

長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

脳内移行性とターゲット特異性を賦活したタウ蛋白質凝集阻害作用を有する
カテコール誘導体の開発（29-37）

主任研究者 池沼 宏 国立長寿医療研究センター 研究技術員(役職名)

研究要旨

3年間全体について

アルツハイマー病は高齢者の認知症における主要な原因である。アルツハイマー病の進行に関与するタウ蛋白質凝集の阻害を目的とする薬剤開発において、高島らは *in vitro* スクリーニングよりカテコール系化合物にタウ蛋白質凝集阻害作用を見出し、その中でも脳内移行性を有する D/L-イソプロテレノールがマウスの *in vivo* 試験において神経細胞脱落抑制作用を有することを見出した。本研究では、臨床 PET イメージングに向けて、¹¹C 標識 D/L-イソプロテレノール合成の実用的合成法の確立を行った。また、D/L-イソプロテレノールの化学構造を素に優れた脳透過性の向上を目指したカテコール誘導体を新規に設計・合成し、鈴木らにより独自に開発された高速 *G*-[¹¹C]メチル化あるいは高速 *G*-[¹⁸F]フルオロメチル化等を適用して PET プローブ化し脳透過性を小動物 PET イメージングで評価した。その結果、薬物濃度時間曲線における初期ピーク値は同程度であったものの、カテコール誘導体の薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) は D/L-[¹¹C]イソプロテレノールより増大することを確認した。

誘導体がタウ凝集抑制能を有し、AUC の増加が誘導体の脳移行性向上によるものであることを確認するにはさらなる検討が必要である。

2019年度について

鈴木らにより独自に開発された高速 *G*-[¹¹C]メチル化あるいは高速 *G*-[¹⁸F]フルオロメチル化等を適用して、D/L-イソプロテレノールの化学構造を素に脳移行性の向上を目指した新規カテコール誘導体を PET プローブ化し、脳透過性を PET イメージングで評価した。薬物濃度時間曲線における初期ピーク値は同程度であったものの、カテコール誘導体の薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) は D/L-[¹¹C]イソプロテレノールより増大することを確認した。

主任研究者

池沼 宏 国立長寿医療研究センター 研究技術員（役職名）

分担研究者

なし

研究期間 2017年4月1日～2020年3月31日

A. 研究目的

アルツハイマー病患者の脳の主要な病理学的所見として、アミロイドベータ(A β)が沈着して形成される「老人斑」と、過リン酸化タウ蛋白の沈着による「神経原繊維変化」が認められる。これまで、A β がアルツハイマー病発症の引き金となるとの考え（アミロイド仮説）のもと低分子薬剤および抗体医薬の開発が行なわれてきたが、未だ有効な医薬は出現していない。一方、細胞外A β 凝集体刺激で活性化されたGSK-3 β 等が、微小管を形成するタウ蛋白質の過剰リン酸化を促進し、その結果生じるタウモノマーが凝集し、タウオリゴマーや顆粒状タウ凝集体によりシナプス消失や神経脱落を引き起こす。高島らは、化合物ライブラリーからタウの凝集を抑制する化合物を*in vitro*スクリーニングし、ドーパミンやアドレナリンなどのカテコール構造含有化合物およびその酸化物である o -キノン体にタウ凝集抑制効果があることを見いだした。さらにそれらの化合物の中で、血液脳関門透過性があるとされるD/L-イソプロテレノールを、過剰リン酸化タウ発現マウスに投与し、不溶性タウ量の減少効果と神経細胞数の低下の抑制効果があることを見いだした。また、このD/L-イソプロテレノールのタウ凝集抑制作用は、 β アドレナリン受容体のアゴニストとしての作用とは関係がなく、その酸化代謝物の o -キノン体が関与し、タウ蛋白を構成するシステイン残基による共役付加反応に基づくS-S結合の形成阻害によるものと推定されている。

D/L-イソプロテレノールを、タウ凝集抑制を目的とした薬として開発する過程においては、その脳内移行性をヒトに対して明らかにする必要がある。陽電子断層画像撮影法（PET）による画像化では、陽電子放出核種で標識したトレーサーの使用のもと、小動物からヒトまで含めた生体での薬剤の体内動態や、標的部位である脳への移行性が評価できる。まず、D/L-イソプロテレノールの ^{11}C 標識PETトレーサーを製造するために、申請者らはこれまでに ^{11}C 標識化アセトンとノルアドレナリンを用いた還元的アミノ化反応による基本的な製造法を確立した（分子イメージング国際会議（WMIC-2016, WMIC-2017, WMIC-2018）で発表及び、特許出願済み）。本研究では、小動物のPETイメージングへの展開および上記合成法をヒト臨床試験への実用的プロトコールとしての最適化を図る。さらに、より高い脳内移行

