

図 1 1 . Indomethacin 派生化合物の合成経路(II)

(6) フェニルブタゾン派生化合物の合成

4-(5-(4-Bromophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-*N,N*-dimethylbenzenamine

(化合物 34) の合成

4-Bromobenzhydrazine (215 mg, 1 mmol) と

4-dimethylaminobenzaldehyde (149 mg, 1 mmol)、ammonium cerium nitrate (548 mg, 1 mmol) をジクロ

ロメタン (10 mL) に溶解し 24 時間加熱還流した。精製水を加えてクロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/4) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 34 を得た。収量 12 mg (収率 3.5%) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.08 (s, 6H), 6.76 (d, *J*=9.0 Hz, 2H), 7.66 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.98 (dd, *J*=5.4, 4.5 Hz, 4H).

MS m/z 362 (M⁺).

4-(5-(4-Tributylstannyl)phenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-*N,N*-dimethylbenz enamine (化合物 3 5)の合成

ラトリフェニルホスフィンパラジウム (3 mg, 0.002 mmol)、トリエチルアミン (3 mL) を加えて4時間30分、加熱還流した。反応溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン(1/3)を展

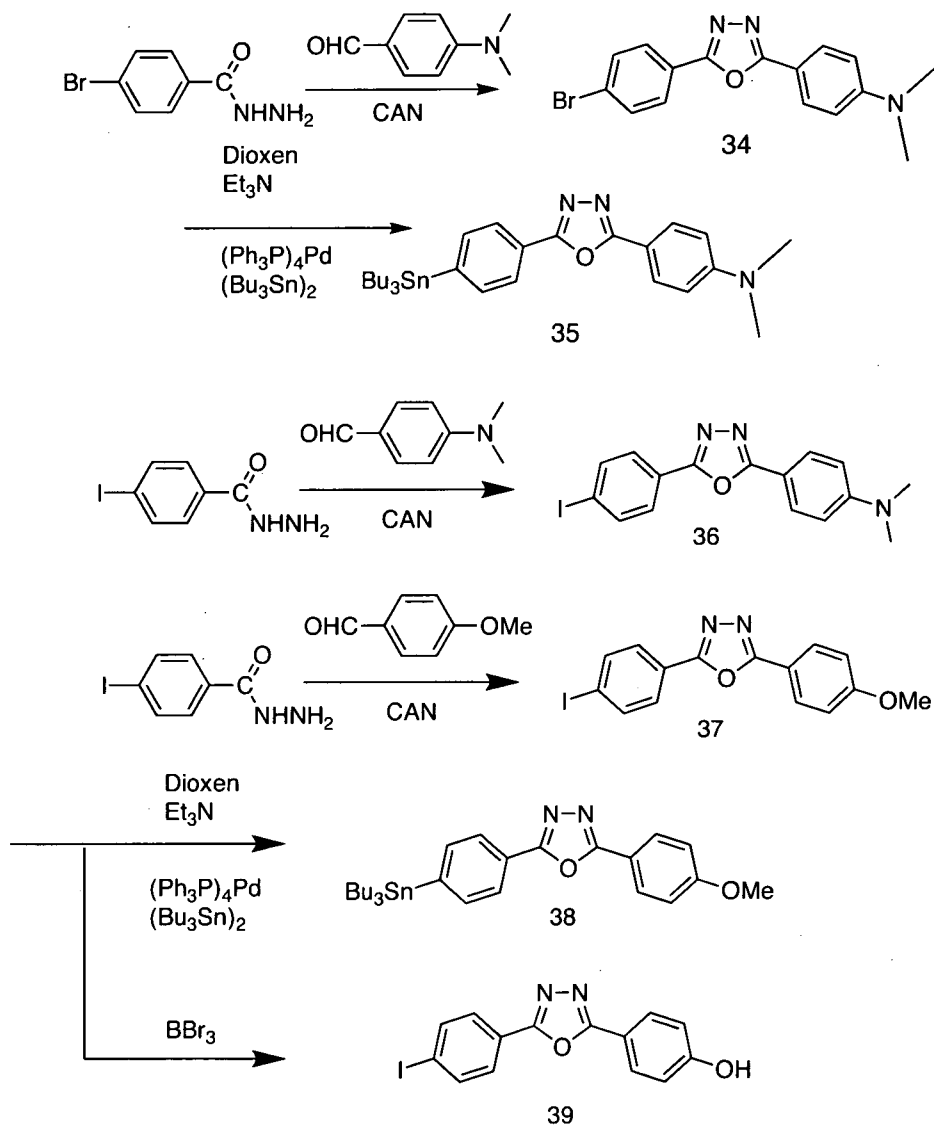


図 1 2. Phenylbutazon 派生化合物の合成経路

化合物 3 4 (19 mg, 0.06 mmol) を 1,4-ジオキサン (3 mL) に溶解し、ビス(トリブチルスズ) (0.04 mL)、テト

開溶媒とする分取用 TLC により精製を行い、化合物 3 5 を得た。収量 2.5mg (収率 8.2%) ¹H NMR (300

MHz, CDCl₃) δ 0.87-1.6 (m, 27H), 3.07 (s, 6H), 6.77 (d, *J*=9.0 Hz, 2H),

7.61 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 8.01 (dd, *J*=9.0, 8.1 Hz, 4H).

4-(5-(Iodophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-*N,N*-dimethylbenzenamine(化合物 36)の合成

4-Iodobenzohydrazide (524 mg, 2 mmol) と

4-(dimethylamino)benzaldehyde (298 mg, 2 mmol)、Ammonium cerium nitrate (1096 mg, 2 mmol) をジクロロメタン (20 mL) に溶解し 11 時間加熱還流した。精製水を加えてクロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム/メタノール (99/1) を展開溶媒とする分取用 TLC により精製を行い、化合物 36 を得た。収量 6 mg (収率 0.76%) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.07 (s, 6H), 6.76 (d, *J*=3.0 Hz, 2H), 7.85 (d, *J*=12.0 Hz, 4H), 7.97 (d, *J*=3.0 Hz, 2H). MS *m/z* 391 (M⁺).

