

脳内アミロイド凝集体を特異的に可視化できる イメージングプローブの探索

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 中家 真理

[目的]

アルツハイマー病、プリオン病、およびレビー小体型認知症などの神経変性疾患は、脳内のタンパク質やペプチドが β シート構造に富むアミロイドと呼ばれる繊維状の凝集体を形成して脳内に蓄積し、様々な神経症状を引き起こすと考えられている。これら疾患に関連する凝集体として、アミロイド β ($A\beta$) 凝集体、異常型プリオンタンパク質凝集体 (PrP^{Sc})、 α -シヌクレイン (α -Syn) 凝集体などが知られている。神経変性疾患の確定診断は、病理組織学的検査が唯一の手法である。一方、核医学的手法による脳内アミロイドの非侵襲的な検出は、神経変性疾患の生前鑑別診断、治験薬を含む薬剤の効果判定、さらには病態の発症メカニズム解明にも貢献できると期待できる。そこで本研究では、臨床診断に資するイメージングプローブが未開発である PrP^{Sc} および α -Syn 凝集体を標的としたイメージングプローブの開発を試みた。 PrP^{Sc} を標的としたイメージングプローブとして、化合物の物理化学的なパラメーターを用いて算出される central nervous system multiparameter positron emission tomography optimization (CNS PET MPO) に基づき、高い脳移行性と非特異的な脳内分子との結合の軽減を期待して設計したスチリルクロモン (SC) 誘導体、ビニルピリジルクロモン (VPC) 誘導体、およびベンゾフラニルクロモン (BFC) 誘導体を開発した。また、当研究室において $A\beta$ 凝集体または PrP^{Sc} に対して結合親和性が確認された化合物ライブラリーを用いて、 α -Syn 凝集体へ高い特異性を有するイメージングプローブの母体化合物となりうる分子のスクリーニングを試みた。

[結果・考察]

(1) PrP^{Sc} を標的とした SC 誘導体および VPC 誘導体の開発

これまでに当研究室にて、SC 誘導体 [^{123}I]SC-OMe が開発され、SPECT にてプリオン病マウスモデルであるマウス馴化 bovine spongiform encephalopathy (mBSE) 感染マウス脳内の PrP^{Sc} を画像化できることが見いだされている。一方、脳移行性は臨床応用には不十分であることも示された。中枢神経系を標的としたイメージングプローブには 3.0 以上の CNS PET MPO スコアが必要であると推察されているが、SC-OMe は 1.30 と算出されており、基準を満たしていない。そこで、CNS PET MPO スコアがより高値の、エタノールアミノ基を有する新規 SC 誘導体、ジメチルアミノ基、メトキシ基を有する VPC 誘導体 (Figure 1) を設計・合成した。リコンビナントマウスプリオンタンパク質 (rMoPrP) 凝集体に対する競合阻害実験を行ったところ、SC-NHEtOH

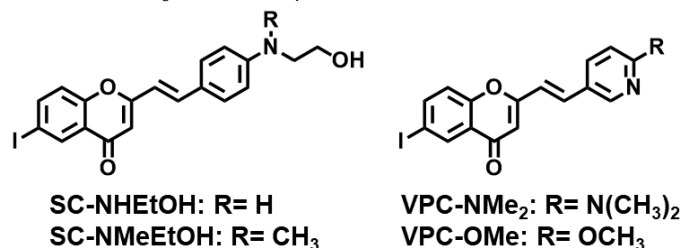


Figure 1. Chemical structures of SC and VPC derivatives.