性を示すタウ蛋白凝集抑制剤の開発と ^{11}C 及び ^{18}F 陽電子放出核種による標識化への展開を図る（脳移行に最適な脂溶性要件は $\log P=2\sim 3$ と言われている。D/L-イソプロテレノールの $\log P$ 値は 0.94）。

B. 研究方法

3年間全体について

本研究は3年間を予定し、主にPET分子イメージング技術を機軸とする創薬研究の展開のために、タウ蛋白凝集阻害作用を示すイソプロテレノールのPETプローブ化および小動物イメージングを行う。特に、 ^{11}C 標識D/L-イソプロテレノールに関しては、ヒト臨床試験へ応用可能なPETプローブの製剤化を目指す。さらに脳移行性の向上を目指した分子設計およびPETプローブ化を展開する。

2019年度について

脳移行性を向上させるため新規に設計したD/L-イソプロテレノールのカテコール誘導体の $\text{C}-[^{11}\text{C}]$ メチル化あるいは高速 $\text{C}-[^{18}\text{F}]$ フルオロメチル化及び製剤化を行い、小動物PETを実施する。

（倫理面への配慮）

国立長寿医療研究センターでは、マウスを扱う動物実験および放射線を用いるPETを応用することから、同センターの動物倫理委員会の承認の下、動物実験指針（飼育、麻酔、実験方法、動物の苦痛軽減、排除の方法等）を順守しながら行った。さらに「動物愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験などの実施に関する基本指針」、「動物実験等の適切な実施に向けたガイドライン」、「動物処分方法に関する指針」等、関連規則を遵守し、生命倫理・安全対策に十分配慮して、研究を実施した。また、放射性化合物を扱うPETプローブの合成とイメージング実験は、同センターのRI管理者の指導のもとに、「電離放射線障害防止規制」等の関連規則を遵守し、適切な防護、遮蔽等の安全対策を行い実施した。

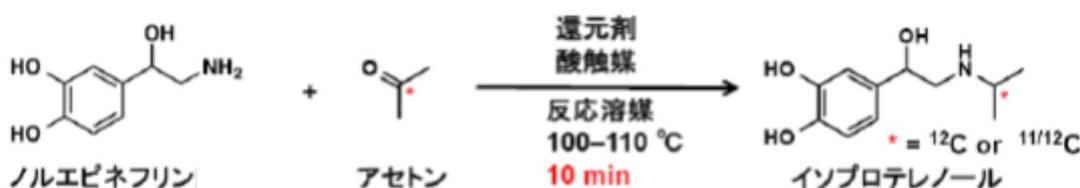
C. 研究結果

3年間全体について

A: D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノールの実用的合成方法の確立に関して

D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノールを用いて、PETイメージングによる脳内動態評価を行う

ためには、高品質な製剤が求められる。これを達成する要件の中でも、高い総放射エネルギーを有した製剤化は、投与可能な容量の限られる小動物の PET イメージング、品質検査に時間を要する臨床 PET イメージングには欠かせない。還元的アルキル化反応の反応率は、製剤の総放射エネルギーに直結するため、標識前駆体であるノルエピネフリンと単離した[2-¹¹C]アセトンとの還元的アルキル化反応の最適な反応条件を、使用する還元剤と酸触媒の選択によって検討した。以下に、還元的アルキル化反応の反応式(図1)及び、還元剤及び酸触媒の組み合わせによる[2-¹¹C]アセトンに基づいた反応率(表1)を、陽電子放出核種を用いない系、用いた系それぞれの結果を表にまとめた。



(図1) 還元的アルキル化反応の反応式

放射能非使用下: [ノルエピネフリン]/[アセトン]/[還元剤]/[酸触媒] = 40:1:1:40 (モル比) 反応温度 110 °C
 放射能使用下: [ノルエピネフリン]/[還元剤]/[酸触媒] = 1:1:2 (モル比) 反応温度 100 °C

