

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)

研究要旨

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直結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の実用的合成法の検討を行った。具体的には、[2-¹¹C]アセトン合成法を改良し、単離精製した [2-¹¹C]アセトンとノルアドレナリンとの還元的アルキル化反応の最適化を行った。さらに、酸・塩基両性の高極性化合物である D/L-[¹¹C]イソプロテレノールの最適な HPLC 単離条件を見出すとともに、単離した D/L-[¹¹C]イソプロテレノールの安定化にも成功した。以上を連続して行った結果、高い比放射能を有した D/L-[¹¹C]イソプロテレノールを、臨床イメージングに十分な放射能量で製剤化することができた。製剤化された D/L-[¹¹C]イソプロテレノールは小動物 PET イメージングに供され、ラットでの脳移行性の評価したところ、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。今後、適切な誘導体を設計・合成し、脳内移行性の改善を行うことにより、アルツハイマー病治療薬の開発に有用で、かつ従来のタウ PET プローブと結合様式の異なる新規 PET プローブの開発が期待できる。

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)

分担研究者

なし

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「神経原線維変化」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)のもと抗体医薬の開発が行なわれたが、認知症の進行は十分には阻止できていない。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体である σ -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出した。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 σ -キノン体によるものであり、タウ蛋白を構成するシステイン残基による求核的付加反応に基づく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、その脳内移行性をヒトにおい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、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¹¹C標識PETトレーサーを製造するために、報告者らはこれまでにノルアドレナリンと¹¹C標識化アセトンを用いた還元的アルキル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, 2016年9月7-10日, New York)で発表済み、特許出願)。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、イソプロピル側鎖からベンジル側鎖への構造変換により脂溶性を増大($\log P = 2.5$)し、より高い脳内移行性を示すタウ蛋白凝集抑制剤の開発への展開を図る(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)。加えて、適度な脂溶性を持ち、かつ高い求核的付加反応を受ける酸化体への誘導も図る。

B. 研究方法

(1) 全体計画

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類のPETプローブ化および小動物イメージングを行う。特に、¹¹C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。

(2) 年度別計画

平成 29 年度

(1) ^{11}C 標識アセトンの調製と還元的アルキル化反応の連続自動合成による ^{11}C 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

^{11}C 標識イソプロテレノールは、通常の放射性前駆体である $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ から過剰量のメチルリチウムで処理して $[2-^{11}\text{C}]$ アセトン を調製し（第一反応容器）、加熱により第二反応容器内に捕獲された $[2-^{11}\text{C}]$ アセトンとノルアドレナリンとの酸性条件下還元剤添加のもと還元的アルキル化により合成した。(i)～(iv)の順に合成条件の最適化を行った。

- (i) $[2-^{11}\text{C}]$ アセトン合成法の改良： $[2-^{11}\text{C}]$ アセトン合成後に行われる $[2-^{11}\text{C}]$ アセトン移送時に、還元的アルキル化反応の進行を阻害するエーテル系溶媒が第二反応容器へ混入することを抑えるために、高沸点で吸湿性の低い代替溶媒を探索した。加えて、反応系で生じる水分子の除去に適した無攪拌条件を探った。
- (ii) 還元的アルキル化反応の最適化：還元剤の分解が緩徐かつイミン中間体形成を促進する最適な $\text{p}K_{\text{a}}$ をもつ酸触媒を、非放射化アセトンを用いて探索したのち、放射性条件で適用されるかを検証した。また、還元的アルキル化を促進し、かつ $[2-^{11}\text{C}]$ アセトンの捕獲溶媒として最適な溶媒をスクリーニングした。さらに、還元剤と反応溶媒の適切な組み合わせと適切な還元剤の量を検討し、その条件における酸触媒の必要性を検討した。また、適切な反応温度を検証した。
- (iii) 酸・塩基両性の高極性化合物に最適な HPLC 分取カラムの選択：陽イオン交換樹脂（スルホン酸あるいはカルボン酸を交換基とした樹脂）を充填したカラムの使用により、反応混合溶液から目的とする D/L-イソプロテレノールのピークが分離されることを見出し、時間短縮を兼ねた高効率溶離システムを確立した。溶離液で使用する緩衝液の pH で D/L-イソプロテレノールの溶出速度が変化するため、単離精製に適切な緩衝液を選択した。
- (iv) 単離した D/L- $[^{11}\text{C}]$ イソプロテレノールの安定化：分取 HPLC により単離した標識体の不安定なカテコール性水酸基に起因する酸化分解を完全に防ぐために、適切な酸化剤や酸でアンモニウム塩にすることにより安定で高い放射化学純度をもつ標識

