

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293273

研究課題名(和文)アルツハイマー病の早期診断用シナプス前コリン作動性神経分子イメージング剤の開発

研究課題名(英文)The development of the presynaptic cholinergic nerve molecules imaging agent for early diagnosis of Alzheimer's disease

研究代表者

柴 和弘 (Shiba, Kazuhiro)

金沢大学・学際科学実験センター・教授

研究者番号：40143929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の早期診断、重症度診断および治療効果判定が可能なPET用のポジトロン核種標識分子イメージング剤の開発を目指し、アルツハイマー病の認知障害と関係が深いコリン作動性神経の神経伝達系の前シナプスに存在するアセチルコリントランスポーター(VAChT)の変化を可視化定量するPET用分子イメージングプローブの開発を検討した。その結果、ベサミコールにデカリン骨格を導入したデカリンベサミコールのオルト位に $[^{11}\text{C}]$ メチル基や $^{77}\text{Br}$ 基を導入した $[^{11}\text{C}]\text{OMDV}$ や $[^{77}\text{Br}]\text{OBDV}$ がPET用VAChTイメージング剤として、優れていることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study is to develop a novel PET imaging agent for early diagnosis of Alzheimer's disease, a severity diagnosis and an effect of treatment judgment. We targeted the acetylcholine transporter(VAChT) which exist in pre-synapse in cholinergic nerve system, which is related to the cognitive impairment of Alzheimer's disease. We newly synthesized (-)-o- $[^{11}\text{C}]$ methyl-trans-decalinvesamicol((-)- $[^{11}\text{C}]\text{OMDV}$ ) and o- $[^{77}\text{Br}]\text{Bromo-trans-decalinvesamicol}$  ( $[^{77}\text{Br}]\text{OBDV}$ ). (-)- $[^{11}\text{C}]\text{OMDV}$  and  $[^{77}\text{Br}]\text{OBDV}$  showed a high binding affinity and selectivity for VAChT. In vivo studies demonstrated  $[^{11}\text{C}]\text{OMDV}$  and  $[^{77}\text{Br}]\text{OBDV}$  passage through the blood-brain barrier (BBB) and accumulation in the rat brain. The regional brain distribution of them was accordance with the density distribution of VAChT in brain. These results showed (-)- $[^{11}\text{C}]\text{OMDV}$  and  $[^{77}\text{Br}]\text{OBDV}$  bound selectively to VAChT in vivo. (-)- $[^{11}\text{C}]\text{OMDV}$  and  $[^{77}\text{Br}]\text{OBDV}$  was suggested to be useful as a VAChT imaging agent for PET.

研究分野：放射性医薬品化学

キーワード：アセチルコリントランスポーター アルツハイマー病 早期診断薬 分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

認知症は介護から入院そして死に至るまで何年も経過することから、その人的・金銭的負担は莫大なものである。特に、認知症の原因の第1位であるアルツハイマー病(AD)の予防並びに早期診断・治療による症状の軽減化・進行度遅延が大変重要になってくる。さらに、今後根本的治療が開発された場合の客観的な治療効果判定も重要となってくる。ADの客観的な診断として、ADの病理学的変化や神経化学的变化を鋭敏に捉える放射性核種標識分子イメージング剤の開発が注目されている。ADの病理学的変化として、アミロイド(A $\beta$ )の蓄積を可視化する[18F]標識A $\beta$ イメージング剤がAD診断薬として承認され、注目を集めている。しかし、その集積は初期のAD患者だけでなく健常者にも見られることから、ADの認知・記憶障害等の主要症状と必ずしも相関しない(Neurobiology of Aging, 2010;31:1275)。また、A $\beta$ 免疫療法により、脳内のA $\beta$ を除去した患者でも症状の改善は見られなかった(Lancet 2008;372:216)。このことから、A $\beta$ の蓄積変化はADの治療効果判定のための指標にはならないなど、まだ多くの課題が残されている。そこで、ADの主要症状と関係がある神経系の神経化学的变化を鋭敏に捉える放射性核種標識分子イメージング剤の開発が重要である。

ADの神経化学的变化としては認知機能と関係が深いコリン作動性神経系が注目されており、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬(ドネペジル)が治療薬として承認されている。また、早期診断や認知症状と関連した変化が見られることから認知症状の進行度診断、さらに根本治療が開発された場合の治療効果判定の指標として有力である。これまでに、コリン作動性神経系ではシナプス前終末部の変化が早い段階から大きいとされ、シナプス前終末部のシナプス小胞膜に存在するアセチルコリントランスポーター(VAChT)を画像化する分子イメージング剤の研究が世界中で数多くされている。我々もSPECT用の(-)-[<sup>123</sup>I]mIV、(-)-[<sup>123</sup>I]oIV、[<sup>123</sup>I]OIDV及びPET用の(-)-[<sup>11</sup>C]OMVを開発し、その有用性を報告してきた。しかし、これまでに世界中で報告されてきたほとんど化合物はVAChTだけでなくシグマ受容体( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ )にも親和性を有するものや脳への集積性が低いものなどVAChTイメージング剤として、臨床応用するにはまだ不十分である。そこで、VAChTに対して高い親和性かつ高い選択性を有し、脳への高い集積性を併せ持つ新たなVAChTイメージング剤の開発が必要である。それにより、症状が見られないA $\beta$ イメージングでA $\beta$ 陽性となった患者について、今後主要症状が現れる可能性に関する予防的診断ならびに主要症状の重症度を客観的に判定する重症度診断が可能となると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究ではVAChTに対する高い親和性及び選択性を兼ね備えた新しい放射性核種標識VAChT分子イメージング剤の開発を目指し、アルツハイマー病の客観的早期診断及び重症度診断及び将来的な治療指針予測の可能性について検討する。

我々はこれまでに、開発してきたVAChT分子イメージング剤として、デカリン骨格を有するベサミコール類似体であるSPECT用の[<sup>123</sup>I]OIDVがVAChT親和性及び選択性に優れていた。そこで、今回、VAChT親和性及び選択性に優れたPET用のVAChTイメージング剤の開発を検討した。

## 3. 研究の方法

デカリン骨格を有するOIDVのヨウ素をメチル基に代えた*o*-methyl-*trans*-decalin-vesamicol (OMDV)の合成を検討し、さらに、OMDVを(-)-OMDVと(+)-OMDVに光学分割し、それぞれの*in vitro*でのVAChT親和性及び受容体( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ )親和性を調べる。次に、(-)-[<sup>11</sup>C]OMDVと(+)-[<sup>11</sup>C]OMDVを標識合成するために、それぞれの標識前駆体であるスズメチル体((-)-OTDV, (+)-OTDV)を用いて検討した。(-)-[<sup>11</sup>C]OMDVと(+)-[<sup>11</sup>C]OMDVの*in vivo*評価を行うため、脳内分布実験や薬物阻害実験およびPET撮像実験を行い、PET用VAChTイメージング剤としての有用性を調べた。

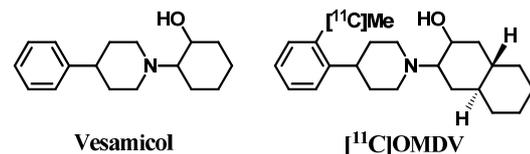
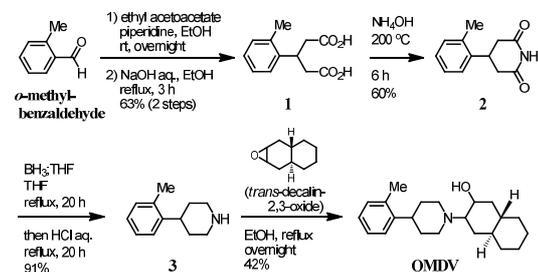


Figure 1. Vesamicol and [<sup>11</sup>C]OMDV

### 3-1) OMDVの合成

*o*-bromobenzaldehydeを出発原料とし、既報の合成経路に従って、ラセミ体OMDV((+/-)-OMDV)を合成した(Scheme 1)。



Scheme 1. Synthesis of OMDV

### 3-2) OMDVの光学分割

合成したラセミ体OMDVをCHIRAL PAK IAカラムを用いたHPLCにより、立体異性体分離を行った。移動相にはヘキサン：ジクロロメタン：ジエチルアミンの80：20：0.1の混合溶媒を用いた。カラム温度は40、流

速は 1.9 mL/min とし、UV は吸収波長 230 nm で測定した。

### 3-3) 光学異性体 OMDV の旋光度測定

HPLC により、光学分割した(-)-OMDV 及び (+)-OMDV のクロロホルム (スペクトル用、ナカライテスク)溶液 (20 mg / mL)を調製し、旋光計 (P-2200, 日本分光(株))で測定し、比旋光度を求めた。

### 3-4) *In vitro* 評価

(-)-OMDV 及び(+)-OMDV の VACHT 親和性及びシグマ受容体 ( $\sigma_1$ ,  $\sigma_2$ ) 親和性を調べるために *in vitro* 薬物阻害実験を行った。

#### ラット脳・肝臓組織の試料調製

S-Dラット脳及び肝臓ホモジナイズの核分画を取り除いた後、超遠心機(55,000×g、60分間)により、シナプスを多く含む P2,P3 分画を得た。

#### VACHT, シグマ受容体親和性

ラジオリガンドとして、VACHT 親和性用に 10nM [ $^3$ H]vesamicol、 $\sigma_1$  受容体用に 5nM [ $^3$ H]pentazocine、 $\sigma_2$  受容体用に 5nM [ $^3$ H]DTG を用いた。(-)-OMDV 及び (+)-OMDV 含む調査薬物は  $10^{-5}$  ~  $10^{-10}$ M の 10 種類の濃度で調べた。反応は 37 °C で行い、反応時間は VACHT で 60 分、シグマ受容体で 90 分とした。データはグラフパッドソフトにより行い、親和性の強さを  $K_i$  値で評価した。

### 3-5) *In vivo* 評価

#### *In vivo* 脳内分布実験

S-D ラット (8 週齢, 雄)に(-)-[ $^{11}$ C]OMDV と(+)-[ $^{11}$ C]OMDV (37 MBq / 0.4 mL 5 %エタノール生理食塩水)を尾静脈内投与した。投与後 2 分、10 分、30 分、60 分において、ジエチルエーテル麻酔下で屠殺、断頭し、血液を採取後、脳各部位 (大脳皮質、線条体、小脳、その他脳)を摘出し、それぞれ重量と放射能を測定し、% ID / g を算出した。

#### *In vivo* 薬物阻害実験

S-D ラット (8 週齢, 雄)に(-)-[ $^{11}$ C]OMDV と(+)-[ $^{11}$ C]OMDV (6 MBq / 0.4 mL 5 %エタノール生理食塩水)と 3 種の阻害剤: (+/-)-vesamicol, (+)-pentazocine, (+)-3-PPP (0.125  $\mu$ mol)をそれぞれ尾静脈内投与した。投与後 30 分、ジエチルエーテル麻酔下で屠殺、断頭し、血液を採取後、脳各部位 (大脳皮質、線条体、小脳、その他脳)を摘出し、それぞれ重量と放射能を測定し、% ID / g を算出した。

#### PET-CT 撮像実験

S-D ラット (8 週齢, 雄)に(-)-[ $^{11}$ C]OMDV (22 MBq / 0.4 mL 5 %エタノール生理食塩水)を尾静脈内投与した control ラット脳と (-)-[ $^{11}$ C]OMDV (33 MBq / 0.4 mL 5 %エタノール生理食塩水 + 0.125  $\mu$ mol (+/-)-vesamicol)を

尾静脈内投与した阻害剤(+/-)-vesamicol 投与ラット脳について、投与後 40 分間、PET-CT (FX3000 Pre-Clinical Imaging System, Gamma Medica-Ideas, Inc. U.S.A.)を用いて撮像した。撮像後に、脳各部位の関心領域(ROI)を設定し、SUV を求めた。

## 4. 研究成果

### 4-1) 合成

各反応の収率は、ジカルボン酸 1 は 2 工程 63%、イミド体 2 は 60%、ピペリジン体 3 は 91%、OMDV は 42%であった。以上より、5 工程、通算収率 14%で目的とする OMDV を合成した。

### 4-2) 光学分割

HPLC により得られたチャートを Figure 2 に示す。2.2 で記載した条件で光学分割を行い、23 分前後で 2 つに分かれたピークをそれぞれ分取することが出来た。

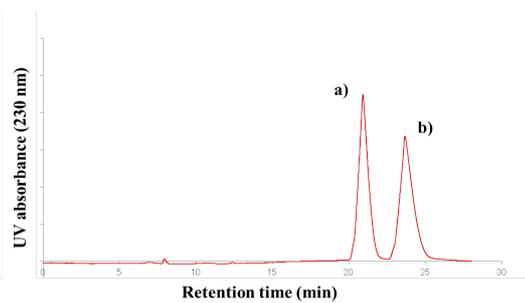


Figure 2. Optical resolution of (+/-)-OMDV

a) (-)-OMDV, b) (+)-OMDV

Column ; CHIRALPAK IA(DAICEL) 5  $\mu$ m, 10 × 250 mm

Mobile phase ; Hexane / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / Et<sub>2</sub>NH = 80 / 20 / 0.1

Flow rate ; 1.9 mL / min

Temperature ; 30

UV wavelength ; 230 nm

### 4-3) 旋光度測定

比旋光度は、ピーク a) : -17.88 (c=1.67,CHCl<sub>3</sub>) ピーク b) : +18.97 (c=2.08,CHCl<sub>3</sub>)であった。従って、ピーク a) が (-)-OMDV、ピーク b)が(+)-OMDV であることが判明した。

### 4-4) *In vitro* 結合置換実験

光学分割により得られた (-)-OMDV、(+)-OMDV のそれぞれの VACHT に対する親和性、及び選択性を調べた。VACHT 選択性は、 $\sigma$  受容体親和性を調べることで評価した。結果を Table 1 に示す。(-)-[ $^3$ H]vesamicol は 7.4 nM、(+)-[ $^3$ H]pentazocine は 19.9 nM、[ $^3$ H]DTG は 22.3 nM として、阻害定数  $K_i$  を算出した。(+)Pentazocine、及び DTG は、 $\sigma$  受容体親和性の標準試薬として用いた。(-)-OMDV は (+)-OMDV に比べて、5 倍の VACHT 親和性を示した。また選択性を見ると、(-)-OMDV の

VACHT 親和性は、 $\sigma$  受容体 ( $\sigma$ -1,  $\sigma$ -2) 親和性に比べて、それぞれ約 7.3 倍, 4.3 倍高い値を示した。一方、(+)-OMDV の値は、それぞれ約 3.2 倍, 2.5 倍であったことから、(-)-OMDV の方が VACHT 親和性、及び選択性に優れていることが明らかとなった。

**Table 1. Binding affinities of DADT analogs and  $\sigma$ -ligands for VACHT and  $\sigma$  receptors.**

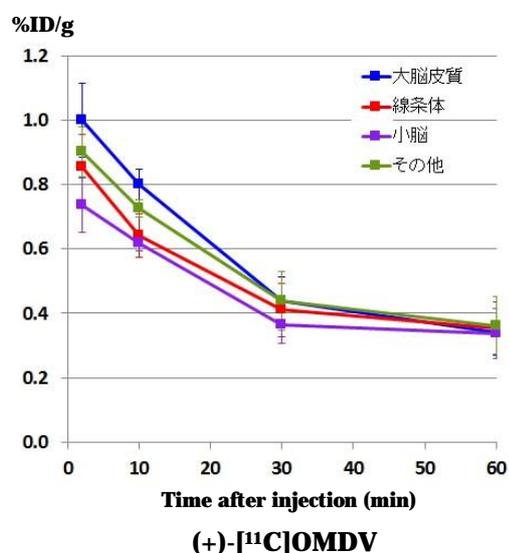
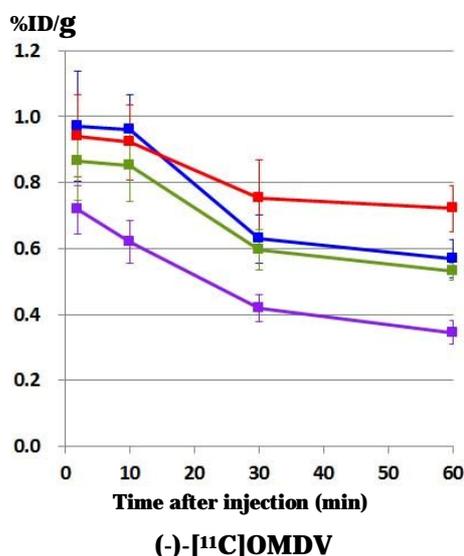
	$K_i$ (nM)		
	VACHT	$\sigma$ -1	$\sigma$ -2
(-)-OMDV	10.2 ± 5.2	74.5 ± 2.7	43.4 ± 2.4
(+)-OMDV	51.0 ± 7.8	164.0 ± 29.5	128.6 ± 35.5
DV	6.8 ± 3.6	94.2 ± 21.3	77.7 ± 1.0
(+/-)-Vesamicol	28.8 ± 3.8	24.3 ± 3.4	93.7 ± 25.6
(+)-Pentazocine	-	13.0 ± 4.2	2657.6 ± 1183.8
DTG	-	103.5 ± 17.4	48.6 ± 6.4

#### 4-5) [<sup>11</sup>C]標識

それぞれの OMDV エナンチオマーを [<sup>11</sup>C] 標識し、(-)-[<sup>11</sup>C]OMDV、及び(+)-[<sup>11</sup>C]OMDV を得た。(-)-[<sup>11</sup>C]OMDV は放射化学的収率 ([<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> から起算) : 28%、放射化学的純度 : > 99%、(+)-[<sup>11</sup>C]OMDV は放射化学的収率 ([<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub> から起算) : 22%、放射化学的純度 : > 99% でそれぞれ合成した。

#### 4-6) *In vivo* 脳内分布

大脳皮質で(-)-[<sup>11</sup>C]OMDV、(+)-[<sup>11</sup>C]OMDV 共に投与後 2 分で約 1.0% ID / g 脳に集積していることが確認でき、血液脳関門 (BBB) を通過することが分かった。また、血液における集積は(-)体、及び(+)-体共に、投与後 2 分の時点で約 0.1% ID / g を示し、既に低下していることが判明した。脳における経時変化を Figure 3 に示す。(-)体の方が(+)-体と比べ、クリアランスの速度が遅いことが分かった。血液や各種臓器において大きな違いは見られなかったが、腎臓においては(+)-体の方が、(-)体よりも早くクリアランスされることが分かった。



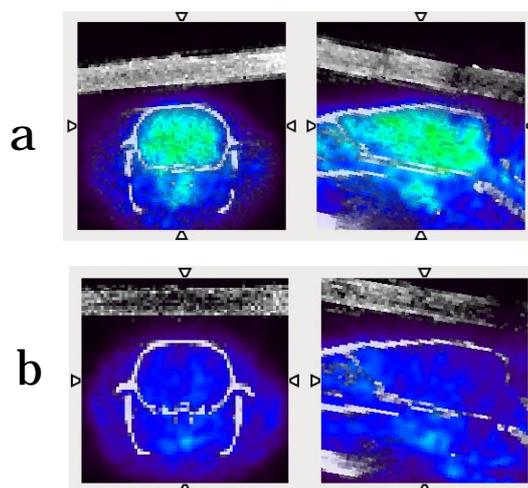
**Figure 3. Regional brain distribution in rat brain.**

#### 4-7) *In vivo* 薬物阻害実験

VACHT リガンド(+/-)-vesamicol の同時投与により、(-)-[<sup>11</sup>C]OMDV の脳への集積は脳各部位で約 60 % に阻害され、有意に低下した。一方、 $\sigma$  受容体リガンドである(+)-pentazocine や 受容体リガンドである(+)-3-PPP の同時投与では、(-)-[<sup>11</sup>C]OMDV 集積に有意な阻害効果は見られなかった。

#### 4-8) PET-CT 撮像

(-)-[<sup>11</sup>C]OMDV を投与したラット脳内の PET-CT 画像を Figure 4 に示す。control ラット脳内に(-)-[<sup>11</sup>C]OMDV が集積していることが確認出来た。一方、阻害剤(+/-)-vesamicol 投与ラット脳内では、control ラット脳内と比べて明らかな阻害効果が見られた。SUV を見ると、control ラット脳内では、投与 15



**Figure 4. The rat brain images of (-)-[<sup>11</sup>C]OMDV (a) and (-)-[<sup>11</sup>C]OMDV with 0.125  $\mu$ mol (+/-)-vesamicol (b) by PET-CT.**

分後から撮像終了時点まで、the standardized uptake value (SUV) が 0.3 付近でほぼ一定であ

った。一方、阻害剤(+/-)-vesamicol 投与ラット脳内では、投与2分後から撮像終了時点まで、低下傾向が継続した。

以上の結果より、(-)-<sup>11</sup>C]OMDV が生体内で、高い VAcHT 親和性、及び選択性を有し、PET-CT による VAcHT イメージングにも成功したことから、(-)-<sup>11</sup>C]OMDV が PET 用 VAcHT イメージング剤として、高い可能性を有していることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Yoji Kitamura, Takashi Kozaka, Daisuke Miwa, Izumi Uno, Mohammad Anwar-ul Azim, Kazuma Ogawa, Junichi Taki, Seigo Kinuya and Kazuhiro Shiba. Synthesis and evaluation of a new vesamicol analog o-<sup>11</sup>C]methyl-trans-decalinvesamicol as a PET ligand for the vesicular acetylcholine transporter. *Ann. Nucl. Med.* (2016), 30:122-129. DOI 10.1007/s12149-015-1039-6.
2. Izumi Uno, Takashi Kozaka, Daisuke Miwa, Yoji Kitamura, Azim Mohammad Anwar-ul, Kazuma Ogawa, Junichi Taki, Seigo Kinuya and Kazuhiro Shiba. In vivo differences between two optical isomers of radioiodinated o-iodo-trans-decalinvesamicol for use as a radioligand for the vesicular acetylcholine transporter. *PLOS ONE* 11(1) (2016) January 11. DOI:10.1371/journal.pone.0146719
3. Mohammad Anwar-ul Azim, Takashi Kozaka, Izumi Uno, Daisuke Miwa, Yoji Kitamura, Kazuma Ogawa, Akira Makino, Yasushi Kiyono, Kazuhiro Shiba. The Potential of The Vesicular Acetylcholine Transporter (VAcHT) Imaging Using Radiolabeled o-Bromo-trans-decalin vesamicol (OBDV) as a New PET Ligand. *Synapse.* (2014). 68, 445-453. October.

[学会発表](計 6 件)

1. Azim MA, Kozaka T, Uno I, Miwa D, Kitamura Y, Shiba K. In vitro evaluation meta-bromo benzovesamicol as PET VAcHT imaging Probe. The 2nd Asian Nuclear Medicine Academic Forum (2016),(ANMAF 2016) May 5yh-8th, Shanghai, China.
2. 柴 和弘 : 講演 : 脳神経機能疾患と in vivo 分子イメージング 核化学夏の学校 (和倉温泉 大観荘 七尾市) 2015 年 8 月 29 日 ~ 31 日
3. 小阪孝史, 茂野泰貴, 三輪大輔, 北村陽二, Mohammad A. Azim, 小川数馬, 川井恵一, 柴 和弘. 光学活性体

(-)-<sup>11</sup>C]OMDV の VAcHT イメージング剤としての評価, 日本薬学会第 135 年会 (神戸学院大学、神戸) 2015 年 3 月 25 - 28 日

4. 柴 和弘 : SPECT/PET 用脳神経機能分子イメージングプローブの開発 平成 27 年度放射線取扱講習会 特別講演 (岡山大学 自然生命科学研究支援センター 岡山) 2015 年 3 月 4 日
5. 三輪大輔, 小阪孝史, 北村陽二, Mohammad A. Azim, 黒宮里紗, 緩詰沙耶, 小川数馬, 川井恵一, 柴 和弘, PET 用イメージング剤<sup>11</sup>C]OMDV の光学分割と動態評価, 第 54 回日本核医学会学術総会 (大阪国際会議場、大阪) 2014 年 11 月 6 日 ~ 8 日
6. Mohammad Anwar-ul Azim, Takashi Kozaka, Izumi Uno, Daisuke Miwa, Yoji Kitamura, Kazuma Ogawa, Keiichi Kawai, Yasushi Kiyono, Kazuhiro Shiba. Introduction of radiobromine labeled decalinvesamicol analogue as a new and promising PET vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) imaging probe. 2014 SNMMI 61th annual meeting. June 7-11, (2014), Louis Convention Center, St. Louis. USA

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴 和弘 (SHIBA KAZUHIRO)  
金沢大学・学際科学実験センター・教授  
研究者番号 : 4 0 1 4 3 9 2 9

(2) 研究分担者

北村 陽二 (KITAMURA YOJI)  
金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
研究者番号 : 1 0 3 6 8 4 8 3

小阪 孝史 (KOZAKA TAKASHI)  
金沢大学・学際科学実験センター・助教  
研究者番号 : 5 0 5 7 9 8 3 6