は阻害定数 (K_i) = 51.2 nM と最も高い結合親和性を示し、mBSE 感染マウス脳切片の PrP^{Sc} 沈着部位に SC-NHEtOH 由来の蛍光像が観察された。しかし、正常マウスを用いて体内動態を評価した結果、 $[^{125}\text{I}]\text{SC-NHEtOH}$ の投与 2 分後における初期脳取り込みは 0.88% injected dose (ID)/g であり、 $[^{125}\text{I}]\text{SC-OMe}$ (2.25% ID/g) と比べても低値であり、脳移行性は臨床応用には不十分であることが示された。したがって、SC-NHEtOH は PrP^{Sc} への結合性は認められたものの、さらなる構造の最適化の必要性が示された。

(2) PrP^{Sc} を標的とした BFC 誘導体の開発

これまでに開発してきた SC 誘導体は、脳移行性が不十分であることに加えて、光異性化を起こすため、単一成分を用いた画像診断が行えないという問題点がある。そこで、光異性化を防止し、かつ CNS PET MPO スコアが 3.0 付近かそれ以上である、SC 骨格を環化させた BFC 誘導体 (Figure 2a) を設計・合成した。その結果、BFC 誘導体は rMoPrP 凝集体へ高い結合親和性 (K_d = 23-48 nM) を示し、mBSE 感染マウス脳切片において、BFC 誘導体の染色部位は、脳内 PrP^{Sc} 沈着部位と一致することが確認された。続いて、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 凝集体および $\text{A}\beta$ が脳内に蓄積する Tg2576 マウス脳切片を用いた検討により、BFC 誘導体の $\text{A}\beta$ への親和性は極めて弱いことが示された。正常マウスを用いて体内動態を評価した結果、メトキシ基、アミノ基を導入した BFC 誘導体は、臨床で使用されているアミロイドイメージング薬剤に匹敵する高い脳移行性と消失性を示した。さらに、メ

トキシ基を導入した BFC 誘導体の mBSE 感染マウスおよび mock 感染 (非感染) マウスの *in vivo* 評価を行ったところ、投与 180 分後において、脳/血液比は mBSE 感染マウスの方が mock 感染マウスと比べて有意に高く、mBSE 感染マウスでは脳移行性が高いことが示された (Figure 2b)。以上、今後更なる検討は必要であるが、BFC 誘導体が PrP^{Sc} を可視化できるイメージングプローブとして臨床応用できる可能性が示された。

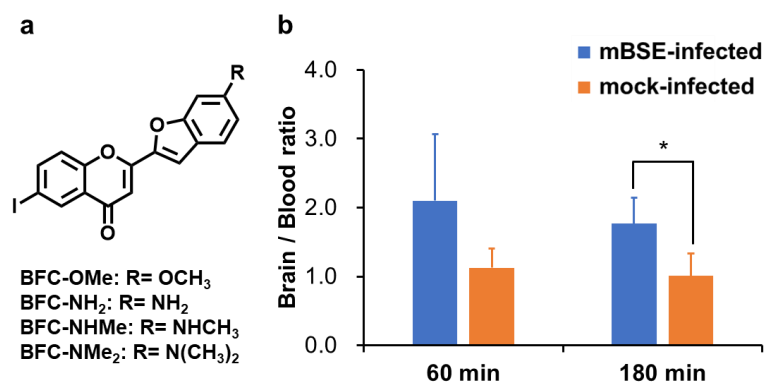


Figure 2. (a) Chemical structures of BFC derivatives. (b) The ratio of brain and blood distribution of the radioactivity after intravenous administration of $[^{123/125}\text{I}]\text{BFC-OMe}$ in mBSE-infected mice and mock-infected mice. Each value represents the mean (standard deviation) of 3-5 mice. *P < 0.05 (Welch's t-test).

(3) α -Syn 凝集体を標的としたイメージングプローブ候補化合物の探索

当研究室において、 $A\beta$ 凝集体、 PrP^{Sc} に対して結合親和性を有することが見出されている、フラボノイド関連化合物 [フラボン (FL) 誘導体、カルコン (CL) 誘導体、オーロン (AR) 誘導体、SC 誘導体]、アクリジン (AC) 誘導体、ベンゾフラン (BF) 誘導体、および BFC 誘導体 (Figure 3) は同じくアミロイドに分類される α -Syn 凝集体を標的としたイメージングプローブとしての展開も期待される。そこで、これらの化合物を用いて α -Syn 凝集体への結合性に関する基礎的な評価を行った。リコンビナントヒト α -Syn 凝集体に対する $[^{125}I]$ 標識化合物の吸着実験および結合飽和実験を行った結果、 $[^{125}I]5\text{-IBF-NMe}_2$ 、 $[^{125}I]\text{BFC-OMe}$ 、 $[^{125}I]\text{BFC-NMe}_2$ は α -Syn 凝集体に対して結合親和性を有することが示された ($K_d = 26.1\text{-}111\text{ nM}$)。さらに詳細な検討を行うために、細胞膜上および細胞質に α -Syn 凝集体を形成する SH-SY5Y 細胞を作製し、 α -Syn 凝集体モデルとして用いた。BFC-NMe₂ の細胞染色実験を行ったところ、細胞内で BFC-NMe₂ 由来の蛍光が観察されたことから、BFC-NMe₂ は細胞内 α -Syn 凝集体に対して結合性を有することが示唆された。

以上、本研究にて評価したアミロイド結合性化合物のうち、BFC 誘導体が α -Syn 凝集体を標的としたイメージング

プローブとして展開できる可能性が示唆された。

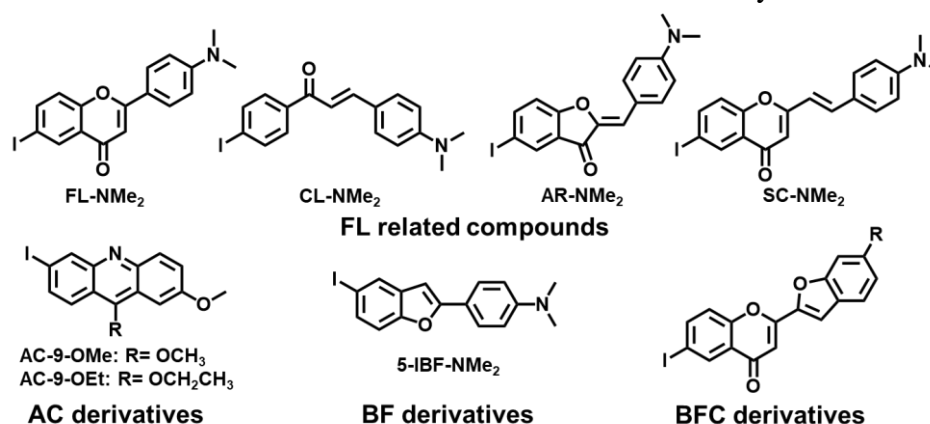


Figure 3. Chemical structures of amyloid-binding compounds evaluated as imaging probes for α -Syn aggregates.

[結論]

本研究にて、 PrP^{Sc} を標的としたイメージングプローブの開発を試みたところ、BFC 誘導体は PrP^{Sc} への良好な結合性と脳内挙動を示した。さらに、 $[^{123/125}I]\text{BFC-OMe}$ を用いて mBSE 感染マウスの脳内挙動を評価した結果、脳/血液比は mock 感染マウスと比較して有意に高かった。 α -Syn 凝集体を標的としたイメージングプローブの開発を試みたところ、分子骨格の異なる候補化合物のうち、BFC 誘導体が最も α -Syn 凝集体へ良好な結合性を示した。以上の結果より、BFC 誘導体は、 PrP^{Sc} および α -Syn 凝集体を標的としたイメージングプローブとして機能し得ることが示された。

[基礎となった学術論文]

1. Nakaie M., Katayama F., Nakagaki T., Kawasaki M., Yoshida S., Toriba A., Ogawa K., Nishida N., Nakayama M., Fuchigami T. Synthesis and characterization of hydroxyethylamino- and pyridyl- substituted 2-vinyl chromone derivatives for detection of cerebral abnormal prion protein deposits. *Chem. Pharm. Bull.*, in press.