(Aβ)凝集体から、神経原線維変化はタウタンパク質(Tau)凝集体から主に構成される。これら脳タンパク質凝集体は、臨床症状の出現前から蓄積することが知られており、AD の早期診断および治療薬開発における有用な標的となり得ることから、Aβ凝集体およびTau凝集体を標的とした分子イメージング研究が注目されている²⁴。これら脳タンパク質凝集体を標的とする場合、体外から非侵襲的かつ高感度で深部まで検出可能な核医学イメージング法が有力なアプローチと考えられたことから、陽電子断層撮像法(Positron emission tomography: PET)および単光子放出断層撮像法(Single photon emission computed tomography: SPECT)と組み合わせる核医学分子イメージングプローブの開発が活発に展開されてきた。現在までに、AD 発症過程の最初期段階から蓄積が認められるAβ凝集体²⁵を標的としたPET用イメージングプローブとして、^[18F]Florbetapir²⁶、^[18F]Florbetaben²⁷、^[18F]Flutemetamol²⁸の3薬剤が実用化されており、Aβイメージング法は確立されたものと考えられる。

一方、Tau凝集体は、Aβ凝集体と比較して、その蓄積量がADの病期の進展と密接に関連することが報告されており、高精度なAD診断に向け、Tauイメージング法の有用性が報告されている^{13,29}。現在、Tauイメージングプローブを用いた臨床研究が世界中で進められている段階であり、Tauイメージング法は未だ確立されていない。第一世代プローブとして、^[11C]PBB3³⁰、^[18F]AV1451 (^[18F]Flortaucipir)³¹、^[18F]THK5351³²が、第二世代プローブとして、^[18F]MK6240³³、^[18F]RO69558948³⁴、^[18F]GTP-1³⁵、^[18F]JNJ64349311³⁶、^[18F]PI2620³⁷などが報告されており(Figure 1-1 および 1-2)、いくつかのプローブについてはその有用性が検証され、将来の実用化が期待されている。

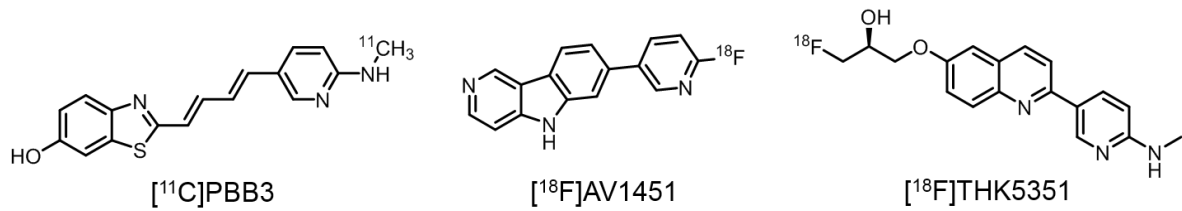


Figure 1-1. Chemical structures of first-generation-Tau imaging probes.

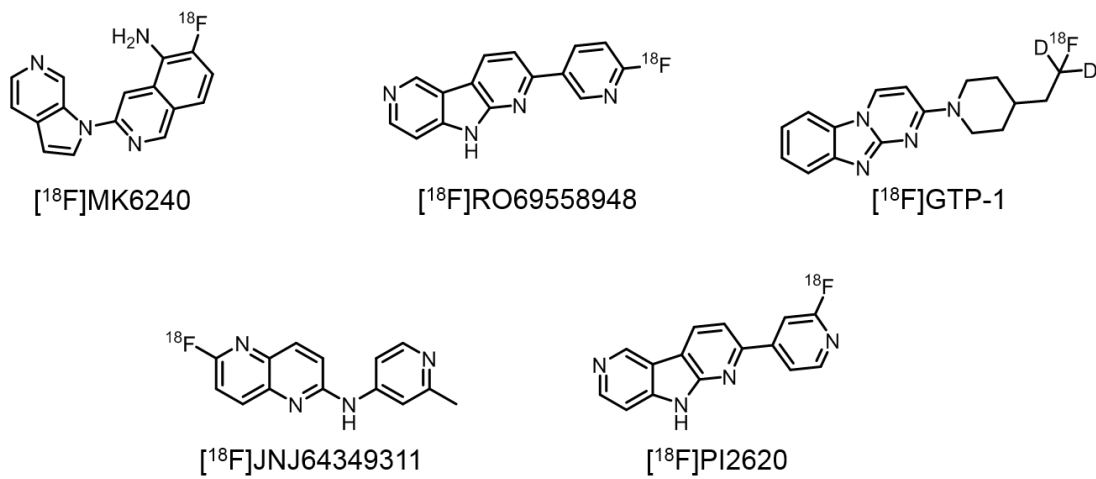


Figure 1-2. Chemical structures of second-generation-Tau imaging probes.

第1節

ベンゾイミダゾピリジン誘導体 に関する構造活性相関研究

世界中の Tau イメージングプローブの開発研究の進展に並行して、既存プローブとは異なる独自の母核を有する Tau イメージングプローブの開発を計画した。今後患者数の大幅な増加が見込まれる AD の診断・治療に対応するため、PET と比較して物理的半減期の長い放射性核種を利用可能であり、検査施設数が多い SPECT 用プローブの開発が必要であると考えた。ベンゾイミダゾピリジン (Benzimidazopyridine: BIP) 母核に、SPECT 用核種として放射性ヨウ素を、置換基としてジメチルアミノ基を導入した $[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NMe}_2$ が Tau イメージングプローブとしての基礎的性質を示したという著者の所属分野の過去の知見を基に¹⁴、本研究では BIP を母核としてより高性能な SPECT 用 Tau イメージングプローブの開発を目指した。既存の Tau イメージングプローブにおいても置換基としてアミノ基を導入した分子設計が図られていた点に着目し^{30, 32, 33}、アミノ基の導入が Tau 凝集体への良好な結合性に寄与する可能性を考えた。そこで、BIP 母核に導入するアミノ基の種類による Tau 凝集体への結合性や体内動態への影響を検討するため、放射性ヨウ素標識 BIP 誘導体として、 $[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NH}_2$ 、 $[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NHMe}$ 、 $[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NHEt}$ 、 $[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NEt}_2$ 、 $[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NHPr}$ 、 $[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NPr}_2$ を設計・合成 (Figure 1-3)、SPECT 用 Tau イメージングプローブとしての有用性を $[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NMe}_2$ と比較して評価した。

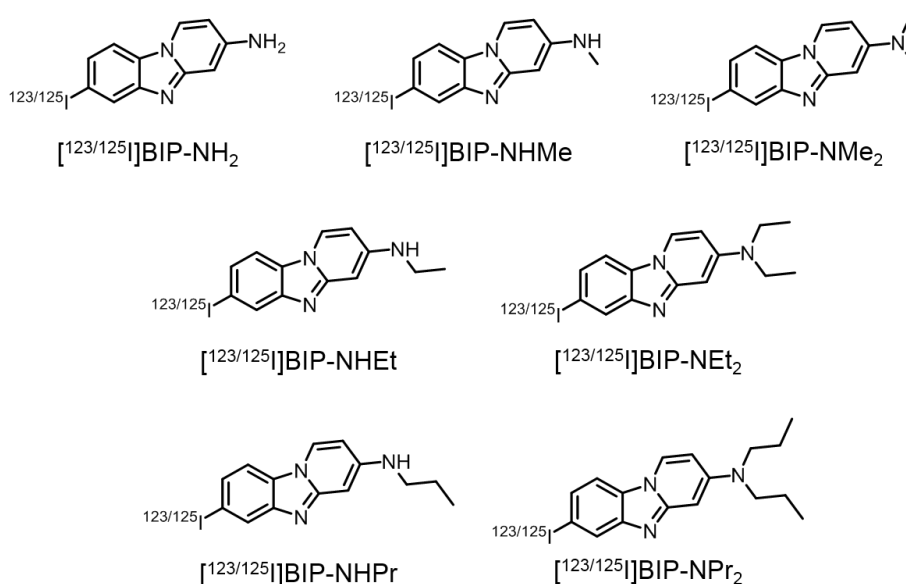


Figure 1-3. Chemical structures of BIP derivatives.

1.1.1. 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、富士フイルム和光純薬株式会社、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, フラクションコレクター: 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: M あるいは L)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。核磁気共鳴分光(Nuclear magnetic resonance: NMR)には、日本電子株式会社製 JEOL JNM-ECS400 を用い、Tetramethylsilane を内部標準物質として測定した。エレクトロスプレーイオン化質量分析(Electrospray ionization mass spectrometry: 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 EV を用いて測定した。高速原子イオン化高分解能質量分析(Fast atom bombardment high-resolution mass spectrometry: FAB-HRMS)には、JEOL JMS-700 を用いて測定した。 $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$ は、パーキンエルマーより購入した。高速液体クロマトグラフィー(High performance liquid chromatography: HPLC)には、株式会社島津製作所製 LC-20AD 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 WIZARD1480 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。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脳神経内科 高橋良輔教授および国立循環器病研究センター病院 猪原匡史部長より提供されたものを使用した。

動物

動物実験は京都大学動物実験委員会の指針を遵守して行った。ddY マウスは日本エスエルシー株式会社より購入した。動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件下で飼育し、飼料と水は自由に与えた。

BIP 誘導体の合成

2-Bromo-*N,N*-(di-*tert*-butoxycarbonyl)pyridine-4-amine (1).

2-Bromopyridine-4-amine (346 mg, 2.0 mmol)のテトラヒドロフラン(Tetrahydrofuran: THF)溶液(20 mL)に di-*tert*-Butyl dicarbonate (8.7 g, 40 mmol), 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) (触媒量), トリエチ

ルアミン(Et_3N) (334 μL , 2.4 mmol)を加え、室温で24時間攪拌した。クロロホルム(60 mL \times 2)で抽出し、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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **1** を収量 561 mg (75.2%) で得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.37 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 1.6, 5.6$ Hz, 1H), 1.47 (s, 18H). MS (ESI) m/z 373.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Bromo-3-(*N,N*-(di-*tert*-butoxycarbonyl)amino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (2).

化合物 **1** (505 mg, 1.4 mmol), 2,5-Dibromoaniline (340 mg, 1.4 mmol), CuI (51.6 mg, 0.27 mmol), Cs_2CO_3 (1.32 g, 4.1 mmol), および 1,10-Phenanthroline (97.7 mg, 0.54 mmol)を Xylene (12 mL)に溶解し、120 $^\circ\text{C}$ で24時間攪拌した。クロロホルム(60 mL \times 2)で抽出し、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 = 10/1) で精製して目的物 **2** を収量 150 mg (24.0%)で得た。 ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 8.94 (dd, $J = 0.80, 7.2$ Hz, 1H), 8.17 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 0.80, 2.0$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.96 (dd, $J = 2.0, 7.2$ Hz, 1H), 1.46 (s, 18H). MS (ESI) m/z 462.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Tributylstannyl-3-(*N,N*-(di-*tert*-butoxycarbonyl)amino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (3).

化合物 **2** (75.5 mg, 0.16 mmol), Bis(tributyltin) (163 μL , 0.16 mmol), $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ (81 mg, 0.07 mmol), Et_3N (2.0 mL)および *N,N*-ジメチルホルムアミド(*N,N*-dimethylformamide: DMF) (1.0 mL)を 1,4-Dioxane (6.0 mL)に溶解し、95 $^\circ\text{C}$ で3.5時間攪拌した。クロロホルム(50 mL \times 2)で抽出し、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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **3** を収量 27.8 mg (25.3%)で得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.43 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 1.60-1.57 (m, 6H), 1.47-1.44 (m, 6H), 1.44-1.43 (m, 6H), 1.24 (s, 18H), 0.92-0.91 (m, 9H). MS (ESI) m/z 674.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-3-(*N,N*-(di-*tert*-butoxycarbonyl)amino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (4).

化合物 **3** (27.8 mg, 0.04 mmol)をクロロホルム(10 mL)に溶解し、ヨウ素のクロロホルム溶液(1.6 mL, 50 mg/mL)を加えて室温で30分間攪拌した。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止した後、クロロホルム(40 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。残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/2)を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、目的物 **4** を収量 15.7 mg (74.6%)で得た。 ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 8.92 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.20 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 1.6, 8.8$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 2.0, 2.8$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J = 2.0, 7.2$ Hz, 1H), 1.46(s, 18H). MS (ESI) m/z 510.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-3-amino-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (5, BIP-NH₂).

化合物 **4** (15.7 mg, 0.03 mmol)を CH₂Cl₂ (5.0 mL)に溶解し、トリフルオロ酢酸(Trifluoroacetic acid: TFA) (1.5 mL)を加えて室温で 30 分間攪拌した。2 N NaOH 水溶液を加えて中和した後、クロロホルム(50 mL×2)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒を減圧留去した。残渣を(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、目的物 **5** (BIP-NH₂)を収量 8.83 mg (92.8%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.37 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.32 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, Dimethyl sulfoxide (DMSO)-*d*₆) δ 151.8, 151.2, 147.1, 128.7, 126.9, 125.9, 124.8, 112.2, 105.3, 89.5, 88.5. MS (ESI) *m/z* 310.0 [M+H]⁺. HRMS (FAB) *m/z* 309.9839 [M+H]⁺.

2-Bromo-*N*-methylpyridine-4-amine (6).

2-Bromopyridine-4-amine (1.73 g, 10 mmol)を DMF (30 mL)に溶解し、ヨウ化メチル(1.3 mL, 20 mmol), 水素化ナトリウム(NaH) (1.2 g, 50 mmol)を氷冷下に加え、1 時間攪拌した。水で反応を停止した後、酢酸エチル(70 mL×2)で抽出し、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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **6** を収量 563 mg (30.1%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.92 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.38 (dd, *J* = 2.4, 5.6 Hz, 1H), 4.32 (s, 1H), 2.86 (d, *J* = 5.2 Hz, 3H). MS (ESI) *m/z* 187.0 [M+H]⁺.

2-Bromo-*N*-ethylpyridine-4-amine (7).

2-Bromopyridine-4-amine (1.73 g, 10 mmol)を DMF (30 mL)に溶解し、ヨウ化エチル(1.6 mL, 20 mmol), 水素化ナトリウム(NaH) (1.2 g, 50 mmol)を氷冷下に加え、1 時間攪拌した。水で反応を停止した後、酢酸エチル(70 mL×2)で抽出し、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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **7** を収量 212 mg (10.5%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.91 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.36 (dd, *J* = 2.4, 6.0 Hz, 1H), 4.18 (s, 1H), 3.21-3.15 (m, 2H) 1.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). MS (ESI) *m/z* 201.0 [M+H]⁺.

2-Bromo-*N*-ethylpyridine-4-amine (8).

2-Bromopyridine-4-amine (1.73 g, 10 mmol)を DMF (30 mL)に溶解し、ヨウ化プロピル(1.9 mL, 20 mmol), 水素化ナトリウム(NaH) (1.2 g, 50 mmol)を氷冷下に加え、1 時間攪拌した。水で反応を停止した後、酢酸エチル(70 mL×2)で抽出し、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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **8** を収量 768 mg (35.7%)で得た。¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 7.77 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.53 (dd, *J* = 2.4, 5.6 Hz, 1H), 6.09 (s, 1H), 3.12 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.62 (m,

2H), 0.96 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H). MS (ESI) m/z 215.0 $[M+H]^+$.

2-Bromo-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-methylpyridine-4-amine (9).

化合物 **1** と同様の合成法により, 化合物 **6** から, 目的物 **9** を収量 847 mg (98.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 8.22 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 2.0, 5.6$ Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 1.51 (s, 9H). MS (ESI) m/z 287.0 $[M+H]^+$.

2-Bromo-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-ethylpyridine-4-amine (10).

化合物 **1** と同様の合成法により, 化合物 **7** から, 目的物 **10** を収量 310 mg (99.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.27 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J = 2.0, 5.6$ Hz, 1H), 3.75 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.13 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). MS (ESI) m/z 301.0 $[M+H]^+$.

2-Bromo-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-propylpyridine-4-amine (11).

化合物 **1** と同様の合成法により, 化合物 **8** から, 目的物 **11** を収量 1.1 g (97.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 8.23 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 2.0, 5.6$ Hz, 1H), 3.74 (q, $J = 4.9$ Hz, 2H), 1.65-1.60 (m, 2H), 1.50 (s, 9H), 0.89 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). MS (ESI) m/z 315.0 $[M+H]^+$.

7-Bromo-3-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-methylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (12).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **9** から, 目的物 **12** を収量 114 mg (10.3%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.27 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.70 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 1.6, 8.8$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 2.4, 7.6$ Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.53 (s, 9H). MS (ESI) m/z 376.1 $[M+H]^+$.

7-Bromo-3-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-ethylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (13).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **10** から, 目的物 **13** を収量 161 mg (40.2%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.21 (dd, $J = 1.6, 4.4$ Hz, 1H), 8.27 (dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 1.6, 8.8$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.04 (dd, $J = 2.0, 7.6$ Hz, 1H), 3.83 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.52 (s, 9H), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). MS (ESI) m/z 390.1 $[M+H]^+$.

7-Bromo-3-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-propylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (14).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **11** から, 目的物 **14** を収量 270 mg (19.3%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.71 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.03 (dd, $J = 2.0, 7.6$ Hz, 1H), 3.73 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.73-1.63 (m, 2H), 1.50 (s, 9H), 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). MS (ESI) m/z 404.1 $[M+H]^+$.

7-Tributylstannyl-3-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-methylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (15).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **12** から, 目的物 **15** を収量 42.3 mg (24.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.07 (dd, $J = 2.0, 7.2$ Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 1.64-1.52 (m, 15H), 1.39-1.30 (m, 6H), 1.21-1.04 (m, 6H), 0.90-0.87 (m, 9H). MS (ESI) m/z 588.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Tributylstannyl-3-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-ethylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (16).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **13** から, 目的物 **16** を収量 62.3 mg (25.1%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.32 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.83 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 7.39 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J = 2.0, 7.6$ Hz, 1H), 3.82 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.61-1.52 (m, 6H), 1.50 (s, 9H), 1.39-1.30 (m, 6H), 1.29-1.18 (m, 6H), 1.12 (t, $J = 8.4$ Hz, 3H). 0.90-0.85 (m, 9H). MS (ESI) m/z 602.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Tributylstannyl-3-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-propylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (17).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **14** から, 目的物 **17** を収量 108 mg (36.1%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.32 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.38 (s, 1H), 6.92 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.72 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.67-1.57 (m, 6H), 1.55-1.54 (m, 6H), 1.49 (s, 9H), 1.37-1.32 (m, 6H), 1.12 (t, $J = 8.0$ Hz, 3H), 0.94-0.92 (m, 2H), 0.90-0.86 (m, 9H). MS (ESI) m/z 616.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-3-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-methylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (18).

化合物 **4** と同様の合成法により, 化合物 **15** から, 目的物 **18** を収量 24.1 mg (78.1%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.60 (s, 2H), 7.33 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 2.4, 7.6$ Hz, 1H), 3.39 (s, 3H) 1.53 (s, 9H). MS (ESI) m/z 424.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-3-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-ethylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (19).

化合物 **4** と同様の合成法により, 化合物 **16** から, 目的物 **19** を収量 20.3 mg (83.5%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.23 (d, $J = 0.80$ Hz, 1H), 7.61 (s, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.04 (dd, $J = 2.0, 7.6$ Hz, 1H), 3.83 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.51 (s, 9H), 1.28 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H). MS (ESI) m/z 438.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-3-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-ethylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (20).

化合物 **4** と同様の合成法により, 化合物 **17** から, 目的物 **20** を収量 22.9 mg (98.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.23 (d, $J = 0.80$ Hz, 1H), 7.60 (s, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.03 (dd, $J = 2.0, 7.6$ Hz, 1H), 3.73 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.73-1.65 (m, 2H), 1.50 (s, 9H), 0.93 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H). MS

(ESI) m/z 452.1 $[M+H]^+$.

7-Iodo-3-(*N*-methylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (21, BIP-NHMe).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **18** から, 目的物 **21** を収量 16.6 mg (88.0%) で得た. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.60 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 4.8$ Hz, 1H), 6.49 (dd, $J = 2.0, 7.6$ Hz, 1H), 6.14 (s, 1H), 2.79 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 152.1, 151.2, 147.1, 128.8, 126.24, 126.15, 125.0, 112.2, 105.3, 88.3, 86.0 29.1. MS (ESI) m/z 324.0 $[M+H]^+$. HRMS (FAB) m/z 323.9996 $[M+H]^+$.

7-Iodo-3-(*N*-ethylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (22, BIP-NHEt).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **19** から, 目的物 **22** を収量 14.0 mg (89.4%) で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.05 (d, $J = 1.2$ Hz, 2H), 7.45 (dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.25 (dd, $J = 2.4, 7.2$ Hz, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.30-3.23 (m, 2H), 1.34 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 152.0, 150.1, 147.2, 128.8, 126.3, 126.1, 124.9, 112.2, 105.3, 88.3, 86.2, 36.9, 13.6. MS (ESI) m/z 338.0 $[M+H]^+$. HRMS (FAB) m/z 338.0158 $[M+H]^+$.

7-Iodo-3-(*N*-propylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (23, BIP-NHPr).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **20** から, 目的物 **23** を収量 17.7 mg (89.3%) で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.04 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 7.44 (dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.25 (dd, $J = 2.4, 7.2$ Hz, 1H), 4.28 (s, 1H), 3.21-3.16 (m, 2H), 1.75-1.70 (m, 2H), 1.04 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 152.1, 150.3, 147.2, 128.8, 126.3, 126.0, 124.9, 112.1, 105.3, 88.3, 86.1, 44.1, 21.3, 11.7. MS (ESI) m/z 352.0 $[M+H]^+$. HRMS (FAB) m/z 352.0307 $[M+H]^+$.

2-Bromo-*N,N*-diethylpyridine-4-amine (24).

化合物 **7** と同様の合成法により, 2-Bromopyridine-4-amine から, 目的物 **24** を収量 1.88 g (81.8%) で得た. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.27 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 3.87 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.60 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H). MS (ESI) m/z 229.1 $[M+H]^+$.

2-Bromo-*N,N*-dipropylpyridine-4-amine (25).

化合物 **8** と同様の合成法により, 2-Bromopyridine-4-amine から, 目的物 **25** を収量 1.40 g (54.5%) で得た. ^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 7.81 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.59 (dd, $J = 2.4, 6.0$ Hz, 1H), 3.33 (t, $J = 8.0$ Hz, 4H), 1.66-1.56 (m, 4H), 0.93 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H). MS (ESI) m/z 257.0 $[M+H]^+$.

7-Bromo-3-(*N,N*-diethylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (26).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **24** から, 目的物 **26** を収量 1.10 g (43.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.21 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 8.27 (dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 3.46 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H). MS (ESI) m/z 318.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Bromo-3-(*N,N*-dipropylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**27**).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **25** から, 目的物 **27** を収量 868 mg (46.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.48 (dd, $J = 2.4, 7.6$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.34 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.74-1.64 (m, 4H), 0.97 (t, $J = 7.6$ Hz, 6H). MS (ESI) m/z 346.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Tributylstannyl-3-(*N,N*-diethylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**28**).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **26** から, 目的物 **28** を収量 278 mg (15.2%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.45 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 3.46 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.65-1.53 (m, 6H), 1.39-1.30 (m, 6H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.16-1.03 (m, 6H), 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H). MS (ESI) m/z 530.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Tributylstannyl-3-(*N,N*-dipropylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**29**).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **27** から, 目的物 **29** を収量 146 mg (25.2%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 3.34 (t, $J = 8.0$ Hz, 4H), 1.72-1.66 (m, 6H), 1.51-1.45 (m, 4H), 1.39-1.28 (m, 6H), 1.10 (t, $J = 8.0$ Hz, 6H), 0.99-0.94 (m, 6H), 0.91-0.86 (m, 9H). MS (ESI) m/z 558.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-3-(*N,N*-diethylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**30**, BIP-NEt₂).

化合物 **4** と同様の合成法により, 化合物 **28** から, 目的物 **30** を収量 23.2 mg (93.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.10 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 0.80$ Hz, 1H), 7.42-7.41 (m, 2H), 6.49 (dd, $J = 2.4, 7.6$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.46 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 152.0, 148.7, 147.4, 128.5, 126.9, 125.9, 124.8, 112.4, 102.3, 88.6, 88.2, 44.0, 12.5. MS (ESI) m/z 366.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS (FAB) m/z 366.0469 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-3-(*N,N*-dipropylamino)-pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**31**, BIP-NPr₂).

化合物 **4** と同様の合成法により, 化合物 **29** から, 目的物 **31** を収量 15.2 mg (67.4%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.68 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, 1H), 6.74 (dd, $J = 2.4, 7.2$ Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 2.51 (t, $J = 2.0$ Hz, 4H), 1.64-1.57 (m, 4H),

0.93 (t, $J = 7.6$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 151.9, 149.2, 147.4, 128.4, 126.7, 125.9, 124.8, 112.4, 102.5, 88.6, 88.2, 51.7, 20.1, 11.1. MS (ESI) m/z 394.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS (FAB) m/z 394.0779 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^{125}I 標識 BIP 誘導体の合成

各非標識体に対応するトリブチルスズ標識前駆体を用い、スズ-ヨウ素交換反応により標識した。1 N HCl 水溶液(100 μL)および 3% H_2O_2 水溶液(100 μL)に、 $^{125}\text{I}[\text{NaI}]$ (3.7–7.4 MBq, 比放射能 81.4 TBq/mmol)を添加し、標識前駆体の EtOH 溶液(1.0 mg/mL, 200 μL)を加えた。室温で 2 分間反応させた後、還元剤として飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液(200 μL)を加え、反応を停止した。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(200 μL)で中和した後、酢酸エチルで目的物を抽出した。無水硫酸ナトリウムを充填したカラムを通し脱水した後、溶媒を留去した。 $^{125}\text{I}[\mathbf{5}]$ ($^{125}\text{I}[\text{BIP-NH}_2]$), $^{125}\text{I}[\mathbf{21}]$ ($^{125}\text{I}[\text{BIP-NHMe}]$), $^{125}\text{I}[\mathbf{22}]$ ($^{125}\text{I}[\text{BIP-NHEt}]$), $^{125}\text{I}[\mathbf{23}]$ ($^{125}\text{I}[\text{BIP-NHPr}]$)については、TFA/クロロホルム = 1/1 の混合溶液(1 mL)を加え、さらに室温で 30 分間攪拌して脱保護を行った後、酢酸エチルによる抽出、無水硫酸ナトリウムによる脱水および溶媒留去を行った。残渣を移動相(200 μL)に溶解させ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 (0.1%TFA 含有アセトニトリル(MeCN)/ H_2O)を用いて目的とする ^{125}I 標識体を精製した。

AD 患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 患者脳組織切片(76 歳男性, 6 μm)を、Xylene (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 標識体の 10% EtOH 溶液 (370 kBq/mL)を添加し、室温で 2 時間インキュベートした。50% EtOH 溶液で洗浄後(1 h \times 1), イメージングプレートに 12 時間露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。

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 患者脳組織切片と同ロットの切片を用いて、 $\text{A}\beta$ および Tau の免疫染色を行った。Tau の免疫染色における 1 次抗体には、抗リン酸化 Tau モノクローナル抗体(AT8, Thermo Scientific)を、 $\text{A}\beta$ の免疫染色における 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。Xylene (15 min \times 2), 100% EtOH (1 min \times 2), 90% EtOH (1 min \times 1), 80% 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。抗原の賦活化には 0.01 M クエン酸緩衝液(pH 6.0)中におけるオートクレーブ(121 $^\circ\text{C}$, 15 min)および蟻酸処理(5 min)を行った。流水で洗浄(5 min)した後、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate-buffered saline: PBS)-Tween 20 (2 min \times 1)で洗浄した。1 次抗体溶液と室温で 1 時間反応させた後、PBS-Tween 20 (5 min \times 3)で洗浄した。ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス)と室温で 30 分間反応させた後、PBS-Tween 20 (3 min \times 3)およびトリス緩衝生理食塩水(Tris-buffered saline: TBS) (5 min \times 1)で洗浄した。最後に、Diaminobenzidine (DAB)溶液と室温で 1 分間反応させた。超純水(1 min \times 1)

で洗浄し、反応を停止した。脳組織切片を封入した後、顕微鏡で観察した。

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

正常マウスとして5週齢、雄性の ddY マウスを用いた。¹²⁵I 標識体を 0.1% Tween 80 および 10% EtOH を含有した生理食塩水溶液で希釈した。1群5匹のマウスに、¹²⁵I 標識体(13.6-37.0 kBq, 100 μ L) を尾静脈より投与し、2, 10, 30, 60 分後に屠殺、採血後、主要な臓器を摘出し、重量と放射エネルギーを測定し、放射能集積量(% Injected dose/g (% ID/g)または% ID)を算出した。

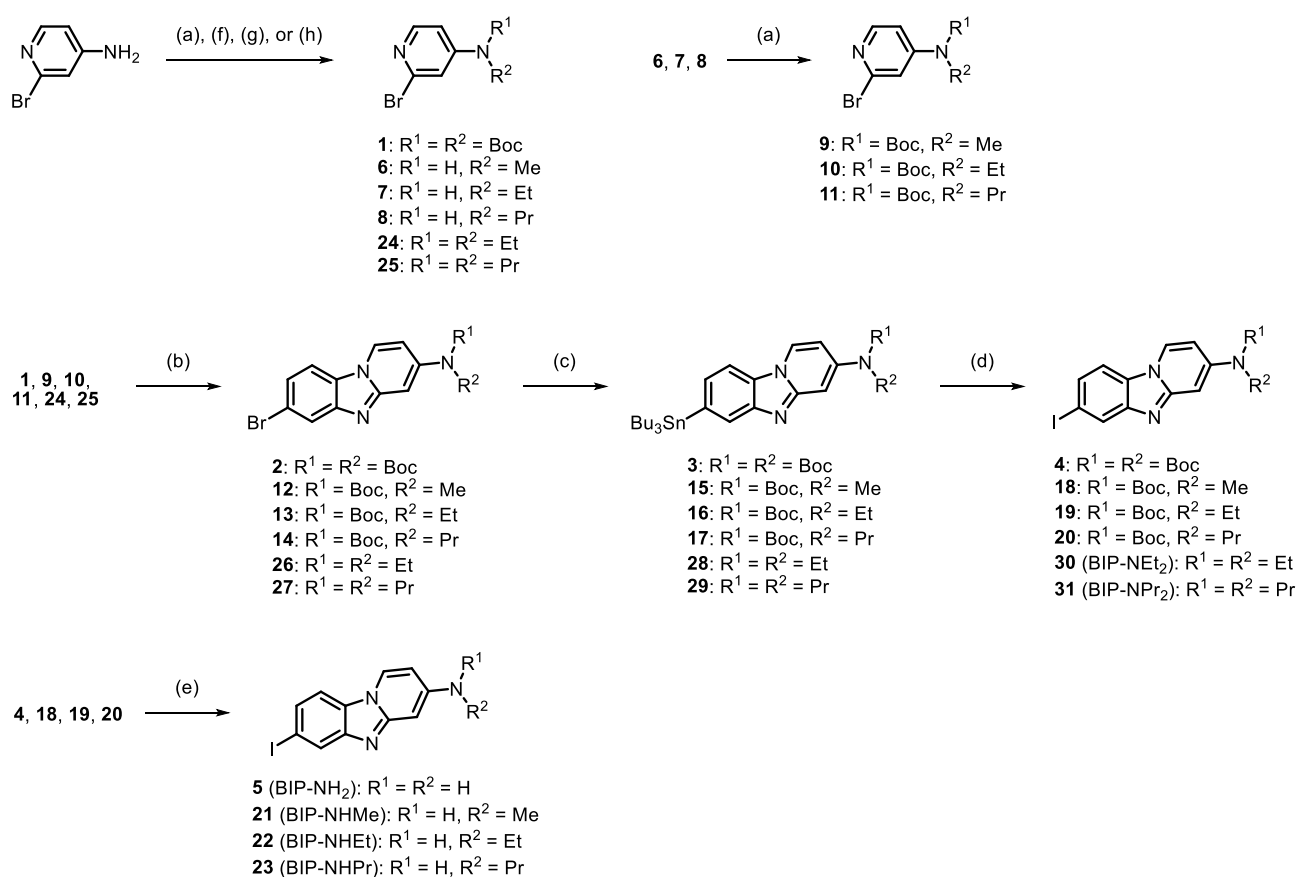
LogP 値測定

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 ¹²⁵I 標識体(170 kBq)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、それぞれの放射エネルギーを測定した。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 500 μ L の放射エネルギーを測定した。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算出した。

1.1.2. 結果と考察

BIP 誘導体の合成

Scheme 1-1 に BIP 誘導体の合成経路を示す. 2-Bromopyridine-4-amine を出発原料として 1-2 工程を経て化合物 **1**, **9**, **10**, **11**, **24**, および **25** を収率 10.4-81.8% で得た. その後, 2,5-Dibromoaniline と縮合反応させることで BIP 骨格を形成させ, 化合物 **2**, **12**, **13**, **14**, **26**, および **27** を得た. ビストリブチルスズと反応させることによって標識前駆体である化合物 **3**, **15**, **16**, **17**, **28**, および **29** を収率 15.2-36.1% で得た. さらにスズ-ヨウ素交換反応および脱保護反応を経て, 非標識体である化合物 **5** (BIP-NH₂), **21** (BIP-NHMe), **22** (BIP-NHEt), **23** (BIP-NHPr), **30** (BIP-NEt₂), および **31** (BIP-NPr₂) を総収率 0.50-5.0% で得た.

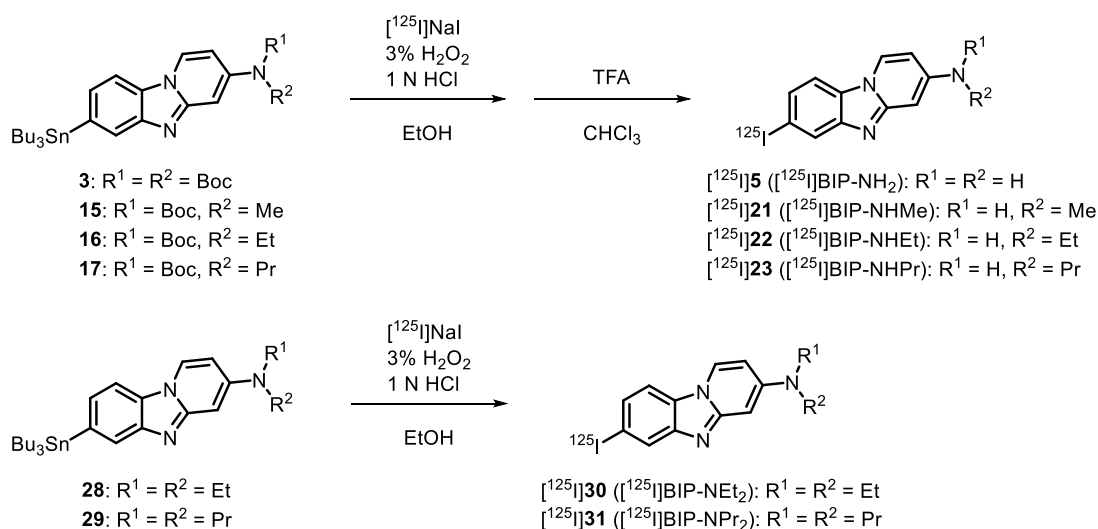


Reagent and conditions: (a) Boc₂O, DMAP, Et₃N, THF, 80 °C; (b) 2,5-Dibromoaniline, CuI(I), 1,10-Phenanthroline, Cs₂CO₃, Xylene, 120 °C; (c) (SnBu₃)₂, Pd(PPh₃)₄, Et₃N, 1,4-Dioxane, 95 °C; (d) I₂, CHCl₃, rt; (e) TFA, CH₂Cl₂, rt; (f) CH₃I, NaH, 0 °C; (g) CH₃CH₂I, NaH, 0 °C; (h) CH₃CH₂CH₂I, NaH, 0 °C.

Scheme 1-1. Synthetic routes for BIP derivatives.

¹²⁵I 標識 BIP 誘導体の合成

Scheme 1-2 に ¹²⁵I 標識経路を示す. [¹²⁵I]**5** ([¹²⁵I]BIP-NH₂), [¹²⁵I]**21** ([¹²⁵I]BIP-NHMe), [¹²⁵I]**22** ([¹²⁵I]BIP-NHEt), および [¹²⁵I]**23** ([¹²⁵I]BIP-NHPr)は, 1 N HCl 水溶液および 3% H₂O₂ 水溶液存在下での [¹²⁵I]NaI によるヨウ素化, および酸性条件下での脱保護の 2 工程を経て合成した. [¹²⁵I]**30** ([¹²⁵I]BIP-NEt₂)および [¹²⁵I]**31** ([¹²⁵I]BIP-NPr₂)はヨウ素化の 1 工程を経て合成した. 各 ¹²⁵I 標識体は Table 1-1 に示す放射化学的収率(25.1-64.6%), 放射化学的純度 95%以上で得た.



Scheme 1-2. ¹²⁵I-Labeling of BIP derivatives.

Table 1-1. Radiochemical yields of ¹²⁵I-labeled BIP derivatives.

Compound	Radiochemical yield (%)
[¹²⁵ I] 5 ([¹²⁵ I]BIP-NH ₂)	35.0
[¹²⁵ I] 21 ([¹²⁵ I]BIP-NHMe)	38.0
[¹²⁵ I] 22 ([¹²⁵ I]BIP-NHEt)	25.1
[¹²⁵ I] 30 ([¹²⁵ I]BIP-NEt ₂)	64.6
[¹²⁵ I] 23 ([¹²⁵ I]BIP-NHPr)	27.8
[¹²⁵ I] 31 ([¹²⁵ I]BIP-NPr ₂)	40.0

AD 患者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

¹²⁵I 標識した BIP 誘導体について, Aβ 凝集体に対する Tau 凝集体への選択的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 実験を行った(Figure 1-4). まず, 前頭葉および側頭

葉の2種類の切片を用いて、抗 A β 抗体および抗 Tau 抗体による免疫染色を行ったところ、A β 凝集体については前頭葉および側頭葉いずれの灰白質においても顕著な蓄積が認められた一方、Tau 凝集体は側頭葉灰白質にのみ顕著な蓄積が認められた(Figure 1-4O-R). この結果より、優れた Tau イメージングプローブとして機能するためには、Tau 凝集体の免疫染色と同様、プローブが側頭葉灰白質にのみ顕著に集積し、前頭葉灰白質には集積しない必要があると考えた. [¹²⁵I]5 ([¹²⁵I]BIP-NH₂), [¹²⁵I]21 ([¹²⁵I]BIP-NHMe), [¹²⁵I]22 ([¹²⁵I]BIP-NHEt), [¹²⁵I]30 ([¹²⁵I]BIP-NEt₂), および [¹²⁵I]23 ([¹²⁵I]BIP-NHPr)については、[¹²⁵I]BIP-NMe₂と同様、側頭葉灰白質に顕著な層状の放射能集積が認められ(Figure 1-4B, D, F, H, J, and L), その集積パターンは免疫染色における Tau 集積パターンとよく一致した. また、前頭葉灰白質においては顕著な放射能集積は認められなかったことから(Figure 1-4A, C, E, G, I, and K), これら ¹²⁵I 標識 BIP 誘導体が A β 凝集体に対して Tau 凝集体への選択的結合性を示すことが明らかとなった. 一方、[¹²⁵I]31 ([¹²⁵I]BIP-NPr₂)については、前頭葉および側頭葉いずれの灰白質においても顕著な放射能集積が認められず、前頭葉および側頭葉の白質において比較的高い非特異的集積が認められた(Figure 1-4M and N). この結果は[¹²⁵I]31 ([¹²⁵I]BIP-NPr₂)の高い脂溶性に起因するものと考えられ、[¹²⁵I]31 ([¹²⁵I]BIP-NPr₂)が Tau イメージングプローブとして機能しない可能性が示された.