2-(4-Iodophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole(化合物 37)の合成

4-Iodobenzohydrazide (524 mg, 2 mmol) と 4-methoxybenzaldehyde (272 mg, 2 mmol) Ammonium cerium nitrate (1096 mg, 2 mmol)

をジクロロメタン (20mL) に溶解し 19 時間加熱還流した。精製水を加えてクロロホルムで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルム/メタノール (99/1) を展開溶媒とする分取用 TLC により精製を行い、化合物 37 を得た。収量 40mg (収率 8.8%) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.89 (s, 3H), 7.03 (d, *J*=2.9 Hz, 2H), 7.86 (q, *J*=7.8 Hz, 4H), 8.03 (d, *J*=3.0 Hz, 2H). MS *m/z* 378 (M⁺).

2-(4-(Tributylstannyl)phenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole(化合物 38)の合成

化合物 37 (64 mg, 0.06 mmol) を 1,4-ジオキサン (5 mL) に溶解し、ビス(トリブチルスズ) (0.11 mL)、テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (8.1 mg, mmol)、トリエチルアミン (5 mL) を加えて 4 時間加熱還流した。反応溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/4) を展開溶媒とする分取用 TLC により精製を行い、化合物 38 を得た。収量 6 mg (収率 6.5%) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.87-1.58 (m, 27H), 3.91 (s, 3H), 7.04 (d, *J*=3.1 Hz, 2H), 7.63 (d,

$J=2.6$ Hz, 2H), 8.06 (q, $J=6.6$ Hz, 4H).

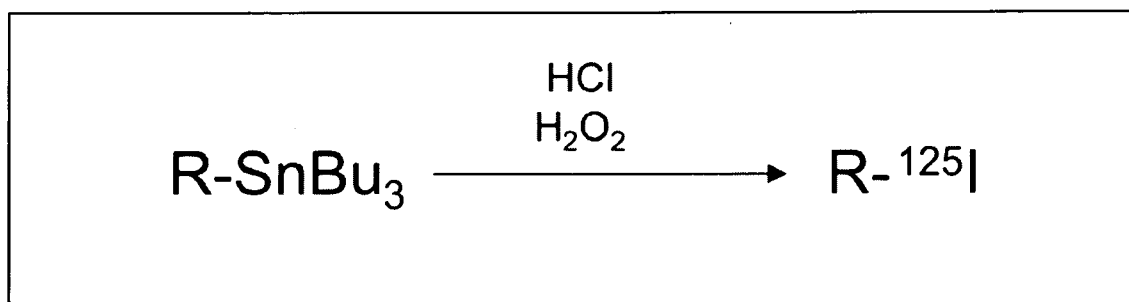
4-(5-(4-Iodophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenol(化合物 39)の合成
化合物 37 (36mg, 0.1 mmol) をジクロロメタン溶液に溶解し、氷冷下三臭化ホウ素ジクロロメタン溶液 (0.6mL) を徐々に加えていった。室温で5日間反応させた後、反応液に少量ずつ精製水を加え反応を停止させた。クロロホルムで抽出後、水層を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル/ヘキサン (1/2) を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーに付し、化合物 39 を得た。収量 17 mg (収率 49%) $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 6.98-7.06 (m, 2H), 7.86-7.91 (m, 4H), 8.02-8.09 (m, 2H). MS m/z 364 (M^+).