Entry	酸触媒 (pK _a)	収率 (%) ^a		放射化学的収率 (%) ^b	
		NaBH ₃ CN in ethylene glycol (放射能非使用下)	NaBH(OAc) ₃ in DMF (放射能非使用下)	NaBH ₃ CN in ethylene glycol (放射能使用下)	NaBH(OAc) ₃ in DMSO/DMF (放射能使用下)
1	酢酸 (4.76)	87 (90)	76 (70)	75	75
2	安息香酸 (4.20)	98 (93)	88 (89)	72	86
3	p-TFMBA (3.69)	95 (89)	80 (60)	59	79
4	DL-酒石酸 (3.03)	84 (61)	66 (19)	-	-
5	塩化水素 (-0.8)	33/57	-	57	-

^a ()内の数値はノルエピネフリンに対して2当量の酸触媒を使用した際の収率

^b 反応混合液のラジオHPLC分析収率による

p-TFMBA: p-trifluoromethylbenzoic acid

(表1) 還元剤及び酸触媒の組み合わせによる[2-¹¹C]アセトンに基づいた反応率

結果、安息香酸/NaBH(OAc)₃/DMSO/DMF の組み合わせが、高い反応率を達成するために特に有効であることが判明した。またこの結果は、陽電子放出核種使用・非使用の系で一致した結果が認められた。さらに、還元剤に NaBH₃CN を使用した場合、陽電子放出核種を用いない系では高収率である一方、陽電子放出核種を用いた系では想定される収率に届かないという結果も得られた。還元剤である NaBH₃CN は反応性が高い一方、

酸触媒によって分解されやすく、陽電子放出核種を用いた系では、 $[2-^{11}\text{C}]$ アセトン合成中に酸触媒/ NaBH_3CN /ethylene glycol の混合液中で失活している可能性がある。陽電子放出核種を用いた系における実用的な合成法の確立には、より酸に安定な還元剤、 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ を使用した系である安息香酸/ $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ /DMSO/DMF の組み合わせを使用することが適切と考えられた。

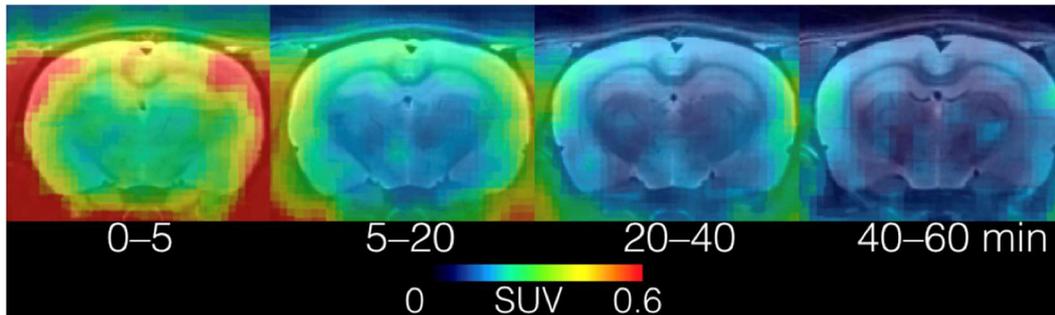
また、D/L-イソプロテレノールは β アドレナリン受容体作動薬であり、 $0.5\ \mu\text{g}$ 程度の極少量のボラス投与でも自覚症状を伴い、安静時の脈拍をわずかに増加(3 拍/分)させる(Khalsa *et al.*)。従って、D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノール製剤は、ヒト臨床試験における PET 撮像に適切な放射能を有する投与量において、D/L-イソプロテレノールの薬理作用が軽微となる、高い比放射能を有することが望ましい。半減期約 20 分の放射性核種 ^{11}C の減衰によって比放射能は低下することから、製剤化までに要する時間の短縮が、比放射能向上に有効である。そこで、反応後混合液から HPLC を用いた単離精製に要する時間の短縮に取り組み、10 分程度で単離可能な条件を見出した。その結果、 $100\ \text{GBq}/\mu\text{mol}$ の高い比放射能を有した D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノールを、約 $2\ \text{GBq}$ という臨床投与に十分な放射能で製剤化することができた(表 2)。臨床投与前に実施する品質試験に 20 分要すると仮定した場合、想定される D/L-イソプロテレノールの臨床投与量は $0.78\ \mu\text{g}$ ($185\ \text{MBq}$) であり、脈拍をわずかに増加させる程度の少ない投与量に抑えることが可能であると考えられる。

D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノール製剤 (サイクロトロン照射 : $20\ \mu\text{A} \times 40\ \text{min}$)	
総放射能	1.91 GBq
減衰補正収率	16%
放射化学純度	>99%
比放射能	99.5 GBq/ μmol
合成時間	53 min

