

アミロイド β オリゴマーを標的とした
蛍光イメージングプローブの開発に関する研究

2025

赤坂 貴浩

目次

緒言	1	
第1章	生体内におけるAβオリゴマーの選択的検出を目的とした蛍光イメージングプローブの開発と最適化	3
第1節	Aβオリゴマー標的蛍光イメージングプローブの開発を目的とした BODIPY 誘導体の構造活性相関	4
1.1.1	実験方法	5
1.1.2	結果と考察	19
1.1.3	小括	43
第2節	生体蛍光イメージングへの応用性の向上を目的とした BODIPY 誘導体の構造最適化	44
1.1.1	実験方法	45
1.1.2	結果と考察	53
1.1.3	小括	80
第2章	バイオアッセイにおける Aβオリゴマーの選択的検出を可能とする蛍光イメージングプローブの開発	81
2.1	実験方法	82
2.2	結果と考察	90
2.3	小括	110
結語	111	
引用文献	112	
学術雑誌公表論文	119	
謝辞	120	

緒言

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)は認知症の最大の要因であり、その患者数は世界的に増加している。AD患者の脳内に過剰に蓄積するペプチドであるアミロイド β (amyloid β ; A β)は、A β フィブリルと呼ばれる不溶性の凝集体を形成し、発症前より脳内に沈着する¹ことから、ADのバイオマーカーとして注目されてきた^{2,3}。しかし、健常者においてもA β フィブリルの蓄積が認められる⁴ことから、新たなバイオマーカーの探索が求められている。A β は凝集過程において、A β オリゴマーと呼ばれる可溶性の凝集体を形成することが知られており、A β フィブリルよりも早期に脳内に蓄積することが報告されている⁵。加えて、A β オリゴマーはA β の凝集形態の中で、最も高い毒性を有することが示唆されており^{6,7}、ADのバイオマーカーおよび治療標的として近年注目を集めている。したがって、A β オリゴマーを標的としたイメージング法の開発はADの病態解明、早期診断、治療薬開発に重要であるが、これまでにA β オリゴマーの選択的検出法は確立されていない。蛍光イメージングは汎用性の高いイメージング法であり、蛍光プローブを用いることにより、標的の高感度かつリアルタイムな検出を可能とする⁸。そこで本研究では、A β オリゴマーの選択的検出に資する新規蛍光イメージングプローブの開発を行った。

A β オリゴマーの詳細な構造は未だ解明されておらず⁹、蛍光プローブの論理的な分子設計は困難である。そこで、所属研究室で開発されたA β フィブリル標的蛍光プローブであるボロンジピロメテン(BODIPY)誘導体のBAP-1¹⁰をリード化合物として、置換基や共役系などを変換した18化合物を設計・合成し、構造活性相関研究を実施した。候補化合物のA β オリゴマーおよびA β フィブリル存在下における蛍光強度を測定したところ、BAOP-16が最も高いA β オリゴマー選択性を示した。BAOP-16のA β オリゴマー標的蛍光プローブとしての有用性を評価するために、A β を過剰発現する遺伝子組換えマウス(APP^{NL-G-F/NL-G-F}マウス¹¹)の脳組織切片を用いた蛍光染色および生体蛍光イメージングを実施したところ、A β オリゴマーの可視化に成功した。これらの結果より、BAOP-16はA β オリゴマーの生体検出に応用可能であることが示唆された。

生体蛍光イメージングにおいて、組織透過性の高い長波長領域の光を吸収する蛍光プローブは明瞭なイメージング画像の取得を可能にする。そこで、BAOP-16の生体蛍光イメージングにおける応用性を向上するために、吸収・蛍光波長の長波長化によるA β オリゴマー検出能の改善を企図した5化合物を新たに設計・合成し、A β オリゴマー標的蛍光プローブとしての有用性を評価した。なかでもBAOP-24がA β オリゴマーに対する高い選択性を維持しつつ、吸収・蛍光波長の長波長化およびA β オリゴマーの検出感度の向上を示した。BAOP-24を用いて生体蛍光イメージングを実施したところ、APP^{NL-G-F/NL-G-F}マウスの頭部において正常マウスと比較して強い蛍光シグナルが認められた。これらの結果より、BAOP-24が生体内A β オリゴマーの選択的検出に資する蛍光イメージングプローブ

として有用であることが示唆された。

細胞などを用いるバイオアッセイにおいて、蛍光プローブによるA β オリゴマーの選択的検出は、ADの発症メカニズムの解明に貢献すると考えられる。しかし、BAOP-16は脂溶性と平面性の高さから、水系溶媒への溶解性が低く、バイオアッセイへの応用は限定的である。そこで、水系溶媒に対して高い溶解性を有するA β オリゴマー標的蛍光プローブの開発を行った。BAOP-16をリード化合物として、水溶性の高い置換基の導入とさらなる構造展開を行うことにより5化合物を新たに設計・合成し、A β オリゴマー標的蛍光プローブとしての有用性を評価した。A β オリゴマーおよびA β フィブリル存在下における蛍光特性および水系溶媒に対する溶解性を評価した結果、sBAOP-2-3はA β オリゴマーに対する高い選択性を示すとともに、優れた水溶性を有することが明らかとなった。さらに、sBAOP-2-3はA β 凝集過程の追跡や細胞を用いたアッセイ、APP^{NL-G-F/NL-G-F}マウスの脳組織切片を用いた蛍光染色において、A β オリゴマーを選択的に検出可能であることが示された。これらの結果より、sBAOP-2-3がバイオアッセイに応用可能なA β オリゴマー標的蛍光プローブとして有用であることが示された。

以上、本研究はA β オリゴマーを標的とした蛍光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、これらの知見はADの病態解明、早期診断、治療薬開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

これらの結果について、以下に詳述する。

第1章

生体内における A β オリゴマーの選択的検出を目的とした 蛍光イメージングプローブの開発と最適化

背景

高齢化社会の到来に伴い、認知症の罹患者数は急速に増加しており、2050年には全世界で1億5280万人に達すると推測されている¹²。認知症は高齢者の主要な死因である⁹だけでなく、介護者への重い負担や医療費増大の原因となっている¹³。アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は認知症の最大の原因であるが、発症メカニズムは未だ解明されておらず、早期診断法や根治療法の開発が求められている。ADの病理的特徴の1つとして、39–43 残基のアミノ酸から構成されるペプチドであるアミロイド β (amyloid β ; A β) の、脳内における過剰な蓄積が挙げられる^{14, 15}。A β は凝集することで脳内において多様な形態をとることが知られており、なかでも不溶性の線維状凝集体である A β フィブリルは AD の発症以前より脳内に沈着する¹ことから、AD の早期診断を目的としたイメージングプローブの標的として用いられてきた^{2, 3}。しかしながら、A β フィブリルは健常者の脳内においても認められ⁴、その蓄積量と AD の重症度との間の相関が低いことが報告されている¹⁶。

近年、可溶性の A β 凝集体である A β オリゴマーが A β の凝集形態の中で最も強い毒性を有しており、AD の発症と深く関わっているとする「オリゴマー仮説」が支持されている^{6, 7}。加えて、A β オリゴマーは A β フィブリルより早期に脳内に蓄積する⁵ことが報告されており、AD 診断における新たなバイオマーカーとなり得ると考えられる。さらに、2023年には高分子量の A β オリゴマーである A β プロトフィブリルを標的とした抗体であるレカネマブが臨床試験において A β 凝集体の脳内への蓄積や認知症状の進行を抑制したことが報告された¹⁷。この結果を受け、レカネマブは2023年に米国食品医薬品局および厚生労働省より薬事承認を受けており、A β オリゴマーは治療標的としても注目を集めている。したがって、A β オリゴマーの生体イメージング法の開発は AD の病態解明、早期診断、治療薬開発に貢献すると考えられる。

蛍光イメージングは簡便かつ汎用性の高いイメージング法であり、蛍光プローブを用いることで、標的の高感度かつリアルタイムな検出が可能である⁸。蛍光イメージングに用いられる波長領域の中でも、近赤外領域(650–900 nm)は光の組織透過性が高く、組織由来の自家蛍光や光の散乱が少ない領域として知られている。近赤外領域に吸収・蛍光波長を有する蛍光イメージングプローブは、主にマウスなどの小動物を用いた生体イメージングにおいて有用性が高いツールとして注目されている^{3, 18}。これまでに、A β オリゴマーの生体イメージングを目的として、複数の蛍光イメージングプローブが開発されているが^{19–25}、A β オリゴマーに対する選択性や蛍光波長の長さなどの点において課題があり、A β オリゴマーの生体

イメージング法の確立には至っていない。そこで本章では A β オリゴマーの生体イメージングに応用可能な蛍光イメージングプローブの開発を行った。

第1節 A β オリゴマー標的蛍光イメージングプローブの開発を目的とした BODIPY 誘導体の構造活性相関

A β オリゴマーの詳細な構造は未だ解明されておらず⁹、A β オリゴマーを標的とした蛍光プローブを論理的に設計することは困難である。したがって、構造活性相関(structure-activity relationship; SAR)が A β オリゴマーを標的とした蛍光プローブの開発において有効な戦略であると考えられる。SAR 研究を行うにあたり、ボロンジピロメテン(BODIPY)骨格に着目した。BODIPY は優れた蛍光特性、高い化学的安定性、低い細胞毒性、合成の容易さなどの特徴を有しており^{26,27}、SAR 研究に適した蛍光団であると考えられる。近年、BODIPY を基盤とする A β オリゴマー標的蛍光プローブ(BD-Oligo²³, NB²²)が報告されている。しかしながら、BD-Oligo には蛍光波長が短い($\lambda_{em} < 600$ nm)という課題があり²³、NB には生体応用を行うには脂溶性が高く分子量が大きいという課題がある²²ため、これらのプローブの生体への応用は困難である。そこで本節では A β オリゴマー標的蛍光イメージングプローブの開発を目的として、BODIPY 誘導体の SAR 研究を行った。

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、富士フィルム和光純薬株式会社、Sigma Aldrich 社、BLD Pharmatech 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(ミキサー内臓): No.580D, 検出器(波長固定型): prep UV-254 W, フラクションコレクター: FR-260)を使用し、HI-FLASH COLUMN (充填剤: シリカゲルあるいはアミノプロピル基修飾シリカゲル, ポアサイズ: 60Å, 粒子径: 40 µm, カラムサイズ: M, L あるいは 2L)および INJECT COLUMN (充填剤: シリカゲルあるいはアミノプロピル基修飾シリカゲル, ポアサイズ: 60Å, 粒子径: 40 µm, カラムサイズ: M あるいは L)を装着した。核磁気共鳴分光法には日本電子株式会社製 JEOL JNM-ECS400 あるいは JEOL ECA500 を用い、tetramethylsilane を内部標準物質として測定した。ピークのカップリングは一重線を s, 二重線を d, 三重線を t, 四重線を q, 二重線の二重線を dd, 三重線の二重線を td, 四重線の二重線を qd, 五重線を quin, 多重線を m, ブロードピークを br と記載した。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。高分解能質量分析(high-resolution mass spectrometry; HRMS)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-IT-TOF あるいは日本電子株式会社製二重収束質量分析装置 JMS-700 を用いて測定した。高速液体クロマトグラフィー(high performance liquid chromatography; HPLC)装置には、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 およびユニバーサル技研株式会社製 RI 検出器 US-3000 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 COSMOIL 5C₁₈ AR-II 4.6 mm I.D.×150 mm を使用した。ヒト Aβ ペプチド(1-42)は株式会社ペプチド研究所より購入した。紫外可視分光法には株式会社島津製作所製紫外可視分光光度計 UV-1800 を使用した。蛍光分光法には株式会社島津製作所製蛍光分光光度計 RF-6000 を使用した。マイクロプレートリーダーには TECAN 社製マイクロプレートリーダー Infinite® 200Pro を使用した。¹⁸F は京都大学医学部附属病院から購入した。放射能の測定には PerkinElmer 社製 Wallac WIZARD2480 を使用した。蛍光観察には株式会社キーエンス製オールインワン顕微鏡 BZ-9000 を使用し、明視野観察にはオリンパス株式会社製ボックス型蛍光撮像装置 FSX100 を使用した。生体蛍光イメージングには PerkinElmer 社製 IVIS SPECTRUM イメージングシステムを用いた。

動物

動物実験は京都大学動物実験委員会での承認を得、その指針を遵守して行った。ddY マウスおよび C57BL/6 マウスは日本エスエルシー株式会社より購入した。APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウス¹¹は理化学研究所バイオリソース研究センターより提供を受けた。動物は 12 時間/12 時間の昼夜サイクル条件化で飼育し、飼料と水は自由に与えた。

合成

BAP-1¹⁰, BAP-2²⁸, TAU-1²⁹, TAU-2²⁹, DANIR-2c³⁰, PTO-41²⁵

いずれの化合物についても、既報の合成法に従い、合成した。機器分析データについては既報と一致していることを確認した^{10, 25, 28-30}。

(E)-4-(2-(5,5-Difluoro-1,7,9-trimethyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)-N,N-dimethylaniline (3, BAOP-1)

1,3,5,7-Tetramethyl BODIPY (**1**) (139 mg, 0.56 mmol), 酢酸(364 μL, 6.3 mmol), ピペリジン(364 μL, 3.9 mmol)を 4-(N,N-dimethylamino)benzaldehyde (**2**) (83.4 mg, 0.56 mmol)のトルエン溶液(10 mL)に加え、反応が完了するまで 110°Cで攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/ヘキサン= 30/70)で精製して目的物 **3** を収量 21.6 mg (10%)で得た。 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.63–6.59 (m, 3H), 5.96 (s, 1H), 2.96 (s, 6H), 2.49 (s, 3H), 2.21 (s, 3H), 2.18 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 380.1 [M + H]⁺.

(4-(Dimethylamino)phenyl)methanol (4)

4-(Dimethylamino)benzaldehyde (**2**) (597 mg, 4.0 mmol)の無水メタノール溶液に水素化ホウ素ナトリウム(227 mg, 6.0 mmol)を氷冷下に加え、室温で 30 分間攪拌した。水を加えて反応を停止させた後、酢酸エチル(200 mL)で抽出した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン= 15/85)で精製して目的物 **4** を収量 393 mg (65%)で得た。 ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.54 (s, 2H), 2.96 (s, 6H), 2.70 (s, 1H). MS (ESI) *m/z* 152.1 [M + H]⁺.

(4-(Dimethylamino)benzyl)triphenylphosphonium bromide (5)

化合物 **4** (1.30 g, 8.6 mmol)をトリフェニルホスフィン臭化水素酸塩(3.25 g, 9.5 mmol)のクロロホルム溶液に加え、60°Cで 4 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残渣を 0°Cに冷却したジエチルエーテルに加え、沈殿をフィルターろ過で回収することで目的物 **5** を収量 4.03 g (98%)で得た。 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.63–7.57 (m, 3H), 7.48–7.44 (m, 12H), 6.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.78 (s, 1H), 4.76 (s, 1H), 2.68 (s, 6H). MS (ESI) *m/z* 396.1 [M + H]⁺.

(E)-4-(2-(1H-Pyrrol-2-yl)vinyl)-N,N-dimethylaniline (6)

ナトリウムメトキシド(334 mg, 6.2 mmol)を化合物 **5** (2680 mg, 5.6 mmol)の無水メタノール溶液に氷冷下に加え、室温で 15 分間攪拌した。1H-Pyrrole-2-carbaldehyde (535 mg, 5.6 mmol)を加え、アルゴンガス雰囲気下、60°Cで 6 時間攪拌した。水を加えた後、酢酸エチル(200 mL)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧留

去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン= 10/90)およびアミノプロピル基修飾シリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン= 25/75)で精製して目的物 **6** を収量 59.6 mg (10%)で得た。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (s, 1H), 7.24 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.70 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.67 (dd, J = 4.0, 2.9 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.52 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.20 (dd, J = 5.7, 4.0 Hz, 1H), 6.15 (dd, J = 5.7, 2.9 Hz, 1H), 2.89 (s, 6H). MS (ESI) m/z 213.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(E)-4-(2-(5,5-Difluoro-7,9-dimethyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)-N,N-dimethylaniline (**7**, BAOP-2)

化合物 **6** (59.6 mg, 0.28 mmol)を 3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde (34.4 mg, 0.28 mmol)の無水ジクロロメタン(dichloromethane; DCM)溶液に加え、アルゴンガス雰囲気下、0°Cで 15 分間攪拌した。塩化ホスホリル(26.1 μL , 0.28 mmol)を少しずつ加え、アルゴンガス雰囲気下、0°Cで 15 分間攪拌した後、さらに室温で 1 時間攪拌した。三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(261 μL , 2.52 mmol)およびトリエチルアミン(352 μL , 2.52 mmol)を加え、アルゴンガス雰囲気下、室温で 1.5 時間攪拌した。水を加えた後、クロロホルム(300 mL)で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧留去し、残渣をアミノプロピル基修飾シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/ヘキサン= 30/70)で精製して目的物 **7** を収量 4.0 mg (3.9%)で得た。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.43 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 16.0 Hz, 2H), 6.90 (s, 1H), 6.87 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 5.99 (s, 1H), 2.96 (s, 6H), 2.52 (s, 3H), 2.17 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, Acetone- d_6) δ 156.67, 156.58, 152.32, 141.82, 138.42, 136.33, 135.08, 130.37, 129.71, 125.32, 122.42, 119.76, 116.48, 114.87, 113.05, 40.22, 14.72, 11.16. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_3$, 366.1948, found 366.1947 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

(2E,4E)-5-(4-(Dimethylamino)phenyl)penta-2,4-dienal (**9**)

既報の合成法に従い、Wittig 反応により合成した。機器分析データは既報と一致していることを確認した³¹.

4-(((1E,3E,5E)-6-(5,5-Difluoro-1-methyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-yl)hexa-1,3,5-trien-1-yl)-N,N-dimethylaniline (**10**, BAOP-3)

化合物 **3** と同様の合成法により、5,5-difluoro-1,3-dimethyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinine (**8**)および化合物 **9** から、目的物 **10** を収量 37.2 mg (64%)で得た。 ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.55 (s, 1H), 7.30 (dd, J = 14.9, 8.6 Hz, 2H), 7.17–6.99 (m, 3H), 6.79–6.48 (m, 8H), 6.36 (dd, J = 4.0, 2.3 Hz, 1H), 2.96 (s, 6H), 2.16 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, Acetone- d_6) δ 151.82, 144.26, 143.08, 142.86, 142.03, 139.41, 138.91, 138.00, 131.27, 129.94, 129.25, 125.88, 125.14, 123.12, 120.93, 118.74, 116.46, 113.03, 112.97, 40.24, 11.34. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd.

for $C_{24}H_{25}BF_2N_3$, 404.2104, found 404.2100 $[M + H]^+$.

4-(Piperidin-1-yl)benzaldehyde (13)

4-フルオロベンズアルデヒド (372 mg, 3.0 mmol) をピペリジン (281 mg, 3.3 mmol) および炭酸カリウム (498 mg, 3.8 mmol) の *N,N*-ジメチルホルムアミド (*N,N*-dimethylformamide; DMF) 溶液に加え、140°C で終夜撹拌した。水を加えた後、酢酸エチル/ヘキサン混合液 (1/2) (200 mL) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 5/95) で精製して目的物 **13** を収量 547 mg (96%) で得た。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 9.72 (s, 1H), 7.69 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.38 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 1.66–1.63 (m, 6H). MS (ESI) m/z 190.0 $[M + H]^+$.

4-(Pyrrolidin-1-yl)benzaldehyde (14)

化合物 **13** と同様の合成法により、4-フルオロベンズアルデヒドおよびピロリジンから、目的物 **14** を収量 478 mg (91%) で得た。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.69 (s, 1H), 7.69 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.35 (t, $J = 6.4$ Hz, 4H), 2.05–2.00 (m, 4H). MS (ESI) m/z 176.0 $[M + H]^+$.

4-(Azetidin-1-yl)benzaldehyde (15)

4-フルオロベンズアルデヒド (372 mg, 3.0 mmol) をアゼチジン塩酸塩 (280 mg, 3.0 mmol) および炭酸カリウム (841 mg, 6.0 mmol) のジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide; DMSO) 溶液に加え、110°C で終夜撹拌した。水を加えた後、酢酸エチル/ヘキサン混合液 (1/1) (200 mL) で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで脱水した。溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (酢酸エチル/ヘキサン = 15/85) で精製して目的物 **15** を収量 228 mg (71%) で得た。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.61 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H), 2.36–2.28 (m, 2H). MS (ESI) m/z 162.0 $[M + H]^+$.

4-Thiomorpholinobenzaldehyde (16)

化合物 **13** と同様の合成法により、4-フルオロベンズアルデヒドおよびチオモルホリンから、目的物 **16** を収量 482 mg (78%) で得た。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.75 (s, 1H), 7.73 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.81 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 2.68 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H). MS (ESI) m/z 208.0 $[M + H]^+$.

4-(4-(2-Hydroxyethyl)piperidin-1-yl)benzaldehyde (17)

化合物 **13** と同様の合成法により、4-フルオロベンズアルデヒドおよび 2-(piperidin-4-yl)ethan-1-ol から、目的物 **17** を収量 598 mg (85%) で得た。 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9.63 (s, 1H), 7.64 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 3.84 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H), 3.65 (t, $J = 6.4$

Hz, 2H), 2.83 (td, $J = 12.8, 2.3$ Hz, 2H), 2.66 (s, 1H), 1.74 (d, $J = 13.3$ Hz, 2H), 1.66 (m, 1H), 1.47 (q, $J = 6.4$ Hz, 2H), 1.23 (qd, $J = 12.8, 4.1$ Hz, 2H). MS (ESI) m/z 234.0 $[M + H]^+$.

4-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl)benzaldehyde (18)

化合物 **13** と同様の合成法により, 4-フルオロベンズアルデヒドおよび 2-(piperadin-4-yl)ethan-1-ol から, 目的物 **18** を収量 54.0 mg (7.7%)で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.77 (s, 1H), 7.71 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 3.65 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.38 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 2.63 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 2.58 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H). MS (ESI) m/z 235.0 $[M + H]^+$.

4-(3-Hydroxyazetidin-1-yl)benzaldehyde (19)

tert-Butyl 3-hydroxyazetidine-1-carboxylate (866 mg, 5.0 mmol)をトリフルオロ酢酸(trifluoroacetic acid; TFA) (3 mL)と DCM (14 mL)の混合溶媒に加え, 室温で1時間攪拌した. 溶媒を減圧留去し, 残渣を DMSO (10 mL)に溶解させた後, 4-フルオロベンズアルデヒド(621 mg, 5.0 mmol)と炭酸カリウム(2.1 g, 15 mmol)を加え, 110°Cで終夜攪拌した. 水を加えた後, 酢酸エチル/ヘキサン混合液(1/1) (200 mL)で抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄した後, 硫酸ナトリウムで脱水した. 溶媒を減圧留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン=20/80)で精製して目的物 **19** を収量 428 mg (48%)で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.56 (s, 1H), 7.58 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.29 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.76 (m, 1H), 4.20 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 3.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H). MS (ESI) m/z 178.0 $[M + H]^+$.

(E)-2-((4-(2-(5,5-Difluoro-1-methyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)(methyl)amino)ethan-1-ol (21, BAOP-4)

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **8** および *N*-メチル-*N*-(2-ヒドロキシエチル)-4-アミノベンズアルデヒド(**11**)から, 目的物 **21** を収量 67.1 mg (42%)で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.58 (s, 1H), 7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.80 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 6.70–6.68 (m, 3H), 6.39 (dd, $J = 3.7, 1.8$ Hz, 1H), 3.81 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.53 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 1.70 (br, 1H). MS (ESI) m/z 382.1 $[M + H]^+$.

(E)-4-(2-(5,5-Difluoro-1-methyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)-*N,N*-diethylaniline (22, BAOP-5)

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **8** および 4-(*N,N*-diethylamino)benzaldehyde (**12**)から, 目的物 **22** を収量 54.5 mg (53%)で得た. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (s, 1H), 7.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.71 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 6.38 (s, 1H), 3.40 (q, $J = 4.6$ Hz, 4H), 2.25 (s, 3H), 1.18 (t, $J = 4.6$ Hz, 6H). MS (ESI) m/z 380.2 $[M + H]^+$.

(E)-5,5-Difluoro-1-methyl-3-(4-(piperidin-1-yl)styryl)-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinine (23, BAOP-6)

化合物 **3** と同様の合成法により、化合物 **8** および化合物 **12** から、目的物 **23** を収量 37.1 mg (61%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.44 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.40 (dd, *J* = 4.1, 2.3 Hz, 1H), 3.30 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H), 2.62 (s, 3H), 1.68–1.56 (m, 6H). MS (ESI) *m/z* 392.0 [M + H]⁺.

(E)-5,5-Difluoro-1-methyl-3-(4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinine (24, BAOP-7)

化合物 **3** と同様の合成法により、化合物 **8** および化合物 **14** から、目的物 **24** を収量 39.3 mg (42%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.41 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.78 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.39 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 3.35 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H), 2.26 (s, 3H), 2.02 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 160.82, 149.33, 144.28, 142.43, 138.53, 135.89, 132.53, 130.33, 123.32, 123.05, 119.97, 117.49, 115.07, 112.84, 111.92, 47.63, 25.41, 11.43. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd. for C₂₂H₂₃BF₂N₃, 378.1948, found 378.1943 [M + H]⁺.

(E)-3-(4-(Azetidin-1-yl)styryl)-5,5-difluoro-1-methyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinine (25, BAOP-8)

化合物 **3** と同様の合成法により、化合物 **8** および化合物 **15** から、目的物 **25** を収量 51.7 mg (59%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.57 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.75 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.33 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 2.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.21 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 160.51, 152.73, 144.35, 141.99, 138.40, 136.47, 132.62, 129.90, 124.60, 123.62, 120.60, 117.40, 115.34, 113.67, 110.85, 51.79, 16.58, 11.44. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd. for C₂₁H₂₁BF₂N₃, 364.1791, found 364.1796 [M + H]⁺.

(E)-4-(4-(2-(5,5-Difluoro-1-methyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)thiomorpholine (26, BAOP-10)

化合物 **3** と同様の合成法により、化合物 **8** および化合物 **16** から、目的物 **26** を収量 26.4 mg (45%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.85–6.81 (m, 3H), 6.72 (s, 1H), 6.41 (dd, *J* = 3.5, 2.4 Hz, 1H), 3.71 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 2.70 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 2.28 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 159.91, 151.12, 144.43, 140.63, 138.21, 137.32, 132.80, 129.93, 126.29, 124.46, 121.48, 117.31, 115.73, 115.34, 115.31, 50.88, 26.03, 11.46. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd. for C₂₂H₂₃BF₂N₃S,

410.1668, found 410.1672 [M + H]⁺.

(E)-2-(1-(4-(2-(5,5-Difluoro-1-methyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)piperidin-4-yl)ethan-1-ol (27, BAOP-11)

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **8** および化合物 **17** から, 目的物 **27** を収量 42.5 mg (46%) で得た. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.54 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.26 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.81 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.77 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.35 (dd, *J* = 4.0, 2.3 Hz, 1H), 3.78 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 3.67 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 12.6 Hz, 2H), 2.22 (s, 1H), 1.75 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.64–1.58 (m, 1H), 1.49 (dd, *J* = 12.6, 6.3 Hz, 2H), 1.28 (d, *J* = 12.6 Hz, 2H), 1.18 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, Acetone-*d*⁶) δ 161.28, 153.53, 146.12, 142.63, 139.21, 137.20, 133.75, 130.55, 126.17, 124.95, 122.72, 118.48, 116.07, 115.68, 114.56, 59.85, 48.90, 40.30, 33.31, 32.60, 11.37. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd. for C₂₅H₂₉BF₂N₃O, 436.2366, found 436.2364 [M + H]⁺.

(E)-2-(4-(4-(2-(5,5-Difluoro-1-methyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)piperazin-1-yl)ethan-1-ol (28, BAOP-12)

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **8** および化合物 **18** から, 目的物 **28** を収量 5.6 mg (4.6%) で得た. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (s, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.87–6.84 (m, 3H), 6.71 (s, 1H), 6.41 (dd, *J* = 4.0, 2.3 Hz, 1H), 3.65 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.32 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 2.66 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 2.60 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H) 1.67 (br, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 159.78, 152.21, 145.31, 142.19, 137.83, 136.42, 132.46, 129.51, 125.05, 124.44, 122.42, 117.92, 115.62, 114.44, 113.02, 60.10, 58.43, 52.81, 46.70, 11.18. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd. for C₂₄H₂₈BF₂N₄O, 437.2319, found 437.2319 [M + H]⁺.

(E)-1-(4-(2-(5,5-Difluoro-1-methyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)azetidin-3-ol (29, BAOP-13)

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **8** および化合物 **19** から, 目的物 **29** を収量 36.1 mg (29%) で得た. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 7.72 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.43 (dd, *J* = 3.4, 2.3 Hz, 1H), 5.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.63–4.57 (m, 1H), 4.18 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 3.66 (dd, *J* = 8.0, 4.6 Hz, 2H), 2.30 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 160.14, 152.63, 145.25, 143.05, 137.96, 135.88, 132.36, 129.71, 123.91, 123.78, 121.79, 118.00, 115.40, 112.00, 111.45, 61.14, 60.69, 11.19. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd. for C₂₁H₂₁BF₂N₃O, 380.1740, found 380.1745 [M + H]⁺.

(E)-4-(2-(5,5-Difluoro-1-methyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-

yl)vinyl)aniline (30)

化合物 **3** と同様の合成法により、化合物 **8** および 4-aminobenzaldehyde (**20**) から、目的物 **30** を収量 19.8 mg (40%) で得た。¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*⁶) δ 7.50 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.33–7.31 (m, 3H), 7.27 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.79 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.29 (dd, *J* = 4.0, 2.3 Hz, 1H), 5.32 (br, 2H), 2.22 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 324.0 [M + H]⁺.

4-Nitro-4-phenylbutan-2-one (32)

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (760 μL, 5.2 mmol) およびベンザルアセトン (**31**) (731 mg, 5.0 mmol) をニトロメタン (6 mL) と DCM (14 mL) の混合溶媒に加え、0°C で 3 時間攪拌した。クロロホルム (15 mL) とチオ硫酸ナトリウム水溶液 (20 mL) を加え、反応を停止した後、クロロホルム (200 mL) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで脱水した後、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 = 99/1) で精製して目的物 **32** を収量 765 mg (74%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.28 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.70 (dd, *J* = 12.2, 7.5 Hz, 1H), 4.61 (dd, *J* = 12.2, 7.5 Hz, 1H), 4.06–3.98 (m, 1H), 2.93 (d, *J* = 7.54 Hz, 2H), 2.12 (s, 1H). MS (ESI) *m/z* 208.1 [M + H]⁺.

2-Methyl-4-phenyl-1H-pyrrole (33)

化合物 **32** (750 mg, 3.6 mmol), モルホリン (946 μL, 10.9 mmol), 酢酸アンモニウム (1670 mg, 22 mmol), 硫黄 (348 mg, 10.9 mmol) を丸底フラスコに加え、80°C で 1.5 時間攪拌した。水を加え、反応を停止した後、クロロホルム (200 mL) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで脱水した後、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 = 10/90) で精製して目的物 **33** を収量 153 mg (33%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.58 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.39 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.24 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 2.32 (s, 1H). MS (ESI) *m/z* 158.0 [M + H]⁺.

5,5-Difluoro-3-methyl-1-phenyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine (34)

化合物 **33** (314 mg, 2.0 mmol) を 1-*H*-pyrrole-2-carbaldehyde (190 mg, 2.0 mmol) の無水 DCM 溶液に加え、0°C で 15 分間攪拌した。塩化ホスホリル (188 μL, 2.0 mmol) を氷冷下少しずつ加え、0°C で 30 分間攪拌した後、さらに室温で 2.5 時間攪拌した。三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (1.88 mL, 18 mmol) およびトリエチルアミン (2.51 mL, 18 mmol) を加えた後、アルゴンガス雰囲気下、室温で 1 時間攪拌した。水を加えた後、クロロホルム (200 mL) で抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで脱水した後、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/ヘキサン = 50/50) で精製して目的物 **34** を収量 20.6 mg (3.7%) で得た。¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*⁶) δ 7.64 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50–7.48 (m, 2H), 7.42–7.35 (m, 3H), 7.09 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.42 (dd, *J* = 4.0, 1.8 Hz, 1H), 2.51 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, Acetone-*d*⁶) δ 161.97, 149.13, 141.39, 135.11, 134.88, 133.63, 130.04, 129.99, 129.95,

129.71, 129.54, 120.08, 117.89, 15.07. HRMS (FAB) m/z calcd. for $C_{16}H_{13}BF_2N_2$, 282.1140, found 282.1142 $[M]^+$.

5,5-Difluoro-3,7-dimethyl-1,9-diphenyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine (35)

化合物 **33** (1140 mg, 7.7 mmol) とオルトギ酸トリエチル (643 μ L, 3.8 mmol) を氷冷下無水 DCM (40 mL) に加え, 0°C で 15 分間攪拌した. 塩化ホスホリル (400 μ L, 4.2 mmol) を氷冷下少しずつ加え, 室温で 3 時間攪拌した. 三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体 (4.0 mL, 32 mmol) およびトリエチルアミン (4.0 mL, 45 mmol) を氷冷下加えた後, 室温で 2.5 時間攪拌した. 水を加えた後, クロロホルム (200 mL) で抽出した. 有機層を硫酸ナトリウムで脱水した後, 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/ヘキサン = 50/50) で精製して目的物 **35** を収量 561 mg (20%) で得た. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 7.30–7.24 (m, 10H), 7.16 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 2.55 (s, 1H). MS (ESI) m/z 373.1 $[M + H]^+$.

(*E*)-2-((4-(2-(5,5-Difluoro-1-phenyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)(methyl)amino)ethan-1-ol (36, BAOP-15)

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **11** および化合物 **34** から, 目的物 **36** を収量 5.0 mg (8.6%) で得た. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.85 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.65 (s, 1H), 7.57–7.48 (m, 7H), 7.26 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.48 (dd, $J = 4.0, 2.3$ Hz, 1H), 4.76 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 3.58 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.50 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.04 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 159.33, 151.31, 146.97, 143.21, 136.99, 135.47, 133.50, 132.35, 130.10, 129.42, 129.30, 128.84, 125.59, 124.26, 122.85, 117.03, 116.11, 112.15, 111.74, 58.34, 54.07, 38.96. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for $C_{26}H_{25}BF_2N_3O$, 444.2053, found 444.2056 $[M + H]^+$.

(*E*)-2-((4-(2-(5,5-Difluoro-7-methyl-1,9-diphenyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)(methyl)amino)ethan-1-ol (37, BAOP-16)

化合物 **3** と同様の合成法により, 化合物 **11** および化合物 **35** から, 目的物 **37** を収量 15.4 mg (27%) で得た. 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.74 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.55–7.37 (m, 10H), 7.39 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 4.76 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 3.58 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.49 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.56 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $DMSO-d_6$) δ 156.31, 152.15, 150.74, 145.08, 141.56, 140.92, 134.17, 133.45, 132.63, 131.09, 129.49, 129.13, 129.08, 128.97, 128.53, 128.35, 128.26, 122.98, 121.49, 116.47, 115.70, 111.97, 111.93, 58.16, 53.91, 38.78, 14.36. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for $C_{33}H_{31}BF_2N_3O$, 534.2523, found 534.2527 $[M + H]^+$.

(*E*)-2-((4-(2-(5,5-Difluoro-1,7,9-trimethyl-10-phenyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-

β [[1,3,2]diazaborinin-3-yl]vinyl)phenyl)(methylamino)ethan-1-ol (**39**, BAOP-17)

化合物 **3** と同様の合成法により，化合物 **11** および化合物 **38** から，目的物 **39** を収量 8.1 mg (14%) で得た． ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.55–7.53 (m, 3H), 7.47 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.37 (dd, $J = 7.5, 1.7$ Hz, 2H), 7.23 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 6.90 (s, 1H), 6.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.10 (s, 1H), 4.73 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.56 (q, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.47 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.32 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 154.62, 151.53, 150.35, 142.64, 139.76, 138.94, 138.54, 134.37, 132.38, 130.30, 129.12, 129.07, 128.17, 123.08, 120.37, 118.26, 112.35, 112.32, 111.84, 58.11, 53.90, 38.73, 14.26, 14.19, 13.79. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$, 486.2523, found 486.2519 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

ペプチドモデル作製

A β モノマー

A β_{1-42} (0.5 mg) をヘキサフルオロイソプロパノール(1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropan-2-ol; HFIP) (500 μL) に溶解させ，室温で 20 分間インキュベートした後，アルゴン気流下で HFIP を留去した．

A β オリゴマー

A β オリゴマーは以下の 2 通りの方法を用いて作製した．

方法(a)

脱イオン蒸留水(deionized H_2O ; dd H_2O) (900 μL) を A β_{1-42} (0.1 mg) の HFIP (100 μL) 溶液に加え，室温で 20 分間静置した．サンプルを 15 分間遠心分離(4°C, 14,000 g)した後，上清をシリコンチューブに移し，アルゴン気流下で 10 分間静置することで HFIP を留去した^{32,33}．

方法(b)

方法(a)で作製した A β オリゴマーを 22°C, 500 rpm で株式会社石井理化機器製作所製スーパースターラーMS-2T を用いて 24 時間攪拌した^{34,35}．

A β プロトフィブリル

DMSO (5 μL) と dd H_2O (80 μL) を A β_{1-42} (0.1 mg) に加えた．2 M トリス水溶液(1 μL) を加えた後，2–5 秒間ボルテックスミキサーを用いて混和し，室温で 5 分間静置した³⁶．

A β フィブリル

DMSO (5 μL) とリン酸緩衝液(phosphate buffered saline; PBS) (pH 7.4) (845 μL) を A β_{1-42} (0.1 mg) に加え，Eppendorf 社製サーモミキサーC を用いて 37°C, 700 rpm で 72 時間振とうした．

A β 存在下の蛍光スペクトルの測定

A β (終濃度: 5.0 μM) および被験化合物(終濃度: 2.5 μM) を 10 v/v% エタノール(EtOH) 含有

PBS 中で混和し、5 分間(A β モノマー, A β オリゴマー, A β プロトフィブリル)または 20 分間(A β フィブリル)室温で静置した。試料を石英セルに移し、RF-6000 を用いて蛍光スペクトルを測定した。

結合飽和実験

A β (終濃度: 2.0 μ M)および被験化合物(終濃度: 2.0 μ M–3.9 nM)を混和し、5 分間(A β オリゴマーおよび A β プロトフィブリル)または 30 分間(A β フィブリル)室温で静置した。試料を Multi Wellplate (0.4 mL $\times$ 96 wells flatbottom, 住友ベークライト株式会社製)に添加し、Infinite® 200Pro で蛍光強度を測定した。平衡解離定数(K_d)は GraphPad Prism 6.05 ソフトウェア (GraphPad Software 社製)を用いて計算した。

ドットブロット

2 μ L の A β 溶液(25 μ M)をニトロセルロース膜(ポアサイズ: 0.2 μ m, Bio-Rad Laboratories 社製)に添加し、ブロッキングワシ(ナカライテスク株式会社製)中で 1 時間振とうした。0.05 v/v% tween 20 含有トリス緩衝液(tris-buffered saline containing tween 20; TBST)を用いて洗浄後、Can Get Signal Solution 1 (東洋紡株式会社製)で 1000 倍希釈した Amyloid β oligomer-specific monoclonal antibody (OMAB) (Agrisera 社製)溶液に 4°Cで終夜浸漬した。TBST で洗浄後、Can Get Signal Solution 2 (東洋紡株式会社製)で 7500 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgM 抗体(アブカム社製)溶液中、室温で 1 時間振とうした。TBST で洗浄後、Chemi-Lumi One Super (ナカライテスク株式会社製)で処理し、ChemDoc™ Touch Imaging System 170 (Bio-Rad Laboratories 社製)を用いて発光を検出した。

ドッキングシミュレーション

ドッキングシミュレーションは Molecular Operating Environment (MOE)ソフトウェア 2020.09 版(Chemical Computing Group 社製)を用いて行った(CPU: 12th Gen Intel® Core™ i7-12700, コア数: 12, OS: Windows 11)。RCSB 蛋白質データベースより A β オリゴマー(PDB ID: 4NTR³⁷), A β プロトフィブリル(PDB ID: 2MXU³⁸), A β フィブリル(PDB ID: 5OQV³⁹)のモデル構造を取得した。構造最適化は Amber 10: EHT force field を用いて行い、ドッキング結果の解析には GBVI/WSA dG docking scoring function を用いた。

細胞培養

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞は American Type Culture Collection 社より購入した。細胞は抗生物質(ペニシリンおよびストレプトマイシン) (10 U/mL)および 10 v/v%非働化ウシ血清(fetal bovine serum; FBS)を含む Dulbecco's Modified Eagle 培地および Ham's F12 培地の 1:1 混合培地(ナカライテスク株式会社製)中、37°C, 5 v/v% CO₂ 下で培養した。

MTT アッセイ

SH-SY5Y 細胞を 96 ウェルプレート (Corning 社製) に 10,000 cells/well で播種し, 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で 24 時間培養した. 培地を除去した後, BAOP-16 および 0.5 v/v% DMSO を含むナカライテスク株式会社製フェノールレッド不含 Dulbecco's Modified Eagle 培地および Ham's F12 培地の 1:1 混合培地(100 µL)を添加した(BAOP-16 の終濃度: 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 µM). 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で 24 時間培養した後, 培地を除去し, PBS で洗浄した. フェノールレッド不含培地(100 µL)および MTT 溶液(ナカライテスク株式会社製)(10 µL)を加え, 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で 4 時間培養した. 培地および MTT 溶液を除去し, 生成したホルマザンを可溶化溶液(ナカライテスク株式会社製) (100 µL)で溶解した後, 570 nm の吸光度を Infinite® 200Pro で測定した.

¹⁸F 標識 BAOP-16 の合成

¹⁸F を陰イオン交換カラム Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Light Cartridge (Waters 社製)に保持させた後, 240 mM 炭酸カリウム水溶液(50 µL)および 27 mM Kryptofix 222 (950 µL)の混合溶液で抽出した. テトラブチルアンモニウム炭酸水素塩(tetrabutylammonium bicarbonate; TBAB) (8 mg)およびアセトニトリル(MeCN) (334 µL)を加え, 窒素気流下で 120°C に加熱して共沸脱水した. 同量の MeCN をさらに 2 回加え, 共沸脱水操作を繰り返した. BAOP-16 (0.3 mg)を溶解した MeCN (100 µL)および SnCl₄ (0.5 µL)を加え, 室温で 10 分間振とうした. 反応液をコスモナイスフィルター(S) (ナカライテスク株式会社製)で処理した後, 逆相 HPLC (移動相: MeCN/H₂O, 流速: 1.0 mL/min)を用いて分離精製した.

体内放射能分布実験

[¹⁸F]BAOP-16 を 20 v/v% DMSO を含むプロピレングリコールに溶解させた. 1 群 4 または 5 匹の ddY マウス(雄性, 5 週齢)の尾静脈より [¹⁸F]BAOP-16 (207 kBq/50 µL)を投与した. 投与 2, 30, 60 分後にマウスの安楽死処置を行い, 血液を採取した後, 主要な臓器を摘出し, 臓器の重量および放射能を測定した.