(7) NSAIDs 派生化合物の ^{125}I 標識種々のトリブチルスズ化合物 (1mg/mL) のエタノール溶液 (50 μL) に [^{125}I]NaI (1.5 μL 5mCi/50 μL), 1N 塩酸 (50 μL) を加え、最後に 3%w/v 過酸化水素水 (50 μL) を加えた。3分間室温放置後、飽和亜硫酸水素ナトリウム水溶液 (100 μL) を加え反応を停止させ、飽和炭酸水素ナトリウム (100 μL) を加えて反応溶液を中和した。酢酸エチルで抽出し、硫酸ナトリウムを入れたパスツールピペットに通して脱水した後、逆相 HPLC (水 : アセトニトリル=4:6-3:7) で精製した。非放射性化合物を標品として 254nm における吸光度を HPLC で分析し、それと一致する目的物を分取し、酢酸エチルで抽出し、窒素気流下酢酸エチルを留去した。

図 13. トリブチルスズ標識前駆化合物からの放射性ヨウ素標識

(8) $\text{A}\beta$ (1-42)凝集体の調製

mg/mL の濃度になるように溶解し、



$\text{A}\beta$ (1-42)を 1 mM EDTA を含んだ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 0.25

37 °C で 42 時間インキュベートすることにより、 $\text{A}\beta$ (1-42)凝集体を調整

した。

(9) A β (1-42)凝集体を用いた結合実験

10%EtOH 溶液 900 μ L、種々の濃度のサンプル溶液 50 μ L、A β (1-42)凝集体 50 μ L またはリン酸 Buffer 50 μ L を加え、室温で 3 時間放置した。A β (1-42)凝集体と結合した化合物と結合していない化合物とは、Whatman GF/B filter を用いて Brandel M-24R cell harvester によって分離し、濾過したフィルターに残った放射能を γ カウンターで計測した。

C. 研究結果

AD の特徴的病理学的変化のうち最も初期段階に始まるとされる老人斑に着目し、老人斑の主構成成分である A β に特異的結合性を有するイメージングプローブの開発を計画した。本研究では、NSAIDs を基盤分子とする種々の放射性ヨウ素標識化合物を合成し、アミロイドイメージングプローブとしての有用性の評価を行った。

NSAIDs 派生化合物の合成

図 1 から 1 2 に NSAIDs 派生化合物の合成経路を示した。それぞれのブロモ化合物はパラジウムを触媒とするビス(トリブチルスズ)との反応によりトリブチルスズ体へと変換した。こ

(10) トランスジェニックマウス脳切片を用いた蛍光染色

アルツハイマー病モデルトランスジェニックマウス Tg2576 (20,24 ヶ月齢)の脳を取り出し、ドライアイス中で 4%CMC を加え凍結させた。その後、LEICA CM1900 により厚さ 10 μ m の切片を作製した。切片とリガンド (100 μ M in 50%EtOH) を 10 分間、または切片と Th-S を 3 分間反応させた後、50%EtOH で 2 回洗浄し、Nikon ECLIPSE 80i を用い、波長 365 nm、380-420 nm で観察した。

これらのトリブチルスズ体はヨウ素と反応させることによりヨウ素体へと変換した。

¹²⁵I 標識実験

¹²⁵I 標識は、過酸化水素を酸化剤として用い、スズ-ヨウ素交換反応により目的とする ¹²⁵I 標識体を得た(図 1 3)。あらかじめ 254 nm における非放射能化合物の吸光度を逆相 HPLC で分析しておき、その保持時間と一致する化合物を分離精製することにより、目的とする ¹²⁵I 標識体を 98%以上の放射化学的純度で得た。

A β (1-42)凝集体との結合親和性に関する検討

合成した化合物に関して、アミロイドβ 42凝集体を用いたインビトロ結合実験を行い、化合物のアミロイドに対する結合性を定性的に評価した。その結果を図14のグラフに示した。横軸に化合物の濃度、縦軸にアミロイド凝集体に結合した放射能を示す。アミロイド結合性は、化合物によって異なったが、化合物36および化合物37はアミロイド凝集体への高い結合性を有することが示唆された。

正常マウスにおける体内放射能分布実験

4-5週齢正常マウスを用いて¹²⁵I標識化合物36、37の体内放射能分布実験を行った(表1)。いずれの化合物も1%ID/g以上の脳移行性を示し、アミロイドイメージングに十分な放射能

が脳へ到達した。^[125I]37は、^[125I]36に比べて、速やかな放射能消失を示すことが確認された。また、いずれの化合物も肝臓への高い集積を示し、経時的に腸管へと排泄された。

アルツハイマー病病態モデルマウス脳組織切片を用いた蛍光染色実験

次に、実際にアミロイド斑への結合性を検討するために、化合物36および化合物37を使用し、アルツハイマー病モデルマウス脳切片を用いた蛍光染色実験を行った。その結果、アルツハイマー病モデルマウス脳切片上には、同月齢のワイルドタイプマウス脳切片には観察されない、多数の蛍光が観察され、この蛍光像は、隣接切片を用いて行った抗アミロイドβ抗体による免疫染色の陽性部位と一致した。

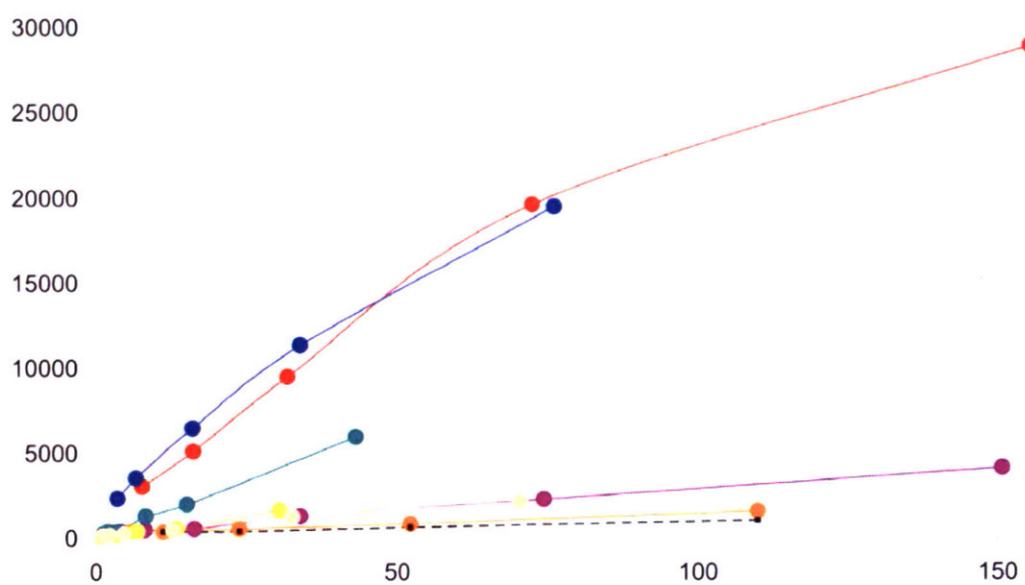
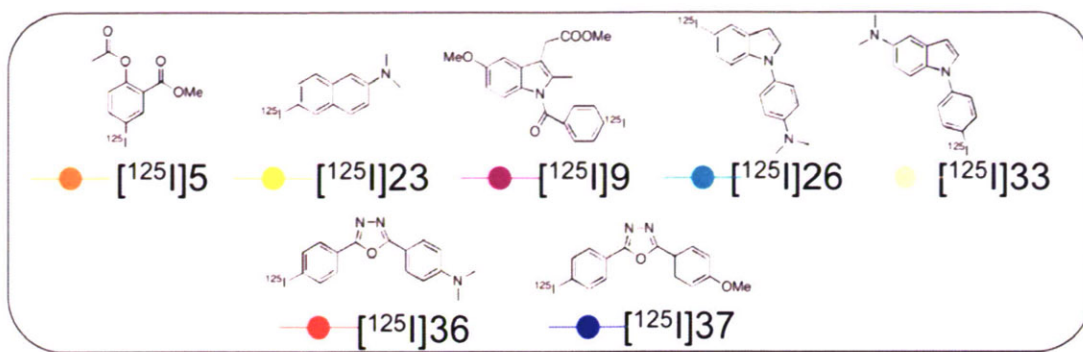


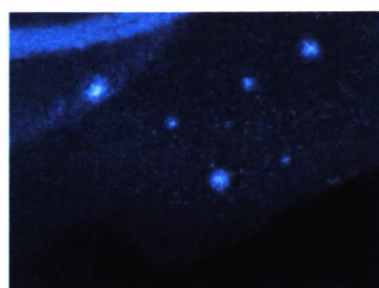
図 1 4. Aβ42 凝集体を用いたインビトロ結合実験

表 1. [¹²⁵I]36 および [¹²⁵I]37 の正常マウス体内放射能分布実験^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[¹²⁵I]36				
Blood	3.28 (0.46)	3.51 (0.29)	2.53 (0.28)	2.21 (0.41)
Liver	15.87 (3.49)	19.12 (2.43)	12.64 (2.44)	10.01 (1.64)
Kidney	9.14 (1.60)	7.80 (0.64)	5.71 (1.35)	3.81 (0.64)
Intestine	2.28 (0.55)	11.34 (1.61)	12.58 (2.35)	16.22 (2.51)
Spleen	3.56 (0.96)	4.10 (0.40)	2.63 (0.54)	2.05 (0.41)
Pancreas	5.32 (0.98)	4.39 (2.17)	2.50 (0.56)	2.14 (0.90)
Heart	3.99 (3.10)	3.55 (1.86)	2.03 (0.30)	1.54 (0.31)
Stomach ^b	0.71 (0.13)	1.41 (0.91)	3.12 (0.90)	2.90 (1.57)
Brain	2.98 (0.53)	5.93 (0.76)	3.16 (0.69)	1.78 (0.41)
[¹²⁵I]37				
Blood	1.84 (0.30)	1.60 (0.30)	1.26 (0.26)	0.80 (0.20)
Liver	9.60 (1.73)	12.60 (1.14)	8.07 (1.66)	4.65 (1.34)
Kidney	7.14 (1.46)	4.85 (0.48)	3.92 (1.97)	2.48 (0.37)
Intestine	2.07 (0.36)	4.49 (0.60)	10.06 (1.81)	19.85 (4.71)
Spleen	2.44 (0.28)	1.51 (0.26)	0.80 (0.10)	0.60 (0.26)
Pancreas	4.74 (0.63)	1.98 (0.37)	0.96 (0.03)	0.57 (0.14)
Heart	4.80 (1.33)	1.73 (0.27)	0.92 (0.25)	0.43 (0.11)

Stomach ^b	0.71 (0.13)	1.41 (0.91)	3.12 (0.90)	2.89 (1.57)
Brain	3.75 (0.78)	2.74 (0.37)	1.04 (0.14)	0.36 (0.10)

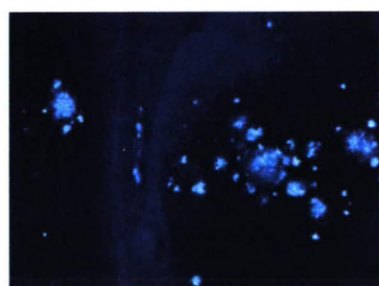
^aExpressed as % injected dose per gram. Each value represents the mean (s.d.) for 3-5 animals at each interval. ^bExpressed as % injected dose per organ. ^cnot determined



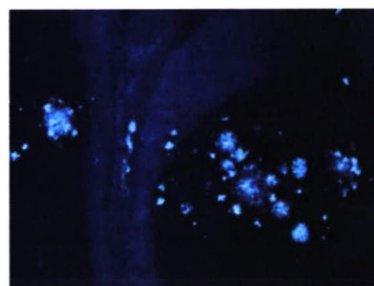
3 6



チオフラビン S



3 7



チオフラビン S

図 1 4. アルツハイマー病モデルマウス脳切片を用いた化合物 1 9 と 2 0 の蛍光染色

D. 考察

NSAIDs を基盤分子とする数種類の新規 SPECT 用プローブを設計・合成した。アミロイド凝集体を用いたインビトロ結合実験において、ジフェニルオキサジアゾール誘導体化合物 3 6 と化合物 3 7 は、アミロイド凝集体に対する高い結合親和性を示した。ア

ルツハイマー病モデルマウス脳切片を用いた蛍光染色実験より、化合物および化合物は、脳への高い移行性を示した。今後、ジフェニルオキサジアゾール骨格へ更なる分子修飾を行い、アミロイド凝集体への結合性と脳移行性を保持し、クリランスに優れたアミロイドイメージングプローブの開発を推進していく予定である。

E. 結論

NSAIDs を基盤分子とする放射性ヨウ素標識化合物の中から、ジフェニルオキサジアゾール骨格が新規 SPECT 用アミロイドイメージングプローブとして機能することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

小野正博、中山守雄：ジフェニルオキサジアゾール誘導体含有診断用組成物 平成20年2月26日出願

出願番号：特願2008-043750

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					