(表 2) 製剤化された D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノール

B: D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノール製剤を用いた小動物 PET イメージングに関して

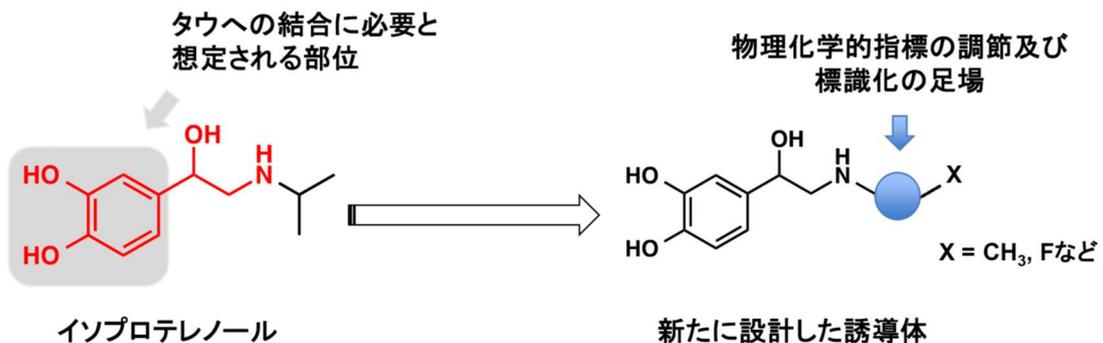
関連する研究課題である「認知症の新規診断・治療薬の薬物動態評価のための PET first-in-human 試験(29-29)」において、本研究課題によって製剤化された D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノールの小動物 PET 撮像、および、血液・血漿中放射能濃度の推移の測定、さらに経時的な放射性代謝物分析が実施された。その結果、本製剤は小動物 PET イメージングに供するためには十分な品質を有していることが明らかになり(図 2)、本製剤によって、D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノールの脳移行性の評価として、ラットにおける脳 PET イメージング、および脳内、血漿中代謝物分析の実施を可能にした。



(図 2) D/L-[¹¹C]イソプロテレノールのラット脳 PET イメージング

C: 高い脳内移行性を指向したタウ凝集抑制カテコール誘導体の設計・合成

関連する研究課題である「認知症の新規診断・治療薬の薬物動態評価のための PET first-in-human 試験(29-29)」で明らかとなったラットにおける D/L-[¹¹C]イソプロテレノールの脳内移行性は、タウ蛋白をイメージングするための PET プローブとして不十分であった。分子量 500 以下かつ分配係数 $\log P$ が 2-3 であることが血液脳関門を通過する化合物の物理化学的指標となっている一方、D/L-イソプロテレノールは $\log P$ が 0.94 と小さい。そこで、活性部位と想定されるアミノカテコール骨格を保持したまま、より好ましい物理化学的指標を有する誘導体を設計した(図 3)。