体が得られるように試みた。特に、ヒト臨床に向けた PET 薬剤を目指すため、安定化のために添加可能な防酸化剤、酸の使用に留意した。

(i)～(iv)で最適化された条件を連続して行い、 ^{11}C 標識イソプロテレノールの実用的合成法を確立した。最終的にギガバクレルの高放射エネルギーおよび 99%以上の放射化学純度をもつ高品位の PET プローブの合成を達成した。

(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）を順守しながら行う。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、研究を実施する。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する。

C. 研究結果

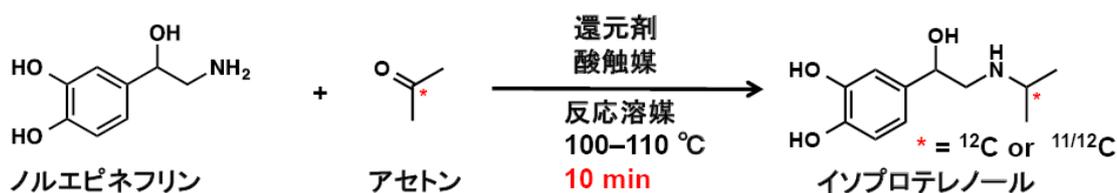
本研究計画は 3 年間で予定しており、以下の 2 つの段階で構成されている。

- ① 平成 29 年度： ^{11}C 標識アセトンの調製と還元的アルキル化反応の連続自動合成による D/L- ^{11}C イソプロテレノールの実用的合成方法の確立と PET イメージングによる小動物の脳内動態解析研究への製剤提供
- ② 平成 30～31 年度：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・合成及び ^{11}C , ^{18}F 標識化と PET イメージングによる小動物の体内動態解析

本年度の研究計画の内、①の進捗状況は以下の通りである。

A: D/L- ^{11}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}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 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収率は、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 $[2-^{11}\text{C}]$ 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 $[2-^{11}\text{C}]$ アセトンに基づいた反応収率 (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 ($\text{p}K_a$)	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 $[2-^{11}\text{C}]$ アセトンに基づいた反応収率

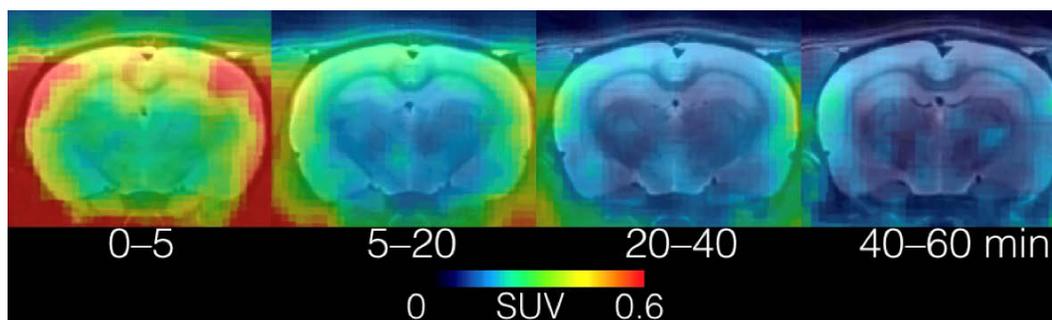
結果、安息香酸/NaBH(OAc)₃/DMSO/DMF の組み合わせが、高い反応収率を達成するために特に有効であることが判明した。またこの結果は、陽電子放出核種使用・非使用の系で一致した結果が認められた。さらに、還元剤に NaBH₃CN を使用した場合、陽電子放出核種を用いない系では高収率である一方、陽電子放出核種を用いた系で

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 NaBH_3CN 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、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、臨床投与に十分な放射エネルギーで製剤化することができた。臨床投与前に実施する品質試験に 20 分要すると仮定しても、想定される D/L-イソプロテレノールの臨床投与量は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。

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

D. 考察と結論

D/L-[¹¹C]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概ね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-[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。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誘導体の設計・合成により、脳内移行性の改善が見込まれる。この誘導体がタウ蛋白凝集抑制作用を保持しているかどうかの確認と、PETプローブ化した際の脳内移行性をD/L-[¹¹C]イソプロテレノールと比較することによって、アルツハイマー病治療薬開発に有用な、従来のタウPETプローブと結合様式の異なる新規PETプローブの開発が期待できる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

国際学会発表

- 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 ^{11}C -labeled (*R,S*)-isoproterenol via reductive alkylation of (*R,S*)-norepinephrine with $[2-^{11}\text{C}]$ 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 ^{11}C -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 IID-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 IID-06)

国内学会発表

1) ○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, 10月5日～10月7日(口頭発表, MM2V III B-01)

2) ○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ロ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)

3) ○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 ^{11}C 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)

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