放射化学的純度の評価

[¹⁸F]BAOP-16 を順相薄層クロマトグラフィープレート (Merck KGaA 社製)に添加し, クロロホルム/メタノール = 20/1 の混合液を移動相として薄層クロマトグラフィーを行った. イメージングプレートに 3 時間露光させ, Amersham Typhoon scanner (GE Healthcare Life Sciences 社製)を用いて分析した. 定量解析には ImageQuant TL ver 8.1 (GE Healthcare Life Sciences 社製)を用いた.

log P 値の測定

アニソール(log P = 2.1), トルエン(log P = 2.7), ブロモベンゼン(log P = 3.0)を標準物質と

して用いた。以下の計算式を用いて $\log P$ 値を算出した。

$$k = (t_R - t_0)/t_0, t_R = \text{評価物質の保持時間}, t_0 = \text{遅延時間}$$

$$\log P = a + b \log k$$

定数 a および b は標準物質の HPLC 分析(移動相: MeCN/H₂O = 70/30, 流速: 1 mL/min)における保持時間より求めた($a = 2.22$, $b = 2.60$)。BAOP-16 の $\log P$ 値は HPLC 分析(移動相: MeCN/H₂O = 70/30, 流速: 1 mL/min)での保持時間より求めた。

蛍光検出による脳移行性評価

正常マウスとして ddY マウス(雄性, 6 週齢)を用いた。BAOP-16 を 20 v/v% DMSO を含むプロピレングリコールに溶解させ、マウスの尾静脈より 2 mg/kg で投与した。投与 2, 10, 30, 60, 120 分後にマウスの安楽死処置を行い、脳を摘出した後、脳の蛍光画像を IVIS SPECTRUM イメージングシステムを用いて撮像した(露光時間: 1.0 s, f-stop: 2, 励起フィルター: 640 nm, 蛍光フィルター: 700 nm)。

ファントムイメージング

ddY マウス(雄性, 5 週齢)の脳を摘出し、PBS (2 mL)とホモジナイズすることで、脳ホモジネートを得た。脳ホモジネートを Multi Wellplate (0.4 mL $\times$ 96 wells flatbottom)に 1 ウェル当たり 100 μ L ずつ添加した。さらに A β (終濃度: 5 μ M)および BAOP-16 (終濃度: 2.5 μ M)を加え、室温で 20 分間静置した後、脳の蛍光画像を IVIS SPECTRUM イメージングシステムを用いて撮像した(露光時間: 1.0 s, f-stop: 2, 励起フィルター: 640 nm, 蛍光フィルター: 680 nm)。

A β イノキュレーションマウスの作製

C57BL/6 マウス(雄性, 5–7 月齢)を用いた。イソフルラン麻酔下、2 μ L の A β の PBS 溶液 (25 μ M)または PBS を海馬(bregma: -1.94 mm, lateral: 1.9 mm, depth: 1.3 mm)⁴⁰に 200 nL/min の流速で注入した。

A β オリゴマー検出能の *in vivo* 評価

作製 1 日後の A β イノキュレーションマウスを用いた。BAOP-16 を 20 v/v% DMSO を含むプロピレングリコールに溶解させ、マウスの尾静脈より 2 mg/kg で投与した。投与 60 分後にマウスの安楽死処置を行い、脳を摘出した後、脳の蛍光画像を IVIS SPECTRUM イメージングシステムを用いて撮像した(露光時間: 1.0 s, f-stop: 2, 励起フィルター: 640 nm, 蛍光フィルター: 680 nm)。

切片染色

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウス(雌性, 11 月齢)の脳組織切片を用いて、以下の方法に従って実施した。
チオフラビン S と BAOP-16 の共染色

脳組織切片をチオフラビン S (thioflavin S; ThS)の 50% EtOH 溶液(100 μ M)に 20 分間浸漬した後、50%EtOH 水溶液で 1 分間の洗浄を 2 回行った。さらに脳組織切片を、BAOP-16 の 50 % EtOH 溶液(10 μ M)に 20 分間浸漬した。50% EtOH 水溶液で 1 分間の洗浄を 2 回行った後、BZ-9000 を用いて切片を観察した。

A β 配列認識抗体を用いた免疫組織化学染色

観察後、同一の脳組織切片を 90%ギ酸で処理した。抗体希釈用緩衝液(Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて 6E10 抗体(Biolegend 社製)を 1000 倍希釈した後、脳組織切片を抗体溶液に室温で 3 時間浸漬した。脳組織切片を 0.5 v/v% tween 20 含有リン酸緩衝液(phosphate buffered saline containing tween 20; PBST)で洗浄した後、Histofine Simple Stain MAX-PO (株式会社ニチレイバイオサイエンス製)に 30 分間浸漬した。脳組織切片を 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma Aldrich 社製)で処理し、FSX-100 を用いて観察した。

抗 A β オリゴマー抗体を用いた免疫蛍光染色

OMAB 抗体を PBST で 200 倍希釈した後、脳組織切片を抗体溶液に室温で 3 時間浸漬した。脳組織切片を PBST で洗浄した後、PBST で 200 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識 goat 抗マウス IgM 抗体(Thermo Fisher Scientific 社製)溶液に室温で 2 時間浸漬した。PBST で洗浄後、BAOP-16 の 50% EtOH 溶液(2 μ M)に室温で 20 分間浸漬した。50 % EtOH 水溶液で 1 分間の洗浄を 2 回行った後、BZ-9000 を用いて切片を観察した。

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスを用いた生体蛍光イメージング

A β を過剰発現する遺伝子組換えマウスである APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウス(雌性, 5 月齢)および正常マウスである C57BL/6 マウス(雌性, 5 月齢)を用いた。BAOP-16 の 20 v/v% DMSO 含有プロピレングリコール溶液をマウスの尾静脈より 2 mg/kg で投与し、イソフルラン麻酔下、頭皮を除去した。1.5 v/v%イソフルランを含む酸素吸入下、IVIS SPECTRUM イメージングシステムを用いて、BAOP-16 投与 10, 20, 30, 40, 50, 60 分後におけるマウス頭部の蛍光画像を取得した。定量データの統計解析には Student の t 検定を用いた。

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスを用いた *ex vivo* 蛍光染色実験

生体蛍光イメージングを実施後、マウスの安楽死処置を行い、脳を摘出した。その後、脳を包埋剤に浸漬し、ドライアイスを用いて急速冷凍した。凍結ブロックを、ライカ社製クライオスタットを用いて薄切し、25 μ m 厚の切片を作製した。作製した切片を、BZ-9000 を用いて蛍光観察後、ThS による蛍光染色、6E10 抗体を用いた免疫組織化学染色または OMAB 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。ThS または OMAB 抗体により染色した切片は BZ-9000 を用いて、6E10 抗体により染色した切片は FSX-100 を用いて観察した。

1.1.2 結果と考察

A β オリゴマーの特性評価

A β オリゴマーを作製し、その形成をチオフラビン T (thioflavin T; ThT)および 1-アミノナフタレン-8-スルホネート(1-aminonaphtalene-8-sulfonate; ANS)存在下の蛍光強度測定(**Figure 1-1**)および透過型電子顕微鏡(transmission electron microscopy; TEM)を用いた形態観察(**Figure 1-2**)により確認した。ThT は A β フィブリル中のクロス β シート構造を認識し蛍光上昇を示す一方⁴¹, ANS は A β オリゴマー中に存在する疎水性表面を認識し蛍光上昇を示すことが知られている⁴²。蛍光強度測定の結果、既報^{23, 25, 42}と同様に A β オリゴマー存在下における ThT の蛍光強度は A β フィブリル存在下と比較して低値を示した一方, ANS の蛍光強度は A β オリゴマー存在下で増大した(**Figure 1-1**)。また, TEM を用いた形態観察では, A β フィブリルが線維状の形態を示したのに対し, A β オリゴマーは既報^{32, 43, 44}と同様に球状の形態を示した(**Figure 1-2**)。以上の結果より A β オリゴマーの形成が示唆されたことから, 本作製法に従い準備した A β オリゴマーを SAR 研究における A β オリゴマーモデルとして用いた。

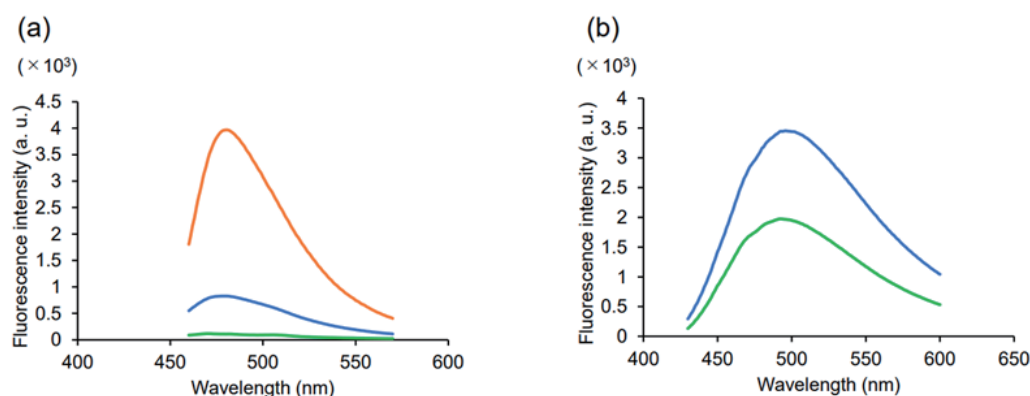


Figure 1-1. Emission spectra of (a) ThT and (b) ANS. Orange line, with A β fibrils; blue line, with A β oligomers; green line, without A β species.

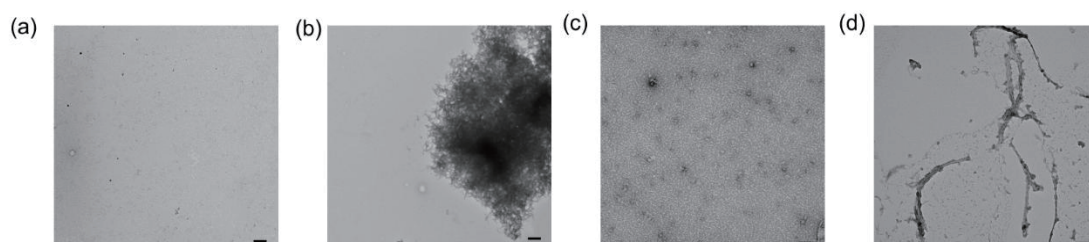


Figure 1-2. The morphology of (a and c) A β oligomers and (b and d) A β fibrils observed by TEM. Scale bar: 500 nm (a and b); 100 nm (c and d).

SAR 研究におけるリード化合物の探索

所属分野において A β フィブрил標的蛍光プローブとして開発された BODIPY 誘導体である BAP-1¹⁰ および BAP-2²⁸, さらに BODIPY 骨格を有していない A β フィブрил標的蛍光プローブである DANIR-2c³⁰ について, A β オリゴマーおよび A β フィブрил存在下での蛍光スペクトルを測定した. BAP-1 および BAP-2 は A β オリゴマー存在下で A β フィブрил存在下と比較して強い蛍光を示した一方, DANIR-2c は A β オリゴマー存在下で A β フィブрил存在下と比較して弱い蛍光を示した(**Figure 1-3, Table 1-1**). したがって, BODIPY 骨格が A β オリゴマー標的蛍光イメージングプローブの母骨格として有用である可能性が示された. BAP-1 の A β フィブрил存在下における蛍光強度に対する A β オリゴマー存在下の蛍光強度の比 (Selectivity Index, 以下 SI) は 2.78 であり, 3 化合物の中で A β オリゴマーに対して最も高い選択性を示したことから, SAR 研究におけるリード化合物として選択した.

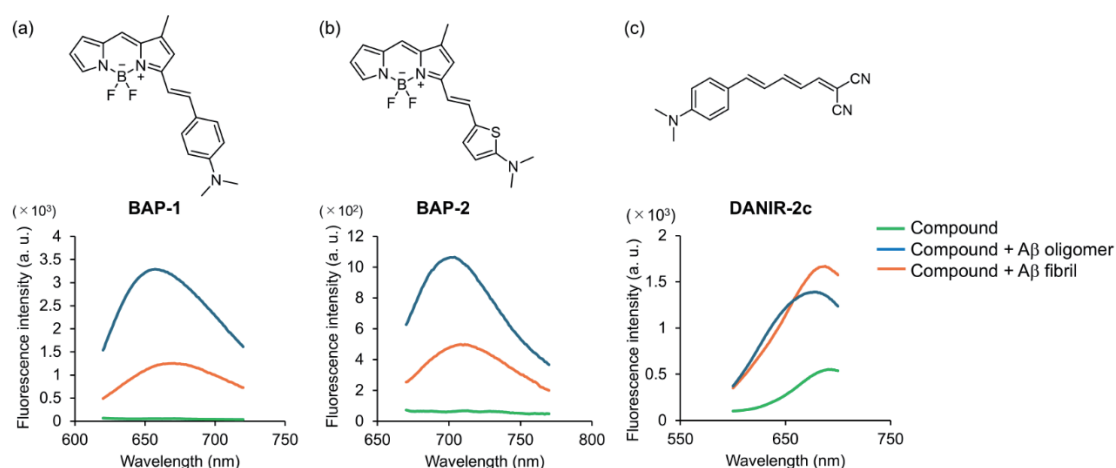


Figure 1-3. Chemical structures and emission spectra of (a) BAP-1, (b) BAP-2, and (c) DANIR-2c in the presence or absence of A β species.

Table 1-1. Spectroscopic Data of BAP-1, BAP-2, and DANIR-2c upon Binding with A β Species ($n = 4$).

Compounds	With A β oligomers		With A β fibrils		SI ^b
	λ_{em} (nm)	fold ^a	λ_{em} (nm)	fold ^a	
BAP-1	657	62.8	671	21.9	2.78
BAP-2	707	15.8	708	7.70	1.95
DANIR-2c	678	2.60	688	3.56	0.671

^aEach value represents an increase in fluorescence intensity with protein and is expressed as fold = fluorescence intensity (FI) (probe with proteins)/FI (probe).

^bEach value represents selectivity for A β oligomers versus A β fibrils and is expressed as SI = FI (with A β oligomers)/FI (with A β fibrils).

BODIPY 誘導体の設計および合成

分子構造のかさ高さや置換基の変更が、蛍光プローブの A β オリゴマー検出能に影響を与えることが知られている。そこで、BAP-1 の構造のうち(a) BODIPY 骨格におけるメチル基の位置、(b)スチリル基の共役系の長さ、(c)スチリル基の置換基をそれぞれ変換した BODIPY-based A β oligomer probe (BAOP)-1–BAOP-14 を設計した(**Figure 1-4**)。BAOP-2 を除く 13 化合物については BODIPY とベンズアルデヒドを原料として Knoevenagel 縮合により合成した。BAOP-2 は(*E*)-4-(2-(1*H*-pyrrol-2-yl)vinyl)-*N,N*-dimethylaniline (**6**)および 3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carboxyaldehyde を縮合した後に、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体およびトリエチルアミンを添加することで合成した(**Scheme 1-1**)。BAOP-9 については、評価に十分な純度で得ることができなかったため、SAR 研究の候補化合物から除外した。また(b)の構造展開を検証するため、過剰リン酸化タウ凝集体標的蛍光イメージングプローブとして開発され、A β フィブリルに対する結合性も報告されている ⁴⁵TAU-1²⁹ および TAU-2²⁹ を評価化合物に加えた。

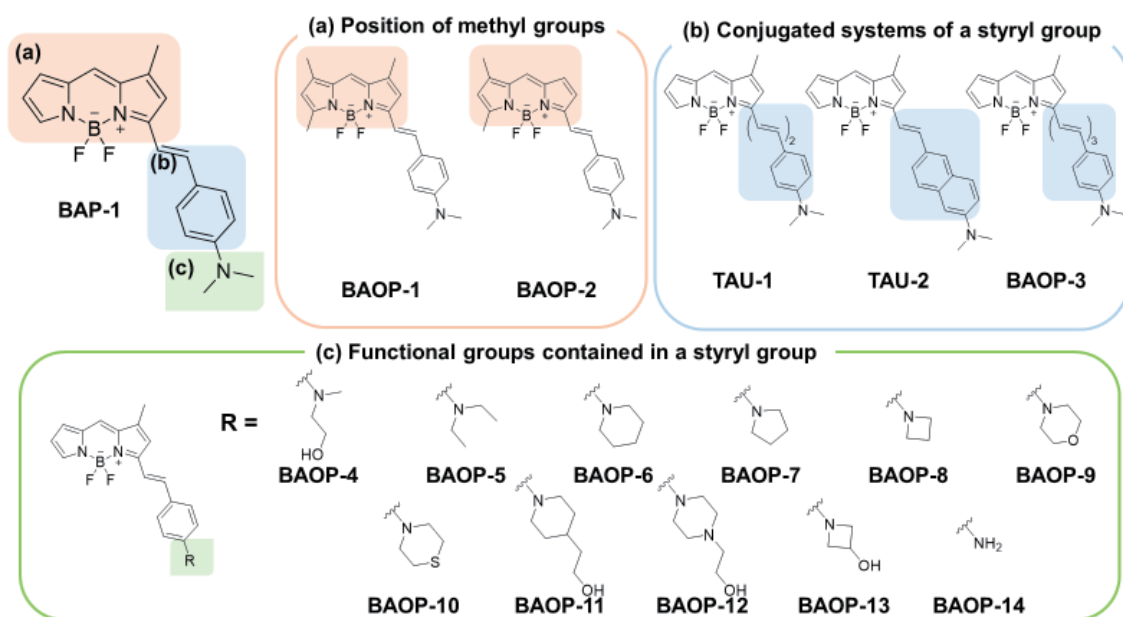
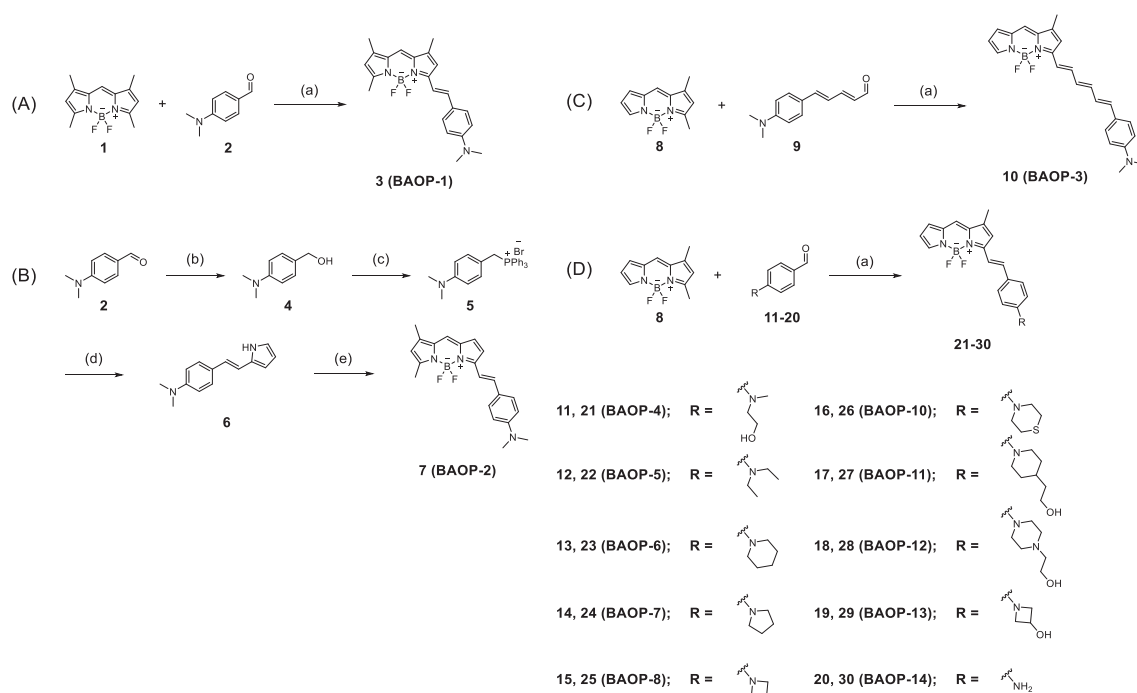


Figure 1-4. Design strategies of BODIPY derivatives by modification of BAP-1 and their chemical structures. (a) BAOP-1 and BAOP-2; (b) TAU-1, TAU-2, and BAOP-3; (c) BAOP-4 to BAOP-14.



Scheme 1-1. Synthetic route of BAOP-1 to BAOP-14^a. ^aReagents: (a) piperidine, AcOH, toluene, 110°C; (b) NaBH₄, MeOH, rt, 30 min; (c) PPh₃·HBr, CHCl₃, 60°C, 4 h; (d) 3,5-dimethylpyrrole-2-carboxyaldehyde, NaOMe, MeOH, 60°C, 6 h; (e) 1. POCl₃, DCM, rt, 1 h; 2. BF₃·OEt, Et₃N, rt, 1.5 h.

Aβオリゴマーおよび Aβフィブリル存在下における蛍光特性の評価

候補化合物のクロロホルム中における蛍光特性を評価したところ、いずれの化合物も良好な蛍光量子収率(8.96–55.0%)を示し、BAOP-10, BAOP-12, BAOP-14を除く化合物に関して、最大蛍光波長が近赤外領域(> 650 nm)に認められた。また、EtOH 中においてはクロロホルム中と比較して最大蛍光波長が長波長側にシフトしたことから、疎水性環境下で蛍光スペクトルの浅色シフトが生じることが示唆された。これらの結果から BAOP 誘導体は生体蛍光イメージングに応用可能な蛍光特性を有することが示された(**Table 1-2**)。

Table 1-2. Spectroscopic Data of BAOP Series.

Compounds	λ_{abs} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ (%) ^a
	CHCl ₃ /EtOH	CHCl ₃ /EtOH	CHCl ₃ /EtOH	
BAOP-1	610/597	610/603	657/688	55.0 ^b
BAOP-2	616/602	619/606	671/707	30.0 ^b
BAOP-3	623/602	623/n.d.	728/n.d.	8.96 ^b
BAOP-4	603/595	604/599	663/704	47.8 ^b
BAOP-5	614/602	619/605	674/707	48.1 ^b
BAOP-6	593/579	593/585	679/714	37.8 ^b
BAOP-7	616/601	618/605	677/713	40.4 ^b
BAOP-8	596/584	599/590	674/711	44.3 ^b
BAOP-10	589/578	590/582	649/694	51.0 ^b
BAOP-11	591/581	593/585	677/714	44.3 ^b
BAOP-12	584/576	578/579	615/699	19.9 ^b
BAOP-13	591/584	593/588	666/704	23.0 ^b
BAOP-14	579/578	580/582	624/680	33.7 ^c

^aData was measured in chloroform.

^bDetermined versus BAP-1 in chloroform¹⁰.

^cDetermined versus PTO-41 in DCM²⁵.

続いて、Aβオリゴマーおよび Aβフィブリル存在下における蛍光特性の評価を行った。初めに、ポジティブコントロールとして、Aβオリゴマー選択的な蛍光プローブとして報告されている PTO-41²⁵の蛍光スペクトルを測定した。既報²⁵と同様に、PTO-41はAβオリゴマーに対して良好な選択性を示し、SIは3.70であった。次に、候補化合物のAβオリゴマーおよびAβフィブリル存在下での蛍光スペクトルを測定した。候補化合物はいずれもAβオリゴマー存在下で顕著な蛍光上昇を示し(3.25–140-fold)、この値は既報のAβオリゴマー標的蛍光

プローブと同程度であった(e.g., ANSP: 9.4-fold²¹, PTO-29: 60-fold²⁴, NB: 165-fold²²). また, 候補化合物のうち BAOP-1 および BAOP-14 を除く 13 化合物で A β オリゴマーに対する選択性が認められた(SI=1.37–3.06) (**Table 1-3**). 加えて, TAU-1, BAOP-3, BAOP-11 を除く候補化合物では, A β オリゴマー存在下での蛍光波長が A β フィブリル存在下と比較して短波長側に認められたことから, A β オリゴマー中の結合サイトは A β フィブリル中の結合サイトと比較して疎水性の高い環境であることが示唆された.

(a)の構造展開に関しては, BAP-1 (SI=2.78), BAOP-1 (SI=0.800), BAOP-2 (SI=1.75)の A β オリゴマーに対する選択性に顕著な違いが認められたことから, BODIPY 骨格のメチル基の位置による立体障害性が A β オリゴマーに対する選択性に影響を与えることが示唆された. また(b)の構造展開では, TAU-1 (SI=2.97)および TAU-2 (SI=2.82)は BAP-1 と比較して高い A β オリゴマー選択性を示した一方, BAOP-3 は BAP-1 と比較して低い A β オリゴマー選択性(SI=1.51)を示したことから, 共役系の伸長は A β オリゴマー選択性に影響を与えるが, 必ずしもその向上に寄与するわけではないことが示唆された. (c)の構造展開では, BAOP-4–BAOP-14 において A β オリゴマー選択性に違いが認められたことから, 置換基の変更が A β オリゴマー選択性に影響を与えることが示唆されたが, 置換基の脂溶性や構造などの性質と A β オリゴマー選択性との間に相関は認められなかった. 候補化合物の中で BAOP-4 が最も高い A β オリゴマー選択性(SI=3.06)を示したことから, *N*-メチル-*N*-(2-ヒドロキシエチル)アミノ基が A β オリゴマー選択的な蛍光プローブの開発において有用である可能性が示された (**Table 1-3**).

続いて, A β オリゴマーに対する結合親和性を評価するために結合飽和実験を実施した (**Table 1-4**). その結果, いずれの化合物も A β オリゴマー標的蛍光プローブとして機能し得る結合親和性(K_d = 42.6–500 nM)を示した. また, A β フィブリルに対しても同程度の結合親和性(K_d = 15.9–120 nM)を示した(**Table 1-4**).

Table 1-3. Spectroscopic Data upon Binding to A β Species of BAOP Derivatives, TAU Derivatives, BAP-1, and PTO-41 ($n = 4$).

Compounds	With A β oligomers		With A β fibrils		SI ^b
	λ_{em} (nm)	fold ^a	λ_{em} (nm)	fold ^a	
BAOP-1	644	34.3	660	40.6	0.800
BAOP-2	668	60.7	680	40.1	1.75
TAU-1	699	116	699	39.0	2.97
TAU-2	668	24.4	680	9.21	2.82
BAOP-3	693	12.2	688	8.06	1.51
BAOP-4	683	21.2	688	6.52	3.06
BAOP-5	663	66.6	674	44.1	1.37
BAOP-6	667	138	671	57.4	2.51
BAOP-7	663	75.6	671	33.2	2.09
BAOP-8	663	140	674	71.6	2.21
BAOP-10	641	87.7	655	38.0	1.97
BAOP-11	669	123	666	64.5	1.88
BAOP-12	652	6.83	672	3.74	1.61
BAOP-13	676	11.3	690	5.83	1.87
BAOP-14	638	3.25	654	3.79	0.963
BAP-1	657	62.8	671	21.9	2.78
PTO-41	688	29.4	683	8.52	3.70

^aEach value represents an increase in fluorescence intensity with protein and is expressed as fold = FI (probe with proteins)/FI (probe).

^bEach value represents selectivity for A β oligomers versus A β fibrils and is expressed as a selectivity index (SI) = FI (with A β oligomers)/FI (with A β fibrils).

Table 1-4. Binding Affinity of BAOP Derivatives, TAU Derivatives, BAP-1, and PTO-41 for A β Oligomers or A β Fibrils^a. (*n* = 3)

Compounds	<i>K_d</i> for A β oligomers (nM)	<i>K_d</i> for A β fibrils (nM)
BAOP-1	83.8 (67.8)	68.8 (13.1)
BAOP-2	201 (27.2)	52.6 (4.63)
BAOP-3	42.6 (1.75)	74.9 (11.1)
TAU-1	51.4 (7.84)	29.0 (15.1)
TAU-2	108 (12.4)	37.2 (8.75)
BAOP-4	148 (18.2)	31.7 (4.48)
BAOP-5	50.6 (5.49)	30.4 (6.53)
BAOP-6	107 (13.0)	21.8 (0.927)
BAOP-7	54.7 (13.7)	15.9 (4.08)
BAOP-8	121 (34.4)	28.4 (10.6)
BAOP-10	62.4 (3.08)	54.0 (3.75)
BAOP-11	85.4 (5.08)	21.3 (2.60)
BAOP-12	297 (27.1)	81.1 (13.0)
BAOP-13	229 (26.7)	65.4 (27.0)
BAOP-14	500 (92.5)	120 (37.8)
BAP-1	67.1 (9.42)	24.3 (5.73)
PTO-41	126 (6.21)	52.4 (6.34)

^aEach value represents the mean (standard deviation (S.D.)).

BAOP-4 をリード化合物とした構造展開

ここまでの SAR 研究の結果を基に、さらなる構造展開を行った。評価した 15 化合物の中で最も高い A β オリゴマー選択性を示し、溶解性や体内動態の改善に寄与することが報告されている^{25, 46, 47} *N*-メチル-*N*-(2-ヒドロキシエチル)アミノ基を有することから、BAOP-4 (SI = 3.06) をリード化合物として選択した。(a)の構造展開においては、BODIPY 骨格のメチル基の位置における立体障害性が A β オリゴマーに対する選択性に影響を与えることが示唆されたため、この位置の立体障害性を大きくすることで、A β オリゴマーに対する選択性が向上すると考え、BODIPY 骨格の 1 位にフェニル基を導入した BAOP-15 と、1 位および 7 位にフェニル基を導入した BAOP-16 を設計した。加えて、(a)の構造展開でメチル基が導入されていない 8 位にフェニル基を導入した BAOP-17 も候補化合物として設計した(**Figure 1-5**)。

これらの化合物は **Scheme 1-2** に従って合成した。2-Methyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole (**33**)は既報⁴⁸に従い、5-nitro-4-phenyl-2-pentanone (**32**)から合成した。BODIPY (**34**, **35**, **38**)は汎用されている縮合反応⁴⁹により合成した。また、BAOP-15–BAOP-17 は BODIPY (**34**, **35**, **38**)と *N*-メチル-

N-(2-ヒドロキシエチル)-4-アミノベンズアルデヒドを原料として Knoevenagel 縮合により合成した (Scheme 1-2).

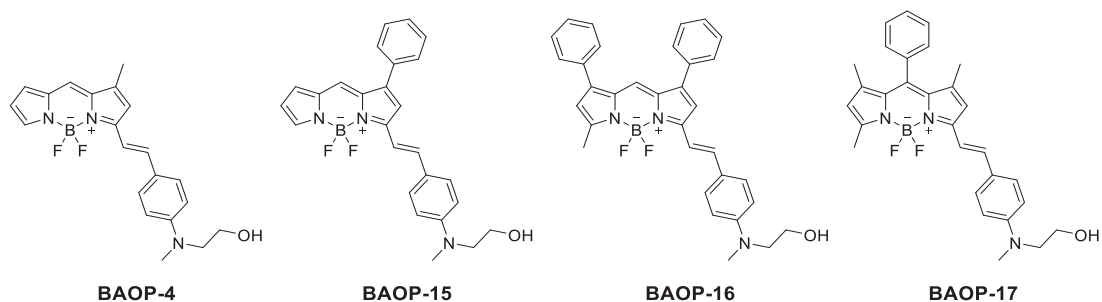
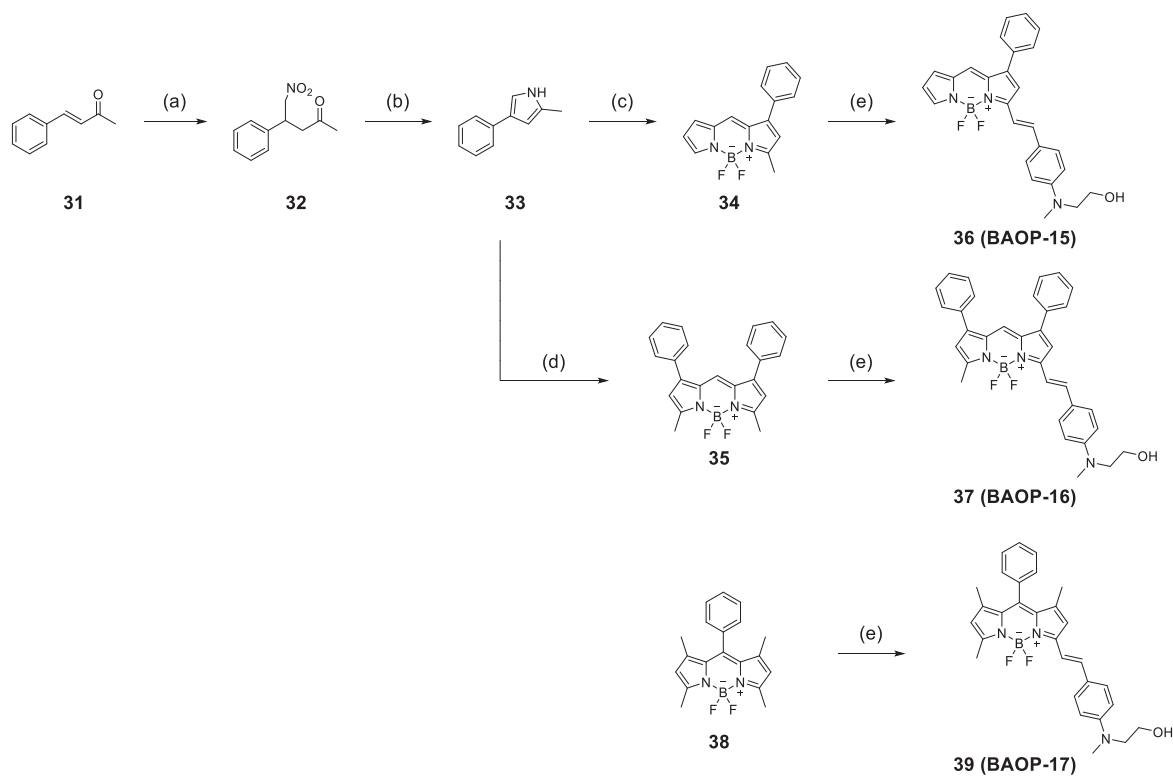


Figure 1-5. Chemical structures of BAOP-4, BAOP-15, BAOP-16, and BAOP-17.



Scheme 1-2. Synthetic route of BAOP-15, BAOP-16, and BAOP-17^a. ^aReagents: (a) nitromethane, DBU, DCM, 0°C, 3 h; (b) morpholine, NH₄OAc, S, 80°C, 1.5 h; (c) 1-*H*-pyrrole-2-carboxyaldehyde, POCl₃, DCM, rt, 2.5 h; 2. BF₃·OEt, Et₃N, rt, 1 h; (d) 1. triethyl orthoformate, POCl₃, DCM, rt, 3 h; 2. BF₃·OEt, Et₃N, rt, 2.5 h; (e) *N*-methyl-*N*-(2-hydroxyethyl)-4-amino benzaldehyde, piperidine, AcOH, toluene, 110°C.

BAOP-15, BAOP-16 および BAOP-17 の A β 存在下における蛍光特性評価

BAOP-15 および BAOP-16 のクロロホルム中における吸収・蛍光波長は、BAOP-4 と比較して長波長領域に認められたことから、生体イメージングへの応用に有望な化合物であることが示唆された。一方、BAOP-17 のクロロホルム中における吸収・蛍光波長は BAOP-4 と比較してわずかに短波長領域に認められた。また、3 化合物はいずれもクロロホルム中で高い蛍光量子収率を示した。さらに、EtOH 中における蛍光波長がクロロホルム中と比較して長波長領域に認められたことから、これらの化合物は疎水性環境下で蛍光スペクトルの浅色シフトを示すことが示唆された(**Table 1-5**).

Table 1-5. Spectroscopic Data of BAOP Series.

Compounds	λ_{abs} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ (%) ^a
	CHCl ₃ /EtOH	CHCl ₃ /EtOH	CHCl ₃ /EtOH	
BAOP-15	616/611	619/617	694/749	11.4 ^b
BAOP-16	638/636	635/636	704/754	22.0 ^c
BAOP-17	603/602	602/605	650/694	18.2 ^b

^aData was measured in chloroform.

^bDetermined versus BAP-1 in chloroform¹⁰.

^cDetermined versus BAP-2 in chloroform²⁸.

続いて、3 化合物の A β オリゴマーおよび A β フィブリル存在下における蛍光スペクトルを測定した(**Table 1-6**). その結果、いずれの化合物も A β オリゴマー存在下で蛍光上昇を示し、さらに A β オリゴマーに対する選択性が認められた。特に BAOP-16 は、PTO-41 を含む他の評価化合物と比較して顕著に高い A β オリゴマー選択性(SI = 4.86)を示した(**Table 1-6**). BAOP-16 は“y 字型”の分子構造を有しており、フェニル基の導入による立体障害性の増大が A β オリゴマーに対する選択性を向上させたと考えられる。近年、T 字型²⁰や V 字型²⁴などの分岐型構造が A β オリゴマー選択的な蛍光プローブの分子構造として有効であることが示唆されているが、y 字型の分子構造を有する A β オリゴマー選択的な蛍光プローブは報告されていない。したがって、y 字型構造は A β オリゴマー選択的な蛍光プローブの開発における新たな分子構造の候補となると考えられる。また、本研究および過去の報告^{20,22,24}から、A β オリゴマーに対する高い選択性を実現する上で、分岐型構造の導入による立体障害性の増大が、有効な分子設計戦略であると考えられる。一方、BAOP-17 は A β オリゴマー存在下で、BAOP-4 と比較して高い蛍光上昇度を示した(BAOP-4: 21.2-fold, BAOP-17: 107-fold). また、BAOP-15 および BAOP-16 の A β オリゴマー存在下における蛍光波長は A β フィブリル存在下と比較して短波長側に認められたが、BAOP-17 はこれらの 2 化合物とは対照的に長波長側へのシフトを示した。これは BAOP-15 および BAOP-16 の結合サイトが BAOP-17 の結合サイトと異なることを示唆しており、フェニル基の導入位置が A β オリゴマーとの相互作用

用に大きな影響を与えると考えられる (Table 1-6).

さらに、結合飽和実験により A β オリゴマーに対する結合親和性を評価したところ、いずれの化合物も A β オリゴマー標的蛍光プローブとして機能し得る結合親和性を示した (Table 1-7). なかでも BAOP-16 は PTO-41 を含む評価化合物の中で最も高い結合親和性 ($K_d = 34.3$ nM) を示した. フェニル基の導入数が増加するにつれて、A β オリゴマーに対する結合親和性が向上する傾向が認められたことから、フェニル基が A β オリゴマーとの相互作用において重要な役割を有していることが示唆された. また、A β フィブリルに対する結合親和性は A β オリゴマーに対する結合親和性と同程度であった (Table 1-7).

以上の結果より BAOP-16 を有望な A β オリゴマー標的蛍光プローブ候補として選択し、さらなる評価を行った.

Table 1-6. Spectroscopic Data upon Binding to A β Oligomers or A β Fibrils of BAOP-15, BAOP-16, and BAOP-17 ($n = 4$).

Compounds	With A β oligomers		With A β fibrils		SI ^b
	λ_{em} (nm)	fold ^a	λ_{em} (nm)	fold ^a	
BAOP-15	696	14.7	707	9.10	1.64
BAOP-16	704	12.7	711	2.72	4.86
BAOP-17	677	107	672	37.5	2.77

^aEach value represents an increase in fluorescence intensity with protein and is expressed as fold = FI (probe with proteins)/FI (probe).

^bEach value represents selectivity for A β oligomers versus A β fibrils and is expressed as SI = FI (with A β oligomers)/FI (with A β fibrils).

Table 1-7. Binding Affinity of BAOP-15, BAOP-16, and BAOP-17 for A β Oligomers or A β Fibrils^a. ($n = 3$)

Compounds	K_d for A β oligomers (nM)	K_d for A β fibrils (nM)
BAOP-15	90.8 (5.45)	83.5 (17.5)
BAOP-16	34.3 (3.97)	15.9 (1.80)
BAOP-17	74.4 (6.28)	39.9 (1.13)

^aEach value represents the mean (S.D.).

多様な形態の A β オリゴマー存在下における蛍光評価

A β オリゴマーは多様な形態を有することが示唆されている。そこで、複数の形態の A β オリゴマー存在下における BAOP-16 の蛍光特性を評価した。まず、SAR 研究で用いた A β オリゴマーと異なる方法で作製した A β オリゴマー^{25, 35} と、高分子量の A β オリゴマーである A β プロトフィブリル^{50, 51}を用意した。本節では、SAR 研究で用いた A β オリゴマーを A β オリゴマー(a)、新たに作製した A β オリゴマーを A β オリゴマー(b)と呼称する。TEM を用いた形態観察の結果、A β オリゴマー(b)は短い線維状の形態を、A β プロトフィブリルは曲線的な形態をそれぞれ示した(**Figure 1-6**)。これらの A β オリゴマー存在下における ThT の蛍光強度は A β フィブリル存在下と比較して低値を示した(**Figure 1-7a**)。A β オリゴマー認識抗体である OMAB 抗体⁵²を用いたドットプロットでは、A β フィブリルのスポットにおけるシグナルはほとんど認められなかった一方で、A β オリゴマーのスポットにおいては強いシグナルが認められた(**Figure 1-8**)。これらの結果から、A β オリゴマーおよび A β プロトフィブリルの形成が示唆された。

新たに作製した A β オリゴマーを含む複数の形態の A β 存在下における BAOP-16 の蛍光スペクトルを測定したところ、いずれの A β オリゴマー(A β オリゴマー(a)、A β オリゴマー(b)、A β プロトフィブリル)存在下でも蛍光強度は A β フィブリルおよび A β モノマー存在下と比較して高値を示した(**Figure 1-9a**)。これらの結果から、BAOP-16 は A β フィブリルや A β モノマーの影響を受けず、多様な形態の A β オリゴマーを検出可能であることが示唆された。また、PTO-41 に関しても同様の評価を行ったところ、A β プロトフィブリル存在下において A β オリゴマー(a)および(b)存在下と比較して顕著に弱い蛍光を示した(**Figure 1-7b**)。この結果から、PTO-41 は A β オリゴマーの形態変化に依存して蛍光上昇度が変化する可能性が示唆された。さらに、BAOP-16 および PTO-41 のウシ血清アルブミン(bovine serum albumin; BSA)存在下での蛍光スペクトルを測定したところ、いずれの化合物も蛍光上昇が認められた(**Figure 1-10**)。一方で、BAOP-16 の A β オリゴマー(a)存在下での蛍光波長($\lambda_{em} = 704$ nm)は、BSA 存在下での蛍光波長($\lambda_{em} = 731$ nm)と比較して顕著に短かったことから、蛍光フィルターを調節することにより、アルブミン結合時の蛍光による影響を低減することができると考えられる。続いて、A β オリゴマー(b)および A β プロトフィブリルに対する結合親和性を結合飽和実験により評価した。その結果、いずれのオリゴマーに対しても高い結合親和性を示した($K_d = 13.9$ nM for A β oligomer (b); $K_d = 15.1$ nM for A β protofibril) (**Figure 1-9b-d**)。

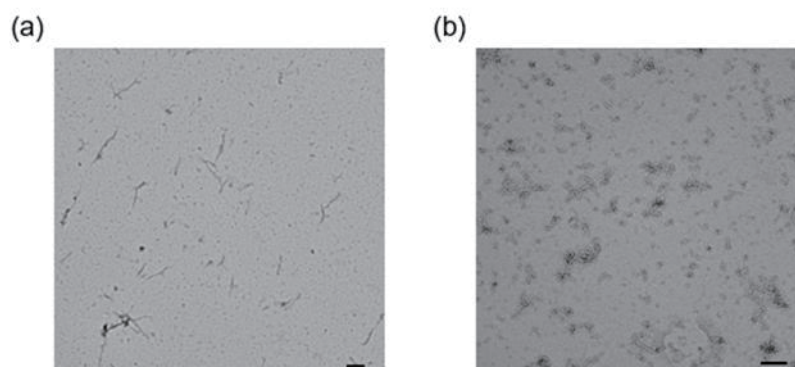


Figure 1-6. The morphology of (a) Aβ oligomers and (b) Aβ protofibrils observed by TEM. Scale bar: 100 nm.

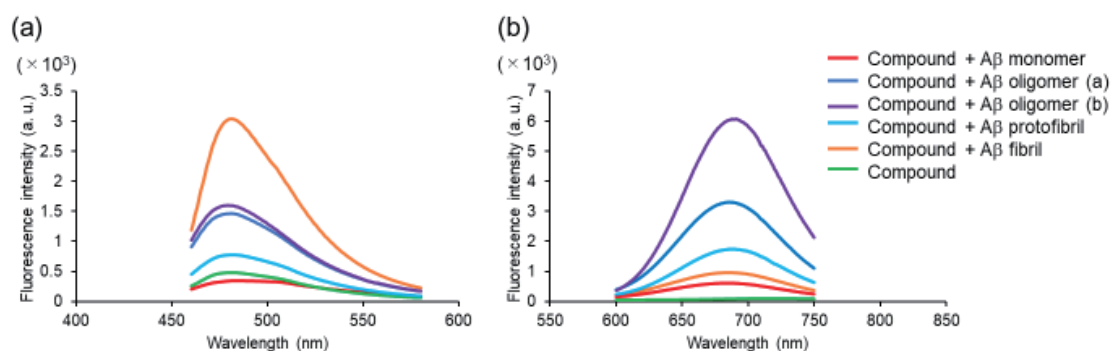


Figure 1-7. Emission spectra of (a) ThT and (b) PTO-41 with or without diverse Aβ species.

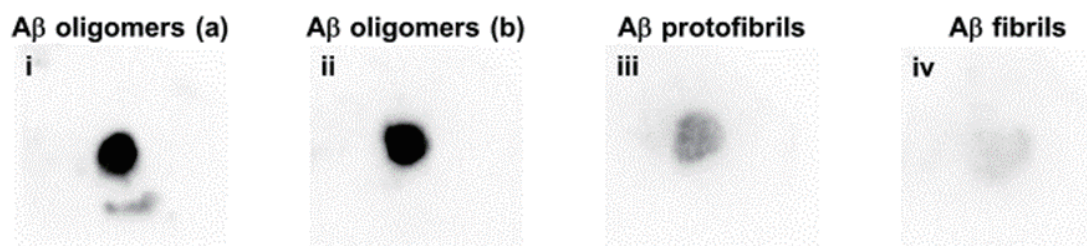


Figure 1-8. Dot blot analysis of (i) Aβ oligomers (a), (ii) Aβ oligomers (b), (iii) Aβ protofibrils, and (iv) Aβ fibrils using OMAB.

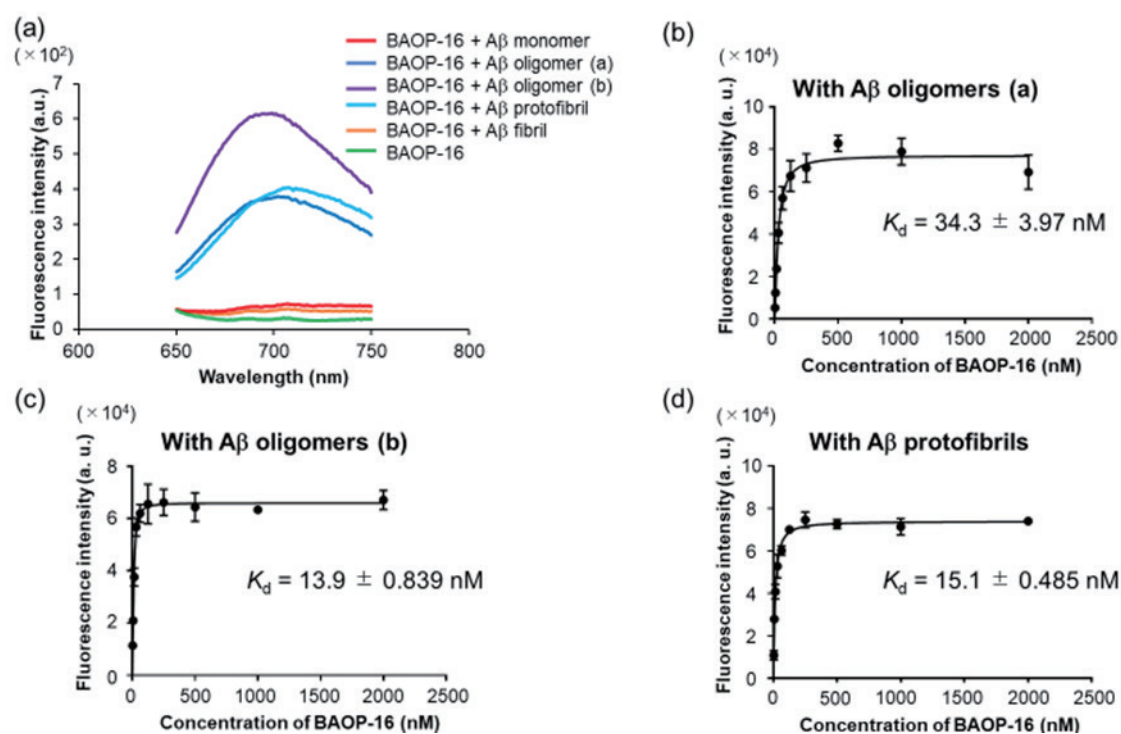


Figure 1-9. The results of *in vitro* evaluation of BAOP-16 as fluorescent probes targeting Aβ oligomers. (a) Fluorescence spectra of BAOP-16 with various Aβ species; (b, c, and d) the saturation binding curves of BAOP-16 with Aβ oligomers.

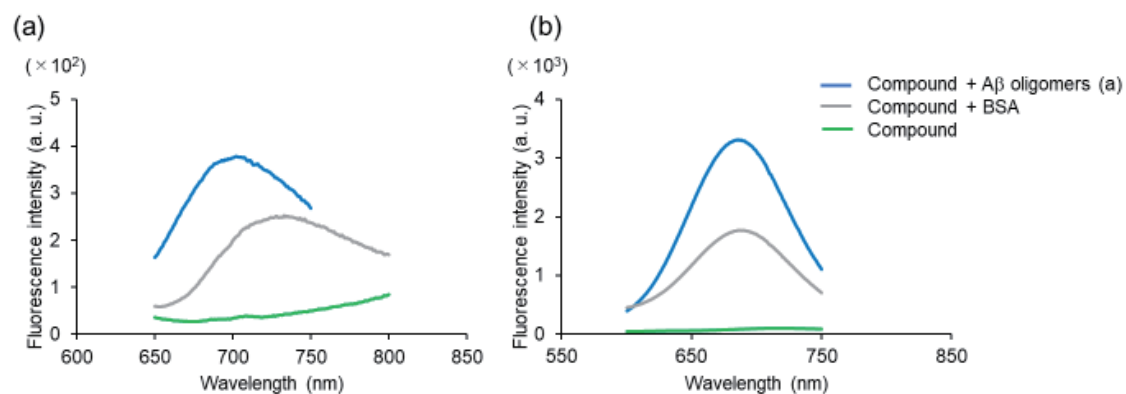


Figure 1-10. Emission spectra of (a) BAOP-16 and (b) PTO-41 with or without Aβ oligomers (a) or BSA.

ドッキングシミュレーション

BAOP-16 と A β の間の相互作用を調べるためにドッキングシミュレーションを行った (Figure 1-11). A β オリゴマーの構造としてトリマーモデル(PDB ID: 4NTR³⁷)を, A β プロトフィブリルの構造として 12 量体の A β ポリマーモデル(PDB ID: 2MXU³⁸)を, A β フィブリルの構造としてクライオ電子顕微鏡により決定された A β_{1-42} フィブリルの構造(PDB ID: 5OQV³⁹)をそれぞれ選択した. A β オリゴマーに対するドッキングシミュレーションにおいて, BAOP-16 は, わずかにねじれた平面状の構造をとりながら A β オリゴマーの疎水性領域に対して結合する様子が認められた. ドナー- π -アクセプター型の分子は平面状の構造をとった際, ねじれ分子内電荷移動(twisted intramolecular charge transfer; TICT)⁵³が抑制され, 蛍光を示すことが知られている. したがって, BAOP-16 の A β オリゴマー存在下における蛍光上昇は結合時の平面状構造に起因すると考えられる. また, A β プロトフィブリルに対するドッキングシミュレーションにおいても, 疎水性ポケットにおいてわずかにねじれた平面状の構造をとっている様子が認められた. 一方で, A β フィブリルに対するドッキングシミュレーションでは, 7 位のフェニル基が自由回転可能な状態で A β フィブリルに結合している様子が認められた. これは 1 位および 7 位へのフェニル基の導入による立体障害性の増大により, A β フィブリルの結合部位への接近が制限されるためであると考えられる. そして, 結合時に分子内回転を起こすことで無輻射失活が生じるため, BAOP-16 は A β フィブリル存在下において弱い蛍光を示したと考えられる (Figure 1-11).

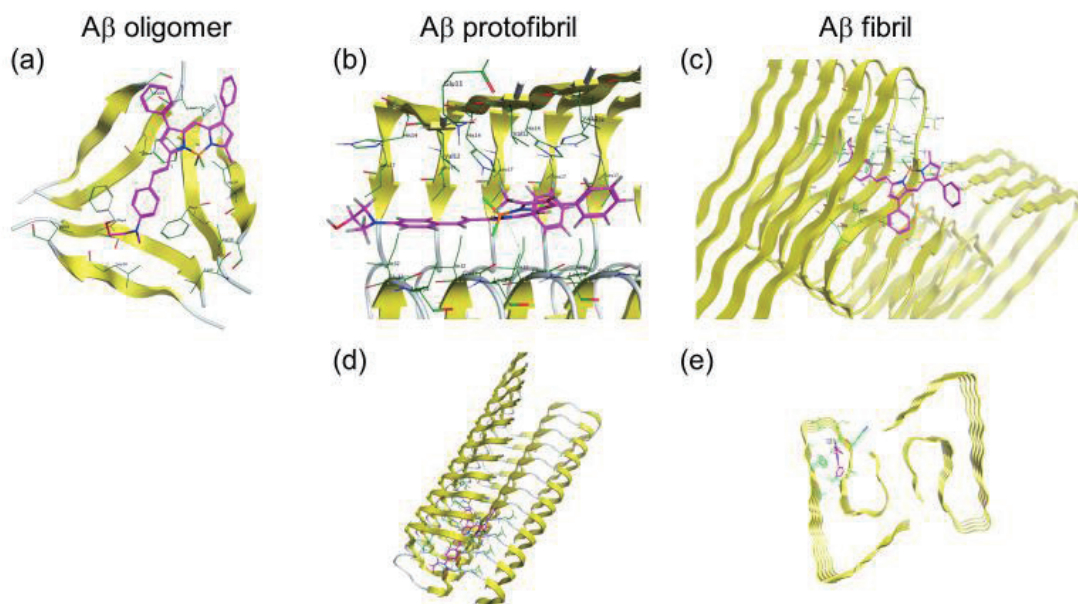
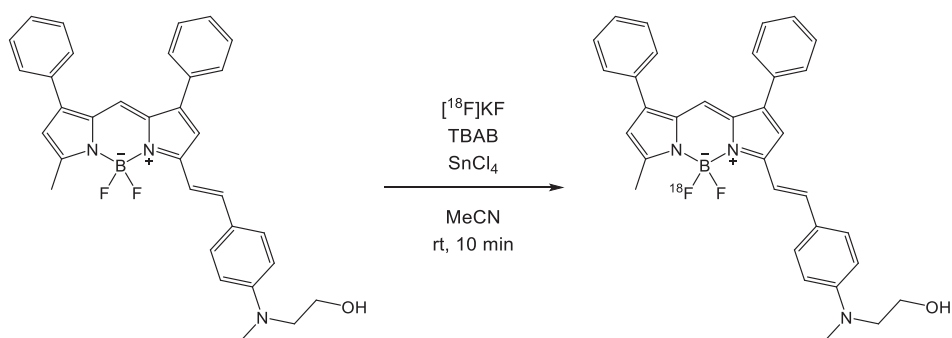


Figure 1-11. Molecular docking model of BAOP-16 with (a) A β oligomer, (b and d) A β protofibril, and (c and e) A β fibril.

BAOP-16 の脳移行性評価

BAOP-16 の生体への応用可能性を評価するため、SH-SY5Y 細胞を用いた MTT アッセイを行った。その結果、5 μ M までの濃度において顕著な細胞毒性は認められなかった(**Figure 1-13a**)。この結果を踏まえ、マウスを用いた BAOP-16 の脳移行性評価を行った。BAOP-16 の脳移行性を定量的に評価するため、BAOP-16 の ^{18}F 標識体を合成した。塩化スズ(IV)をルイス酸として用いた $[^{18}\text{F}]/[^{19}\text{F}]$ 同位体交換反応⁵⁴により $[^{18}\text{F}]\text{BAOP-16}$ を放射化学的収率 2.0% で得た(**Scheme 1-3**)。また薄層クロマトグラフィーにより放射化学的純度 95%以上であることを確認した(**Figure 1-12**)。続いて、正常マウスを用いた $[^{18}\text{F}]\text{BAOP-16}$ の体内放射能分布実験を行った。 $[^{18}\text{F}]\text{BAOP-16}$ の脳移行性は認められたが、投与後早期における脳への移行量は低値であった($\text{brain}_{2\text{min}} = 0.43\%$ injected dose/g)。これは分子量の大きさ(MW: 534 Da)および脂溶性の高さ($\log P = 4.98$)に起因すると考えられる。しかしながら、BAOP-16 が脳内の A β オリゴマーと結合した際に顕著な蛍光上昇を起こす場合、脳への移行量が低値であっても生体イメージングが可能であると考えられる。また、 $[^{18}\text{F}]\text{BAOP-16}$ の脳からの速やかな消失が認められたことから($\text{brain}_{2\text{min}}/\text{brain}_{30\text{min}} = 3.37$, $\text{brain}_{2\text{min}}/\text{brain}_{60\text{min}} = 6.40$)、高い S/N 比で A β オリゴマーを検出できる可能性が示された(**Figure 1-13b**, **Table 1-8**)。加えて、BAOP-16 を正常マウスに投与し、脳を摘出後、蛍光画像を取得したところ、 $[^{18}\text{F}]\text{BAOP-16}$ の脳内挙動と類似した結果が得られたことから、マウス脳内の蛍光は BAOP-16 に由来することが示唆された(**Figure 1-14**)。



Scheme 1-3. Radiosynthesis of [^{18}F]BAOP-16.

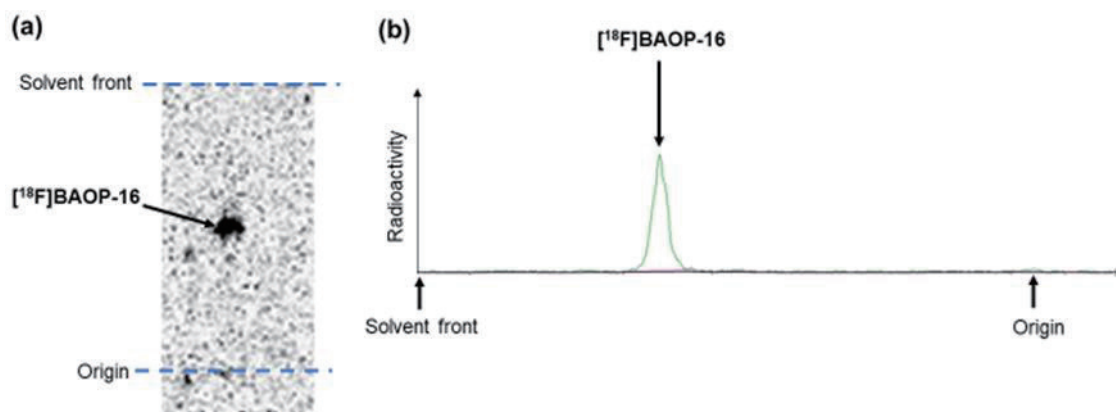


Figure 1-12. Radio TLC of [¹⁸F]BAOP-16. (a) Autoradiography of the radio TLC and (b) quantitative analysis of radioactivity on the TLC. Mobile phase: chloroform/methanol = 20/1.

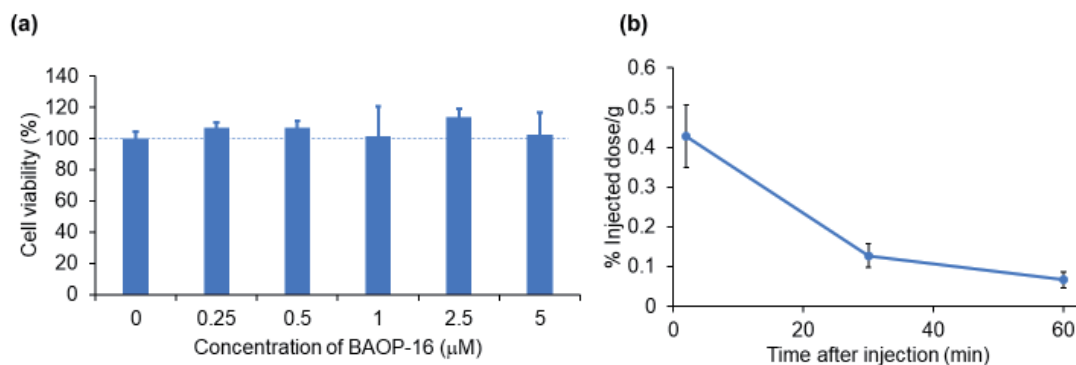


Figure 1-13. The results for evaluation of *in vivo* applicability of BAOP-16 using cells and normal mice. (a) Viability of SH-SY5Y cells after incubation with BAOP-16 evaluated by the MTT assay ($n = 3$; the results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation). (b) Radioactivity in brains of normal mice after injection of [¹⁸F]BAOP-16 via tail veins ($n = 4$ or 5).

Table 1-8. Radioactivity Accumulated in Organs of Normal Mice After Injection of [^{18}F]BAOP-16^a. ($n = 4$ or 5, Male)

Organs	Time after injection (min)		
	2	30	60
Blood	23.36 (4.05)	6.62 (1.28)	3.16 (0.82)
Spleen	9.51 (5.27)	19.54 (3.48)	12.62 (2.61)
Pancreas	0.82 (0.28)	0.53 (0.03)	0.62 (0.33)
Stomach ^b	0.28 (0.22)	2.15 (2.67)	0.52 (0.30)
Intestine	0.50 (0.18)	6.92 (1.56)	12.97 (3.23)
Kidney	4.28 (0.75)	5.25 (0.47)	5.29 (1.17)
Liver	22.83 (4.08)	32.26 (1.07)	22.45 (2.24)
Heart	5.76 (2.49)	4.48 (0.67)	4.14 (1.28)
Lung	17.91 (4.90)	13.29 (0.76)	11.27 (4.05)
Brain	0.43 (0.08)	0.13 (0.03)	0.07 (0.02)
Bone	3.24 (0.66)	3.19 (1.91)	3.07 (1.27)

^aEach value represents the mean (S.D.) of four or five mice and is expressed as % injected dose/g.

^bExpressed as % injected dose per organ.

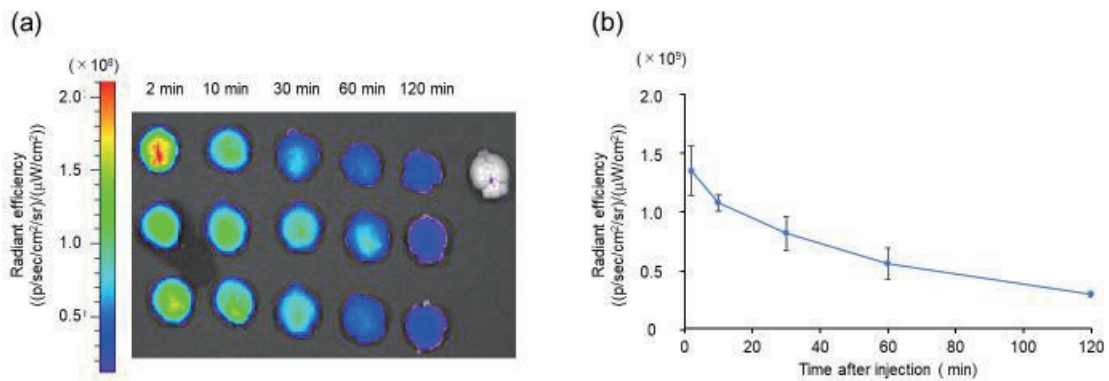


Figure 1-14. Fluorescence from the mice brains dissected after the injection of BAOP-16 via tail veins ($n = 3$). (a) A fluorescent image of the mice brains. (b) Quantitative analysis of fluorescence intensity of the mice brains. $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 640/700$ nm.

Aβイノキュレーションマウスを用いた *in vivo* 結合性評価

正常マウス由来の脳ホモジネートを用いたファントムイメージングを行ったところ、BAOP-16 は Aβオリゴマー(a)存在下で、Aβフィブリル存在下と比較して強い蛍光を示したことから、BAOP-16 が脳内環境において Aβオリゴマーを選択的に検出可能であることが示唆された(**Figure 1-15**). 続いて BAOP-16 が *in vivo* において Aβオリゴマーを検出することができるかどうかを評価するために、Aβイノキュレーションマウスを作製し、BAOP-16 を尾静脈より投与後、脳を摘出し、蛍光画像を取得した. 右脳に Aβオリゴマー(a)を、左脳に PBS をそれぞれ注入したイノキュレーションマウスにおいては、Aβオリゴマー注入部位で、PBS 注入部位と比較して有意に高い蛍光シグナルが認められた. この結果より、BAOP-16 が脳内の Aβオリゴマーを検出可能であることが示唆された(**Figure 1-16a, b**). さらに、右脳に Aβオリゴマー(a)、左脳に Aβフィブリルをそれぞれ注入したイノキュレーションマウスにおいても、Aβオリゴマー注入部位で、Aβフィブリル注入部位と比較して有意に高い蛍光シグナルが認められたことから、BAOP-16 が脳内において Aβオリゴマーを選択的に検出可能であることが示唆された(**Figure 1-16c, d**).

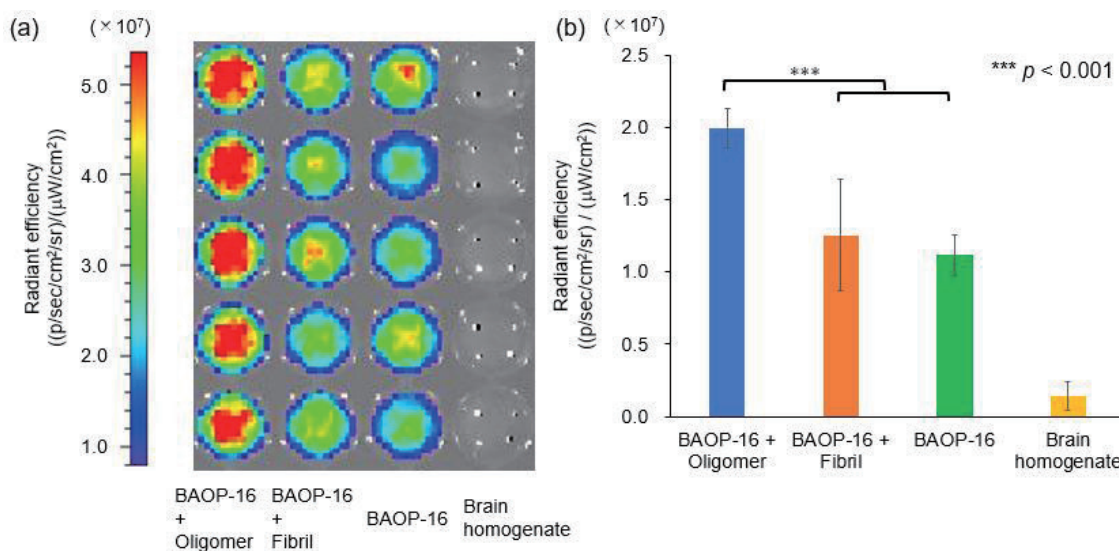


Figure 1-15. Phantom imaging of BAOP-16 in brain-relevant environment. (a) A fluorescent image of each well in phantom imaging. (b) Quantitative analysis of fluorescence intensity from each well. $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 640/680$ nm. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and post-hoc Bonferroni's test.

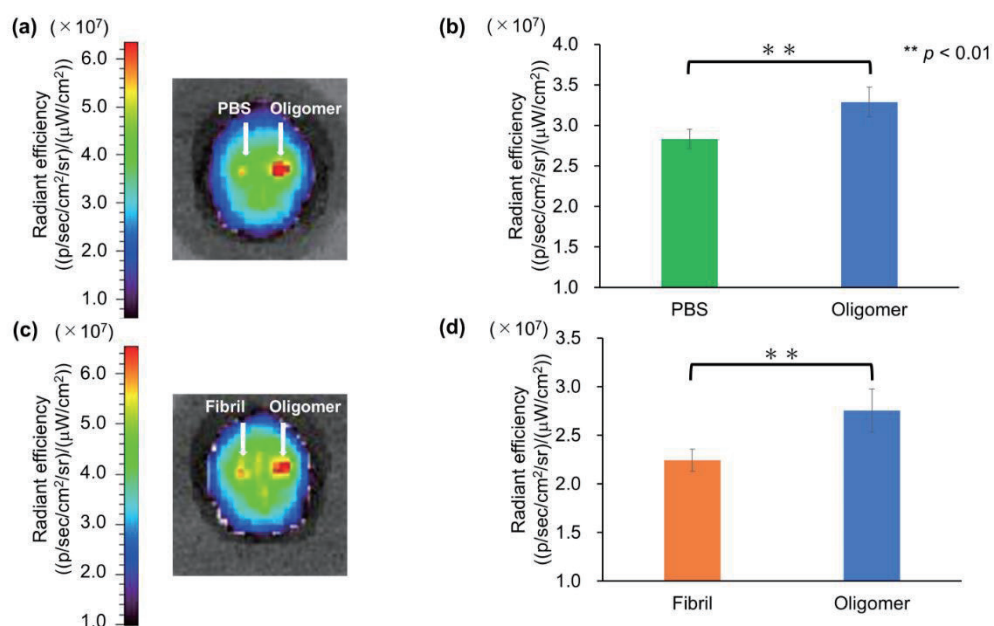


Figure 1-16. Results of *in vivo* evaluation of BAOP-16 using A β -inoculated model mice. (a) A fluorescence image and (b) quantitative analysis ($n = 4$) of the study using mice inoculated with PBS (left) and A β oligomer (right). (c) A fluorescence image and (d) quantitative analysis ($n = 5$) of the study using mice inoculated with A β fibril (left) and A β oligomer (right). Injected dose of BAOP-16 was 2 mg/kg. $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 640/680$ nm. Statistical analysis was performed using paired t-test.

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片を用いた蛍光染色

続いて、BAOP-16 が脳組織切片中の A β オリゴマーを検出できるかどうかを評価した。脳組織切片の作製には、A β プロトフィブリルの形成を促進する北極変異⁵⁵を配列中に含む A β を過剰発現する遺伝子組換えマウス(APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウス)¹¹を用いた。まず、組織染色においてアミロイドフィブリル特異的な蛍光プローブとして汎用されている ThS と BAOP-16 を用いた共染色を実施した。結果として、プラーク状の BAOP-16 染色部位が脳組織切片全体に認められ、その局在は ThS 染色部位と概ね一致した。一方で、BAOP-16 は ThS 陽性部位の周辺領域についても強く染色した(Figure 1-17a-c)。加えて、同一切片について A β 配列認識抗体である 6E10 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った結果、6E10 抗体と BAOP-16 の間に局在および染色領域の一致が認められたことから、BAOP-16 は A β を特異的に染色していることが示唆された(Figure 1-17a, d)。A β フィブリルがプラークの中心に局在する一方で、A β オリゴマーはプラークの中心のみならず、周辺領域にも存在することが報告されている⁵⁶。したがって BAOP-16 が脳組織切片中の A β オリゴマーに結合している可能性が示唆された。さらに、OMAB 抗体を用いた免疫蛍光染色と BAOP-16 を用いた蛍光染色を同一切片に対して行ったところ、OMAB 抗体と BAOP-16 の間に局在および染色領域の一致が認められた(Figure 1-17e-g)。以上の結果から、BAOP-16 が APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片中の A β オリゴマーを検出することができる可能性が示された。

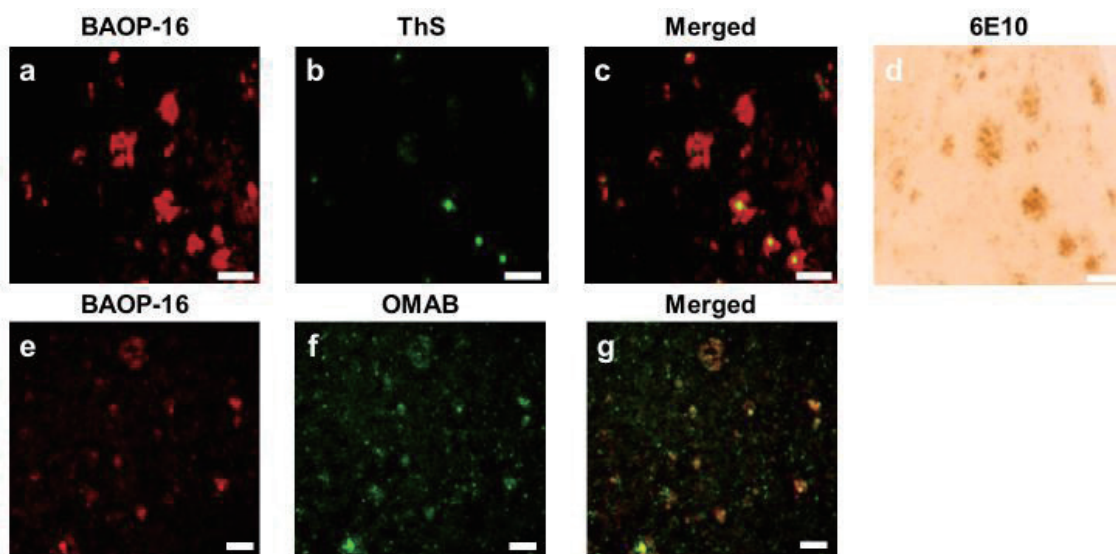


Figure 1-17. Neuropathological staining of BAOP-16 and ThS and immunohistochemical staining of A β species in the same brain section from an APP^{NL-G-F/NL-G-F} mouse. (a) Stained with BAOP-16; (b) stained with ThS; (c) merged image of a and b; (d) labeled with anti A β antibody (6E10); (e) stained with BAOP-16; (f) labeled with A β oligomer specific antibody (OMAB); (g) merged image of e and f. Scale bar: 50 μ m.

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスを用いた生体蛍光イメージング

最後に、APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスを用いて BAOP-16 の生体蛍光イメージングにおける有用性を評価した。BAOP-16 をマウス尾静脈より投与し、経時的にマウス頭部の蛍光画像を取得したところ、APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスでは正常マウスと比較して強い蛍光シグナルが認められた。この結果から、BAOP-16 の A β オリゴマー標的蛍光プローブとしての生体蛍光イメージングへの応用可能性が示唆された(**Figure 1-18a, b**)。

続いて、BAOP-16 が A β オリゴマーに結合しているかどうかを確認するため、生体蛍光イメージングで用いたマウスの脳を摘出し、脳組織切片を作製して、蛍光顕微鏡で観察した。APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片では、BAOP-16 の染色部位が多数認められた(**Figure 1-18c, d, f, g**)。一方、正常マウスの脳組織切片では、BAOP-16 染色部位は認められなかった(**Figure 1-18i, j**)。さらに、6E10 抗体および OMAB 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、BAOP-16 と 6E10 (**Figure 1-18e**)および OMAB (**Figure 1-18h**)の間に局在の一致がそれぞれ認められた。さらに、ThS を用いた蛍光染色では、ThS は BAOP-16 染色部位の中心領域のみを染色した(**Figure 1-19**)。これらの結果から、BAOP-16 は APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳内へ移行し、A β オリゴマーに結合することが示唆された。

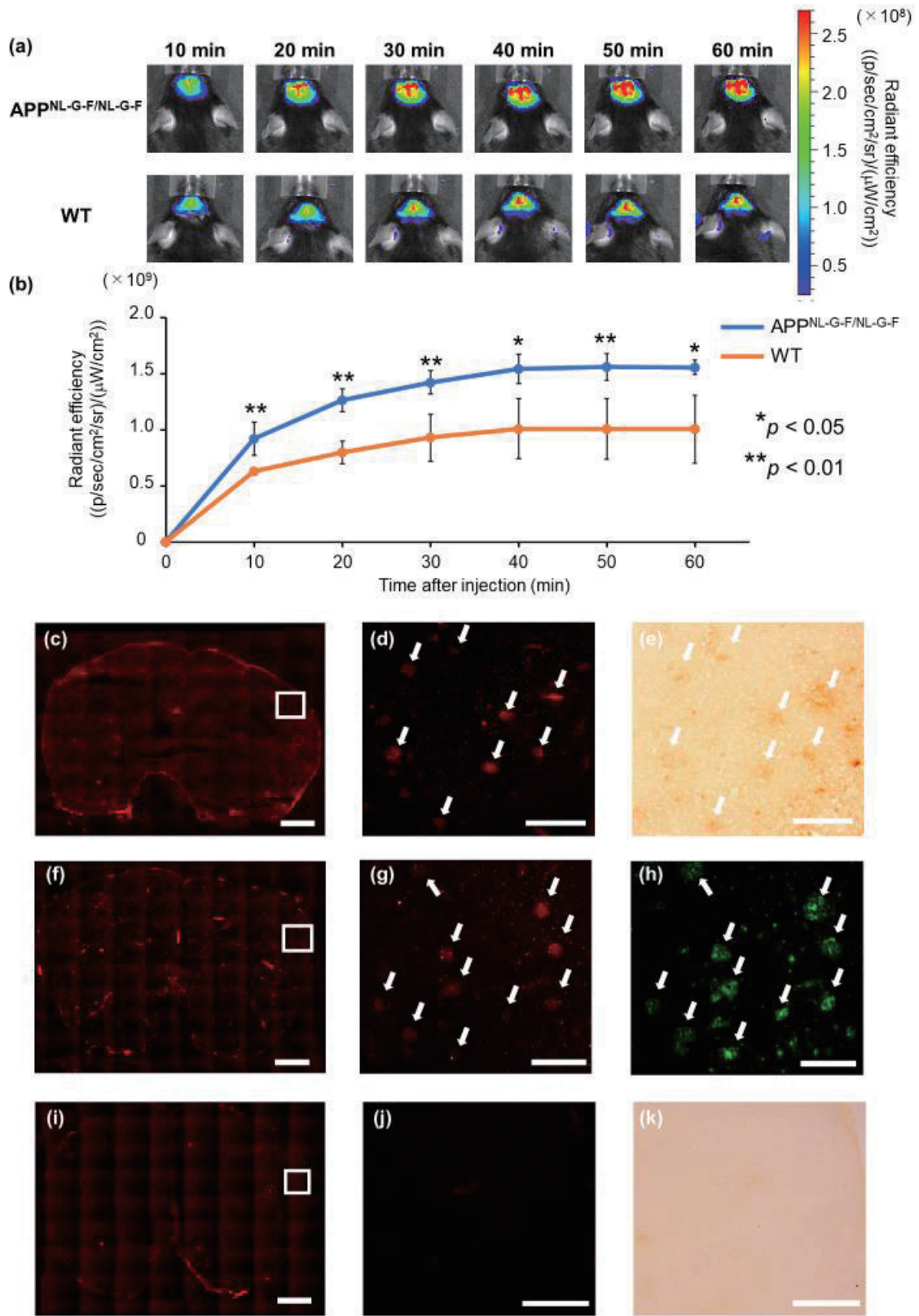


Figure 1-18. *In vivo* fluorescence imaging and *ex vivo* section staining of BAOP-16 using APP^{NL-G-F/NL-G-F} and age-matched wild-type (WT) mice. (a) Fluorescence images of APP^{NL-G-F/NL-G-F} and WT mice at 10, 20, 30, 40, 50, and 60 min after injection of BAOP-16 and (b) quantitative analysis of

fluorescence from the brains of APP^{NL-G-F/NL-G-F} and WT mice after injection of BAOP-16 ($n = 4$). Injected dose of BAOP-16 was 2 mg/kg. $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 640/680$ nm. (c and f) An *ex vivo* fluorescence image of a brain section from an APP^{NL-G-F/NL-G-F} mouse observed with the Cy5 filter set; (d) an enlarged image of the white solid flame in c; (e) immunohistochemical staining of d with 6E10 antibody; (g) an enlarged image of the white solid flame in f; (h) immunohistochemical staining of g with OMAB antibody (i) an *ex vivo* fluorescence image of a brain section from an age-matched WT mouse; (j) an enlarged image of the white solid flame in i; (k) immunohistochemical staining of j with 6E10 antibody. Scale bar: 1 mm (c, f, and i); 200 μ m (d, e, g, h, j, and k). Statistical analysis was performed using unpaired Student's t-test.

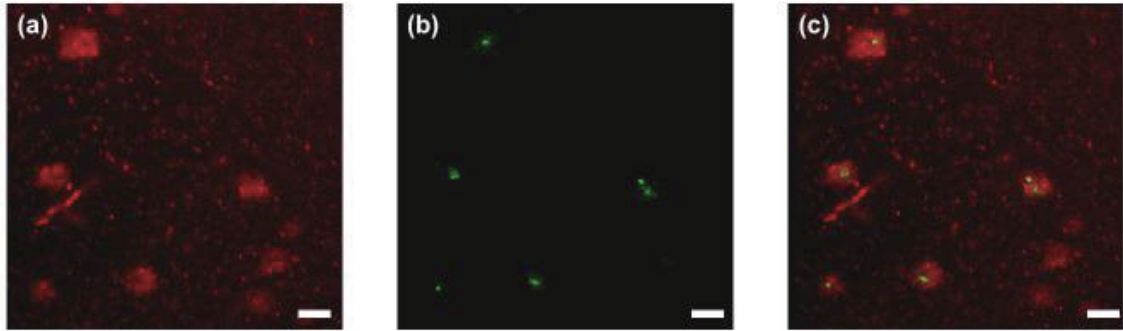


Figure 1-19. ThS staining of APP^{NL-G-F/NL-G-F} brain section after *ex vivo* fluorescence observation. (a) An *ex vivo* fluorescence image of the brain slice of the APP^{NL-G-F/NL-G-F} mouse observed with the Cy5 filter set. (b) the fluorescence image of the same section stained with ThS and observed with the GFP-B filter set. (c) The merged image of a and b. Scale bar: 50 μ m.

1.1.3 小括

本節では、 $A\beta$ オリゴマーの生体イメージングに応用可能な蛍光イメージングプローブの開発を目的として、BODIPY 誘導体の SAR 研究を行い、見出した化合物に関して、 $A\beta$ オリゴマー標的蛍光イメージングプローブとしての評価を行うことにより、以下の知見を得た。

- (1) SAR 研究において BAOP-16 が $A\beta$ オリゴマーに対する高い選択性および結合親和性を示した。
- (2) SAR 研究の結果より、y 字型の分子構造が $A\beta$ オリゴマー標的蛍光イメージングプローブの構造として有用であることが示唆された。
- (3) BAOP-16 は多様な形態の $A\beta$ オリゴマーに対して蛍光上昇を示した。
- (4) BAOP-16 は脳内へ移行し、 $A\beta$ イノキュレーションマウス脳内の $A\beta$ オリゴマーを選択的に検出した。
- (5) BAOP-16 による生体蛍光イメージングでは、 $APP^{NL-G-F/NL-G-F}$ マウスの頭部において、正常マウスと比較して強い蛍光シグナルが認められた。
- (6) *Ex vivo* 評価において、BAOP-16 が $APP^{NL-G-F/NL-G-F}$ マウスの脳内の $A\beta$ オリゴマーに結合していることが示唆された。

以上の結果より、BAOP-16 が $A\beta$ オリゴマーの生体イメージングに応用可能な蛍光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。加えて、y 字型の分子構造が $A\beta$ オリゴマー標的蛍光イメージングプローブの開発における分子設計戦略として有効であることが示唆された。

第2節 生体蛍光イメージングへの応用性の向上を目的とした BODIPY 誘導体の構造最適化

生体蛍光イメージングにおいて鮮明な蛍光画像を取得するためには、近赤外領域に吸収・蛍光波長を有すること、脳移行性を示すこと、標的を高感度かつ選択的に検出可能であることなどの複数の条件を満たす蛍光プローブの開発が求められる。第1節の SAR 研究において見出した BAOP-16 は A β オリゴマーの選択的検出能を有する一方で、最大吸収波長が近赤外領域よりも短い($\lambda_{\text{abs}} = 638 \text{ nm} < 650 \text{ nm}$)、脂溶性が非常に高い($\log P = 4.98$)、A β オリゴマーに対する結合選択性を示さない($K_d = 34.3 \text{ nM}$ for A β oligomer; $K_d = 15.9 \text{ nM}$ for A β fibril)といった生体蛍光イメージングに応用する上での課題を有している。そこで本節では生体蛍光イメージングへの応用性の向上を目的として、BAOP-16 のさらなる構造展開を行った。

1.2.1. 実験方法

試薬・機器

核磁気共鳴分光法には日本電子株式会社製 JEOL ECA500 および JOEL ECZ600R を用いた。マイクロプレートリーダーには TECAN 社製 Infinite® 200 pro M Plex を用いた。他の試薬・機器は第 1 節と同様である。

動物

第 1 章 第 1 節と同様にして、購入・飼育した。

合成

5-Nitro-4-phenylpentan-2-one (**3**), 2-methyl-4-phenyl-1*H*-pyrrole (**5**), 5,5-difluoro-3,7-dimethyl-1,9-diphenyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine (**7**), (*E*)-2-((4-(2-(5,5-difluoro-7-methyl-1,9-diphenyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)(methyl)amino)ethan-1-ol (**9**, BAOP-16)は第 1 章 第 1 節と同様にして合成した。

(*E*)-4-(Thiophen-2-yl)but-3-en-2-one (**2**)

800 μL の 5 v/v%水酸化ナトリウム水溶液および 2-thiophenecarboxaldehyde (1.87 mL, 20 mmol)をアセトン(2 mL, 27.5 mmol)と水(4 mL)の混合溶媒に加え、室温で 7 時間攪拌した。水を加え反応を停止した後、クロロホルムで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン=5/95)で精製して目的物 **2** を収量 2062 mg (68%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J* = 5.2, 4.0 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H). MS (ESI) *m/z* 153.0 [M + H]⁺.

5-Nitro-4-(thiophen-2-yl)pentan-2-one (**4**)

化合物 **2** (2.0 g, 13.1 mmol)を DCM (42 mL)とニトロメタン(18 mL)の混合溶媒に溶解させ、DBU (2.2 mL)を加えた。0°Cで 3 時間攪拌した後、クロロホルムおよびチオ硫酸ナトリウム水溶液を加えることで反応を停止した。クロロホルムで抽出した後、有機層を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=15/85)で精製して目的物 **4** を収量 878 mg (31%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.24 (dd, *J* = 5.2, 1.2 Hz, 1H), 6.98–6.94 (m, 2H), 4.75 (dd, *J* = 12.6, 6.9 Hz, 1H), 4.65 (dd, *J* = 12.6, 7.4 Hz, 1H), 4.38–4.32 (m, 1H), 3.01 (dd, *J* = 6.9, 3.4 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H). MS (EI) *m/z* 213.3 [M]⁺.

2-Methyl-4-(thiophen-2-yl)-1*H*-pyrrole (**6**)

化合物 **4** (800 mg, 3.8 mmol), モルホリン(980 μL, 11.3 mmol), 酢酸アンモニウム(1730 mg, 22.5 mmol), 硫黄(360 mg, 11.3 mmol)を丸底フラスコに加え、80°Cで 30 分間攪拌した。室温

まで冷却した後、水を加えることで反応を停止した。クロロホルムで抽出した後、有機層を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= 15/85)で精製して目的物 **6** を収量 114 mg (19%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (br, 1H), 7.08 (dd, *J* = 4.6, 1.1 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 3.4, 1.1 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 4.6, 3.4 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 2.8, 1.7 Hz, 1H), 6.14–6.13 (m, 1H), 2.26 (s, 3H). HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C₉H₁₀NS, 164.0528, found 164.0528 [M + H]⁺.

5,5-Difluoro-3,7-dimethyl-1,9-di(thiophen-2-yl)-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine (**8**)

オルトギ酸トリエチル(78 μL, 0.47 mmol)を化合物 **6** (152 mg, 0.93 mmol)の DCM 溶液(10 mL)に氷冷下に加え、アルゴンガス雰囲気下 0°Cで 15 分間攪拌した。塩化ホスホリル(48 μL, 0.51 mmol)を氷冷下に加え、アルゴンガス雰囲気下室温で 3 時間攪拌した。トリエチルアミン(650 μL, 4.7 mmol)および三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(650 μL, 5.2 mmol)を氷冷下に加え、室温で 2 時間攪拌した。水を加え反応を停止し、クロロホルムで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで脱水し、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= 10/90)で精製して目的物 **8** を収量 29 mg (17%)で得た。¹H NMR (500 MHz, Acetone-*d*⁶) δ 7.83 (s, 1H), 7.54 (dd, *J* = 5.2, 1.1 Hz, 2H), 7.38 (dd, *J* = 4.0, 1.1 Hz, 2H), 7.10 (dd, *J* = 5.2, 4.0 Hz, 2H), 6.51 (s, 2H), 2.46 (s, 6H). HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C₁₉H₁₆BF₂N₂S₂, 385.0811, found 385.0814 [M + H]⁺.

(*E*)-2-((4-(2-(5,5-Difluoro-7-methyl-1,9-di(thiophen-2-yl)-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)(methyl)amino)ethan-1-ol (**10**, BAOP-18)

N-メチル-*N*-(2-ヒドロキシエチル)-4-アミノベンズアルデヒド(23 mg, 0.13 mmol)を化合物 **8** (47.7 mg, 0.13 mmol)の無水トルエン溶液(10 mL)に加えた。さらにピペリジン(100 μL)および酢酸(100 μL)を加え、アルゴンガス雰囲気下加熱還流した。溶媒を減圧留去し、残渣をアミノプロピル基修飾シリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン= 20/80)で精製して目的物 **10** を収量 13 mg (19%)で得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 7.81 (dd, *J* = 5.2, 1.1 Hz, 1H), 7.77–7.74 (m, 2H), 7.71 (dd, *J* = 5.2, 1.1 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 4.0, 1.1 Hz, 1H), 7.50–7.47 (m, 4H), 7.29 (dd, *J* = 5.2, 4.0 Hz, 1H), 7.24–7.21 (m, 2H), 6.80 (d, *J* = 9.17 Hz, 2H), 6.61 (s, 1H), 4.76 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H), 3.58 (q, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.49 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.03 (s, 3H), 2.52 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 156.77, 152.37, 150.87, 141.40, 137.51, 135.07, 133.95, 133.85, 133.74, 130.66, 129.64, 128.84, 128.82, 128.74, 127.99, 127.83, 127.02, 122.93, 119.37, 115.39, 114.66, 111.97, 111.73, 58.17, 53.91, 38.79, 14.26. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C₂₉H₂₇BF₂N₃OS₂, 546.1651, found 546.1653 [M + H]⁺.

3,7-Dimethyl-1,9-diphenyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine-5,5-dicarbonitrile (**11**)

塩化スズ(IV)の 1 M DCM 溶液(118 μ L, 0.11 mmol)およびトリメチルシアニド(200 μ L, 1.5 mmol)を化合物 **7** (79 mg, 0.21 mmol)の無水 DCM 溶液(2 mL)に加え、室温で 45 分間攪拌した。水を加え反応を停止した後、クロロホルムで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで脱水し、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(クロロホルム/ヘキサン= 80/20)で精製して目的物 **11** を収量 73 mg (89%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.68–7.60 (m, 10H), 7.57 (s, 1H), 6.77 (s, 2H), 3.04 (s, 6H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₂₅H₁₈BN₄, 385.1630, found 385.1627 [M – H][–].

3,7-Dimethyl-1,9-di(thiophen-2-yl)-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine-5,5-dicarbonitrile (**12**)

化合物 **11** と同様の合成法により、化合物 **8** から、目的物 **12** を収量 43.6 mg (23%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (s, 1H), 7.42 (dd, J = 5.2, 1.1 Hz, 2H), 7.24 (dd, J = 3.4, 1.1 Hz, 2H), 7.19 (s, 2H), 7.11 (dd, J = 5.2, 3.4 Hz, 2H), 6.52 (s, 2H), 2.73 (s, 6H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₂₁H₁₄BN₄S₂, 397.0758, found 397.0761 [M – H][–].

(*E*)-3-(4-((2-Hydroxyethyl)(methyl)amino)styryl)-7-methyl-1,9-diphenyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine-5,5-dicarbonitrile (**13**, BAOP-19)

N-メチル-*N*-(2-ヒドロキシエチル)-4-アミノベンズアルデヒド(15 mg, 0.085 mmol)を化合物 **7** (33 mg, 0.085 mmol)の無水トルエン溶液(5 mL)に加えた。さらにピペリジン(100 μ L)および酢酸(100 μ L)を加え、アルゴンガス雰囲気下 80°Cで 3 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をアミノプロピル基修飾シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/ヘキサン= 80/20)で精製して目的物 **13** を収量 12 mg (26%)で得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 8.00 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.69–7.67 (m, 3H), 7.59–7.47 (m, 10H), 7.31 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.89 (d, J = 9.16 Hz, 2H), 6.77 (s, 1H), 4.77 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 3.60 (q, J = 5.2 Hz, 2H), 3.54 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.08 (s, 3H), 2.72 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 156.57, 151.66, 151.14, 145.92, 143.91, 141.60, 132.96, 132.65, 132.01, 130.16, 129.43, 129.29, 129.24, 129.17, 128.71, 128.60, 128.53, 122.79, 121.37, 117.52, 117.32, 112.30, 109.54, 58.25, 53.94, 30.69, 14.73. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for C₃₅H₃₁BN₅O, 548.2616, found 548.2615 [M + H]⁺.

(*E*)-3-(4-((2-Hydroxyethyl)(methyl)amino)styryl)-7-methyl-1,9-di(thiophen-2-yl)-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine-5,5-dicarbonitrile (**14**, BAOP-20)

化合物 **13** と同様の合成法により、化合物 **12** から、目的物 **14** を収量 12 mg (19%)で得た。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 8.00 (d, J = 15.1 Hz, 1H), 7.87 (dd, J = 4.8, 1.4 Hz, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.76 (dd, J = 4.8, 1.4 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.68 (dd, J = 3.4, 1.4 Hz, 1H), 7.56–7.54 (m, 3H), 7.32 (dd, J = 4.8, 3.4 Hz, 1H), 7.27–7.24 (m, 2H), 6.89 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 4.78 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 3.60 (q, J = 5.5 Hz, 2H), 3.54 (q, J = 5.5 Hz, 2H), 3.08 (s, 3H), 2.68 (s, 3H). HRMS (ESI-

TOF) m/z calcd for $C_{31}H_{27}BN_5OS_2$, 560.1745, found 560.1745 $[M + H]^+$.

5,5-Difluoro-3,7,10-trimethyl-1,9-diphenyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine (15)

塩化アセチル(180 μ L, 2.5 mmol)を化合物 **5** (800 mg, 5.1 mmol)の無水 DCM 溶液(7 mL)に氷冷下加え、アルゴンガス雰囲気下室温で終夜攪拌した。トリエチルアミン(8 mL)および三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体(8 mL)を氷冷下加え、室温で2時間攪拌した。水を加え反応を停止し、クロロホルムで抽出した。有機層を硫酸ナトリウムで脱水し、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=7/93)で精製して目的物 **15** を収量 47.6 mg (5%)で得た。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.26–7.20 (m, 6H), 7.18–7.15 (m, 4H), 6.10 (s, 2H), 2.56 (s, 6H), 1.63 (s, 3H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{24}H_{22}BF_2N_2$, 387.1839, found 387.1836 $[M + H]^+$.

5,5-Difluoro-3,7,10-trimethyl-1,9-di(thiophen-2-yl)-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine (16)

化合物 **15** と同様の合成法により、化合物 **6** から、目的物 **16** を収量 152 mg (23%)で得た。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.32 (dd, $J = 5.2, 1.1$ Hz, 2H), 7.00 (dd, $J = 5.2, 3.4$ Hz, 2H), 6.94 (dd, $J = 3.4, 1.1$ Hz, 2H), 6.27 (s, 2H), 2.59 (s, 6H), 2.06 (s, 3H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{20}H_{18}BF_2N_2S_2$, 399.0967, found 399.0963 $[M + H]^+$.

3,7,10-Trimethyl-1,9-diphenyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine-5,5-dicarbonitrile (17)

塩化スズ(IV)の 1 M DCM 溶液(62 μ L, 0.062 mmol)およびトリメチルシアニド(115 μ L, 0.86 mmol)を化合物 **15** (47.6 mg, 0.12 mmol)の無水 DCM 溶液(3 mL)に加え、室温で15分間攪拌した。水を加え反応を停止した後、クロロホルムで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで脱水し、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(クロロホルム/ヘキサン=93/7)で精製して目的物 **17** を収量 43.0 mg (87%)で得た。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.37–7.31 (m, 6H), 7.25–7.23 (m, 4H), 6.34 (s, 2H), 2.80 (s, 6H), 1.74 (s, 3H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{26}H_{20}BN_4$, 399.1787, found 399.1789 $[M - H]^-$.

3,7,10-Trimethyl-1,9-di(thiophen-2-yl)-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine-5,5-dicarbonitrile (18)

化合物 **17** と同様の合成法により、化合物 **16** から、目的物 **18** を収量 32.8 mg (73%)で得た。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.61 (dd, $J = 5.2, 1.1$ Hz, 2H), 7.27 (dd, $J = 5.2, 3.4$ Hz, 2H), 7.21 (dd, $J = 3.4, 1.1$ Hz, 2H), 6.68 (s, 2H), 3.02 (s, 6H), 2.36 (s, 3H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $C_{22}H_{16}BN_4S_2$, 411.0915, found 411.0916 $[M - H]^-$.

(E)-3-(4-((2-Hydroxyethyl)(methyl)amino)styryl)-7,10-dimethyl-1,9-diphenyl-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinine-5,5-dicarbonitrile (**19**, BAOP-23)

化合物 **13** と同様の合成法により、化合物 **17** から、目的物 **19** を収量 5.9 mg (14%) で得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 7.88 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.51–7.35 (m, 13H), 7.31 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.51 (s, 1H), 4.75 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 3.59 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.51 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.05 (s, 3H), 2.70 (s, 3H), 1.73 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 154.47, 154.20, 151.33, 149.17, 146.95, 142.71, 139.06, 136.14, 135.51, 131.23, 129.80, 129.04, 128.91, 128.85, 128.52, 128.45, 128.29, 128.01, 122.85, 121.09, 120.46, 112.16, 109.70, 58.22, 53.92, 38.86, 18.58, 14.68. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C₃₆H₃₃BN₅O, 562.2773, found 562.2773 [M + H]⁺.

(E)-3-(4-((2-Hydroxyethyl)(methyl)amino)styryl)-7,10-dimethyl-1,9-di(thiophen-2-yl)-5H-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinine-5,5-dicarbonitrile (**20**, BAOP-24)

化合物 **13** と同様の合成法により、化合物 **18** から、目的物 **20** を収量 10.2 mg (22%) で得た。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 7.92 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 5.2, 1.1 Hz, 1H), 7.65 (dd, *J* = 5.2, 1.1 Hz, 1H), 7.52–7.51 (m, 3H), 7.35 (dd, *J* = 3.4, 1.1 Hz, 1H), 7.28 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 3.4, 1.1 Hz, 1H), 7.16 (dd, *J* = 5.2, 3.4 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 5.2, 3.4 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H), 6.59 (s, 1H), 4.75 (br, 1H), 3.59 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.52 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.68 (s, 3H), 2.10 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*⁶) δ 154.49, 151.67, 149.00, 143.58, 139.31, 139.00, 136.10, 134.96, 134.35, 131.83, 130.15, 129.85, 129.62, 129.31, 128.47, 128.17, 128.02, 126.26, 122.98, 122.14, 121.99, 112.37, 109.55, 79.33, 58.42, 54.15, 17.91, 14.78. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for C₃₂H₂₉BN₅OS₂, 574.1901, found 574.1902 [M + H]⁺.

物理的特性の計算

量子化学計算は Gaussian 16 ソフトウェア(Gaussian 社製)および GaussView 6 ソフトウェア(Gaussian 社製)を用いて行った。密度汎関数(DFT)法を用いて、構造最適化と最高占有軌道(HOMO)および最低非占有軌道(LUMO)のフロンティア分子軌道の推測を B3LYP/6-31+G(d,p)レベルで行った(CPU: 12th Gen Intel® Core™ i7-12700, コア数: 12, OS: Windows 11). Clog *P* 値は ALOGPS 2.1 システム⁵⁷を用いて計算した。

光物理的特性の測定

紫外可視吸収スペクトルは UV-1800 を用いて測定した。モル吸光係数は 0, 1, 5, 10, 20, 50 μM で被験化合物を溶解させた際の最大吸収波長における吸光度より算出した。蛍光スペクトルおよび蛍光量子収率は RF-6000 を用いて測定した。

光安定性評価

被験化合物を EtOH (BAOP-16, BAOP-18, BAOP-19, BAOP-23, BAOP-24)または 1 v/v%

DMSO を含む EtOH (BAOP-20)に溶解させた(濃度: 10 μ M). 化合物溶液(100 μ L)を Multi Wellplate (0.4 mL $\times$ 96 wells flatbottom)に添加した. 660 nm の赤色光源を用いて 40 mW/cm² の強度で光照射し, 10 分ごとに最大蛍光波長における蛍光強度を Infinite[®] 200 pro M Plex を用いて測定した. この操作を 60 分間行った.

粘度感受性の評価

被験化合物の 2 mM DMSO 溶液をエチレングリコール(EG)およびグリセロール(G)の混合溶液に 5 μ M となるよう加えた. [混合溶液の組成: EG/G = 100/0 (21 cP), 80/20 (52 cP), 70/30 (81 cP), 60/40 (124 cP), 50/50 (183 cP), 40/60 (283 cP)または 30/70 (426 cP)]^{58, 59} 化合物溶液(100 μ L)を Multi Wellplate (0.4 mL $\times$ 96 wells flatbottom)に添加し, 最大蛍光波長における蛍光強度を Infinite[®] 200 pro M Plex を用いて測定した. 測定値は以下に示す Förster-Hoffman 式^{60, 61}(Equation 1-1)に従い, 解析した.

$$\log I = x \log \eta + A \text{ (Equation 1-1)}$$

A: 定数, I: 蛍光強度, η : 粘度(cP), x: 粘度感受性

ペプチド凝集体の作製

第 1 章 第 1 節と同様にして作製した.

A β 存在下における蛍光スペクトルの測定

A β (終濃度: 10 μ M)および被験化合物(終濃度: 10 μ M)を 10 v/v% EtOH 含有 PBS 中で混和し, 5 分間(A β モノマーおよび A β オリゴマー)または 20 分間(A β フィブリル)室温で静置した. 試料を石英セルに移し RF-6000 を用いて蛍光スペクトルを測定した.

溶解性評価

被験化合物の 10% EtOH 溶液(0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50 μ M)を調製した. 卓上遠心機で 1 分間遠心分離を行った後, 上清を石英セルへ移し, UV-1800 を用いて最大吸収波長における吸光度を測定した.

結合飽和実験

第 1 章 第 1 節と同様にして行った.

検出限界の測定

被験化合物(10 μ M)を A β オリゴマー(0, 2, 4, 6, 8, 10 μ M)と混和し, 室温で 5 分間静置した. Multi Wellplate (0.4 mL $\times$ 96 wells flatbottom)に添加し, Infinite[®] 200 M Plex で被験化合物の最大蛍光波長における蛍光強度を測定した. 検量線はブランク値を通るように引いた. 検出限界は 3 σ /k 法を用いて算出した.

結合サイトの比誘電率の解析^{62,63}

化合物をヘキサン、キシレン、トルエン、酢酸エチル、DCM、1-ブタノール、2-プロパノール、EtOH 中の吸収・蛍光波長を測定した。各溶媒中の最大蛍光波長と比誘電率の値を基に、以下の式に従って、解析を行うことで、最大蛍光波長と比誘電率の関係式を得た。得られた式を基に、Aβ存在下における最大蛍光波長の値を用いて、結合サイトにおける比誘電率を求めた。有機溶媒の比誘電率には Sigma-Aldrich Solvent Center の値を用いた。

$$\Delta\lambda = a_1[(\epsilon_0 - 1)/(2\epsilon_0 + 1) - (n^2 - 1)/(2n^2 + 1)] + b_1 \text{ (Equation 1-2)}$$

$$1/\lambda_{em} = a_2[(\epsilon_0 - 1)/(2\epsilon_0 + 1) - (n^2 - 1)/(2n^2 + 1)] + b_2 \text{ (Equation 1-3)}$$

$$1/\lambda_{em} = a_3(\epsilon_0 - 1)/(2\epsilon_0 + 1) + b_3 \text{ (Equation 1-4)}$$

$a_1, a_2, a_3, b_1, b_2, b_3$: 定数, $\Delta\lambda$: ストークスシフト, λ_{em} : 最大蛍光波長, ϵ_0 : 比誘電率, n : 屈折率

ファントムイメージング

第 1 章 第 1 節と同様にしてマウス脳ホモジネートを得た。脳ホモジネートを Multi Wellplate (0.4 mL × 96 wells flatbottom) に 1 ウェル当たり 100 μL ずつ添加した。さらに Aβ (終濃度: 5 μM) および BAOP-24 (終濃度: 5 μM) を加え、室温で 30 分間静置した後、脳の蛍光画像を IVIS SPECTRUM イメージングシステムを用いて撮像した(露光時間: 1.0 s, f-stop: 2, 励起フィルター: 675 nm, 蛍光フィルター: 720 nm)。

In vitro 切片染色

マウス脳組織切片の作製

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウス(雌性, 4-5 月齢)より摘出した脳を包埋剤に浸漬し、ドライアイスを用いて急速冷凍した。凍結ブロックを、ライカ社製クライオスタットを用いて薄切し、25 μm 厚の切片を作製した。使用時まで -20°C で保存した。

ThS と被験化合物の共染色

第 1 章 第 1 節と同様にして行った。

Aβ配列認識抗体を用いた免疫組織化学染色

第 1 章 第 1 節と同様にして行った。

抗 Aβオリゴマー抗体を用いた免疫蛍光染色

OMAB 抗体を PBST で 200 倍希釈した後、脳組織切片を抗体溶液に室温で終夜浸漬した。脳組織切片を PBST で洗浄した後、PBST で 200 倍希釈した Alexa Fluor 488 標識 goat 抗マウス IgM 抗体(Thermo Fisher Scientific 社製)溶液に室温で 2 時間浸漬した。PBST で洗浄後、BAOP-24 の 50% EtOH 溶液(20 μM)に室温で 20 分間浸漬した。50% EtOH 水溶液で 1 分間の洗浄を 2 回行った後、BZ-9000 を用いて切片を観察した。

細胞培養

ラット褐色細胞腫 PC12 細胞は American Type Culture Collection 社より購入した。細胞は 10 v/v% FBS および 10 v/v% 非働化ウマ血清(Thermo Fisher Scientific 社製)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (ナカライテスク株式会社製)中, 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で培養した。

MTT アッセイ

PC12 細胞を 96 ウェルプレート(Corning 社製)に 30,000 cells/well で播種し, 10 v/v% FBS および 5 v/v% 非働化ウマ血清(Thermo Fisher Scientific 社製)を含む DMEM 中 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で 72 時間培養した。培地を除去した後, BAOP-24 および 1 v/v% DMSO を含むナカライテスク株式会社製フェノールレッド不含 DMEM (100 μ L)を添加した(BAOP-24 の終濃度: 0, 0.5, 2.5, 5, 10 μ M). 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で 24 時間培養した。以降の操作は第 1 章 第 1 節と同様にして行った。

生体蛍光イメージング

第 1 章 第 1 節と同様にして行った。

Ex vivo 蛍光染色

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウス(雌性, 5 月齢)および C57BL/6 マウス(雌性, 5 月齢)を用いた。BAOP-24 の 20 v/v% DMSO 含有プロピレングリコール溶液をマウスの尾静脈より 2 mg/kg で投与した。投与 30 分後にマウスの安楽死処置を行い, *in vitro* 切片染色と同様にして凍結切片を作製した。切片を BZ-9000 により用いて蛍光観察した後, ThS による蛍光染色, 6E10 抗体を用いた免疫組織化学染色または OMAB 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。ThS または OMAB 抗体により染色した切片は BZ-9000 を用いて, 6E10 抗体により染色した切片は FSX-100 を用いて観察した。

1.2.2. 結果と考察

分子設計

BAOP-16 の生体蛍光イメージングへの応用性の向上を目的として、3 つの設計戦略に従い、新たな分子を設計した(**Figure 1-20**). 1 つ目の設計戦略(**Strategy 1**)は、BODIPY 骨格の 1 位および 7 位のフェニル基のチエニル基への置換である。BODIPY 骨格の 1 位および 7 位にチエニル基を導入することにより、吸収・蛍光波長が長波長化することが報告されており⁶⁴, **Strategy 1** によって吸収・蛍光波長の長波長化が期待される。2 つ目の設計戦略(**Strategy 2**)は BODIPY 骨格のフルオロ基のシアノ基への置換である。シアノ基は極性が高く、脂溶性を低減することが期待される。さらに、シアノ基は強力な電子吸引性基であるため push-pull 効果を強め、吸収・蛍光波長の長波長化が期待できる。よって、**Strategy 2** により脂溶性の低減と吸収・蛍光波長の長波長化が同時に実現されると考えられる。3 つ目の設計戦略(**Strategy 3**)は BODIPY 骨格の 8 位へのメチル基の導入である。第 1 節の SAR 研究において、BODIPY 骨格の 1 位、7 位、8 位への置換基の導入が蛍光プローブの A β に対する結合様式に影響を与えることが示唆された。この結果を基に、8 位への置換基の導入が A β に対する結合様式を変化させ、A β オリゴマーに対する結合選択性を向上する可能性があると考え、本設計戦略を採用した。本研究では、合成が容易で、分子量の増加を最低限に抑えられることから、8 位に導入する置換基としてメチル基を選択した。これらの設計戦略に従い BAOP-16 を構造展開することにより、新たに 7 化合物(BAOP-18–BAOP-24)を設計した(**Figure 1-20**).

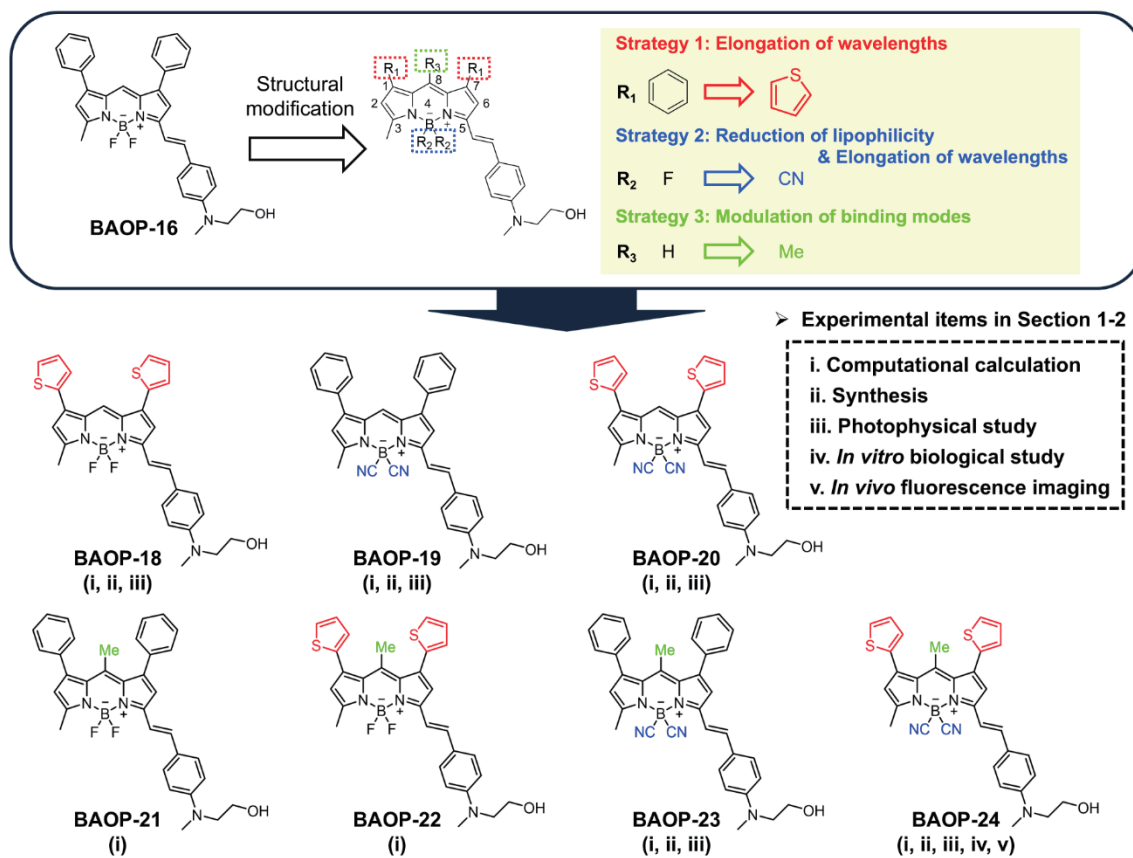


Figure 1-20. Design strategy and chemical structure of candidates.

計算科学を用いた物理学的特性の計算

化合物の合成を行う前に、設計した分子において吸収・蛍光波長の長波長化が生じるかどうかを推定するため、DFT 計算により候補化合物の HOMO と LUMO の間のエネルギー差を求めた(**Figure 1-21, Table 1-9**). チエニル基が導入された化合物の HOMO-LUMO エネルギー差はフェニル基が導入された化合物と比較して小さく、シアノ基が導入された化合物の HOMO-LUMO エネルギー差もフルオロ基が導入された化合物と比較して小さいという計算結果が得られた. これらの結果からチエニル基およびシアノ基の導入により遷移エネルギーが小さくなり、長波長化が生じると推定された. 一方で、メチル基が 8 位に導入された化合物の HOMO-LUMO エネルギー差はメチル基が導入されていない化合物と比較して大きいという計算結果が得られた. この結果から、8 位へのメチル基の導入により遷移エネルギーが大きくなり、短波長化が生じると推定された(**Table 1-9**). 最適化された構造においては、8 位にメチル基が導入された化合物の 1 位および 7 位の芳香環と BODIPY 骨格の間の 2 面角が、メチル基が導入されていない化合物と比較して大きくなるという計算結果が得られた. この結果より、8 位へのメチル基の導入により分子の共面性が減少し、電子の非局在化が制限され、HOMO-LUMO エネルギー差の増大が生じると考えられる(**Figure 1-21, Table 1-9**). 加えて、候補化合物の脂溶性を推定するために Clog *P* 値を ALOGPS 2.1 システム⁵⁷を用いて計算した. 結果として、メチル基の導入による Clog *P* 値への影響はほとんど認められなかったが、チエニル基およびシアノ基の導入による Clog *P* 値の顕著な低下が認められ、BAOP-21 を除く候補化合物は BAOP-16 と比較して低値を示した(**Table 1-9**). これらの結果より、新たに設計した化合物は BAOP-16 と比較して、生体蛍光イメージングへの応用性が高いことが予想された.

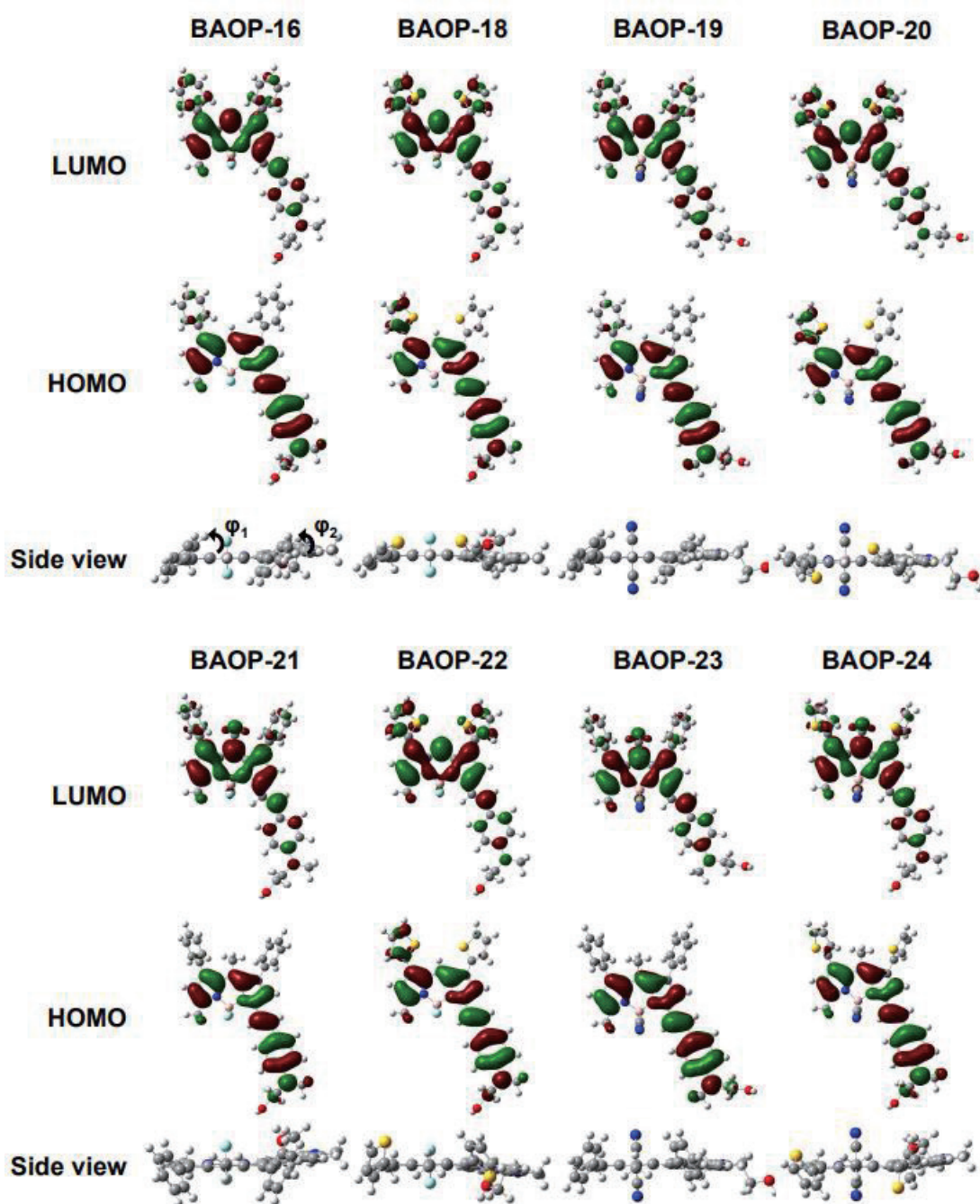


Figure 1-21. Optimized structures and frontier orbitals of candidates calculated by density functional theory (DFT). Calculations were performed at the B3LYP/6-31+G(d,p) level. φ_1 and φ_2 were specified in the side view of BAOP-16.

Table 1-9. Data of DFT Calculations^a and Clog *P*-values

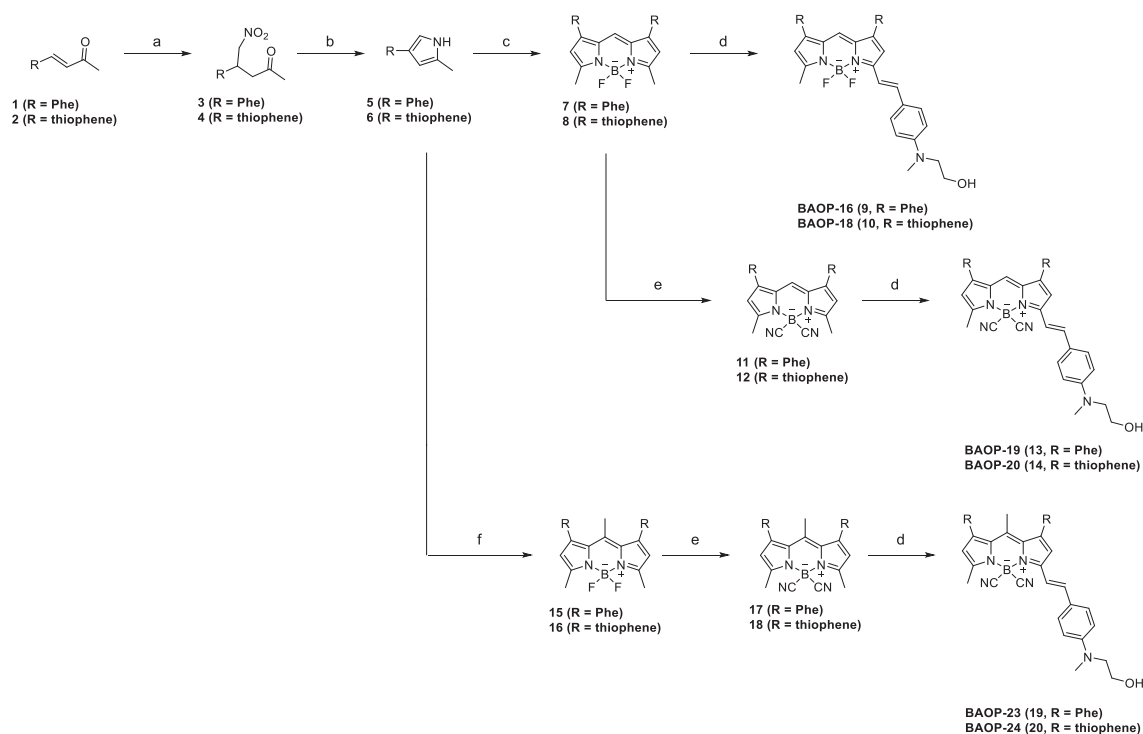
Compounds	HOMO (eV)	LUMO (ev)	Energy Gap (ev)	φ_1^b	φ_2^b	Clog <i>P</i>
BAOP-16	-4.99	-2.78	2.22	42.4	43.1	4.87
BAOP-18	-5.01	-2.87	2.14	35.4	-36.0	4.31
BAOP-19	-5.20	-3.03	2.17	43.2	43.8	3.97
BAOP-20	-5.22	-3.11	2.10	-36.0	-35.7	3.51
BAOP-21	-4.96	-2.68	2.28	-61.6	63.7	5.04
BAOP-22	-5.03	-2.80	2.23	70.3	-56.0	4.43
BAOP-23	-5.17	-2.94	2.23	62.6	-63.9	4.01
BAOP-24	-5.22	-3.06	2.16	-56.8	68.0	3.42

^aDFT calculations were performed at the B3LYP/6-31+G(d,p) level.

^b φ_1 and φ_2 stand for torsion angles between the plane of central chromophore and aromatic rings at the 1 or 7-position, and their positions are specified in Figure 1-21.

合成

第 1 節と同様に BODIPY 骨格を合成した後, BODIPY と *N*-メチル-*N*-(2-ヒドロキシエチル)-4-アミノベンズアルデヒドを原料とした Knoevenagel 縮合を行うことで合成した (Scheme 1-4). 5 化合物(BAOP-18, BAOP-19, BAOP-20, BAOP-23, BAOP-24)は十分な収量および純度で得ることができたが, BAOP-21 および BAOP-22 については分離が困難な副生成物が多く生じたことから, 評価を行うために必要な収量および純度で得ることができなかった. 計算科学を用いた評価において, BAOP-21 および BAOP-22 はそれぞれの対象化合物 (BAOP-16 および BAOP-18)と比較して波長が短く, 脂溶性が高いと推定されたことから (Table 1-9), 生体蛍光イメージングへの応用性は比較的低いと考え, 以降の評価における候補化合物から除外した.



Scheme 1-4. Synthetic route of BAOP-18, BAOP-19, BAOP-20, BAOP-23, and BAOP-24^a.
^aReagents: (a) nitromethane, DBU, DCM, 0°C, 3 h; (b) morpholine, NH₄OAc, S, 80°C, 0.5 or 1.5 h; (c) 1. triethyl orthoformate, POCl₃, DCM, rt, 3 h; 2. BF₃·OEt, Et₃N, rt, 2 h; (d) *N*-methyl-*N*-(2-hydroxyethyl)-4-amino benzaldehyde, piperidine, AcOH, toluene, 80 or 110°C; (e) SnCl₄, TMSCN, DCM, rt 15–45 min; (f) 1. acetyl chloride, DCM, rt, overnight; 2. BF₃·OEt, Et₃N, rt, 2 h.

光物理学的特性の評価

クロロホルム中における光物理学的特性を評価した。5 化合物の吸収波長は、いずれも BAOP-16 の吸収波長より長波長領域に認められ、BAOP-23 を除く 4 化合物の最大吸収波長については近赤外領域に認められた。また蛍光波長についても、BAOP-16 より長波長領域に認められた(**Table 1-10, Figure 1-22a**)。この結果から、組織透過性の高い長波長領域での蛍光イメージングへの応用が可能であることが示された。また、いずれの化合物についても BAOP-16 と比較してストークスシフトの増大が認められたことから、励起光や散乱光によるアーチファクトが低減され、蛍光イメージングにおけるシグナル/ノイズ(signal/noise; S/N)比が改善すると考えられる。さらに、いずれの化合物についても BAOP-16 と同様に良好なモル吸光係数および蛍光量子収率が認められた(**Table 1-10**)。加えて、光を 60 分間照射した後に、評価化合物の蛍光を測定したところ、いずれの化合物についても光照射前の 80%以上の強度で蛍光を示したことから、高い光安定性が示唆された(**Figure 1-22b**)。

Table 1-10. Photophysical Properties of Candidates^a

Compounds	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ϕ^b
BAOP-16	638 ^c	704 ^c	66	9.6×10^4	0.22 ^c
BAOP-18	659	740	81	7.9×10^4	0.21
BAOP-19	663	740	77	8.1×10^4	0.21
BAOP-20	686	768	82	8.9×10^4	0.12
BAOP-23	636	724	88	5.5×10^4	0.25
BAOP-24	658	755	97	6.9×10^4	0.21

^aThese data were measured in chloroform.

^b ϕ were determined versus that of BAP-2 in chloroform²⁸.

^cThis value was demonstrated in Section 1-1.

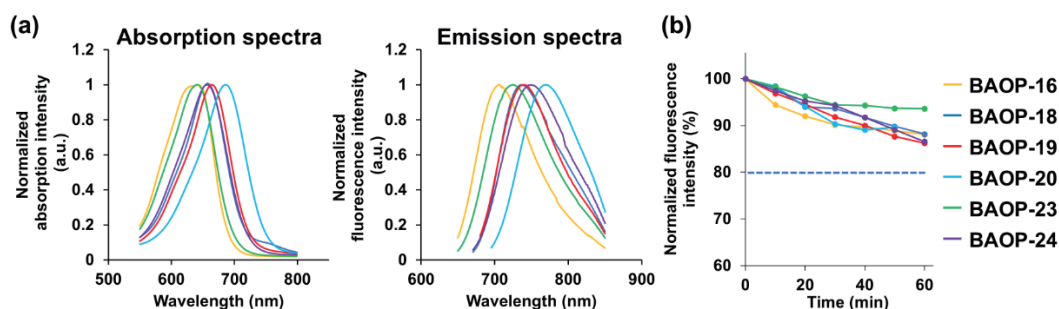


Figure 1-22. Photophysical properties of candidates. (a) Absorption and emission spectra of candidates in chloroform. (b) Fluorescence intensity of candidates measured at each time-point during continuous light irradiation ($n = 4$).

粘性環境に対する感受性の評価

分子ローター型の蛍光分子については、粘性の高い環境中で分子内回転が制御され、TICTによる無輻射失活が抑制されることで蛍光強度が増大することが知られている^{59,65}。粘度への感受性の調節がA β オリゴマーの検出能に影響を与えることが報告されており、粘度への感受性の評価はA β オリゴマーを標的とした蛍光イメージングプローブの開発において重要であると考えられる。そこで、粘度の異なる溶媒中における評価化合物の蛍光強度を評価した。いずれの化合物も粘度の増大に伴い蛍光強度の増加を示したことから、分子ローターとして振る舞うことが示された(**Figure 1-23**)。加えて、評価化合物の粘度に対する感受性を評価するために、Förster-Hoffman 式^{60, 61}(**Equation 1-1**)を用いて、粘度感受性係数(x)を計算した。BAOP-20を除き、評価化合物の x 値(0.23–0.37)はBAOP-16(0.20)と比較して高い値を示した。この結果より、BAOP-20を除く評価化合物はBAOP-16と比較して粘度感受性が高いことが示された。さらに、評価化合物の x 値はアミロイドオリゴマーに対して蛍光上昇を示す既報の蛍光分子の x 値(AggFluor P1: 0.28⁵⁹, RBF P1b: 0.32⁶⁵)と同程度である一方、アミロイドフィブリル選択的な蛍光分子の x 値(ThT: 0.79⁶⁵, AggFluor P18: 0.68⁵⁹)よりも低値であったことから、候補化合物の粘度感受性はA β オリゴマーの検出に適した範囲内にあることが示唆された(**Figure 1-24**)。

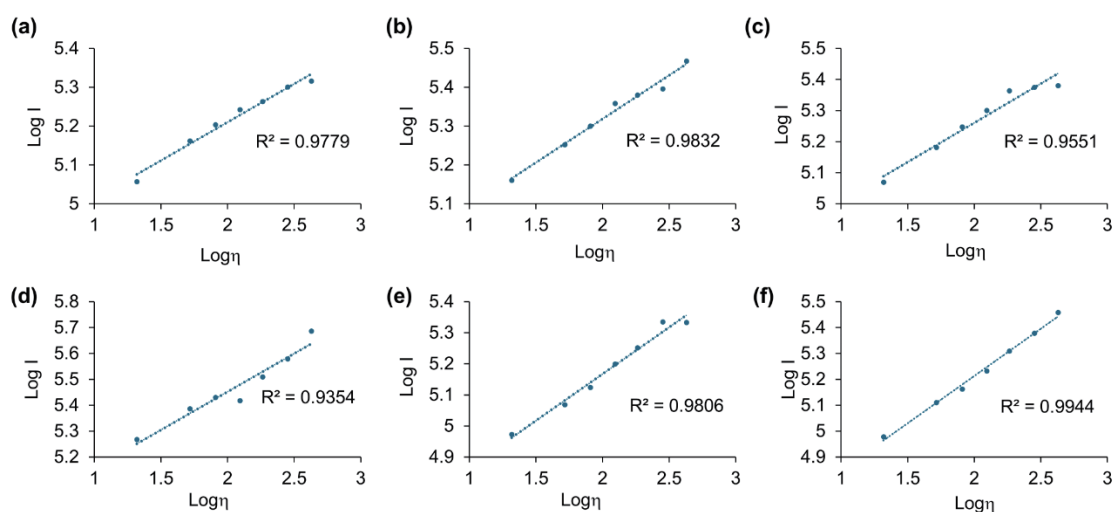


Figure 1-23. Relationships between viscosity and fluorescent intensity of candidates. (a) BAOP-16, (b) BAOP-18, (c) BAOP-19, (d) BAOP-20, (e) BAOP-23, and (f) BAOP-24.

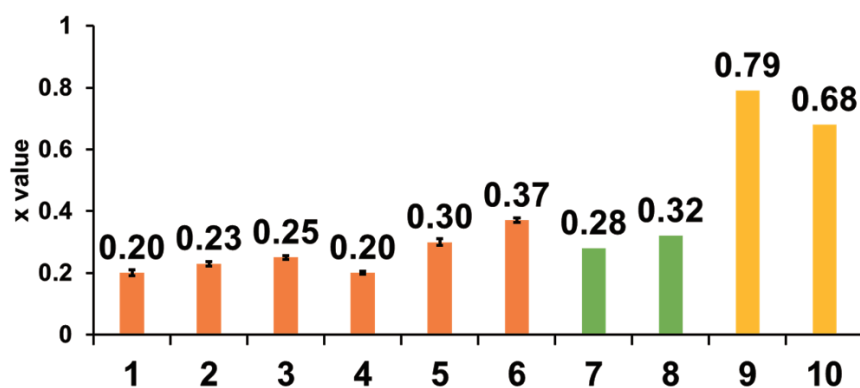


Figure 1-24. The x value of candidates and dyes reported previously (1. BAOP-16; 2. BAOP-18; 3. BAOP-19; 4. BAOP-20; 5. BAOP-23; 6. BAOP-24; 7. AggFluor P1; 8. RBF P1b; 9. ThT; 10. AggFluor P18). The x values of 7 and 10 were cited from ref. 59 and those of 8 and 9 were cited from ref. 65.

A β 存在下における蛍光特性の評価

続いて、評価化合物の A β モノマー、A β オリゴマー、A β フィブリル存在下における蛍光スペクトルを測定した(**Figure 1-25**)。A β オリゴマー存在下では、BAOP-20 を除く評価化合物に関して顕著な蛍光上昇が認められた。なかでも BAOP-24 は特に高い蛍光上昇(40.7-fold)を示し、BAOP-16 より高感度で A β オリゴマーを検出可能であることが示唆された。さらに、BAOP-23 も評価化合物の中で比較的高い蛍光上昇を示したことから、メチル基の BODIPY 骨格の 8 位への導入が A β オリゴマーの検出感度の向上に寄与していると考えられる(**Figure 1-25**, **Table 1-11**)。既報では A β オリゴマーの検出には低い粘度感受性が適することが示唆されている一方で^{59,65}、本研究では A β オリゴマーに対して高い検出感度を示す BAOP-23 および BAOP-24 は、評価化合物の中で比較的高い粘度感受性を示した(**Figure 1-24**)。この結果から、A β オリゴマーの高感度検出における粘度感受性の至適範囲が存在する可能性が示唆された(**Figure 1-26**)。また、BAOP-20 は他の化合物と異なり A β オリゴマー存在下において蛍光上昇を示さなかった。この結果を考察するために、評価化合物の水系溶媒への溶解性を評価した(**Figure 1-27**)。BAOP-20 は非常に低い溶解性を示したことから、A β 存在下における蛍光特性評価時に凝集が生じていることが示唆された。BAOP-20 は凝集状態にあると、凝集起因消光(ACQ)効果⁶⁶により蛍光を失い、さらには A β オリゴマーの結合サイトへの接近も制限されると考えられる。このような現象が生じるため、BAOP-20 は A β オリゴマー存在下で蛍光上昇を示さないと考えられる。一方で、BAOP-20 にメチル基を導入した化合物である BAOP-24 は BAOP-20 と比較して高い溶解性を示した。これは 8 位へのメチル基の導入により 1 位および 7 位の芳香環と BODIPY 骨格の間の 2 面角が増大し、自己凝集が抑制されることにより、水系溶媒中での分散性が増大するためであると考えられる。この結果から、メチル基の 8 位への導入は水系溶媒への溶解性を改善し、生物学的使用への適合性を向上させる効果を有することが示唆された(**Figure 1-27**)。BAOP-20 は溶解性が非常に低く、

生物学的使用が困難であると考え、以降の評価における候補化合物から除外した。加えて、異なる濃度の A β オリゴマー存在下における評価化合物の蛍光強度を測定したところ、A β オリゴマーの濃度と蛍光強度の間に直線的な相関が認められたことから、A β オリゴマーを定量的に検出することができる可能性が示された(**Figure 1-28**)。さらに、3 σ /k 法により検出限界(LOD)を求めたところ、いずれの化合物も nM オーダーの値を示した(**Table 1-12**)。なかでも BAOP-24 が最も低い検出限界(9.3 nM)を示し、評価化合物の中で最も高い検出感度を有することが示唆された。この結果は、上述の蛍光上昇度評価の結果と合致している。また、A β フィブリルおよび A β モノマー存在下で、いずれもほとんど蛍光上昇を示さず、A β オリゴマーに対する選択性はいずれの化合物も BAOP-16 と同程度であった(**Figure 1-25**, **Tables 1-11 and 1-13**)。加えて、BSA 存在下での蛍光スペクトルを測定したところ、BAOP-18 を除く化合物について BSA に対する A β オリゴマーへの選択性が BAOP-16 と比較して向上することが示された(**Figure 1-29**, **Table 1-13**)。以上の結果から、構造展開により A β オリゴマーを標的する蛍光イメージングプローブに求められる蛍光特性が改善することが示された。

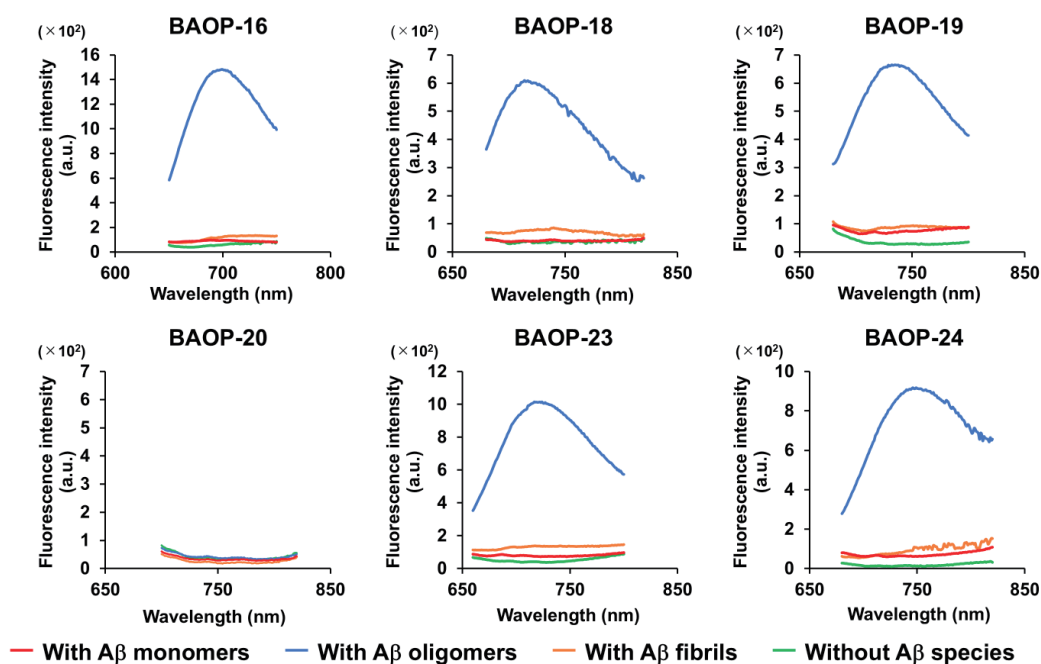


Figure 1-25. Representative fluorescence spectra of candidates with or without A β species.

Table 1-11. Spectroscopic Data upon Binding to A β species ($n = 3$)

Compounds	With oligomers			With fibrils			SI ^b
	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	fold ^a	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	fold ^a	
BAOP-16	704	66	25.2	737	99	2.12	11.9
BAOP-18	718	59	22.0	757	98	2.02	10.9
BAOP-19	733	70	20.3	762	99	2.60	7.78
BAOP-20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BAOP-23	719	83	26.6	741	105	3.44	7.74
BAOP-24	743	85	40.7	773	115	4.24	9.61

^aEach value represents an increase in fluorescence intensity with protein and is expressed as fold = FI (probe with proteins)/FI (probe).

^bEach value represents selectivity for A β oligomers versus A β fibrils and is expressed as SI = FI (with A β oligomers)/FI (with A β fibrils).

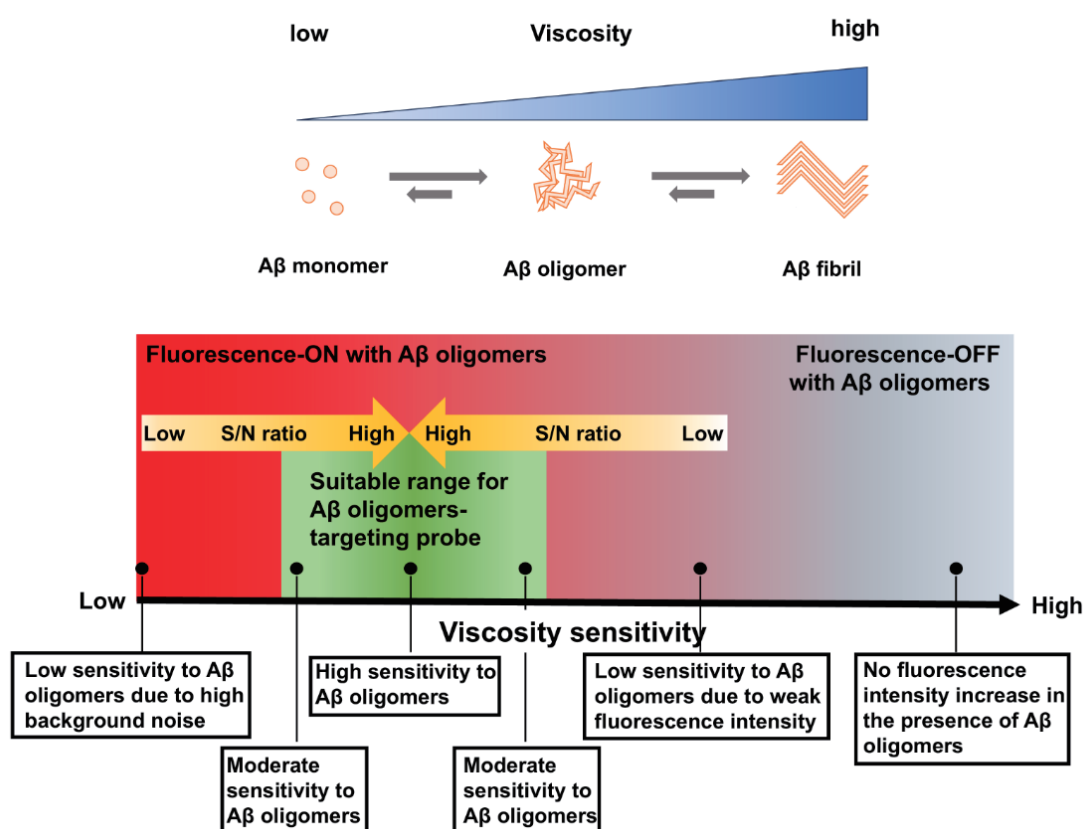


Figure 1-26. Outline of the expected relationship between viscosity sensitivity and sensitivity to A β oligomers.

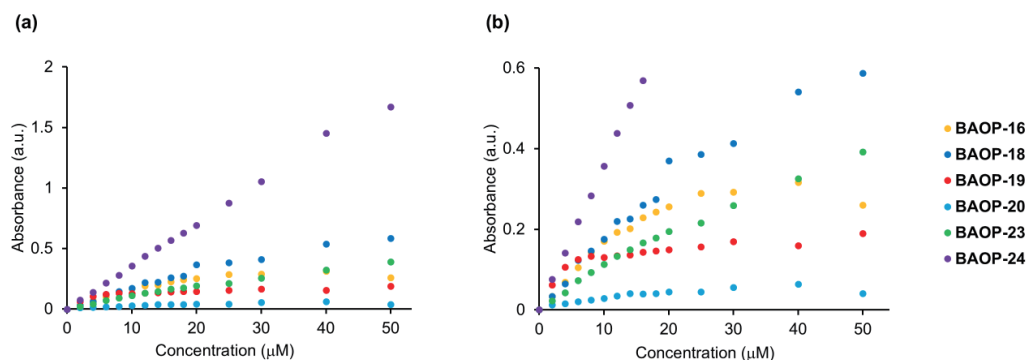


Figure 1-27. Absorbance of candidates at different concentrations in 10% EtOH aq.. (a) Absorbance of all candidates and (b) enlarged view of a.

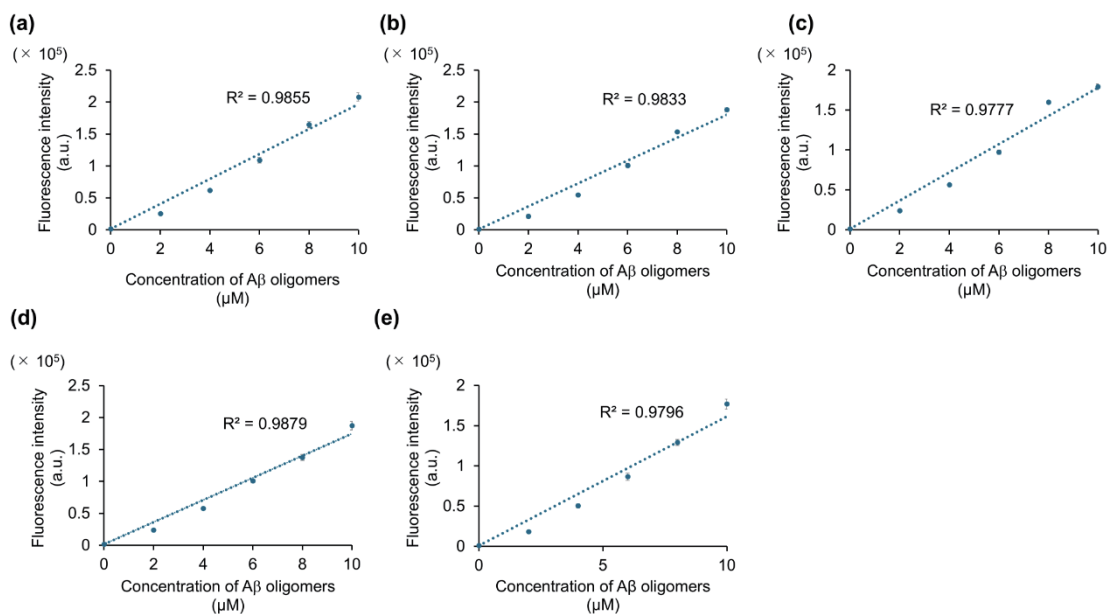


Figure 1-28. Representative data of relationships between concentrations of Aβ oligomers and fluorescence intensity of candidates. (a) BAOP-16, (b) BAOP-18, (c) BAOP-19, (d) BAOP-23, and (e) BAOP-24.

Table 1-12. Limit of Detection (LOD) of Candidates for A β Oligomers ($n = 3$).

Compounds	LOD ^a (nM)
BAOP-16	25.2 (1.12)
BAOP-18	33.1 (7.15)
BAOP-19	31.9 (16.8)
BAOP-23	37.7 (5.02)
BAOP-24	9.32 (3.75)

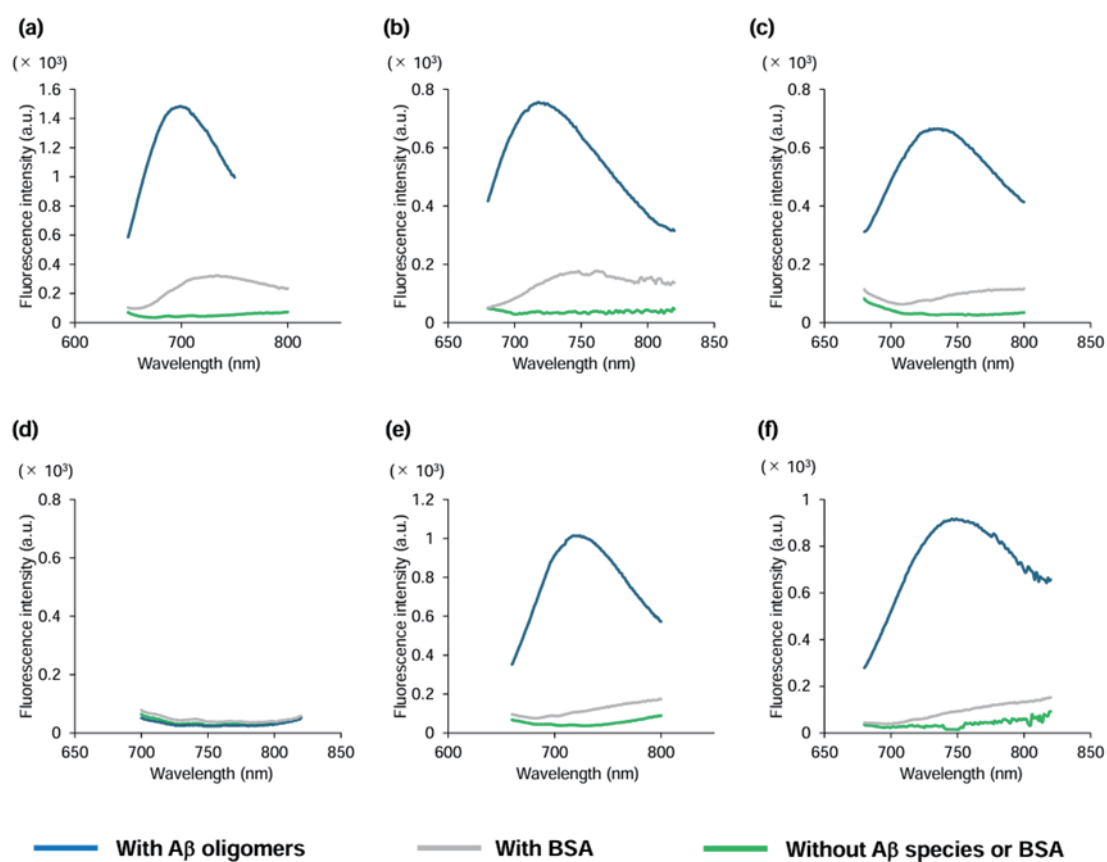
^aThe data are expressed as mean (S.D.).**Figure 1-29.** Fluorescence spectra of candidates in the presence of A β oligomers or BSA. (a) BAOP-16, (b) BAOP-18, (c) BAOP-19, (d) BAOP-20, (e) BAOP-23, and (f) BAOP-24.

Table 1-13. Spectroscopic Data upon Binding to A β monomers or BSA ($n = 3$).

Compounds	With A β monomers		With BSA	
	fold ^a	SI ^b	fold ^a	SI ^c
BAOP-16	1.99	12.7	5.09	4.96
BAOP-18	1.10	20.0	3.79	5.81
BAOP-19	2.46	8.23	2.61	7.78
BAOP-20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BAOP-23	2.03	13.1	2.53	10.5
BAOP-24	3.38	12.1	4.35	9.36

^aEach value represents an increase in fluorescence intensity with protein and is expressed as fold = FI (probe with proteins)/FI (probe).

^bEach value represents selectivity for A β oligomers versus A β fibrils and is expressed as SI = FI (with A β monomers)/FI (with A β fibrils).

^cEach value represents selectivity for A β oligomers versus A β fibrils and is expressed as SI = FI (with BSA)/FI (with A β fibrils).

A β に対する結合親和性の評価

結合飽和実験により、評価化合物の A β オリゴマーおよび A β フィブリルに対する結合親和性を求めた(**Figure 1-30a**, **Table 1-14**). 評価化合物の A β オリゴマーに対する K_d 値はいずれも BAOP-16 と同程度の値であり、本研究の構造展開において A β オリゴマーへの結合親和性が維持されることが示された. A β フィブリルに対する K_d 値については、BAOP-19 が BAOP-16 と同程度の値を示した一方、BAOP-18 および BAOP-23 は BAOP-16 と比較して約 2 倍、BAOP-24 は約 6 倍大きな値を示した(**Table 1-14**). この結果から、シアノ基の導入が A β フィブリルに対する結合親和性にほとんど影響を与えない一方で、チエニル基およびメチル基の導入は A β オリゴマーに対する結合親和性を維持しつつ、A β フィブリルに対する結合親和性を低減することが示唆された. 既報では、化合物の両親媒性を調節することで、A β フィブリルに対する A β オリゴマーへの結合選択性が向上することが示唆されている⁶⁷. したがって、本研究においてもチエニル基の導入による分子の両親媒性の変化が A β オリゴマーへの結合選択性の向上に寄与している可能性があると考えられる. また、既報において、A β オリゴマーは内部に A β フィブリルと比較して大きな結合ポケットを有することが報告されている⁶⁸. 一方、上述の DFT 計算では BODIPY 骨格の 8 位へのメチル基の導入により、分子のかさ高さが Z 軸方向に増大することが示唆された(**Figure 1-21**, **Table 1-9**). これらの知見を踏まえると、メチル基の導入による分子の Z 軸方向へのかさ高さの増大が、A β フィブリル内部の小さな結合ポケットへの接近を妨げた一方、A β オリゴマー内部の結合ポケットへの接近には影響しなかったことで、A β オリゴマーへの結合選択性が向上したと考えられる(BAOP-16: K_d ratio = 0.464, BAOP-24: K_d ratio = 2.17) (**Figure 1-30b**).

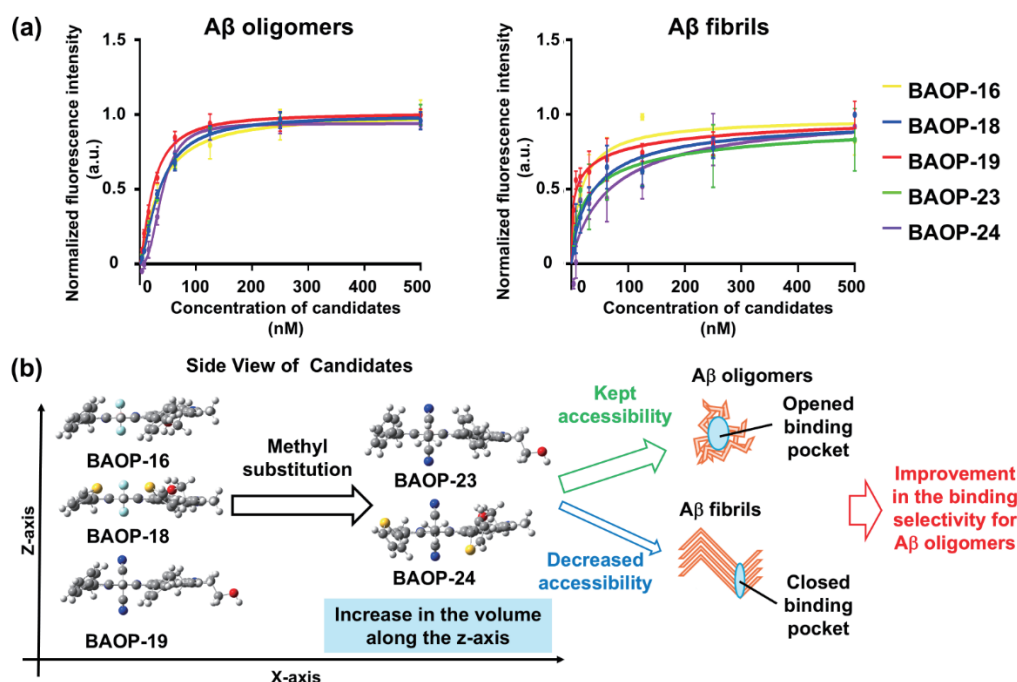


Figure 1-30. Evaluation of binding mode to Aβ species. (a) Representative saturation binding curves of candidates with Aβ oligomers or Aβ fibrils. The data of BAOP-16 were obtained from Section 1-1. (b) Side view of candidates and outline of the expected mechanism of improvement in binding selectivity by methyl-substitution.

Table 1-14. K_d Values with Aβ Oligomers and Aβ Fibrils^a ($n = 3$)

Compounds	Aβ oligomers (nM)	Aβ fibrils (nM)	K_d ratio ^b
BAOP-16	34.3 (3.47) ^c	15.9 (1.80) ^c	0.464
BAOP-18	33.0 (11.0)	32.3 (0.601)	0.979
BAOP-19	27.6 (2.82)	12.5 (4.58)	0.453
BAOP-23	35.5 (6.32)	32.4 (8.22)	0.913
BAOP-24	41.2 (5.11)	89.6 (13.2)	2.17

^aRepresented as mean (S.D.).

^bRepresented as $(K_d \text{ with A}\beta \text{ fibrils}) / (K_d \text{ with A}\beta \text{ oligomers})$.

^cDemonstrated in Section 1-1.

A β 凝集体内の結合サイトの評価

A β オリゴマーおよび A β フィブリル内の評価化合物の結合サイトの環境を推測するため、既報^{62,63}を参考に Ooshika-Lippert-Mataga (OLM)式⁶⁹⁻⁷¹(**Equation 1-2**)を応用して、各化合物の結合サイトの極性を計算した。まず、計算を行う上で必要な波長情報を得るために、極性の異なる複数の溶媒中における吸収・蛍光スペクトルを測定した。溶媒の極性が変化しても吸収波長はほとんどシフトしない(**Figure 1-31**, **Tables 1-15–1-19**)一方、溶媒の極性の増大に伴い蛍光波長が顕著に長波長側へシフトするため(**Figure 1-32**, **Tables 1-15–1-19**)、最大蛍光波長(λ_{em})とストークスシフト($\Delta\lambda$)の間に直線的な相関関係が認められた(**Figure 1-33**)。この結果を踏まえ、OLM 式を近似して得た式(**Equation 1-3**)を用いて計算を行ったところ、最大蛍光波長の逆数($1/\lambda_{em}$)と変数として比誘電率(ϵ_0)および屈折率(n)を含む項の間に直線的な相関関係が認められた(**Figure 1-34**)。しかし、A β 凝集体内の結合サイトの屈折率を求めることはできないため、さらに近似した式(**Equation 1-4**)を用いて計算を行ったところ、最大蛍光波長の逆数($1/\lambda_{em}$)と変数として比誘電率(ϵ_0)のみを含む項の間に直線的な相関関係が認められた(**Figure 1-35**)。この結果から、**Equation 1-4**を用いて、A β 結合時の蛍光波長(**Table 1-11**)を基に A β オリゴマーおよび A β フィブリル内の結合サイトの比誘電率を求めた(**Table 1-20**)。全ての化合物に関して、A β オリゴマー内の結合サイトの比誘電率は A β フィブリル内の結合サイトの比誘電率と比較して小さいことから、A β オリゴマー内の結合サイトは疎水性の高い環境であると考えられる。また、A β オリゴマー内の結合サイトの比誘電率に関して、BAOP-18, BAOP-19, BAOP-23, BAOP-24 の値は BAOP-16 の値と比較して小さいことから、結合親和性にほとんど影響しないものの、構造展開により A β オリゴマーに対する結合様式が変化することが示唆された。一方、A β フィブリル内の結合サイトの比誘電率に関して、BAOP-18, BAOP-19, BAOP-23, BAOP-24 の値は BAOP-16 の値と比較して小さいことから、構造展開により A β フィブリルに対する結合様式が変化することが示唆された。また、結合親和性が比較的高い化合物(BAOP-16, BAOP-19)と比較して、結合親和性が比較的低い化合物(BAOP-18, BAOP-23, BAOP-24)が A β フィブリル内の疎水性が高いサイトに結合する傾向が認められた(**Table 1-20**)。したがって、構造展開による A β フィブリルに対する結合サイトの変化が A β オリゴマーに対する結合選択性の向上に関与している可能性が示された。

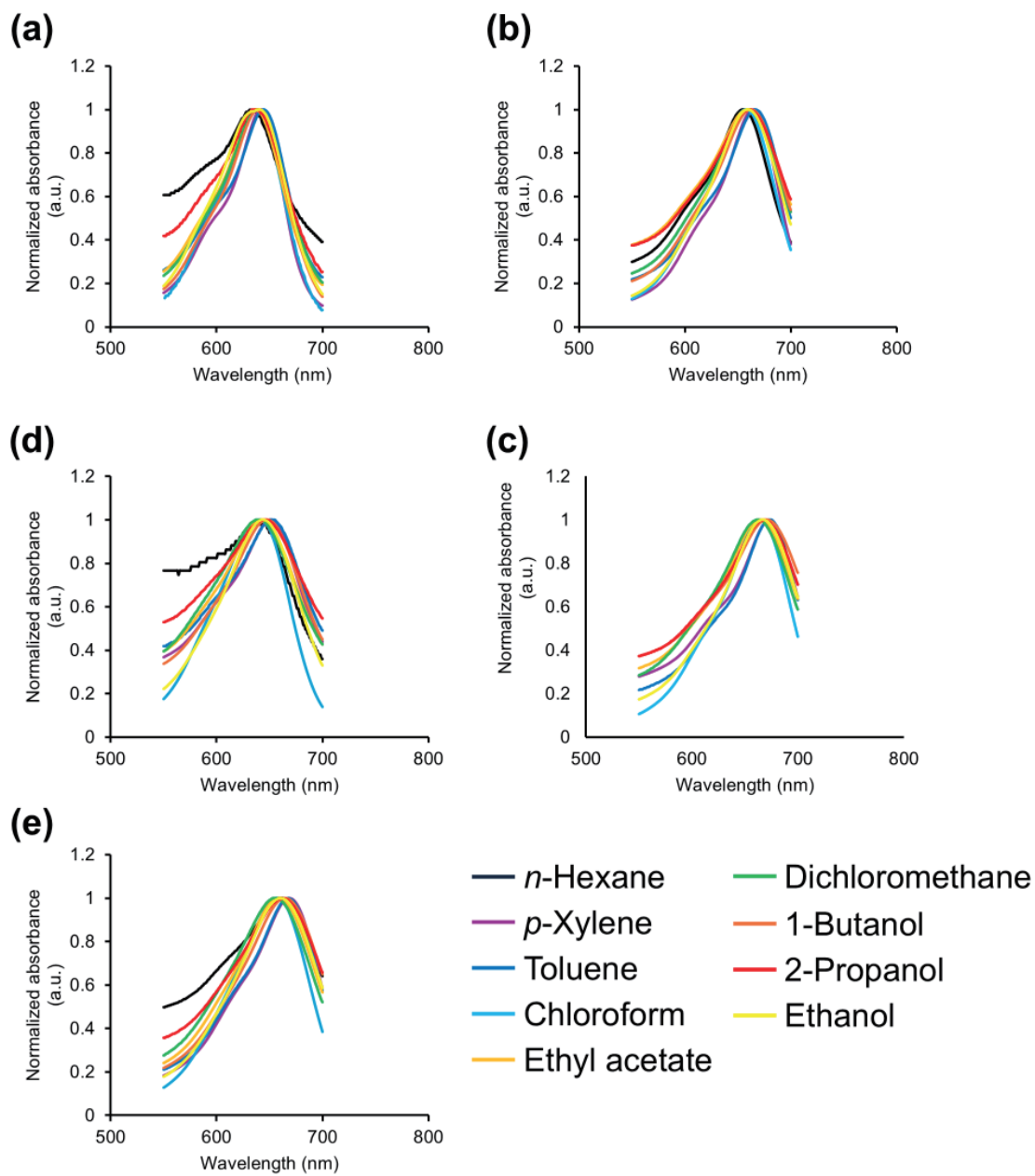


Figure 1-31. Absorption spectra of candidates in various solvents. (a) BAOP-16, (b) BAOP-18, (c) BAOP-19, (d) BAOP-23, and (e) BAOP-24.

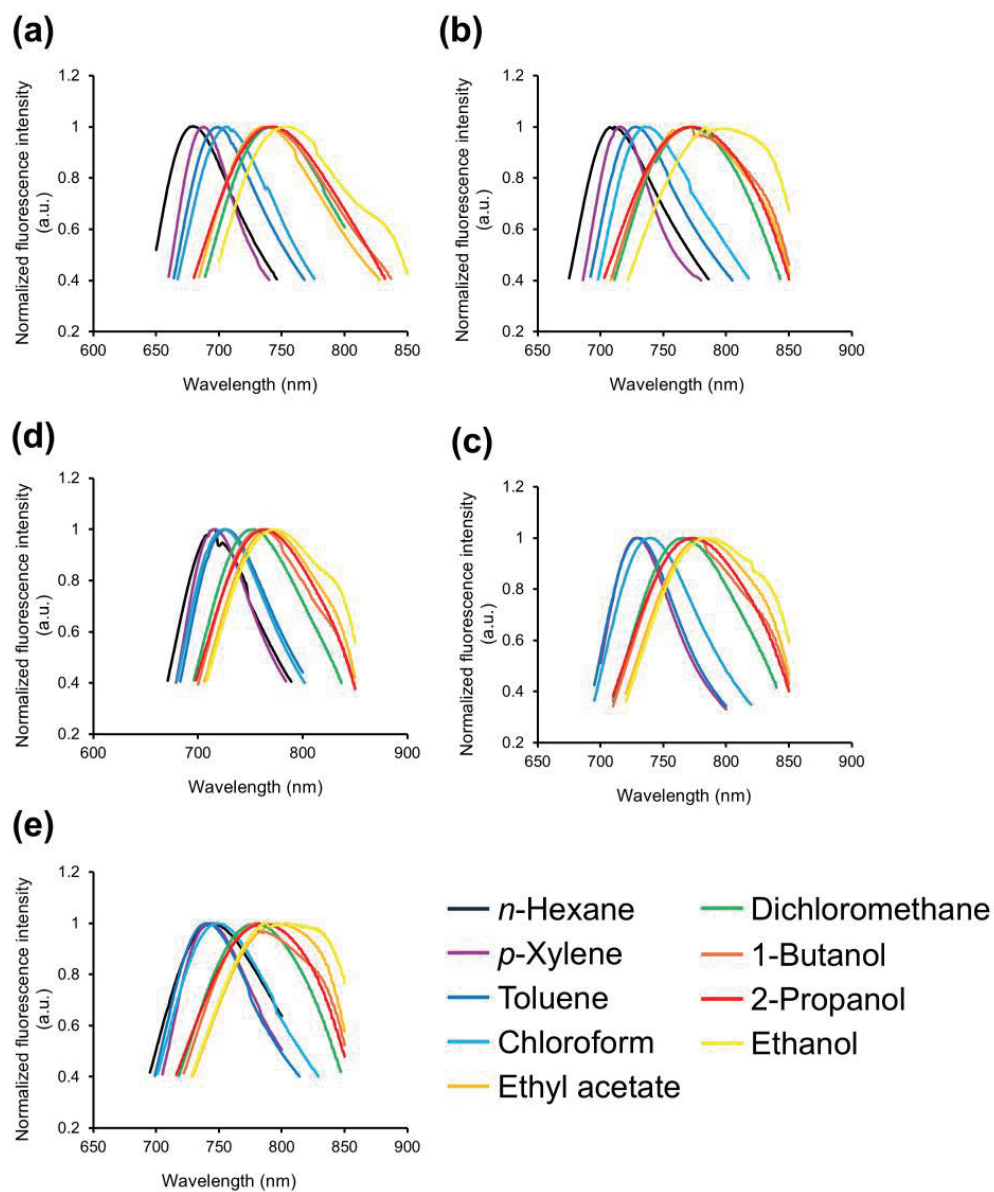


Figure 1-32. fluorescence spectra of candidates in various solvents. (a) BAOP-16, (b) BAOP-18, (c) BAOP-19, (d) BAOP-23, and (e) BAOP-24.

Table 1-15. Maximum Absorption and Emission Wavelengths of BAOP-16 in Various Solvents.

Solvents	ϵ_0^a	n^a	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
<i>n</i> -Hexane	1.89	1.375	634	679	45
<i>p</i> -Xylene	2.27	1.495	642	688	46
Toluene	2.4	1.496	644	699	55
Ethyl acetate	6.02	1.372	636	735	99
Dichloromethane	9.08	1.424	639	743	104
1-Butanol	17.80	1.399	639	740	101
2-Propanol	18.3	1.377	636	743	107
Ethanol	24.55	1.363	641	754	113

^aThese data were obtained from Sigma-Aldrich Solvent Center.

Table 1-16. Maximum Absorption and Emission Wavelengths of BAOP-18 in Various Solvents.

Solvents	ϵ_0^a	n^a	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
<i>n</i> -Hexane	1.89	1.375	655	711	56
<i>p</i> -Xylene	2.27	1.495	665	716	51
Toluene	2.4	1.496	644	699	55
Ethyl acetate	6.02	1.372	659	773	114
Dichloromethane	9.08	1.424	660	770	110
1-Butanol	17.80	1.399	662	772	110
2-Propanol	18.3	1.377	660	773	113
Ethanol	24.55	1.363	659	803	144

^aThese data were obtained from Sigma-Aldrich Solvent Center.

Table 1-17. Maximum Absorption and Emission Wavelengths of BAOP-19 in Various Solvents.

Solvents	ϵ_0^a	n^a	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
<i>n</i> -Hexane	1.89	1.375	N.D. ^b	N.D. ^b	N.D. ^b
<i>p</i> -Xylene	2.27	1.495	673	728	55
Toluene	2.4	1.496	673	727	54
Ethyl acetate	6.02	1.372	664	779	115
Dichloromethane	9.08	1.424	662	766	104
1-Butanol	17.80	1.399	671	773	102
2-Propanol	18.3	1.377	668	773	105
Ethanol	24.55	1.363	667	787	120

^aThese data were obtained from Sigma-Aldrich Solvent Center.

^bSpectral data of BAOP-19 could not be obtained due to its low solubility in *n*-hexane.

Table 1-18. Maximum Absorption and Emission Wavelengths of BAOP-23 in Various Solvents.

Solvents	ϵ_0^a	n^a	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
<i>n</i> -Hexane	1.89	1.375	638	715	77
<i>p</i> -Xylene	2.27	1.495	651	716	65
Toluene	2.4	1.496	653	724	71
Ethyl acetate	6.02	1.372	642	766	124
Dichloromethane	9.08	1.424	639	752	113
1-Butanol	17.80	1.399	648	762	114
2-Propanol	18.3	1.377	645	765	120
Ethanol	24.55	1.363	667	787	120

^aThese data were obtained from Sigma-Aldrich Solvent Center.

Table 1-19. Maximum Absorption and Emission Wavelengths of BAOP-24 in Various Solvents.

Solvents	ϵ_0^a	n^a	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
<i>n</i> -Hexane	1.89	1.375	660	744	84
<i>p</i> -Xylene	2.27	1.495	669	743	74
Toluene	2.4	1.496	668	742	74
Ethyl acetate	6.02	1.372	659	797	138
Dichloromethane	9.08	1.424	655	779	124
1-Butanol	17.80	1.399	665	785	120
2-Propanol	18.3	1.377	662	788	126
Ethanol	24.55	1.363	661	808	147

^aThese data were obtained from Sigma-Aldrich Solvent Center.

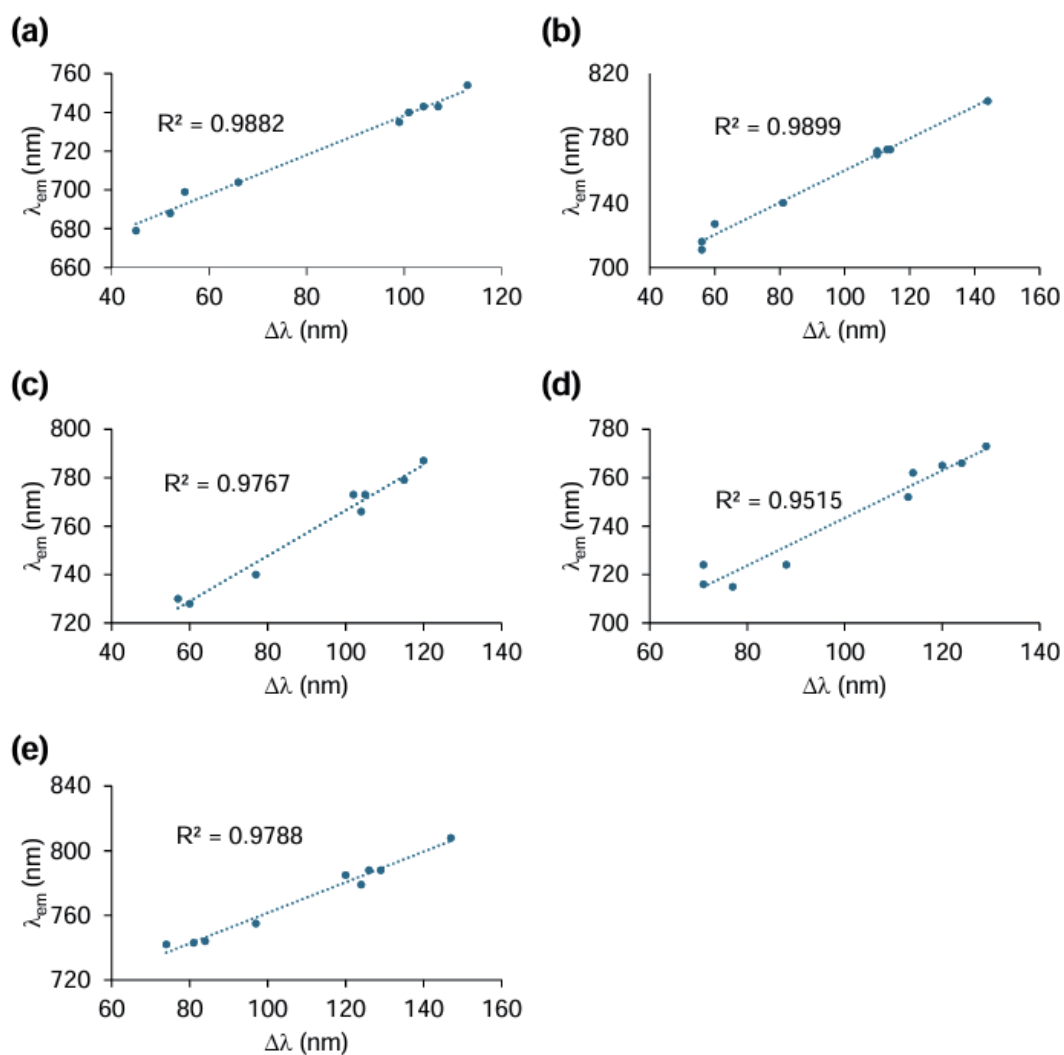


Figure 1-33. Relationships between maximum emission wavelengths (λ_{em}) and Stokes shifts ($\Delta\lambda$). (a) BAOP-16, (b) BAOP-18, (c) BAOP-19, (d) BAOP-23, and (e) BAOP-24.

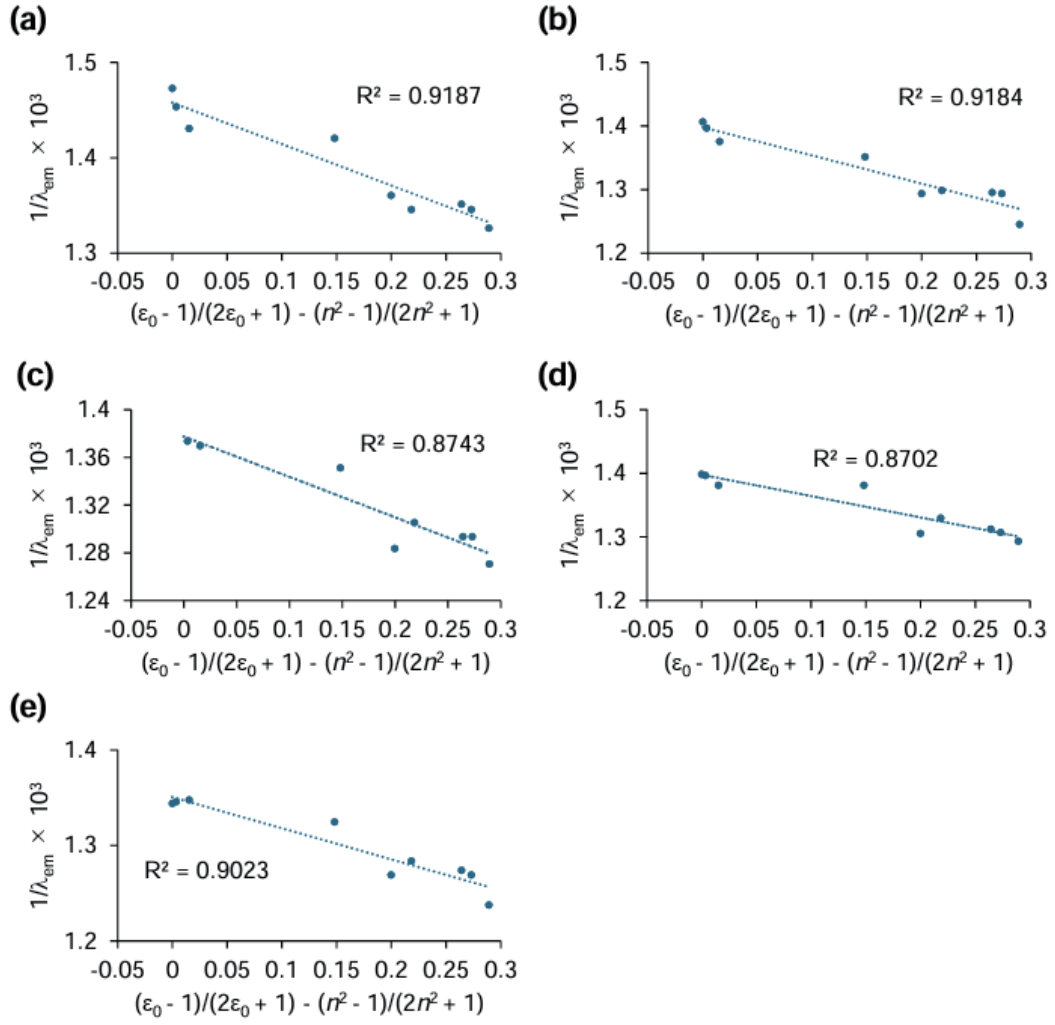


Figure 1-34. Relationships between $1/\lambda_{em}$ versus the relative static permittivity (ϵ_0) and reflective index (n). (a) BAOP-16, (b) BAOP-18, (c) BAOP-19, (d) BAOP-23, and (e) BAOP-24.

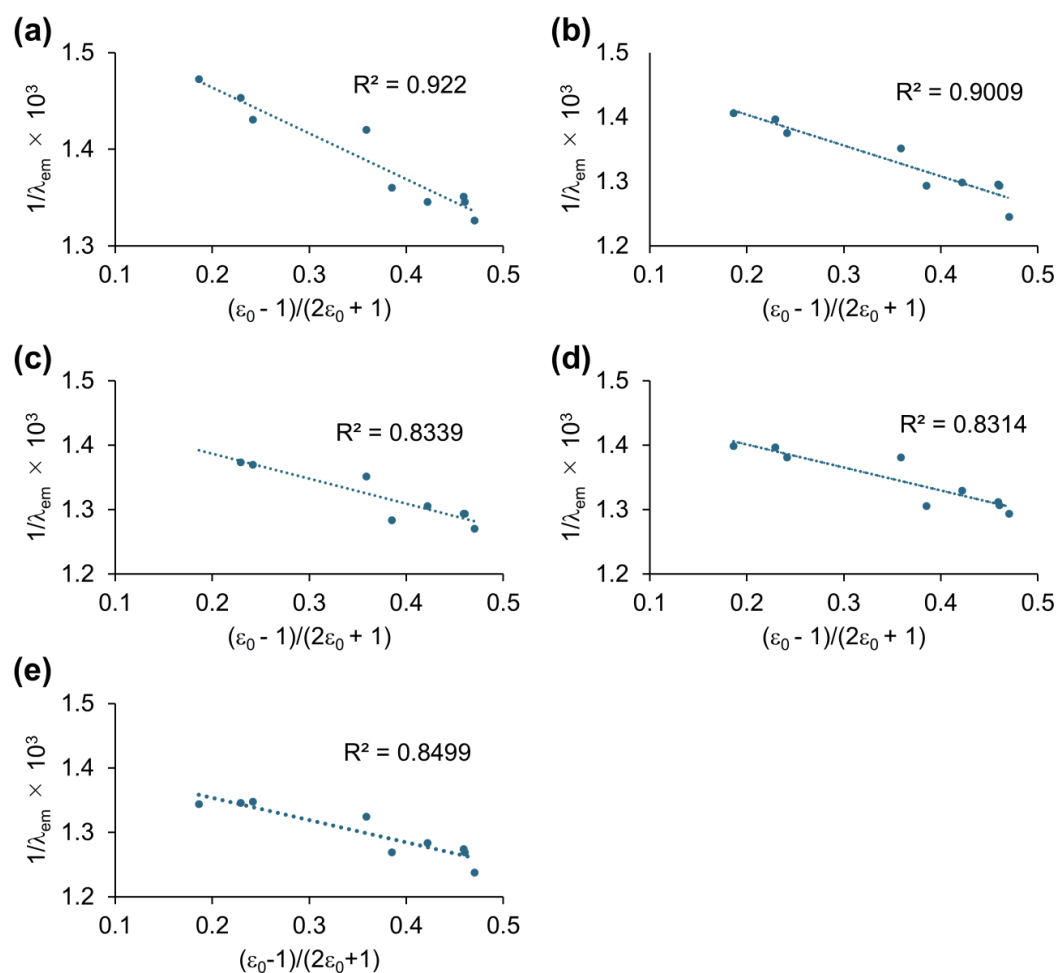


Figure 1-35. Relationships between $1/\lambda_{em}$ versus the relative static permittivity (ϵ_0). (a) BAOP-16, (b) BAOP-18, (c) BAOP-19, (d) BAOP-23, and (e) BAOP-24.

Table 1-20. The Estimated Relative Static Permittivity of Binding Sites in A β Oligomers or A β Fibrils.

Compounds	Relative static permittivity (ϵ_0)	
	Oligomer	Fibril
BAOP-16	3.10	9.65
BAOP-18	2.20	5.39
BAOP-19	2.60	6.45
BAOP-23	2.27	4.32
BAOP-24	2.01	5.43

BAOP-24 の生物試料への応用性の評価

これまでの評価において A β オリゴマー標的蛍光イメージングプローブとして最も優れた性質を示した BAOP-24 について、生物試料への応用性を評価した。脳内環境において A β オリゴマーを検出することができるかどうかを評価するため、脳ホモジネートを用いたファントムイメージングを行った。A β オリゴマー存在下では、A β フィブリル存在下および A β 非存在下と比較して、有意に高い蛍光シグナルが認められたことから、BAOP-24 は脳内環境において A β オリゴマーを選択的に検出可能であることが示された(**Figure 1-36**)。続いて、BAOP-24 が脳内に蓄積した A β オリゴマーを検出することができるかどうかを評価するため、APP^{NL-G-F/NL-G-F}マウスの脳組織切片を用いた蛍光染色および免疫組織化学染色を行った。BAOP-24 によるプラーク状の染色像が多数観察され、6E10 抗体との局在の一致が認められた(**Figure 1-37a, d**)。この結果より、BAOP-24 はマウス脳内において A β を特異的に染色することが示唆された。また BAOP-24 と ThS の染色像を比較したところ、ThS がプラークの中心を強く染色した一方で、BAOP-24 は周辺部位を強く染色した(**Figure 1-37a-c**)。この結果より BAOP-24 はプラークの中心に局在している A β フィブリルをほとんど染色しないことが示唆された。さらに、BAOP-24 で染色した脳組織切片について、OMAB 抗体を用いた免疫蛍光染色を実施したところ、BAOP-24 と OMAB 抗体の間に局在の一致が認められたことから、BAOP-24 がマウス脳内の A β オリゴマーを染色することが示唆された(**Figure 1-37e-g**)。以上の結果より BAOP-24 が APP^{NL-G-F/NL-G-F}マウス脳内の A β オリゴマーを選択的に検出することができる可能性が示された。

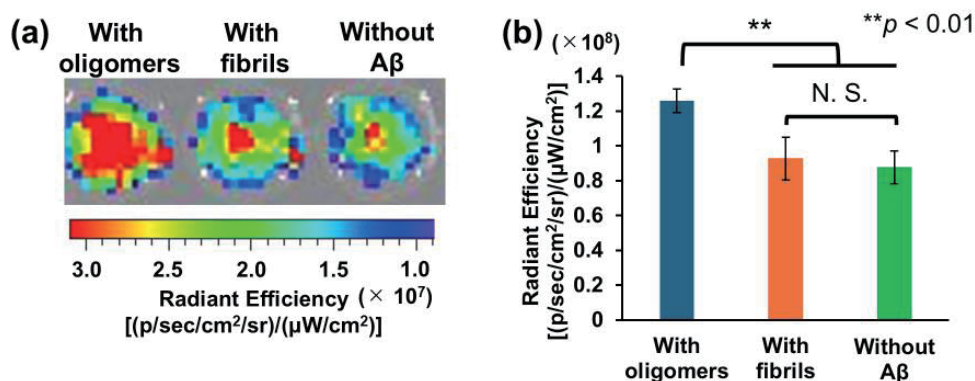


Figure 1-36. The results of brain phantom imaging using BAOP-24. (a) Representative fluorescent images and (b) quantitative analysis ($n = 5$) of a phantom imaging assay using BAOP-24. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA and post-hoc Bonferroni's test.

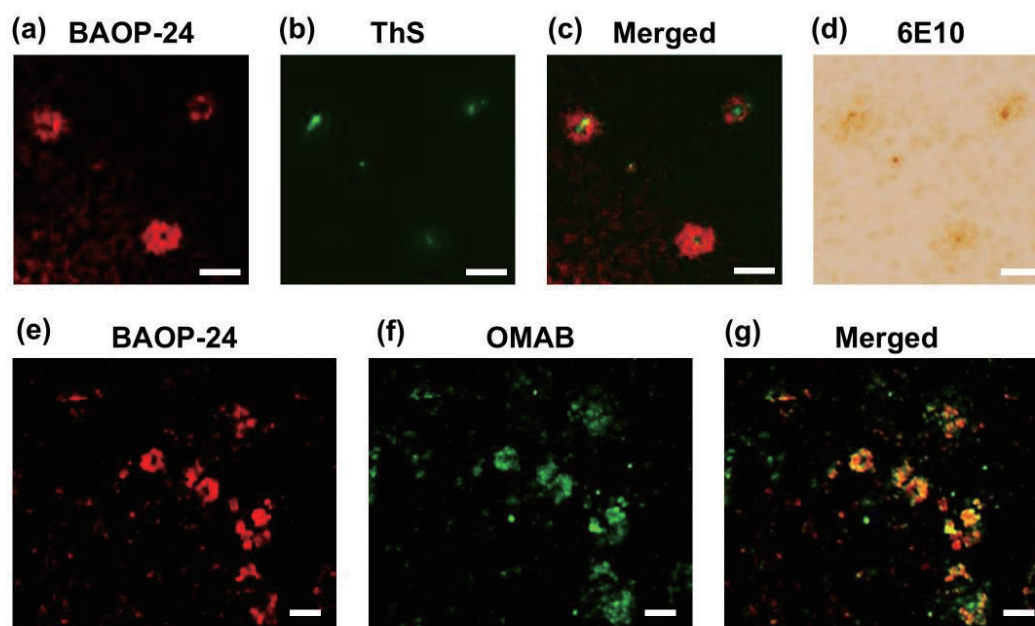


Figure 1-37. Images of *in vitro* staining: (a and e) stained with BAOP-24; (b) stained with ThS; (c) merged image of a and b; (d) labeled with 6E10 antibody; (f) labeled with OMAB antibody; (g) merged image of e and f. Scale bar: 50 μ m.

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスを用いた生体蛍光イメージング

BAOP-24 の生体への応用可能性を評価するため、MTT アッセイを用いて細胞毒性を評価した。その結果、10 μ M までの濃度範囲において顕著な細胞毒性は認められず、BAOP-24 は低毒性であることが示された(**Figure 1-38**)。そこで、BAOP-24 を用いて生体蛍光イメージングを行った(**Figure 1-39**)。マウスの尾静脈より BAOP-24 を投与し、経時的にマウス頭部の蛍光画像を取得したところ、APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスでは、正常マウスと比較して有意に高い蛍光シグナルが認められた(**Figure 1-39**)。さらに、BAOP-24 が APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウス脳内の A β オリゴマーに結合しているかどうかを確認するため、生体蛍光イメージング後に、マウスの脳組織切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した(**Figure 1-40**)。正常マウスの脳組織切片では BAOP-24 の陽性部位はほとんど認められない一方、APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片では多数の BAOP-24 陽性部位が認められた(**Figure 1-40a, b**)。観察後、APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片に関して、6E10 抗体および OMAB 抗体を用いた免疫組織染色を実施したところ、BAOP-24 とそれぞれの抗体の間に局在の一致が認められた(**Figure 1-40c-f**)。加えて、ThS を用いた蛍光染色では、BAOP-24 が ThS よりも広範囲に結合している様子が観察された(**Figure 1-40g, h**)。これらの結果から BAOP-24 が APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳内へ移行し、A β オリゴマーに結合することが示唆された。

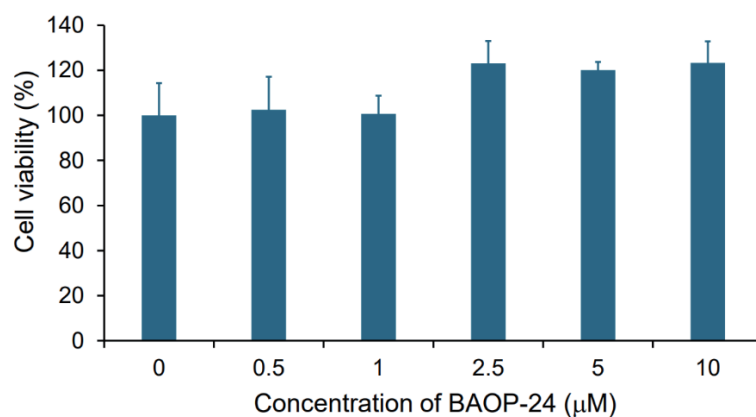


Figure 1-38. Results of the MTT assay using PC12 cells for evaluating the cytotoxicity of BAOP-24 ($n = 5$).

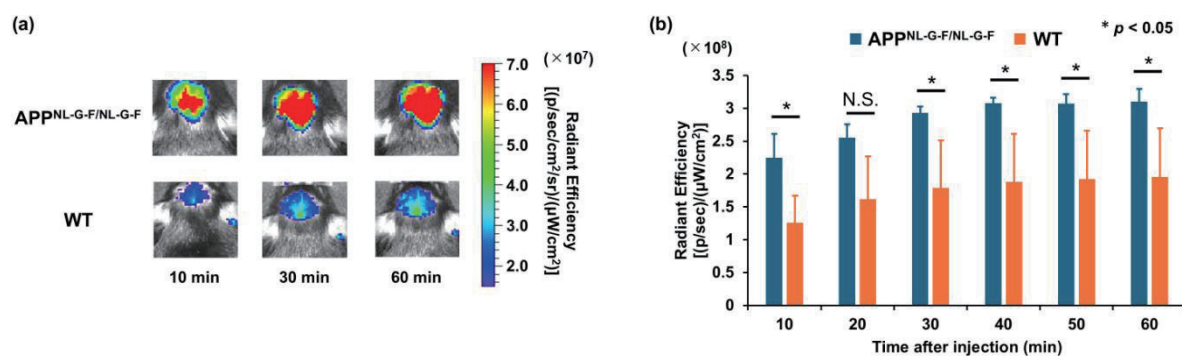


Figure 1-39. The results of *in vivo* fluorescence imaging studies. (a) Fluorescence images of APP^{NL-G-F/NL-G-F} and WT mice after intravenous injection of BAOP-24 (λ_{ex} : 675 nm, λ_{em} : 740 nm) and (b) quantitative analysis of fluorescent signals from their brains at each time-point ($n = 4$, respectively). Statistical analysis was performed using unpaired Student's t-test.

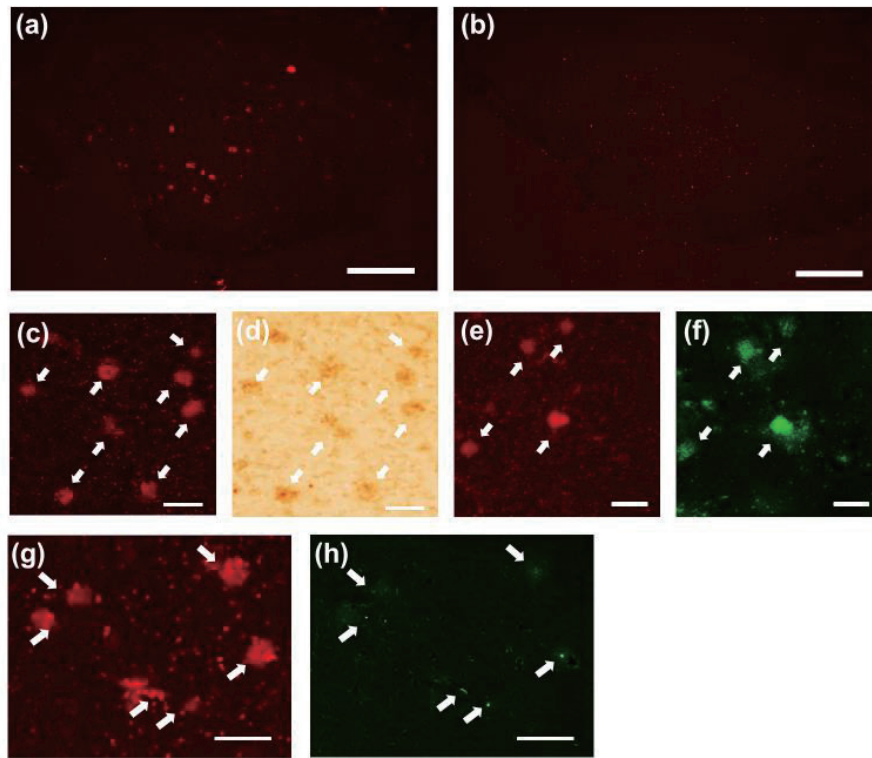


Figure 1-40. Images of *ex vivo* observation studies using BAOP-24. (a, c, e, and g) brain section from the APP^{NL-G-F/NL-G-F} mouse; (b) brain section from the WT mouse; (d) same area as c labeled with 6E10 antibody; (f) same area as e labeled with OMAB antibody; (h) same area as g stained using ThS. Scale bar: 500 μ m (a and b) and 100 μ m (c–h).

1.2.3 小括

本節では、第1節で見出した BAOP-16 の生体蛍光イメージングへの応用性の向上を目的として、3つの設計戦略に従い構造展開を行い、得られた化合物に関して、A β オリゴマー標的蛍光イメージングプローブとしての評価を行うことにより、以下の知見を得た。

- (1) 新たに合成した5化合物について、BAOP-16と比較して吸収・蛍光波長が長波長領域に認められた。
- (2) BAOP-24のA β オリゴマーに対する検出感度はBAOP-16と比較して顕著に高いことが示された。
- (3) チエニル基およびメチル基の導入によるA β オリゴマーに対する結合選択性の向上が認められ、なかでもBAOP-24が最も高いA β オリゴマーに対する結合選択性を示した。
- (4) APP^{NL-G-F/NL-G-F}マウスの脳組織切片を用いた蛍光染色において、BAOP-24はAPP^{NL-G-F/NL-G-F}マウスの脳内に存在するA β オリゴマーを選択的に染色することが示唆された。
- (5) BAOP-24による生体蛍光イメージングを実施したところ、APP^{NL-G-F/NL-G-F}マウスの頭部において、正常マウスと比較して、強い蛍光シグナルが認められた。
- (6) *Ex vivo* 評価において、BAOP-24がAPP^{NL-G-F/NL-G-F}マウスの脳内のA β オリゴマーに結合していることが示唆された。

以上の結果より、BAOP-24がA β オリゴマーの生体蛍光イメージングにおいて有用性の高い蛍光イメージングプローブである可能性が示された。加えて、本節で採用した3つの設計戦略がA β オリゴマーを標的とする蛍光イメージングプローブの開発において有用であることが示唆された(Figure 1-41)。

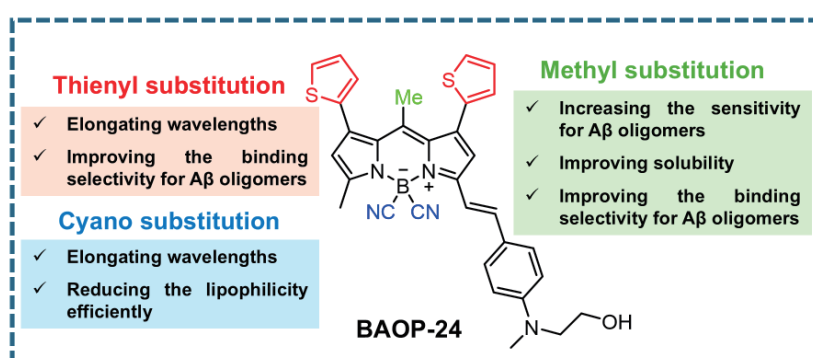


Figure 1-41. Summary of insights from Section 1-2.

第2章

バイオアッセイにおける A β オリゴマーの選択的検出を可能とする 蛍光イメージングプローブの開発

背景

バイオアッセイにおいて、A β 凝集体の検出には蛍光プローブとして ThT が広く用いられている。しかし、ThT は不溶性の A β フィブリルに対して強く応答する⁴¹一方で、A β オリゴマーの存在を特定することは困難である。そのため、A β オリゴマーを選択的に検出可能な蛍光プローブの開発は AD の病態解明における重要な課題である。第1章で SAR 研究により見出した BAOP-16 は、A β オリゴマー存在下で選択的な蛍光上昇を示した。しかし、BAOP-16 は脂溶性と分子の平面性が高いため水溶性が低く、生物試料へ応用するには有機溶媒の添加が必要となる。一方、過剰なエタノール添加は A β オリゴマーの形態に影響を与えることが示唆されており⁷²、蛍光プローブを溶解させるための有機溶媒添加はバイオアッセイにおける A β オリゴマーの性質評価に望ましくない結果をもたらす可能性がある。そこで本章では、水溶性向上を目的として BAOP-16 に水溶性置換基を導入した化合物を設計・合成し、バイオアッセイにおいて有用な A β オリゴマー標的蛍光プローブとして機能するかどうかを評価した。

2.1. 実験方法

試薬・機器

第1章と同じ試薬・機器を使用した。超遠心には工機ホールディングス株式会社製 HIMAC CS120GXII を用いた。円偏光二色(circular dichroism; CD)スペクトルの測定には日本分光株式会社製円二色性分光光度計 J-820 を用いた。蛍光観察には株式会社キーエンス製オールインワン顕微鏡 BZ-X800 を用いた。

動物

第1章と同様にして、購入・飼育した。

合成

5,5-Difluoro-3,7-dimethyl-1,9-diphenyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine (1) は第1章第1節と同様にして合成した。2-(2-Fluoropyridin-1-ium-1-yl)-1,1-bis((trifluoromethyl)sulfonyl)ethan-1-ide (2) は既報に従い合成した⁷³。

Methyl 4-(methyl(phenyl)amino)butanoate (3)

無水 MeCN (15 mL) に *N*-メチルアニリン (2.16 mL, 20.0 mmol), 4-ブロモ酪酸メチル (3.20 mL, 25.5 mmol), Et₃N (3.36 mL, 24.0 mmol) を加え, アルゴンガス雰囲気下, 82°C で終夜加熱還流した。反応が完了した後, セライトろ過を行い, ろ液を減圧留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン = 95/5) で精製して目的物 **3** を収量 2.63 g (64%) で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.13–7.09 (m, 2H), 6.61–6.56 (m, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.23 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H), 2.79 (s, 3H), 2.23 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H), 1.79 (quin, *J* = 7.45 Hz, 2H)。MS (ESI) *m/z* 208.0 [M + H]⁺。

Methyl 6-(methyl(phenyl)amino)hexanoate (4)

化合物 **3** と同様の合成法により, 6-ブロモヘキサン酸メチルから, 目的物 **4** を収量 3.31 g (70%) で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.27–7.24 (m, 2H), 6.73–6.70 (m, 3H), 3.68 (s, 1H), 3.32 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H), 2.93 (s, 3H), 2.34 (t, *J* = 7.45 Hz, 2H), 1.69 (quin, *J* = 7.45 Hz, 2H), 1.61 (quin, *J* = 7.45 Hz, 2H), 1.40–1.34 (m, 2H)。MS (ESI) *m/z* 236.1 [M + H]⁺。

Methyl 4-((4-formylphenyl)(methyl)amino)butanoate (5)

無水 DCM に塩化ホスホリル (3.5 mL, 37.5 mmol) および無水 DMF (8.7 mL, 113 mmol) をアルゴンガス雰囲気下, 0°C で加え, 室温で 20 分間攪拌した。化合物 **3** (1.55 g, 7.5 mmol) を少しずつ加えた後, アルゴンガス雰囲気下, 室温で終夜攪拌した。反応が完了した後, 水酸化ナトリウム水溶液を 0°C で添加することにより, 反応を停止した。酢酸エチルで抽出した後, 有機層を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

イー(酢酸エチル/ヘキサン=25/75)で精製して目的物 **5** を収量 954 mg (54%)で得た. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.45 (s, 1H), 7.44 (d, J = 8.59 Hz, 2H), 6.46 (d, J = 8.59 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 3.19 (t, J = 7.46 Hz, 2H), 2.76 (s, 3H), 2.11 (t, J = 7.46 Hz, 2H), 1.66 (quin, J = 7.46 Hz, 2H). MS (ESI) m/z 236.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Methyl 6-((4-formylphenyl)(methyl)amino)hexanoate (**6**)

化合物 **5** と同様の合成法により, 化合物 **4** から, 目的物 **6** を収量 627 mg (32%)で得た. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.44 (s, 1H), 7.43 (d, J = 8.59 Hz, 2H), 6.40 (d, J = 8.59 Hz, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.12 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 2.75 (s, 3H), 2.05 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 1.43–1.32 (m, 4H), 1.10 (quin, J = 7.45 Hz, 2H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $[\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_3]^+$, 264.1594, found 264.1594 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

4-((4-Formylphenyl)(methyl)amino)butanoic acid (**7**)

化合物 **5** (600 mg, 2.6 mmol)および 5 N 水酸化カリウム水溶液(6 mL)をメタノール(10 mL)に加え, 室温で 5 時間攪拌した. 反応が完了した後, 酢酸エチルで洗浄し, 水層に 6 N 塩酸を pH 1 以下になるまで添加した. 酢酸エチルで抽出した後, 有機層を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=100:0 to 95:5 for 30 min)で精製して目的物 **7** を収量 292 mg (52%)で得た. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 9.68 (s, 1H), 7.70 (d, J = 8.59 Hz, 2H), 6.70 (d, J = 8.59 Hz, 2H), 3.47 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.41 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 1.94 (quin, J = 7.45 Hz, 2H). MS (ESI) m/z 222.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

6-((4-Formylphenyl)(methyl)amino)hexanoic acid (**8**)

化合物 **7** と同様の合成法により, 化合物 **6** から, 目的物 **8** を収量 430 mg (100%)で得た. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.34 (br, 1H), 9.66 (s, 1H), 7.68 (d, J = 9.14 Hz, 2H), 6.64 (d, J = 9.14 Hz, 2H), 3.38 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.34 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 1.69–1.58 (m, 4H), 1.40–1.33 (m, 2H). MS (ESI) m/z 250.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$

(E)-4-((4-(2-(5,5-Difluoro-7-methyl-1,9-diphenyl-5H-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)(methyl)amino)butanoic acid (**9**, sBAOP-1-1)

無水トルエン(10 mL)に化合物 **1** (59.7 mg, 0.16 mmol), 化合物 **7** (42.6 mg, 0.19 mmol), ピペリジン(200 μL), 酢酸(150 μL)を加え, アルゴンガス雰囲気下, 110°Cで終夜加熱還流した. 反応が完了した後, 溶媒を減圧留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール=100:0 to 99:1 for 30 min)で精製して目的物 **9** を収量 11.2 mg (12%)で得た. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.52–7.31 (m, 15H), 7.18 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.69 (d, J = 8.59 Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 3.45 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 2.42 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 1.95 (quin, J = 7.45 Hz, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d^6$) δ 174.27, 156.30, 152.32, 150.51, 145.14, 141.70,

140.89, 134.18, 133.48, 132.66, 131.16, 129.58, 129.16, 129.05, 128.60, 128.41, 128.36, 123.13, 121.62, 116.59, 115.74, 112.15, 112.00, 79.19, 50.76, 30.79, 21.77, 14.40. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $[C_{35}H_{33}BF_2N_3O_2]^+$, 576.2628, found 576.2625 $[M + H]^+$.

(E)-6-((4-(2-(5,5-Difluoro-7-methyl-1,9-diphenyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)phenyl)(methylamino)hexanoic acid (**10**, sBAOP-1-2)

無水トルエン(10 mL)に化合物 **1** (87.0 mg, 0.23 mmol), 化合物 **7** (65.0 mg, 0.26 mmol), ピペリジン(200 μ L), 酢酸(200 μ L), モレキュラーシーブ 4Å (6 粒)を加え, アルゴンガス雰囲気下, 110°Cで終夜加熱還流した. 反応が完了した後, 溶媒を減圧留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/メタノール= 100:0 to 99:1 for 30 min)で精製して目的物 **10** を収量 24.6 mg (19%)で得た. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.52–7.33 (m, 15 H), 7.18 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.65 (d, J = 9.16 Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 3.37 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 3.00 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 2.37 (t, J = 7.45 Hz, 2H), 1.72–1.60 (m, 4H), 1.42–1.35 (m, 2H). ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 174.50, 156.35, 152.22, 150.54, 145.15, 141.63, 140.95, 134.22, 133.51, 132.67, 131.14, 129.64, 129.21, 129.16, 129.05, 128.60, 128.41, 128.35, 122.99, 121.54, 116.54, 115.76, 112.05, 111.97, 51.37, 38.06, 33.69, 26.13, 26.00, 24.41, 14.40. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $[C_{37}H_{37}BF_2N_3O_2]^+$, 604.2941, found 604.2943 $[M + H]^+$.

(E)-4-(2-(5,5-Difluoro-7-methyl-1,9-diphenyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)-*N,N*-dimethylaniline (**11**)

化合物 **9** と同様の合成法により, 化合物 **1** および 4-(*N,N*-dimethylamino)benzaldehyde から合成した. シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/ヘキサン= 65:35)で精製して目的物 **11** を収量 30.8 mg (39%)で得た. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.54–7.33 (m, 14H), 7.18 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.68 (d, J = 8.60 Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 3.03 (s, 6H), 2.66 (s, 3H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $[C_{32}H_{29}BF_2N_3]^+$, 504.2417, found 504.2417 $[M + H]^+$.

(E)-5,5-Difluoro-3-methyl-1,9-diphenyl-7-(4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)-5*H*-5 λ^4 ,6 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine (**12**)

化合物 **10** と同様の合成法により, 化合物 **1** および 4-pyrrolidin-1-yl benzaldehyde から合成した. シリカゲルクロマトグラフィー(クロロホルム/ヘキサン= 40:60)で精製して目的物 **12** を収量 31.7 mg (34%)で得た. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.53–7.32 (m, 14H), 7.17 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 6.54 (d, J = 9.16 Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 3.35 (t, J = 6.30 Hz, 4H), 2.67 (s, 3H), 2.02 (t, J = 6.30 Hz, 4H). HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $[C_{34}H_{31}BF_2N_3]^+$, 530.2574, found 530.2573 $[M + H]^+$.

(E)-4-(2-(5,5-Difluoro-7-methyl-1,9-diphenyl-5*H*-4 λ^4 ,5 λ^4 -dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)-*N,N*-diphenylaniline (**13**)

化合物 **9** と同様の合成法により、化合物 **1** および 4-(*N,N*-diphenylamino)benzaldehyde から合成した。シリカゲルクロマトグラフィー(酢酸エチル/ヘキサン=7:93)で精製して目的物 **13** を収量 24.9 mg (25%)で得た。¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.41–7.15 (m, 18H), 7.07–6.99 (m, 6H), 7.51 (d, *J* = 8.59 Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 2.60 (s, 3H). HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for [C₄₂H₃₃BF₂N₃]⁺, 628.2730, found 628.2727 [M + H]⁺.

(*E*)-4-(2-(2,8-Bis(2,2-bis((trifluoromethyl)sulfonyl)ethyl)-5,5-difluoro-7-methyl-1,9-diphenyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)-*N,N*-dimethylaniline (**14**, sBAOP-2-1)

MeCN (10 mL)に化合物 **11** (30.8 mg, 0.061 mmol)を加え、室温で攪拌しながら化合物 **2** (49.3 mg, 0.13 mmol)を少しずつ加えた。全て加えた後、さらに室温で 20 分間攪拌し、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=70:30)で精製して目的物 **14** を収量 43.5 mg (65%)で得た。¹H NMR (500 MHz, MeOH-*d*⁴) δ 8.02 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 7.68–7.66 (m, 3H), 7.39–7.28 (m, 10H), 6.79 (d, *J* = 7.45 Hz, 2H), 6.41 (s, 1H), 3.78 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.02 (s, 6H), 2.79 (s, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, MeOH-*d*⁴) δ 156.52, 154.84, 152.51, 145.61, 142.79, 140.54, 140.50, 136.30, 134.60, 134.38, 133.87, 131.72, 131.38, 130.44, 129.02, 128.93, 128.70, 128.51, 128.06, 127.98, 125.77, 123.61, 122.13, 121.43, 114.84, 113.44, 55.99, 40.58, 30.70, 29.51, 24.72, 23.90, 14.05. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for [C₄₀H₃₀BF₁₄N₃O₈S₄]²⁻/2, 542.5398, found 542.5396 [M – 2H]²⁻/2.

(*E*)-2,8-Bis(2,2-bis((trifluoromethyl)sulfonyl)ethyl)-5,5-difluoro-3-methyl-1,9-diphenyl-7-(4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)-5*H*-5λ⁴,6λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinine (**15**, sBAOP-2-2)

化合物 **14** と同様の合成法により、化合物 **2** および **12** から、目的物 **15** を収量 32.6 mg (83%)で得た。¹H NMR (500 MHz, MeOH-*d*⁴) δ 8.03 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 7.68–7.63 (m, 3H), 7.38–7.26 (m, 10H), 6.61 (d, *J* = 8.59 Hz, 2H), 6.38 (s, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.59 (s, 2H), 3.37 (t, *J* = 6.30 Hz, 4H), 2.78 (s, 3H), 2.05 (t, *J* = 6.30 Hz, 4H). ¹³C NMR (150 MHz, MeOH-*d*⁴) δ 155.95, 155.51, 155.24, 150.03, 145.67, 142.44, 141.12, 136.47, 134.75, 134.46, 133.71, 131.75, 131.42, 130.72, 129.65, 129.00, 128.90, 128.66, 128.42, 127.86, 127.15, 125.81, 123.63, 121.79, 121.45, 114.08, 112.91, 64.30, 56.02, 29.53, 26.45, 24.78, 23.92, 14.01. HRMS (ESI-TOF) *m/z* calcd for [C₄₂H₃₂BF₁₄N₃O₈S₄]²⁻/2, 555.5476, found 555.5472 [M – 2H]²⁻/2.

(*E*)-4-(2-(2,8-Bis(2,2-bis((trifluoromethyl)sulfonyl)ethyl)-5,5-difluoro-7-methyl-1,9-diphenyl-5*H*-4λ⁴,5λ⁴-dipyrrolo[1,2-*c*:2',1'-*f*][1,3,2]diazaborinin-3-yl)vinyl)-*N,N*-diphenylaniline (**16**, sBAOP-2-3)

MeCN (10 mL)に化合物 **13** (25.2 mg, 0.040 mmol)を加え、室温で攪拌しながら化合物 **2** (32.3 mg, 0.083 mmol)を少しずつ加えた。全て加えた後、さらに室温で 80 分間攪拌し、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=75:25)で精製し、目的物 **16** を収量 15.5 mg (32%)で得た。¹H NMR (500 MHz, MeOH-*d*⁴) δ 7.52–7.27 (m, 19H),

7.12–7.04 (m, 4H), 6.99–6.98 (m, 3H), 6.85 (s, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.63 (s, 2H), 2.80 (s, 3H). ^{13}C NMR (150 MHz, MeOH- d^4) δ 154.17, 150.43, 148.79, 146.15, 144.85, 139.71, 137.04, 135.15, 135.06, 134.22, 134.15, 131.47, 131.16, 130.88, 130.46, 130.41, 129.93, 129.67, 129.38, 129.22, 128.98, 126.29, 126.00, 125.82, 124.48, 124.45, 123.82, 123.76, 123.62, 123.32, 122.79, 121.65, 121.45, 117.60, 114.42, 56.03, 33.84, 29.53, 23.95, 14.30. HRMS (ESI-TOF) m/z calcd for $[\text{C}_{50}\text{H}_{34}\text{BF}_{14}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_4]^{2-}/2$, 604.5554, found 604.5552 $[\text{M} - 2\text{H}]^{2-}/2$.

水系溶媒に対する溶解性の評価

被験化合物を水系溶媒(1% EtOH 水溶液, 1% DMSO 水溶液, PBS)に添加した(終濃度: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50 μM). 試料を Multi Wellplate (0.4 mL $\times$ 96 wells flatbottom) に 200 μL ずつ添加し, Infinite® 200 pro M Plex で被験化合物の最大吸収波長における吸光度を測定した.

ペプチド凝集体の作製

第 1 章 第 1 節と同様にして作製した.

光物理的特性の測定

モル吸光係数は 0, 5, 10, 15, 20, 25 μM で被験化合物を溶解させた際の最大吸収波長における吸光度より算出した. 他の光物理的特性は第 1 章と同様にして測定した.

Log D 値の算出⁷⁴

被験化合物(0.5 mg)を MeCN/1-オクタノール/0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.4) (1 mL/160 μL /1 mL)混合液に溶解させ, ボルテックスミキサーを用いて 30 秒間混和し, 層が分離するまで静置した. 上層と下層をそれぞれ Multi Wellplate (0.4 mL $\times$ 96 wells flatbottom)に添加し, Infinite® 200 M pro Plex で被験化合物の最大吸収波長における吸光度を測定した. log D 値は以下の式を用いて算出した(Equation 2-1, 2-2).

$$K_{AN} = \frac{C_{UP}}{C_{LP}} = \frac{A_{UPsample} - A_{UPblank}}{A_{LPsample} - A_{LPblank}} \quad (\text{Equation 2-1})$$

$$\log D = 2.8630 \log K_{AN} - 0.1497 \quad (\text{Equation 2-2})$$

C_{UP} or C_{LP} : 上層(upper phase; UP)または下層(lower phase; LP)の化合物濃度

$A_{UPsample}$ or $A_{LPsample}$: 上層または下層における化合物の吸光度

$A_{UPblank}$ or $A_{LPblank}$: 上層または下層におけるバックグラウンドの吸光度

A β 存在下における蛍光スペクトルの測定

A β (終濃度: 5 μM)および被験化合物(終濃度: 5 μM)を 10 v/v% EtOH 含有 PBS 中で混和し,

5 分間(A β モノマーおよび A β オリゴマー)または 20 分間(A β フィブリル)室温で静置した。試料を石英セルに移し RF-6000 を用いて蛍光スペクトルを測定した。

ドッキングシミュレーション

第 1 章と同様のソフトウェアを用いて行った。RCSB 蛋白質データバンクより A β オリゴマー(PDB ID: 5SUR⁷⁵)の構造を取得した。

検出限界の測定

評価化合物の濃度を 250 nM に、A β の濃度を 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 μ M に設定した。検量線はブランク値を通さずに引いた。他の操作は第 1 章 第 2 節と同様にして行った。

光安定性の評価

第 1 章 第 2 節と同様にして行った。

活性種の作製

活性酸素種(reactive oxygen species; ROS), 活性窒素種(reactive nitrogen species; RNS), 活性硫黄種(reactive sulfur species; RSS)を以下の方法に従い作製した。

H₂O₂

30 v/v% H₂O₂ 水溶液を蒸留水で希釈した。

O₂⁻

KO₂ および 18-クラウン-6 を DMSO に 1:2.5 の当量比で加え、0.25 M のストック溶液を作製した。この溶液を蒸留水で希釈した⁷⁶。

NO

ペンタシアノにトロシル鉄(III)酸ナトリウム二水和物を蒸留水に溶解した。

ONOO⁻

0.6 M 塩酸(10 mL)を 0.6 M KNO₂ 水溶液(10 mL)と 0.7 M H₂O₂ 水溶液(10 mL)の混合液に 0°C で攪拌しながら加えた。その後、1.5 M 水酸化ナトリウム水溶液(20 mL)をすぐに加えた。濃度は 302 nm の吸光度を測定し、モル吸光係数(1670 M⁻¹cm⁻²)を用いて計算した⁷⁷。

H₂S

NaHS を蒸留水に溶解した。

グルタチオン(GSH)

GSH を蒸留水に溶解した。

活性種存在下における安定性の評価

sBAOP-2-3 の 1 v/v% DMSO 含有 PBS 溶液(150 μ L)と活性種溶液(50 μ L)を Multi Wellplate (0.4 mL $\times$ 96 wells flatbottom)に添加し(終濃度 sBAOP-2-3: 10 μ M, 活性種: 0, 5, 10, 20, 40 μ M),

5, 10, 20, 30 分後に Infinite® 200 pro M Plex で 612 nm の吸光度を測定した.

粘度感受性の評価

第 1 章 第 2 節と同様にして行った.

結合飽和実験の評価

第 1 章 第 2 節と同様にして行った.

A β 凝集過程における蛍光特性の評価

A β ストック溶液の作製

A β_{1-42} を 10 mM 水酸化ナトリウム水溶液に 140 μ M で溶解させ, 3 時間超遠心(4°C, 500,000 g)した後, 表面から 4 分の 3 の上清を回収した. 濃度は 280 nm における吸光度を測定し, チロシン残基のモル吸光係数(1490 M⁻¹cm⁻²)⁷⁸ を用いて計算することにより求めた. 10 mM 水酸化ナトリウム水溶液で 100 μ M まで希釈した後, 液体窒素を用いて急速冷凍し, 使用時まで-78°Cで保管した.

A β 凝集過程の分析

A β ストック溶液を PBS (300 mM NaCl を含む 100 mM リン酸緩衝液, pH 7.4)で 50 μ M に希釈し, 37°Cに加温することで凝集させた⁷⁹. 各時間において, A β サンプルから 8 μ L 回収し, PBS (182 μ L)および蛍光プローブの EtOH 溶液(40 μ M, 10 μ L)と混和した後, 10 分間室温で静置し, 蛍光スペクトルを測定した. ThT は 440 nm で, sBAOP-2-3 は 629 nm でそれぞれ励起した.

CD スペクトルの測定

A β を PBS (pH 7.4)で 10 μ M に希釈し, キュベットに移した. 測定は 0.5 nm 間隔で行い, 5 回の測定データを積算することにより, CD スペクトルを得た.

細胞培養

ラット褐色細胞腫 PC12 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより提供を受けた. 細胞培養は第 1 章 第 2 節と同様にして行った.

細胞毒性の評価

PC12 細胞をポリ-D-リジンコート 96 ウェルプレート(Corning 社製)に 10,000 cells/well で播種し, 10 v/v% FBS および 5 v/v%非働化ウマ血清を含む DMEM 中 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で 72 時間培養した. 培地を除去した後, 0.1 v/v%非働化ウマ血清および GlutaMax™ (2 mM)を含むフェノールレッド不含 DMEM (90 μ L)と sBAOP-2-3 の 5 v/v% DMSO 含有 PBS 溶液(10 μ L)を添加した(sBAOP-2-3 の終濃度: 0, 62.5, 125, 250, 500 または 1000 nM). 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で 24 時間培養した後, 培地を除去し, 0.1 v/v%非働化ウマ血清および GlutaMax™ (2 mM)

を含むフェノールレッド不含培地(100 μ L)および生細胞測定試薬 SF (ナカライテスク株式会社製)(10 μ L)を加え, 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で 4 時間培養した. 450 nm の吸光度を Infinite® 200 pro M Plex で測定した.

生細胞観察

細胞毒性評価と同様にして PC12 細胞をポリ-D-リジンコート 96 ウェルプレートに播種した. 培地を除去した後, GlutaMax™ (2 mM)を含むフェノールレッド不含培地(100 μ L)で洗浄し, 同一の培地(100 μ L)中 37°C, 5 v/v% CO₂ 下で 72 時間培養した. 培地を除去した後, 洗浄し, 同一の培地(80 μ L), A β 溶液, sBAOP-2-3 溶液をそれぞれ加えた. 凝集過程の分析における A β 凝集方法に従い 2.5 時間凝集させた A β を A β オリゴマーとして, 凝集過程の分析における A β 凝集方法に従い 24 時間凝集させた A β を A β フィブリルとしてそれぞれ用いた.

切片染色

マウス脳組織切片の作製

APPNL-G-F/NL-G-F マウス(雌性, 5 月齢)より摘出した脳を包埋剤に浸漬し, ドライアイスを用いて急速冷凍した. 凍結ブロックを, ライカ社製クライオスタットを用いて薄切し, 20 μ m 厚の切片を作製した. 使用時まで-20°Cで保存した.

ThS と被験化合物の共染色

第 1 章 第 1 節と同様にして行った.

A β 配列認識抗体または抗 A β オリゴマー抗体を用いた免疫蛍光染色

6E10 抗体または OMAB 抗体を PBST で希釈した後(6E10: 1/1000, OMAB: 1/100), 脳組織切片を抗体溶液に室温で終夜浸漬した. 脳組織切片を PBST で洗浄した後, PBST で希釈した二次抗体溶液(6E10: Alexa Fluor 488 標識 goat 抗マウス IgG 抗体(Abcam 社製) (1/3000), OMAB: Alexa Fluor 488 標識 goat 抗マウス IgM 抗体(Thermo Fisher Scientific 社製) (1/500))に室温で 2 時間浸漬した. PBST で洗浄後, sBAOP-2-3 の 50% EtOH 溶液(5 μ M)に室温で 20 分間浸漬した. 50% EtOH 水溶液で 1 分間の洗浄を 2 回行った後, BZ-X800 を用いて切片を観察した.

2.2. 結果と考察

分子設計および合成

高極性の置換基の導入は、水系溶媒への溶解性の向上において有効な設計戦略である。しかし、このような置換基を母骨格へ直接導入する場合、分子全体の極性が劇的に増大する可能性がある⁷³。A β オリゴマーは構造内に疎水性領域を有しており、この領域が A β オリゴマーの神経毒性において重要な役割を果たすことが示唆されている^{80, 81}。さらに、第 1 章では、BODIPY 誘導体が A β オリゴマーの構造内の疎水性領域に結合していることが示唆された。したがって、A β オリゴマー標的蛍光プローブを開発する上で、BAOP-16 の母骨格の脂溶性を維持することは重要である。本研究では以下の 2 通りの設計戦略を採用した。1 つ目の設計戦略はアルキルスパーサーを介してジアルキルアミノ基にカルボキシ基を導入する方法である(**Strategy 1**)。この戦略は、既報において A β を標的とした BODIPY を基盤とする光酸化触媒の溶解性を向上させる目的で用いられており⁸²、アルキルスパーサーの長さを調節することで、分子全体の脂溶性を維持しつつ、溶解性を向上可能である。本研究では炭素鎖長が 3 または 5 のアルキルスパーサーを採用した。2 つ目の設計戦略は、CH₂C-Tf₂ 基を BODIPY 骨格の 2 位および 6 位に導入する方法である(**Strategy 2**)。既報において、蛍光分子への CH₂C-Tf₂ 基を導入が、蛍光分子の脂溶性を維持しつつ、水系溶媒への溶解性を向上させることが報告されている⁷³。さらに、第 1 章において分子構造のかさ高さが A β オリゴマーに対する選択性向上に重要であることが示唆されており、CH₂C-Tf₂ 基の導入による分子構造のかさ高さの増大によって、A β オリゴマーに対する選択性が向上することが期待される。したがって、CH₂C-Tf₂ 基の導入は、A β オリゴマーを標的とする蛍光プローブの開発に適した設計戦略であると考えられる。本研究では、**Strategy 1** に従い 2 化合物(sBAOP-1-1 および sBAOP-1-2)を、**Strategy 2** に従い 4 化合物(sBAOP-2-1, sBAOP-2-2, sBAOP-2-3, sBAOP-2-4)をそれぞれ設計した(**Figure 2-1**)。BODIPY 骨格へのスチリル基の導入は、第 1 章と同様に BODIPY とベンズアルデヒドを原料とし、Knoevenagel 縮合によって行った。CH₂C-Tf₂ 基は 2-fluoropyridinium ethanide (化合物 **2**)を用いて導入した(**Schemes 2-1**)。5 化合物(sBAOP-1-1, sBAOP-1-2, sBAOP-2-1, sBAOP-2-2, sBAOP-2-3)については、十分な収量および純度で得ることができたが、sBAOP-2-4 は、評価に必要な収量および純度で得ることができなかった。したがって、sBAOP-2-4 を除く 5 化合物について、A β オリゴマーを標的とする蛍光プローブとしての評価を行った。

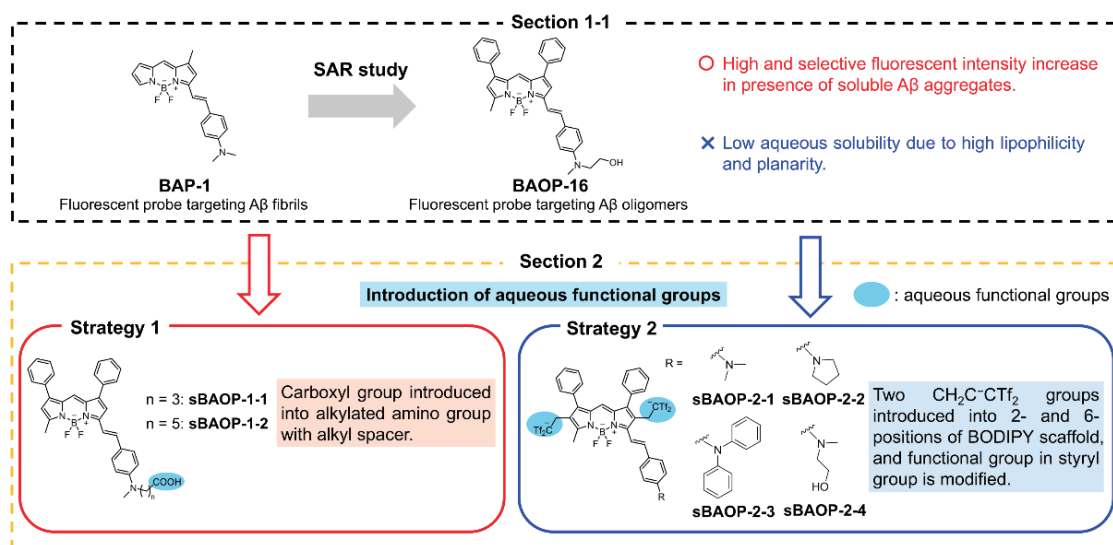
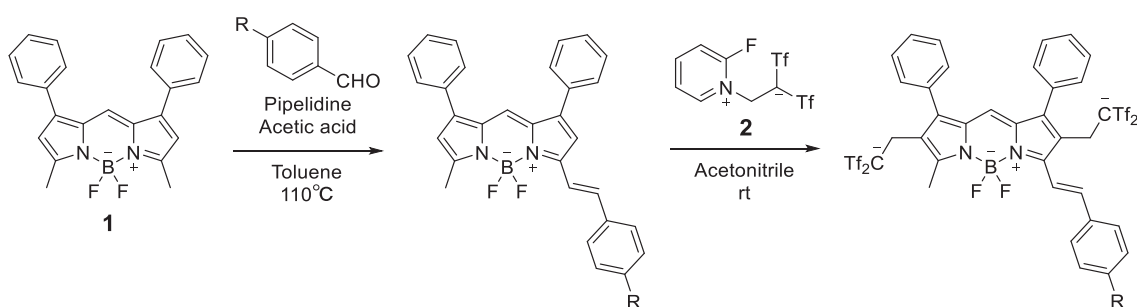


Figure 2-1. Design strategy and chemical structure of candidates in this study.