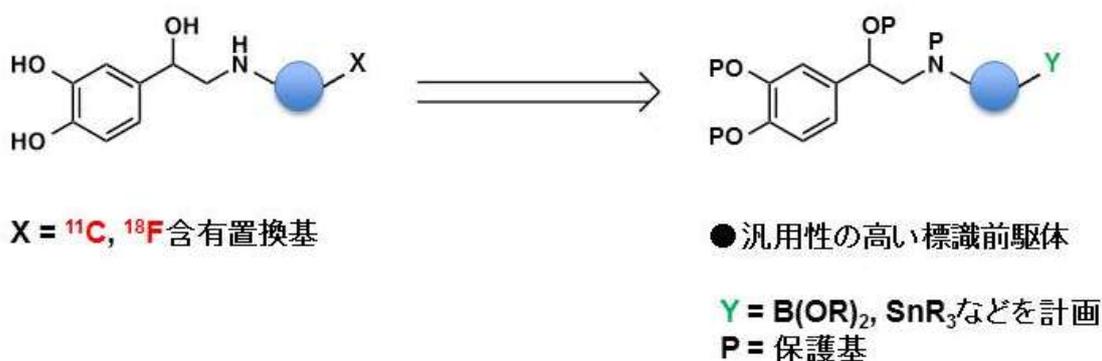
(図 3) より好ましい物理化学的指標を有する誘導体の設計

まず、HPLC 分析の標品となるメチル基あるいはフルオロ基が置換したアミノカテコール誘導体(非放射化体)の合成を試みた。

D: タウ凝集抑制カテコール誘導体の標識前駆体の設計・合成

続いて、メチル基あるいはフルオロ基が置換したアミノカテコール誘導体に対応す

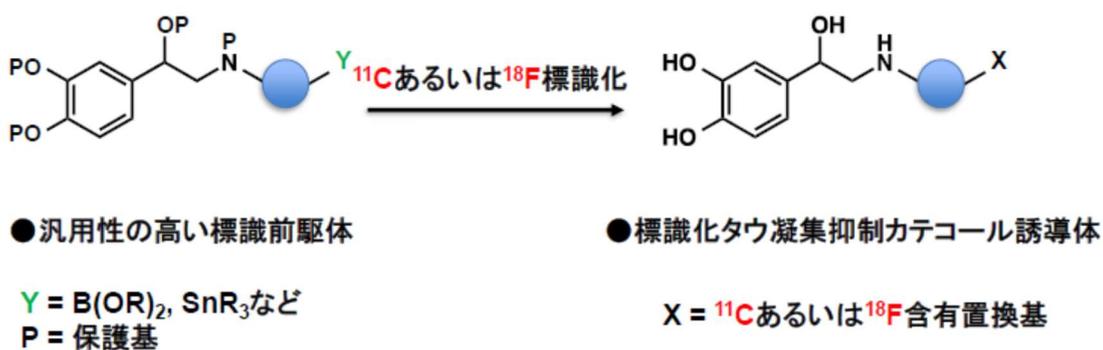
る標識用前駆体を設計し、その合成を実施した（図4）。



（図4）アミノカテコール誘導体の標識前駆体の設計

E: タウ凝集抑制アミノカテコール誘導体の ^{11}C あるいは ^{18}F 標識化と小動物 PET

上記の誘導体を対応する標識前駆体から ^{11}C あるいは ^{18}F 標識化合成を行った。



（図5）タウ凝集抑制カテコール誘導体の ^{11}C あるいは ^{18}F 標識化

標識化反応後は速やかに、HPLC を用いて標識化合成後の反応液から目的の標識化されたカテコール誘導体を単離精製し、注射剤として製剤化を行い、小動物 PET を実施した。その結果、薬物濃度時間曲線における初期ピーク値は同程度であったものの、カテコール誘導体の薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) は D/L- ^{11}C イソプロテレノールより増大していることを確認した。

2019年度について

2018年度に合成したアミノカテコール誘導体の標識前駆体を用いて、 ^{11}C あるいは ^{18}F 標識化、続く製剤化を実施した。製剤は小動物 PET に供され、画像解析によって

薬物濃度時間曲線における初期ピーク値は同程度であったものの、カテコール誘導体の薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) は D/L- ^{11}C イソプロテレノールより増大していることが判明した。

D. 考察と結論

D/L- ^{11}C イソプロテレノールに関しては、ヒトへの薬理作用が軽微である高い比放射能と、臨床投与に十分な放射エネルギーを有する製剤化までを達成することができた。関連する研究課題である「認知症の新規診断・治療薬の薬物動態評価のための PET first-in-human 試験 (29-29)」で明らかとなったラットにおける D/L- ^{11}C イソプロテレノールの脳移行性は、タウ蛋白をイメージングするための PET プローブとして不十分であった。活性部位と想定されるアミノカテコール骨格を保持したまま、適切な脂溶性を有する D/L- ^{11}C イソプロテレノールの誘導体は脳移行性の改善が見込まれた。そこで、このカテコール誘導体の設計・合成及び標識前駆体の合成を実施し、 C - ^{11}C メチル化あるいは高速 C - ^{18}F フルオロメチル化及び製剤化後に小動物 PET を実施した。その結果薬物濃度時間曲線における初期ピーク値は同程度であったものの、カテコール誘導体の薬物濃度時間曲線下面積 (AUC) は D/L- ^{11}C イソプロテレノールより増大した。

誘導体がタウ凝集抑制能を有し、AUC の増加が誘導体の脳移行性向上によるものであることを確認するにはさらなる検討が必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2017年度

なし

2018年度

なし

2019年度

1) [Ikenuma H](#), Koyama H, Kajino N, Kimura Y, Ogata A, Abe J, Kawasumi Y, Kato T, Takashima A, Ito K, Suzuki M Synthesis of (*R,S*)-isoproterenol, an inhibitor of tau aggregation, as an ^{11}C -labeled PET tracer via reductive alkylation of

(*R, S*)-norepinephrine with [2-¹¹C]acetone. Bioorg Med Chem Lett 2019 Aug
15;29(16):2107-2111