次に、¹²⁵I 標識 BIP 誘導体の Tau 凝集体への結合親和性および結合選択性を評価するため、*in vitro* ARG 実験により得られたオートラジオグラムから、切片に残存する ¹²⁵I 標識 BIP 誘導体由来の放射能集積量を定量解析した(Figure 1-5). そこで、前頭葉灰白質、前頭葉白質、側頭葉灰白質、側頭葉白質の4領域を関心領域として設定し、単位面積当たりの放射能集積量(counts per minute per square millimeter: cpm/mm²)を算出した. 前頭葉灰白質および側頭葉灰白質を Tau 凝集体への結合親和性および結合選択性の評価に、前頭葉白質および側頭葉白質を非特異的結合性の評価に用いた. [¹²⁵I]5 ([¹²⁵I]BIP-NH₂), [¹²⁵I]21 ([¹²⁵I]BIP-NHMe), [¹²⁵I]22 ([¹²⁵I]BIP-NHEt), [¹²⁵I]30 ([¹²⁵I]BIP-NEt₂), および [¹²⁵I]23 ([¹²⁵I]BIP-NHPr)は Tau 凝集体に富む側頭葉灰白質において顕著に高い放射能集積を示し、Tau 蓄積が認められない他の関心領域における集積量は低値を示した. 特に、[¹²⁵I]22 ([¹²⁵I]BIP-NHEt)および[¹²⁵I]30 ([¹²⁵I]BIP-NEt₂)の側頭葉灰白質における放射能集積量は、[¹²⁵I]BIP-NMe₂と同様、高値を示し(1242-1248 cpm/mm²), 他の関心領域における放射能集積量はいずれの BIP 誘導体も同等であった. 以上より、[¹²⁵I]22 ([¹²⁵I]BIP-NHEt)および[¹²⁵I]30 ([¹²⁵I]BIP-NEt₂)は、非特異結合が少なく、Tau 凝集体への高い結合親和性を示すことが示唆された. さらに、前頭葉灰白質(A β (+), Tau(-))における放射能集積量に対する側頭葉灰白質(A β (+), Tau(+))における放射能集積量の比を算出することで、各 ¹²⁵I 標識 BIP 誘導体の A β 凝集体に対する Tau 凝集体への結合選択性を評価した(Table 1-2). [¹²⁵I]BIP-NMe₂ (32.8)と同様、[¹²⁵I]22 ([¹²⁵I]BIP-NHEt), [¹²⁵I]30 ([¹²⁵I]BIP-NEt₂), [¹²⁵I]23 ([¹²⁵I]BIP-NHPr)は高い放射能集積比(26.2-30.5)を示し、これらプローブが Tau 凝集体への高い結合選択性を示すことが明らかとなった. 一方、[¹²⁵I]31 ([¹²⁵I]BIP-NPr₂)については、4つの関心領域に均一な放射能集積が認められ、前頭葉灰白質および側頭葉灰白質における放射能集積比は低値を示したことから(1.2), Tau 凝集体への結合親和性および結合選択性を示さない可能性が示唆された.

以上の結果より、 ^{125}I 標識 BIP 誘導体間で、Tau 凝集体への結合親和性(73.4-1248 cpm/mm²)および結合選択性(側頭葉灰白質/前頭葉灰白質 = 1.2-30.5)に顕著な相違が認められたことから、BIP 骨格に導入されたアミノ基の種類が BIP 誘導体の Tau 結合性に影響を及ぼし、 ^{125}I 22 (^{125}I BIP-NHEt)および ^{125}I 30 (^{125}I BIP-NEt₂)が Tau 凝集体への優れた結合親和性および結合選択性を示すことが明らかとなった。

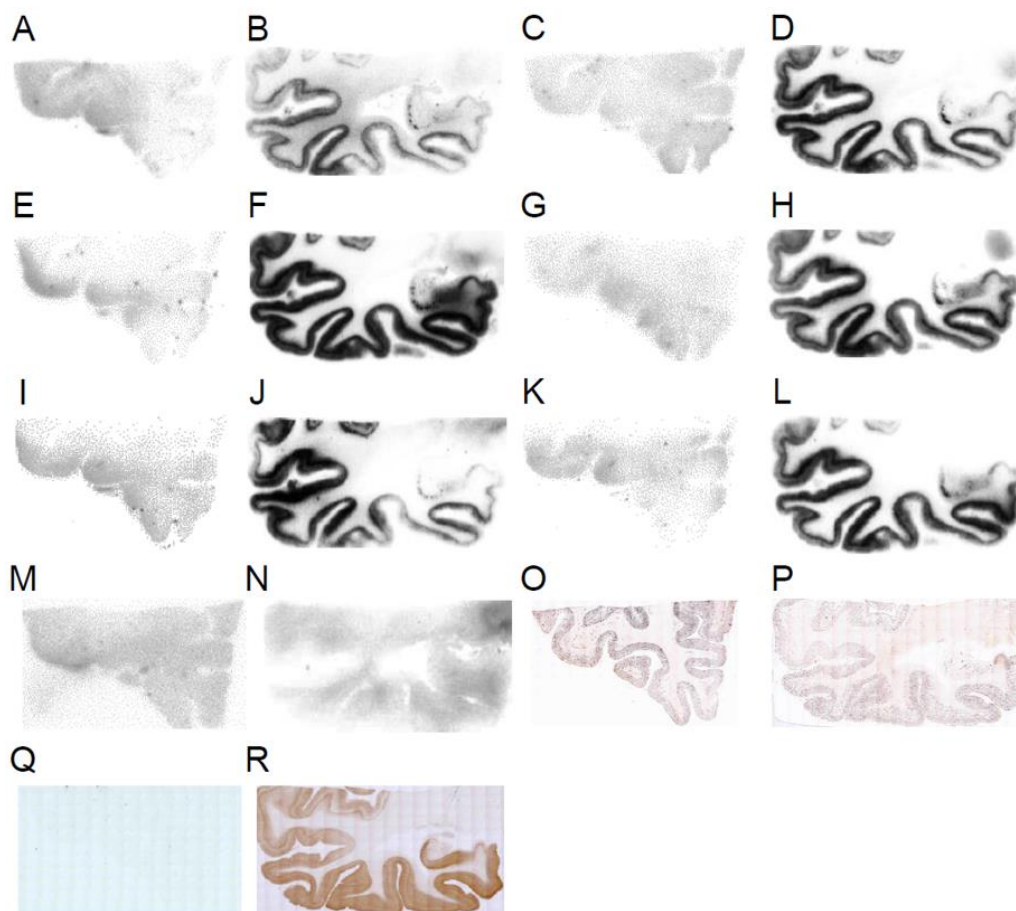


Figure 1-4. Comparison of *in vitro* autoradiograms of ^{125}I 5 (^{125}I BIP-NH₂) (A and B), ^{125}I 21 (^{125}I BIP-NHMe) (C and D), ^{125}I BIP-NMe₂ (E and F), ^{125}I 22 (^{125}I BIP-NHEt) (G and H), ^{125}I 30 (^{125}I BIP-NEt₂) (I and J), ^{125}I 23 (^{125}I BIP-NHPr) (K and L), ^{125}I 31 (^{125}I BIP-NPr₂) (M and N), and immunohistochemical staining with anti-A β antibody (O and P) and anti-phosphorylated tau antibody (Q and R) in AD brain sections. A, C, E, G, I, K, M, O, and Q are the sections from the frontal lobes. B, D, F, H, J, L, N, P, and R are the sections from the temporal lobes.

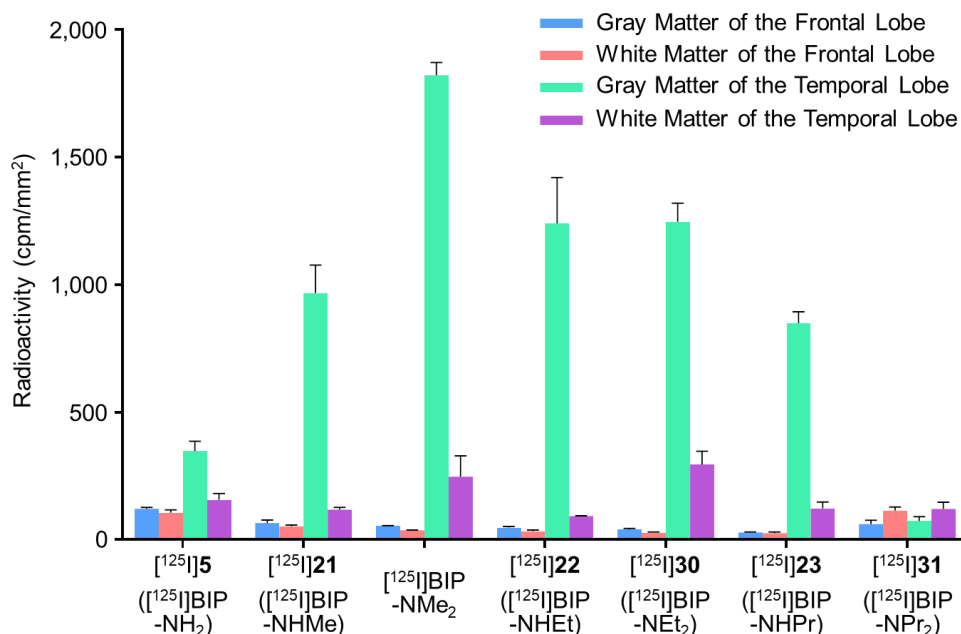


Figure 1-5. Quantitative analysis of *in vitro* ARG of ¹²⁵I-labeled BIP derivatives with AD brain sections. Data are presented as mean ± standard errors (n = 3-4).

Table 1-2. Ratio of radioactivity accumulation in the gray matter of the temporal lobe (A) against the gray matter of the frontal lobe (B).

Compound	A/B ratio
[¹²⁵ I]5 ([¹²⁵ I]BIP-NH ₂)	2.9
[¹²⁵ I]21 ([¹²⁵ I]BIP-NHMe)	14.7
[¹²⁵ I]BIP-NMe ₂	32.8
[¹²⁵ I]22 ([¹²⁵ I]BIP-NHEt)	26.2
[¹²⁵ I]30 ([¹²⁵ I]BIP-NEt ₂)	30.5
[¹²⁵ I]23 ([¹²⁵ I]BIP-NHPr)	29.2
[¹²⁵ I]31 ([¹²⁵ I]BIP-NPr ₂)	1.2

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

各 ¹²⁵I 標識 BIP 誘導体の体内動態を評価するため、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 1-6, Table 1-3, および Table 1-4 に示す。全ての BIP 誘導体は、投与 2 分後における脳内放射エネルギーが 2.01-6.04% ID/g と、投与早期における脳移行性を示した。正常マウス脳内には Tau 凝集体が存在しないため、脳内放射能の経時的な減少は正常脳組織からの消失を示す³⁸。各 ¹²⁵I 標識 BIP 誘導体の脳内放射エネルギーは、投与 30 分後では 0.38-0.66% ID/g, 投与 60 分後では

0.12-0.28% ID/g と経時的に減少したことから、全ての BIP 誘導体は脳へ移行後、経時的に脳外へ消失されることが示唆された(Figure 1-6).

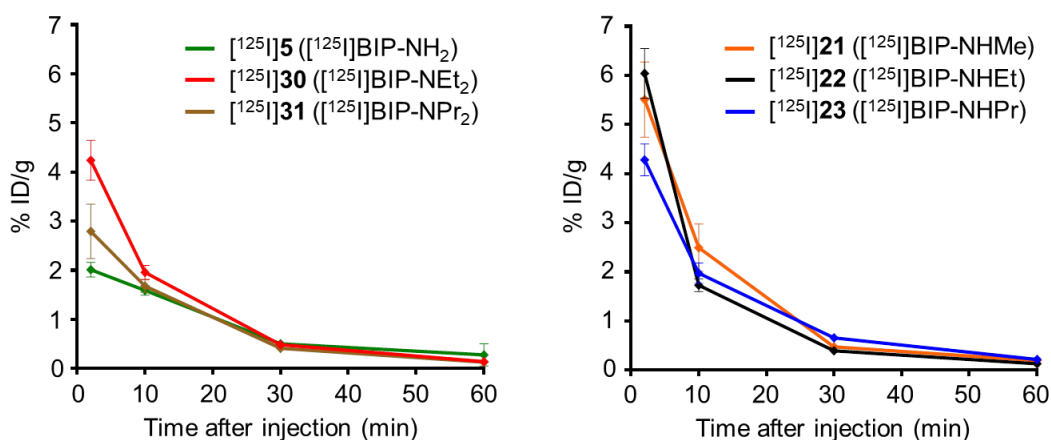


Figure 1-6. Comparison of uptake into and clearance from the brain after intravenous injection of ^{125}I -labeled BIP derivatives into normal mice (male, $n = 5$).

Tau イメージングプローブとしての有用性を詳細に評価するため、脳移行性の指標として投与早期における脳内放射エネルギーを用いて、化合物間で比較した(Table 1-3). $[^{125}\text{I}]5$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NH₂)および $[^{125}\text{I}]31$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NPr₂)の脳内放射エネルギーは、他の BIP 誘導体と比べて低値を示した(投与 2 分後で 2.01 および 2.79% ID/g)ことから、 $[^{125}\text{I}]5$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NH₂)はその脂溶性の低さが (LogP = 2.08), $[^{125}\text{I}]31$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NPr₂)はその脂溶性の高さ(LogP = 3.40)が、マウス脳移行性を低下させる要因であると考えられた. 一方、 $[^{125}\text{I}]21$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NHMe)および $[^{125}\text{I}]22$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NHEt)は、その適度な脂溶性と分子サイズにより、投与 2 分後における高い脳内放射エネルギー、すなわち脳移行性を示した(5.51 および 6.04% ID/g). さらに、臨床応用されてきた既存の Tau イメージングプローブである $[^{11}\text{C}]$ PBB3 (1.92% ID/g)³⁹, $[^{18}\text{F}]$ AV1451 (4.43% ID/g)³¹, $[^{18}\text{F}]$ THK5351 (4.35% ID/g)³² と比較しても高い脳移行性を示した. 脳からの消失性の指標として、投与 2 分後および投与 30 分後または 60 分後における脳内放射エネルギーの比を算出し、化合物間で比較した. その値は、2 分/30 分比で 4.0-15.5, 2 分/60 分比で 7.2-47.2 であり、特に $[^{125}\text{I}]21$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NHMe)および $[^{125}\text{I}]22$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NHEt)は、 $[^{125}\text{I}]$ BIP-NMe₂ (24.9)と比較しても高い 2 分/60 分比を示した(28.5 および 47.2). さらに、2 分/30 分比で比較すると、 $[^{125}\text{I}]21$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NHMe)および $[^{125}\text{I}]22$ ($[^{125}\text{I}]$ BIP-NHEt) (11.6-15.5)は、 $[^{125}\text{I}]$ BIP-NMe₂ (10.5)のみならず既存 Tau イメージングプローブである $[^{11}\text{C}]$ PBB3 (17.5), $[^{18}\text{F}]$ AV1451 (20.7), $[^{18}\text{F}]$ THK5351 (7.15)と比較しても同程度に高い脳からの消失性を示した. これら BIP 誘導体はマウス脳内での非特異結合が少ないためと考えられた.

Table 1-3. Brain uptake of ^{125}I -labeled BIP derivatives and the ratio of radioactivity accumulation (2 min/30 and 2 min/60 min) in normal mice.

Compound	Time after injection (min) ^a			Ratio	
	2	30	60	2 min/30 min	2 min/60 min
[^{125}I]5 ([^{125}I]BIP-NH ₂)	2.01 (0.15)	0.50 (0.07)	0.28 (0.23)	4.0	7.2
[^{125}I]21 ([^{125}I]BIP-NHMe)	5.51 (0.77)	0.47 (0.03)	0.19 (0.02)	11.6	28.5
[^{125}I]BIP-NMe ₂ ^b	3.98 (0.32)	0.38 (0.03)	0.16 (0.01)	10.5	24.9
[^{125}I]22 ([^{125}I]BIP-NHEt)	6.04 (0.51)	0.39 (0.08)	0.12 (0.02)	15.5	47.2
[^{125}I]30 ([^{125}I]BIP-NEt ₂)	4.23 (0.41)	0.48 (0.04)	0.14 (0.03)	8.8	30.3
[^{125}I]23 ([^{125}I]BIP-NHPr)	4.28 (0.33)	0.66 (0.05)	0.21 (0.04)	6.5	20.4
[^{125}I]31 ([^{125}I]BIP-NPr ₂)	2.79 (0.55)	0.41 (0.08)	0.12 (0.04)	6.8	22.0

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

^bThe data were reported previously¹⁴.

Table 1-4 に示すように、[^{125}I]21 ([^{125}I]BIP-NHMe)および[^{125}I]22 ([^{125}I]BIP-NHEt)は、他の ^{125}I 標識 BIP 誘導体と同様、投与早期における肝臓への集積性(投与 2 分後で 9.93 および 13.5% ID/g)と、その後の経時的な腸への集積性を示し(投与 60 分後で 27.6 および 21.3% ID/g)、本集積パターンは脂溶性化合物に特徴的な動態と考えられた。また、甲状腺においては顕著な放射能集積は認められず(投与 60 分後で 0.08 および 0.30% ID)、生体における脱ヨウ素化は生じないことが示唆された。

以上の結果より、 ^{125}I 標識 BIP 誘導体間で、マウス脳内における放射能集積量に顕著な相違が認められたことから、BIP 骨格に導入されたアミノ基の種類がマウスの脳内挙動に影響を及ぼし、[^{125}I]21 ([^{125}I]BIP-NHMe)および[^{125}I]22 ([^{125}I]BIP-NHEt)が優れたマウス脳移行性および脳からの消失性を示すことが明らかとなった。

Table 1-4. Biodistribution of ^{125}I -labeled BIP derivatives.^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
	[^{125}I]5 ([^{125}I]BIP-NH ₂)			
Blood	8.31 (0.24)	6.16 (0.39)	4.32 (0.26)	3.69 (0.18)
Liver	17.4 (0.89)	17.3 (2.01)	9.94 (1.13)	7.59 (0.80)
Kidney	19.4 (2.08)	18.9 (2.04)	7.72 (1.57)	3.84 (0.78)
Intestine	3.32 (0.47)	8.57 (2.36)	17.6 (2.33)	20.7 (5.20)
Spleen	4.23 (0.69)	6.22 (0.55)	4.27 (0.35)	2.45 (0.35)
Pancreas	6.21 (0.53)	5.08 (0.49)	2.01 (0.41)	1.10 (0.22)
Heart	10.1 (0.99)	4.67 (0.41)	2.14 (0.18)	1.61 (0.22)
Lung	17.3 (1.80)	10.5 (1.51)	5.66 (0.86)	4.12 (0.15)

Stomach ^b	1.33 (0.41)	2.49 (0.29)	4.30 (1.38)	4.95 (0.48)
Brain	2.01 (0.15)	1.59 (0.10)	0.50 (0.07)	0.28 (0.23)
Thyroid ^b	0.18 (0.06)	0.14 (0.02)	0.13 (0.03)	0.25 (0.06)
	[¹²⁵ I]21 ([¹²⁵ I]BIP-NHMe)			
Blood	3.40 (0.46)	2.14 (0.14)	1.57 (0.11)	0.77 (0.10)
Liver	9.93 (0.87)	12.2 (2.00)	5.43 (0.96)	3.14 (0.42)
Kidney	19.4 (1.83)	19.1 (2.38)	7.26 (0.87)	4.27 (2.63)
Intestine	3.51 (0.55)	9.40 (2.50)	15.6 (5.54)	27.6 (4.64)
Spleen	3.20 (0.52)	6.43 (1.21)	3.20 (0.66)	2.16 (0.61)
Pancreas	7.72 (0.78)	6.01 (1.50)	1.48 (0.30)	0.73 (0.11)
Heart	8.67 (1.30)	3.46 (0.43)	1.35 (0.08)	0.74 (0.04)
Lung	16.6 (1.87)	5.69 (0.84)	2.44 (0.39)	1.54 (0.18)
Stomach ^b	1.97 (0.43)	4.83 (1.11)	6.91 (1.72)	5.48 (0.71)
Brain	5.51 (0.77)	2.49 (0.48)	0.47 (0.03)	0.19 (0.02)
Thyroid ^b	0.11 (0.07)	0.05 (0.02)	0.06 (0.03)	0.08 (0.08)
	[¹²⁵ I]22 ([¹²⁵ I]BIP-NHEt)			
Blood	2.37 (0.15)	2.06 (0.54)	1.44 (0.21)	0.59 (0.07)
Liver	13.5 (2.47)	19.3 (0.93)	9.65 (1.96)	5.52 (0.92)
Kidney	20.5 (2.65)	17.3 (1.44)	8.58 (1.46)	3.14 (0.52)
Intestine	3.36 (0.77)	9.84 (2.03)	18.8 (3.57)	21.3 (5.17)
Spleen	3.57 (0.72)	4.19 (0.58)	1.82 (0.41)	1.18 (0.24)
Pancreas	8.15 (0.71)	2.87 (0.31)	1.00 (0.19)	0.51 (0.11)
Heart	6.27 (0.45)	2.13 (0.26)	1.01 (0.09)	0.47 (0.06)
Lung	11.0 (2.00)	3.29 (0.74)	1.64 (0.29)	0.75 (0.10)
Stomach ^b	2.34 (0.06)	3.42 (0.53)	3.95 (0.70)	4.64 (0.41)
Brain	6.04 (0.51)	1.73 (0.13)	0.39 (0.08)	0.12 (0.02)
Thyroid ^b	0.09 (0.02)	0.06 (0.02)	0.12 (0.03)	0.30 (0.06)
	[¹²⁵ I]30 ([¹²⁵ I]BIP-NEt ₂)			
Blood	4.34 (0.24)	1.86 (0.29)	1.53 (0.44)	0.56 (0.09)
Liver	19.4 (0.87)	23.3 (2.76)	11.7 (1.07)	5.41 (1.11)
Kidney	20.2 (3.37)	18.3 (1.47)	9.08 (0.86)	4.72 (0.81)
Intestine	3.16 (0.60)	9.61 (0.57)	18.6 (1.86)	25.7 (3.73)
Spleen	5.37 (0.99)	6.80 (1.13)	3.12 (0.99)	1.34 (0.41)
Pancreas	9.10 (0.74)	6.81 (1.41)	2.11 (0.60)	0.79 (0.12)
Heart	6.30 (0.78)	2.10 (0.14)	1.04 (0.11)	0.52 (0.10)
Lung	10.4 (1.79)	4.22 (0.44)	2.26 (0.18)	1.11 (0.14)
Stomach ^b	1.87 (0.18)	3.72 (1.17)	5.04 (1.99)	4.98 (0.57)
Brain	4.23 (0.41)	1.96 (0.14)	0.48 (0.04)	0.14 (0.03)
Thyroid ^b	0.04 (0.03)	0.03 (0.01)	0.03 (0.02)	0.04 (0.02)
	[¹²⁵ I]23 ([¹²⁵ I]BIP-NHPr)			
Blood	2.64 (0.38)	2.66 (0.98)	0.96 (0.11)	2.04 (0.93)
Liver	13.1 (2.59)	19.2 (1.14)	18.3 (2.08)	7.83 (3.33)
Kidney	19.0 (2.48)	24.2 (4.05)	22.8 (2.71)	10.8 (5.49)
Intestine	2.60 (0.37)	8.61 (0.92)	15.0 (4.19)	21.3 (3.14)
Spleen	3.11 (0.65)	4.26 (0.66)	2.63 (0.34)	1.32 (0.24)
Pancreas	7.60 (1.06)	4.16 (0.51)	1.57 (0.17)	0.70 (0.08)

Heart	8.24 (1.62)	3.20 (0.35)	1.32 (0.26)	1.09 (0.29)
Lung	12.5 (4.48)	4.19 (0.76)	1.92 (0.21)	1.76 (0.41)
Stomach ^b	1.75 (0.44)	3.83 (1.68)	5.37 (0.76)	3.14 (1.16)
Brain	4.28 (0.33)	1.97 (0.21)	0.66 (0.05)	0.21 (0.04)
Thyroid ^b	0.11 (0.03)	0.07 (0.02)	0.08 (0.02)	0.09 (0.03)
		[¹²⁵ I]31 ([¹²⁵ I]BIP-NPr ₂)		
Blood	7.27 (2.99)	4.67 (0.83)	2.75 (1.61)	1.35 (0.89)
Liver	30.2 (4.68)	25.4 (2.22)	12.5 (1.85)	9.83 (1.06)
Kidney	26.7 (4.06)	21.2 (1.74)	9.30 (1.27)	7.28 (2.07)
Intestine	3.88 (0.42)	12.1 (1.46)	24.2 (3.35)	36.3 (8.87)
Spleen	12.9 (4.14)	10.9 (2.08)	5.26 (1.34)	2.77 (1.46)
Pancreas	10.5 (2.92)	8.74 (3.34)	1.47 (0.62)	0.89 (0.36)
Heart	9.33 (2.16)	3.74 (0.11)	1.87 (0.81)	0.75 (0.18)
Lung	12.3 (2.78)	5.79 (0.86)	3.49 (1.08)	1.65 (0.45)
Stomach ^b	1.64 (0.24)	3.57 (1.12)	1.57 (1.48)	1.14 (1.30)
Brain	2.79 (0.55)	1.68 (0.13)	0.41 (0.08)	0.12 (0.04)
Thyroid ^b	0.04 (0.01)	0.05 (0.01)	0.03 (0.03)	0.03 (0.03)

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

^bExpressed as % ID.

1.1.3. 小括

本節において、ベンゾイミダゾピリジン(BIP)骨格を基盤としたより高性能な SPECT 用 Tau イメージングプローブを開発することを目的として、BIP 骨格に種々のアミノ基を導入した ^{125}I 標識 BIP 誘導体を設計・合成し、Tau 凝集体への結合性およびマウスにおける脳内挙動の観点から SPECT 用 Tau 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い、以下に述べる結果を得た。

- (1) 種々のアミノ基を導入した 6 種類の ^{125}I 標識 BIP 誘導体を設計・合成した。
- (2) AD 患者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG において、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{31}$ ($[^{125}\text{I}]\text{BIP-NPr}_2$)を除く全ての BIP 誘導体は、Tau 凝集体への選択的結合性を示した。定量解析の結果、BIP 骨格に導入されたアミノ基の種類が BIP 誘導体の Tau 結合性に影響を及ぼし、特に、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{22}$ ($[^{125}\text{I}]\text{BIP-NHEt}$)および $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{BIP-NEt}_2$)が Tau 凝集体への優れた結合親和性および結合選択性を示した。
- (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 ^{125}I 標識 BIP 誘導体は投与早期における脳移行性とその後の脳からの消失性を示した。BIP 骨格に導入されたアミノ基の種類がマウスの脳内挙動に影響を及ぼし、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{21}$ ($[^{125}\text{I}]\text{BIP-NHMe}$)および $[^{125}\text{I}]\mathbf{22}$ ($[^{125}\text{I}]\text{BIP-NHEt}$)が優れたマウス脳移行性および脳からの消失性を示した。

以上の結果より、BIP を母核とした $[^{123/125}\text{I}]\mathbf{22}$ ($[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NHEt}$)が SPECT 用 Tau イメージングプローブとして最も優れた基礎的性質を有することが示された。

第2節

ベンゾイミダゾピリジンを母核とした

陽電子断層撮像用 Tau イメージングプローブの開発

汎用性に優れた SPECT 用 Tau イメージングプローブの開発と並行して、定量性や空間分解能に優れた PET 用プローブを用いた高精度な Tau イメージング法の開発が切望されている^{40, 41}。第1章第1節では、種々のアミノ基を導入した BIP 誘導体を用いて Tau 凝集体への結合性および体内動態に関する構造活性相関研究を行い、BIP 母核にエチルアミノ基を導入した^{[123/125]I}BIP-NHEt が、SPECT 用 Tau イメージングプローブとして最も優れた基礎的性質を有することを明らかにした¹⁵。この知見を基に、^{[123/125]I}BIP-NHEt をリード化合物として、同等の物理化学的性質を示すプローブを設計する必要があると考えた。そこで、臨床における実用性が高い PET 核種である ¹⁸F を標識核種として選択し、低分子化合物へのフッ素原子の導入において一般に利用されるフルオロエチル基^{42, 43}をアミノ基の窒素原子に導入することで、^{[123/125]I}BIP-NHEt の化学構造を保持しながら PET プローブ化した BIP 誘導体^{[18F]IBIPF1}, ^{[18F]IBIPF2} を設計・合成した(Figure 1-7)。これらの PET 用 Tau イメージングプローブとしての有用性について第1章第1節と同様の方法により評価した。

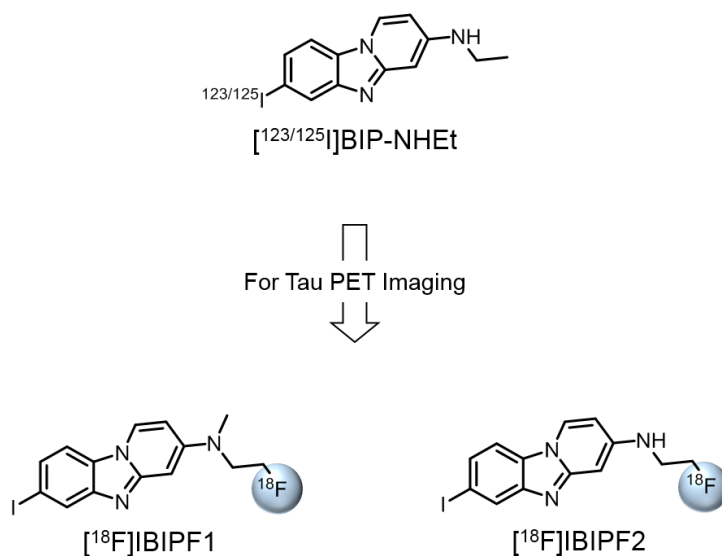


Figure 1-7. Design and chemical structures of ¹⁸F-labeled BIP derivatives.

1.2.1. 実験方法

試薬・機器

第1章第1節と同じ試薬・機器を使用した。 ^{18}F 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 $[^{18}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ を用いて製造した。放射能の測定には、パーキンエルマー社製Wallac WIZARD2480を用いて測定した。健常者脳組織切片は、BioChain社より購入したものを使用した。

動物

第1章第1節と同様に、購入・飼育した。

BIP 誘導体の合成

2-Bromo-*N*-(2-fluoroethyl)pyridine-4-amine (1).

2-Bromopyridine-4-amine (346 mg, 2.0 mmol)をDMF (10 mL)に溶解し、 K_2CO_3 (553 mg, 4.0 mmol), 2-Fluoroethyl *p*-toluenesulfonate (1.8 mL, 10 mmol)を加え、90 °Cで3時間攪拌した。クロロホルム(60 mL×2)で抽出し、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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製して目的物 **1** を収量 192 mg (43.7%)で得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.45 (dd, $J = 2.0, 5.6$ Hz, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.60 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.48 (dt, $J_{\text{F}} = 26.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H). MS (ESI) m/z 219.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-Bromo-*N,N*-(2-fluoroethyl)(methyl)pyridine-4-amine (2).

化合物 **1** (192 mg, 0.87 mmol)をDMF (10 mL)に溶解し、NaH (31.5 mg, 1.3 mmol)を氷冷下に加え、30分間攪拌した。 CH_3I (106 μL , 1.3 mmol)を加え、室温で3時間攪拌した。クロロホルム(60 mL×2)で抽出し、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 = 49/1)で精製して目的物 **2** を収量 167 mg (82.1%)で得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.46 (dd, $J = 2.4, 6.0$ Hz, 1H), 4.59 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.64 (dt, $J_{\text{F}} = 25.6$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.01 (s, 3H). MS (ESI) m/z 232.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Bromo-*N,N*-(2-fluoroethyl)(methyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (3).

化合物 **2** (167 mg, 0.72 mmol), 2,5-Dibromoaniline (360 mg, 1.4 mmol), CuI(I) (27.4 mg, 0.14 mmol), Cs_2CO_3 (704 mg, 2.2 mmol), および1,10-Phenanthroline (50.5 mg, 0.28 mmol)をXylene (15 mL)に溶解し、120 °Cで24時間攪拌した。クロロホルム(60 mL×2)で抽出し、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(酢酸エ

チル/ヘキサン = 2/1)で精製して目的物 **3** を収量 61 mg (26.0%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.04 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.47 (s, 2H), 4.64 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.73 (dt, $J_{\text{F}} = 25.2$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.12 (s, 3H). MS (ESI) m/z 324.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Tributylstannyl-*N,N*-(2-fluoroethyl)(methyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (4).

化合物 **3** (61.0 mg, 0.19 mmol), Bis(tributyltin) (190 μL , 0.38 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (94.4 mg, 0.08 mmol), Et_3N (6.0 mL), および DMF (1.0 mL)を 1,4-Dioxane (12 mL)に溶解し, 95 °C で 3.5 時間攪拌した. 酢酸エチル(60 mL \times 2)で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 2/1)で精製して目的物 **4** を収量 8.5 mg (8.4%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.18 (s, 1H), 7.86 (s 1H), 7.67 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.52 (s, 2H), 4.67 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.76 (dt, $J_{\text{F}} = 25.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.15 (s, 3H), 1.61-0.84 (m, 27H). MS (ESI) m/z 534.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-*N,N*-(2-fluoroethyl)(methyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (5, IBIPF1).

化合物 **4** (8.5 mg, 0.02 mmol)をクロロホルム(4.0 mL)に溶解し, ヨウ素のクロロホルム溶液(5.3 mL, 50 mg/mL)を加えて室温で 30 分間攪拌した. 飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止した後, クロロホルム(40 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. 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 3.0 mg (51.0%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.44 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.56 (dd, $J = 2.4, 7.6$ Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 4.66 (dt, $J_{\text{F}} = 46.8$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.76 (dt, $J_{\text{F}} = 25.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 3.16 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, Acetone- d_6) δ 132.7, 132.6, 132.5, 129.4, 129.3, 127.4, 126.9, 126.8, 112.7, 103.4, 91.2, 83.7, 82.0, 39.1. HRMS (FAB) m/z 370.0211 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-Bromo-*N*-(2-(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethylpyridine-4-amine (6).

2-Bromopyridine-4-amine (1.73 g, 10 mmol)を DMF (30 mL)に溶解し, K_2CO_3 (2.76 g, 20 mmol), (2-Bromoethoxy)-*tert*-butyldimethylsilane (10.7 mL, 50 mmol)を加え, 90 °C で 3 時間攪拌した. クロロホルム(60 mL \times 2)で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **6** を収量 1.49 g (45.0%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.42 (dd, $J = 2.0, 6.0$ Hz, 1H), 4.65 (s, 1H), 3.83 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.25 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 0.94 (s, 9H), 0.10 (s, 6H). MS (ESI) m/z 331.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-Bromo-*N,N*-(2-(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)(methyl)pyridine-4-amine (7).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **6** から, 目的物 **7** を収量 836 mg (53.8%)で得た. $^1\text{H NMR}$

(400 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.62 (dd, *J* = 2.4, 6.0 Hz, 1H), 3.92 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.63 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.16 (s, 3H), 1.01 (s, 9H), 0.16 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 345.1 [M+H]⁺.

7-Bromo-*N,N*-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)(methyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (8).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **7** から, 目的物 **8** を収量 252 mg (24.0%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.36 (dd, *J* = 1.6, 4.4 Hz, 1H), 8.42 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.77 (dd, *J* = 2.4, 8.0 Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.98 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.74 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.27 (s, 3H), 1.01 (s, 9H), 0.15 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 434.1 [M+H]⁺.

7-Tributylstannyl-*N,N*-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)(methyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (9).

化合物 **4** と同様の合成法により, 化合物 **8** から, 目的物 **9** を収量 80 mg (21.4%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.60 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 3.94 (t, *J* = 3.2 Hz, 2H), 3.68 (t, *J* = 3.2 Hz, 2H), 3.20 (s, 3H), 1.85-0.96 (m, 27H), 0.95 (s, 9H), 0.10 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 646.3 [M+H]⁺.

7-Iodo-*N,N*-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)(methyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (10).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **9** から, 目的物 **10** を収量 49.5 mg (82.8%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (dd, *J* = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.58 (dd, *J* = 1.2, 2.4 Hz, 1H), 7.41 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.75 (dd, *J* = 4.4, 7.6 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 3.97 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.26 (s, 3H), 0.99 (s, 9H), 0.15 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 482.2 [M+H]⁺.

7-Iodo-*N,N*-(2-hydroxyethyl)(methyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (11).

化合物 **10** (49.5 mg, 0.10 mmol) を THF (8.0 mL) に溶解し, *tetra-n*-Butylammonium fluoride (TBAF) (1 M THF 溶液, 120 μL, 0.12 mmol) を氷冷下で加えた. 反応液を 30 分間攪拌した後, クロロホルム(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(クロロホルム/メタノール = 6/1) で精製して目的物 **11** を収量 27.3 mg (72.3%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, Acetone-*d*₆) δ 8.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.51 (dd, *J* = 1.6, 8.4 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 2.4, 8.0 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 4.27 (s, 1H), 3.83 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.71 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.21 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 368.0 [M+H]⁺.

7-Iodo-*N,N*-(methyl)(2-((toluenesulfonyl)oxy)ethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (12).

化合物 **11** (27.3 mg, 0.074 mmol) を CH₂Cl₂ (8.0 mL) に溶解し, *p*-Toluenesulfonyl chloride (70.9 mg, 0.37 mmol), DMAP (触媒量), Et₃N (50 μL, 0.36 mmol) を加えた. 反応液を室温で 3 時間攪拌した後, 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 =

6/1)で精製して目的物 **12** を収量 35.7 mg (92.1%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.09 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.47 (dd, $J = 8.4, 16.8$ Hz, 2H), 7.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.49 (dd, $J = 3.2, 8.0$ Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.24 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.75 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.28 (s, 3H). MS (ESI) m/z 522.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-Bromo-*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)pyridine-4-amine (**13**).

2-Bromopyridine-4-amine (346 mg, 2.0 mmol)を THF (25 mL)に溶解し, di-*tert*-Butyl dicarbonate (8.73 g, 40 mmol), DMAP (触媒量), および Et_3N (334 μL , 2.4 mmol)を加え, 室温で 24 時間攪拌した. クロロホルム(60 mL \times 2)で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 2/1)で精製して目的物 **13** を収量 113 mg (20.8%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.20 (dd, $J = 2.0, 6.0$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 1.52 (s, 9H). MS (ESI) m/z 273.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-Bromo-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-fluoroethyl)pyridine-4-amine (**14**).

化合物 **1** と同様の合成法により, 化合物 **13** から, 目的物 **14** を収量 121 mg (91.2%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.02 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.12 (dd, $J = 2.0, 5.6$ Hz, 1H), 4.60 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.04 (dt, $J_{\text{F}} = 26.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 1.52 (s, 9H). MS (ESI) m/z 319.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Bromo-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-fluoroethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**15**).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **14** から, 目的物 **15** を収量 110 mg (71.0%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.56 (s, 2H), 4.58 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.02 (dt, $J_{\text{F}} = 26.4$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 1.49 (s, 9H). MS (ESI) m/z 408.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Tributylstannyl-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-fluoroethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**16**).

化合物 **4** と同様の合成法により, 化合物 **15** から, 目的物 **16** を収量 37.3 mg (22.4%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.35 (dd, $J = 0.8, 7.6$ Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.83 (dd, $J = 0.4, 8.0$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 0.8, 8.0$ Hz, 1H), 6.90 (dd, $J = 2.0, 7.2$ Hz, 1H), 4.67 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.03 (dt, $J_{\text{F}} = 25.6$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 1.60-1.55 (m, 6H), 1.49 (s, 9H), 1.37-1.31 (m, 6H), 1.17-1.08 (m, 6H), 0.92-0.86 (m, 9H). MS (ESI) m/z 620.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-fluoroethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (**17**).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **16** から, 目的物 **17** を収量 37.3 mg (91.0%)で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (dd, $J = 0.8, 7.6$ Hz, 1H), 8.25 (dd, $J = 0.8, 1.2$ Hz, 1H), 7.62 (s, 2H), 7.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.84 (dd, $J = 2.0, 7.6$ Hz, 1H), 4.68 (dt, $J_{\text{F}} = 47.6$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.03 (dt, $J_{\text{F}} = 26.0$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 2H), 1.50 (s, 9H). MS (ESI) m/z 456.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7-Iodo-*N*-(2-fluoroethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (18, IBIPF2).

化合物 **17** (25 mg, 0.055 mmol) を CH₂Cl₂ (8.0 mL) に溶解し, TFA (2.5 mL) を加えて室温で 30 分間攪拌した. 2 N NaOH 水溶液を加えて中和した後, クロロホルム(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. 残渣をシリカゲルカラム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 **18** (IBIPF2)を収量 19.3 mg (99.0%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 1.6, 8.8 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.32 (dd, *J* = 2.4, 7.2 Hz, 1H), 4.71 (dt, *J*_F = 47.2 Hz, *J* = 4.8 Hz, 2H), 4.59 (s, 1H), 3.56 (dt, *J*_F = 27.2 Hz, *J* = 4.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 153.7, 152.6, 147.2, 129.8, 128.9, 127.1, 126.3, 112.7, 107.0, 89.1, 87.7, 83.8, 82.1. HRMS (FAB) *m/z* 356.0063 [M+H]⁺.

2-Bromo-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)pyridine-4-amine (19).

化合物 **6** と同様の合成法により, 化合物 **13** から, 目的物 **19** を収量 251 mg (29.2%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 2.0, 5.2 Hz, 1H), 3.90 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.83 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.56 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.09 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 431.1 [M+H]⁺.

7-Bromo-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (20).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **19** から, 目的物 **20** を収量 101 mg (33.1%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.14 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J* = 1.6, 8.4 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 2.0, 7.6 Hz, 1H), 4.25 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.35 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 1.69 (s, 9H), 0.97 (s, 9H), 0.11 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 520.2 [M+H]⁺.

7-Tributylstannyl-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (21).

化合物 **4** と同様の合成法により, 化合物 **20** から, 目的物 **21** を収量 24.2 mg (17.1%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.41 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.09 (dd, *J* = 2.0, 7.6 Hz, 1H), 4.35 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.82 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.72-1.64 (m, 6H), 1.64-1.60 (m, 9H), 1.50-1.41 (m, 6H), 1.49 (s, 9H), 1.31-1.13 (m, 6H), 0.97 (s, 9H), 0.15 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 732.3 [M+H]⁺.

7-Iodo-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (22).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **21** から, 目的物 **22** を収量 17.6 mg (94.1%)で得た. ¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃) δ 8.37 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.35 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 0.8 Hz, 2H), 7.67 (dd, *J* = 0.4, 2.0 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J* = 2.0, 7.2 Hz, 1H), 4.19 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.63 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.62 (s, 9H), 0.96 (s, 9H), 0.15 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 568.2 [M+H]⁺.

7-Iodo-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-hydroxyethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (23).

化合物 **11** と同様の合成法により, 化合物 **22** から, 目的物 **23** を収量 10.4 mg (74.0%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.36 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 7.6, 22.0 Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.27 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.11 (s, 1H), 1.43 (s, 9H). MS (ESI) *m/z* 454.1 [M+H]⁺.

7-Iodo-*N,N*-(*tert*-butoxycarbonyl)(2-((toluenesulfonyl)oxy)ethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (24).

化合物 **12** と同様の合成法により, 化合物 **23** から, 目的物 **24** を収量 5.8 mg (59.6%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.38 (dd, *J* = 0.8, 7.2 Hz, 1H), 8.26 (dd, *J* = 0.8, 1.2 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 2.8 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.14 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 2.4, 7.2 Hz, 1H), 4.21 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 1.40 (s, 9H). MS (ESI) *m/z* 608.1 [M+H]⁺.

7-Iodo-*N*-(2-((toluenesulfonyl)oxy)ethyl)amino pyrido[1,2-*a*]benzimidazole (25).

化合物 **18** と同様の合成法により, 化合物 **24** から, 目的物 **25** を収量 2.5 mg (99.0%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.38 (dd, *J* = 1.2, 7.2 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 0.4 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.18 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 2.4, 7.2 Hz, 1H), 4.24 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.80 (s, 1H), 3.75 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.43 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 508.1 [M+H]⁺.

¹⁸F 標識 BIP 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. 化合物 **12** および化合物 **25** 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 DMSO (200 μL)に溶解した ¹⁸F を加え, 100 °C で 20 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(200 μL)に溶解し, 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 (0.1% TFA 含有 MeCN/H₂O)を用いて目的とする ¹⁸F 標識体を精製した.

LogP 値測定

第 1 章第 1 節と同様の方法を用いて行った. 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 ¹⁸F 標識体(74 kBq)を加えた.

AD 患者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。各 ^{18}F 標識体の 10% EtOH 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 溶液で洗浄した後(3 min \times 2)、イメージングプレートに12時間露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。また、競合阻害実験においては、各 ^{18}F 標識体に対応する非標識体(100 μM)を切片上に共添加した。

健常者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

パラフィン包埋された健常者脳組織切片(70歳女性, 5 μm)を, Xylene (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。 ^{18}F 標識体の 10% EtOH 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 溶液で洗浄した後(3 min \times 2)、イメージングプレートに12時間露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。各 ^{18}F 標識体(95.3-144 kBq, 100 μL)を尾静脈より投与した。

血液中代謝物分析

正常マウスとして5週齢, 雄性の ddY マウスを用いた。 ^{18}F 5 (^{18}F]IBIPF1)の 0.1% Tween 80 および 10% EtOH を含有した生理食塩水溶液を尾静脈より投与した(15.4-17.4 MBq, 150 μL)。投与2分後および10分後に屠殺し, 血液を採取した。MeCN (200 μL)を加え, 4,000 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ で5分間遠心分離後, 上清を採取した。さらに MeCN (200 μL) を加えた後, 4,000 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 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。

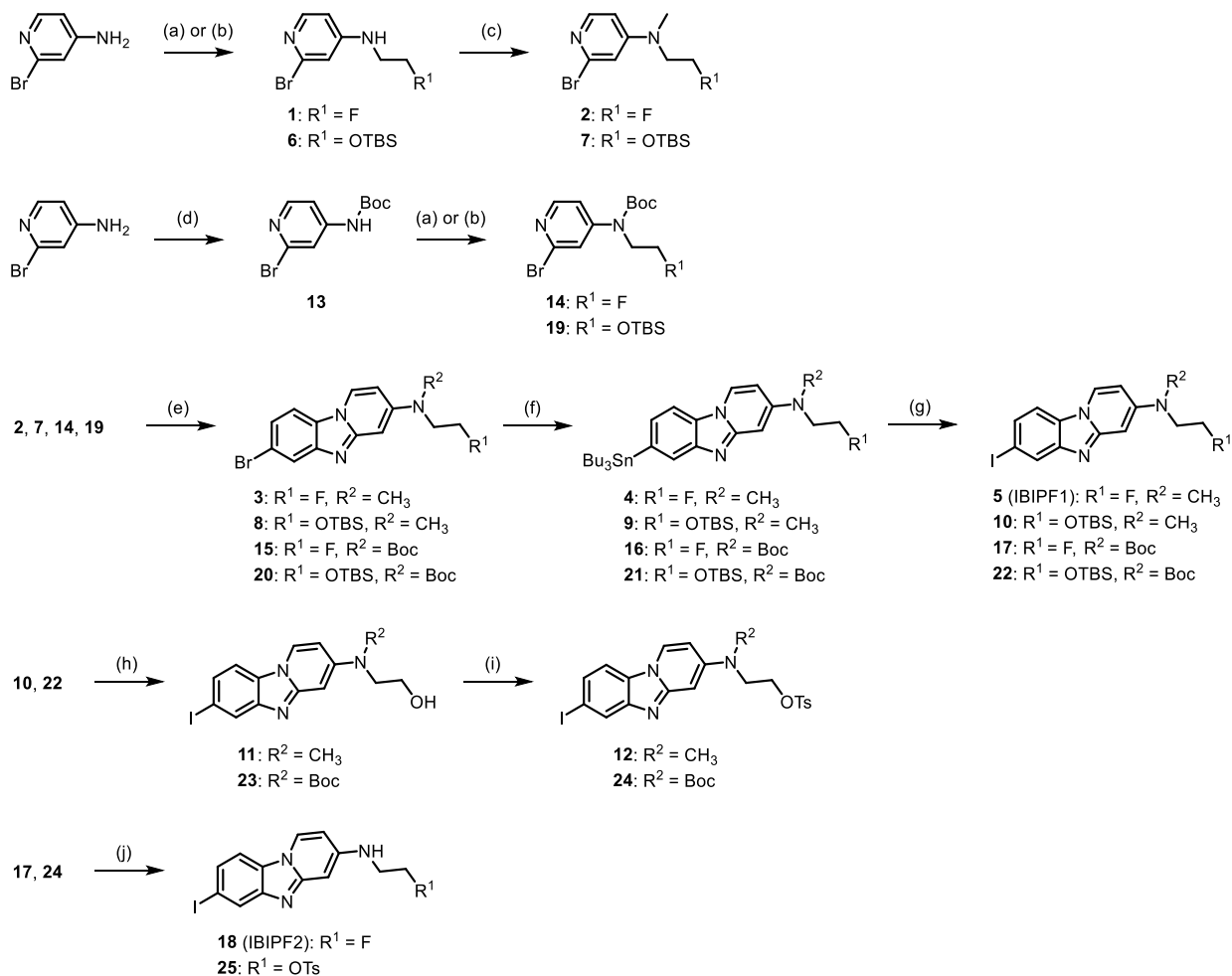
脳内代謝物分析

正常マウスとして5週齢, 雄性の ddY マウスを用いた。 ^{18}F 5 (^{18}F]IBIPF1)の 0.1% Tween 80 および 10% EtOH を含有した生理食塩水溶液を尾静脈より投与した(15.4-17.4 MBq, 150 μL)。投与2分後および10分後に屠殺し, 速やかに脳を摘出した。TBS (500 μL)中でホモジネートを作製し, MeCN (500 μL) を加え, 4,000 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ で5分間遠心分離後, 上清を採取した。さらに MeCN (500 μL) を加えた後, 4 $^{\circ}\text{C}$, 4,000 \times 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。

1.2.2. 結果と考察

BIP 誘導体の合成

Scheme 1-3 に BIP 誘導体の合成経路を示す。2-Bromopyridine-4-amine を出発原料として 2 工程を経て化合物 **2**, **7**, **14**, および **19** を収率 6.1-35.9% で得た。その後, 2,5-Dibromoaniline と縮合反応させることで BIP 骨格を形成させ, 化合物 **3**, **8**, **15**, および **20** を得た。ビストリブチルスズと反応させることで化合物 **4**, **9**, **16**, および **21** を収率 8.4-22.4% で得た。さらにスズ-ヨウ素交換反応および脱保護反応を経て, 非標識体である化合物 **5** (IBIPF1) および **18** (IBIPF2) を総収率 0.40-2.7% で得た。また, 化合物 **10** および **22** より脱保護反応および *p*-Toluenesulfonyl chloride を用いたトシル化反応を経て, 標識前駆体 **12** および **25** を得た。

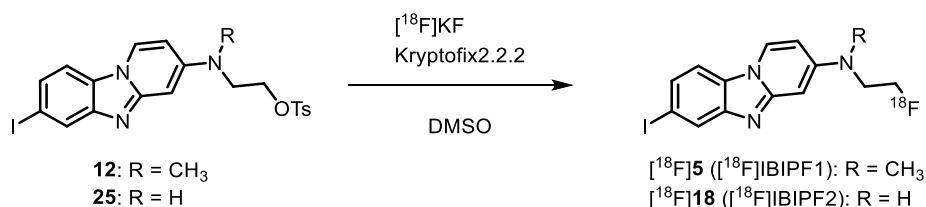


Reagents and conditions: (a) 2-Fluoroethyl *p*-toluenesulfonate, K₂CO₃, DMF, reflux; (b) (2-Bromoethoxy)-*tert*-butyldimethylsilane, K₂CO₃, DMF, reflux; (c) CH₃I, NaH, DMF, rt; (d) Boc₂O, DMAP, Et₃N, THF, reflux; (e) 2,5-Dibromoaniline, CuI (I), 1,10-Phenanthroline, Cs₂CO₃, Xylene, reflux; (f) (SnBu₃)₂, Pd(PPh₃)₄, Et₃N, 1,4-Dioxane, reflux; (g) I₂, CHCl₃, rt; (h) TBAF, THF, rt; (i) *p*-Toluenesulfonyl chloride, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; (j) TFA, CH₂Cl₂, rt.

Scheme 1-3. Synthetic routes for BIP derivatives.

¹⁸F 標識 BIP 誘導体の合成

Scheme 1-4 に ¹⁸F 標識経路を示す. [¹⁸F]**5** ([¹⁸F]IBIPF1)および[¹⁸F]**18** ([¹⁸F]IBIPF2)を, [¹⁸F]KF および Kryptofix2.2.2 によるフッ素化の 1 工程を経て合成した. 各 ¹⁸F 標識体は Table 1-5 に示す放射化学的収率(63.3%および 13.4%), 放射化学的純度 95%以上で得た.



Scheme 1-4. ¹⁸F-Labeling of BIP derivatives.

Table 1-5. Radiochemical yields of ¹⁸F-labeled BIP derivatives.

Compound	Radiochemical yield (%)
[¹⁸ F] 5 ([¹⁸ F]IBIPF1)	63.3
[¹⁸ F] 18 ([¹⁸ F]IBIPF2)	13.4

AD 患者および健常者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG

¹⁸F 標識した BIP 誘導体について, 第 1 章第 1 節と同様, AD 患者の前頭葉(Aβ(+), Tau(-))および側頭葉(Aβ(+), Tau(+))脳組織切片を用いた *in vitro* ARG 実験を行った. [¹⁸F]**5** ([¹⁸F]IBIPF1)および[¹⁸F]**18** ([¹⁸F]IBIPF2)のオートラジオグラムにおいて, 前頭葉灰白質には顕著な放射能集積が認められなかった一方(Figure 1-8A and C), 側頭葉灰白質に顕著な層状の放射能集積を認めた(Figure 1-8B and D). その集積パターンは免疫染色における Tau 凝集体と同様であったことから, [¹⁸F]**5** ([¹⁸F]IBIPF1)および[¹⁸F]**18** ([¹⁸F]IBIPF2)は Aβ 凝集体には結合せず, Tau 凝集体への選択的結合性を有することが示された. また, Tau 凝集体への結合特異性を評価するため, 非標識体を用いた競合阻害実験を行った. 過剰量の **5** (IBIPF1)および **18** (IBIPF2)を添加したところ, 切片上に残存する放射能集積が顕著に低減したことから(Figure 1-9), [¹⁸F]**5** ([¹⁸F]IBIPF1)および[¹⁸F]**18** ([¹⁸F]IBIPF2)が Tau 凝集体に特異的に結合することが示唆された. さらに, 健常者脳組織切片に対しては両プローブとも放射能集積が認められなかったことから(Figure 1-10), 正常脳組織への非特異的結合を示さないことが示唆された.

オートラジオグラムから, 切片に残存する各プローブの放射能集積量を定量解析した(Figure 1-11, Table 1-6). AD 脳組織切片の前頭葉および側頭葉それぞれの灰白質および白質の計 4 箇所を関心領域として設定した. 本実験では, 第 1 章第 1 節において得られた [¹²⁵I]BIP-NHEt と比較するため, **5** (IBIPF1)および **18** (IBIPF2)の ¹²⁵I 標識体である [¹²⁵I]**5** ([¹²⁵I]IBIPF1)および[¹²⁵I]**18** ([¹²⁵I]IBIPF2)を用いて

評価した。両プローブとも Tau 陽性の側頭葉灰白質において他の領域と比べて顕著に高い放射能集積を示した。特に ^{125}I 5 (^{125}I IBIPF1) (766 cpm/mm²)は、 ^{125}I 18 (^{125}I IBIPF2) (326 cpm/mm²)と比べて高い放射能集積を示し、他の関心領域での放射能集積量は両プローブ間で同等であった(6.4-61.6 cpm/mm²)。以上より、 ^{125}I 5 (^{125}I IBIPF1)は ^{125}I 18 (^{125}I IBIPF2)と比べて Tau 凝集体への高い結合親和性を示し、両プローブとも非特異的結合性はほとんど示さないことが示唆された。側頭葉灰白質における放射能集積量と前頭葉灰白質における放射能集積量との比(Tau/A β 比)を算出したところ、いずれのプローブも高値を示した(34.8 および 15.3)。特に ^{125}I 5 (^{125}I IBIPF1) (34.8)はリード化合物である ^{125}I BIP-NHEt (26.2)¹⁵と同程度に高い値を示したことから、 ^{125}I 5 (^{125}I IBIPF1)は AD 脳内の Tau 凝集体に対して高い結合選択性を有することが示された。

以上の結果より、 ^{18}F 5 (^{18}F IBIPF1)は ^{18}F 18 (^{18}F IBIPF2)と比べて、AD 脳内の Tau 病変を選択的かつ明瞭に描出可能であることが示唆された。

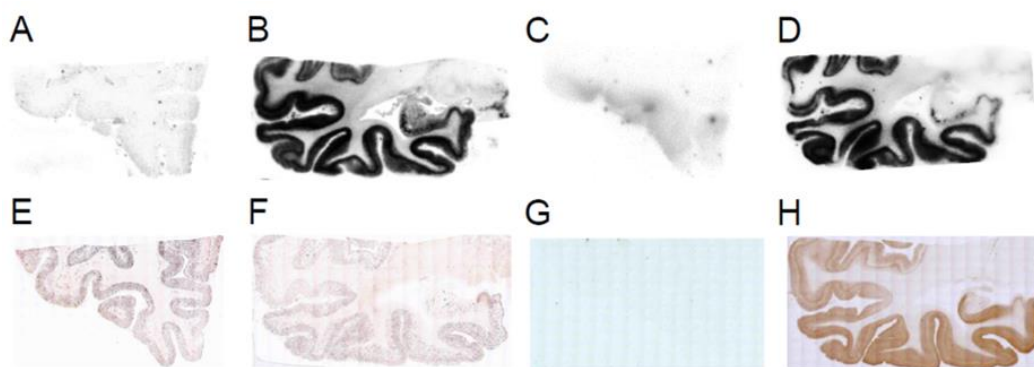


Figure 1-8. Comparison of *in vitro* autoradiograms of ^{18}F 5 (^{18}F IBIPF1) (A and B), ^{18}F 18 (^{18}F IBIPF2) (C and D), and immunohistochemical staining with anti-A β antibody (E and F) and anti-phosphorylated tau antibody (G and H) in AD brain sections. A, C, E, and G are the sections from the frontal lobes. B, D, F, and H are the sections from the temporal lobes.

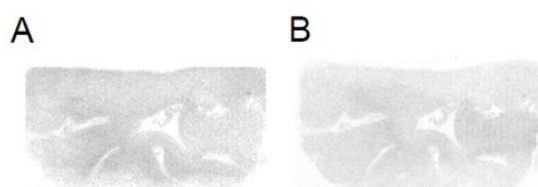


Figure 1-9. *In vitro* autoradiograms of ^{18}F 5 (^{18}F IBIPF1) (A) and ^{18}F 18 (^{18}F IBIPF2) (B) in AD brain sections with excess 5 (IBIPF1) and 18 (IBIPF2), respectively.

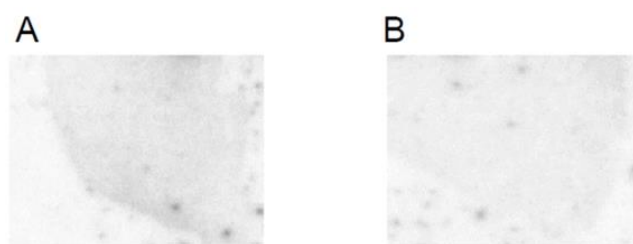


Figure 1-10. *In vitro* autoradiograms of [¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1) (A) and [¹⁸F]18 ([¹⁸F]IBIPF2) (B) in healthy human brain sections.

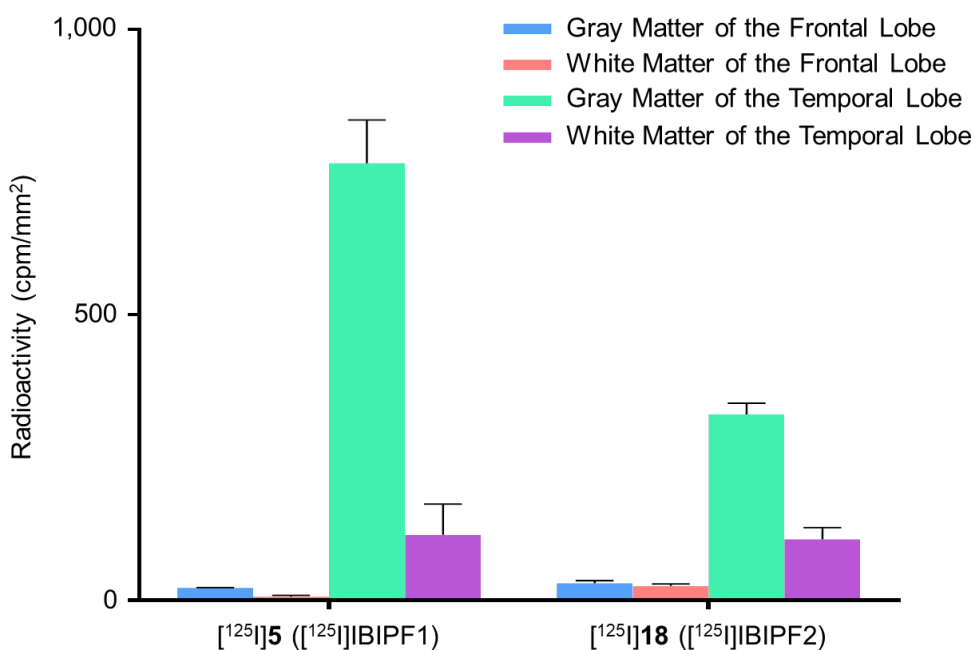


Figure 1-11. Quantitative analysis of *in vitro* ARG with AD brain sections. Data are presented as mean ± standard errors (n = 3).

Table 1-6. Ratio of radioactivity accumulation in the gray matter of the temporal lobe (A) against the gray matter of the frontal lobe (B).

Compound	A/B ratio
[¹²⁵ I]5 ([¹²⁵ I]IBIPF1)	34.8
[¹²⁵ I]18 ([¹²⁵ I]IBIPF2)	15.3
[¹²⁵ I]BIP-NHEt	26.2

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

^{18}F 標識 BIP 誘導体の体内動態を評価するため、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 1-12, Table 1-7, および Table 1-8 に示す。 ^{18}F 5 (^{18}F]IBIPF1)および ^{18}F 18 (^{18}F]IBIPF2)は、投与2分後における脳内放射エネルギーが6.22および3.85% ID/gと、投与早期における脳移行性を示した(Figure 1-12)。一般にLogP値が1-3を示す化合物はBBBを容易に透過するとされており^{40,44}、両プローブの脳移行性は適度な脂溶性(LogP = 2.8 および 2.7)に起因すると考えられた。また、分子量も良好な脳移行性を示す上で重要な因子であり、Tau イメージングプローブの開発においては500 Da未満であることが望ましい⁴⁵。 ^{18}F 5 (^{18}F]IBIPF1)および ^{18}F 18 (^{18}F]IBIPF2)の分子量(369 および 355)はBBB透過性を示す上で十分小さいことから、両プローブの良好な脳移行性が説明される。特に、 ^{18}F 5 (^{18}F]IBIPF1)の脳移行性(6.22% ID/g)は臨床用Tau イメージングプローブに求められる要件(投与2分後で $\geq 4.0\%$ ID/g)を満たし、臨床応用されているPET用Tau イメージングプローブである ^{18}F]AV1451 (4.4% ID/g)³¹ および ^{18}F]THK5351 (4.3% ID/g)³² と比べても優れた脳移行性を示した。また、 ^{18}F 5 (^{18}F]IBIPF1)および ^{18}F 18 (^{18}F]IBIPF2)の脳からの消失性を評価するため、投与2分後/30分後における脳内放射エネルギーの比を算出したところ、2.2 および 3.2 と経時的に脳から消失し、Tau イメージングプローブとして必要な要件を満たすことが示唆された(Table 1-7)。

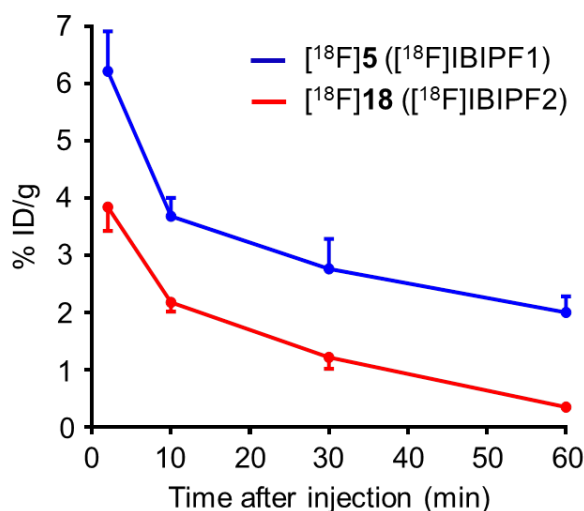


Figure 1-12. Comparison of uptake into and clearance from the brain after intravenous injection of ^{18}F 5 (^{18}F]IBIPF1) and ^{18}F 18 (^{18}F]IBIPF2) into normal mice (male, n = 5).

Table 1-7. Brain uptake of ^{18}F -labeled BIP derivatives and the ratio of radioactivity accumulation (2 min/30 min and 2 min/60 min).

Compound	Time after injection (min) ^a			Ratio	
	2	30	60	2 min/30 min	2 min/60 min
^{18}F 5 (^{18}F IBIPF1)	6.22 (0.70)	2.77 (0.52)	2.01 (0.28)	2.2	3.1
^{18}F 18 (^{18}F IBIPF2)	3.85 (0.42)	1.22 (0.19)	0.35 (0.05)	3.2	11

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

さらに、両プローブの他臓器における放射能集積量を評価した。 ^{18}F 5 (^{18}F IBIPF1)は投与早期に肝臓(投与2分後で21.3% ID/g)に集積し、その後経時的に腸(投与60分後で20.5% ID/g)へ移行した。これは脂溶性化合物に一般に認められる集積パターンと考えられた。また、骨への顕著な集積は認められなかったことから(投与60分後で2.95% ID/g)、生体における脱フッ素化は生じないことが示唆された。一方、 ^{18}F 18 (^{18}F IBIPF2)は投与早期に肝臓(投与2分後で11.8% ID/g)に集積し、その後ほぼ全ての臓器から消失したことから、 ^{18}F 5 (^{18}F IBIPF1)と比べて速く代謝・排泄されることが示唆された(Table 1-8)。両プローブ間で薬物動態が異なることから、BIP骨格に導入したアミノ基上の水素原子が特定の生理的メカニズムで代謝・排泄に関与していた可能性が示唆されたものの、その詳細は不明である。実際、臨床で実用化されている $\text{A}\beta$ イメージングプローブ ^{18}F Florbetapirがマウス血漿中で脱メチル化およびアセチル化を経て代謝されることが報告されている⁴⁶。

以上の結果より、 ^{18}F 5 (^{18}F IBIPF1)が臨床応用する上で求められる薬物動態の基準を満たしたことから、本プローブはTauイメージングプローブとして機能することが示された。

Table 1-8. Biodistribution of ^{18}F -labeled BIP derivatives in normal mice.^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
	^{18}F 5 (^{18}F IBIPF1)			
Blood	4.47 (0.46)	2.75 (0.17)	2.59 (0.34)	2.87 (0.45)
Liver	21.3 (4.29)	25.9 (7.15)	27.6 (4.09)	20.0 (7.80)
Kidney	29.8 (4.60)	33.4 (3.73)	31.0 (3.19)	23.0 (6.83)
Intestine	4.62 (0.80)	9.26 (1.82)	13.9 (2.59)	20.5 (2.96)
Spleen	6.31 (1.80)	5.88 (1.82)	5.41 (0.84)	2.87 (0.32)
Pancreas	12.5 (2.72)	7.69 (0.49)	4.09 (1.15)	2.40 (0.41)
Heart	12.6 (1.02)	5.09 (0.63)	3.55 (0.43)	3.05 (0.45)
Lung	11.6 (1.50)	5.48 (0.88)	3.50 (0.94)	3.03 (0.47)
Stomach ^b	2.47 (0.63)	3.42 (0.55)	3.32 (0.82)	5.98 (3.44)
Brain	6.22 (0.70)	3.68 (0.32)	2.77 (0.52)	2.01 (0.28)

Bone	2.20 (0.76)	2.10 (0.66)	2.11 (0.47)	2.95 (0.79)
		[¹⁸ F]18 ([¹⁸ F]IBIPF2)		
Blood	9.01 (0.73)	6.17 (0.71)	2.58 (0.57)	1.26 (0.79)
Liver	11.8 (1.64)	6.18 (0.53)	2.43 (0.56)	0.68 (0.13)
Kidney	11.6 (0.66)	14.5 (2.85)	8.81 (2.37)	3.06 (2.08)
Intestine	4.78 (0.45)	4.04 (0.41)	2.24 (0.35)	1.82 (0.49)
Spleen	5.02 (0.75)	4.42 (0.55)	1.73 (0.40)	0.49 (0.06)
Pancreas	6.56 (0.66)	4.70 (0.78)	2.42 (0.66)	0.59 (0.10)
Heart	7.07 (0.50)	4.69 (0.52)	2.05 (0.50)	0.75 (0.17)
Lung	9.57 (0.54)	6.26 (0.85)	2.63 (0.45)	0.86 (0.13)
Stomach ^b	1.15 (0.19)	1.32 (0.29)	1.21 (0.28)	1.79 (0.53)
Brain	3.85 (0.42)	2.18 (0.16)	1.22 (0.19)	0.35 (0.05)
Bone	3.83 (0.76)	4.21 (1.09)	3.53 (0.99)	2.84 (0.91)

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

^bExpressed as % ID.

血液中代謝物分析

In vitro ARG および体内放射能分布実験の結果を考慮し、[¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1)の Tau イメージングプローブとしての有用性についてさらに評価を行った。[¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1)を正常マウスに投与後、血液中に存在する放射性代謝物を逆相 HPLC により分析した。その結果を Figure 1-13 に示す。[¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1)は、マウスに投与後、未変化体に比べて極性の高い放射性代謝物が生成することを認めた。また、未変化体は Table 1-9 に示す割合で血液中に存在しており、経時的な減少が認められた。

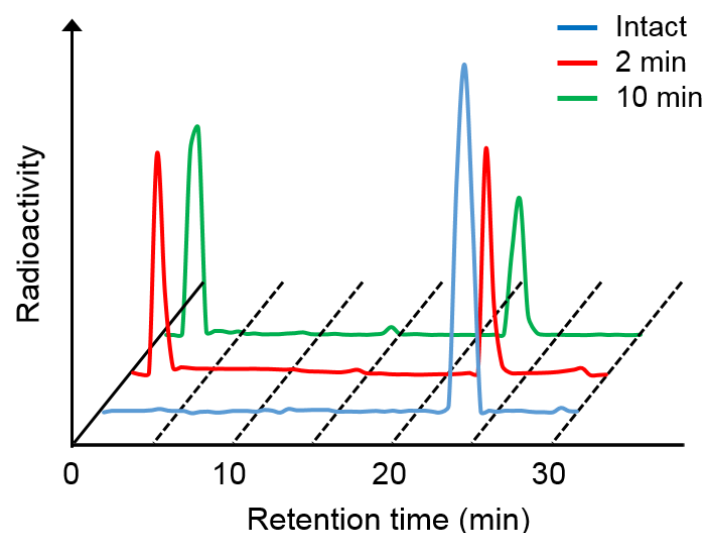


Figure 1-13. Representative HPLC analysis of radioactivity in blood after injection of [¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1) into normal mice.

Table 1-9. Percentages of the parent probe in blood at 2 and 10 min postinjection into normal mice.

Time after injection (min)	Percentage of the parent probe ^a
2	53.3 ± 8.3
10	30.7 ± 6.7

^aValues are the mean ± standard deviation for three independent experiments.

脳内代謝物分析

[¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1)を正常マウスに投与後、脳内に存在する放射性代謝物を逆相 HPLC により分析した。その結果を Figure 1-14 に示す。 [¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1)は、マウスに投与後、血液中と同様の代謝物が認められたものの、その割合は低値を示し、未変化体は Table 1-10 に示す割合で存在していた。このことから、 [¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1)は脳内では代謝に対して安定であり、血液中に存在する代謝物は脳内へ移行しないことが示唆された。

以上の結果より、 [¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1)が臨床応用を目指した Tau イメージングプローブとして有望である可能性が示された。

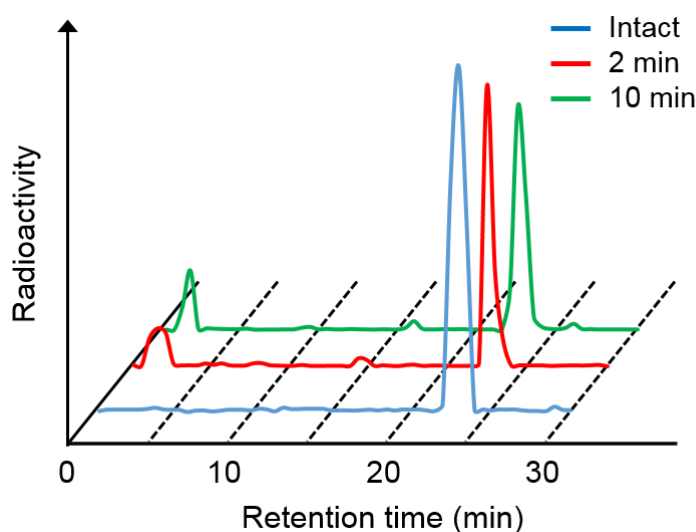


Figure 1-14. Representative HPLC analysis of radioactivity in brain after injection of [¹⁸F]5 ([¹⁸F]IBIPF1) into normal mice.

Table 1-10. Percentages of the parent probe in brain at 2 and 10 min postinjection into normal mice.

Time after injection (min)	Percentage of the parent probe ^a
2	85.6 ± 10.5
10	79.8 ± 11.8

^aValues are the mean ± standard deviation for three independent experiments.

1.2.3. 小括

本節において、定量性や空間分解能に優れる PET 用 Tau イメージングプローブを開発することを目的として、ベンゾイミダゾピリジン(BIP)骨格に種々のアミノ基を導入した ^{18}F 標識 BIP 誘導体を設計・合成し、Tau 凝集体への結合性およびマウスにおける脳内挙動の観点から、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) 前節で得た $[^{123/125}\text{I}]\text{BIP-NHEt}$ の化学構造を保持しながらフルオロエチル基をアミノ基の窒素原子に導入した 2 種類の ^{18}F 標識 BIP 誘導体を設計・合成した。
- (2) AD 患者脳組織切片を用いた *in vitro* ARG において、 $[^{18}\text{F}]\mathbf{5}$ ($[^{18}\text{F}]\text{IBIPF1}$) および $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ ($[^{18}\text{F}]\text{IBIPF2}$) はいずれも Tau 凝集体への選択的結合性を示した。定量解析の結果、特に $[^{125}\text{I}]\mathbf{5}$ ($[^{125}\text{I}]\text{IBIPF1}$) が Tau 凝集体への優れた結合親和性および結合選択性を示した。
- (3) 正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、 $[^{18}\text{F}]\mathbf{5}$ ($[^{18}\text{F}]\text{IBIPF1}$) および $[^{18}\text{F}]\mathbf{18}$ ($[^{18}\text{F}]\text{IBIPF2}$) はいずれも投与早期における脳移行性とその後の脳からの消失性を示した。特に、 $[^{18}\text{F}]\mathbf{5}$ ($[^{18}\text{F}]\text{IBIPF1}$) が優れたマウス脳移行性および脳からの消失性を示した。
- (4) 正常マウスを用いた放射性代謝物分析において、 $[^{18}\text{F}]\mathbf{5}$ ($[^{18}\text{F}]\text{IBIPF1}$) は脳内での高い安定性を示した。

以上の結果より、BIP を母核とした $[^{18}\text{F}]\mathbf{5}$ ($[^{18}\text{F}]\text{IBIPF1}$) が PET 用 Tau 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

α -Syn凝集体を標的とした 核医学分子イメージングプローブの開発

背景

パーキンソン病(Parkinson's disease: PD)は嗅覚障害, 自律神経症状, 精神症状, 認知機能障害, 睡眠障害などの非運動症状に加えて, 静止時振戦, 無動, 筋固縮, 姿勢保持障害などの運動症状を主症状とする進行性の神経変性疾患である. 全世界の罹患者数は2015年の690万人から2040年には1420万人までに増加すると予測されており, 神経変性疾患の中でADに次いで2番目に多い⁴⁷. また, その増加率はADを凌ぐものとなっており, 非感染性疾患であるPDが早急な対策を必要とするパンデミック状況にあると米国医師会 *JAMA Neurology* 誌より報告されている⁴⁷. PDはADと同様, 加齢に伴い発生率・有病率が上昇することが知られており, 急速な高齢化に伴うさらなる患者数増加が世界的に社会問題とされている. 現在のPD診断は, 問診や神経学的診察による運動症状の有無の確認と, MRI, 心筋シンチグラフィ, ドパミントランスポーター(Dopamine transporter: DAT)スキャンなどによる画像診断を組み合わせて行われているものの⁴⁸, 運動症状が発現する前段階での早期診断は困難とされている. また, PDの確定診断は剖検病理に依拠しており生前の確定診断法は存在しないため, 現行の診断法に替わる新たな診断技術の確立が求められている⁴⁹. PD患者に認められる病理学的特徴として, レビー小体およびレビー神経突起の脳内沈着が挙げられ, これら異常沈着物は α -シヌクレインタンパク質(α -Syn)凝集体を主要構成成分とする^{5,6}. このように α -Syn凝集体の異常蓄積を病理所見とする疾患群はシヌクレイノパチーと総称され, PDに加えてレビー小体型認知症, 多系統萎縮症などが含まれる. α -Synはシナプス前終末に豊富に存在する140アミノ酸残基のペプチドであり, その生理学的機能として, シナプス前終末の機能維持や可塑性, 小胞輸送のプロセスなどに関与することが示唆されている⁵⁰. α -Syn凝集体はA β 凝集体やTau凝集体と同様, 単量体の α -Synがミスフォールディングを起こすことで生じる異常形成物であり, 神経細胞間を伝播しながら中脳黒質線条体系のドパミン神経の変性・脱落を誘起し, 神経伝達物質であるドパミンを欠乏させることで運動症状を呈する. また, その蓄積量に基づく病理ステージはPDの臨床症状と高く相関することが報告されている^{9,10,51}.

最近のPD診断・治療では, ドパミン神経の脱落に伴うDAT密度の低下を捉え, ドパミン補充療法の有無を選択することが主流とされている. 本アプローチはPD症状の一時的な改善には有効である反面, 症状の進行を抑制することは不可能であり, 神経変性に直接作用しPDの発症予防や進行抑制を可能とする根本治療法は現在まで確立されていない. α -Syn凝集体を体外から検出する生体イメージング法が確立されれば, 現行の診断法よりも早期の段階, すなわち運動症状発症前におけるPDの確定診断が実現し得ると期待される⁵². また, 神経変性を誘起する病態メカニズムに焦点を当てた

AD根本治療法の台頭に続き、PDにおいても α -Syn凝集体を標的とした疾患修飾薬の開発が期待されており^{53, 54}、 α -Syn凝集体の生体イメージングは疾患修飾薬の開発におけるサロゲートバイオマーカーや被験者の層別化のためのツールとしての役割も担うことが想定される。

以上のことから、 α -Syn凝集体の生体イメージングはPDの早期診断および治療薬開発に貢献しうると考えられ⁵⁵、 α -Syn凝集体を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発研究が世界中で活発に展開されてきた(Figure 2-1)⁵⁶⁻⁶¹。しかし、現在までに報告されている α -Synイメージングプローブはいずれも α -Syn凝集体に対する結合選択性や脳移行性に乏しいため、臨床応用されているプローブは皆無である¹⁷。そのため、本課題を克服し、前臨床研究において脳内の α -Syn凝集体を生体で選択的かつ明瞭に描出するプローブを開発することが α -Synイメージング研究に求められる喫緊の課題とされる。本研究では、優れた性能を有する α -Synイメージングプローブを開発する上で、リードとなる化合物をスクリーニングにより見出し、それを基盤として、 α -Syn凝集体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。

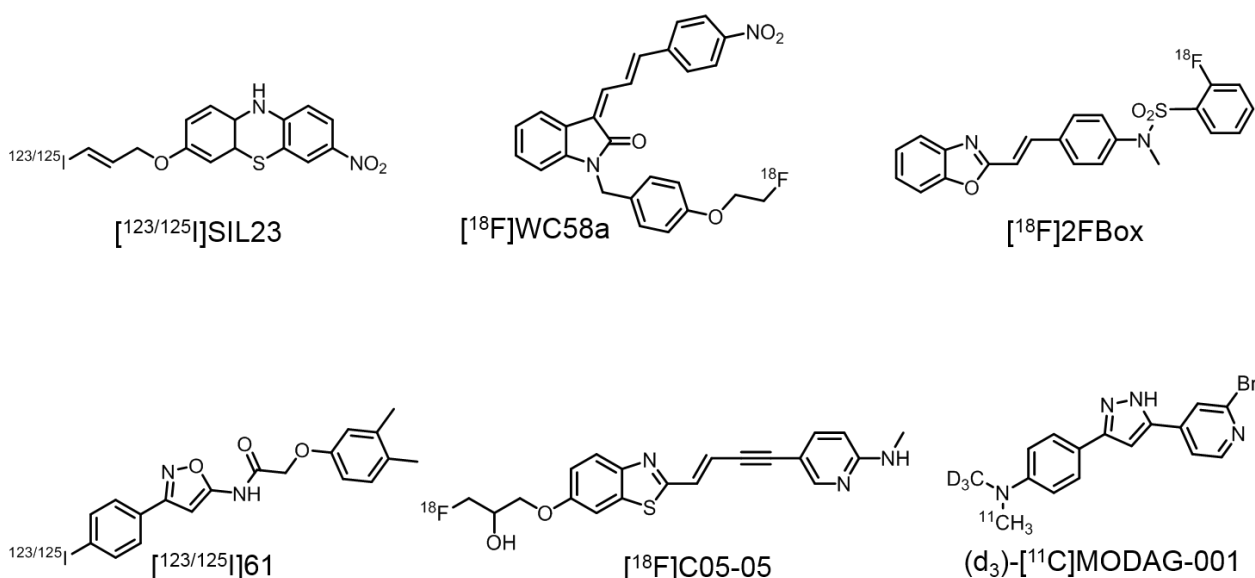


Figure 2-1. Chemical structures of α -Syn imaging probes reported previously.

第1節

ビスキノリン誘導体を基盤とした

陽電子断層撮像用 α -Syn イメージングプローブの開発

α -Synイメージングプローブの開発が世界的に見ても成功していないことから、既存プローブの化学構造に囚われない独自の骨格を基盤とした分子設計によるプローブ開発を行う必要があると考えた。そこで、京都大学大学院薬学研究科および著者の所属分野で構築された30,000以上の化合物を含む独自の化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行うことで、 α -Syn凝集体への高い結合親和性を示すリード化合物を探索することとした。ライブラリーに含まれる化合物の化学構造に着目し、 α -Syn凝集体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性質として3つの基準を設けることで、被験化合物を選抜することとした。具体的には、① β -シート構造を豊富に含む α -Syn凝集体に対して高い結合親和性を示す必要があるため、 β -シート構造認識能を示す上で高い平面構造を有すること、②BBB透過性を示す必要があるため、適度な分子量であること(<500 Da)、③放射性核種の導入が簡便であることを選抜基準とし、得られた約150化合物について、 α -Syn凝集体への結合性評価を行うこととした。

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。¹⁹F-NMRには、日本電子株式会社製 JEOL JNM-ECS400 を用いた。 α -Syn 凝集体は東京都医学総合研究所 長谷川成人分野長より提供されたものを使用した。 $A\beta$ は株式会社ペプチド研究所より購入した。

動物

第1章第1節と同様に、購入・飼育した。

ビスキノリン(Bisquinoline: BQ)誘導体の合成

8-Hydroxyquinoline-2-carbaldehyde (1).

2-Methyl-8-quinolinol (746 mg, 5.0 mmol)を 1,4-Dioxane (50 mL)に溶解し、SeO₂ (666 mg, 6.0 mmol)を加え、100 °C で3時間攪拌した。クロロホルム(50 mL×2)で抽出し、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 = 10/1)で精製して目的物 **1** を収量 493 mg (56.9%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.8 (s, 1H), 8.35 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.62 (td, J = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 7.44 (dt, J = 0.8, 8.0 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 9.2 Hz, 1H). MS (ESI) m/z 174.0 [M+H]⁺.

2-Quinolinecarboxaldehyde, 8-hydroxy-, hydrazone (2).

化合物 **1** (392 mg, 2.3 mmol)を MeOH (12 mL)に溶解し、ヒドラジン無水和物(132 μ L, 2.7 mmol)を氷冷下に加え、室温で20時間攪拌した。クロロホルム(50 mL×2)で抽出し、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 = 49/1)で精製して目的物 **2** を収量 315 mg (74.3%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.10 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.99 (dd, J = 1.2, 8.8 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.42 (td, J = 1.2, 8.0 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H). MS (ESI) m/z 188.1 [M+H]⁺.

8-Methoxy-2-methylquinoline (3).

2-Methyl-8-quinolinol (746 mg, 5.0 mmol)を DMF (20 mL)に溶解し、CH₃I (623 μ L, 10 mmol), NaH (600 mg, 25 mmol)を氷冷下に加え、30分間攪拌した。水で反応を停止した後、酢酸エチル(50 mL×2)で抽出し、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 = 20/1)で精製して目的物 **3** を収量 755 mg (87.1%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.37-7.29 (m, 3H), 7.01 (dd, J = 1.6, 7.6 Hz, 1H), 4.06 (s, 3H), 2.79 (s, 3H). MS (ESI) m/z 174.1 [M+H]⁺.

8-Methoxyquinoline-2-carbaldehyde (4).

化合物 **1** と同様の合成法により, 化合物 **3** から, 目的物 **4** を収量 676 mg (82.9%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.3 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 8.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 0.8, 8.0$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 0.8, 8.0$ Hz, 1H), 4.17 (s, 3H). MS (ESI) m/z 188.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-Quinolinecarboxaldehyde, 8-methoxy-, hydrazone (5).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **4** から, 目的物 **5** を収量 556 mg (76.5%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 1.2, 8.0$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.85 (s, 2H), 4.09 (s, 3H). MS (ESI) m/z 202.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

8-Fluoroethoxy-2-methylquinoline (6).

2-Methyl-8-quinolinol (318 mg, 2.0 mmol) を DMF (20 mL) に溶解し, 2-Fluoroethyl *p*-toluenesulfonate (654 μL , 3.0 mmol), Cs_2CO_3 (1.30 g, 4.0 mmol) を加え, 105 $^\circ\text{C}$ で 3 時間攪拌した. 酢酸エチル(50 mL \times 2) で抽出し, 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 = 20/1)で精製して目的物 **6** を収量 294 mg (71.6%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.35-7.33 (m, 2H), 7.25 (dd, $J = 0.4, 8.4$ Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 2.4, 6.0$ Hz, 1H), 4.91 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 2H), 4.49 (dt, $J_{\text{F}} = 27.6$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H), 2.75 (s, 3H). MS (ESI) m/z 206.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

8-Fluoroethoxyquinoline-2-carbaldehyde (7).

化合物 **1** と同様の合成法により, 化合物 **6** から, 目的物 **7** を収量 216 mg (69.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.58 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 1.6, 8.4$ Hz, 1H), 7.20 (dd, $J = 0.8, 7.2$ Hz, 1H), 5.06 (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 4.92 (dt, $J_{\text{F}} = 21.2$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.57 (dt, $J_{\text{F}} = 26.4$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H). MS (ESI) m/z 220.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

8-Hydroxyethoxy-2-methylquinoline (8).

2-Methyl-8-quinolinol (318 mg, 2.0 mmol) を DMF (20 mL) に溶解し, 2-Bromoethanol (284 μL , 4.0 mmol), Cs_2CO_3 (1.30 g, 4.0 mmol) を加え, 105 $^\circ\text{C}$ で 14 時間攪拌した. 酢酸エチル(50 mL \times 2) で抽出し, 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 = 20/1)で精製して目的物 **8** を収量 276 mg (68.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.02 (s, 2H), 7.49 (dd, $J = 1.2, 8.0$ Hz, 1H), 7.42 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 1.2, 7.6$ Hz, 1H), 5.98 (s, 1H), 4.34 (t, $J = 4.8$ Hz, 1H), 3.95 (d, $J = 3.6$ Hz, 1H), 2.77 (s, 3H). MS (ESI) m/z 204.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

8-Hydroxyethoxyquinoline-2-carbaldehyde (9).

化合物 **1** と同様の合成法により, 化合物 **8** から, 目的物 **9** を収量 139 mg (47.0%) で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.2 (s, 1H), 8.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.56 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 1.2, 7.6$ Hz, 1H), 4.95 (s, 1H), 4.37 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.16 (d, $J = 3.6$ Hz, 2H). MS (ESI) m/z 218.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(8-Fluoroethoxy-2-quinolinylidene)(8-methoxy-2-quinolinylidene)azine (10, BQ1).

化合物 **2** (45.0 mg, 0.24 mmol) を MeOH (10.0 mL) に溶解し, 化合物 **7** (63.1 mg, 0.29 mmol) を加えた. 反応液を 70 °C で 17 時間攪拌した後, クロロホルム(30 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 **10** を収量 20.5 mg (22.0%) で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.80 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.35 (dd, $J = 5.6, 8.8$ Hz, 1H), 8.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.89 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.60-7.48 (m, 3H), 7.41 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.26 (dd, $J = 1.6, 8.8$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.99 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 3.2$ Hz, 2H), 4.59 (dt, $J_{\text{F}} = 27.2$ Hz, $J = 3.2$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 163.0, 162.5, 161.8, 154.7, 152.2, 140.4, 136.5, 135.2, 132.8, 130.1, 129.2, 128.1, 128.0, 123.7, 120.6, 120.0, 119.4, 119.25, 110.7, 108.1, 81.0, 68.4. ^{19}F NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 222.8. HRMS (FAB) m/z 388.1341 $[\text{M}]^+$.

(8-Fluoroethoxy-2-quinolinylidene)(8-hydroxy-2-quinolinylidene)azine (11, BQ2).

化合物 **10** と同様の合成法により, 化合物 **5** から, 目的物 **11** を収量 4.81 mg (9.17%) で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.92 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.39 (d, $J = 5.2$ Hz 1H), 8.37 (d, $J = 5.2$ Hz 1H), 8.23 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 7.54-7.48 (m, 3H), 7.18 (dd, $J = 2.0, 6.8$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 7.6$ Hz 1H), 7.19 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.94 (dt, $J_{\text{F}} = 47.2$ Hz, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.58 (dt, $J_{\text{F}} = 26.8$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 2H), 4.14 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 162.04, 162.00, 161.9, 155.6, 154.6, 152.5, 152.4, 140.3, 140.0, 136.51, 136.50, 130.1, 130.0, 128.1, 128.0, 120.7, 119.6, 119.5, 110.9, 108.2, 81.1, 68.8, 56.2. ^{19}F NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 222.9. HRMS (FAB) m/z 403.1576 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(8-Hydroxyethoxy-2-quinolinylidene)(8-methoxy-2-quinolinylidene)azine (12).

化合物 **5** (47.3 mg, 0.24 mmol) を MeOH (10.0 mL) に溶解し, 化合物 **9** (61.3 mg, 0.28 mmol) を加えた. 反応液を 70 °C で 17 時間攪拌した後, 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 = 1/1)で精製して目的物 **12** を収量 17.7 mg (18.9%) で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.92 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.34 (d, $J = 4.8$ Hz 1H), 8.31 (d, $J = 4.8$ Hz 1H), 8.21 (d, $J = 7.6$ Hz 2H), 7.58-7.46 (m, 5H), 7.24 (dd, $J = 3.2, 6.0$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.0$ Hz 1H), 4.38 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 4.14 (s, 3H), 4.07 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H). MS (ESI) m/z 401.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(8-Methoxy-2-quinolinylidene)(8-(toluenesulfonyl)oxyethoxy-2-quinolinylidene)azine (13).

化合物 **12** (17.7 mg, 0.044 mmol)を CH₂Cl₂ (5.0 mL)に溶解し, *p*-Toluenesulfonyl chloride (25.3 mg, 0.13 mmol), DMAP (触媒量), Et₃N (24.7 μ L, 0.18 mmol)を加えた. 反応液を室温で 3 時間攪拌した後, クロロホルム(25 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(クロロホルム/メタノール = 10/1)で精製して目的物 **13** を収量 2.18 mg (8.9%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.94 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.38 (d, *J* = 8.8 Hz 1H), 8.35 (d, *J* = 8.4 Hz 1H), 8.24 (d, *J* = 8.4 Hz 1H), 8.20 (dd, *J* = 0.4, 8.8 Hz, 1H), 7.84-7.79 (m, 4H), 7.48 (d, *J* = 4.8 Hz 2H), 7.46 (dd, *J* = 1.6, 6.8 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.4 Hz 1H), 7.13 (dd, *J* = 1.2, 7.6 Hz, 1H), 7.09 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 4.59-4.53 (m, 4H), 4.15 (s, 3H), 2.38 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 161.95, 161.94, 155.5, 152.3, 154.6, 142.9, 139.95, 139.94, 137.4, 136.5, 130.0, 129.9, 129.6, 129.5, 128.5, 128.09, 128.07, 126.99, 126.98, 119.6, 119.57, 119.56, 118.0, 108.5, 108.2, 108.1, 56.2, 41.9, 21.4, 14.1. HRMS (FAB) *m/z* 555.1702 [M+H]⁺.

Thioflavin T (ThT)を競合リガンドとしたスクリーニングアッセイ

α -Syn 凝集体(0.23 μ M), ThT (2.7 μ M), および被験化合物(23 nM)の TBS 混合溶液を室温で 30 分間インキュベートした後, 溶液を Multi Wellplate (0.4 mL \times 96 wells flatbottom, Sumitomo Bakelite Co., Ltd)に分注した. 蛍光プレートリーダー(Infinite M200PRO, TECAN)を用いて ThT の蛍光強度を測定(励起波長 440 nm, 蛍光波長 484 nm)し, 85% Control 以下の値を示した被験化合物を α -Syn 結合性化合物として選別した. % Control は, 被験化合物の存在下における ThT の蛍光強度と非存在下における ThT の蛍光強度の比として定義した.

A β 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.

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験

α -Syn 凝集体または A β 凝集体(0.23 μ M), ThT (2.7 μ M), および BQ 誘導体(0.12 nM – 9.1 μ M)の TBS 混合溶液を室温で 30 分間インキュベートした後, 溶液を Multi Wellplate に分注した. 蛍光プレートリーダーを用いて ThT の蛍光強度を測定(励起波長 440 nm, 蛍光波長 484 nm)し, GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.)を用いて蛍光強度の阻害曲線を作成し, 半数阻害濃度(IC₅₀)を算出した. 得られた IC₅₀ から, Cheng-Prusoff 式: $K_i = IC_{50}/(1+[L]/K_d)$ に基づいて, 結合阻害定数(K_i)を算出した. [L] は ThT 濃度を, α -Syn 凝集体および A β 凝集体に対する結合解離定数(K_d)は, ThT の K_d : 0.40 μ M および 0.31 μ M をそれぞれ用いた.

[¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2)の合成

第1章第2節と同様の方法を用いて¹⁸F含有溶液を共沸脱水した。標識前駆体として化合物**13** (1.0 mg)が入ったバイアルに、DMSO (200 μL)に溶解した¹⁸Fを加え、100 °Cで20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(200 μL)に溶解し、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 (0.1% Et₃N 含有 MeCN/H₂O)を用いて[¹⁸F]**11** ([¹⁸F]BQ2)を精製した。

LogP 値測定

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。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[¹⁸F]**11** ([¹⁸F]BQ2) (74 kBq)を加えた。

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。[¹⁸F]**11** ([¹⁸F]BQ2) (74.0 kBq, 100 μL)を尾静脈より投与した。

2.1.2. 結果と考察

ThT を競合リガンドとしたスクリーニングアッセイ

β -シート認識性, BBB 透過性, 放射性核種の導入簡便性の 3 つの選抜基準により得られた約 150 の被験化合物について, α -Syn 凝集体への結合性を評価するため, β -シート構造認識能を有する蛍光プローブ ThT を競合リガンドとする競合阻害実験を行った. 本評価法は, 異なる化学構造を有する様々な低分子化合物について, α -Syn 凝集体に対する結合親和性を算出する手法として一般に利用されてきたため^{57, 62-64}, α -Syn 結合性化合物を探索する上で有用であると考えられた. スクリーニングアッセイに用いた被験化合物およびそれらの % Control 値を Table 2-1 に示す. % Control は, 被験化合物の存在下における ThT の蛍光強度と非存在下における ThT の蛍光強度の比として定義し, 85% Control 以下の値を示した被験化合物を α -Syn 結合性化合物として選別した.

その結果, α -Syn凝集体に対してThTと競合してThT由来の蛍光を減弱させる被験化合物を11個見出した(Figure 2-2). 特に, BQ骨格を基盤としたKPTJ10017 (62.1% Control)およびカルコン類縁体構造を基盤としたIDP-3⁶⁵ (61.0% Control)は, ThTに対する高い結合阻害能を示した. 以上より, KPTJ10017およびIDP-3が α -Syn凝集体への高い結合親和性を示すことが示唆され, 両化合物が α -Synイメージングプローブの開発に向けた有望なリード化合物となり得ることが示された.

本節では, KPTJ10017の化学構造を基盤としたプローブ化を計画した. そこで, α -Syn結合性を示す上で重要な構造と考えられたBQ骨格を保持することとした. また, PET用核種として臨床で汎用される¹⁸Fの導入を想定し, ヒドロキシ基を介してフルオロエチル基を導入することで, 放射性フッ素標識BQ誘導体[¹⁸F]BQ1~2を設計・合成し(Figure 2-3), その α -Synイメージングプローブとしての有用性を評価した.

Table 2-1. List of library compounds in the screening assay and % Control value of each compound.

Compound	% Control	Compound	% Control	Compound	% Control
KPBA10101	90.13	KPTJ16752	102.6	KPYC08509	87.56
KPBA10078	91.48	KPTJ17336	101.8	KPYC08592	93.10
KPYB10896	89.73	KPTJ17374	101.4	KPYC08606	88.06
KPYC10736	88.62	KPTJ17377	102.4	KPYC10005	97.22
TPNA00406	88.89	KPTJ17954	105.5	KPYC10926	97.12
TPNA10487	89.90	KPTJ18005	104.6	KPYC10991	95.31
TPNA10670	94.17	KPTJ18017	104.4	KPYC12152	96.47
TPNA12342	91.24	KPTJ18034	106.6	KPYC12161	95.59
KPVJ00178	92.38	KPTJ18039	97.75	KPYC12162	93.37
KPVJ00279	93.83	KPTJ18041	101.1	KPYC12165	93.81
KPTJ00100	87.61	KPTJ18042	97.61	KPYH00072	89.55
KPTJ00108	85.48	KPTJ18094	104.3	KPYJ00023	93.62
KPTJ00110	86.97	KPTJ18232	95.27	TPNA00901	94.37

KPTJ00865	88.52	KPTJ18287	96.26	TPNA01274	92.77
KPTJ00979	88.12	KPTJ18350	98.41	TPNA01917	92.16
KPTJ01007	88.68	KPTJ18504	111.4	TPNA12631	94.25
KPTJ01012	87.70	KPTJ18690	116.3	KPTJ11351	85.95
KPTJ10017	62.11	KPTJ18691	115.0	KPTJ11352	91.95
<u>KPTJ16057</u>	<u>76.44</u>	KPTJ18783	94.12	KPTJ11672	91.51
KPTJ16407	88.88	KPTJ18995	106.2	KPTJ14312	90.75
KPTJ18929	87.97	KPTJ19104	90.08	KPTJ14998	90.94
KPTJ19983	90.75	KPTJ19297	93.36	KPTJ15032	89.68
KPTC00336	101.1	KPTJ19310	95.12	KPTJ15832	85.86
KPTC00449	101.4	KPTJ19317	93.31	KPYC08207	89.46
KPTG00191	100.6	KPTJ19487	93.81	KPYC08214	89.07
KPTG00196	99.90	KPTJ19577	94.70	KPYC08217	89.95
KPTJ00044	99.70	KPTJ19612	93.56	KPYC08246	88.72
KPTJ00045	100.5	KPTJ19896	89.91	KPYC08345	106.6
KPTJ00145	100.2	KPTJ19932	91.50	KPYC08356	86.33
KPTJ00900	101.9	KPTJ19954	95.15	KPYC08372	87.71
KPTJ01537	100.2	KPVJ00323	91.78	KPYC08383	85.91
KPTJ01835	99.73	KPYB00527	92.73	<u>KPYC08456</u>	<u>79.09</u>
KPTJ10423	99.59	KPYB10292	91.47	<u>KPYC08488</u>	<u>78.05</u>
KPTJ10776	101.7	KPYC00826	93.00	<u>KPYC08531</u>	<u>78.56</u>
KPTJ10828	97.94	KPYC00829	92.89	KPYC10685	87.62
KPTJ10832	99.98	<u>KPYC02942</u>	<u>84.38</u>	KPYC12163	88.43
KPTJ10856	97.99	<u>KPYC08123</u>	<u>83.52</u>	KPYH00037	88.56
KPTJ10857	98.60	KPYC08137	91.81	KPYH00046	88.04
KPTJ11103	96.96	KPYC08148	90.55	KPYH00066	88.47
KPTJ11667	96.31	KPYC08191	93.21	KPYH00067	90.66
KPTJ11780	95.66	KPYC08195	89.14	KPYH00068	86.48
KPTJ12872	96.03	KPYC08348	93.45	KPYH00069	86.93
KPTJ15071	98.03	KPYC08370	91.21	KPYH00070	86.64
KPTJ15293	98.22	KPYC08374	92.87	KPYH00071	85.63
KPTJ15511	95.90	KPYC08410	90.45	KPYH00073	86.06
KPTJ16239	97.56	KPYC08487	90.86	<u>KPYH00074</u>	<u>84.98</u>
KPTJ16391	99.04	<u>KPYC08497</u>	<u>82.12</u>	IDP-3	60.98
KPTJ16557	97.63	<u>KPYC08505</u>	<u>84.96</u>		
KPTJ16683	106.7	KPYC08506	92.41		
KPTJ16746	96.48	KPYC08507	92.67		

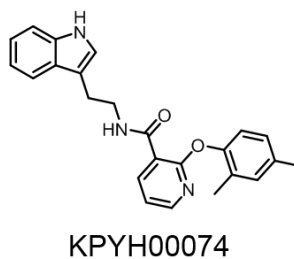
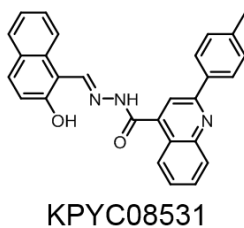
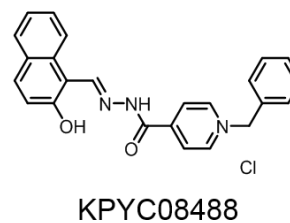
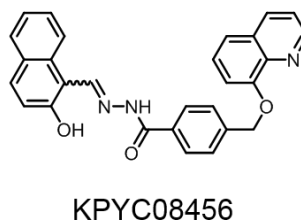
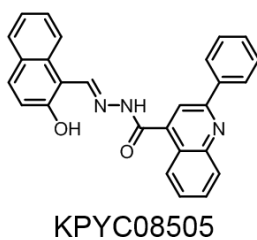
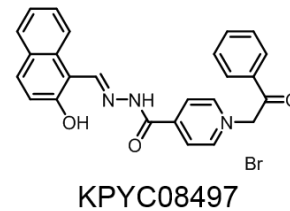
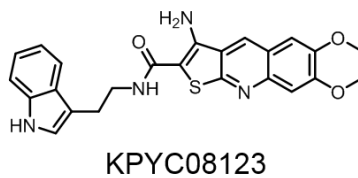
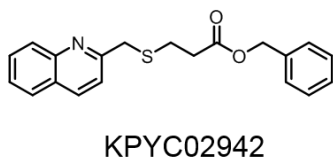
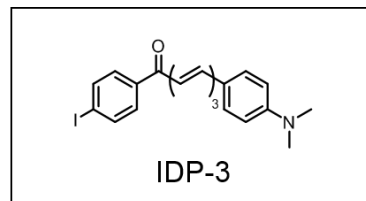
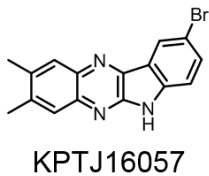
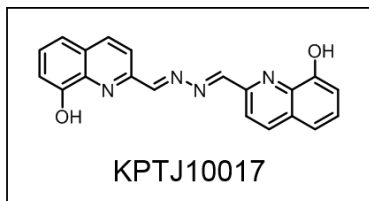


Figure 2-2. Chemical structures of α -Syn-binding compounds in a screening assay.

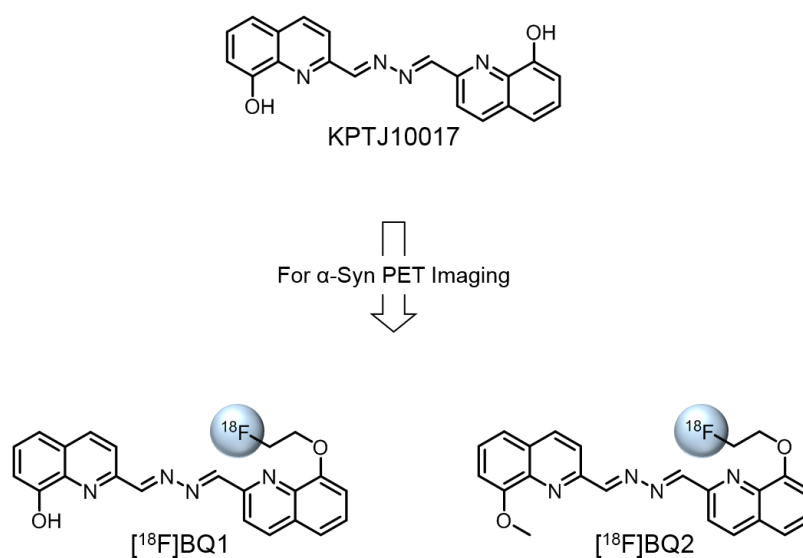
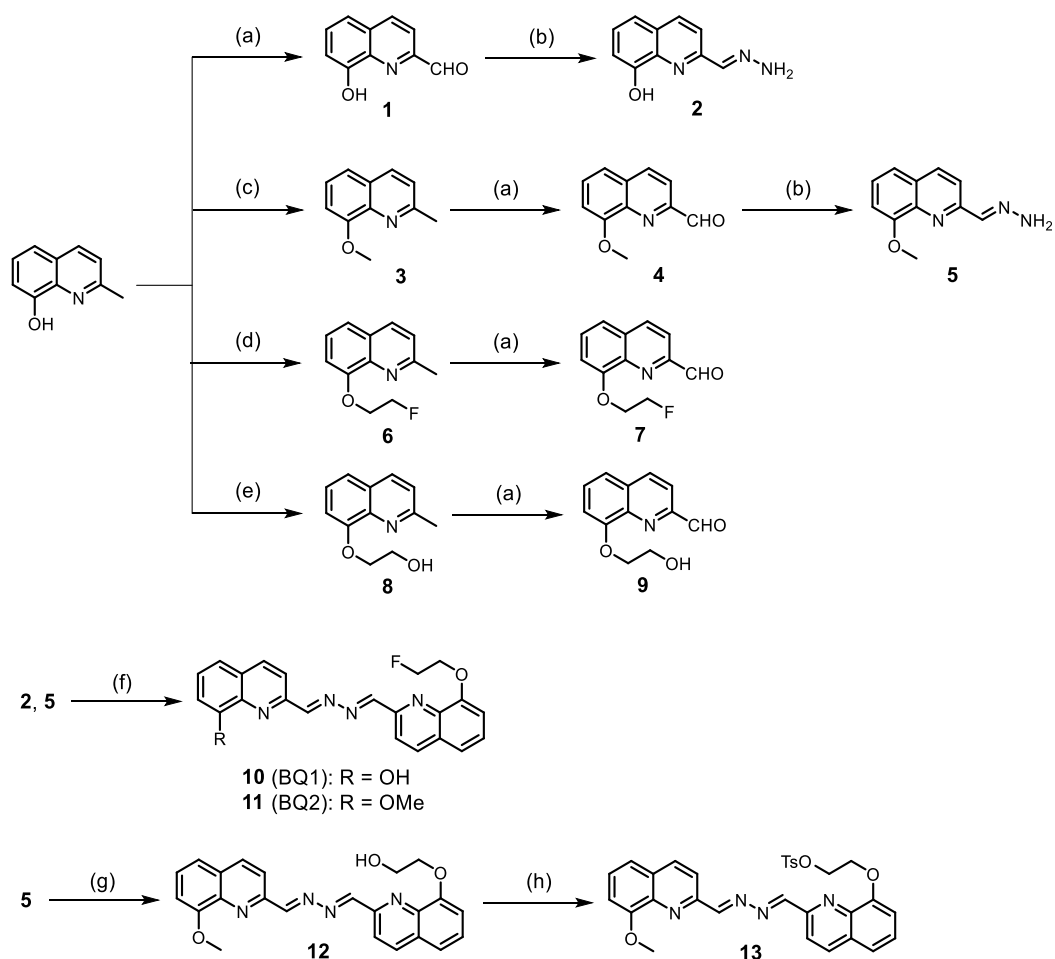


Figure 2-3. Design and chemical structures of ¹⁸F-labeled BQ derivatives.

BQ 誘導体の合成

Scheme 2-1 に BQ 誘導体の合成経路を示す。2-Methyl-8-quinolinol を出発原料として 1-2 工程を経て化合物 **1**, **4**, **7**, および **9** を収率 32.0-72.2% で得た。その後、Wolff-Kishner 還元^{66,67}によりヒドラジンと縮合させることで化合物 **2** および **5** を得た。その後、BQ 骨格を形成させ、最終化合物 **10** (BQ1) および **11** (BQ2) を総収率 5.1 および 9.3% で得た。また、化合物 **12** より *p*-Toluenesulfonyl chloride を用いたトシル化反応を経て、[¹⁸F]**11** ([¹⁸F]BQ2) の標識前駆体 **13** を得た。



Reagents and conditions: (a) SeO_2 , 1,4-Dioxane, reflux, 100 °C; (b) $\text{N}_2\text{H}_4\text{-H}_2\text{O}$, MeOH, rt; (c) CH_3I , NaH, DMF, rt; (d) 2-Fluoroethyl *p*-toluenesulfonate, Cs_2CO_3 , DMF, rt; (e) 2-Bromoethanol, Cs_2CO_3 , DMF, rt; (f) 7, MeOH, reflux, 70 °C; (g) 9, MeOH, reflux, 70 °C; (h) *p*-Toluenesulfonyl chloride, DMAP, Et_3N , CH_2Cl_2 , rt.

Scheme 2-1. Synthetic routes for BQ derivatives.

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験

各 BQ 誘導体の α -Syn 凝集体への結合親和性を評価するために、ThT を競合リガンドとした競合阻害実験を行った。その結果、BQ 誘導体の添加量依存的に ThT の蛍光強度が減弱した(Figure 2-4A)。得られた阻害曲線より算出した 10 (BQ1)および 11 (BQ2)の α -Syn 凝集体に対する K_i 値を Table 2-2 に示す。10 (BQ1)および 11 (BQ2)の K_i 値は 17.0 nM および 11.6 nM と、リード化合物の KPTJ10017 (3.4 nM)と比較して高値を示したものの、両プローブは BQ 骨格を保持した分子設計により、 α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示すことが明らかとなった。 α -Syn 凝集体および $\text{A}\beta$ 凝集体は β -シート構造を豊富に含む点を共通の特徴とし、神経変性疾患患者脳内で共局在する症例が多数報告されてい

る⁶⁸⁻⁷⁰。したがって、生体で α -Syn 凝集体を識別するため、 β -シート構造を認識するよう設計された α -Syn イメージングプローブには、 $A\beta$ 凝集体に対して α -Syn 凝集体への高い結合選択性が求められる。そこで、**10** (BQ1)および **11** (BQ2)の $A\beta$ 凝集体に対する結合親和性を α -Syn 凝集体を用いた場合と同様に評価した。その結果、BQ 誘導体の添加量依存的に ThT の蛍光強度が減弱し(Figure 2-4B), 両プローブの $A\beta$ 凝集体に対する K_i 値は 8.5 nM および 7.3 nM と, KPTJ10017 (1.1 nM)と比較して高値を示したものの、 α -Syn 凝集体に対する K_i 値と比較して低値を示したことから、**10** (BQ1)および **11** (BQ2)は $A\beta$ 凝集体に対しても高い結合親和性を示すことが明らかとなった。

以上の結果より、KPTJ10017 の化学構造を基盤としてフルオロエチル基を導入した BQ 誘導体は、既存の α -Syn イメージングプローブと同様、 α -Syn 凝集体および $A\beta$ 凝集体のいずれに対しても高い結合親和性を示すことが明らかとなった。

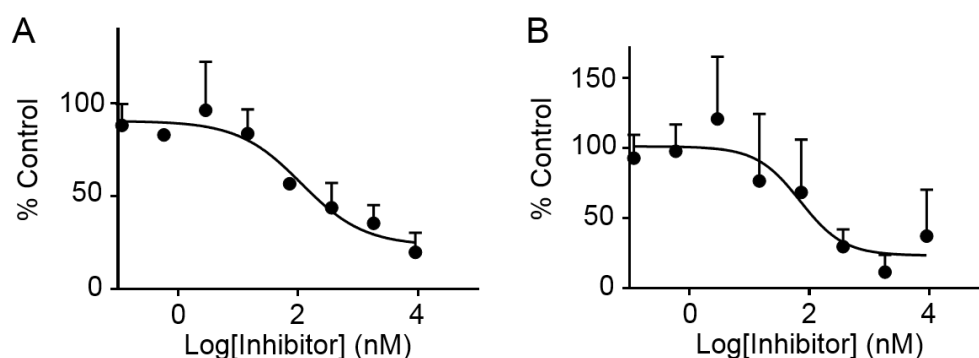


Figure 2-4. Inhibition curves of **11** (BQ2) for α -Syn (A) and $A\beta$ (B) aggregates.

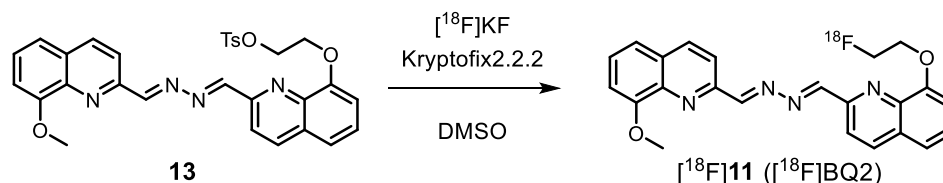
Table 2-2. Comparison of binding affinity of BQ derivatives for α -Syn and $A\beta$ aggregates.

Compound	K_i (nM) ^a	
	α -Syn	$A\beta$
10 (BQ1)	17.0 \pm 3.5	8.5 \pm 3.6
11 (BQ2)	11.6 \pm 2.6	7.3 \pm 0.7
KPTJ10017	3.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.6

^aValues are the means \pm standard errors of three independent experiments.

[¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2)の合成

Scheme 2-2 に ¹⁸F 標識経路を示す。トシル前駆体を用いて、[¹⁸F]KF および Kryptofix2.2.2 によるフッ素化を経て、[¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2)を放射化学的収率 1.2%、放射化学的純度 95%以上で合成した。



Scheme 2-2. ¹⁸F-Labeling of [¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2).

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

[¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2)の体内動態を評価するため、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 2-5 および Table 2-3 に示す。[¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2)はその適度な脂溶性(LogP = 2.62)および分子量(402 Da)を反映して、投与 2 分後における脳内放射エネルギーが 1.59% ID/g と投与早期における脳移行性を示した。すなわち、[¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2)は既存の α -Syn イメージングプローブ(<1% ID/g)と比較して高いマウス脳移行性を示し^{58,71}、 α -Syn イメージングプローブの開発に向けた新たなリード化合物となり得ることが示された。また、投与 30 分後および 60 分後における脳内放射エネルギーが 1.46 および 1.35% ID/g と、[¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2)は脳内へ移行後、滞留傾向を示した。これにはプローブの脳白質への非特異的結合が寄与した可能性が考えられた。実際、白質に豊富に存在するミエリン鞘はミエリン塩基性タンパク質(Myelin basic protein: MBP)を主要構成成分とし、MBP には α -Syn 凝集体や A β 凝集体などの脳タンパク質凝集体と同様、 β -シート構造が豊富に存在することが知られていることから^{72,73}、プローブとの相互作用が想定される。さらに、既存の A β や Tau イメージングプローブと同様、モノアミン酸化酵素⁷⁴や神経メラニン⁷⁵に対する結合性の寄与なども考えられたものの、その詳細は不明である。本プローブの他臓器における放射能集積量を評価した結果、[¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2)は脂溶性化合物に典型的な肝臓への初期移行性および経時的な腸への集積性を示した。また、骨への顕著な集積は認められなかったことから(投与 60 分後で 1.93% ID/g)、生体における脱フッ素化は生じないことが示唆された。

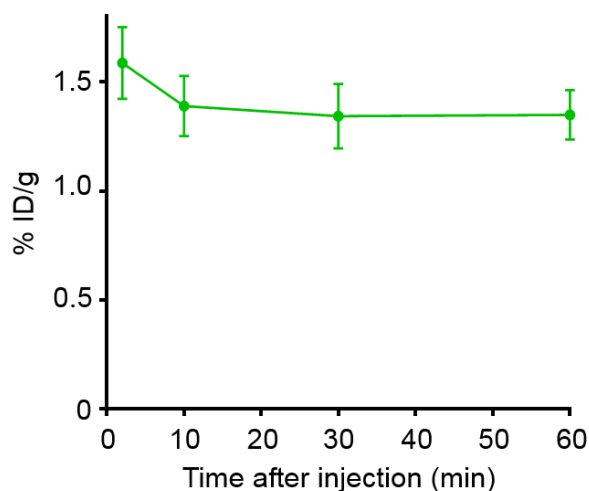


Figure 2-5. Brain uptake and clearance after intravenous injection of [¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2) into normal mice (male, n = 5).

Table 2-3. Biodistribution of [¹⁸F]11 ([¹⁸F]BQ2) in normal mice.^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
Blood	13.4 (0.93)	7.05 (0.56)	6.80 (1.66)	6.64 (0.40)
Liver	17.0 (2.03)	10.6 (0.70)	8.58 (1.33)	7.45 (1.27)
Kidney	10.6 (0.48)	6.68 (0.55)	6.28 (0.73)	5.83 (0.69)
Intestine	2.67 (0.27)	4.43 (0.37)	8.42 (1.91)	12.4 (1.76)
Spleen	3.41 (0.23)	2.59 (0.39)	2.26 (0.50)	2.22 (0.39)
Pancreas	4.16 (0.59)	3.07 (0.31)	2.62 (0.62)	2.16 (0.33)
Heart	6.97 (0.42)	4.03 (0.52)	3.65 (0.92)	3.95 (0.51)
Lung	9.33 (1.17)	5.19 (0.67)	4.45 (0.76)	4.39 (0.44)
Stomach ^b	1.77 (0.52)	3.28 (0.51)	5.04 (1.25)	5.41 (1.19)
Brain	1.59 (0.16)	1.39 (0.14)	1.46 (0.30)	1.35 (0.11)
Bone	3.54 (0.74)	2.45 (0.42)	1.96 (0.77)	1.93 (0.17)

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

^bExpressed as % ID.

2.1.3. 小括

本節において、 α -Syn イメージングプローブの開発研究が世界的に停滞している現状を鑑み、既存プローブの化学構造に囚われない独自の骨格を基盤とした分子設計によるプローブ開発を計画した。そこで、独自の化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより新たなリード化合物を探索することとし、以下に述べる結果を得た。

- (1) β -シート認識性、BBB 透過性、放射性核種の導入簡便性の 3 点を基準に設け、約 150 の化合物を選抜した。
- (2) ThT を競合リガンドとした競合阻害実験において、特に KPTJ10017 および IDP-3 が、ThT の α -Syn 結合性に対する高い阻害能を示した。
- (3) KPTJ10017 の化学構造を基盤として、ビスキノリン(BQ)骨格を保持し、ヒドロキシ基を介してフルオロエチル基を導入した BQ 誘導体を設計・合成した。
- (4) KPTJ10017 と同様、**10** (BQ1)および **11** (BQ2)はいずれも α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示した。
- (5) トシル前駆体を用いた ^{18}F 標識反応により得られた ^{18}F **11** (^{18}F BQ2)は、脳内での滞留傾向を示したものの、既存プローブと比較して高いマウス脳移行性を示した。

以上の結果より、スクリーニングにより α -Syn 結合性を示す新規骨格として BQ を見出し、本骨格を基盤とした α -Syn 標的 PET プローブへの応用により、 ^{18}F **11** (^{18}F BQ2)の開発に成功した。一方、本プローブは $\text{A}\beta$ 凝集体への結合性を示したことから、 α -Syn 凝集体への結合選択性において課題を有した。

第2節

α -Syn 凝集体への結合選択性の向上を目指した カルコン類縁体の合成と評価

第2章第1節において、独自の化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、 α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示す新規骨格として BQ 骨格を見出した。さらに、それを基盤とした PET プローブ化に成功し、 $[^{18}\text{F}]\text{BQ2}$ を得た。しかし、本プローブは、既存の α -Syn イメージングプローブと同様、 $\text{A}\beta$ 凝集体に対しても高い結合親和性を示したことから¹⁸、 α -Syn 凝集体への結合選択性に課題を有し、新たなプローブ開発が求められた。そこで、前節のスクリーニングにおいて KPTJ10017 とともに得られたカルコン類縁体である IDP-3 をリード化合物とした分子設計を計画した。 α -Syn 凝集体を標的とした既存プローブおよびカルコン骨格を基盤とした $\text{A}\beta$ イメージングプローブの開発研究に関する過去の知見を基に⁷⁶⁻⁷⁸、カルコン類縁体構造に導入する置換基の変換が α -Syn 凝集体への結合親和性を保持したまま $\text{A}\beta$ 凝集体への結合親和性を低下させる有効なアプローチであると考えた。以上を踏まえて、カルコン類縁体構造に種々のアリール置換基を導入することで、計 9 種の $^{123/125}\text{I}$ 標識カルコン類縁体(Figure 2-6)を設計・合成し、 α -Syn 凝集体への結合親和性および結合選択性に関する構造活性相関を検討した。

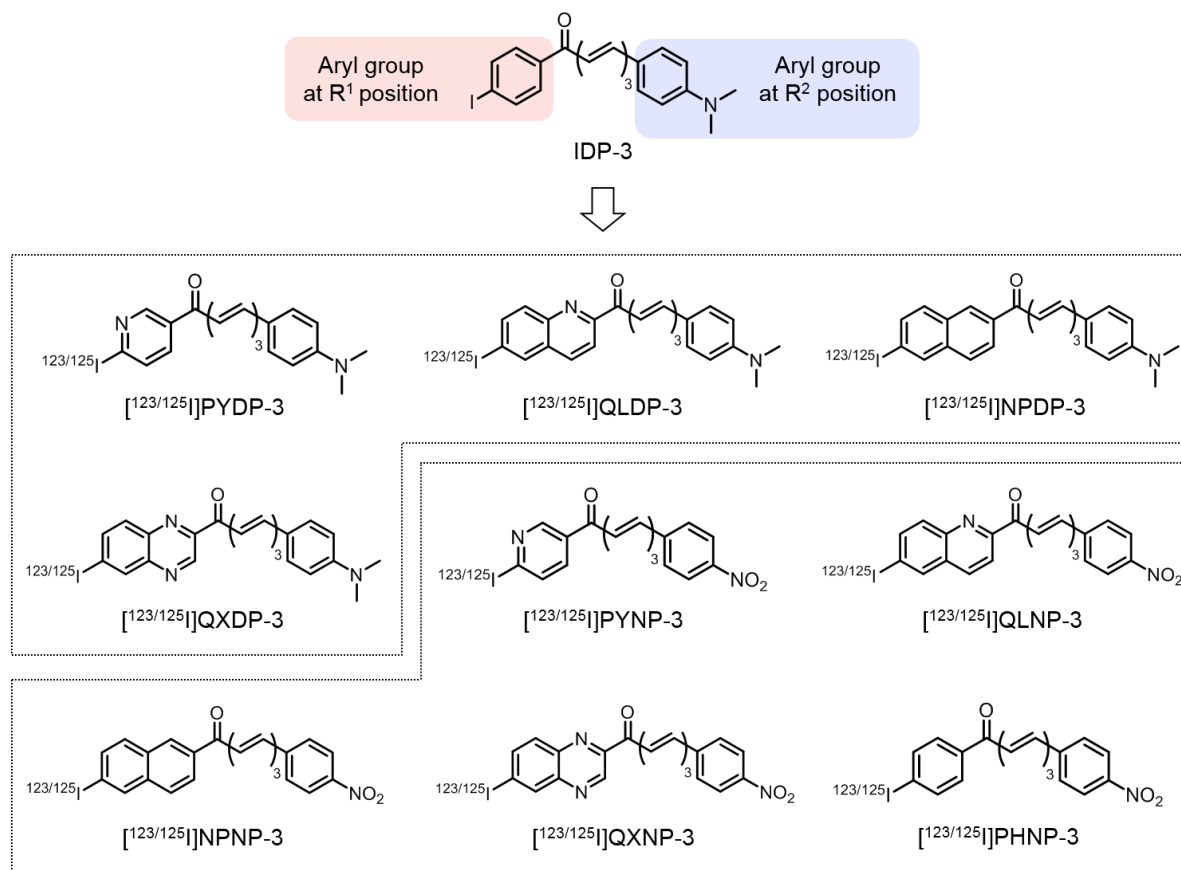


Figure 2-6. Design and chemical structures of $^{123/125}\text{I}$ -labeled chalcone analogues.

2.2.1. 実験方法

試薬・機器

第 2 章第 1 節と同じ試薬・機器を使用した。電子イオン化質量分析(Electron ionization mass spectrometry: EI-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 GCMS-QP2010 PL を用いて測定した。シヌクレイノパチー患者および AD 患者剖検脳組織切片は、京都府立医科大学 伊東恭子教授より提供されたものを使用した。蛍光染色像は、オリンパス株式会社製 FSX100 を用いて観察した。結合飽和実験のため、 α -Syn は rPeptide 社より購入した。

動物

第 1 章第 1 節と同様に、購入・飼育した。

カルコン類縁体の合成

5-Acetyl-2-(tributylstannyl)pyridine (2).

化合物 1 (200 mg, 1.0 mmol), Bis(tributyltin) (3.0 mL, 12.0 mmol), Pd(PPh₃)₄ (231 mg, 0.20 mmol), Et₃N (5.0 mL)を 1,4-Dioxane (10 mL)に溶解し, 95 °C で 2.5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後, 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 = 1/4)で精製して目的物 2 を収量 120 mg (29.3%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.92 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.72 (dd, J = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 2.58 (s, 3H), 1.86-1.66 (m, 6H), 1.54-1.42 (m, 6H), 1.35-1.18 (m, 6H), 0.94-0.88 (m, 9H). MS (ESI) m/z 412.2 [M+H]⁺.

5-Acetyl-2-iodopyridine (3).

化合物 2 (120 mg, 0.29 mmol)をクロロホルム(5.0 mL)に溶解し, ヨウ素のクロロホルム溶液(66 μ L, 50 mg/mL)を加えて室温で 30 分間攪拌した。飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液で反応を停止した後, クロロホルム(40 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。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 = 1/4)で精製して目的物 3 を収量 45.7 mg (63.2%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.88 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.83 (dd, J = 2.4, 8.4 Hz, 1H), 2.61 (s, 3H). MS (ESI) m/z 247.9 [M+H]⁺.

6-Bromoquinoline-2-carboxaldehyde (5).

化合物 4 (444 mg, 2.0 mmol)を 1,4-Dioxane (20 mL)に溶解し, SeO₂ (266 mg, 2.4 mmol)を加え, 100 °C で 13 時間攪拌した。クロロホルム(50 mL \times 2)で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/3)で精製して目的物 5 を収量 286 mg (60.9%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.2 (s, 1H), 8.23 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.05 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.90 (dd, J = 2.4, 8.8 Hz, 1H). MS (ESI) m/z 236.0 [M+H]⁺.

1-(6-Bromoquinoline-2-yl)ethanone (6).

化合物 **5** (200 mg, 0.85 mmol) を Toluene (636 μL) に溶解し, Nitromethane (206 μL , 3.8 mmol) および 1,1,3,3-Tetramethyl guanidine (16.1 μL , 0.13 mmol) を加え, 110 $^{\circ}\text{C}$ で 1.5 時間攪拌した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え反応を停止した後. 酢酸エチル(30 mL \times 2)で抽出し, 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 (酢酸エチル/ヘキサン = 1/6) で精製して目的物 **6** を収量 83.0 mg (39.2%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (q, $J = 7.7$ Hz, 2H), 8.07 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 8.05 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.85 (dd, $J = 2.0$, 8.8 Hz, 1H), 2.86 (s, 3H). MS (ESI) m/z 250.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-(6-(Tributylstannyl)quinoline-2-yl)ethanone (7).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **6** から, 目的物 **7** を収量 25.0 mg (48.6%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.24 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 1.2$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.87 (s, 3H), 1.68-1.54 (m, 6H), 1.48-1.36 (m, 6H), 1.28-1.18 (m, 6H), 0.91-0.88 (m, 9H). MS (ESI) m/z 462.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-(6-Iodoquinoline-2-yl)ethanone (8).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **7** から, 目的物 **8** を収量 12.9 mg (89.2%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 1.2$ Hz, 2H), 8.02 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 2.85 (s, 3H). MS (ESI) m/z 298.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6-(Tributylstannyl)-2-naphthaldehyde (10).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **9** から, 目的物 **10** を収量 119 mg (62.6%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.1 (s, 1H), 8.43 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 8.01 (dd, $J = 2.0$, 8.8 Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 1.6$, 7.6 Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 1.76-1.55 (m, 6H), 1.44-1.32 (m, 6H), 1.24-1.10 (m, 6H), 0.92-0.88 (m, 9H). MS (ESI) m/z 447.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6-Iodo-2-naphthaldehyde (11).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **10** から, 目的物 **11** を収量 68.5mg (91.2%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.2 (s, 1H), 8.31 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 7.97 (dd, $J = 1.6$, 8.4 Hz, 1H), 7.84 (dd, $J = 2.0$, 8.8 Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H). MS (ESI) m/z 283.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-(6-Iodonaphthalen-2-yl)ethanone (12).

化合物 **6** と同様の合成法により, 化合物 **11** から, 目的物 **12** を収量 15.2 mg (48.3%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.24 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.77 (dd, $J = 1.6$, 8.8 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.56

(d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 1.81 (s, 3H). MS (ESI) m/z 297.0 $[M+H]^+$.

6-Bromo-2-methylquinoxaline (14).

化合物 **13** (935 mg, 5.0 mmol) を EtOH (50 mL) に溶解し, Methylglyoxal (40% in H₂O) (450 μ L, 6.5 mmol) を加えた. 反応液を 50 °C で 1.5 時間攪拌した後, 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 710 mg (63.6%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.23 (dd, $J = 2.0, 20$ Hz, 1H), 7.91 (q, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.80 (ddd, $J = 2.0, 8.8, 14$ Hz, 1H), 2.78 (s, 3H). MS (ESI) m/z 223.0 $[M+H]^+$.

6-Bromo-2-quinoxalinecarboxaldehyde (15).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **14** から, 目的物 **15** を収量 324 mg (68.3%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.3 (s, 1H), 9.42 (d, $J = 2.0$, 1H), 8.43 (dd, $J = 2.4, 15.6$ Hz, 1H), 8.10 (q, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.99 (ddd, $J = 2.0, 9.2, 11.3$ Hz, 1H). MS (ESI) m/z 237.0 $[M+H]^+$.

1-(6-Bromoquinoxalin-2-yl)ethanone (16).

化合物 **6** と同様の合成法により, 化合物 **15** から, 目的物 **16** を収量 205 mg (97.0%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.73 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.77 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 2.77 (s, 3H). MS (ESI) m/z 251.0 $[M+H]^+$.

1-(6-(Tributylstannyl)quinoxalin-2-yl)ethanone (17).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **16** から, 目的物 **17** を収量 131 mg (69.2%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.72 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.78 (s, 3H), 1.66-1.55 (m, 6H), 1.37-1.34 (m, 6H), 1.18-1.11 (m, 6H), 0.90-0.87 (m, 9H). MS (ESI) m/z 463.2 $[M+H]^+$.

1-(6-Iodoquinoxalin-2-yl)ethanone (18).

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **17** から, 目的物 **18** を収量 26.8 mg (63.4%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.74 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.95 (dd, $J = 2.0, 8.8$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 2.77 (s, 3H). MS (ESI) m/z 299.0 $[M+H]^+$.

(2E)-3-(4-Nitrophenyl)prop-2-enal (20).

化合物 **19** (302 mg, 2.0 mmol) を THF (30 mL) に溶解し, (1,3-Dioxolan-2-yl)methyltriphenylphosphonium bromide (1.72 g, 4.0 mmol), 18-Crown-6 (触媒量), および NaH (192 mg, 8.0 mmol) を加え, 室温で 2 時間攪拌した. 6 N HCl 水溶液 (2.0 mL) を加えて加水分解した後, 1 N NaOH 水溶液 (12 mL) を加えて中和した. クロロホルム (50 mL \times 2) で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **20** を収量 185 mg (52.1%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.81 (q, *J* = 7.9 Hz, 1H).

(2*E*,4*E*)-5-(4-Nitrophenyl)penta-2,4-dienal (**21**).

化合物 **20** と同様の合成法により、化合物 **20** から、目的物 **21** を収量 146 mg (51.6%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.68 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.31-7.25 (m, 1H), 7.17-7.03 (m, 2H), 6.37 (q, *J* = 7.7 Hz, 1H).

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1-(2-iodopyridinyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (**22**, PYDP-3).

化合物 **3** (17.1 mg, 0.070 mmol)を EtOH/DMF = 4/1 の混合液(4.0 mL)に溶解し、(2*E*,4*E*)-5-(4-(Dimethylamino)phenyl)penta-2,4-dienal (14.0 mg, 0.070 mmol)を加え、氷冷下で 10 分間攪拌した。10% KOH 水溶液(1.5 mL)を加え、室温で 8 時間攪拌した。酢酸エチル(40 mL×2)で抽出し、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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **22** を収量 4.1 mg (13.6%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 11.2 Hz, 2H), 7.55 (dd, *J* = 2.0, 7.6 Hz, 1H), 7.10 (q, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.92-6.80 (m, 3H), 6.74 (dd, *J* = 9.2, 14.8 Hz, 1H), 3.01 (s, 6H). MS (EI) *m/z* 430.1 [M]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1-(6-iodoquinolinyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (**23**, QLDP-3).

化合物 **22** と同様の合成法により、化合物 **8** から、目的物 **23** を収量 8.0 mg (49.5%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.28 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.02 (dd, *J* = 2.0, 8.8 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.86 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 11.2, 15.2 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.92 (q, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.73-6.67 (m, 3H), 6.66-6.59 (m, 1H), 3.01 (s, 6H). MS (EI) *m/z* 480.1 [M]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1-(6-iodonaphthyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (**24**, NPDP-3).

化合物 **22** と同様の合成法により、化合物 **12** から、目的物 **24** を収量 1.7 mg (12.3%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.32 (dd, *J* = 3.2, 9.6 Hz, 2H), 6.72-6.65 (m, 6H), 6.61-6.52 (m, 2H), 6.48-6.31 (m, 2H), 6.14 (q, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.10 (s, 6H). MS (EI) *m/z* 479.1 [M]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-(Dimethylamino)phenyl)-1-(6-iodoquinoxaliny)hepta-2,4,6-trien-1-one (**25**, QXDP-3).

化合物 **22** と同様の合成法により、化合物 **18** から、目的物 **25** を収量 1.8 mg (8.4%)で得た。¹H NMR

(400 MHz, CDCl₃) δ 9.58 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.64 (d, *J* = 24.4 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 4.0, 8.8 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.00-6.94 (m, 1H), 6.81-6.78 (m, 2H), 6.69 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.61 (dd, *J* = 11.2, 14 Hz, 1H), 3.02 (s, 6H). MS (EI) *m/z* 481.1 [M]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(2-iodopyridinyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (26, PYNP-3).

化合物 **3** (21.4 mg, 0.087 mmol) を EtOH/DMF = 4/1 の混合液(4.0 mL) に溶解し, 化合物 **21** (17.6 mg, 0.087 mmol) を加え, 氷冷下で 10 分間攪拌した. 10% KOH 水溶液(200 μL) を加え, 室温で 48 時間攪拌した. 酢酸エチル(30 mL×2) で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2) で精製して目的物 **26** を収量 3.5 mg (9.4%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.88 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.85 (dd, *J* = 2.4, 8.4 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.58 (dd, *J* = 4.0, 9.2 Hz, 1H), 7.06 (q, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.99-6.83 (m, 3H), 6.70 (dd, *J* = 11.2, 14.8 Hz, 1H). MS (EI) *m/z* 432.0 [M]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(6-iodoquinolinyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (27, QLNP-3).

化合物 **26** と同様の合成法により, 化合物 **8** から, 目的物 **27** を収量 0.90 mg (17.0%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.31 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.26 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.99 (dd, *J* = 1.6, 8.0 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 9.2, 14.0 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.88 (q, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.68-6.60 (m, 3H), 6.60-6.56 (m, 1H). MS (EI) *m/z* 482.0 [M]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(6-iodonaphthyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (28, NPNP-3).

化合物 **26** と同様の合成法により, 化合物 **12** から, 目的物 **28** を収量 0.60 mg (4.6%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.52 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.38 (dd, *J* = 4.0, 8.8 Hz, 2H), 6.70-6.63 (m, 6H), 6.55-6.51 (m, 2H), 6.38-6.30 (m, 2H), 6.22 (q, *J* = 7.9 Hz, 1H). MS (EI) *m/z* 481.0 [M]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(6-iodoquinoxaliny)hepta-2,4,6-trien-1-one (29, QXNP-3).

化合物 **26** と同様の合成法により, 化合物 **18** から, 目的物 **29** を収量 1.3 mg (9.9%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.57 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.82 (dd, *J* = 2.4, 8.0 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.02-6.94 (m, 1H), 6.79-6.76 (m, 2H), 6.66 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.48 (dd, *J* = 4.0, 8.8 Hz, 1H). MS (EI) *m/z* 483.0 [M]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-iodophenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (30, PHNP-3).

化合物 **26** と同様の合成法により, 4-Iodoacetophenone から, 目的物 **30** を収量 6.7 mg (39.0%) で得

た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.86 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.52 (q, $J = 4.9$ Hz, 1H), 7.09-7.01 (m, 2H), 6.91-6.80 (m, 2H), 6.68 (dd, $J = 11.2, 14.0$ Hz, 1H). MS (EI) m/z 431.0 $[\text{M}]^+$.

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-bromophenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (31).

化合物 **26** と同様の合成法により, 4-Bromoacetophenone から, 目的物 **31** を収量 26.8 mg (65.1%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.53 (dd, $J = 3.6, 10.8$ Hz, 1H), 7.04 (dd, $J = 3.2, 14.8$ Hz, 2H), 6.85 (q, $J = 13.6$ Hz, 2H), 6.69 (dd, $J = 10.8, 14.8$ Hz, 1H). MS (ESI) m/z 384.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-(tributylstannyl)phenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (32).

化合物 **2** と同様の合成法により, 化合物 **31** から, 目的物 **32** を収量 6.0 mg (14.4%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.22 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.52 (dd, $J = 3.6, 11.6$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H), 7.06 (q, $J = 8.8$ Hz, 1H), 6.83 (q, $J = 13.6$ Hz, 2H), 6.72 (dd, $J = 3.2, 14.4$ Hz, 1H), 1.56-1.53 (m, 6H), 1.36-1.31 (m, 6H), 1.16-1.01 (m, 6H), 0.91-0.87 (m, 9H). MS (ESI) m/z 596.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

A β 凝集体の作製

第 2 章第 1 節と同様の方法を用いて行った.

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験

第 2 章第 1 節と同様の方法を用いて行った. 被験化合物としてカルコン類縁体(0.12 nM – 9.1 μM)を用いて, その添加量依存的に% Control が 50%未満まで低下した場合, IC_{50} および K_i 値を算出した. % Control が 50%未満まで低下しなかった場合, IC_{50} および K_i 値の算出は不可(N.D.)とした.

シヌクレイノパチー患者および AD 患者剖検脳組織切片を用いた蛍光染色実験

パラフィン包埋されたシヌクレイノパチー患者脳組織切片(69 歳男性, 6 μm)および AD 患者脳組織切片(76 歳男性, 6 μm)を, Xylene (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. カルコン類縁体の 50% EtOH 溶液 (30 μM)を添加し, 室温で 30 分間インキュベートした. 50% EtOH 溶液(30 s \times 1)および超純水(15 s \times 1)で洗浄後, 蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行った.

シヌクレイノパチー患者および AD 患者剖検脳組織切片を用いた免疫染色

蛍光染色実験で使用した同一切片を用いて, α -Syn および A β の免疫染色を行った. α -Syn の免疫染色における 1 次抗体には, 抗リン酸化 α -Syn モノクローナル抗体(pSyn#64, Wako)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)を用いた。蛍光染色実験後、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)および蟻酸処理(5 min)を行い、流水(5 min)およびPBS-Tween 20 (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-Tween 20 (5 min \times 3)で洗浄した。2次抗体には、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス)を用いて、室温で30分間反応させた後、PBS-Tween 20 (3 min \times 3)およびTBS (5 min \times 1)で洗浄した。その後、DAB溶液と室温で1分間反応させた。超純水(1 min \times 1)で洗浄し、顕微鏡で観察した。

[¹²⁵I]30 ([¹²⁵I]PHNP-3)の合成

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。標識前駆体として化合物**32**のEtOH溶液(1.0 mg/mL, 200 μ L)を用いた。

α -Syn 凝集体を用いた結合飽和実験

TBSを用いて α -Synが1.67 mg/mLの濃度になるように調製した。37 °C, 1,000 rpmで6日間インキュベートすることにより、 α -Syn凝集体溶液を作製した。 α -Syn凝集体(114 nM), 非標識体を加えて濃度調製した[¹²⁵I]30 ([¹²⁵I]PHNP-3) (0.39-800 nM)を10% EtOH水溶液中で室温下3時間インキュベートした。非特異的結合は**30** (PHNP-3) (2 μ M)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エネルギーをガンマカウンターで測定した。得られた結果から、GraphPad Prism 6.05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。

血漿中安定性評価

正常マウスとして5週齢、雄性のddYマウスを屠殺し、採血を行った。採取した血液は4,000 \times gで10分間遠心分離し、上清を回収することでマウス血漿を得た。[¹²⁵I]30 ([¹²⁵I]PHNP-3)の10% EtOH含有水溶液(370 kBq, 10 μ L)およびマウス血漿サンプル(200 μ L)を混合し、37 °Cで1時間インキュベートした。MeCN (400 μ L)を加えた後、4,000 \times gで5分間遠心分離した。上清を回収してナカライテスク株式会社製Cosmonice Filter (S) (0.45 μ m, 4 mm)で処理した後、逆相HPLCで分析した。

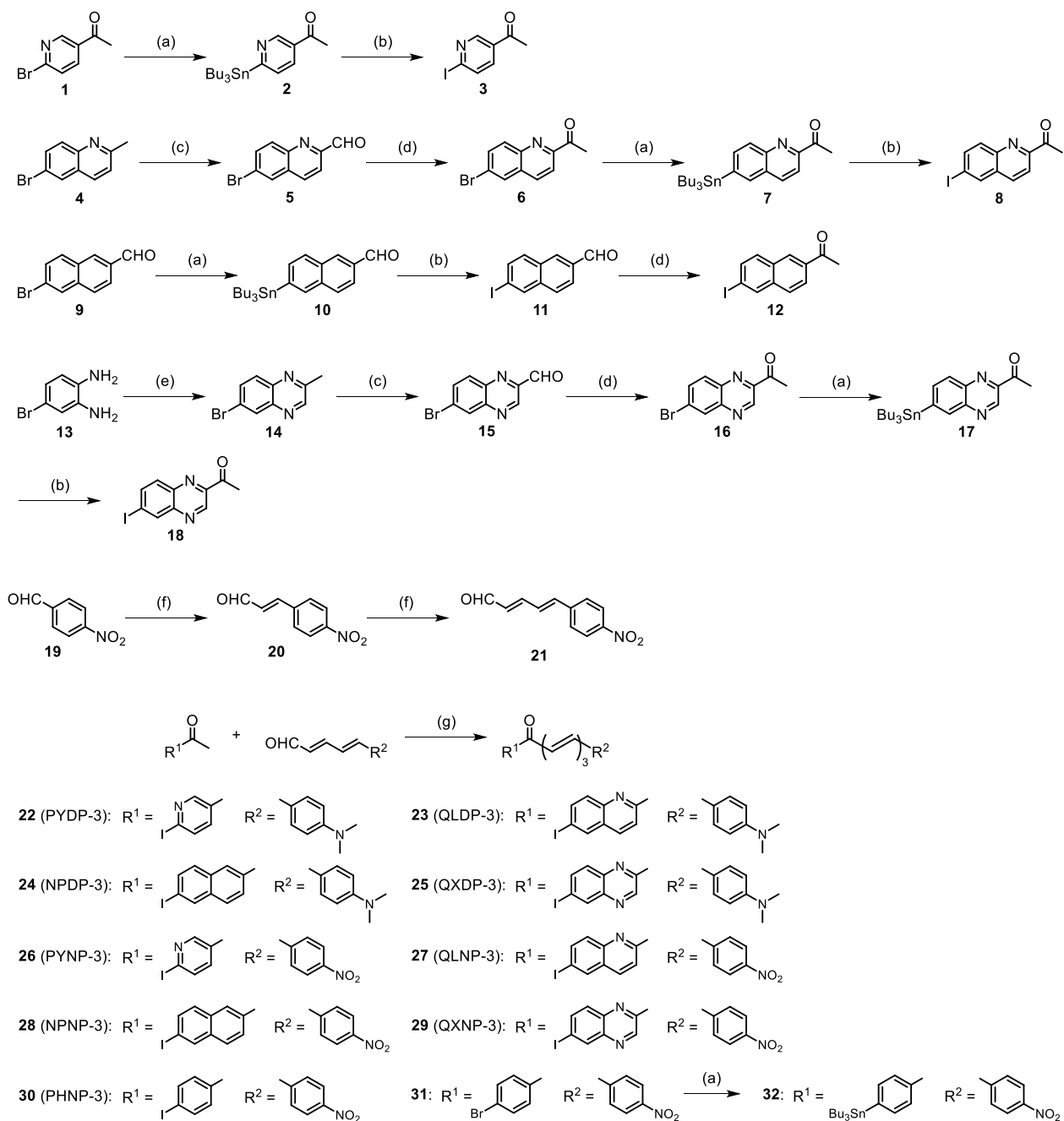
正常マウスを用いた体内放射能分布実験

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。¹²⁵I標識体(18.5 kBq, 100 μ L)を尾静脈より投与した。

2.2.2. 結果と考察

カルコン類縁体の合成

Scheme 2-3 にカルコン類縁体の合成経路を示す。各出発物質より、メチル基、アルデヒド基の酸化反応、臭素のトリブチルスズ化、およびスズ-ヨウ素交換反応を含む 2-5 工程を経て 4-Iodoaryl ethanone (**3**, **8**, **12**, および **18**) を収率 10.3-27.6% で得た。化合物 **21** は連続する Wittig 反応⁷⁹ により合成した。4-Iodoaryl ethanone と 5-(4-Dimethylaminophenyl)penta-2,4-dienal または化合物 **21** との間の Claisen-Schmidt 縮合反応^{80, 81} により、最終化合物(**22-30**) を総収率 1.3-39% で得た。同様に化合物 **30** に対応するブロモ体(**31**) を得た後、ビストリブチルスズと反応させることで ¹²⁵I 標識反応の標識前駆体(**32**) を得た。



Reagents and conditions: (a) (Bu₃Sn)₂, Pd(PPh₃)₄, 1,4-Dioxane, Et₃N, reflux, 95 °C; (b) I₂, CHCl₃, rt; (c) SeO₂, 1,4-Dioxane, reflux, 100 °C; (d) Nitromethane, 1,1,3,3-Tetramethylguanidine, Toluene, 110 °C; (e) Methylglyoxal (40% in H₂O), EtOH, reflux, 50 °C; (f) (1) (1,3-Dioxolan-2-yl)methyltriphenylphosphonium bromide, 18-Crown-6, NaH, THF, rt., (2) 6 N HCl aq., THF, rt.; (g) 10% KOH, EtOH, DMF, rt.

Scheme 2-3. Synthetic routes for chalcone analogues.

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験を行い、得られた阻害曲線より算出した K_i 値を Table 2-4 に示す。置換基 R^1 として Iodopyridyl 基, Iodoquinolinyl 基, Iodonaphthyl 基, または Iodoquinoxaliny 基を, 置換基 R^2 として 4-(Dimethylamino)phenyl 基を導入したカルコン類縁体(**22** (PYDP-3), **23** (QLDP-3), **24** (NPDP-3), および **25** (QXDP-3))は IDP-3 と同様, α -Syn 凝集体上において ThT とよく競合し, α -Syn 凝集体への高い結合親和性($K_i = 0.49-0.68$ nM)を示した。さらに, 既存の α -Syn イメージングプローブである Phenothiazine 誘導体 SIL23 ($K_i = 57.9$ nM) および 3-(Benzylidene)indolin-2-one 誘導体 WC58a ($K_i = 2.1$ nM)と比較しても優れた結合親和性を示すことが示唆された^{57, 62}。 **22** (PYDP-3), **23** (QLDP-3), **24** (NPDP-3), および **25** (QXDP-3)の A β 凝集体に対する結合親和性を同様に評価した結果, これらのカルコン類縁体は A β 凝集体上においても ThT とよく競合し, A β 凝集体に対する K_i 値(1.1-25 nM)に顕著な相違を認めた。また, α -Syn 凝集体および A β 凝集体に対する K_i 値の比においても顕著な相違を認めたことから(2.2-42), カルコン類縁体構造に置換基 R^1 として導入したアリール置換基の種類に依存して, A β 凝集体に対する結合親和性および α -Syn 凝集体に対する結合選択性が変化することが示唆された。

置換基 R^1 として Iodopyridyl 基, Iodoquinolinyl 基, Iodonaphthyl 基, Iodoquinoxaliny 基, または Iodophenyl 基を, 置換基 R^2 として 4-Nitrophenyl 基を導入したカルコン類縁体(**26** (PYNP-3), **27** (QLNP-3), **28** (NPNP-3), **29** (QXNP-3), および **30** (PHNP-3))は, **22** (PYDP-3), **23** (QLDP-3), **24** (NPDP-3), および **25** (QXDP-3)と同様, α -Syn 凝集体上において ThT とよく競合し, 置換基 R^1 として導入したアリール置換基の種類に依存して, α -Syn 凝集体に対する K_i 値に相違が認められたことから(0.52-13 nM), 置換基 R^1 の種類が, α -Syn 凝集体への結合親和性に寄与することが示唆された。一方, これらのカルコン類縁体は, A β 凝集体上において ThT と競合せず, A β 凝集体に対する K_i 値は算出不可となったことから, カルコン類縁体構造に置換基 R^2 として導入した 4-Nitrophenyl 基が, A β 凝集体への結合性低下, およびそれに伴う α -Syn 凝集体に対する優れた結合選択性に寄与することが示された。

以上の結果より, カルコン類縁体構造に導入されたアリール置換基が, α -Syn 凝集体に対する結合親和性および結合選択性のいずれにも寄与することが示された。A β 凝集体と同様^{82, 83}, α -Syn 凝集体上には低分子化合物に対して複数の結合部位が存在することが最近報告されており^{77, 84}, α -Syn 凝集体への高い結合選択性を示した既存プローブは, その中で特定の結合部位を選択的に認識することが示唆されている。その結合部位は, α -Syn 凝集体上の他の結合部位と比較して, 極性の高いアミノ酸残基から構成される点を特徴として有していた。一方, A β 凝集体上に存在する結合部位は極性の低いアミノ酸残基から構成されることが一般に知られている。したがって, 4-(Dimethylamino)phenyl 基と比較して極性の高い 4-Nitrophenyl 基を置換基 R^2 として導入したことで, α -Syn 凝集体上の特定の結合部位に対する結合選択性が向上し, A β 凝集体に対する α -Syn 凝集体への高い結合選択性が生じた可能性が考えられた。実際, α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示した複数の既存 α -Syn イメージングプローブには化学構造式中に Nitrophenyl 基が認められる

一方、A β イメージングプローブとして有用性が報告されているものには Nitrophenyl 基を有するものが存在せず^{49, 52}。この点からも、4-Nitrophenyl 基の導入が α -Syn 凝集体への高い結合選択性をもたらす重要な因子である可能性が考えられたものの、詳細は不明である。

Table 2-4. Comparison of binding affinity of chalcone analogues for α -Syn and A β aggregates.

Compound	K_i (nM) ^a		Ratio (A β / α -Syn)
	α -Syn	A β	
22 (PYDP-3)	0.49 \pm 0.13	1.1 \pm 0.7	2.2
23 (QLDP-3)	0.52 \pm 0.08	5.5 \pm 3.2	11
24 (NPDP-3)	0.68 \pm 0.15	9.9 \pm 7.2	14
25 (QXDP-3)	0.59 \pm 0.07	25 \pm 16	42
IDP-3	1.7 \pm 0.8	1.1 \pm 0.6	0.7
26 (PYNP-3)	0.84 \pm 0.05	N.D.	N.D.
27 (QLNP-3)	13 \pm 1.6	N.D.	N.D.
28 (NPNP-3)	5.4 \pm 0.6	N.D.	N.D.
29 (QXNP-3)	2.9 \pm 0.2	N.D.	N.D.
30 (PHNP-3)	0.52 \pm 0.06	N.D.	N.D.

^aValues are the means \pm standard errors of three independent experiments.

シヌクレイノパチー患者および AD 患者剖検脳組織切片を用いた蛍光染色実験

ヒト脳内に蓄積するタンパク質凝集体に対するプローブの結合親和性を評価するため、患者脳組織切片を用いた蛍光染色実験を行った。置換基 R²として 4-(Dimethylamino)phenyl 基を導入したカルコン類縁体の結合特性を評価した結果を Figure 2-7 に示す。シヌクレイノパチー患者脳組織切片上において、**22** (PYDP-3), **23** (QLDP-3), **24** (NPDP-3), および **25** (QXDP-3)由来の蛍光スポットが観察された(Figure 2-7A, C, E, G)。さらに同一切片において、蛍光染色陽性部位と抗リン酸化 α -Syn 抗体による免疫染色陽性部位が一致したことから(Figure 2-7B, D, F, H), これらカルコン類縁体がシヌクレイノパチー患者脳内に蓄積した α -Syn 凝集体に対して結合親和性を有することが示された。また、AD 患者脳組織切片を用いた蛍光染色実験および同一切片を用いた抗 A β 抗体による免疫染色を行った。その結果、**22** (PYDP-3), **23** (QLDP-3), **24** (NPDP-3), および **25** (QXDP-3)由来の蛍光スポットが免疫染色における A β 陽性部位と一致したことから(Figure 2-7I-P), これらカルコン類縁体が AD 患者脳内に蓄積した A β 凝集体に対しても結合親和性を有することが示された。これらの結果は、**22** (PYDP-3), **23** (QLDP-3), **24** (NPDP-3), および **25** (QXDP-3)において α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示し、A β 凝集体への結合親和性が認められた競合阻害実験の結果と相関することが明らかとなった。

次に、置換基 R²として 4-Nitrophenyl 基を導入したカルコン類縁体について同様に結合特性を評価した。その結果を Figure 2-8 に示す。シヌクレイノパチー患者脳組織切片において、**26** (PYNP-3), **27** (QLNP-3), **28** (NPNP-3), **29** (QXNP-3), および **30** (PHNP-3)由来の蛍光スポットが観察された(Figure 2-8A, C, E, G, I)。さらに同一切片において、蛍光染色陽性部位と抗リン酸化 α -Syn 抗体による免疫染色陽性部位が一致したことから(Figure 2-8B, D, F, H, J), これらカルコン類縁体がシヌクレイノパチー患者脳内に蓄積した α -Syn 凝集体に対して結合親和性を有することが示された。一方, AD 患者脳組織切片において、免疫染色における A β 陽性部位に **26** (PYNP-3), **27** (QLNP-3), **28** (NPNP-3), **29** (QXNP-3), および **30** (PHNP-3)由来の蛍光スポットが認められなかったことから(Figure 2-8K-T), これらカルコン類縁体は AD 患者脳内に蓄積した A β 凝集体に対して結合性を有さないことが示唆された。これらの結果においても、**26** (PYNP-3), **27** (QLNP-3), **28** (NPNP-3), **29** (QXNP-3), および **30** (PHNP-3)が A β 凝集体への結合性を示さなかったという競合阻害実験の結果とよく相関した。

以上の結果より、競合阻害実験の結果と相関して、カルコン類縁体構造への 4-Nitrophenyl 基の導入が、 α -Syn 凝集体への高い結合選択性をもたらす重要な因子である可能性が示された。競合阻害実験および蛍光染色実験において、**30** (PHNP-3)が α -Syn 凝集体への結合親和性および結合選択性の両面で最も優れた結果を示したことから、本プローブについてさらなる評価を行った。

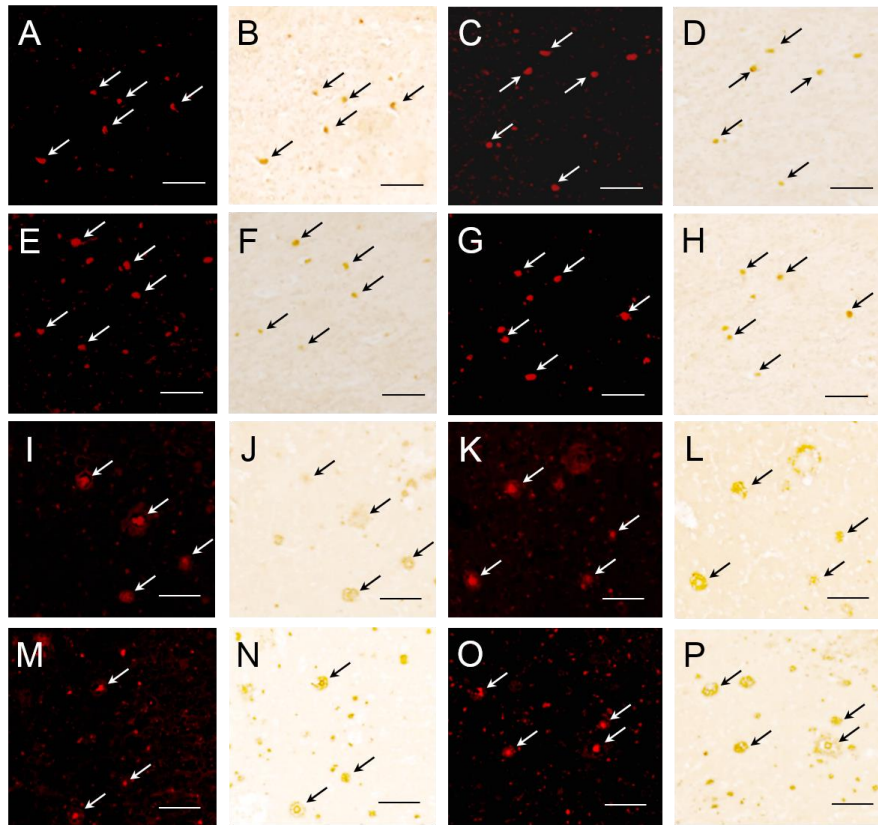


Figure 2-7. Fluorescence staining of **22** (PYDP-3), **23** (QLDP-3), **24** (NPDP-3), and **25** (QXDP-3) in basal ganglia sections from a synucleinopathy patient (A, C, E, and G, respectively) or frontal lobe sections from an AD patient (I, K, M, and O, respectively). Immunohistochemical staining of the same sections for A, C, E, G, I, K, M, and O with an antibody against α -Syn (B, D, F, and H, respectively) or A β (J, L, N, and P, respectively). Scale bars indicate 100 μ m.

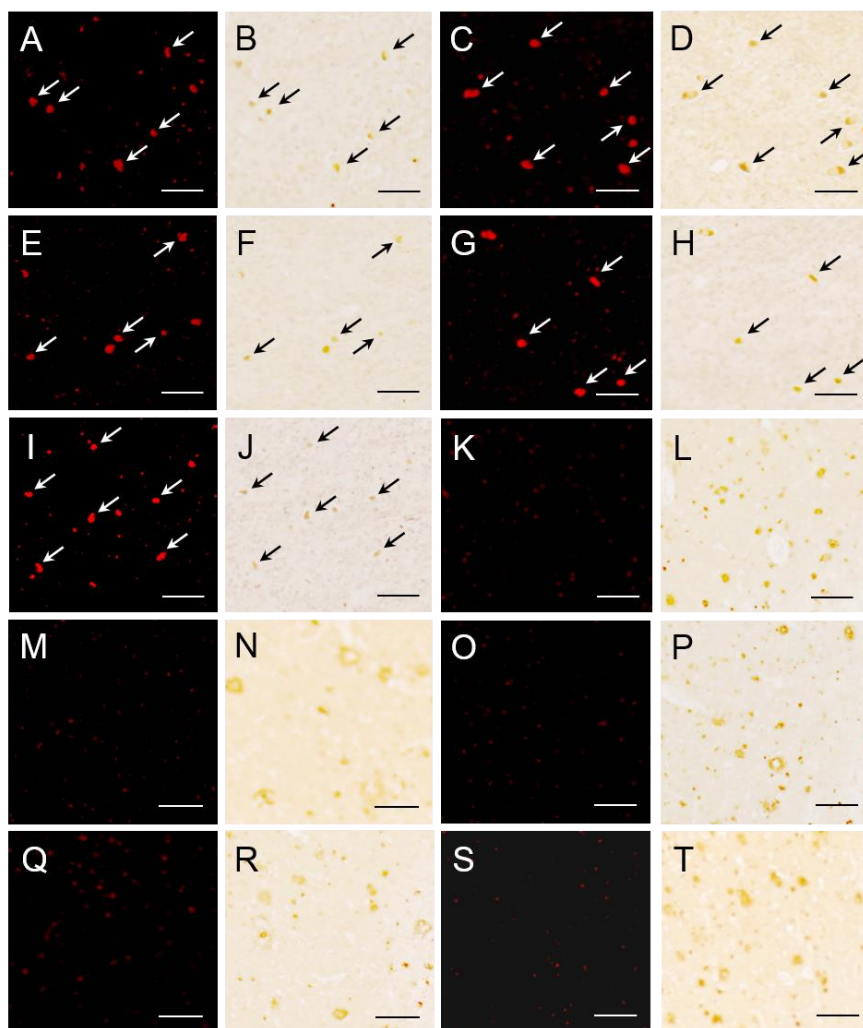
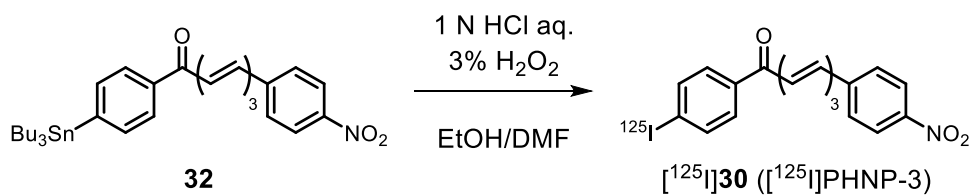


Figure 2-8. Fluorescence staining of **26** (PYNP-3), **27** (QLNP-3), **28** (NPNP-3), **29** (QXNP-3), and **30** (PHNP-3) in basal ganglia sections from a synucleinopathy patient (A, C, E, G, and I, respectively) or frontal lobe sections from an AD patient (K, M, O, Q, and S, respectively). Immunohistochemical staining of the same sections for A, C, E, G, I, K, M, O, Q, and S with an antibody against α -Syn (B, D, F, H, and J, respectively) or A β (L, N, P, R, and T, respectively). Scale bars indicate 100 μ m.

$[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)の合成

Scheme 2-4 に $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)の ^{125}I 標識経路を示す。1 N HCl 水溶液および3% H_2O_2 水溶液存在下での $[^{125}\text{I}]\text{NaI}$ によるヨウ素化を経て放射化学的収率25%、放射化学的純度95%以上で得た。



Scheme 2-4. ^{125}I -Labeling of $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$).

α -Syn 凝集体を用いた結合飽和実験

$[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)の α -Syn 凝集体への結合親和性をさらに検証するため、結合飽和実験を行った。その結果を Figure 2-9 に示す。 α -Syn 凝集体に結合した放射能から $\mathbf{30}$ (PHNP-3)の物質量を計算し、得られた結合飽和曲線より算出した α -Syn 凝集体に対する K_d 値は 6.9 ± 2.3 nM, B_{\max} は 9.5 ± 3.5 pmol/nmol protein となり、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)は α -Syn 凝集体に対して高い結合親和性を示すことを認めた。さらに、同様の実験により評価されている既存の α -Syn イメージングプローブ($K_d = 8.9$ nM ($[^{18}\text{F}]\text{WC58a}$)⁵⁷, 3.3 nM ($[^{18}\text{F}]\text{2FBox}$)⁵⁸, 1.1 nM ($[^{125}\text{I}]\mathbf{61}$)⁵⁹)と同程度の K_d 値を示したことから、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)は競合阻害実験の結果と相関して α -Syn 凝集体への優れた結合親和性を示すことが明らかとなった。

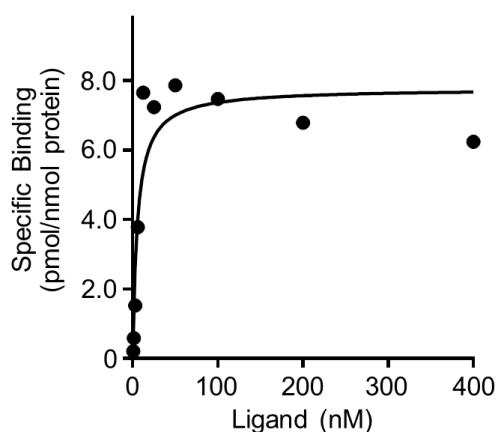


Figure 2-9. Saturation curve of $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$) for α -Syn aggregates.

血漿中安定性評価

$[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)の安定性を評価するために、マウス血漿中における安定性を評価した。その結果を Figure 2-10 に示す。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)をマウス血漿中で1時間インキュベートした後においても95%以上が未変化体のまま存在したため、本プローブはマウス血漿中において安定であることが示された。

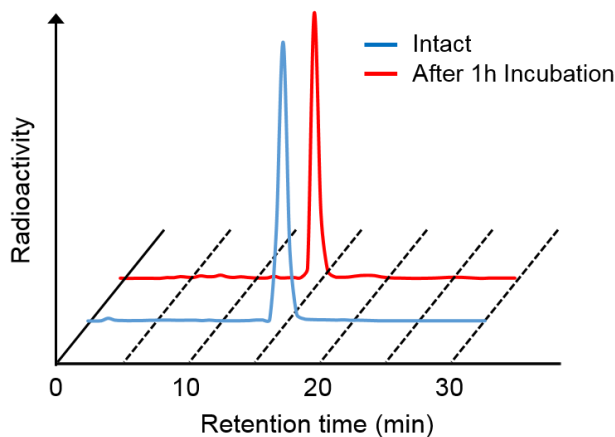


Figure 2-10. HPLC profiles of $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$) before and after incubation for 1 h in mouse plasma.

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

$[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)の体内動態を評価するため、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 2-11 および Table 2-5 に示す。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)は投与 2 分後における脳内放射能量が 0.78% ID/g と、生体での $\alpha\text{-Syn}$ イメージングを行う上で十分な脳移行性を示さず、血液では高い放射能滞留が認められた(28.9% ID/g)。これは $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)の高い脂溶性(Calculated LogP: CLog P = 5.62)が血漿タンパク質への結合率を高め、プローブの BBB 透過を妨げるためと考えられた^{85, 86}。脂溶性に加え、分子量(431 Da)が大きいことも BBB 透過性の低さの一因と考えられた⁴⁴。一方、*ex vivo* ARG 実験において生体内の $\alpha\text{-Syn}$ 凝集体を検出した $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}\text{FBox}$ (0.47% ID/g)⁵⁸と比較すると、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)は同等以上の脳移行性を示すことを認めた。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)が $\alpha\text{-Syn}$ 凝集体への優れた結合親和性($K_d = 6.9$ nM)および結合選択性を示した点を考慮すると、本プローブが $\alpha\text{-Syn}$ イメージングプローブの開発に向けた有用なリード化合物となり得ることが示された。他臓器における放射能集積量を評価した結果、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$)は脂溶性化合物に典型的な肝臓への初期移行性および経時的な腸への集積性を示した。また、甲状腺への顕著な集積は認められなかったことから(投与 60 分後で 0.08% ID)、生体における脱ヨウ素化は生じないことが示唆された。

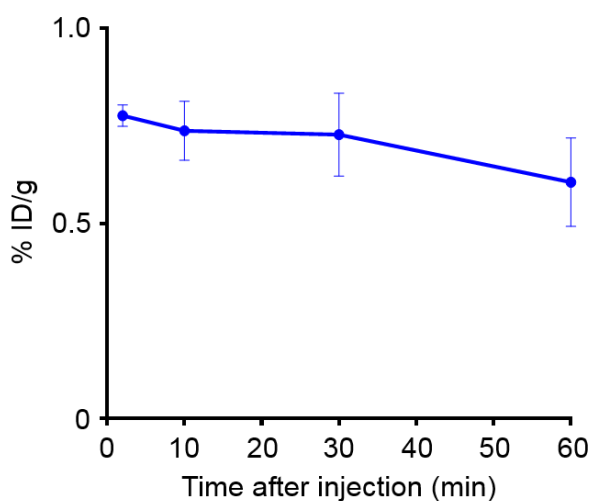


Figure 2-11. Brain uptake and clearance after intravenous injection of $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$) into normal mice (male, n = 5).

Table 2-5. Biodistribution of $[^{125}\text{I}]\mathbf{30}$ ($[^{125}\text{I}]\text{PHNP-3}$) in normal mice.^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
Blood	28.9 (2.52)	20.4 (1.58)	15.1 (2.19)	12.4 (1.60)
Spleen	4.73 (0.71)	4.48 (0.48)	4.51 (0.53)	4.81 (0.81)
Pancreas	2.01 (0.45)	2.31 (0.31)	2.00 (0.27)	1.85 (0.28)
Stomach ^b	0.57 (0.14)	0.70 (0.17)	1.04 (0.57)	1.01 (0.49)

Intestine	0.93 (0.08)	1.56 (0.28)	2.45 (0.48)	3.86 (0.51)
Kidney	6.94 (0.52)	5.89 (0.24)	4.65 (0.67)	4.56 (0.64)
Liver	16.4 (8.15)	15.5 (1.31)	12.5 (1.43)	11.5 (1.34)
Heart	8.72 (1.29)	6.41 (0.50)	4.61 (0.48)	3.87 (0.75)
Lung	17.2 (0.82)	11.3 (0.93)	9.21 (0.30)	7.95 (1.82)
Brain	0.78 (0.03)	0.74 (0.08)	0.73 (0.11)	0.61 (0.11)
Thyroid ^b	0.07 (0.03)	0.07 (0.03)	0.08 (0.02)	0.08 (0.02)

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

^bExpressed as % ID.

2.2.3. 小括

本節において、第2章第1節のスクリーニングで見出したカルコン類縁体 IDP-3 をリード化合物として選択した。カルコン類縁体構造に種々のアリール置換基を導入することで、計9種の^{123/125}I標識カルコン類縁体を設計した。 α -Syn凝集体への結合親和性および結合選択性に関する構造活性相関を検討し、以下に述べる結果を得た。

- (1) 置換基 R¹として Iodopyridyl 基, Iodoquinolinyl 基, Iodonaphthyl 基, または Iodoquinoxalinylyl 基を, 置換基 R²として 4-(Dimethylamino)phenyl 基または 4-Nitrophenyl 基を導入した種々のカルコン類縁体を合成した。
- (2) ThT を競合リガンドとした競合阻害実験において、置換基 R¹および R²として導入されたアリール置換基の種類に依存して、 α -Syn 凝集体への結合親和性および結合選択性に相違が認められた。置換基 R²として 4-(Dimethylamino)phenyl 基を導入したカルコン類縁体は、 α -Syn 凝集体および A β 凝集体いずれに対しても結合親和性を示した一方、置換基 R²として 4-Nitrophenyl 基を導入したカルコン類縁体は、A β 凝集体に対する結合性を示さず、 α -Syn 凝集体への高い結合親和性および結合選択性を示した。特に、**30** (PHNP-3)は α -Syn 凝集体への優れた結合親和性および結合選択性を示した。
- (3) 患者脳組織切片を用いた蛍光染色実験において、置換基 R²として 4-(Dimethylamino)phenyl 基を導入したカルコン類縁体は、シヌクレイノパチー患者脳組織切片上の α -Syn 凝集体および AD 患者脳組織切片上の A β 凝集体のいずれも明瞭に検出した。一方、置換基 R²として 4-Nitrophenyl 基を導入したカルコン類縁体は、AD 患者脳組織切片上の A β 凝集体を検出せず、シヌクレイノパチー患者脳組織切片上の α -Syn 凝集体を選択的かつ明瞭に検出した。
- (4) スズ標識前駆体を用いた ¹²⁵I 標識反応により得られた [¹²⁵I]**30** ([¹²⁵I]PHNP-3)は、マウス血漿中で安定に存在したものの、 α -Syn 凝集体の生体イメージングを行う上で十分なマウス脳移行性を示さなかった。

以上の結果より、マウス脳移行性に課題を有するものの、 α -Syn 凝集体への結合親和性および結合選択性に優れるカルコン類縁体 [^{123/125}I]**30** ([^{123/125}I]PHNP-3)が、 α -Syn イメージングプローブの開発に向けた有望なリード化合物となり得ることが示された。

第3節

カルコン類縁体を基盤とした

陽電子断層撮像用 α -Synイメージングプローブの開発

第1項 脳内挙動の改善を目的とした ^{18}F 標識カルコン類縁体の開発

第2章第2節において、 $[^{123/125}\text{I}]\text{PHNP-3}$ は α -Syn凝集体への優れた結合親和性および結合選択性を示し、既存プローブやBQ誘導体に認められた課題の克服に成功した。一方、 $[^{123/125}\text{I}]\text{PHNP-3}$ の Maus 脳移行性は低値を示したことから、脳内挙動の改善が求められた¹⁹。

本課題の克服にあたり、計算科学的手法として Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) アルゴリズムを用いることで、Maus における脳内挙動を改善する合理的な分子設計が可能になると考えた。CNS MPO アルゴリズムは、低分子化合物を基盤とした中枢標的薬の開発研究において、化合物の脳移行性を予測する上で広く利用される。脂溶性(CLogP, Calculated LogD: CLogD)、分子量(Molecular weight: MW)、極性表面積(Topological polar surface area: TPSA)、水素結合供与基数(Hydrogen bond donor: HBD)、酸解離定数(pKa)の6種の物理化学的パラメーター毎に異なる関数を用いて0-1の範囲で換算され、各パラメーターに対する換算値の合計をCNS MPO scoreとして0-6で表す(Figure 2-12)^{87, 88}。中枢を標的とした薬剤開発における過去の知見により、一般に4以上のCNS MPO scoreを示す化合物は良好なBBB透過性を示すことが知られている⁸⁹⁻⁹⁴。

前節で見出した $[^{123/125}\text{I}]\text{PHNP-3}$ は、その低い脳移行性と相関して4未満のCNS MPO scoreを示した。そこで、CNS MPO scoreを4以上に向上させるよう、 $[^{123/125}\text{I}]\text{PHNP-3}$ をリード化合物としたさらなる構造改変を行うことで、脳移行性に優れる α -Synイメージングプローブの開発を計画した。本プローブにおける $^{123/125}\text{I}$ の導入が分子全体の脂溶性および分子量の大幅な増大、すなわち、CNS MPO scoreの低下に寄与していたと考え、脂溶性・分子量の低減とそれに伴うCNS MPO scoreの増大を企図し、 $^{123/125}\text{I}$ の代わりにPET用核種である ^{18}F を導入することとした。また、 $[^{123/125}\text{I}]\text{PHNP-3}$ に認められた α -Syn凝集体への良好な結合性を保持するため、他の部位の化学構造は保存することとし、新規カルコン類縁体 $[^{18}\text{F}]\text{FPHNP-3}$ を設計・合成した。さらに、フッ素原子およびニトロ原子団の導入位置が α -Syn凝集体への結合性に影響を及ぼすかどうかを検証するため、それぞれを芳香環上の異なる位置に導入した種々のカルコン類縁体を設計・合成した(Figure 2-13)。これらカルコン類縁体の α -Syn凝集体への結合性およびMausにおける脳内挙動の2点に着目し、PET用 α -Synイメージングプローブとしての有用性を第2章第2節と同様の方法を用いて評価した。

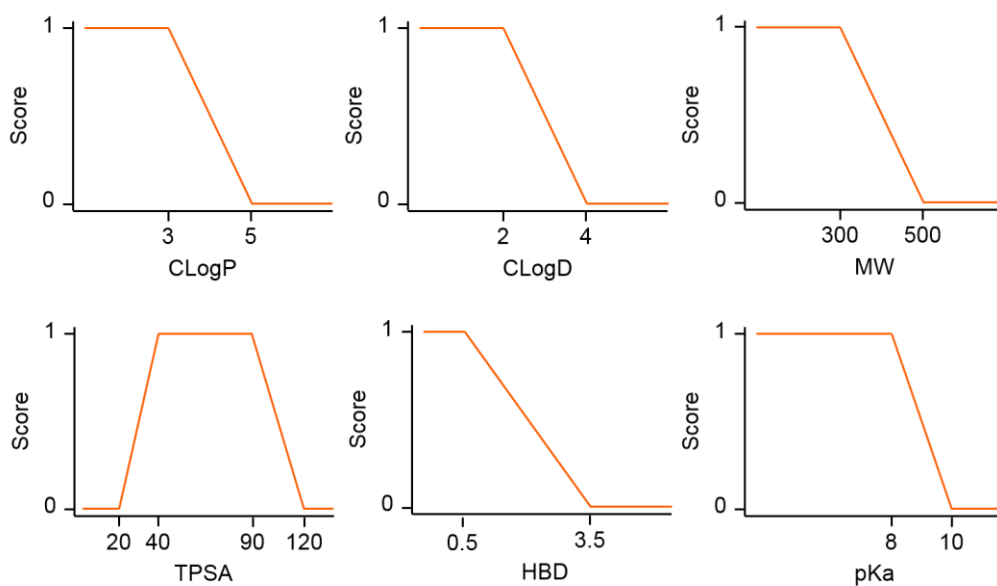


Figure 2-12. Physicochemical property desirability functions used to generate the CNS MPO score.

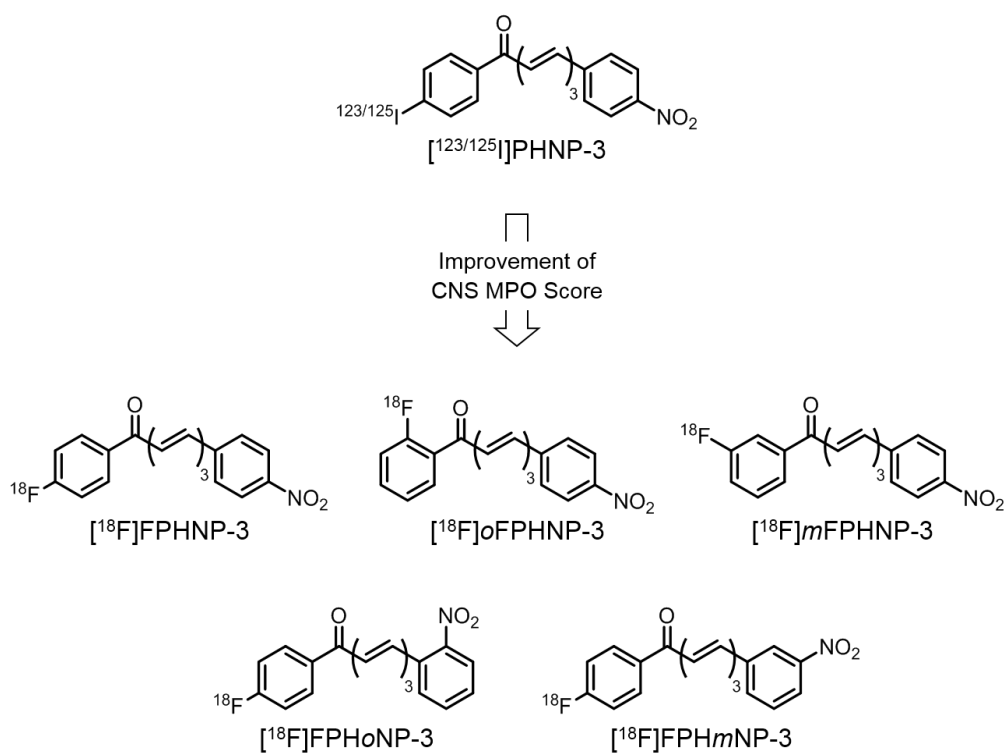


Figure 2-13. Design and chemical structures of ^{18}F -labeled chalcone analogues

2.3.1. 実験方法

試薬・機器

第2章第2節と同じ試薬・機器を使用した。

動物

第1章第1節と同様に、購入・飼育した。C57BL/6J マウスは日本エスエルシー株式会社より購入した。PET/CT 撮像のため、イソフルラン麻酔下(2%), α -Syn 凝集体(228 pmol, 2 μ L)および PBS (2 μ L) を C57BL/6J マウスの左右の線条体(stereotaxic coordinates: 2.3 mm lateral to the midline, 0.8 mm posterior to the bregma, and 3.5 mm below the skull)にそれぞれ接種した。

CNS MPO score の算出

化合物の化学構造式を基に、Optibrium 社製 StarDrop を用いて算出した。

カルコン類縁体の合成

(2E)-3-(2-Nitrophenyl)prop-2-enal (5).

化合物 **2** (302 mg, 2.0 mmol) を Toluene (30 mL) に溶解し, (1,3-Dioxolan-2-yl)methyltriphenylphosphonium bromide (1.29 g, 3.0 mmol), 18-Crown-6 (触媒量), および K_2CO_3 (415 mg, 3.0 mmol)を加え, 100 °C で 15.5 時間攪拌した。クロロホルム(50 mL \times 2)で抽出し, 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 THF (10 mL)に溶解し, 6 N HCl 水溶液(1.0 mL)を加えて加水分解した後, 1 N NaOH 水溶液(6.0 mL)を加えて中和した。クロロホルム(40 mL \times 2)で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2)で精製して目的物 **5** を収量 80 mg (22.6%)で得た。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.72 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.52 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.60 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 8.4 Hz, 1H).

(2E)-3-(3-Nitrophenyl)prop-2-enal (6).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **3** から, 目的物 **6** を収量 22 mg (33.9%)で得た。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.78 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.43 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 8.30 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.66 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 16 Hz, 1H).

(2E,4E)-5-(2-Nitrophenyl)penta-2,4-dienal (8).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **5** から, 目的物 **8** を収量 56.8 mg (93.6%)で得た。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.67 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.65 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 4.4, 10.8 Hz, 1H), 6.97 (dd, J =

4.4, 10.8 Hz, 1H), 6.33 (dd, $J = 8.0, 15.6$ Hz, 1H).

(2E,4E)-5-(3-Nitrophenyl)penta-2,4-dienal (9).

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **6** から, 目的物 **9** を収量 20 mg (78.7%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.68 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 8.35 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.58 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 7.11 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 6.36 (dd, $J = 7.2, 16$ Hz, 1H).

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-fluorophenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (10, FPHNP-3).

化合物 **7** (26.0 mg, 0.13 mmol) を EtOH/DMF = 4/1 の混合液(5.0 mL) に溶解し, 4-Fluoroacetophenone (17.6 mg, 0.13 mmol) を加え, 氷冷下で 10 分間攪拌した. 10% KOH 水溶液(200 μL) を加え, 室温で 12 時間攪拌した. 酢酸エチル(30 mL \times 2) で抽出し, 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 (酢酸エチル/ヘキサン = 1/4) で精製して目的物 **10** を収量 23.4 mg (56.7%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.94 (dd, $J = 5.5, 8.5$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.47-7.42 (m, 1H), 7.10 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.01-6.96 (m, 2H), 6.82-6.73 (m, 2H), 6.62 (dd, $J = 11.5, 14.5$ Hz, 1H). MS (ESI) m/z 324.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(2-fluorophenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (11, oFPHNP-3).

化合物 **7** (8.8 mg, 0.064 mmol) を EtOH/DMF = 4/1 の混合液(4.0 mL) に溶解し, 2-Fluoroacetophenone (25.9 mg, 0.13 mmol) を加え, 氷冷下で 10 分間攪拌した. 10% KOH 水溶液(150 μL) を加え, 室温で 16 時間攪拌した. 酢酸エチル(30 mL \times 2) で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/2) で精製して目的物 **11** を収量 15.2 mg (73.8%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.19 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.78 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.53-7.42 (m, 3H), 7.03 (dd, $J = 8.5, 10$ Hz, 1H), 7.06-7.00 (m, 1H), 6.93 (dd, $J = 2.5, 15$ Hz, 1H), 6.85-6.76 (m, 2H), 6.66 (dd, $J = 11.5, 14.5$ Hz, 1H). MS (ESI) m/z 324.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(3-fluorophenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (12, mFPHNP-3).

化合物 **7** (6.5 mg, 0.047 mmol) を EtOH/DMF = 4/1 の混合液(4.0 mL) に溶解し, 3-Fluoroacetophenone (19.1 mg, 0.094 mmol) を加え, 氷冷下で 10 分間攪拌した. 10% KOH 水溶液(150 μL) を加え, 室温で 16 時間攪拌した. 酢酸エチル(30 mL \times 2) で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/4) で精製して目的物 **12** を収量 11.7 mg (77.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.92 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.52 (dd, $J = 2.0, 7.2$ Hz, 1H), 7.10-6.99 (m, 2H), 6.87-6.80 (m, 2H), 6.60 (dd, $J = 4.0, 11.2$ Hz, 1H). MS (ESI) m/z 324.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

(2E,4E,6E)-7-(2-Nitrophenyl)-1-(4-fluorophenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (13, FPHoNP-3).

化合物 **10** と同様の合成法により, 化合物 **8** から, 目的物 **13** を収量 9.4 mg (52.0%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.68 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.48-7.39 (m, 2H), 7.22 (dd, $J = 2.5, 8.5$ Hz, 1H), 7.02-6.95 (m, 2H), 6.83-6.74 (m, 2H), 6.62 (dd, $J = 11.5, 14.5$ Hz, 1H). MS (ESI) m/z 324.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(2E,4E,6E)-7-(3-Nitrophenyl)-1-(4-fluorophenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (14, FPHmNP-3).

化合物 **10** と同様の合成法により, 化合物 **9** から, 目的物 **14** を収量 3.9 mg (24.6%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J = 5.5, 8.5$ Hz, 2H), 7.64 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.39-7.35 (m, 1H), 7.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.02-6.97 (m, 2H), 6.91-6.78 (m, 2H), 6.53 (t, $J = 11.5$ Hz, 1H). MS (ESI) m/z 324.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-(4-(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)ethanone (15).

4-Iodoacetophenone (123 mg, 0.50 mmol) を DMSO (20 mL) に溶解し, Bis(pinacolate)diboron (140 mg, 0.55 mmol), KOAc (147 mg, 1.5 mmol), および Pd(dppf) Cl_2 (57.2 mg, 0.070 mmol) を加えた. 反応液を 80 °C で 2 時間攪拌した後, 酢酸エチル(30 mL \times 2) で抽出し, 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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/4) で精製して目的物 **15** を収量 38.3 mg (31.1%) で得た. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (q, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.62 (s, 3H), 1.36 (s, 12H). MS (ESI) m/z 247.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

A β 凝集体の作製

第 2 章第 1 節と同様の方法を用いて行った.

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験

第 2 章第 2 節と同様の方法を用いて行った.

[^{18}F]**10** ([^{18}F]FPHNP-3) の合成

第 1 章第 2 節と同様の方法を用いて ^{18}F 含有溶液を共沸脱水した. 標識前駆体 **15** (1.0 mg) が入ったバイアルに, DMF (200 μL) に溶解した ^{18}F および $\text{Cu}(\text{OTf})_2(\text{py})_4$ を加え, 110 °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(200 μL) に溶解し, 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 (MeCN/ H_2O) を用いて [^{18}F]4-Fluoroacetophenon を精製した. 本標識体を Sep-Pak Plus Light C18 に保持させた後, EtOH (300 μL) によってバイアル中に溶出した. EtOH/DMF = 1/1 (200 μL) に溶解した化合物 **7** を加え, 80 °C で 30 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(200

μL)に溶解し、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 (MeCN/H₂O)を用いて [¹⁸F]**10** ([¹⁸F]FPHNP-3)を精製した。

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

第1章第1節と同様の方法を用いて行った。¹⁸F 標識体(148 kBq, 100 μL)を尾静脈より投与した。

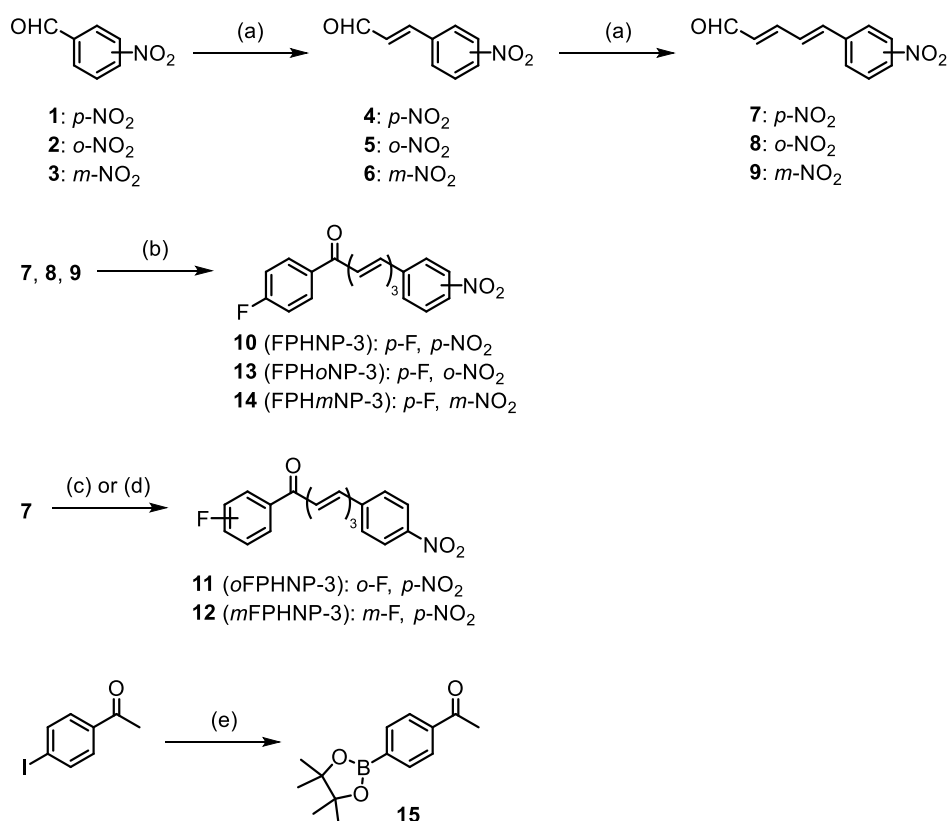
PET/CT 撮像

パーキンエルマー社製 G8 small-animal PET/CT scanner にて PET/CT 撮像を行った。左右の線条体に α-Syn 凝集体および PBS を接種したモデルマウス(C57BL/6J, 5-week-old, male)をイソフルランで麻酔した。その2日後に 10% EtOH 含有生理食塩水溶液に溶解した [¹⁸F]**10** ([¹⁸F]FPHNP-3) (1.85 MBq, 150 μL)を尾静脈より投与した。投与 10-30 分後の 20 分間×1 frame で PET 撮像を行った。PET 撮像後に CT 撮像(管電圧 50 kV, 管電流 200 μA)を行った。PET の投影データは 3 次元 ordered-subset expectation maximization (OSEM)法による画像再構成を行い、画像解析用ソフトウェア AMIDE にて PET/CT の画像解析を行った。PET/CT 撮像の翌日、マウスを屠殺後直ちに脳を摘出し、30 μm 厚の凍結脳組織切片を作製した。作製した脳組織切片を用いて β-シート構造認識能を有する蛍光試薬 Thioflavin S (ThS)の 50% EtOH 溶液(100 μM)を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。50% EtOH で洗浄後 (30 s×1), 蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行い、脳内の α-Syn 凝集体の局在を確認した。

2.3.2. 結果と考察

カルコン類縁体の合成

Scheme 2-5 にカルコン類縁体の合成経路を示す。Nitrobenzaldehyde を出発原料として、連続する Wittig 反応⁷⁹により前節で合成した化合物 **7** と同様、化合物 **8** および **9** を収率 21.2 および 26.7% で合成した。その後、Fluoroacetophenone との Claisen-Schmidt 縮合反応^{80,81}により、最終化合物(**10-14**)を総収率 6.6-20.7%で合成した。また、4-Iodoacetophenon を出発原料として宮浦・石山ホウ素化反応⁹⁵により ¹⁸F 標識反応の標識前駆体(**15**)を得た。



Reagents and conditions: (a) (1) (1,3-Dioxolan-2-yl)methyltriphenylphosphonium bromide, 18-Crown-6, K₂CO₃, Toluene, 100 °C, reflux. (2) 6 N HCl aq., THF, rt.; (b) 4-Fluoroacetophenone, 10% KOH, EtOH, DMF, rt; (c) 2-Fluoroacetophenone, 10% KOH, EtOH, DMF, rt; (d) 3-Fluoroacetophenone, 10% KOH, EtOH, DMF, rt; (e) Bis(pinacolate)diboron, KOAc, Pd(dppf)Cl₂, DMSO, 80 °C.

Scheme 2-5. Synthetic routes for chalcone analogues.

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験を行い、得られた阻害曲線より算出した K_i 値を Table 2-6 に示す。 **10** (FPHNP-3), **11** (*o*FPHNP-3), および **12** (*m*FPHNP-3)を比較すると、フッ素原子の導入位置の変更により、 α -Syn 凝集体への結合親和性に顕著な変化は認められず($K_i = 0.7$ -2.1 nM), いずれの化合物もリード化合物である PHNP-3 と同程度に α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示した。一方、

10 (FPHNP-3), **13** (FPHoNP-3), および **14** (FPH*m*NP-3)を比較すると, ニトロ原子団の導入位置の変更により α -Syn 凝集体への結合親和性に変化が認められ, ニトロ原子団を *m* 位に導入した場合, 結合親和性は算出不可となり, ニトロ原子団を *p* 位に導入した **10** (FPHNP-3)のみ α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示した. 一方, A β 凝集体に対しては, いずれの化合物においても結合親和性は算出不可となり, 前節により得られた知見と矛盾しない結果が得られた.

以上の結果および前節の構造活性相関研究において得られた知見より, カルコン類縁体構造への 4-Nitrophenyl 基の導入は, α -Syn 凝集体への結合選択性のみならず結合親和性にも寄与することが示唆された. また, **10** (FPHNP-3)が α -Syn 凝集体への優れた結合親和性および結合選択性を示したことから, リード化合物である [$^{123/125}$ I]PHNP-3 のヨウ素原子からフッ素原子への置換によって, α -Syn 凝集体への結合特性は維持されることが明らかとなった. そこで, **10** (FPHNP-3)についてさらなる評価を行った.

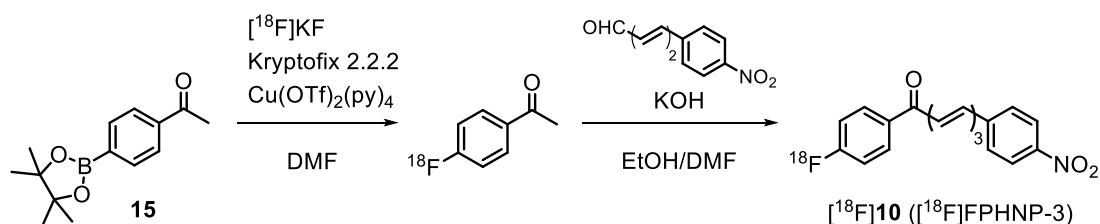
Table 2-6. Comparison of binding affinity of chalcone analogues for α -Syn and A β aggregates.

Compound	K_i (nM) ^a	
	α -Syn	A β
10 (FPHNP-3)	0.7 \pm 0.1	N.D.
11 (<i>o</i> FPHNP-3)	2.1 \pm 0.3	N.D.
12 (<i>m</i> FPHNP-3)	1.7 \pm 0.4	N.D.
13 (FPHoNP-3)	20 \pm 4.7	N.D.
14 (FPH <i>m</i> NP-3)	N.D.	N.D.

^aValues are the means \pm standard errors of three independent experiments.

[18 F]**10** ([18 F]FPHNP-3)の合成

Scheme 2-6 に [18 F]**10** ([18 F]FPHNP-3)の 18 F 標識経路を示す. ボロン標識前駆体を用いた [18 F]KF および Kryptofix 2.2.2 によるフッ素化, および [18 F]Fluoroacetophenon と Enal との間の Claisen-Schmidt 縮合反応^{80,81}の2工程を経て, 放射化学的収率 7.2%, 放射化学的純度 95%以上で得た.



Scheme 2-6. 18 F-Labeling of [18 F]**10** ([18 F]FPHNP-3).

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

[¹⁸F]10 ([¹⁸F]FPHNP-3)の体内動態を評価するため、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 および Table 2-7 に示す。 [¹⁸F]10 ([¹⁸F]FPHNP-3)は投与2分後における脳内放射エネルギーが 2.32% ID/g と、リード化合物である [^{123/125}I]PHNP-3 と比較して高値を示し、所期の通り CNS MPO score の増大に伴う脳移行性の向上を認めた。また、投与2分後から60分後にかけて脳内放射エネルギーは経時的に減少したことから、 [¹⁸F]10 ([¹⁸F]FPHNP-3)は投与早期に脳内へ移行後、経時的に消失するという良好な脳内挙動を示した。他臓器における放射能集積量を評価した結果、 [¹⁸F]10 ([¹⁸F]FPHNP-3)は肝臓への初期移行性および経時的な腸への集積性を示した。また、骨への顕著な集積は認められなかったことから(投与60分後で 1.71% ID/g)、生体における脱フッ素化は生じないことが示唆された。

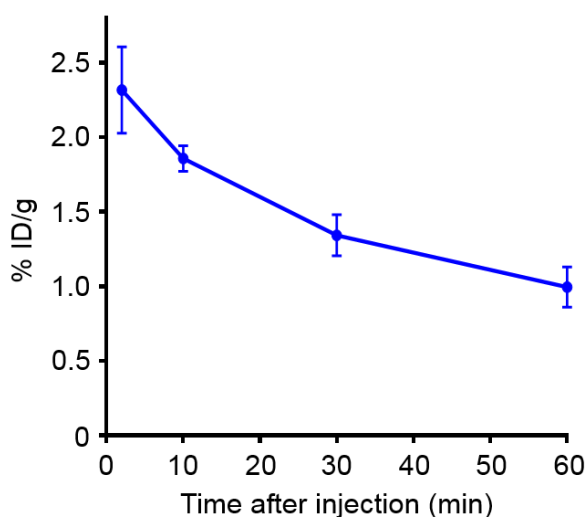


Figure 2-14. Brain uptake and clearance after intravenous injection of [¹⁸F]10 ([¹⁸F]FPHNP-3) into normal mice (male, n = 5).

Table 2-7. Biodistribution of [¹⁸F]10 ([¹⁸F]FPHNP-3) in normal mice.^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
Blood	8.53 (0.59)	5.78 (0.37)	4.10 (0.38)	3.20 (0.33)
Spleen	3.80 (0.66)	4.37 (0.41)	5.81 (1.07)	4.47 (0.85)
Pancreas	4.72 (0.60)	3.14 (0.35)	2.96 (0.33)	1.86 (0.39)
Stomach ^b	1.05 (0.20)	0.86 (0.16)	0.72 (0.28)	0.72 (0.28)
Intestine	1.69 (0.30)	2.65 (0.24)	4.46 (0.71)	5.90 (1.11)
Kidney	10.0 (1.45)	6.14 (0.51)	5.95 (0.80)	4.93 (0.84)
Liver	20.9 (1.64)	16.5 (1.63)	15.6 (2.29)	12.6 (2.05)
Heart	9.83 (0.94)	4.22 (0.60)	3.17 (0.39)	2.87 (0.77)
Lung	9.93 (0.69)	6.28 (0.45)	6.26 (0.82)	4.25 (0.57)

Brain	2.32 (0.29)	1.86 (0.09)	1.34 (0.14)	1.00 (0.13)
Bone	1.72 (0.77)	1.64 (1.20)	1.92 (0.64)	1.71 (0.84)

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

^bExpressed as % ID.

PET/CT 撮像

左右の線条体に α -Syn 凝集体および PBS を接種した C57BL/6J マウスを用いた PET/CT 撮像を行い, [¹⁸F]10 ([¹⁸F]FPHNP-3) の α -Syn イメージングプローブとしての有用性について評価した. その結果を Figure 2-15 に示す. PBS を接種した右側線条体において, ThS 由来の蛍光シグナルは認められず, PET 撮像においても周囲と比べて顕著に高い放射能集積を認めなかった. また, α -Syn 凝集体を接種した左側線条体においては, ThS 由来の蛍光シグナルが認められ, 対側と比較してわずかに高い放射能集積が認められたものの, α -Syn 凝集体を明瞭に描出することはできなかった.

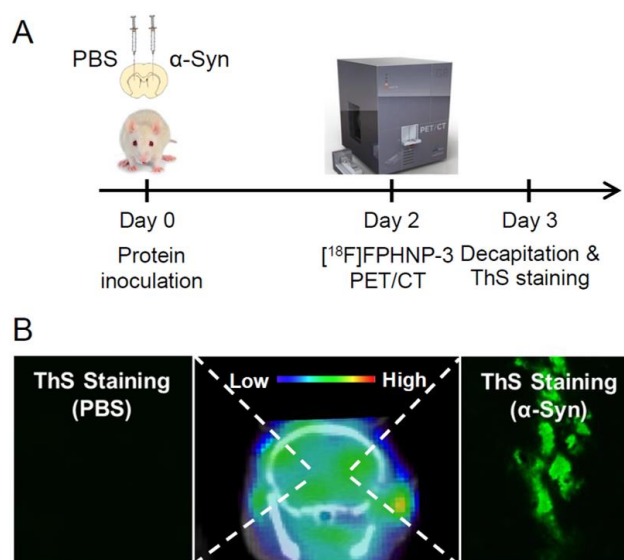


Figure 2-15. The experimental procedure (A). A PET/CT image after injection of [¹⁸F]10 ([¹⁸F]FPHNP-3) into an α -Syn aggregates-inoculated C57BL/6J mouse, and fluorescent staining with ThS in the striatal of the mouse brain section (B).

2.3.3. 小括

本項において、 α -Syn 凝集体への結合親和性および結合選択性に優れる $^{123/125}\text{I}$ PHNP-3 をリード化合物として選択し、計算科学的手法を用いた合理的な分子設計により、本プローブの課題である脳移行性の向上を企図した。すなわち、CNS MPO score を 4 以上に向上させるよう、 $^{123/125}\text{I}$ PHNP-3 の化学構造を基盤にさらなる構造改変を行い、計 5 種のカルコン類縁体を設計し、以下に述べる結果を得た。

- (1) $^{123/125}\text{I}$ PHNP-3 における $^{123/125}\text{I}$ を ^{18}F に置換した ^{18}F 10 (^{18}F FPHP-3), および ^{18}F 10 (^{18}F FPHP-3)における ^{18}F およびニトロ原子団をそれぞれ芳香環上の異なる位置に導入した計 5 種のカルコン類縁体を合成した。
- (2) ThT を競合リガンドとした競合阻害実験において、フッ素原子の導入位置の変更により α -Syn 凝集体への結合親和性に顕著な変化は認められず、ニトロ原子団の導入位置の変更により α -Syn 凝集体への結合親和性に顕著な変化が認められた。一方、いずれのカルコン類縁体においても $\text{A}\beta$ 凝集体に対する結合性を認めず、フッ素原子およびニトロ原子団をそれぞれ p 位に導入した 10 (FPHP-3)が α -Syn 凝集体への最も優れた結合親和性および結合選択性を示した。
- (3) ボロン標識前駆体を用いた 2 段階の ^{18}F 標識反応により得られた ^{18}F 10 (^{18}F FPHP-3)において、 $^{123/125}\text{I}$ PHNP-3 と比較して、CNS MPO score の増大に伴う脳移行性の向上を認めた。
- (4) ^{18}F 10 (^{18}F FPHP-3)を用いた PET イメージングにおいて、 α -Syn 凝集体の明瞭な描出には至らなかった。

以上の結果より、カルコン類縁体構造を基盤とした ^{18}F 10 (^{18}F FPHP-3)は、 α -Syn 凝集体に対する優れた結合親和性、結合選択性、および良好なマウス脳移行性を示したことから、本プローブを基盤とした構造最適化が有用な α -Syn イメージングプローブの開発に繋がる可能性が示された。

第2項 カルコン類縁体を基盤とした構造最適化による PET 用 α -Syn イメージングプローブの開発

第2章第3節第1項において、 $[^{18}\text{F}]$ FPHNP-3 は α -Syn 凝集体への高い結合親和性および結合選択性を示し、さらに CNS MPO score の増大に伴う高いマウス脳移行性を示したことから、既存の α -Syn イメージングプローブと比較して優れた基礎的性質を有していたものの、生体での α -Syn 凝集体の明瞭な描出には至らなかった。

そこで、 $[^{18}\text{F}]$ FPHNP-3 をリード化合物とした構造最適化を目的に、CNS MPO score とその構成パラメーターとの相関性に着目した。臨床応用されている既存の A β および Tau イメージングプローブ^{26, 32-34, 37, 96}、前臨床段階にある既存の α -Syn イメージングプローブ⁶¹、および種々のカルコン類縁体を含む化合物群について、CNS MPO score を構成する物理化学的パラメーターを横軸に、CNS MPO score を縦軸にプロットした結果、CLogP 値 と CNS MPO score との間に顕著に高い相関が認められた(相関係数 $r = 0.86$) (Figure 2-16)。CLogP-CNS MPO score 相関図において、臨床応用され生体イメージングに成功した既存 A β および Tau イメージングプローブは、CNS MPO score が 4 以上かつ $[^{18}\text{F}]$ FPHNP-3 (CLogP = 4.4)と比較して CLogP 値が低い領域(<3)に多く分布していたことから(Figure 2-16)、 α -Syn 凝集体の生体イメージングに向けて、CNS MPO score を 4 以上に維持しながら、 $[^{18}\text{F}]$ FPHNP-3 より水溶性を増大させる分子設計が有効であると考えた。そこで、 $[^{18}\text{F}]$ FPHNP-3 における ^{18}F と芳香環との間に水溶性リンカーを導入させることとし、リンカー部分には ^{18}F の導入が容易である点からも広く利用される(3-Fluoro-2-hydroxy)-1-propoxy リンカーを採用することで、新規カルコン類縁体として $[^{18}\text{F}]$ FHCL-1~2 を設計・合成した(Figure 2-17)。これらの PET 用 α -Syn イメージングプローブとしての有用性について第2章第3節第1項と同様の方法を用いて評価した。

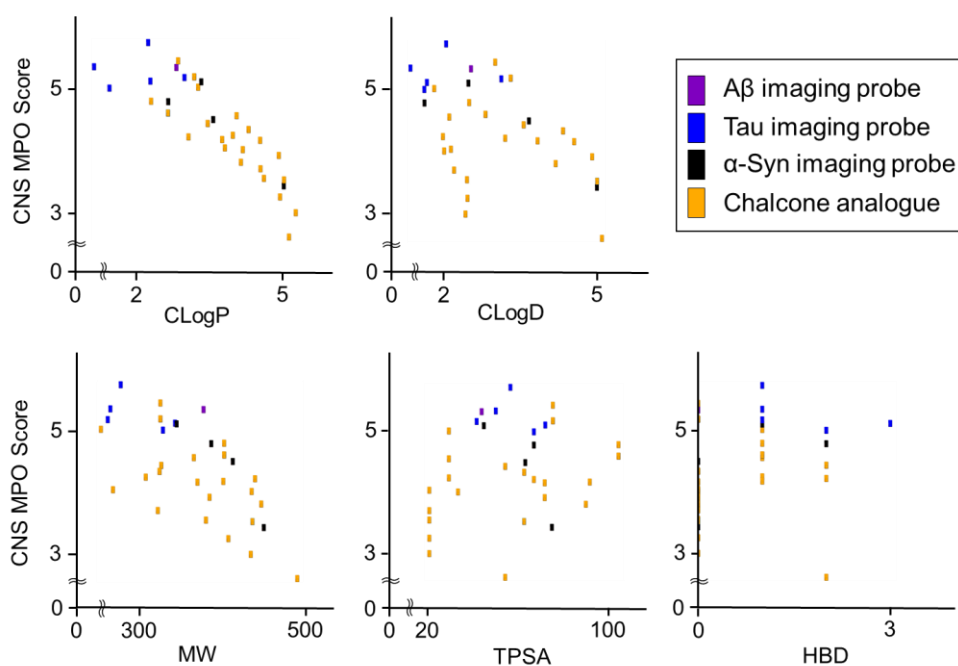


Figure 2-16. Correlation between physicochemical parameters and CNS MPO score.

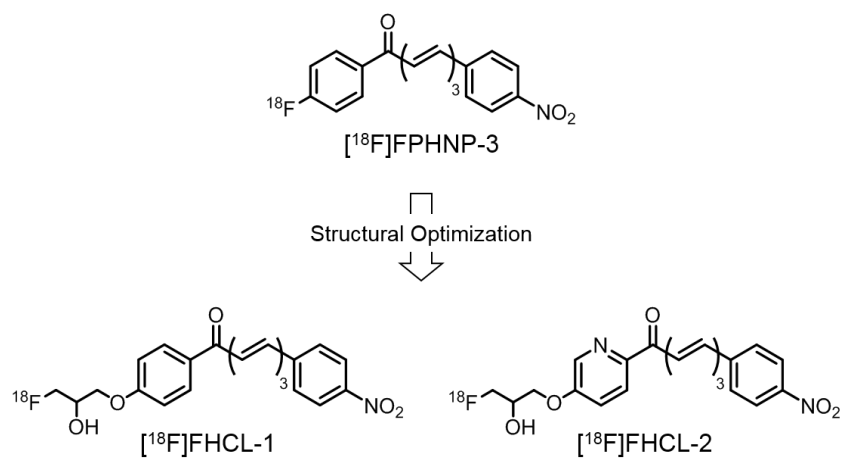


Figure 2-17. Design and chemical structures of ¹⁸F-labeled chalcone analogues

2.3.4. 実験方法

試薬・機器

第2章第1節と同じ試薬・機器を使用した。

動物

第1章第1節と同様に、購入・飼育した。C57BL/6J マウスは日本エスエルシー株式会社より購入した。Ex vivo ARG 実験のため、イソフルラン麻酔下(2%)、 α -Syn 凝集体(228 pmol, 2 μ L)および PBS (2 μ L)を C57BL/6J マウスの左右の線条体(stereotaxic coordinates: 2.3 mm lateral to the midline, 0.8 mm posterior to the bregma, and 3.5 mm below the skull)にそれぞれ接種した。PET/CT 撮像のため、イソフルラン麻酔下(2%)、 α -Syn 凝集体(228 pmol, 2 μ L)および A β 凝集体(228 pmol, 2 μ L)を C57BL/6J マウスの左右の線条体(stereotaxic coordinates: 2.3 mm lateral to the midline, 0.8 mm posterior to the bregma, and 3.5 mm below the skull)にそれぞれ接種した。

CNS MPO score の算出

第2章第3節第1項と同様の方法を用いて行った。

カルコン類縁体の合成

1-(4-((2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)phenyl)ethanone (2).

2,2-Dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol *p*-toluenesulfonate (**1**) (300 mg, 1.1 mmol) を DMF (8.0 mL)に溶解し、4-Hydroxyacetophenone (95 mg, 0.70 mmol)および K₂CO₃ (290 mg, 2.1 mmol)を加え、100 °C で7時間攪拌した。1 N NaOH 水溶液(3.2 mL)加え、さらに100 °C で12時間攪拌した。1 N HCl 水溶液で中和した後、酢酸エチル(40 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。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**2**を収量160 mg (91.8%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.93 (d, *J* = 10 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.53-4.47 (m, 1H), 4.21-4.07 (m, 2H), 4.04-3.86 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.46 (s, 3H), 1.41 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 251.1 [M+H]⁺.

1-(4-((2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methoxy)pyridinyl)ethanone (3).

化合物**1** (600 mg, 2.1 mmol) を DMF (12 mL)に溶解し、1-(5-Hydroxypyridin-2-yl)ethanone (192 mg, 1.4 mmol)および K₂CO₃ (387 mg, 2.8 mmol)を加え、100 °C で7時間攪拌した。1 N NaOH 水溶液(3.2 mL)加え、さらに100 °C で12時間攪拌した。1 N HCl 水溶液で中和した後、酢酸エチル(40 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。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**3**を収量150 mg (42.6%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.36 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 6.0, 8.8 Hz, 1H), 4.56-4.50 (m, 1H), 4.22-4.15 (m, 2H), 4.11-4.07 (m, 1H), 3.95-3.92 (m, 1H), 2.69 (s, 3H),

1.47 (s, 3H), 1.42 (s, 3H). MS (ESI) m/z 252.1 [M+H]⁺.

1-(4-(2,3-Dihydroxypropoxy)phenyl)ethanone (4).

化合物 **2** (160 mg, 0.64 mmol)を MeOH (6.0 mL)に溶解し, 2 N HCl (2.0 mL)を加え, 70 °C で9時間攪拌した. 1 N NaOH 水溶液(4 mL)で中和し, クロロホルム(40 mL×2)で抽出し, 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 = 10/1)で精製して目的物 **4** を収量 58.4 mg (43.4%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.97 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.04 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.18-4.01 (m, 2H), 3.72-3.64 (m, 2H), 3.35-3.27 (m, 1H), 2.55 (s, 3H). MS (ESI) m/z 211.0 [M+H]⁺.

1-(4-(2,3-Dihydroxypropoxy)pyridinyl)ethanone (5).

化合物 **4** と同様の合成法により, 化合物 **3** から, 目的物 **5** を収量 92.6 mg (73.4%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.35 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.48 (dd, J = 6.0, 8.8 Hz, 1H), 4.26-4.20 (m, 1H), 4.17-4.10 (m, 1H), 4.05-3.98 (m, 1H), 3.68 (dd, J = 3.2, 5.2 Hz), 2.63 (s, 3H). MS (ESI) m/z 212.0 [M+H]⁺.

1-(4-(2-Hydroxy-3-(*p*-toluenesulfonyl)propoxy)phenyl)ethanone (6).

化合物 **4** (58.4 mg, 0.28 mmol)を CH₂Cl₂ (10 mL)に溶解し, *p*-Toluenesulfonyl chloride (126 mg, 0.66 mmol), DMAP (触媒量), Et₃N (1 mL)を加えた. 反応液を室温で4時間攪拌した後, クロロホルム(40 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 **6** を収量 92 mg (90.8%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.70 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.28 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 6.71 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 4.25 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 4.15 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.06 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 2.55 (s, 3H), 2.45 (s, 3H). MS (ESI) m/z 365.1 [M+H]⁺.

1-(4-(2-Hydroxy-3-(*p*-toluenesulfonyl)propoxy)pyridinyl)ethanone (7).

化合物 **6** と同様の合成法により, 化合物 **5** から, 目的物 **7** を収量 15.8 mg (20.3%)で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.30 (d, J = 16 Hz, 2H), 7.99 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.23 (dd, J = 6.0, 8.8 Hz, 2H), 4.14 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 3.95-3.90 (m, 1H), 3.74-3.65 (m, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.61 (s, 3H). MS (ESI) m/z 366.1 [M+H]⁺.

1-(4-(2-((Methoxy)methoxy)-3-(*p*-toluenesulfonyl)propoxy)phenyl)ethanone (8).

化合物 **6** (31.8 mg, 0.087 mmol)を CH₂Cl₂ (5.0 mL)に溶解し, *i*Pr₂NEt (120 μL), Bromomethyl methyl ether (114 μL, 1.4 mmol)を加えた. 反応液を室温で4時間攪拌した後, 超純水を加えて反応を停止させた. クロロホルム(30 mL×2)で抽出し, 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。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 **8** を収量 24 mg (67.7%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.69 (s, 2H), 4.30-4.18 (m, 2H), 4.17-4.11 (m, 1H), 4.08 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.41 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 409.1 [M+H]⁺.

1-(4-(2-((Methoxy)methoxy)-3-(*p*-toluenesulfonyl)propoxy)pyridinyl)ethanone (9).

化合物 **8** と同様の合成法により、化合物 **7** から、目的物 **9** を収量 12.7 mg (71.8%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.16 (dd, *J* = 5.6, 8.8 Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.28-4.20 (m, 2H), 4.19-4.15 (m, 1H), 4.14-4.04 (m, 2H), 3.33 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 2.39 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 410.1 [M+H]⁺.

1-(4-(2-((Methoxy)methoxy)-3-fluoropropoxy)phenyl)ethanone (10).

化合物 **8** (12.8 mg, 0.031 mmol)を THF (8.0 mL)に溶解し、TBAF (1 M THF 溶液, 900 μL, 0.90 mmol)を氷冷下で加えた。反応液を 85 °C で 17 時間攪拌した後、クロロホルム(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 **10** を収量 6.5 mg (81.0%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.94 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 4.81 (s, 2H), 4.15-4.12 (m, 2H), 4.04-4.00 (m, 1H), 3.88-3.86 (m, 2H), 3.45 (s, 3H), 2.57 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 257.1 [M+H]⁺.

1-(4-(2-((Methoxy)methoxy)-3-fluoropropoxy)pyridinyl)ethanone (11).

化合物 **10** と同様の合成法により、化合物 **9** から、目的物 **11** を収量 5.4 mg (59.7%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.27 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 5.6, 8.4 Hz, 1H), 4.73 (s, 2H), 4.66-4.59 (m, 1H), 4.54-4.47 (m, 1H), 4.19-4.09 (m, 3H), 3.36 (s, 3H), 2.61 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 258.1 [M+H]⁺.

(2*E*,4*E*,6*E*)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-

(2-((methoxy)methoxy)-3-(*p*-toluenesulfonyl)propoxy)phenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (12)

化合物 **8** (13.6 mg, 0.033 mmol)を EtOH/DMF = 4/1 の混合溶液(4.0 mL)に溶解し、5-(4-Nitrophenyl)penta-2,4-dienal (20.8 mg, 0.10 mmol)を加え、氷冷下で 10 分間攪拌した。10% KOH 水溶液(150 μL)を加え、室温で 12 時間攪拌した。酢酸エチル(40 mL×2)で抽出し、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(酢酸エチル/ヘキサン = 1/1)で精製して目的物 **12** を収量 6.0 mg (30.2%)で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.96 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* =

8.8 Hz, 2H), 7.54-7.49 (m, 1H), 7.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.12-7.02 (m, 1H), 6.87 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.86-6.78 (m, 2H), 6.74-6.65 (m, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.30-4.20 (m, 2H), 4.16-4.12 (m, 1H), 4.11-4.06 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 2.41 (s, 3H). MS (ESI) m/z 594.1 [M+H]⁺.

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-

(2-((methoxy)methoxy)-3-(*p*-toluenesulfonyl)propoxy)pyridinyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (13)

化合物 **12** と同様の合成法により, 化合物 **9** から, 目的物 **13** を収量 5.4 mg (59.7%) で得た. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 8.12 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.79-7.74 (m, 4H), 7.61-7.58 (m, 1H), 7.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.20 (dd, $J = 3.0, 9.0$ Hz, 1H), 7.05 (dd, $J = 11, 15.5$ Hz, 1H), 6.87-6.70 (m, 3H), 4.68 (s, 2H), 4.27-4.19 (m, 2H), 4.15-4.11 (m, 3H), 3.34 (s, 3H), 2.39 (s, 3H). MS (ESI) m/z 595.1 [M+H]⁺.

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-(2-((methoxy)methoxy)-3-fluoropropoxy)phenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one

(14)

化合物 **12** と同様の合成法により, 化合物 **10** から, 目的物 **14** を収量 4.4 mg (17.1%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 7.97 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 7.12-7.02 (m, 2H), 7.00-6.94 (m, 2H), 6.84-6.74 (m, 2H), 6.71-6.62 (m, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.72-4.66 (m, 1H), 4.60-4.53 (m, 1H), 4.24-4.14 (m, 2H), 3.42 (s, 3H). MS (ESI) m/z 442.2 [M+H]⁺.

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-

(2-((methoxy)methoxy)-3-fluoropropoxy)pyridinyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (15)

化合物 **12** と同様の合成法により, 化合物 **11** から, 目的物 **15** を収量 6.4 mg (49.0%) で得た. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.36 (d, $J = 3.5$ Hz, 1H), 8.17 (dd, $J = 8.0, 14.4$ Hz, 3H), 7.76 (d, $J = 19.5$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 10$ Hz, 2H), 7.32 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H), 7.08-7.01 (m, 1H), 6.87-6.69 (m, 3H), 4.93-4.57 (m, 5H), 4.23 (s, 2H), 3.41 (s, 3H). MS (ESI) m/z 443.2 [M+H]⁺.

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-(2-hydroxy-3-fluoropropoxy)phenyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (16, FHCL-1)

化合物 **14** を MeOH (3.0 mL) に溶解し, 2 N HCl 水溶液 (300 μL) 加えた. 反応液を 70 °C で 3.5 時間攪拌した後, 1 N NaOH 水溶液 (480 μL) 加え, 中和した. 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 = 6/1) で精製して目的物 **16** を収量 2.5 mg (86.8%) で得た. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.46 (dd, $J = 11.5, 15$ Hz, 1H), 7.04-6.96 (m, 2H), 6.93 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.80-6.69 (m, 2H), 6.62 (dd, $J = 11.5, 14.5$ Hz, 1H), 4.63-4.48 (m, 2H), 4.25-4.21 (m, 1H), 4.12-4.10 (m, 2H). MS (ESI) m/z 398.1 [M+H]⁺.

(2E,4E,6E)-7-(4-Nitrophenyl)-1-(4-(2-hydroxy-3-fluoropropoxy)pyridinyl)hepta-2,4,6-trien-1-one (17, FHCL-2)

化合物 **16** と同様の合成法により, 化合物 **15** から, 目的物 **17** を収量 3.2 mg (55.5%) で得た. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.29 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 8.17-8.12 (m, 1H), 8.06 (dd, *J* = 2.0, 8.5 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.70-7.63 (m, 2H), 7.54-7.49 (m, 1H), 7.48-7.46 (m, 2H), 7.23 (dd, *J* = 2.5, 8.5 Hz, 2H), 4.62-4.58 (m, 2H), 4.52-4.50 (m, 2H), 4.44-4.34 (m, 1H). MS (ESI) *m/z* 399.1 [M+H]⁺.

Aβ 凝集体の作製

第 2 章第 1 節と同様の方法を用いて行った.

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験

第 2 章第 2 節と同様の方法を用いて行った.

¹⁸F 標識カルコン類縁体の合成

第 1 章第 2 節と同様の方法を用いて ¹⁸F 含有溶液を共沸脱水した. 化合物 **12** または **13** 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, DMSO (200 μL)に溶解した ¹⁸F を加え, 100 °C で 20 分間加熱した. さらに, 2 N HCl 水溶液(50 μL)を加え, さらに 100 °C で 10 分間加熱した. 室温に戻して 1 N NaOH 水溶液(100 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(200 μL)に溶解し逆相 HPLC (MeCN/H₂O)を用いて精製した.

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

第 1 章第 1 節と同様の方法を用いて行った. ¹⁸F 標識体(148 kBq, 100 μL)を尾静脈より投与した.

血液中代謝物分析

第 1 章第 2 節と同様の方法を用いて行った. [¹⁸F]**17** ([¹⁸F]FHCL-2)の 0.1% Tween 80 および 10% EtOH を含有した生理食塩水溶液(0.74-1.9 MBq, 150 μL)を尾静脈より投与した. 投与 2 分後および 30 分後に屠殺し, 血液を採取した.

脳内代謝物分析

第 1 章第 2 節と同様の方法を用いて行った. [¹⁸F]**17** ([¹⁸F]FHCL-2)の 0.1% Tween 80 および 10% EtOH を含有した生理食塩水溶液(0.74-1.9 MBq, 150 μL)を尾静脈より投与した. 投与 2 分後および 30 分後に屠殺し, 速やかに脳を摘出した.

Ex vivo ARG 実験

左右の線条体に α -Syn 凝集体および PBS を接種したモデルマウス(C57BL/6J, 5-week-old, male)を作製し, その 2 日後にイソフルランで麻酔し, 10% EtOH 含有生理食塩水溶液に溶解した [^{18}F]17 ([^{18}F]FHCL-2) (16.7 MBq, 150 μL) を尾静脈より投与した. 投与 30 分後に屠殺後, 直ちに脳を摘出し, ドライアイスで凍結させた. その後, ミ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 ThS の 50% EtOH 溶液(100 μM)を添加し, 50% EtOH で洗浄後(30 s \times 1), 蛍光顕微鏡にて蛍光観察を行い, 脳内の α -Syn 凝集体の局在を確認した.

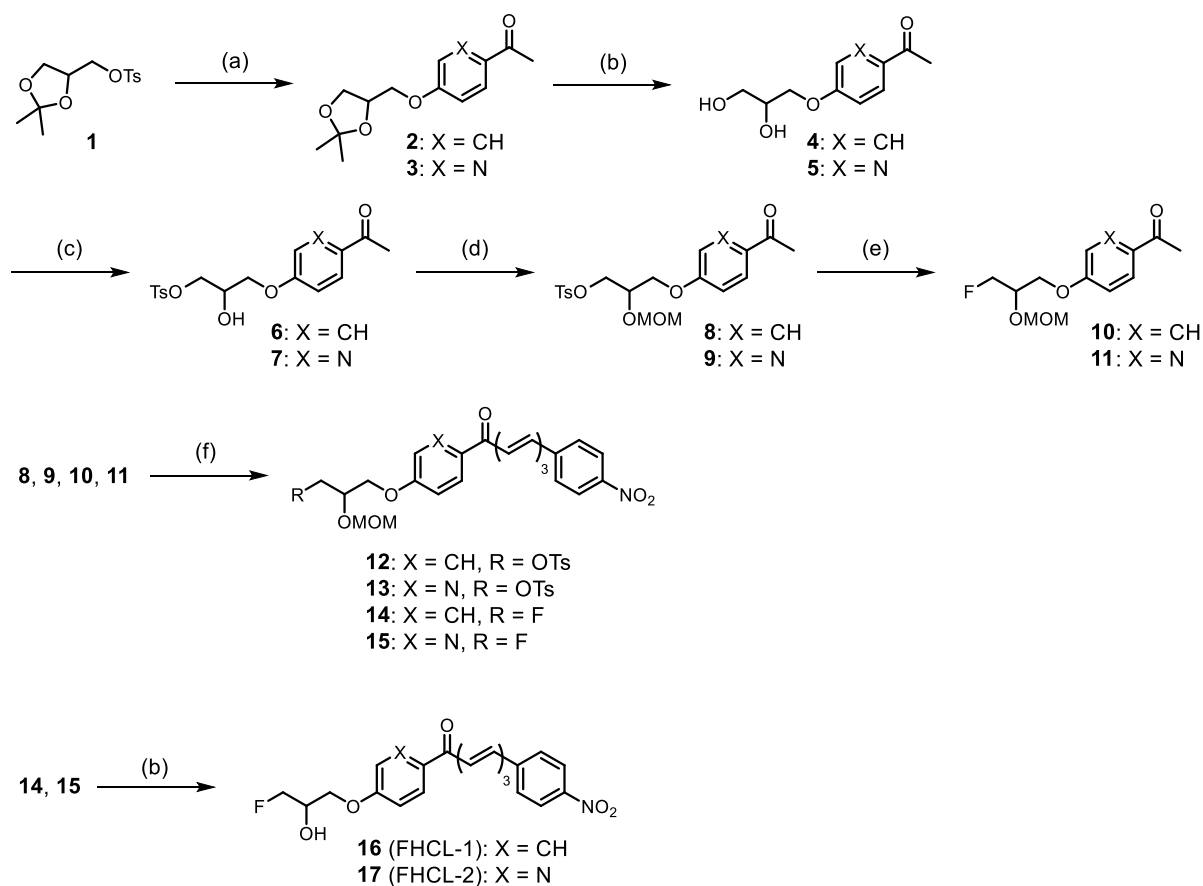
PET/CT 撮像

パーキンエルマー社製 G8 small-animal PET/CT scanner にて PET/CT 撮像を行った. 左右の線条体に α -Syn 凝集体および A β 凝集体を接種したモデルマウス(C57BL/6J, 5-week-old, male)をイソフルランで麻酔し, 0.1% Tween 80 および 10% EtOH を含有した生理食塩水溶液に溶解した [^{18}F]17 ([^{18}F]FHCL-2) (2.7 MBq, 150 μL) を尾静脈より投与した. 投与 20-35 分後の 15 分間 \times 1 frame で PET 撮像を行った. PET 撮像後に CT 撮像(管電圧 50 kV, 管電流 200 μA)を行った. PET の投影データは 3 次元 OSEM 法による画像再構成を行い, 画像解析用ソフトウェア AMIDE にて PET/CT の画像解析を行った. その翌日にマウスを屠殺し, 直ちに脳を摘出し, 30 μm 厚の凍結脳組織切片を作製した. 作製した脳組織切片上に 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, 脳内の α -Syn 凝集体および A β 凝集体の局在を確認した.

2.3.5. 結果と考察

カルコン類縁体の合成

Scheme 2-7 にカルコン類縁体の合成経路を示す. 2,2-Dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol *p*-toluenesulfonate (**1**)を出発原料として, (1,3-Dioxolan-4-yl)methoxyarylethanones (**2**, **3**)を収率 91.8 および 42.6%で合成した. その後, 酸性条件下で開環反応を行い, (Dihydroxypropoxy)arylethanones (**4**, **5**)を合成した. トシル化, ヒドロキシ基の保護の 2 工程を経て, 3-(Toluenesulfonyloxy)-2-(methoxymethoxy)propoxyarylethanones (**8**, **9**)を合成し, その後のフッ素化により 3-Fluoro-2-(methoxymethoxy)propoxyarylethanones (**10**, **11**)を合成した. 化合物 **10** および **11** と 5-(4-Nitrophenyl)penta-2,4-dienal との Claisen-Schmidt 縮合反応^{80, 81}, およびその後の脱保護反応の 2 工程を経て, 最終化合物(**16**, **17**)を総収率 2.94 および 0.74%で得た. また, 化合物 **8** および **9** と 5-(4-Nitrophenyl)penta-2,4-dienal との間の Claisen-Schmidt 縮合反応^{80, 81}により ¹⁸F 標識反応の標識前駆体(**12**, **13**)を得た.



Reagents and conditions: (a) 4-Hydroxyacetophenone or 1-(5-Hydroxypyridine-2-yl)ethanone, K_2CO_3 , 1 N NaOH, DMF, reflux, 100 °C; (b) 2 N HCl, MeOH, reflux, 70 °C; (c) *p*-Toluenesulfonyl chloride, DMAP, Et_3N , CH_2Cl_2 , rt; (d) MOMBr, iPr_2NEt , CH_2Cl_2 , rt; (e) TBAF, THF, reflux, 85 °C; (f) 5-(4-Nitrophenyl)penta-2,4-dienal, 10% KOH, EtOH, DMF, rt.

Scheme 2-7. Synthetic routes for chalcone analogues.

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験

ThT を競合リガンドとした競合阻害実験を行い、得られた阻害曲線より算出した K_i 値を Table 2-8 に示す。16 (FHCL-1) および 17 (FHCL-2) はいずれも α -Syn 凝集体への高い結合親和性を示した ($K_i = 2.6, 3.4$ nM)。一方, A β 凝集体に対しては、いずれの化合物においても結合性は認められなかった。

以上の結果より、カルコン類縁体構造への水溶性リンカーを介した ^{18}F の導入は、 α -Syn 凝集体への結合特性に顕著な影響を及ぼさないことが明らかとなった。

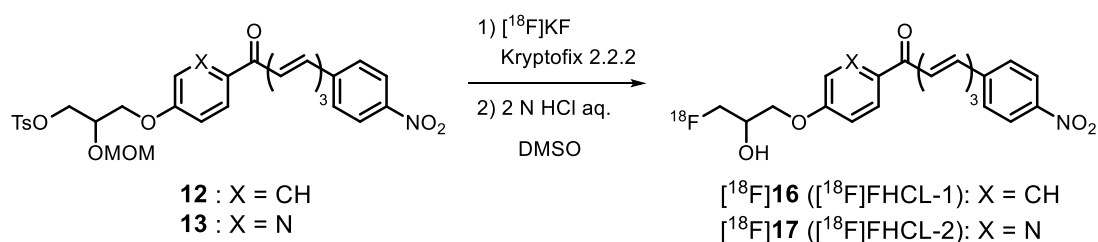
Table 2-8. Comparison of binding affinity of chalcone analogues for α -Syn and A β aggregates.

Compound	K_i (nM) ^a	
	α -Syn	A β
16 (FHCL-1)	2.6 \pm 0.5	N.D.
17 (FHCL-2)	3.4 \pm 0.1	N.D.

^aValues are the means \pm standard errors of three independent experiments.

^{18}F 標識カルコン類縁体の合成

Scheme 2-8 に [^{18}F]16 ([^{18}F]FHCL-1) および [^{18}F]17 ([^{18}F]FHCL-2) の ^{18}F 標識経路を示す。トシル標識前駆体を用いて、 [^{18}F]KF および Kryptofix 2.2.2 によるフッ素化および酸性条件下における脱保護の 2 工程を経て、放射化学的収率 36-40%、放射化学的純度 95% 以上で得た。



Scheme 2-8. ^{18}F -Labeling of chalcone analogues.

正常マウスを用いた体内放射能分布評価

[^{18}F]16 ([^{18}F]FHCL-1) および [^{18}F]17 ([^{18}F]FHCL-2) の体内動態を評価するため、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 2-18 および Table 2-9 に示す。 [^{18}F]16 ([^{18}F]FHCL-1) および [^{18}F]17 ([^{18}F]FHCL-2) は投与 2 分後における脳内放射エネルギーが 2.09 および 2.40% ID/g と、CNS MPO score が 4 以上であることと相関して、リード化合物である [^{18}F]FPHNP-3 と同様に高い脳移行性を認めた。また、投与 2 分後から 60 分後にかけて、 [^{18}F]16 ([^{18}F]FHCL-1) と比較して [^{18}F]17 ([^{18}F]FHCL-2) では脳内放射エネルギーの経時的な減少が認められたことから、 [^{18}F]17 ([^{18}F]FHCL-2) は投与

早期に脳内へ移行後、経時的に消失することが示された。これはフェニル基からピリジル基への変換による脂溶性の低下によるものと考えられた⁹⁷。

他臓器における放射能集積量を評価した結果、両プローブは肝臓への初期移行性および経時的な腸への集積性を示し、骨への顕著な集積は認められなかったことから(投与 60 分後で 3.89 および 2.35% ID/g)、生体における脱フッ素化は生じないことが示唆された。また、^[18F]16 (^[18F]FHCL-1)は投与早期に^[18F]17 (^[18F]FHCL-2)と比較して血液に高い放射能滞留を示したことから、^[18F]16 (^[18F]FHCL-1)は血漿タンパク質に対する高い結合率を示す可能性が示唆された。血漿タンパク質への結合はプローブの BBB 透過を妨げるため^{85, 86}、 α -Syn 凝集体の生体イメージングには血漿タンパク結合率が低いプローブを用いることが望ましく、^[18F]17 (^[18F]FHCL-2)が α -Syn イメージングプローブとして有用である可能性が示された。

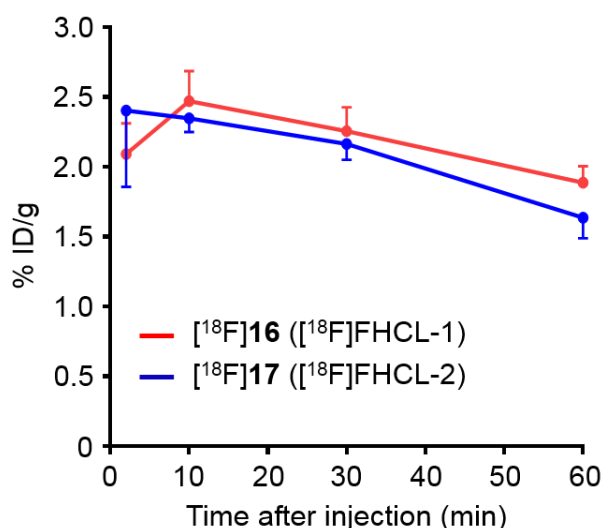


Figure 2-18. Brain uptake and clearance after intravenous injection of [¹⁸F]16 (^[18F]FHCL-1) and [¹⁸F]17 (^[18F]FHCL-2) into normal mice (male, n = 5).

Table 2-9. Biodistribution of ¹⁸F-labeled chalcone analogues in normal mice.^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
	[¹⁸F]16 ([¹⁸F]FHCL-1)			
Blood	13.1 (0.80)	7.13 (0.61)	6.42 (0.53)	7.10 (0.77)
Spleen	5.39 (1.00)	9.60 (0.73)	8.26 (0.86)	6.40 (0.48)
Pancreas	5.01 (0.87)	6.63 (0.44)	5.31 (0.36)	4.16 (0.34)
Stomach ^b	0.99 (0.17)	1.08 (0.16)	1.02 (0.29)	0.98 (0.20)
Intestine	2.21 (0.11)	4.08 (0.45)	6.63 (1.26)	9.32 (2.96)
Kidney	11.7 (0.84)	10.1 (0.98)	8.93 (0.68)	8.10 (0.43)
Liver	22.4 (3.28)	29.4 (1.98)	27.0 (2.34)	22.4 (1.50)
Heart	10.8 (0.84)	7.95 (0.64)	6.83 (0.39)	6.07 (0.32)

Lung	15.1 (1.09)	12.9 (1.90)	10.2 (0.28)	8.71 (0.97)
Brain	2.09 (0.22)	2.47 (0.21)	2.26 (0.17)	1.89 (0.12)
Bone	2.64 (0.36)	3.55 (0.20)	3.66 (0.44)	3.89 (0.57)
$[^{18}\text{F}]\mathbf{17}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FHCL-2}$)				
Blood	7.79 (0.35)	4.78 (0.26)	4.58 (0.33)	4.09 (0.26)
Spleen	4.63 (0.81)	6.20 (0.29)	4.94 (0.19)	3.76 (0.27)
Pancreas	4.95 (0.75)	5.17 (0.22)	4.85 (0.29)	3.70 (0.23)
Stomach ^b	0.94 (0.06)	1.33 (0.11)	2.65 (0.53)	3.85 (0.70)
Intestine	2.30 (0.19)	4.44 (0.53)	7.04 (1.37)	11.5 (0.89)
Kidney	10.1 (0.38)	7.46 (0.55)	6.99 (0.21)	5.86 (0.66)
Liver	21.6 (0.96)	26.4 (1.05)	22.0 (0.97)	20.6 (1.57)
Heart	8.76 (0.41)	6.16 (0.28)	5.33 (0.35)	4.45 (0.31)
Lung	11.5 (0.59)	8.98 (0.93)	7.34 (0.47)	5.73 (0.73)
Brain	2.40 (0.55)	2.35 (0.10)	2.16 (0.11)	1.64 (0.15)
Bone	1.52 (0.29)	2.19 (0.43)	2.18 (0.32)	2.35 (0.16)

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

^bExpressed as % ID.

血液中代謝物分析

$[^{18}\text{F}]\mathbf{17}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FHCL-2}$)のイメージングプローブとしての有用性についてさらに評価するため、 $[^{18}\text{F}]\mathbf{17}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FHCL-2}$)を正常マウスに投与後、血液中に存在する放射性代謝物を逆相 HPLC により分析した。その結果を Figure 2-19 に示す。 $[^{18}\text{F}]\mathbf{17}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FHCL-2}$)は、マウスに投与後、未変化体に比べて極性の高い放射性代謝物が生成することを認めた。また、未変化体は Table 2-10 に示す割合で血液中に存在しており、経時的な減少が認められた。

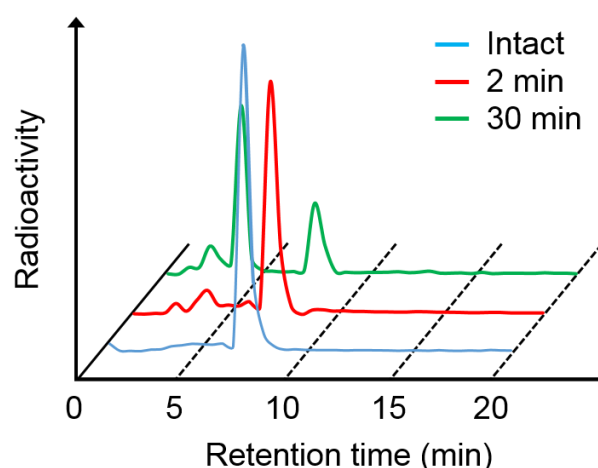


Figure 2-19. Representative HPLC analysis of radioactivity in blood after injection of $[^{18}\text{F}]\mathbf{17}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FHCL-2}$) into normal mice.

Table 2-10. Percentages of the parent probe in blood at 2 and 30 min postinjection into normal mice.

Time after injection (min)	Percentage of the parent probe ^a
2	76.8 ± 1.1
30	37.5 ± 8.2

^aValues are the mean ± standard deviation for three independent experiments.

脳内代謝物分析

[¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2)を正常マウスに投与後、脳内に存在する放射性代謝物を逆相 HPLC により分析した。その結果を Figure 2-20 に示す。[¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2)は、マウスに投与後、血液中と同様の代謝物が認められたものの、投与早期においてその割合は低値を示し、未変化体は Table 2-11 に示す割合で存在していた。投与 30 分後までに認められた放射性代謝物の割合は、臨床応用されている既存 Tau イメージングプローブと比較しても同程度の値を示したことから^{39, 46, 98}, [¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2)は投与早期において脳内で十分安定に存在することが示唆された。

以上の結果より、[¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2)が α-Syn 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。

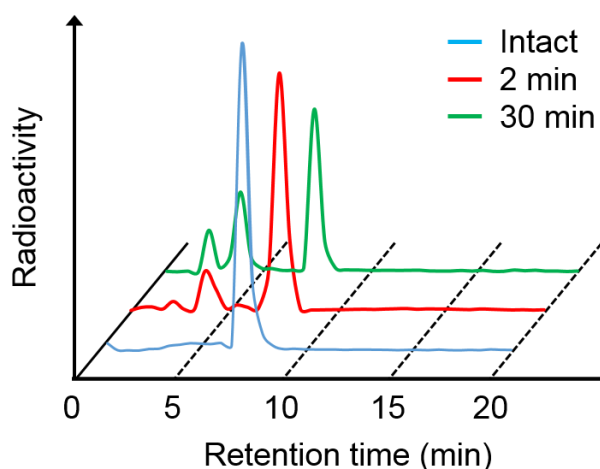


Figure 2-20. Representative HPLC analysis of radioactivity in brain after injection of [¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2) into normal mice.

Table 2-11. Percentages of the parent probe in brain at 2 and 30 min postinjection into normal mice.

Time after injection (min)	Percentage of the parent probe ^a
2	80.6 ± 4.8
30	42.9 ± 10.6

^aValues are the mean ± standard deviation for three independent experiments.

Ex vivo ARG 実験

[¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2)の生体での α -Syn 凝集体に対する結合性を評価するために、左右の線条体に α -Syn 凝集体および PBS を接種したモデルマウス(C57BL/6J, 5-week-old, male)を用いた *ex vivo* ARG 実験を行った。その結果を Figure 2-21 に示す。PBS を接種した右側線条体においては、顕著な放射能集積は認められず、ThS 染色においても陰性であることを認めた。一方、 α -Syn 凝集体を接種した左側線条体においては、対側と比べて顕著に高い放射能集積が認められ、同一切片を用いた ThS 染色においても陽性であったことから、この放射能集積は[¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2)の α -Syn 凝集体への結合を反映することが示された。

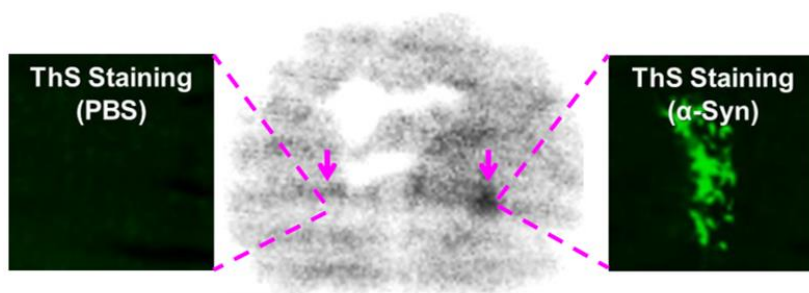


Figure 2-21. An *ex vivo* autoradiogram after injection of [¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2) into the C57BL/6J mouse inoculated with α -Syn aggregates and PBS, and fluorescent staining with ThS in the striatal of the mouse brain section.

PET/CT 撮像

左右の線条体に α -Syn 凝集体および A β 凝集体を接種した C57BL/6J マウスを用いた PET/CT 撮像を行い、[¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2)の α -Syn イメージングプローブとしての有用性について評価した。その結果を Figure 2-22 に示す。A β 凝集体を接種した右側線条体では ThS 由来の蛍光シグナルが認められたものの、PET 撮像においては周囲と比べて顕著に高い放射能集積を認めなかった。一方、 α -Syn 凝集体を接種した左側線条体では、対側と同様に ThS 由来の蛍光シグナルが認められ、さらに PET 撮像において対側と比較して顕著に高い放射能集積が認められたことから、この放射能集積は[¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2)の α -Syn 凝集体への選択的な結合を反映することが示された。

以上の結果より、[¹⁸F]17 ([¹⁸F]FHCL-2)は生体で α -Syn 凝集体への選択的結合性を示すことが明らかとなり、 α -Syn 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。

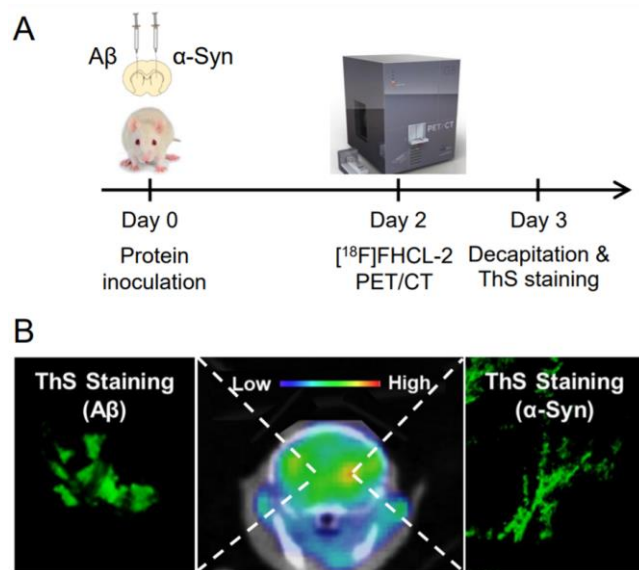


Figure 2-22. The experimental procedure (A). A PET/CT image after injection of [18 F]17 ([18 F]FHCL-2) into the C57BL/6J mouse inoculated with α -Syn aggregates and A β aggregates, and fluorescent staining with ThS in the striatal of the mouse brain section (B).

2.3.6. 小括

本項において、 $[^{18}\text{F}]$ FPHNP-3 をリード化合物として、CNS MPO score とその構成パラメーターとの相関性に着目することで α -Syn 凝集体の生体イメージングに向けた構造最適化を図り、以下に述べる結果を得た。

- (1) $\text{A}\beta$ 凝集体、Tau 凝集体、および α -Syn 凝集体を標的とした既存のイメージングプローブと種々のカルコン類縁体を含む化合物群において、CLogP 値と CNS MPO score との間に高い相関が認められた。
- (2) CNS MPO score を 4 以上に維持しながら、 $[^{18}\text{F}]$ FPHNP-3 より水溶性を増大させるよう、 $[^{18}\text{F}]$ FPHNP-3 における ^{18}F と芳香環との間に水溶性リンカーを導入させた ^{18}F 標識カルコン類縁体を設計・合成した。
- (3) ThT を競合リガンドとした競合阻害実験において、**16** (FHCL-1)および **17** (FHCL-2)は、 $\text{A}\beta$ 凝集体に対する結合性を示さず、 α -Syn 凝集体への高い結合親和性および結合選択性を示したことから、カルコン類縁体構造への水溶性リンカーを介した ^{18}F の導入は、 α -Syn 凝集体への結合特性に顕著な影響を及ぼさないことを認めた。
- (4) トシル標識前駆体を用いた 2 段階の ^{18}F 標識反応により得られた $[^{18}\text{F}]$ **16** ($[^{18}\text{F}]$ FHCL-1)および $[^{18}\text{F}]$ **17** ($[^{18}\text{F}]$ FHCL-2)は CNS MPO score に相関して高い脳移行性を示した。
- (5) α -Syn 凝集体を脳内に接種したモデルマウスを用いた *ex vivo* ARG 実験において、 $[^{18}\text{F}]$ **17** ($[^{18}\text{F}]$ FHCL-2)は脳内の α -Syn 凝集体に対する結合性を示すことを認め、本プローブを用いた PET/CT 撮像において、脳内の α -Syn 凝集体を選択的かつ明瞭に描出した。

以上の結果より、カルコン類縁体構造を基盤とした $[^{18}\text{F}]$ **17** ($[^{18}\text{F}]$ FHCL-2)は、 α -Syn 凝集体に対する優れた結合親和性、結合選択性、および良好なマウス脳移行性を示し、本プローブを用いて α -Syn 凝集体の生体イメージングの実現可能性が示された。

結 語

本研究では、神経変性疾患の代表的な疾患であるアルツハイマー病(AD)およびパーキンソン病(PD)の早期診断や治療薬開発を目的として、Tau 凝集体および α -Syn 凝集体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. 第1章では、Tau 凝集体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、著者の所属分野で見出されたベンゾイミダゾピリジン(BIP)母核に種々のアミノ基を導入したBIP 誘導体を設計・合成し、その Tau イメージングプローブとしての有用性を評価した。第1節では、BIP を母核とする Tau イメージングプローブの開発において、至適なアミノ基が存在することを見出し、エチルアミノ基を導入した $^{123/125}$ I]BIP-NHEt が、AD 患者剖検脳組織切片上の Tau 凝集体に対する優れた結合親和性および結合選択性、マウス脳移行性を示した。第2節では、定量性や空間分解能に優れる PET 用 Tau イメージングプローブの開発を計画し、 $^{123/125}$ I]BIP-NHEt をリード化合物としてエチルアミノ基を介して放射性フッ素を導入した BIP 誘導体を設計・合成した。 ^{18}F]IBIPF1 は Tau 凝集体を選択的かつ明瞭に描出した。また、高いマウス脳移行性を示し、マウス脳内において高い割合で安定に存在することを認めた。以上の結果より、 ^{18}F]IBIPF1 が PET 用 Tau イメージングプローブとして機能し得ることを見出した。
2. 第2章では、 α -Syn凝集体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、京都大学大学院薬学研究科および著者の所属分野において構築された化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを行うことで、 α -Syn凝集体への高い結合親和性を示す化合物としてKPTJ10017およびIDP-3を見出した。第1節では、KPTJ10017の化学構造式中のビスキノリン(BQ)骨格を保持し、ヒドロキシ基を介してフルオロエチル基を導入したBQ誘導体を設計・合成した。 ^{18}F]BQ2は α -Syn凝集体への高い結合親和性およびマウス脳移行性を示し、BQ骨格を基盤としたPETプローブ化に成功した。一方、本プローブはA β 凝集体への高い結合親和性を示したことから、 α -Syn凝集体への結合選択性の向上が求められた。第2節では、IDP-3の化学構造式中のカルコン類縁体構造に着目し、種々のアリアル置換基を導入することで α -Syn凝集体への結合性に関する構造活性相関研究を行った。 $^{123/125}$ I]PHNP-3は α -Syn凝集体への優れた結合親和性および結合選択性を示し、 α -Synイメージングプローブの開発に向けた有望なリード化合物となり得ることが示された。一方、本化合物のマウス脳移行性は低値を示した。第3節では、計算科学的手法としてCentral Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO)アルゴリズムを用いた合理的な分子設計を行い、 α -Syn凝集体への優れた結合性およびマウス脳移行性を示す ^{18}F]FPHNP-3を得た。脳内に α -Syn凝集体を接種したモデルマウスを作製し、本プローブを用いてPETイメージングを行ったものの、 α -Syn凝集体の明瞭な描出には至らなかった。そこで、CNS MPO scoreとその構成パラメーターとの相関性に

着目した構造最適化を図り、水溶性リンカーを介して ^{18}F を導入したカルコン類縁体を設計・合成した。 $[^{18}\text{F}]\text{FHCL-2}$ は良好な $\alpha\text{-Syn}$ 結合性およびマウス脳移行性を示し、本プローブを用いてPETイメージングを行った結果、 $\alpha\text{-Syn}$ 凝集体を選択的かつ明瞭に画像化することに成功した。以上の結果より、 $[^{18}\text{F}]\text{FHCL-2}$ がPET用 $\alpha\text{-Syn}$ イメージングプローブとして機能し得ることを見出した。

以上、本研究はADおよびPDにおけるTau凝集体および $\alpha\text{-Syn}$ 凝集体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成果を収めたものであり、ADおよびPD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. Martínez-Iglesias O, Naidoo V, Cacabelos N, Cacabelos R., Epigenetic biomarkers as diagnostic tools for neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*, **23**, 13 (2021).
2. Przedborski, S, Vila M, Jackson-Lewis V, Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*, **111**, 3-10 (2003).
3. Klunk W E, Biological markers of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **19**, 145-147 (1998).
4. Jack C R, Jr Knopman D S, Jagust W J, Shaw L M, Aisen P S, Weiner M W, Petersen R C, Trojanowski J Q, Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*, **9**, 119-128 (2010).
5. Tejjido O, Cacabelos R, Pharmacoeepigenomic interventions as novel potential treatments for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Int J Mol Sci*, **19**, 3199 (2018).
6. Spillantini M G, Schmidt M L, Lee V M, Trojanowski J Q, Jakes R, Goedert M, α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, **388**, 839-840 (1997).
7. Nelson P T, Alafuzoff I, Bigio E H, Bouras C, Braak H, Cairns N J, Castellani R J, Crain B J, Davies P, Del Tredici K et al., Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*, **71**, 362-381 (2012).
8. Villemagne V L, Fodero-Tavoletti M T, Masters C L, Rowe C C, Tau imaging: early progress and future directions. *Lancet Neurol*, **14**, 114-124 (2015).
9. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos R A, Jansen Steur E N, Braak E, Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, **24**, 197-211 (2003).
10. Lee H J, Bae E J, Lee S J, Extracellular α -synuclein a novel and crucial factor in Lewy body diseases. *Nat Rev Neurol*, **10**, 92-98 (2014).
11. Maltais D D, Jordan L G, Min H K, Miyagawa T, Przybelski S A, Lesnick T G, Reichard R R, Dickson D W, Murray M E, Kantarci K et al., Confirmation of [¹²³I]-FP-CIT SPECT quantification methods in dementia with Lewy bodies and other neurodegenerative disorders. *J Nucl Med*, **61**, 1628-1635 (2020).
12. Leuzy A, Chiotis K, Lemoine L, Gillberg P G, Almkvist O, Rodriguez-Vieitez E, Nordberg A, Tau PET imaging in neurodegenerative tauopathies-still a challenge. *Mol Psychiatry*, **24**, 1112-1134 (2019).
13. Rowley P A, Samsonov A A, Betthausen T J, Pirasteh A, Johnson S C, Eisenmenger L B, Amyloid and tau PET imaging of Alzheimer disease and other neurodegenerative conditions. *Semin Ultrasound CT MR*, **41**, 572-583 (2020).
14. Ono M, Watanabe H, Kitada A, Matsumura K, Ihara M, Saji H, Highly selective tau-SPECT imaging probes for detection of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Sci Rep*, **6**, 34197 (2016).
15. Kaide S, Ono M, Watanabe H, Kitada A, Yoshimura M, Shimizu Y, Ihara M, Saji H, Structure-activity relationships of radioiodinated benzoimidazopyridine derivatives for detection of tau pathology. *ACS Med Chem Lett*, **9**, 478-483 (2018).

16. Kaide S, Watanabe H, Shimizu Y, Tatsumi H, Iikuni S, Nakamoto Y, Togashi K, Ihara M, Saji H, Ono M, ¹⁸F-labeled benzimidazopyridine derivatives for PET imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem*, **27**, 3587-3594 (2019).
17. Ni R, Nitsch R M, Recent developments in positron emission tomography tracers for proteinopathies imaging in dementia. *Front Aging Neurosci*, **13**, 751897 (2021).
18. Kaide S, Watanabe H, Shimizu Y, Iikuni S, Nakamoto Y, Hasegawa M, Itoh K, Ono M, Identification and evaluation of bisquinoline scaffold as a new candidate for α -synuclein-PET imaging. *ACS Chem Neurosci*, **11**, 4254-4261 (2020).
19. Kaide S, Watanabe H, Iikuni S, Hasegawa M, Itoh K, Ono M, Chalcone analogue as new candidate for selective detection of α -synuclein pathology. *ACS Chem Neurosci*, **13**, 16-26 (2022).
20. World Alzheimer Report 2018: Alzheimer's disease international (2018).
21. 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, **17**, 327-406 (2021).
22. Long J M, Holtzman D M, Alzheimer Disease: an update on pathobiology and treatment strategies. *Cell*, **179**, 312-339 (2019).
23. Yang P, Sun F, Aducanumab: The first targeted Alzheimer's therapy. *Drug Discov Ther*, **15**, 166-168 (2021).
24. Ariza M, Kolb H C, Moechars D, Rombouts F, Andrés J I, Tau positron emission tomography (PET) imaging: past, present, and future. *J Med Chem*, **58**, 4365-4382 (2015).
25. Sperling R A, Aisen P S, Beckett L A, Bennett D A, Craft S, Fagan A M, Iwatsubo T, Jack, C R Jr, Kaye J, Montine T J et al., Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the national institute on aging-Alzheimer's association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, **7**, 280-292 (2011).
26. Clark C M, Schneider J A, Bedell B J, Beach T G, Bilker W B, Mintun M A, Pontecorvo M J, Hefti F, Carpenter A P, Flitter M L et al., Use of florbetapir-PET for imaging β -amyloid pathology. *JAMA*, **305**, 275-283 (2011).
27. Rowe C C, Ackerman U, Browne W, Mulligan R, Pike K L, O'Keefe G, Tochon-Danguy H, Chan G, Berlangieri S U, Jones G 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).
28. Vandenberghe R, Van Laere K, Ivanoiu A, Salmon E, Bastin C, Triau E, Hasselbalch S, Law I, Andersen A, Korner A et al., ¹⁸F-Flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial. *Ann Neurol*, **68**, 319-329 (2010).
29. Villemagne V L, Doré V, Burnham S C, Masters C L, Rowe C C, Imaging tau and amyloid- β proteinopathies in Alzheimer disease and other conditions. *Nat Rev Neurol*, **14**, 225-236 (2018).
30. Maruyama M, Shimada H, Suhara T, Shinotoh H, Ji B, Maeda J, Zhang M R, Trojanowski J Q, Lee V M, Ono M et al., Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron*, **79**, 1094-1108 (2003).

31. Xia C F, Arteaga J, Chen G, Gangadharmath U, Gomez L F, Kasi D, Lam C, Liang Q, Liu C, Mocharla V P et al., [¹⁸F]T807, a novel tau positron emission tomography imaging agent for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, **9**, 666-676 (2013).
32. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Tago T, Hiraoka K, Watanuki S, Shidahara M et al., ¹⁸F-THK5351: a novel PET radiotracer for imaging neurofibrillary pathology in Alzheimer disease. *J Nucl Med*, **57**, 208-214 (2016).
33. Walji A M, Hostetler E D, Selnick H, Zeng Z, Miller P, Bennacef I, Salinas C, Connolly B, Gantert L, Holahan M et al., Discovery of 6-(Fluoro-¹⁸F)-3-(1H-pyrrolo[2,3-c]pyridin-1-yl)isoquinolin-5-amine ([¹⁸F]-MK-6240): a positron emission tomography (PET) imaging agent for quantification of neurofibrillary tangles (NFTs). *J Med Chem*, **59**, 4778-4789 (2016).
34. Gobbi L C, Knust H, Körner M, Honer M, Czech C, Belli S, Muri D, Edelmann M R, Hartung T, Erbsmehl I et al., Identification of three novel radiotracers for imaging aggregated tau in Alzheimer's disease with positron emission tomography. *J Med Chem*, **60**, 7350-7370 (2017).
35. Rombouts F J, Andrés J I, Ariza M, Alonso J M, Austin N, Bottelbergs A, Chen L, Chupakhin V, Cleiren E, Fierens K et al., Discovery of *N*-(Pyridin-4-yl)-1,5-naphthyridin-2-amines as potential tau pathology PET tracers for Alzheimer's disease. *J Med Chem*, **60**, 1272-1291 (2017).
36. Rombouts F J R, Declercq L, Andrés J I, Bottelbergs A, Chen L, Iturrino L, Leenaerts J E, Mariën J, Song F, Wintmolders C et al., Discovery of *N*-(4-[¹⁸F]Fluoro-5-methylpyridin-2-yl)isoquinolin-6-amine (JNJ-64326067), a new promising tau positron emission tomography imaging tracer. *J Med Chem*, **62**, 2974-2987 (2019).
37. Kroth H, Oden F, Molette J, Schieferstein H, Capotosti F, Mueller A, Berndt M, Schmitt-Willich H, Darmency V, Gabellieri E et al., Discovery and preclinical characterization of [¹⁸F]PI-2620, a next-generation tau PET tracer for the assessment of tau pathology in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **46**, 2178-2189 (2019).
38. Ono M, Saji H, SPECT imaging agents for detecting cerebral β -amyloid plaques. *Int J Mol Imaging*, **2011**, 543267 (2011).
39. Hashimoto H, Kawamura K, Igarashi N, Takei M, Fujishiro T, Aihara Y, Shiomi S, Muto M, Ito T, Furutsuka K et al., Radiosynthesis, photoisomerization, biodistribution, and metabolite analysis of ¹¹C-PBB3 as a clinically useful PET probe for imaging of tau pathology. *J Nucl Med*, **55**, 1532-1538 (2014).
40. Okamura N, Harada R, Furumoto S, Arai H, Yanai K, Kudo Y, Tau PET imaging in Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, **14**, 500 (2014).
41. Villemagne V L, Barkhof F, Garibotto V, Landau S M, Nordberg A, van Berckel B N M, Molecular imaging approaches in dementia. *Radiology*, **298**, 517-530 (2021).
42. Fodero-Tavoletti M T, Okamura N, Furumoto S, Mulligan R S, Connor A R, McLean C A, Cao D, Rigopoulos A, Cartwright G A, O'Keefe G et al., ¹⁸F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for

- Alzheimer's disease. *Brain*, **134**, 1089-1100 (2011).
43. Yoshimura M, Ono M, Matsumura K, Watanabe H, Kimura H, Cui M, Nakamoto Y, Togashi K, Okamoto Y, Ihara M 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).
 44. Dishino D D, Welch M J, Kilbourn M R, Raichle M E, Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11-labeled radiopharmaceuticals. *J Nucl Med*, **24**, 1030-1038 (1983).
 45. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Yanai K, Imaging protein misfolding in the brain using β -sheet ligands. *Front Neurosci*, **12**, 585 (2018).
 46. Choi S R, Golding G, Zhuang Z, Zhang W, Lim N, Hefti F, Benedum T E, Kilbourn M R, Skovronsky D, Kung H F, Preclinical properties of ^{18}F -AV-45: a PET agent for A β plaques in the brain. *J Nucl Med*, **50**, 1887-1894 (2009).
 47. Dorsey E R, Bloem B R, The parkinson pandemic-a call to action. *JAMA Neurol*, **75**, 9-10 (2018).
 48. Postuma R B, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow C W, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang A E et al., MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*, **30**, 1591-1601 (2015).
 49. Korat Š, Bidesi N S R, Bonanno F, Di Nanni A, Hoàng A N N, Herfert K, Maurer A, Battisti U M, Bowden G D, Thonon D et al., α -Synuclein PET tracer development-an overview about current efforts. *Pharmaceuticals (Basel)*, **14**, 847 (2021).
 50. Bendor J T, Logan T P, Edwards R H, The function of α -synuclein. *Neuron*, **79**, 1044-1066 (2013).
 51. Doty R L, Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*, **8**, 329-339 (2012).
 52. Uzuegbunam B C, Librizzi D, Hooshyar Yousefi B, PET radiopharmaceuticals for Alzheimer's disease and Parkinson's disease diagnosis, the current and future landscape. *Molecules*, **25**, 977 (2020).
 53. Van der Schyf C J, Rational drug discovery design approaches for treating Parkinson's disease. *Expert Opin Drug Discov*, **10**, 713-741 (2015).
 54. Xu M M, Ryan P, Rudrawar S, Quinn R J, Zhang H Y, Mellick G D, Advances in the development of imaging probes and aggregation inhibitors for α -synuclein. *Acta Pharmacol Sin*, **41**, 483-498 (2020).
 55. Eberling J L, Dave K D, Frasier M A, α -Synuclein imaging: a critical need for Parkinson's disease research. *J Parkinsons Dis*, **3**, 565-567 (2013).
 56. Bagchi D P, Yu L, Perlmutter J S, Xu J, Mach R H, Tu Z, Kotzbauer P T, Binding of the radioligand SIL23 to α -synuclein fibrils in Parkinson disease brain tissue establishes feasibility and screening approaches for developing a Parkinson disease imaging agent. *PLoS One*, **8**, e55031 (2013).
 57. Chu W, Zhou D, Gaba V, Liu J, Li S, Peng X, Xu J, Dhavale D, Bagchi D P, d'Avignon A et al., Design, synthesis, and characterization of 3-(benzylidene)indolin-2-one derivatives as ligands for α -synuclein fibrils. *J Med Chem*, **58**, 6002-6017 (2015).
 58. Verdurand M, Levigoureux E, Zeinyeh W, Berthier L, Mendjel-Herda M, Cadarossanesaib F, Bouillot C, Jecker T, Terreux R, Lancelot S et al., *In silico*, *in vitro*, and *in vivo* evaluation of new candidates for α -synuclein PET imaging. *Mol Pharm*, **15**, 3153-3166 (2018).

59. Ferrie J J, Lengyel-Zhand Z, Janssen B, Lougee M G, Giannakoulis S, Hsieh C J, Pagar V V, Weng C C, Xu H, Graham T J A et al., Identification of a nanomolar affinity α -synuclein fibril imaging probe by ultra-high throughput *in silico* screening. *Chem Sci*, **11**, 12746-12754 (2020).
60. Ono M, Takahashi M, Shimozawa A, Fujinaga M, Mori W, Nagai Y, Mimura K, Kumata K, Kikuchi T, Shimojo M et al., *In vivo* visualization of propagating α -synuclein pathologies in mouse and marmoset models by a bimodal imaging probe, C05-05. *bioRxiv* (2021)
61. Kuebler L, Buss S, Leonov A, Ryazanov S, Schmidt F, Maurer A, Weckbecker D, Landau A M, Lillethorup T P, Bleher D et al., [¹¹C]MODAG-001-towards a PET tracer targeting α -synuclein aggregates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **48**, 1759-1772 (2021).
62. Yu L, Cui J, Padakanti P K, Engel L, Bagchi D P, Kotzbauer P T, Tu Z, Synthesis and *in vitro* evaluation of α -synuclein ligands. *Bioorg Med Chem*, **20**, 4625-4634 (2012).
63. Yue X, Dhavale D D, Li J, Luo Z, Liu J, Yang H, Mach R H, Kotzbauer P T, Tu Z, Design, synthesis, and *in vitro* evaluation of quinolinyl analogues for α -synuclein aggregation. *Bioorg Med Chem Lett*, **28**, 1011-1019 (2018).
64. Hsieh C J, Xu K, Lee I, Graham T J A, Tu Z, Dhavale D, Kotzbauer P, Mach R H, Chalcones and five-membered heterocyclic isosteres bind to α -synuclein fibrils *in vitro*. *ACS Omega*, **3**, 4486-4493 (2018).
65. Ono M, Doi Y, Watanabe H, Ihara M, Ozaki A, Saji H, Structure–activity relationships of radioiodinated diphenyl derivatives with different conjugated double bonds as ligands for α -synuclein aggregates. *RSC Adv*, **6**, 44305-44312 (2016).
66. Kishner N, *J Russ Phys Chem Soc*, **43**, 582–595 (1911).
67. Wolff L, Methode zum ersatz des sauerstoffatoms der ketone und aldehyde durch wasserstoff. *Ann*, **394**, 86-108 (1912).
68. Kotzbauer P T, Cairns N J, Campbell M C, Willis A W, Racette B A, Tabbal S D, Perlmuter J S, Pathologic accumulation of α -synuclein and A β in Parkinson disease patients with dementia. *Arch Neurol*, **69**, 1326-1331 (2012).
69. Berg D, Postuma R B, Bloem B, Chan P, Dubois B, Gasser T, Goetz C G, Halliday G M, Hardy J, Lang A E et al., Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS task force on the definition of Parkinson's disease. *Mov Disord*, **29**, 454-462 (2014).
70. Irwin D J, Grossman M, Weintraub D, Hurtig H I, Duda J E, Xie S X, Lee E B, Van Deerlin V M, Lopez O L, Kofler J K et al., Neuropathological and genetic correlates of survival and dementia onset in synucleinopathies: a retrospective analysis. *Lancet Neurol*, **16**, 55-65 (2017).
71. Watanabe H, Ariyoshi T, Ozaki A, Ihara M, Ono M, Saji H, Synthesis and biological evaluation of novel radioiodinated benzimidazole derivatives for imaging α -synuclein aggregates. *Bioorg Med Chem*, **25**, 6398-6403 (2017).
72. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M, Myelin in the central nervous system:

- structure, function, and pathology. *Physiol Rev*, **99**, 1381-1431 (2019).
73. Harauz G, Ishiyama N, Hill C M, Bates I R, Libich D S, Farès C, Myelin basic protein-diverse conformational states of an intrinsically unstructured protein and its roles in myelin assembly and multiple sclerosis. *Micron*, **35**, 503-542 (2004).
 74. Lemoine L, Gillberg P G, Svedberg M, Stepanov V, Jia Z, Huang J, Nag S, Tian H, Ghetti B, Okamura N et al., Comparative binding properties of the tau PET tracers THK5117, THK5351, PBB3, and T807 in postmortem Alzheimer brains. *Alzheimers Res Ther*, **9**, 96 (2017).
 75. Vermeiren C, Motte P, Viot D, Mairet-Coello G, Courade J P, Citron M, Mercier J, Hannestad J, Gillard M, The tau positron-emission tomography tracer AV-1451 binds with similar affinities to tau fibrils and monoamine oxidases. *Mov Disord*, **33**, 273-281 (2018).
 76. Ono M, Hori M, Haratake M, Tomiyama T, Mori H, Nakayama M, Structure-activity relationship of chalcones and related derivatives as ligands for detecting of β -amyloid plaques in the brain. *Bioorg Med Chem*, **15**, 6388-6396 (2007).
 77. Hsieh C J, Ferrie J J, Xu K, Lee I, Graham T J A, Tu Z, Yu J, Dhavale D, Kotzbauer P, Petersson E J et al., α -Synuclein fibrils contain multiple binding sites for small molecules. *ACS Chem Neurosci*, **9**, 2521-2527 (2018).
 78. Thapa P, Upadhyay S P, Suo W Z, Singh V, Gurung P, Lee E S, Sharma R, Sharma M, Chalcone and its analogs: Therapeutic and diagnostic applications in Alzheimer's disease. *Bioorg Chem*, **108**, 104681 (2021).
 79. Wittig G, Scholkopf U, *Ber*, **87**, 1318 (1954).
 80. Claisen L, A Claparede, Condensationen von ketonen mit aldehyden. *Ber Deut Chem Ges*, **14**, 2460-2468 (1881).
 81. J Gustav Schmidt, Ueber die einwirkung von aceton auf furfurol und auf bittermandelöl bei gegenwart von alkalilauge, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. **14**, 1459–1461 (1881).
 82. Lockhart A, Ye L, Judd D B, Merritt A T, Lowe P N, Morgenstern J L, Hong G, Gee A D, Brown J, Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on β -amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem*, **280**, 7677-7684 (2005).
 83. Ye L, Morgenstern J L, Gee A D, Hong G, Brown J, Lockhart A, Delineation of positron emission tomography imaging agent binding sites on β -amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem*, **280**, 23599-23604 (2005).
 84. Lengyel-Zhand Z, Ferrie J J, Janssen B, Hsieh C J, Graham T, Xu K Y, Haney C M, Lee V M, Trojanowski J Q, Petersson E J et al., Synthesis and characterization of high affinity fluorogenic α -synuclein probes. *Chem Commun (Camb)*, **56**, 3567-3570 (2020).
 85. Lázníček M, Květina J, Mazák J, Krch V, Plasma protein binding-lipophilicity relationships: interspecies comparison of some organic acids. *J Pharm Pharmacol*, **39**, 79-83 (1987).
 86. Jones D R, Hall S D, Jackson E K, Branch R A, Wilkinson G R, Brain uptake of benzodiazepines: effects

- of lipophilicity and plasma protein binding. *J Pharmacol Exp Ther*, **245**, 816-822 (1988).
87. Wager T T, Hou X, Verhoest P R, Villalobos A, Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS Chem Neurosci*, **1**, 435-449 (2010).
 88. Wager T T, Hou X, Verhoest P R, Villalobos A, Central nervous system multiparameter optimization desirability: application in drug discovery. *ACS Chem Neurosci*, **7**, 767-775 (2016).
 89. Zhang L, Villalobos A, Beck E M, Bocan T, Chappie T A, Chen L, Grimwood S, Heck S D, Helal C J, Hou X et al., Design and selection parameters to accelerate the discovery of novel central nervous system positron emission tomography (PET) ligands and their application in the development of a novel phosphodiesterase 2A PET ligand. *J Med Chem*, **56**, 4568-4579 (2013).
 90. Zhang L, Chen L, Beck E M, Chappie T A, Coelho R V, Doran S D, Fan K H, Helal C J, Humphrey J M, Hughes Z et al., The discovery of a novel phosphodiesterase (PDE) 4B-preferring radioligand for positron emission tomography (PET) imaging. *J Med Chem*, **60**, 8538-8551 (2017).
 91. Lindberg A, Knight A C, Sohn D, Rakos L, Tong J, Radelet A, Mason N S, Stehouwer J S, Lopresti B J, Klunk W E et al., Radiosynthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation of [¹⁸F]CBD-2115 as a first-in-class radiotracer for imaging 4R-tauopathies. *ACS Chem Neurosci*, **12**, 596-602 (2021).
 92. Urbina F, Zorn K M, Brunner D, Ekins S, Comparing the pfizer central nervous system multiparameter optimization calculator and a BBB machine learning model. *ACS Chem Neurosci*, **12**, 2247-2253 (2021).
 93. Murrell E, Tong J, Smil D, Kiyota T, Aman A M, Isaac M B, Watson I D G, Vasdev N, Leveraging open science drug development for PET: preliminary neuroimaging of ¹¹C-labeled ALK2 inhibitors. *ACS Med Chem Lett*, **12**, 846-850 (2021).
 94. Tawada M, Fushimi M, Masuda K, Sun H, Uchiyama N, Kosugi Y, Lane W, Tjhen R, Endo S, Koike T, Discovery of a novel and brain-penetrant O-GlcNAcase inhibitor via virtual screening, structure-based analysis, and rational lead optimization. *J Med Chem*, **64**, 1103-1115 (2021).
 95. Ishiyama T, Murata M, Miyaura N, Palladium(0)-catalyzed cross-coupling reaction of alkoxydiboron with haloarenes: a direct procedure for arylboronic esters. *J Org Chem*, **60**, 7508-7510 (1995).
 96. Tagai K, Ono M, Kubota M, Kitamura S, Takahata K, Seki C, Takado Y, Shinotoh H, Sano Y, Yamamoto Y et al., High-contrast *in vivo* imaging of tau pathologies in Alzheimer's and non-Alzheimer's disease tauopathies. *Neuron*, **109**, 42-58 (2021).
 97. Pennington L D, Moustakas D T, The necessary nitrogen atom: a versatile high-impact design element for multiparameter optimization. *J Med Chem*, **60**, 3552-3579 (2017).
 98. Tago T, Furumoto S, Okamura N, Harada R, Adachi H, Ishikawa Y, Yanai K, Iwata R, Kudo Y, Structure-activity relationship of 2-arylquinolines as PET imaging tracers for tau pathology in Alzheimer disease. *J Nucl Med*, **57**, 608-614 (2016).

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 小野 正博 教授ならびに佐治 英郎 名誉教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

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 渡邊 裕之 講師に厚く御礼申し上げます。

同時に、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 飯國 慎平 助教に厚く御礼申し上げます。

懇切なる御指導を戴きました、神戸薬科大学 佐野 紘平 准教授ならびに京都大学医学部附属病院 志水 陽一 講師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 吉村 優志 博士、北田 彩音 学士、辰巳 悠華 学士に深く感謝申し上げます。

α -シヌクレインタンパク質凝集体を用いた実験に御助言と御協力を戴きました、東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野ならびに脳・神経科学研究分野 長谷川 成人 分野長に深く感謝申し上げます。

アルツハイマー病患者およびシヌクレイノパチー患者剖検脳組織切片を用いた実験に御助言と御協力を戴きました、京都大学大学院医学研究科 脳神経内科 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、京都府立医科大学 伊東 恭子 教授に深く感謝申し上げます。

化合物ライブラリーを御提供戴きました、京都大学大学院薬学研究科 ファーマコゲノミクス・ケモゲノミクス創薬コアラボ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 松岡 大航 博士、丁寧 博士、藤之原 優 修士、松下 直樹 修士、垂水 勇太 修士、金田 侑子 学士、川崎 梓 学士、有吉 泰亮 学士、河合 良子 学士、谷村 圭一 学士、福井 謙吾 学士、三木 裕典 学士、中川 航平 学士、赤坂 貴浩 学士、長嶋 浩太郎 さん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。