Scheme 2-1. Synthetic route of sBAOP series.

物理学的特性の評価

クロロホルム中において候補化合物の吸収・蛍光スペクトルを測定した結果、いずれの化合物も最大吸収波長は 600 nm 以上の領域に認められ、最大蛍光波長は近赤外領域に位置した(**Figure 2-2**, **Table 2-1**). 近赤外領域は光の散乱や生体試料由来の自家蛍光の影響が小さいことから、化合物はいずれもバイオアッセイに適した光物化学的特性を有することが示された. 続いて、水系溶媒への溶解性を評価するために、1% DMSO 水溶液および 1% EtOH 水溶液中で、候補化合物および BAOP-16 の吸光度を測定した. 1% DMSO 水溶液中では、いずれの候補化合物も濃度と吸光度の間に直線的な正の相関が認められた一方で、BAOP-16 については 30 μM 付近で吸光度の増加率が低下した(**Figure 2-3**). また、1% EtOH 水溶液中では、sBAOP-2-1, sBAOP-2-2, sBAOP-2-3 については、濃度と吸光度の間に直線的な正の相関が認められた一方で、sBAOP-1-1, sBAOP-1-2, BAOP-16 については、高濃度においても吸光度の増加はわずかであった(**Figure 2-4**). この結果から、 $\text{CH}_2\text{C}-\text{CTf}_2$ 基の導入が水系溶媒への溶解性を効果的に向上させることが明らかとなった. さらに、既報⁷⁴に従い $\log D$ 値を算出

したところ、いずれの化合物も $\log D > 5$ の高値を示した(**Table 2-2**)。以上より、本研究で採用した設計戦略は水溶性を向上させつつ母骨格の脂溶性を維持することが示された。

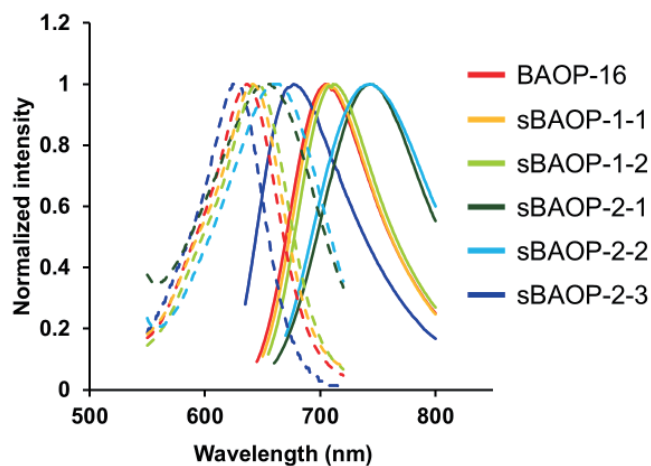


Figure 2-2. Absorption (dotted line) and fluorescence spectra (filled line) of candidates in chloroform.

Table 2-1. Photophysical Property of Candidates in Chloroform.

Compounds	λ_{abs} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	λ_{em} (nm)	ε ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$)	ϕ
BAOP-16 ^a	638	66	704	9.6×10^4	0.22
sBAOP-1-1	642	65	707	7.3×10^4	0.068 ^b
sBAOP-1-2	645	66	711	7.3×10^4	0.095 ^b
sBAOP-2-1	653	90	743	4.1×10^4	0.041 ^b
sBAOP-2-2	661	82	743	7.0×10^4	0.033 ^b
sBAOP-2-3	627	50	677	3.7×10^4	0.072 ^c

^aData on BAOP-16 demonstrated in Section 1-1.

^bDetermined versus that of BAP-2 in chloroform²⁸.

^cDetermined versus that of BAP-1 in chloroform¹⁰.

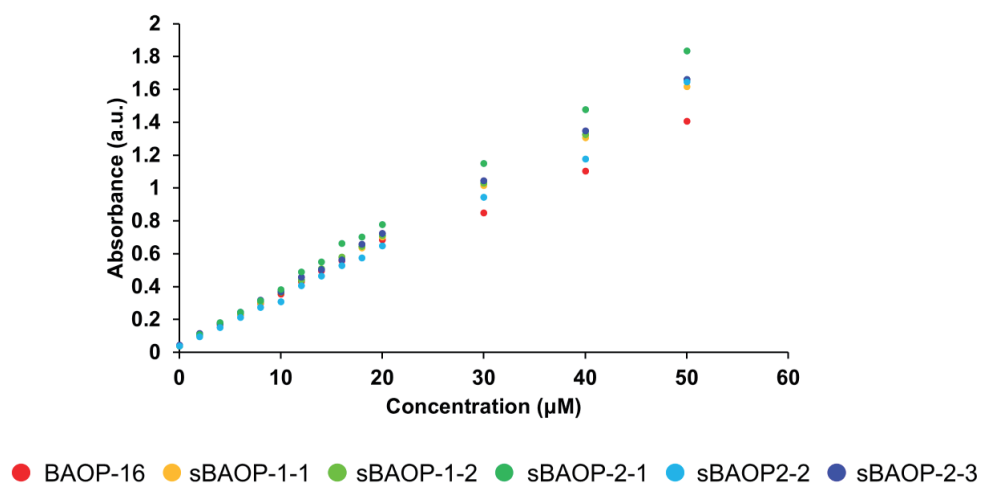


Figure 2-3. Absorbance of candidates in 1% DMSO aq. at various concentrations ($n = 3$).

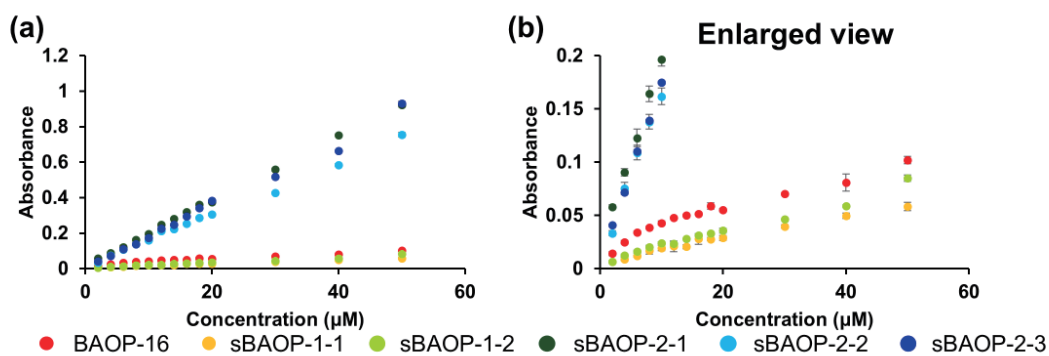


Figure 2-4. Evaluation of aqueous solubility in 1% EtOH aq. (a) Absorbance in 1% EtOH aq. with different concentrations ($n = 3$). (b) Enlarged view of a.

Table 2-2. Results of Log D Analysis.

Compounds	K_{AN}	Log D
BAOP-16	n.d.	n.d.
sBAOP-1-1	140.3	6.00
sBAOP-1-2	431.1	7.39
sBAOP-2-1	415.0	7.35
sBAOP-2-2	441.9	7.42
sBAOP-2-3	800.9	8.16

A β 存在下における蛍光特性の評価

A β 存在下において候補化合物および BAOP-16 の蛍光スペクトルを測定した(**Figure 2-5, Table 2-3**). いずれの化合物も A β オリゴマー存在下で蛍光強度の上昇を示し、その蛍光強度は BAOP-16 と比較して高値であった(**Figure 2-5**). この結果より、水系溶媒への溶解性向上による ACQ の抑制が、A β オリゴマー存在下での蛍光強度増大に寄与していると考えられる。また、いずれの化合物も A β モノマーおよび A β フィブリル存在下での蛍光強度は、A β オリゴマー存在下と比較して低値であったことから、A β オリゴマーに対する選択性が示された。特に、sBAOP-2-3 (SI=6.32)は他の候補化合物(SI=2.30–4.03)と比較して最も高い選択性を示した(**Figures 2-5 and 2-6, Table 2-3**). 一方で、BAOP-16 の選択性(SI=28.4)に関して、第1章 第1節(SI=4.86)と比較して顕著に高い値を示した。これは、評価に用いた溶媒中のエタノールの割合が第1章 第1節と比較して少なかったために ACQ が生じたことに起因すると考えられる。したがって、第1章 第1節の結果を踏まえると、sBAOP-2-3 の A β オリゴマーに対する選択性は BAOP-16 と同程度であると考えられる。加えて、BSA 存在下での蛍光スペクトルを測定した結果、いずれの化合物も蛍光強度の上昇を示した。CH₂C-Tf₂ 基を導入した化合物の中では、sBAOP-2-3 の蛍光上昇度が最も低かったことから、*N,N*-ジフェニルアミノ基の導入が BSA に対する蛍光上昇を抑制することが示唆された(**Figure 2-7**). さらに、ヒト血清アルブミン(human serum albumin; HSA)およびヒト免疫グロブリン G (immunoglobulin; IgG)存在下における sBAOP-2-3 の蛍光スペクトルを測定したところ、BSA 存在下と比較して低いものの、いずれのタンパク存在下においても蛍光強度の上昇が認められた(**Figure 2-8**). これらの結果より、血中に存在する A β オリゴマーの検出に本化合物を用いる際は注意が必要であると考えられる。以上の結果より、sBAOP-2-3 が最も有望な候補化合物であると判断し、以降の評価は sBAOP-2-3 に対して実施した。

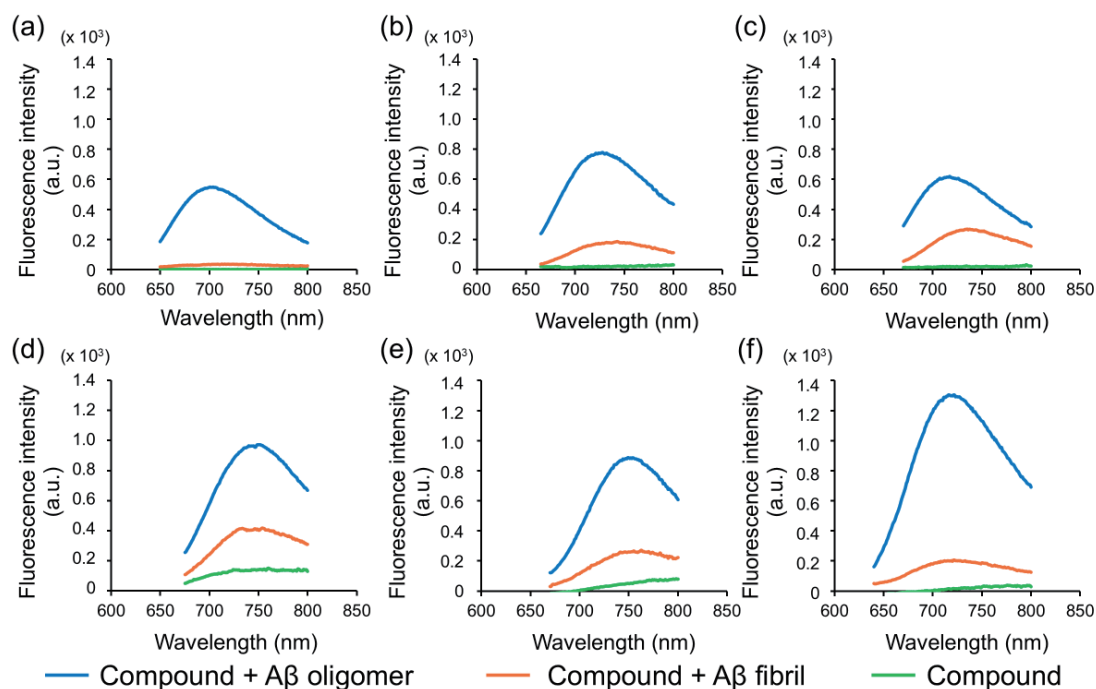


Figure 2-5. Representative fluorescence spectra in the presence of Aβ oligomers and Aβ fibrils. (a) BAOP-16, (b) sBAOP-1-1, (c) sBAOP-1-2, (d) sBAOP-2-1, (e) sBAOP-2-2, and (f) sBAOP-2-3.

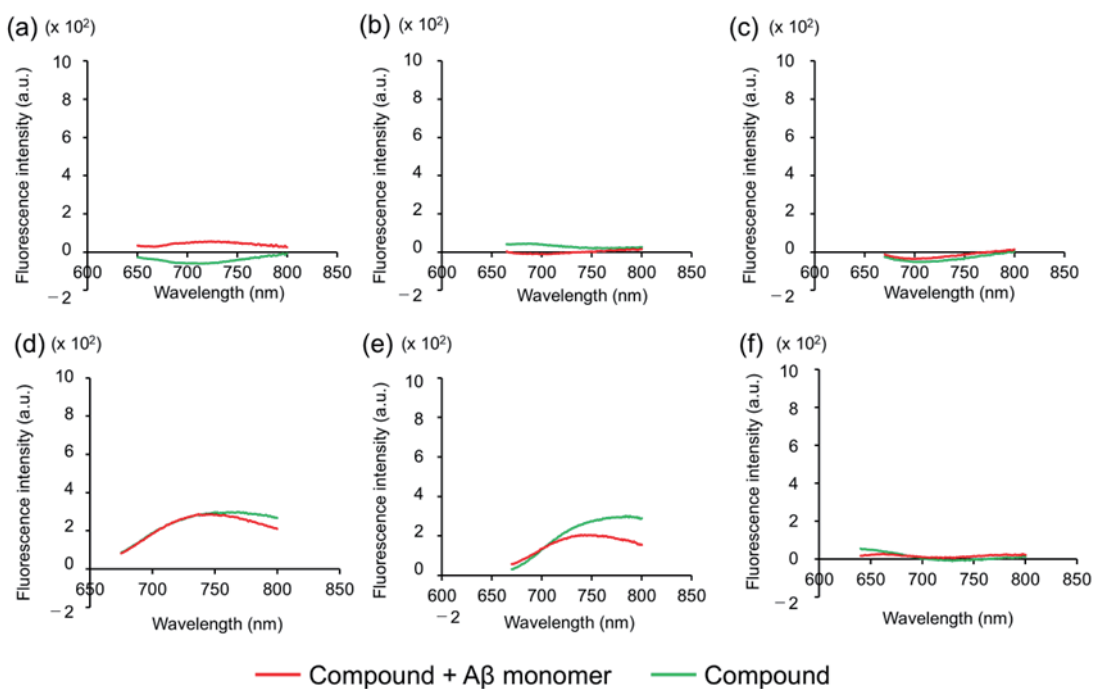


Figure 2-6. Fluorescence spectra of (a) BAOP-16, (b) sBAOP-1-1, (c) sBAOP-1-2, (d) sBAOP-2-1, (e) sBAOP-2-2, and (f) sBAOP-2-3 with or without Aβ monomers.

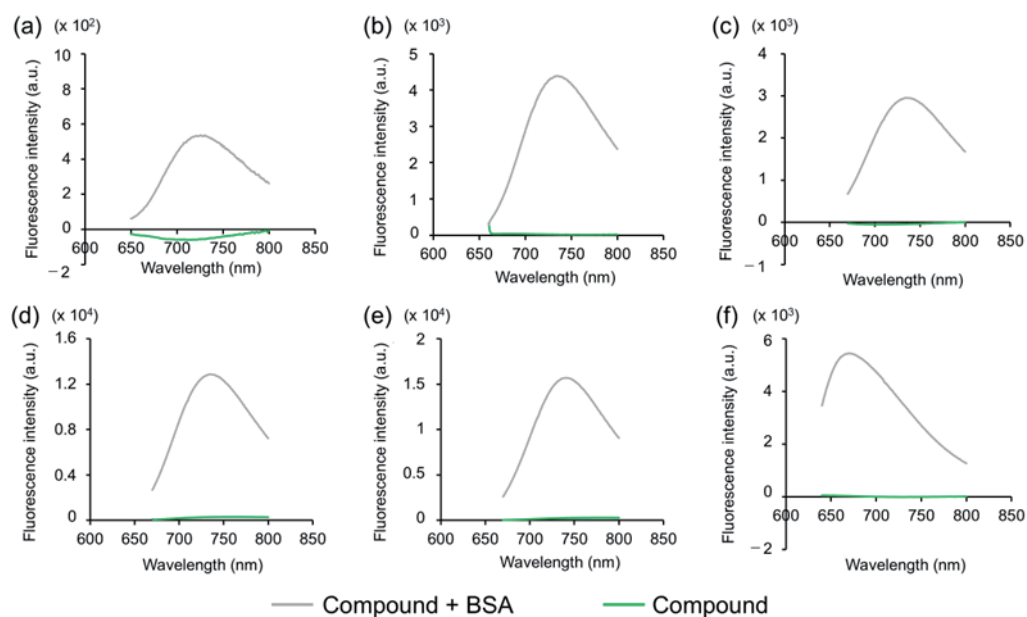


Figure 2-7. Fluorescence spectra of (a) BAOP-16, (b) sBAOP-1-1, (c) sBAOP-1-2, (d) sBAOP-2-1, (e) sBAOP-2-2, and (f) sBAOP-2-3 with or without BSA.

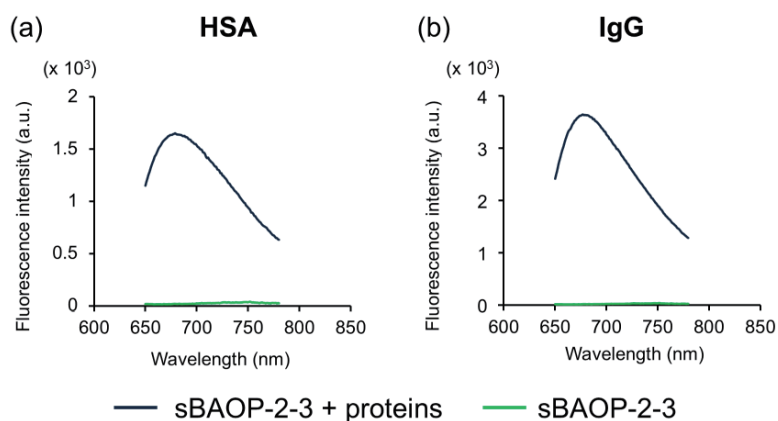


Figure 2-8. Fluorescence spectra of sBAOP-2-3 in the presence of (a) HSA and (b) human IgG.

Table 2-3. Spectroscopic Data in the Presence of A β Oligomers and A β Fibrils. ($n = 3$)

Compounds	With oligomers			With fibrils			SI ^b
	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Fold ^a	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Fold ^a	
BAOP-16	714	78	155	n.d.	n.d.	5.49	28.4
sBAOP-1-1	728	86	36.7	727	85	9.10	4.03
sBAOP-1-2	719	74	40.8	728	83	15.2	2.69
sBAOP-2-1	746	93	6.17	742	89	2.68	2.30
sBAOP-2-2	752	91	6.40	749	88	2.46	2.60
sBAOP-2-3	722	95	26.3	715	88	4.17	6.32

^aEach value represents an increase in fluorescence intensity with protein and is expressed as fold = FI (probe with proteins)/FI (probe).

^bEach value represents selectivity for A β oligomers versus A β fibrils and is expressed as SI = FI (with A β oligomers)/FI (with A β fibrils).

A β オリゴマー標的蛍光プローブとしての sBAOP-2-3 の詳細評価

光を 60 分間照射した後に sBAOP-2-3 の蛍光強度を測定した結果、照射前の 85%以上の蛍光強度を維持しており、sBAOP-2-3 が高い光安定性を有することが示された(**Figure 2-9**). 活性種(ROS, RNS, RSS)存在下での安定性を評価したところ、顕著な分解は認められず、sBAOP-2-3 の化学的安定性が示唆された(**Figure 2-10**). また、有機溶媒を含まない PBS 中での溶解性を評価したところ、BAOP-16 は高濃度でも吸光度の増加が認められなかったのに対し、sBAOP-2-3 は濃度と吸光度の間に直線的な正の相関が認められ、優れた水溶性を有することが明らかとなった(**Figure 2-11**). さらに、異なる濃度の A β オリゴマー存在下で sBAOP-2-3 の蛍光強度を測定したところ、蛍光強度と A β オリゴマー濃度の間に直線的な正の相関が認められた。3 σ/k 法により検出限界を算出した結果、221 nM となり、A β オリゴマーを nM オーダーで検出可能であることが示された(**Figure 2-12**). 加えて、粘度の異なる溶媒中での蛍光強度を測定したところ、粘度の増加に伴い蛍光強度も増加した(**Figure 2-13**). Förster-Hoffman 式(**Equation 1-1**)を用いて粘度感受性係数(x)を計算した結果、0.23 と算出され、BAOP-16 の値($x=0.20$)と同程度であったことから、sBAOP-2-3 は A β オリゴマー検出に適した粘度感受性を有することが示唆された。また、極性の異なる溶媒中での蛍光スペクトルを測定した結果、溶媒の極性が増大するにつれて最大蛍光波長の長波長化および蛍光強度の減弱が認められた(**Figure 2-14, Table 2-4**). この結果より、sBAOP-2-3 の励起状態において分子内電荷移動(ICT)が生じることが示唆された。これらの結果より、分子内回転の抑制と疎水性環境による ICT 状態の不安定化が、sBAOP-2-3 の A β オリゴマー結合時の蛍光上昇に寄与していると考えられる。A β オリゴマーと sBAOP-2-3 の相互作用を検討するため、ドッキングシミュレーションを実施した。A β トリマーモデル(PDB ID: 5SUR⁷⁵)を用いた結果、sBAOP-2-3 が A β トリマーの疎水性領域に結合し、Phe20 とトリフェニルアミノ基の間にπ-π相互作用が認められた(**Figures 2-15 and 2-16**). この結果は、sBAOP-2-3 の蛍光上昇

が A β オリゴマー結合時の分子内回転の抑制と ICT 状態の不安定化に起因するという考察と一致する。さらに、過去の報告では、BODIPY 誘導体に導入されたトリフェニルアミノ基が A β オリゴマーの Phe19-Phe20 と相互作用すること²²や、トリフェニルアミノ基の類似構造であるトリフェニルメタンが A β オリゴマーに結合すること^{75,83,84}が示されている。したがって、トリフェニルアミノ基は sBAOP-2-3 と A β オリゴマーの間の相互作用において重要な役割を果たしていると考えられる。sBAOP-2-3 の A β オリゴマーおよび A β フィブリルに対する結合親和性を結合飽和実験により評価した結果、A β オリゴマーに対する K_d 値は 28 nM、A β フィブリルに対する K_d 値は 322 nM であり、sBAOP-2-3 が A β オリゴマーに対して優れた結合親和性と高い結合選択性(> 10-fold)を有することが示された(**Figure 2-17**)。この結果を BAOP-16 と比較したところ、構造展開により A β オリゴマーに対する結合親和性を維持しつつ、A β オリゴマーに対する結合選択性が大きく向上したことが明らかとなった[e.g., K_d with A β oligomers = 34 nM (BAOP-16) versus 28 nM (sBAOP-2-3); (K_d with A β fibrils)/(K_d with A β oligomers) = 0.464 (BAOP-16) versus 11.5 (sBAOP-2-3)]。第 1 章で得られた、立体障害性の増大が A β オリゴマーに対する結合親和性を向上させるという知見と合わせ、sBAOP-2-3 の高い結合選択性は CH₂C≡Tf₂ 基およびトリフェニルアミノ基の導入による分子のかさ高さの増大に起因すると考えられる。

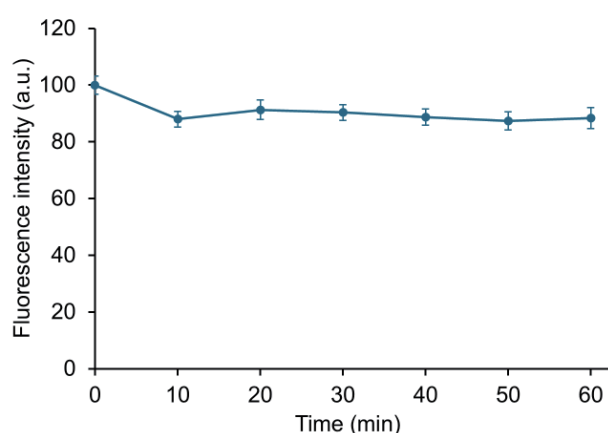


Figure 2-9. Fluorescence intensity of sBAOP-2-3 in ethanol under constant 660-nm laser irradiation (47 mW/cm²) for 60 min.

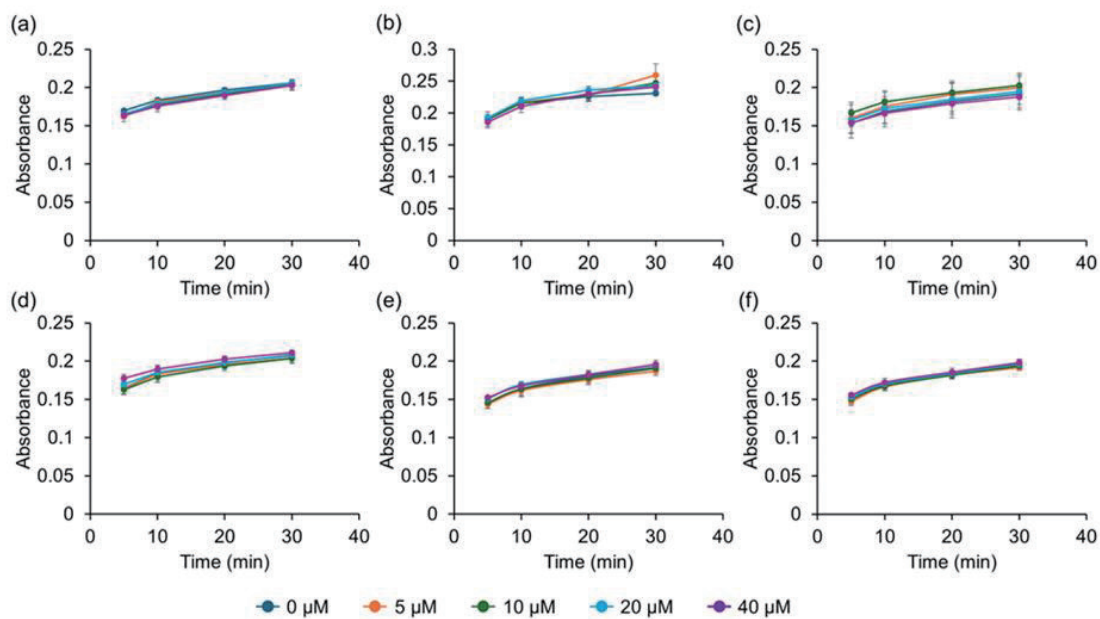


Figure 2-10. Absorbance of sBAOP-2-3 in the presence of various concentrations of reactive species. (a) H_2O_2 , (b) O_2^- , (c) NO , (d) ONOO^- , (e) H_2S , and (f) GSH ($n = 3$).

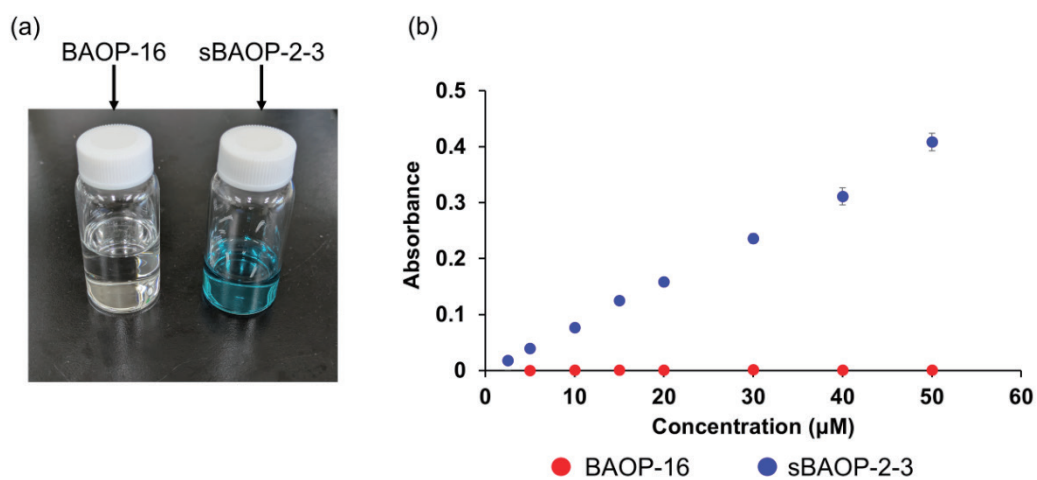


Figure 2-11. Solubility evaluation of BAOP-16 and sBAOP-2-3 in PBS without any organic solvent. (a) An image of BAOP-16 and sBAOP-2-3 dissolved in PBS at 50 μM . (b) Absorbance of BAOP-16 and sBAOP-2-3 in PBS at various concentrations ($n = 3$).

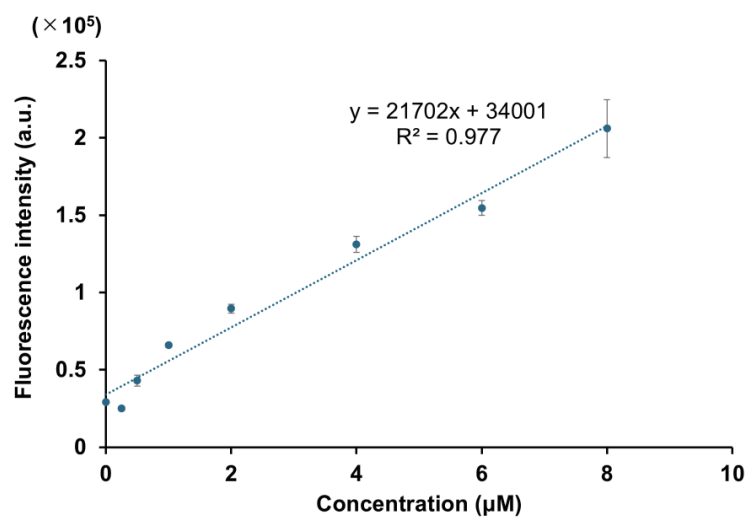


Figure 2-12. Fluorescence intensity of sBAOP-2-3 with different concentrations of A β oligomers.

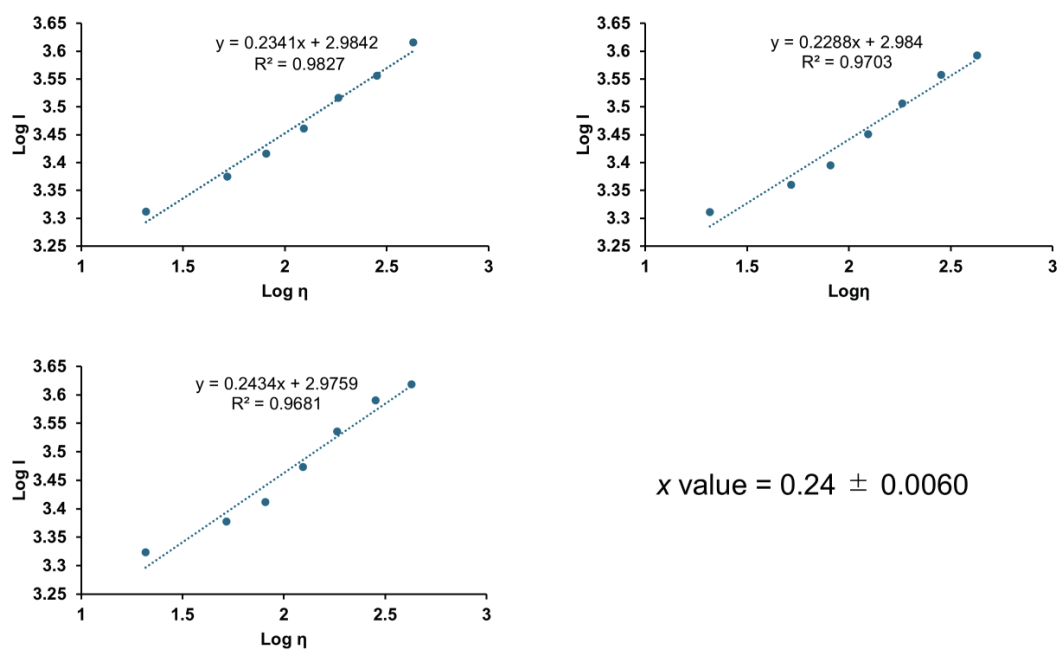


Figure 2-13. The linear relationship between log[fluorescence intensity (I) of sBAOP-2-3] and log[viscosity of solvents (η)]. ($n = 3$)

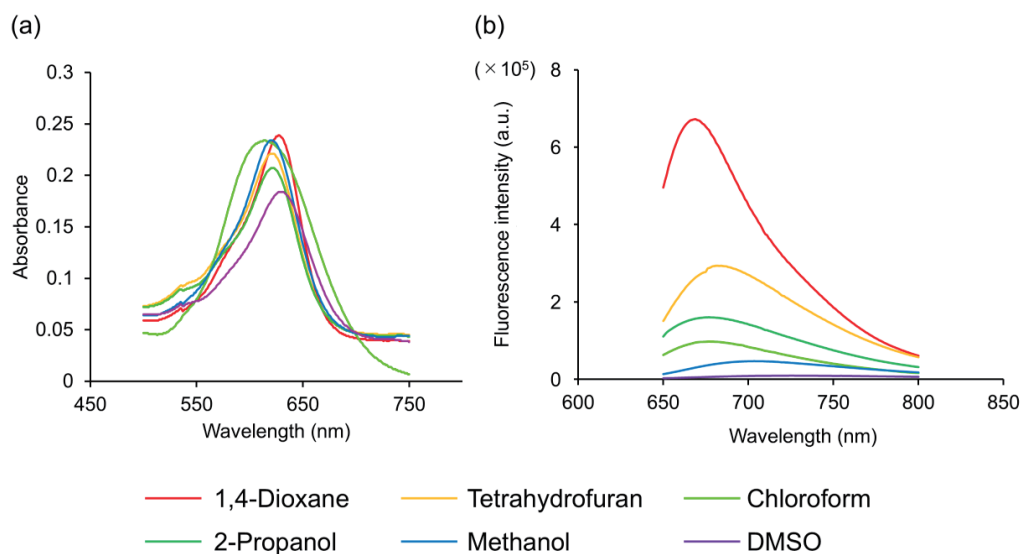


Figure 2-14. (a) Absorption and (b) fluorescence spectra of sBAOP-2-3 in various solvents.

Table 2-4. Photophysical Properties of sBAOP-2-3 in Various Solvents.

Solvents	ϵ_0^a	λ_{abs} (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-2}$)	ϕ^b
1,4-Dioxane	2.2	627	42	669	6.6×10^4	0.16
Tetrahydrofuran	7.6	621	50	671	5.7×10^4	0.15
2-Propanol	18	621	56	677	5.1×10^4	0.064
Methanol	33	621	73	694	6.3×10^4	0.020
DMSO	45	629	95	724	4.7×10^4	0.0078

^aDielectric constant of solvents obtained from Sigma-Aldrich Solvent Center.

^bDetermined versus that of BAP-1 in chloroform¹⁰.

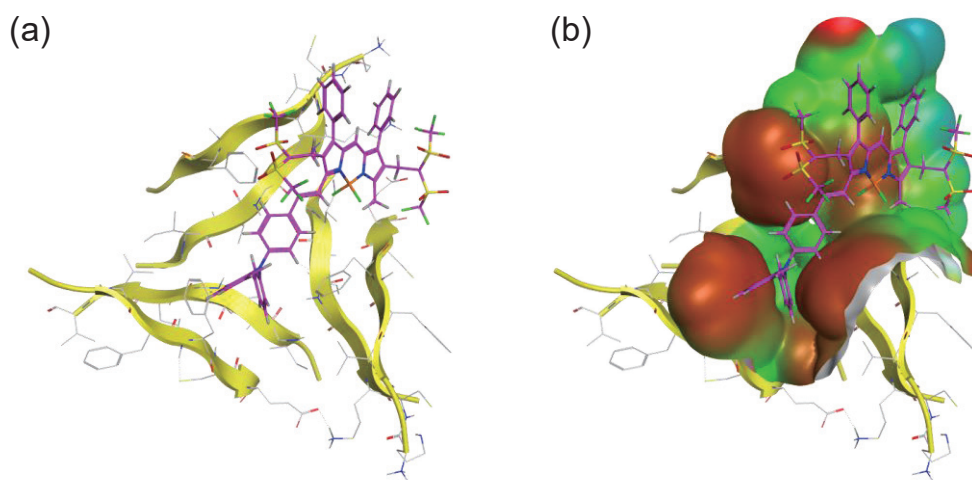


Figure 2-15. Docking simulation between sBAOP-2-3 and A β oligomer. (a) The most stable docking pose in the simulation. (b) Surface of binding site of sBAOP-2-3 in A β oligomer. Red: hydrophobic site, green: neutral site, blue: hydrophilic site.

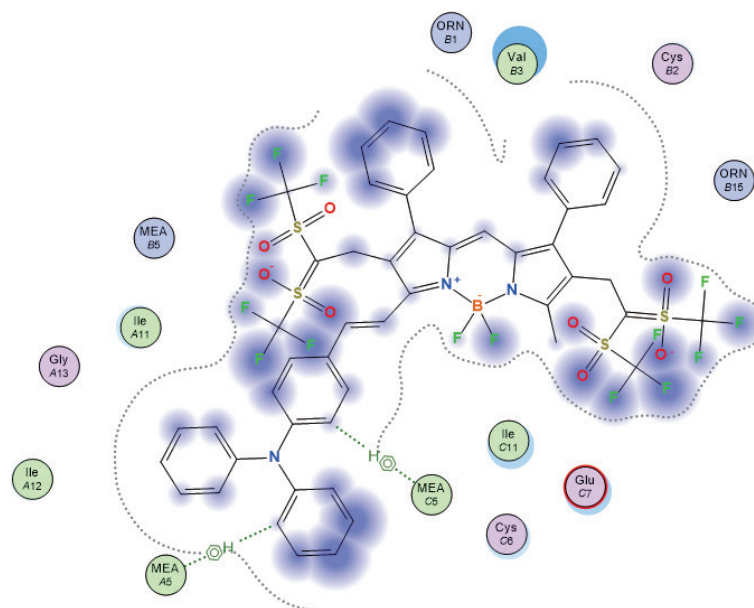


Figure 2-16. Interaction between sBAOP-2-3 and the A β oligomer model (PDB ID: 5SUR). MEA is *N*-methylated Phe₂₀, and the blue-colored part of sBAOP-2-3 has been exposed to a solvent.

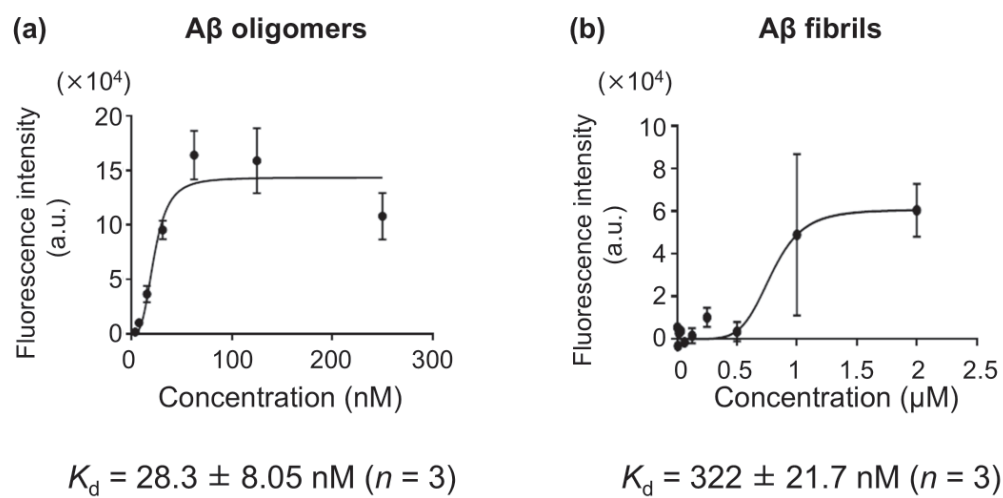


Figure 2-17. Representative saturation binding curve and K_d value of sBAOP-2-3 for (a) A β oligomers or (b) A β fibrils.

A β 凝集過程における A β オリゴマーの検出

sBAOP-2-3 が A β の凝集過程において生成する A β オリゴマーを検出することができるかどうかを評価した。A β モノマーを 37°Cで凝集させ、各時間において凝集反応中のサンプルを分取し、sBAOP-2-3 と混和して、蛍光スペクトルを測定した。対照化合物として ThT を用い、同様の評価を行った。ThT の蛍光強度は凝集開始 8 時間後まで増大し、48 時間後まで高い値を維持した。一方、sBAOP-2-3 の蛍光強度は凝集開始直後から、急速に増大し、3 時間後に最大値を示した後、徐々に減弱した(**Figure 2-18**)。凝集早期においては、sBAOP-2-3 の蛍光強度が ThT よりも有意に高く、凝集後期では ThT の蛍光強度を上回った。これらの結果から、sBAOP-2-3 は凝集早期において生成する A β オリゴマーを選択的に検出できることが示唆された。さらに、各凝集時間における A β 凝集体の 2 次構造を評価した結果、0 時間では A β は主にランダムコイル構造をとっていた一方で、時間の経過に伴い β シート構造の割合が増大することが明らかとなった(**Figure 2-19**)。この変化は ThT の蛍光強度の増加と相関しており、sBAOP-2-3 は β シートを含む A β プロトフィブリルなどの A β オリゴマーを検出できることが示唆された。加えて、各凝集時間における A β の形態を TEM で観察したところ、凝集早期(0.5 および 3 時間)には A β プロトフィブリルの特徴である曲線的な形態^{55, 85, 86}が認められ、凝集時間の経過とともに、凝集体が伸長する様子が観察された(**Figure 2-20**)。これらの結果より、sBAOP-2-3 は A β の凝集早期に生成する A β プロトフィブリルを含む A β オリゴマーを選択的に検出できることが示唆された。

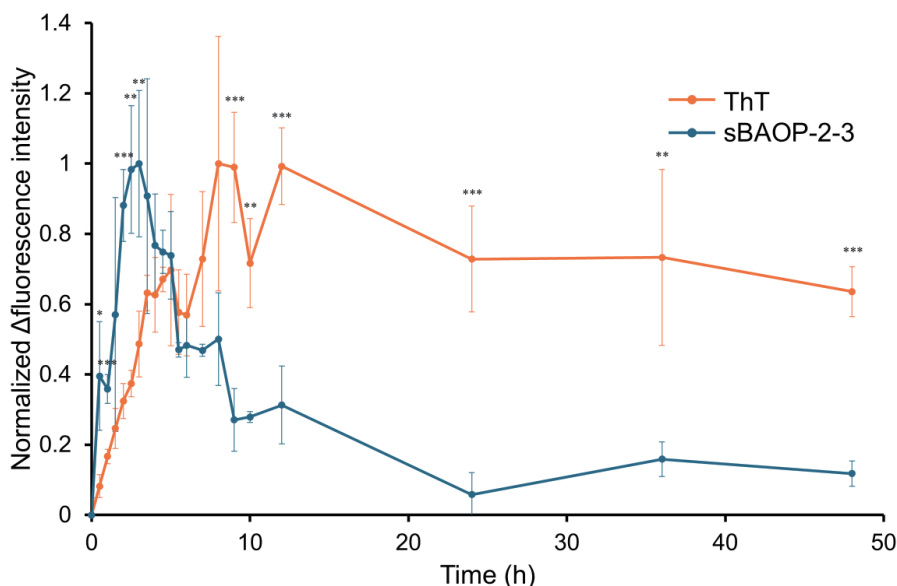


Figure 2-18. Analysis of A β aggregation process by measuring fluorescence intensity of ThT or sBAOP-2-3. Statistical analysis was performed using unpaired Student's t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

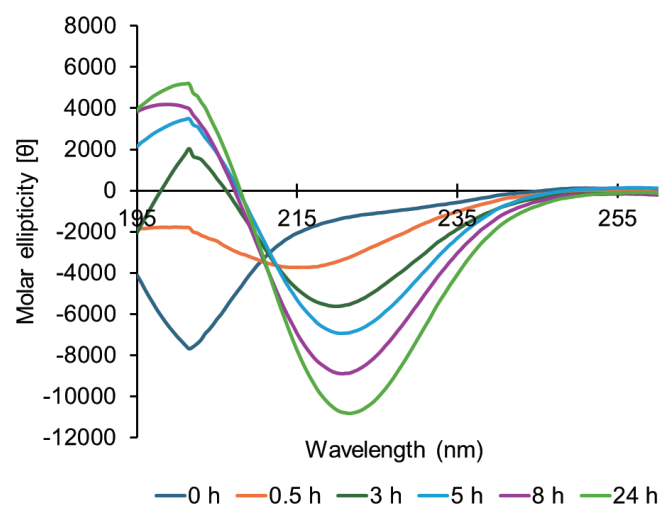


Figure 2-19. CD spectra of A β at each time-point during A β aggregation process.

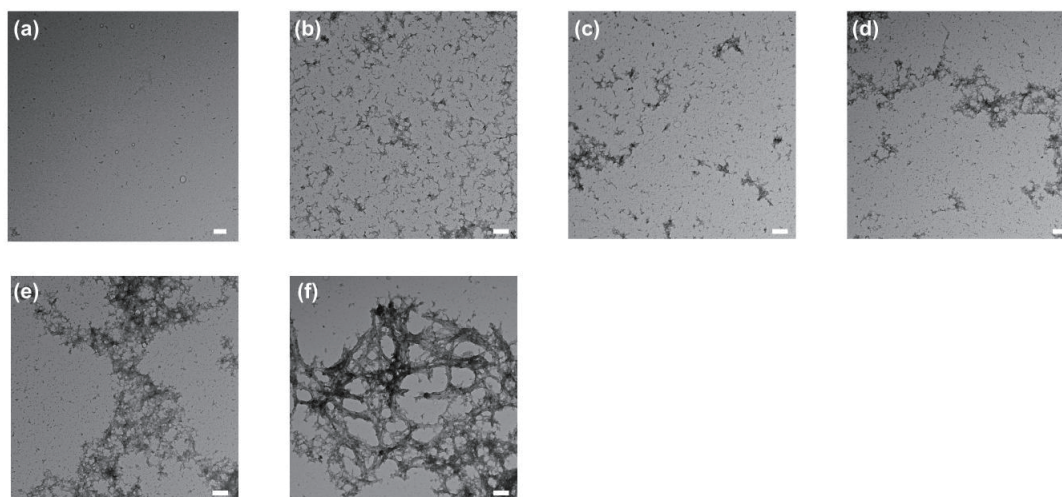


Figure 2-20. Images of A β under incubation at 37°C obtained by TEM. Incubation time of each image is: (a) 0 h, (b) 0.5 h, (c) 3 h, (d) 5 h, (e) 8 h, or (f) 24 h. Scale bar: 100 nm.

生細胞中における A β オリゴマーの検出

sBAOP-2-3 が生細胞存在下において A β オリゴマーを検出できるかどうかを評価するため、PC12 細胞を用いた生細胞イメージングを行った。A β 非存在下では、細胞質における微弱な蛍光シグナルのみが観察された。一方、A β オリゴマー存在下では、顕著に強い蛍光シグナルが認められた。また、A β フィブリル存在下では、蛍光シグナルの顕著な増加は認められなかった(**Figure 2-21**)。これらの結果より、sBAOP-2-3 は生細胞中において A β オリゴマーを選択的に検出可能であることが示された。さらに、異なる濃度の A β オリゴマー存在下での評価において、sBAOP-2-3 の蛍光シグナルは A β オリゴマー濃度に依存して増加することが確認された(**Figure 2-22**)。細胞生存率の評価では、1000 nM の sBAOP-2-3 存在下でも細胞生存率は 80%以上であり、sBAOP-2-3 による顕著な細胞毒性は認められなかった(**Figure 2-23**)。これらの結果より、sBAOP-2-3 は生細胞イメージングへの応用が可能であることが示された。

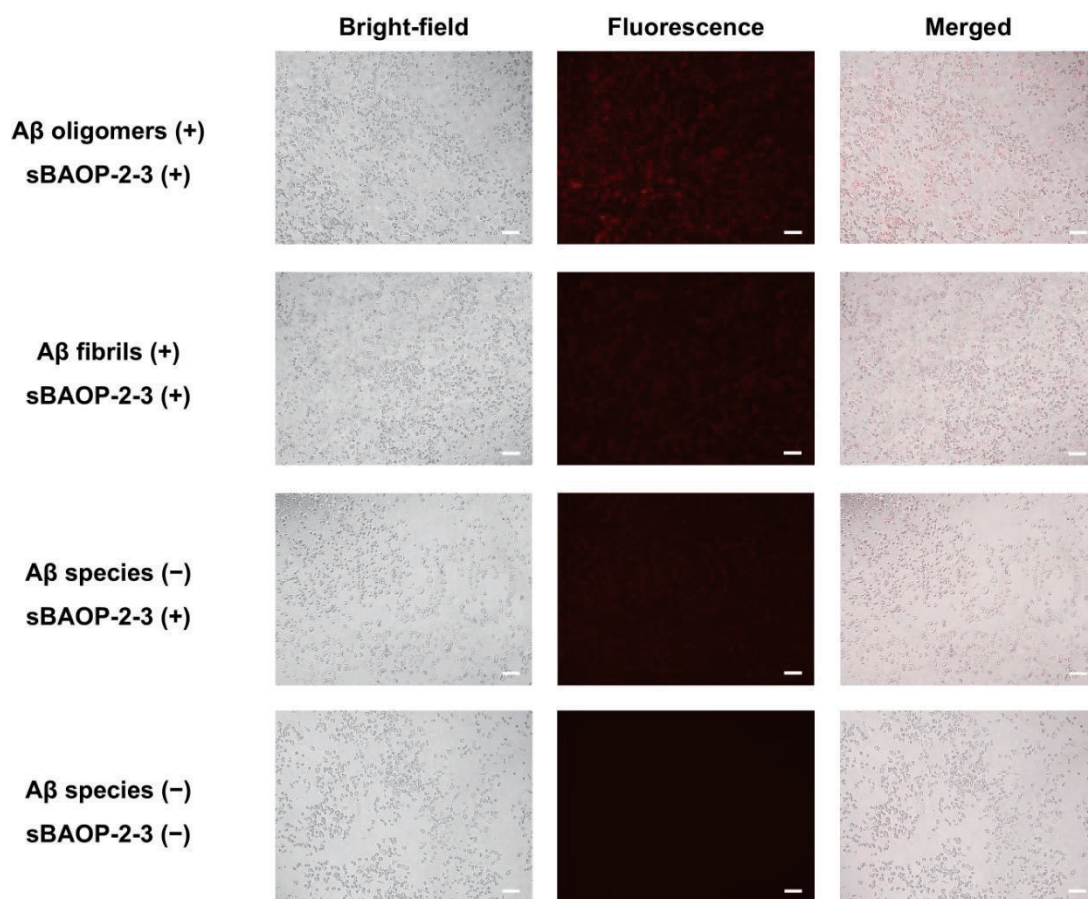


Figure 2-21. Fluorescence images of soluble A β aggregates and A β fibrils (5 μ M) detected by sBAOP-2-3 (1 μ M) in live PC12 cells. Scale bar: 100 μ m.

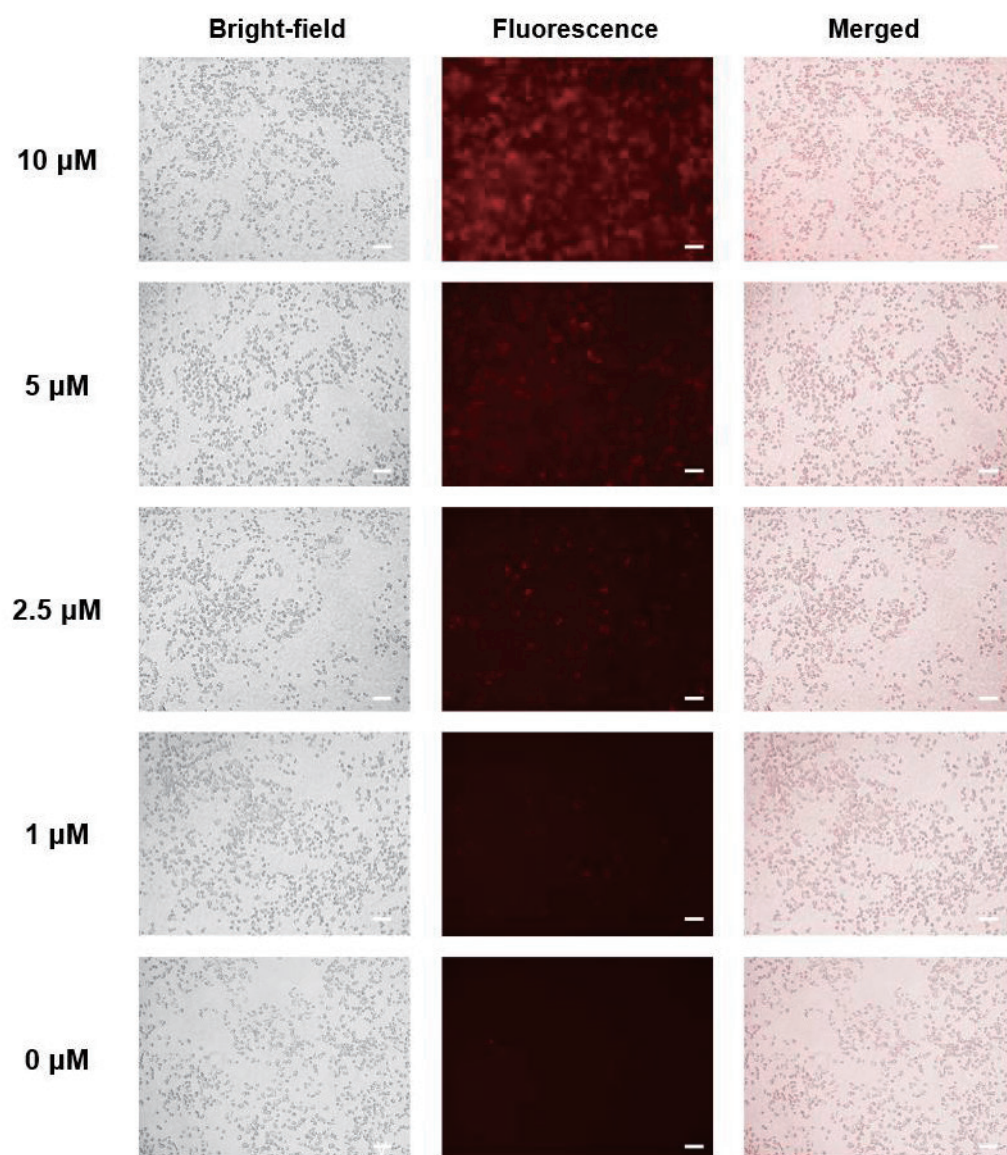


Figure 2-22. Fluorescence images of various concentrations of soluble A β aggregates (0–10 μM) detected by sBAOP-2-3 (1 μM) in live PC12 cells. Scale bar: 100 μm .

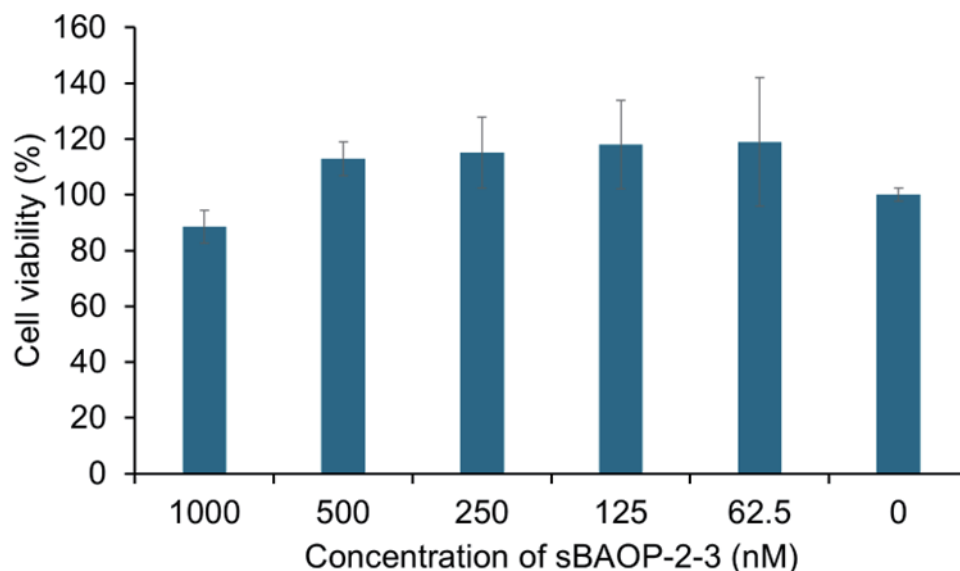


Figure 2-23. Evaluation of cytotoxicity of sBAOP-2-3 using PC12 cells ($n = 4$).

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片を用いた蛍光染色

sBAOP-2-3 が脳組織中の A β オリゴマーを検出することができるかどうかを評価するため、APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片を用いた蛍光染色を実施した。sBAOP-2-3 によるプラーク状の染色像が多数認められ、非特異的な蛍光シグナルは BAOP-16 と比較して低減した (Figures 2-24 and 2-25)。また、sBAOP-2-3 と 6E10 抗体の共染色を行ったところ、局在の一致が認められたことから、sBAOP-2-3 が A β を特異的に染色することが示唆された (Figure 2-24a–d)。同一切片に対して強度プロファイル解析を行った結果、主にプラークの中心領域においてシグナル強度の相違が認められた。このことから、A β プラークの中心領域に sBAOP-2-3 が染色しない A β 凝集体が存在することが示唆された (Figure 2-24e)。さらに、OMAB 抗体との共染色を行ったところ、局在の一致が認められ (Figure 2-24f–i)、強度プロファイル解析ではシグナル強度の一致が確認された (Figure 2-24j)。これらの結果から、sBAOP-2-3 が A β オリゴマーを染色することが示唆された。加えて、ThS との共染色を行ったところ、ThS はプラークの中心領域を染色する一方で、sBAOP-2-3 が周辺領域を強く染色する様子が観察された (Figure 2-24k–n)。強度プロファイル解析においても、ThS のシグナルが強い領域では sBAOP-2-3 のシグナルが比較的弱いことが明らかとなった (Figure 2-24o)。この結果より、sBAOP-2-3 はプラークの周辺領域に存在する A β オリゴマーを選択的に染色することが示唆された。以上の結果より、sBAOP-2-3 が脳組織中の A β オリゴマーを選択的に検出可能であることが示唆された。

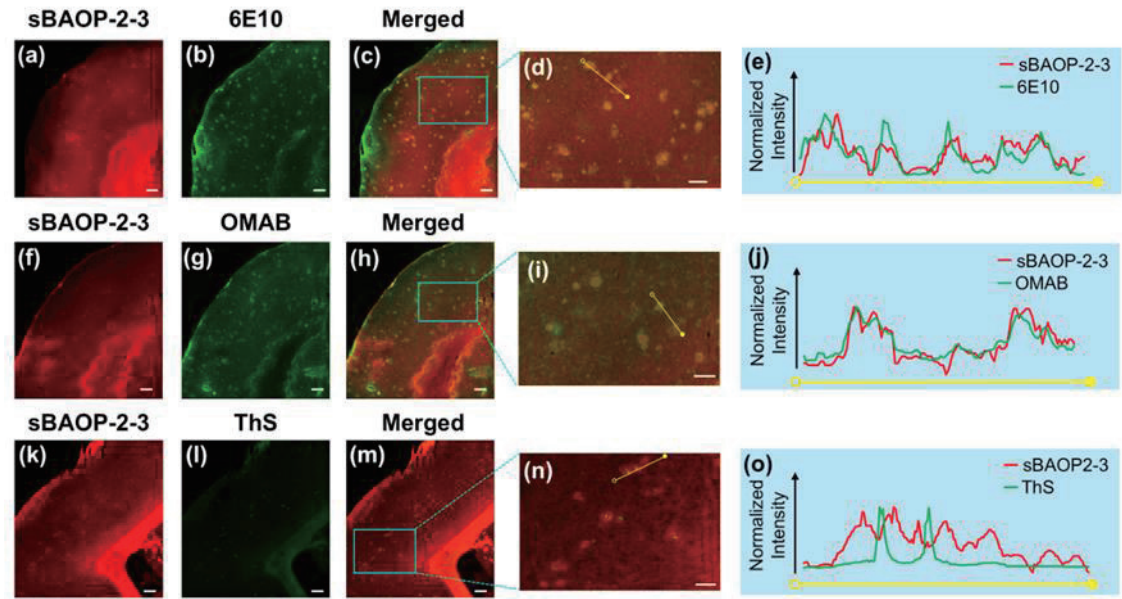


Figure 2-24. Images and intensity profile analysis of brain section staining: (a, f, and k) stained with sBAOP-2-3; (b) stained with 6E10 antibody; (g) stained with OMAB antibody; (l) stained with ThS; (c, h, and m) merged image of a and b, f and g, or k and l, respectively; (d, i, and n) enlarged images of cyan boxes in c, h, or m, respectively; (e, j, and o) intensity profile analysis of specified in d, i, and n, respectively. Scale bar: 200 μm (a–c, f–h, and k–m); 100 μm (d, i, and n).

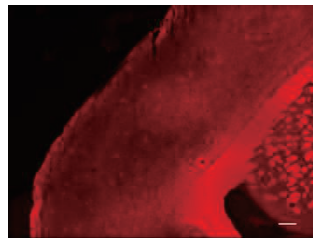


Figure 2-25. An image of a brain section stained with BAOP-16. Scale bar: 200 μm .

2.3 小括

本章では、バイオアッセイにおける A β オリゴマーの選択的検出に資する蛍光プローブの開発を目的として、第 1 章で見出した BAOP-16 の構造展開を行い、得た化合物について A β オリゴマー標的蛍光プローブとしての評価を行った。その結果、以下の知見を得た。

- (1) アルキルスパーサーを介したカルボキシ基の導入、または CH₂C-Tf₂ 基の導入により、5 種類の化合物を設計・合成した。
- (2) 溶解性評価において、CH₂C-Tf₂ 基の導入が水系溶媒に対する溶解性を顕著に向上させることが示された。
- (3) A β 存在下での蛍光特性評価において、sBAOP-2-3 が候補化合物の中で最も高い A β オリゴマー選択性を示した。
- (4) sBAOP-2-3 は A β の凝集過程において、A β オリゴマーを選択的に検出できることが示唆された。
- (5) sBAOP-2-3 は生細胞存在下でも A β オリゴマーを選択的に検出できることが示唆された。
- (6) sBAOP-2-3 は APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片中の A β オリゴマーを選択的に検出できることが示唆された。

以上の結果より、sBAOP-2-3 はバイオアッセイにおいて有用性の高い A β オリゴマー標的蛍光プローブであることが示された。

結語

本研究では、生体内およびバイオアッセイにおける A β オリゴマーの選択的検出を目的として、A β オリゴマーを標的とした蛍光イメージングプローブの開発を行い、以下の知見を得た。

1. 第 1 章では、生体での A β オリゴマーの選択的検出に資する蛍光イメージングプローブの開発を目的として、BODIPY 誘導体の SAR 研究および構造最適化を行った。第 1 節では、A β フィブリル標的蛍光プローブとして見出された BAP-1 をリード化合物とした SAR 研究を通じて、y 字型構造を有する BAOP-16 が A β オリゴマーに対し高い選択性を示すことを見出した。また、A β イノキュレーションマウスを用いた検討により、BAOP-16 が脳内へ移行し、A β オリゴマーを選択的に検出可能であることを示した。さらに、BAOP-16 を用いた生体蛍光イメージングでは、APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの頭部において高い蛍光シグナルが認められ、*ex vivo* 評価により、BAOP-16 が APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳内の A β オリゴマーに結合していることが示唆された。第 2 節では、生体蛍光イメージングへの応用性の向上を目的として BAOP-16 の構造展開を行い、設計・合成した化合物のうち、BAOP-24 が A β オリゴマーに対する高い選択性を維持しつつ、吸収・蛍光波長の長波長化および A β オリゴマーの検出感度の向上を示した。APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片を用いた蛍光染色において、BAOP-24 は A β オリゴマーを選択的に染色することが示唆され、さらに、生体蛍光イメージングでは、正常マウスと比較して強い蛍光シグナルが認められた。以上の結果より、BAOP-24 が生体内 A β オリゴマーの選択的検出に資する蛍光プローブとして有用であることが示された。
2. 第 2 章では、バイオアッセイにおける A β オリゴマーの選択的検出に資する蛍光プローブの開発を目的として、BAOP-16 の構造展開を行った。A β オリゴマーおよび A β フィブリル存在下での蛍光特性および水系溶媒に対する溶解性の評価において、設計・合成した化合物のうち、sBAOP-2-3 が A β オリゴマーに対する高い選択性と優れた水溶性を有することが明らかとなった。さらに、sBAOP-2-3 は A β 凝集過程や生細胞存在下、APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスの脳組織切片において、A β オリゴマーを選択的に検出可能であることが示された。以上の結果より、sBAOP-2-3 がバイオアッセイにおける A β オリゴマーの選択的検出に資する蛍光プローブとして有用であることが示された。

以上、本研究は A β オリゴマーを標的とした蛍光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、これらの知見は AD の病態解明、早期診断、治療薬開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

引用文献

- (1) Jack, C. R., Jr.; Knopman, D. S.; Jagust, W. J.; Petersen, R. C.; Weiner, M. W.; Aisen, P. S.; Shaw, L. M.; Vemuri, P.; Wiste, H. J.; Weigand, S. D.; Lesnick, T. G.; Pankratz, V. S.; Donohue, M. C.; Trojanowski, J. Q. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: An updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 207–216.
- (2) Cui, M. Past and recent progress of molecular imaging probes for β -amyloid plaques in the brain. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 82–112.
- (3) Staderini, M.; Martin, M. A.; Bolognesi, M. L.; Menendez, J. C. Imaging of β -amyloid plaques by near infrared fluorescent tracers: A new frontier for chemical neuroscience. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1807–1819.
- (4) Crystal, H.; Dickson, D.; Fuld, P.; Masur, D.; Scott, R.; Mehler, M.; Masdeu, J.; Kawas, C.; Aronson, M.; Wolfson, L. Clinico-pathologic studies in dementia: Nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology* **1988**, *38*, 1682–1687.
- (5) Welikovich, L. A.; Do Carmo, S.; Magloczky, Z.; Szocsics, P.; Loke, J.; Freund, T.; Cuellar, A. C. Evidence of intraneuronal A β accumulation preceding tau pathology in the entorhinal cortex. *Acta Neuropathol.* **2018**, *136*, 901–917.
- (6) Benilova, I.; Karran, E.; De Strooper, B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 349–357.
- (7) Cline, E. N.; Bicca, M. A.; Viola, K. L.; Klein, W. L. The amyloid- β oligomer hypothesis: Beginning of the third decade. *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, *64*, S567–S610.
- (8) Fu, Y.; Zhang, X.; Wu, L.; Wu, M.; James, T. D.; Zhang, R. Bioorthogonally activated probes for precise fluorescence imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2025**, *54*, 201–265.
- (9) Ramesh, M.; Govindaraju, T. Multipronged diagnostic and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 13657–13689.
- (10) Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Saji, H. BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral β -amyloid plaques. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 319–324.
- (11) Saito, T.; Matsuba, Y.; Mihira, N.; Takano, J.; Nilsson, P.; Itohara, S.; Iwata, N.; Saido, T. C. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* **2014**, *17*, 661–663.
- (12) GBD 2019 Dementia Forecasting Collaborators; Steinmetz, J. D.; Vollset, S. E.; et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: An analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health* **2022**, *7*, e105–e125.
- (13) Alzheimer's Association. 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* **2022**, *18*, 700–789.
- (14) Barage, S. H.; Sonawane, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic

- strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* **2015**, *52*, 1–18.
- (15) Hardy, J. A.; Higgins, G. A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, *256*, 184–185.
- (16) Jack, C. R., Jr.; Lowe, V. J.; Weigand, S. D.; Wiste, H. J.; Senjem, M. L.; Knopman, D. S.; Shiung, M. M.; Gunter, J. L.; Boeve, B. F.; Kemp, B. J.; Weiner, M.; Petersen, R. C.; Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. *Brain* **2009**, *132*, 1355–1365.
- (17) van Dyck, C. H.; Swanson, C. J.; Aisen, P.; Bateman, R. J.; Chen, C.; Gee, M.; Kanekiyo, M.; Li, D.; Reyderman, L.; Cohen, S.; Froelich, L.; Katayama, S.; Sabbagh, M.; Vellas, B.; Watson, D.; Dhadda, S.; Irizarry, M.; Kramer, L. D.; Iwatsubo, T. Lecanemab in early Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **2023**, *388*, 9–21.
- (18) Weissleder, R. A clearer vision for *in vivo* imaging. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316–317.
- (19) An, J.; Kim, K.; Lim, H. J.; Kim, H. Y.; Shin, J.; Park, I.; Cho, I.; Kim, H. Y.; Kim, S.; McLean, C.; Choi, K. Y.; Kim, Y.; Lee, K. H.; Kim, J. S. Early onset diagnosis in Alzheimer's disease patients via amyloid- β oligomers-sensing probe in cerebrospinal fluid. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 1004.
- (20) Li, Y.; Yang, J.; Liu, H.; Yang, J.; Du, L.; Feng, H.; Tian, Y.; Cao, J.; Ran, C. Tuning the stereo-hindrance of a curcumin scaffold for the selective imaging of the soluble forms of amyloid beta species. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 7710–7717.
- (21) Lv, G.; Sun, A.; Wei, P.; Zhang, N.; Lan, H.; Yi, T. A spiropyran-based fluorescent probe for the specific detection of β -amyloid peptide oligomers in Alzheimer's disease. *Chem. Commun. (Camb)* **2016**, *52*, 8865–8868.
- (22) Quan, L.; Moreno-Gonzalez, I.; Xie, Z.; Gamez, N.; Vegas-Gomez, L.; Song, Q.; Gu, J.; Lin, W.; Gomez-Gutierrez, R.; Wu, T. A near-infrared probe for detecting and interposing amyloid beta oligomerization in early Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* **2023**, *19*, 456–466.
- (23) Teoh, C. L.; Su, D.; Sahu, S.; Yun, S. W.; Drummond, E.; Prelli, F.; Lim, S.; Cho, S.; Ham, S.; Wisniewski, T.; Chang, Y. T. Chemical fluorescent probe for detection of A β oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 13503–13509.
- (24) Yang, J.; Zeng, F.; Li, X.; Ran, C.; Xu, Y.; Li, Y. Highly specific detection of A β oligomers in early Alzheimer's disease by a near-infrared fluorescent probe with a "V-shaped" spatial conformation. *Chem. Commun. (Camb)* **2020**, *56*, 583–586.
- (25) Zeng, F.; Yang, J.; Li, X.; Peng, K.; Ran, C.; Xu, Y.; Li, Y. Versatile near-infrared fluorescent probe for *in vivo* detection of A β oligomers. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115559.
- (26) Boens, N.; Verbelen, B.; Dehaen, W. Postfunctionalization of the BODIPY core: Synthesis and spectroscopy. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 6577–6595.
- (27) Bumagina, N. A.; Antina, E. V.; Ksenofontov, A. A.; Antina, L. A.; Kalyagin, A. A.; Berezin, M.

- B. Basic structural modifications for improving the practical properties of BODIPY. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, *469*, 214684.
- (28) Watanabe, H.; Ono, M.; Matsumura, K.; Yoshimura, M.; Kimura, H.; Saji, H. Molecular imaging of β -amyloid plaques with near-infrared boron dipyrromethane (BODIPY)-based fluorescent probes. *Mol. Imaging* **2013**, *12*, 338–347.
- (29) Verwilt, P.; Kim, H. R.; Seo, J.; Sohn, N. W.; Cha, S. Y.; Kim, Y.; Maeng, S.; Shin, J. W.; Kwak, J. H.; Kang, C.; Kim, J. S. Rational design of *in vivo* tau tangle-selective near-infrared fluorophores: expanding the BODIPY universe. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 13393–13403.
- (30) Cui, M.; Ono, M.; Watanabe, H.; Kimura, H.; Liu, B.; Saji, H. Smart near-infrared fluorescence probes with donor-acceptor structure for *in vivo* detection of β -amyloid deposits. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3388–3394.
- (31) Akasaka, T.; Watanabe, H.; Kaide, S.; Iikuni, S.; Hasegawa, M.; Ono, M. Synthesis and evaluation of novel radioiodinated phenylbenzofuranone derivatives as α -synuclein imaging probes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2022**, *64*, 128679.
- (32) Haupt, C.; Leppert, J.; Ronicke, R.; Meinhardt, J.; Yadav, J. K.; Ramachandran, R.; Ohlenschlager, O.; Reymann, K. G.; Gorlach, M.; Fandrich, M. Structural basis of β -amyloid-dependent synaptic dysfunctions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 1576–1579.
- (33) Morgado, I.; Wieligmann, K.; Bereza, M.; Ronicke, R.; Meinhardt, K.; Annamalai, K.; Baumann, M.; Wacker, J.; Hortschansky, P.; Malesevic, M.; Parthier, C.; Mawrin, C.; Schiene-Fischer, C.; Reymann, K. G.; Stubbs, M. T.; Balbach, J.; Gorlach, M.; Horn, U.; Fandrich, M. Molecular basis of β -amyloid oligomer recognition with a conformational antibody fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 12503–12508.
- (34) Kaye, R.; Head, E.; Thompson, J. L.; McIntire, T. M.; Milton, S. C.; Cotman, C. W.; Glabe, C. G. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **2003**, *300*, 486–489.
- (35) Zhang, X.; Tian, Y.; Li, Z.; Tian, X.; Sun, H.; Liu, H.; Moore, A.; Ran, C. Design and synthesis of curcumin analogues for *in vivo* fluorescence imaging and inhibiting copper-induced cross-linking of amyloid beta species in Alzheimer's disease. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16397–16409.
- (36) Jan, A.; Hartley, D. M.; Lashuel, H. A. Preparation and characterization of toxic A β aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1186–1209.
- (37) Spencer, R. K.; Li, H.; Nowick, J. S. X-ray crystallographic structures of trimers and higher-order oligomeric assemblies of a peptide derived from A β _{17–36}. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5595–5598.
- (38) Xiao, Y.; Ma, B.; McElheny, D.; Parthasarathy, S.; Long, F.; Hoshi, M.; Nussinov, R.; Ishii, Y. A β (1–42) fibril structure illuminates self-recognition and replication of amyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 499–505.

- (39) Gremer, L.; Scholzel, D.; Schenk, C.; Reinartz, E.; Labahn, J.; Ravelli, R. B. G.; Tusche, M.; Lopez-Iglesias, C.; Hoyer, W.; Heise, H.; Willbold, D.; Schroder, G. F. Fibril structure of amyloid- β (1–42) by cryo-electron microscopy. *Science* **2017**, *358*, 116–119.
- (40) Hong, M.; Kim, M.; Yoon, J.; Lee, S. H.; Baik, M. H.; Lim, M. H. Excited-state intramolecular hydrogen transfer of compact molecules controls amyloid aggregation profiles. *JACS Au* **2022**, *2*, 2001–2012.
- (41) Biancalana, M.; Koide, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 1405–1412.
- (42) Bolognesi, B.; Kumita, J. R.; Barros, T. P.; Esbjorner, E. K.; Luheshi, L. M.; Crowther, D. C.; Wilson, M. R.; Dobson, C. M.; Favrin, G.; Yerbury, J. J. ANS binding reveals common features of cytotoxic amyloid species. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 735–740.
- (43) Hoshi, M.; Sato, M.; Matsumoto, S.; Noguchi, A.; Yasutake, K.; Yoshida, N.; Sato, K. Spherical aggregates of β -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6370–6375.
- (44) Lambert, M. P.; Barlow, A. K.; Chromy, B. A.; Edwards, C.; Freed, R.; Liosatos, M.; Morgan, T. E.; Rozovsky, I.; Trommer, B.; Viola, K. L.; Wals, P.; Zhang, C.; Finch, C. E.; Krafft, G. A.; Klein, W. L. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β _{1–42} are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6448–6453.
- (45) Li, Y.; Wang, K.; Zhou, K.; Guo, W.; Dai, B.; Liang, Y.; Dai, J.; Cui, M. Novel D-A-D based near-infrared probes for the detection of β -amyloid and Tau fibrils in Alzheimer's disease. *Chem. Commun. (Camb)* **2018**, *54*, 8717–8720.
- (46) Fu, H.; Tu, P.; Zhao, L.; Dai, J.; Liu, B.; Cui, M. Amyloid- β deposits target efficient near-infrared fluorescent probes: Synthesis, in vitro evaluation, and in vivo imaging. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 1944–1950.
- (47) Watanabe, H.; Miki, Y.; Shimizu, Y.; Saji, H.; Ono, M. Synthesis and evaluation of novel two-photon fluorescence probes for in vivo imaging of amylin aggregates in the pancreas. *Dyes Pigments* **2019**, *170*, 107615.
- (48) Adib, M.; Ayashi, N.; Heidari, F.; Mirzaei, P. Reaction between 4-Nitro-1,3-diarylbutan-1-ones and ammonium acetate in the presence of morpholine and sulfur: an efficient synthesis of 2,4-diarylpyrroles. *Synlett* **2016**, *27*, 1738–1742.
- (49) Vazquez-Romero, A.; Kielland, N.; Arevalo, M. J.; Preciado, S.; Mellanby, R. J.; Feng, Y.; Lavilla, R.; Vendrell, M. Multicomponent reactions for *de novo* synthesis of BODIPY probes: *In vivo* imaging of phagocytic macrophages. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16018–16021.
- (50) Lv, G.; Sun, A.; Wang, M.; Wei, P.; Li, R.; Yi, T. A novel near-infrared fluorescent probe for detection of early-stage A β protofibrils in Alzheimer's disease. *Chem. Commun. (Camb)* **2020**, *56*, 1625–1628.

- (51) Yasumoto, T.; Takamura, Y.; Tsuji, M.; Watanabe-Nakayama, T.; Imamura, K.; Inoue, H.; Nakamura, S.; Inoue, T.; Kimura, A.; Yano, S.; Nishijo, H.; Kiuchi, Y.; Teplow, D. B.; Ono, K. High molecular weight amyloid β_{1-42} oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage. *FASEB J.* **2019**, *33*, 9220–9234.
- (52) Lindhagen-Persson, M.; Brannstrom, K.; Vestling, M.; Steinitz, M.; Olofsson, A. Amyloid- β oligomer specificity mediated by the IgM isotype--implications for a specific protective mechanism exerted by endogenous auto-antibodies. *PLoS One* **2010**, *5*, e13928.
- (53) Wang, C.; Chi, W.; Qiao, Q.; Tan, D.; Xu, Z.; Liu, X. Twisted intramolecular charge transfer (TICT) and twists beyond TICT: from mechanisms to rational designs of bright and sensitive fluorophores. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 12656–12678.
- (54) Liu, S.; Li, D.; Zhang, Z.; Surya Prakash, G. K.; Conti, P. S.; Li, Z. Efficient synthesis of fluorescent-PET probes based on [^{18}F]BODIPY dye. *Chem. Commun. (Camb)* **2014**, *50*, 7371–7373.
- (55) Nilsberth, C.; Westlind-Danielsson, A.; Eckman, C. B.; Condron, M. M.; Axelman, K.; Forsell, C.; Stenh, C.; Luthman, J.; Teplow, D. B.; Younkin, S. G.; Naslund, J.; Lannfelt, L. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A β protofibril formation. *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 887–893.
- (56) Koffie, R. M.; Meyer-Luehmann, M.; Hashimoto, T.; Adams, K. W.; Mielke, M. L.; Garcia-Alloza, M.; Micheva, K. D.; Smith, S. J.; Kim, M. L.; Lee, V. M.; Hyman, B. T.; Spires-Jones, T. L. Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4012–4017.
- (57) Tetko, I. V.; Tanchuk, V. Y. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 1136–1145.
- (58) Qian, H.; Cousins, M. E.; Horak, E. H.; Wakefield, A.; Liptak, M. D.; Aprahamian, I. Suppression of Kasha's rule as a mechanism for fluorescent molecular rotors and aggregation-induced emission. *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 83–87.
- (59) Wolstenholme, C. H.; Hu, H.; Ye, S.; Funk, B. E.; Jain, D.; Hsiung, C. H.; Ning, G.; Liu, Y.; Li, X.; Zhang, X. AggFluor: fluorogenic toolbox enables direct visualization of the multi-step protein aggregation process in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 17515–17523.
- (60) Förster, T.; Hoffmann, G. Viscosity dependence of fluorescent quantum yields of some dye systems. *Z. Phys. Chem. Neue. Fol.* **1971**, *75*, 63–76.
- (61) Paez-Perez, M.; Kuimova, M. K. Molecular rotors: Fluorescent sensors for microviscosity and conformation of biomolecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2024**, *63*, e202311233.
- (62) Cao, K.; Farahi, M.; Dakanali, M.; Chang, W. M.; Sigurdson, C. J.; Theodorakis, E. A.; Yang, J. Aminonaphthalene 2-cyanoacrylate (ANCA) probes fluorescently discriminate between amyloid- β and prion plaques in brain. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17338–17341.

- (63) Zhou, K.; Yuan, C.; Dai, B.; Wang, K.; Chen, Y.; Ma, D.; Dai, J.; Liang, Y.; Tan, H.; Cui, M. Environment-sensitive near-infrared probe for fluorescent discrimination of A β and Tau fibrils in AD brain. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 6694–6704.
- (64) Leen, V.; Miscoria, D.; Yin, S.; Filarowski, A.; Ngongo, J. M.; Van der Auweraer, M.; Boens, N.; Dehaen, W. 1,7-Disubstituted boron dipyrromethene (BODIPY) dyes: Synthesis and spectroscopic properties. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8168–8176.
- (65) Ye, S.; Zhang, H.; Fei, J.; Wolstenholme, C. H.; Zhang, X. A general strategy to control viscosity sensitivity of molecular rotor-based fluorophores. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 1339–1346.
- (66) Hong, Y.; Lam, J. W.; Tang, B. Z. Aggregation-induced emission: Phenomenon, mechanism and applications. *Chem. Commun. (Camb)* **2009**, 4332–4353.
- (67) Yu, Z.; Guo, W.; Patel, S.; Cho, H. J.; Sun, L.; Mirica, L. M. Amphiphilic stilbene derivatives attenuate the neurotoxicity of soluble A β_{42} oligomers by controlling their interactions with cell membranes. *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 12818–12830.
- (68) Wang, C.; Jiang, W.; Tan, D.; Huang, L.; Li, J.; Qiao, Q.; Yadav, P.; Liu, X.; Xu, Z. Monitoring amyloid aggregation via a twisted intramolecular charge transfer (TICT)-based fluorescent sensor array. *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 4786–4795.
- (69) Bagchi, B.; Oxtoby, D. W.; Fleming, G. R. Theory of the time development of the stokes shift in polar media. *Chem. Phys.* **1984**, *86*, 257–267.
- (70) Kimura, Y.; Ikegami, A. Local dielectric-properties around polar-region of lipid bilayer-membranes. *J. Membrane Biol.* **1985**, *85*, 225–231.
- (71) Mataga, N.; Kaifu, Y.; Koizumi, M. Solvent effects upon fluorescence spectra and the dipolemoments of excited molecules. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1956**, *29*, 465–470.
- (72) Matsui, A.; Bellier, J. P.; Kanai, T.; Satooka, H.; Nakanishi, A.; Terada, T.; Ishibe, T.; Nakamura, Y.; Taguchi, H.; Naruse, N.; Mera, Y. The Effect of ethanol on disassembly of amyloid- β_{1-42} pentamer revealed by atomic force microscopy and gel electrophoresis. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 889.
- (73) Yanai, H.; Hoshikawa, S.; Moriiwa, Y.; Shoji, A.; Yanagida, A.; Matsumoto, T. A fluorinated carbanionic substituent for improving water solubility and lipophilicity of fluorescent dyes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, *60*, 5168–5172.
- (74) Morikawa, G.; Suzuka, C.; Shoji, A.; Shibusawa, Y.; Yanagida, A. High-throughput determination of octanol/water partition coefficients using a shake-flask method and novel two-phase solvent system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *117*, 338–344.
- (75) Salveson, P. J.; Haerianardakani, S.; Thuy-Boun, A.; Yoo, S.; Kreutzer, A. G.; Demeler, B.; Nowick, J. S. Repurposing triphenylmethane dyes to bind to trimers derived from A β . *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 11745–11754.

- (76) Sedgwick, A. C.; Dou, W. T.; Jiao, J. B.; Wu, L.; Williams, G. T.; Jenkins, A. T. A.; Bull, S. D.; Sessler, J. L.; He, X. P.; James, T. D. An ESIPT probe for the ratiometric imaging of peroxynitrite facilitated by binding to A β -aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14267–14271.
- (77) Wang, P.; Yu, L.; Gong, J.; Xiong, J.; Zi, S.; Xie, H.; Zhang, F.; Mao, Z.; Liu, Z.; Kim, J. S. An activity-based fluorescent probe for imaging fluctuations of peroxynitrite (ONOO⁻) in the Alzheimer's disease brain. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2022**, *61*, e202206894.
- (78) Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2411–2423.
- (79) Noguchi-Shinohara, M.; Shuta, K.; Murakami, H.; Mori, Y.; Komatsu, J.; Kobayashi, C.; Hersch, S.; Horie, K.; Ono, K. Lecanemab-associated amyloid- β protofibril in cerebrospinal fluid correlates with biomarkers of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **2025**, *97*, 993–1006.
- (80) De, S.; Wirthensohn, D. C.; Flagmeier, P.; Hughes, C.; Aprile, F. A.; Ruggeri, F. S.; Whiten, D. R.; Emin, D.; Xia, Z.; Varela, J. A.; Sormanni, P.; Kundel, F.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M.; Bryant, C.; Vendruscolo, M.; Klenerman, D. Different soluble aggregates of A β 42 can give rise to cellular toxicity through different mechanisms. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1541.
- (81) Mannini, B.; Mulvihill, E.; Sgromo, C.; Cascella, R.; Khodarahmi, R.; Ramazzotti, M.; Dobson, C. M.; Cecchi, C.; Chiti, F. Toxicity of protein oligomers is rationalized by a function combining size and surface hydrophobicity. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2309–2317.
- (82) Suzuki, T.; Hori, Y.; Sawazaki, T.; Shimizu, Y.; Nemoto, Y.; Taniguchi, A.; Ozawa, S.; Sohma, Y.; Kanai, M.; Tomita, T. Photo-oxygenation inhibits tau amyloid formation. *Chem. Commun. (Camb)* **2019**, *55*, 6165–6168.
- (83) Furuta, M.; Aii, S.; Umeda, H.; Matsukawa, R.; Shizu, K.; Kaji, H.; Kawashima, S. A.; Hori, Y.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Mitsunuma, H.; Kanai, M. Leuco ethyl violet as self-activating prodrug photocatalyst for in vivo amyloid-selective oxygenation. *Adv. Sci. (Weinh)* **2024**, *11*, e2401346.
- (84) Nagashima, K.; Watanabe, H.; Akasaka, T.; Ono, M. Development of triphenylmethane dyes for *in vivo* fluorescence imaging of A β oligomers. *ACS Chem. Neurosci.* **2024**, *15*, 2233–2242.
- (85) Walsh, D. M.; Lomakin, A.; Benedek, G. B.; Condron, M. M.; Teplow, D. B. Amyloid β -protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22364–22372.
- (86) Watanabe-Nakayama, T.; Tsuji, M.; Umeda, K.; Oguchi, T.; Konno, H.; Noguchi-Shinohara, M.; Kiuchi, Y.; Kodera, N.; Teplow, D. B.; Ono, K. Structural dynamics of amyloid- β protofibrils and actions of anti-amyloid- β antibodies as observed by high-speed atomic force microscopy. *Nano Lett.* **2023**, *23*, 6259–6268.

学術雑誌公表論文

第1章 生体内における A β オリゴマーの選択的検出を目的とした 蛍光イメージングプローブの開発と最適化

In vivo near-infrared fluorescence imaging selective for soluble amyloid β aggregates using y-shaped BODIPY derivative

Takahiro Akasaka, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono

2023 年 10 月発行 *Journal of Medicinal Chemistry* 第 66 巻 14029 ページ～14046 ページ

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c01057 に掲載

Combined strategies for optimizing BODIPY-based near-infrared fluorescent probe targeting A β oligomers

Takahiro Akasaka, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono

2024 年 10 月発行 *Sensors and Actuators B: Chemical* 第 417 巻 136132 ページ

DOI: 10.1016/j.snb.2024.136132 に掲載

第2章 バイオアッセイにおける A β オリゴマーの選択的検出を可能とする 蛍光イメージングプローブの開発

Novel BODIPY-based fluorescent probes with improved aqueous solubility for selective detection of soluble A β aggregates

Takahiro Akasaka, Hiroyuki Watanabe, Masahiro Ono

2025 年 10 月発行 *ACS Chemical Neuroscience* 第 16 巻 4257 ページ～4266 ページ

DOI: 10.1021/acscchemneuro.5c00525 に掲載

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、福井大学高エネルギー医学研究センター 渡邊 裕之 准教授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 中島 一磨 助教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 貝出 翔 博士、長嶋 浩太郎 修士、岸本 峻明 学士、柏山 陸斗 学士に深く感謝申し上げます。

透過型電子顕微鏡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附属総合解剖センター 電子顕微鏡室の方々に深く感謝申し上げます。

APP^{NL-G-F/NL-G-F} マウスを御提供戴きました、理化学研究所 脳神経科学研究センター 西道 隆臣 チームリーダー、名古屋市立大学大学院医学研究科 齊藤 貴志 教授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 尾上 遼太郎 博士、数多 伸紀 博士、石坂 優衣 修士、齋藤 晴香 修士、甚田 洸希 修士、井川 実穂 学士、小原 嵩貴 学士、齋藤 浩輔 学士、土橋 昌平 学士、中野 大樹 学士、高田 遥樹 学士、根岸 将史 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、応援して戴きました、家族、友人に心より感謝申し上げます。