2. 学会発表

2017年度

1) 池沼宏、○古山浩子、木村泰之、阿部純一郎、川角保広、小縣綾、加藤隆司、伊藤健吾、鈴木正昭, Improved Synthesis of ¹¹C-labeled (*R, S*)-isoproterenol via reductive alkylation of (*R, S*)-norepinephrine with [2-¹¹C]acetone. 2017 World Molecular Imaging Congress, Philadelphia, USA, 9月13日～9月16日(ポスター発表、LBAP035)

2) ○池沼宏、古山浩子、木村泰之、梶野直也、阿部潤一郎、川角保広、小縣綾、加藤隆司、伊藤健吾、鈴木正昭, Synthesis of Highly-Qualified ¹¹C-Labeled (*R, S*)-Isoproterenol Aimed at a Clinical Study. 第12回アジア・オセアニア核医学会学術会議, 横浜, 10月5日～10月7日(口頭発表, BM2V II D-05)

3) ○小縣綾, 木村泰之, 池沼宏, 古山浩子, 関千江, 山田貴史, 鈴木正昭, 加藤隆司, 伊藤健吾, Brain penetration of isoproterenol as a drug of dementia measured in rats with a small animal PET. 第12回アジア・オセアニア核医学会学術会議, 横浜, 10月5日～10月7日(口頭発表, BM2V II D-06)

4) ○池沼宏, 古山浩子, 木村泰之, 梶野直也, 阿部潤一郎, 川角保広, 小縣綾, 加藤隆司, 伊藤健吾, 鈴木正昭, 臨床研究を目的とした¹¹C標識化(*R, S*)-イソプロテレノールの高効率合成法の開発, 第57回 日本核医学会学術総会, 横浜, 10月5日～10月7日(口頭発表, MM2V III B-01)

5) ○小縣綾, 木村泰之, 池沼宏, 古山浩子, 関千江, 山田貴史, 鈴木正昭, 加藤隆司, 伊藤健吾, 認知症治療薬としてのイソプレテレノールの小動物 PET を用いたラット脳内移行性の検討. 第57回 日本核医学会学術総会, 横浜, 10月5日～10月7日(口頭発表, MM3V I C-05)

6) ○梶野直也, 池沼宏, 古山浩子, 木村泰之, 阿部純一郎, 川角保広, 小縣綾, 加藤隆司, 伊藤健吾, 鈴木正昭, 還元的アルキル化反応による¹¹C標識(*R, S*)-イソプロテレノールの高効率合成. 第48回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 岐阜, 11月12日～11月13日(ポスター発表, 2PB22)

2018年度

1) ○池沼宏、古山浩子、梶野直也、木村泰之、小縣綾、阿部潤一郎、川角保広、加藤隆司、鈴木正昭、伊藤健吾, Synthesis of ¹¹C-Labeled (*R, S*)-Isoproterenol and Preclinical PET Study. 2018 World Molecular Imaging Congress, Seattle, USA, 9月12日～9月15日(ポスター発表、LBAP 097)

2019年度

1) ○池沼宏、小縣綾、木村泰之、古山浩子、阿部純一郎、山田貴史、市瀬正則、加藤

隆司、伊藤健吾、鈴木正昭、Formulation of ^{11}C -labeled (*R,S*)-isoproterenol and pharmacokinetics studies in rats. Brain & Brain PET 2019, Yokohama, Japan, 2019年7月4日～7月7日(ポスター発表、PP01-M07)

2) ○小縣綾、木村泰之、山田貴史、市瀬正則、池沼宏、阿部純一郎、古山浩子、鈴木正昭、加藤隆司、伊藤健吾、PET imaging of colony stimulating factor 1 receptor in rat brains. Brain & Brain PET 2019, Yokohama, Japan, 2019年7月4日～7月7日(口頭発表、BPS03-4)

3) ○池沼宏、タウ凝集抑制作用を認めるイソプロテレノールのマイクロドーズ試験を目指した ^{11}C -イソプロテレノールの標識化合物合成と小動物評価、第25回東海脳神経核医学研究会、名古屋、2019年9月14日(一般演題)

4) ○池沼宏、古山浩子、木村泰之、梶野直也、阿部潤一郎、川角保広、小縣綾、加藤隆司、伊藤健吾、鈴木正昭、臨床研究を目的とした ^{11}C 標識化(*R,S*)-イソプロテレノールの高効率合成法の開発。第57回日本核医学会学術総会、横浜、2017年10月5日～10月7日(口頭発表、MM2VⅢB-01)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし