

200912036A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)を基盤分子とするアミロイド

イメージングプローブの開発に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 小野 正博

平成22(2010)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)を基盤分子とするアミロイド
イメージングプローブの開発に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 小野 正博

平成22(2010)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)を基盤分子とするアミロイドイメージングプローブ の開発に関する研究	
小野 正博	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 31
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 33

非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)を基盤分子とするアミロイドイメージング
プローブの開発に関する研究

主任研究者 小野 正博 京都大学大学院薬学研究科准教授

研究要旨: NSAIDs を基盤分子とする数種類の放射性ヨウ素標識化合物を合成し、インビトロ結合実験、正常マウス体内放射能分布実験等を行い、そのアミロイドイメージングプローブとしての有用性についての検討を行った。今年度は、ジフェニルオキサジアゾール骨格に導入する置換基の最適化を行うとともに、NSAIDs の一種であるインドメタシンから派生したフェニルインドール骨格がアミロイドイメージングプローブの基本骨格として機能することを新たに見出した。

A. 研究目的

近年の急速な高齢化に伴い、アルツハイマー病をはじめとする痴呆性疾患の増加が大きな社会問題になっている。現在、アルツハイマー病の診断には、長谷川式、ADAS、MMSE などのアルツハイマー病が疑われる個体の認知機能の低下を定量的に評価する方法が一般的に用いられている。しかし、これらの診断方法ではアルツハイマー病を診断するには不十分であり、確定診断には患者死後脳の病理学的

所見が必要である。多くの研究から、最初の臨床症状が現れるかなり前（10-40 年前）にはすでにアルツハイマー病に特徴的な神経変性が始

まっていることが明らかとなってきた(Fig. 1)。またアルツハイマー病の患者を取り巻く家族または臨床医が最初の臨床症状に気付いたときには、すでに脳内病理像は取り返しのつか

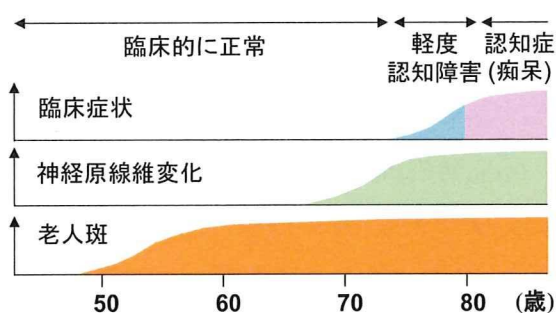


Fig. 1.アルツハイマー病の臨床症状と病理学的変化の関係（80 歳で臨床的に認知症になるとすると 50 歳くらいから老人斑の蓄積が始まると考えられる。）

ない重篤な状態にまで進行していることが知られている。このような状況下、アルツハイマー病の早期診断に対する社会的ニーズは高く、その早急な開発が強く望まれている。アルツハイマー病の特徴的病理学的変化として、老人斑の沈着と神経原線維変化の出現が知られている。前者の主構成成分は β シート構造をとったアミロイド β 蛋白($A\beta$)であり、後者は過剰リン酸化されたタウ蛋白である。アルツハイマー病の確定診断は、患者死後脳におけるこれらの病理学的変化の確認に委ねられている。特に $A\beta$ の蓄積はアルツハイマー病発症の最も初期段階より始まることから、脳内で β シート構造をとった $A\beta$ の早期検出は、アルツハイマー病の早期診断につながると考えられる。

そこで我々は、非侵襲的かつ信頼性と再現性に優れたアルツハイマー病の早期診断を目的として、アルツハイマー病における最も初期段階の特徴的脳病変である老人斑を体外から鋭敏に画像化できる新規分子イメージング技術の開発を計画するに至った。重篤な痴呆症状が出現する前にアルツハイマー病の早期診断を可能とする本イメージング技術が開発できれば、早期治療の導入により、重度の患者を減少させることが可能になると考えられる。また、アルツハイマー病

と臨床的に類似した他の痴呆性疾患との鑑別診断、病状進行の判定、薬剤の治療効果の判定にもその有用性が期待される。さらに、アルツハイマー病患者とその家族の精神的および経済的負担の軽減にも、早期診断は極めて重要であり、その意義は大きいと考えられる。

現在までに、米国のペンシルバニア大学(Hank F. Kung)、ピッツバーグ大学(W. E. Klunk)の研究グループによって、有望な PET 用アミロイドイメージングプローブ(SB-13, PIB)が報告され、臨床試験が行われている。いずれもアミロイドの蛍光染色試薬であるコンゴレッドおよびチオフラビン T の化学構造を基に分子設計された化合物であり、インビトロにおいてアミロイド凝集体に高い結合性を示すものの、脳内での老人斑アミロイドへの特異的結合性が低いなどの問題が生じている。日本においても、ビーエフ研究所(現・東北大学)の研究グループによって、いくつかの候補化合物の報告があるが、その分子設計戦略はペンシルバニア大学、ピッツバーグ大学と同様に、コンゴレッド、チオフラビン T 等の色素系化合物を基本骨格とする PET 用プローブである。

近年、アルツハイマー病の疫学調査において、NSAIDs 長期間服用者にアルツハイマー病発症率が低く、またそ

の要因として、NSAIDsがAβへ結合することによるAβの凝集抑制の可能性が報告されている。本研究では、Aβへの結合性を持つNSAIDsを基本骨格に選択し、かつ、SPECT用放射性同位元素である^{99m}Tcあるいは¹²³Iを標識核種に用いて、新たなアミロイドイメージングプローブの開発を試みる

点で従来の放射性プローブとは全く異なり、独創的であると考えられる。現在日本においては、SPECT装置は全国に約2000台が設置されているのに対し、PET装置は150施設程度である。急増が予測されるアルツハイマー病患者の数を考えあわせると、欧米、日本の他のグループが開発している

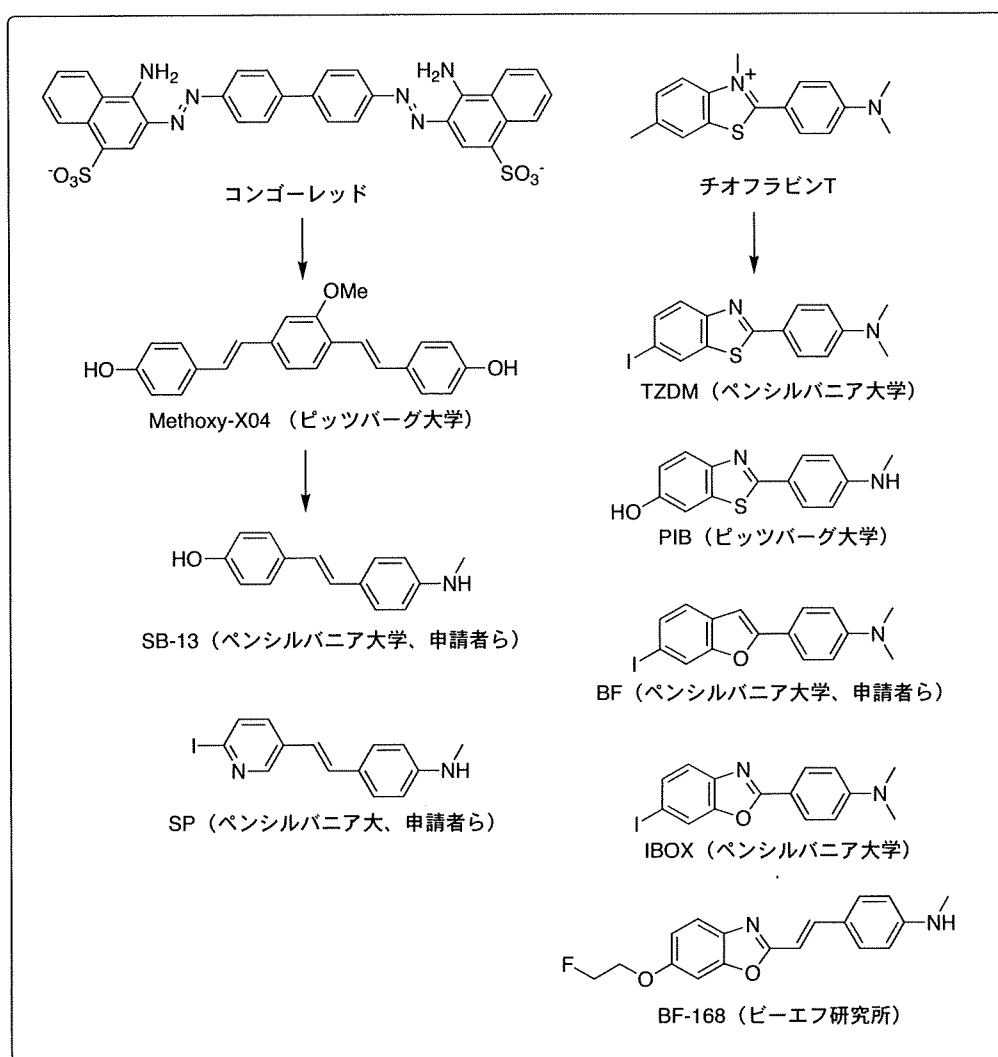


Fig. 2. コンゴレッド、チオフラビンTから派生した既報のアミロイドイメージングプローブの化学構造（コンゴレッド、チオフラビンTはイオン性化合物であるため、血液脳関門を透過しない。これらを中性化した様々な化合物が開発されてきた。）

PET 用プローブが実用化されたとしても、予防的診断に応用するのは困難であり、診断を受けられる患者数は限定されると考えられる。一方、本研究で提案する ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ などの SPECT 用核種で標識された SPECT 用プローブが実用化されれば、胸部 X 線 CT のような一般画像検診と同様に全国の病院でアルツハイマー病の診断を行うことが可能になると期待される。

申請者は、2001 年からペンシルバニア大学 Kung 教授の研究室において、博士研究員としてアミロイドイメージングプローブの開発研究に携わってきた。Fig. 2 に示す、ベンゾフラン誘導体 (BF)、スチルベン誘導体 (SB-13)、スチリルピリジン誘導体 (SP) は、いずれもコンゴレッドあるいはチオフラビン T から派生した化合物であり、上記のようなインビボにおける欠点を有した。申請者は、このコンゴレッドおよびチオフラビン T を基本骨格とする化合物の開発研究で培った経験から、より有効なアミロイドイメージングプローブの開発には、コンゴレッドおよびチオフラビン T 以外の基本骨格を持つプローブ化合物の探索が必要であると考えた。

こうした背景をふまえ、我々は、アミロイドイメージングプローブとして機能するコンゴレッド、チオフラ

ビン T とは別の分子骨格の探索研究を独自に行ってきた。その中で、最近我々は、広く植物界に分布するフラボノイド化合物の一種であるフラボンの基本骨格をアミロイドイメージングプローブとして応用することを考案した。我々は、種々の置換基と放射性ヨウ素を導入したフラボン誘導体を開発 (Fig. 3) し、既報のヨウ素標識プローブに比べ、アミロイドイメージングプローブとして優れた性質を示すことを見出した (特許出願済)。本検討結果はまた、従来アミロイドイメージングプローブの基本骨格として用いられてきた、コンゴレッド、チオフラビン T 以外の分子骨格もアミロイドイメージングプローブとして適応可能であることを示唆するものであった。そこで本研究では、フラボノイド系化合物とは異なる、新たな分子ライブラリー構築のため、 $\text{A}\beta$ 凝集体への結合性が報告されている、NSAIDs を基本骨格とする新規アミロイドイメージングプローブの開発を計画した。今年度は、新たに、NSAIDs 化合物から派生したフェニ

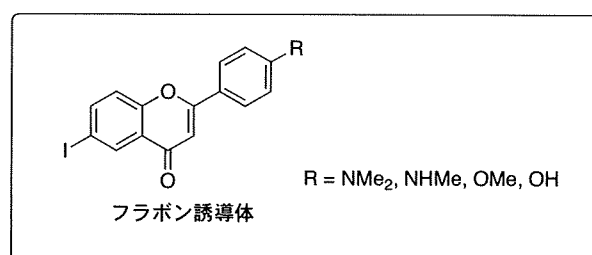


Fig. 3. フラボン誘導体の化学構造

ルインドールおよびジフェニルオキサジアゾールを基本骨格とする数種類の放射性ヨウ素標識体を設計・合成し、その SPECT 用アミロイドイメー

試薬・機器

I - i 試薬及び機器

放射性ヨウ素-125 (^{125}I) は MP Biomedicals, Inc 製 Iodine-125 (Na^{125}I , 100 mCi/mL, pH10 NaOH 溶液)を用いた。Amyloid β -protein (Human, 1-42)[TFA form] はペプチド研究所より購入した。トランスジェニックマウス(Tg2576)は、Taconic 社より購入した。その他の試薬は、市販の一級試薬または特級試薬を用いた。

中圧分取液体クロマトグラフィー装置には、山善株式会社より購入したポンプ-540 および紫外線吸収検出器 prep UV-254、フラクシオンコレクター CHF122SB、ウルトラパック (SiOH, 26 \times 300 mm または 11 \times 300 mm) を使用した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた UV 分析には、島津製作所の紫外可視検出器 SPD-10A およびクロマトパック C-R8A を装着した液体クロマトグラフ LC-10AT を使用した。また、HPLC を用いた放射能の分析には、アロカ製ユニバーサルスケラーおよびガンマサーベイメーターと日立製クロマトインテグレイター D-2500 を同 HPLC に装着

ジングプローブとしての有用性について検討を行ったので、その結果について以下に詳述する。

B. 研究方法

して使用した。カラムは、ナカライテスク社製 Cosmosil 5C₁₈-AR (4.6 \times 150 mm) を用いた。

マウス凍結脳切片の作製には Leica 社製ミクロトーム CM1900 を使用し、蛍光顕微鏡には、KEYENCE 社製 BZ-8100 を用いた。

^1H NMR は Varian Gemini 300 を用い、テトラメチルシランを内標準物質として測定した。質量分析は、JEOL IMS-DX300 を用いて測定した。放射活性の測定にはアロカ ACR-380 またはパーキンエルマー 2470 wizard² を用いた。 $\text{A}\beta$ 凝集体を用いたインビトロ結合実験における B/F 分離には、Brandel 社製 M-24R cell harvester ならびに Whatman 社製 GF/B filter を用いた。

I - ii フェニルインドール誘導体の合成

4-Ethynyl-N-methylbenzenamine (1)の合成

4-Ethynylaniline (819 mg, 7 mmol) を DMSO (5 mL) に溶かした。K₂CO₃(4.8

g, 35 mmol) を加えて攪拌し、CH₃I (1.3 mL, 21 mmol) をゆっくりと滴下した。室温で3時間反応させた後、精製水を加えて酢酸エチルで抽出した。Na₂SO₄で脱水した後、溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 2 を溶出溶媒とした中圧分取カラムクロマトグラフィーにより精製し、313 mg (収率 : 34.1%) の化合物 **1** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.49 (s, 1H), 2.83 (s, 3H), (s, 1H), 6.50 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H).

N-(4-Bromo-2-iodophenyl)acetamide (2) の合成

4-Bromo-2-iodobenzeneamine (586 mg, 2 mmol) をトルエン (5 mL) に溶解し、無水酢酸 (408 mg, 2 mmol) を加えた。室温で3.5時間攪拌後、析出した結晶を濾取し、ヘキサンで洗浄して464 mg (収率 : 69.4%) の化合物 **2** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.24 (s, 3H), 7.39 (s, 1H), 7.46 (dd, *J* = 2.4, 2.1 Hz, 1H), 7.90 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H).

4-(5-Bromo-1*H*-indol-2-yl)-*N*-methylbenzenamine (3) の合成

化合物 **2** (396 mg, 1.2 mmol) を THF (15 mL) に溶解し、化合物 **1** (313 mg, 2.4 mmol)、*t*-ジクロロビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II) (60 mg,

0.06 mmol)、ヨウ化銅 (50 mg, 0.22 mmol)、TBAF (5 mL) を加えて室温で5時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去後、精製水を加えて酢酸エチルで抽出した。無水硫酸ナトリウムで脱水した後、再び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カラムクロマトグラフィーに付し、179 mg (収率 : 49.5 %) の化合物 **3** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.90 (s, 3H), 6.57 (s, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.21 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.69 (s, 1H) 8.25 (s, 1H).

N-Methyl-4-(5-(trimethylstannyl)-1*H*-indol-2-yl)benzenamine (4) の合成

化合物 **3** (179 mg, 0.59 mmol) を1,4-ジオキサン (5 mL) に溶解し、ビス(トリメチルスズ) (198 mg, 0.6 mmol)、テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (88 mg, 0.077 mmol) を加えて3.5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 : 3 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィーによって精製し、6 mg (収率 : 2.1 %) の化合物 **4** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.30 (s, 9H), 2.88 (s, 3H), 3.84 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 8.18 (s, 1H).

4-(5-Iodo-1*H*-indol-2-yl)-*N*-methylbenzenamine (5)の合成

化合物 **4** (9 mg, 0.019 mmol) を酢酸エチル (1 mL) に溶解し、ヨウ素の酢酸エチル溶液 (1 mL, 0.25 M) を加え、室温で 15 秒間攪拌した。飽和亜硫酸ナトリウム水溶液 (1 mL) を加えて反応を停止させ、酢酸エチル層を分液し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 3 を溶出溶媒とする中圧分取カラムクロマトグラフィによって精製し、5 mg (収量 : 77.4%) の化合物 **5** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 2.89 (s, 3H), 6.56 (s, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 1.8, 1.8 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H) 7.90 (s, 1H), 8.23 (s, 1H). MS *m/z* 348 (M⁺).

4-(5-Bromo-1*H*-indol-2-yl)-*N,N*-dimethylbenzenamine (6)の合成

化合物 **2** (99 mg, 0.3 mmol) を THF (入れてください mL) に溶解し、4-ethynyl-*N,N*-dimethylaniline (65.4 mg, 0.45 mmol)、*t*-ジクロロビス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(II) (21 mg, 0.03 mmol)、ヨウ化銅 (11 mg, 0.06 mmol)、TBAF (5 mL) を加えて時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去後、精製水を加えて酢酸エチルで抽出した。無水

硫酸ナトリウムで脱水した後、再び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カラムクロマトグラフィに付し、25 mg (収率 : 27.2 %) の化合物 **6** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.02 (s, 6H), 6.59 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.21-7.22 (m, 2H), 7.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.68 (s, 1H) 8.27 (s, 1H). MS *m/z* 356 (M⁺).

N,N-Dimethyl-4-(5-(trimethylstannyl)-1*H*-indol-2-yl)benzenamine (7)の合成

化合物 **6** (22 mg, 0.07 mmol) を 1,4-ジオキサン (5 mL) に溶解し、ビス(トリメチルスズ) (29 mg, 0.09 mmol)、テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (6 mg, 0.006 mmol) を加えて加熱還流した。反応溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 3 を展開溶媒とする分取 TLC によって精製し、2 mg (収量 : 7.1 %) の化合物 **7** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.30 (s, 9H), 3.01 (s, 6H), 6.62 (s, 1H), 6.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.70 (s, 1H), 8.18 (s, 1H).

4-(5-Iodo-1*H*-indol-2-yl)-*N,N*-dimethylbenzenamine (8)の合成

化合物 **7** を酢酸エチルに溶解し、ヨウ

素の酢酸エチル溶液を加え、室温で秒間攪拌した。飽和亜硫酸ナトリウム水溶液 (1 mL) を加えて反応を停止させ、酢酸エチル層を分液し、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、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カラムクロマトグラフィによって精製し、化合物 **8** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.02 (s, 6H), 6.57 (s, 1H), 6.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 1.5, 1.5 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 8.28 (s, 1H). MS *m/z* 362 (M⁺).

5-Bromo-2-(4-methoxyphenyl)-1*H*-indole (**9**)の合成

化合物 **2** (198 mg, 0.6 mmol) を THF (5 mL) に溶解し、*p*-ethynylanisole (116 μL, 0.9 mmol)、*t*-ジクロロビス (トリフェニルホスフィン) パラジウム (II) (52 mg, 0.075 mmol)、ヨウ化銅 (28 mg, 0.15 mmol)、TBAF (2.4 mL) を加えて 24 時間加熱還流した。反応溶媒を減圧留去後、精製水を加えて酢酸エチルで抽出した。無水硫酸ナトリウムで脱水した後、再び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カラムクロマトグラフィに付し、54 mg (収率 : 30.7 %) の化合物 **9** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.87 (s, 3H), 6.50 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.25 (s,

2H), 7.59 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.12 (s, 1H), 8.30 (s, 1H).

2-(4-Methoxyphenyl)-5-(trimethylstannyl)-1*H*-indole (**10**)の合成

化合物 **9** (49 mg, 0.16 mmol) を 1,4-ジオキササン (5 mL) に溶解し、ビス(トリメチルスズ) (65.8 mg, 0.21 mmol)、テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (20 mg, 0.02 mmol) を加えて 3 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 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィによって精製し、15 mg (収量 : 23.9 %) の化合物 **10** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.30 (s, 9H), 3.86 (s, 3H), 6.68 (s, 1H), 6.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.73 (s, 1H), 8.22 (s, 1H).

5-Iodo-2-(4-methoxyphenyl)-1*H*-indole (**11**)の合成

化合物 **10** (15 mg, 0.039 mmol) を酢酸エチル (3 mL) に溶解し、ヨウ素の酢酸エチル溶液 (1 mL, 0.25 M) を加え、室温で 30 秒間攪拌した。飽和亜硫酸ナトリウム水溶液 (1 mL) を加えて反応を停止させ、酢酸エチル層を分液、無水硫酸ナトリウムで脱水した後、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

する中圧分取カラムクロマトグラフィによって精製し、9 mg (収量 : 66.3%)の化合物 **11** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.86 (s, 3H), 6.63 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 1.8, 1.5 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 8.29 (s, 1H). MS *m/z* 349 (M⁺).

4-(5-Iodo-1*H*-indol-2-yl)phenol (**12**)の合成

化合物 **11** (80 mg, 0.23 mmol) をジクロロメタン (5 mL) に溶解し、氷冷下、三臭化ホウ素ジクロロメタン溶液 (0.7 mL) を徐々に加えていった。室温で 24 時間反応させた後、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脱水した後、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により精製し、15 mg (収率: 19.5%)の化合物 **12** を得た。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 6.57 (s, 1H), 6.76 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.29 (dd, *J* = 1.5, 1.5 Hz, 1H), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.81 (s, 1H). MS *m/z* 335 (M⁺).

2-(4-(5-Iodo-1*H*-indol-2-yl)phenoxy)ethanol (**13**)の合成

化合物 **12** (13 mg, 0.039 mmol) を DMF (3 mL) に溶解し、K₂CO₃ (47.5 mg, 0.12 mmol) と ethylenchlorohydrin (4 μL, 0.06 mmol) を加え、10.5 時間加熱還流した。反応終了後、精製水を加えクロロホルムで抽出し、Na₂SO₄ を加えて脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1 を展開溶媒とする分取用 TLC にて精製し、3 mg (収率: 20.4%)の化合物 **13** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.86 (s, 3H), 6.63 (s, 1H), 6.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 1.8, 1.5 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 8.29 (s, 1H). MS *m/z* 349 (M⁺).

4-(5-Bromo-1*H*-indol-2-yl)phenol (**14**)の合成

化合物 **9** (105 mg, 0.35 mmol) をジクロロメタン (3 mL) に溶解し、氷冷下、三臭化ホウ素ジクロロメタン溶液 (1 mL) を徐々に加えていった。室温で 24 時間反応させた後、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脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1 を溶出溶媒とする中圧分取クロマトグラフィにより精製し、13 mg (収率: 13.0%)の化合物 **14** を得た。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 6.58 (s, 1H), 6.84

(d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.11 (dd, $J = 1.8, 1.5$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.60 (d, $J = 9.0$ Hz, 3H).

2-(4-(5-Bromo-1*H*-indol-2-yl)phenoxy)ethanol (15)の合成

化合物 **12** (11 mg, 0.038 mmol) を DMF (3 mL) に溶解し、 K_2CO_3 (46.5 mg, 0.014 mmol) と ethylenchlorohydrin (4 μ L, 0.06 mmol) を加え、(入れてください) 時間加熱還流した。反応終了後、精製水を加えクロロホルムで抽出し、 Na_2SO_4 を加えて脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1 を展開溶媒とする分取用 TLC にて精製し、1.8 mg (収率: 14.2%) の化合物 **15** を得た。 1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 3.89 (t, 2H), 4.09 (t, 2H), 6.64 (s, 1H), 7.02 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.13 (dd, $J = 1.5, 1.5$ Hz, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H).

2-(4-(5-(Trimethylstannyl)-1*H*-indol-2-yl)phenoxy)ethanol (16)の合成

化合物 **15** (8 mg, 0.02 mmol) を 1,4-ジオキサン (3 mL) に溶解し、ビス(トリメチルスズ) (10 mg, 0.008 mmol)、テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (10 mg, 0.008 mmol) を加えて 3 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 : 1 を溶出溶媒とする中圧分取ク

ロマトグラフィーによって精製し、9 mg (収率 : 89.8 %) の化合物 **16** を得た。 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 3.86 (s, 3H), 6.63 (s, 1H), 6.99 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J = 1.8, 1.5$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 8.29 (s, 1H).

4-(5-Bromo-1*H*-indol-1-yl)-*N,N*-dimethylbenzenamine (17) の合成

5-Bromoindole (100 mg, 0.51 mmol) と 4-(dimethylamino)-phenylboronicacid (84 mg, 0.51 mmol)、酢酸銅(II) (200 mg, 1.00 mmol) をジクロロメタン (10 mL) に溶解し、トリエチルアミン (0.18 mL)、適量のモレキュラーシーブス(3A) を加え室温で 1 時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 9 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 **17** を得た。収量 71 mg (収率 44.2 %) 1H NMR (300MHz, $CDCl_3$) δ 3.02 (s, 6H), 6.55 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.28 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H) 7.78 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H)

4-(5-(Tributylstannyl)-1*H*-indo-1-yl)-*N,N*-dimethylbenzenamine (18) の合成

化合物 **17** (102 mg, 0.32 mmol) を 1,4-ジオキサン (5 mL) に溶解し、ビス(トリブチルスズ) (0.2 mL)、テトラトリフェニルホスフィンパラジウム (10 mg,

0.009 mmol)、トリエチルアミン (5 mL) を加えて6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 : 9 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 **18** を得た。収量 21 mg (収率 12.4%) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.87-1.56 (m, 27H), 3.02 (s, 6H), 6.61 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.77 (s, 1H).

4-(5-Iodo-1*H*-indo-1-yl)-*N,N*-dimethylbenzenamine (19) の合成

化合物 **18** (21 mg, 0.04 mmol) をクロロホルム (3 mL) に溶解し、ヨウ素のクロロホルム溶液 (1 mL, 0.25 M) を加え、室温で 10 分間攪拌した。飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させ、クロロホルム層を分液し、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 を展開溶媒とする分取用 TLC により精製を行い、化合物 **19** を得た。収量 8 mg (収率 55.3%) ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.02 (s, 6H), 6.54 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.2 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.41 (dd, *J* = 10.5 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H). MS *m/z* 362 (*M*⁺).

I - iii 2-PI 誘導体の ¹²⁵I 標識

化合物 **5**、**8**、**11**、**12** の標識前駆体であるトリメチルスズ化合物の 1% メタノール溶液 80 μL (0.56 mg/mL) に *N*-クロロスクシンイミドのメタノール溶液 20 μL (0.5 mg/mL) を加え、20 秒間室温で反応させた。続いて、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液 (10 μL) を加えて反応を停止させ、酢酸エチルを加えて抽出した。硫酸ナトリウムを充填したパスツールピペットに通液して脱水した後、窒素気流化で溶媒を留去した。放射性ヨウ素標識化合物は、それぞれ対応する非放射性化合物を標品として逆相 HPLC (水 : アセトニトリル = 4 : 6 - 1 : 1) で分離精製した。

I - ii 2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazole 誘導体の合成

4-(5-(4-Bromophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)-*N,N*-dimethylbenzenamine (20) 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脱水した後、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より精製し、12 mg (収率 : 3.5%) の化合物 **20** を得た。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*-dimethylbenzenamine (21)の合成

化合物 **20** (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 4.5 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 : 3 を展開溶媒とする分取用 TLC により精製を行い、2.5 mg (収率 : 8.2%) の化合物 **21** を得た。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 (22)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 9 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脱水した後、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、14 mg (収率: 1.8%) の化合物 **22** を得た。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). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 165.5, 162.9, 152.5, 138.2, 128.4, 128.0, 123.9, 111.6, 110.7, 97.8, 40.1. HRMS *m/z* C₁₆H₁₄N₃OI found 391.0191/ calcd 391.0182 (M⁺).

2-(4-Iodophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole (23)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 (20 mL) 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脱水した後、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、40 mg (収率: 8.8%) の化合物 **23** を得た。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). ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 164.7, 163.6, 162.5, 138.3, 128.8, 128.1, 123.6, 116.2, 114.6, 98.2, 55.5. HRMS m/z $C_{15}H_{11}N_2O_2I$ found 377.9877/ calcd 377.9865 (M^+).

2-(4-(Tributylstannyl)phenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazole (24)の合成
化合物 **23** (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, 0.007 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、6 mg (収率: 6.5%) の化合物 **24** を得た。¹H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.87-1.58 (m, 27H), 3.91 (s, 3H), 7.04 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 2.6$ (確認) Hz, 2H), 8.06 (q, $J = 6.6$ Hz, 4H).

4-(5-(4-Iodophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenol (25)の合成

化合物 **23** (36 mg, 0.1 mmol) をジクロロメタン (16 mL) に溶解し、氷冷下、三臭化ホウ素ジクロロメタン溶液 (0.6 mL) 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

脱水した後、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より精製し、17 mg (収率: 49.0%) の化合物 **25** を得た。¹H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.98-7.06 (m, 2H), 7.86-7.91 (m, 4H), 8.02-8.09 (m, 2H). HRMS m/z $C_{14}H_9N_2O_2I$ found 363.9712/ calcd 363.9709 (M^+).

2-(4-(5-(4-Iodophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenoxy)ethanol (26)の合成

化合物 **25** (22 mg, 0.06 mmol) を DMF (3 mL) に溶解し、 K_2CO_3 (24.5 mg, 0.18 mmol) と ethylenchlorohydrin (4 μ L, 0.06 mmol) を加え、6.5 時間加熱還流した。反応終了後、精製水を加えクロロホルムで抽出し、 Na_2SO_4 を加えて脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 3 : 2 を展開溶媒とする分取用 TLC にて精製し、11 mg (収率: 44.6%) の化合物 **26** を得た。¹H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.03 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H), 4.18 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H) 7.06 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H), 7.87 (q, $J = 8.0$ Hz, 4H), 8.07 (d, $J = 3.0$ Hz, 2H). HRMS m/z $C_{16}H_{13}N_2O_3I$ found 407.9983/ calcd 407.9971 (M^+).

2-(2-(4-(5-(4-Iodophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenoxy)ethoxy)ethanol (27)の合成

化合物 **25** (28 mg, 0.077 mmol) を DMF (3 mL) に溶解し、K₂CO₃ (94.3 mg, 0.23 mmol) と ethylen glycol mono-2-chloroethyl ether (6 μL, 0.092 mmol) を加え、4.5 時間加熱還流した。反応終了後、精製水を加えクロロホルムで抽出し、Na₂SO₄ を加えて脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 3 : 2 を展開溶媒とする分取用 TLC にて精製し、9 mg (収率: 25.9%) の化合物 **27** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.70 (t, *J* = 3.1 Hz, 2H), 3.79 (q, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.92 (t, *J* = 3.2 Hz, 2H), 4.23 (t, *J* = 3.1 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H), 7.87 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H), 8.70 (d, *J* = 3.1 Hz, 2H). HRMS *m/z* C₁₈H₁₇N₂O₄I found 452.0244/ calcd 452.0233 (M⁺).

2-(2-(2-(4-(5-(4-Iodophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl)phenoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol (**28**) の合成

化合物 **25** (12 mg, 0.033 mmol) を DMF (3 mL) に溶解し、K₂CO₃ (40.4 mg, 0.1 mmol) と 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (5 μL, 0.035 mmol) を加え、12 時間加熱還流した。反応終了後、精製水を加えクロロホルムで抽出し、Na₂SO₄ を加えて脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を酢酸エチル : ヘキサン = 2 : 1 を展開溶媒とする分取用 TLC にて精

製し、7.8 mg (収率: 44.7%) の化合物 **28** を得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.61-3.77 (m, 8H), 3.91 (t, *J* = 3.1 Hz), 4.23 (t, *J* = 3.2 Hz, 2H), 7.06 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.87 (q, *J* = 7.8 Hz, 4H), 8.06 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H). HRMS *m/z* C₂₀H₂₁N₂O₅I found 496.0525/ calcd 496.0495 (M⁺).

I - iii 1,3,4-DPOD 誘導体の ¹²⁵I 標識

化合物 **22**、**23** の標識前駆体であるトリブチルスズ化合物のエタノール溶液 (50 μL, 1 mg/mL) に 1 N HCl (50 μL)、3% w/v H₂O₂ (50 μL) を加え、2 分間室温で反応させた。続いて、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液 (100 μL) を加えて反応を停止させ、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 μL) を加えて反応溶液を中和した。酢酸エチルを加えて抽出し、硫酸ナトリウムを充填したパスツールピペットに通液して脱水した後、窒素気流化で溶媒を留去した。放射性ヨウ素標識化合物は、それぞれ対応する非放射性化合物を標品として逆相 HPLC (水 : アセトニトリル = 4 : 6) で分離精製した。

I - iv Aβ(1-42)凝集体の調製

1 mM EDTA を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い、Aβ(1-42) が 0.25 mg/mL の濃度になるように調製した。37°C で 42 時間インキュベートすることにより、Aβ(1-42)凝集体溶液

を調製した。凝集体溶液は実験に用いるまで、 -80°C で保存した。

I - v $\text{A}\beta$ 凝集体を用いた競合阻害実験による阻害定数 : K_i 値の算出

12 × 75 mm のガラスチューブに 10%EtOH 溶液 (850 μL)、0.0002 – 400 μM に希釈したサンプル溶液 (50 μL)、適度な濃度の [^{125}I]IMPY (6-iodo-2-(4'-dimethylamino)phenyl-imidazo[1,2]pyridine) (IMPY 合成の参考文献を入れる) (50 μL) を混和し、最後に 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体溶液 (50 μL) を加えてボルテックスし、室温で 3 時間静置した。非特異結合は、サンプルの代わりに 500 nM の非放射性 IMPY を用いて算出した。3 時間後、混合溶液を M-24R cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD)、GF/B filter (Whatman, Kent, UK) を用いて吸

C. 研

究結果

II - i フェニルインドール誘導体の合成

Scheme 1, 2 にフェニルインドール誘導体の合成経路を示す。2-PI の合成は、以前に報告された方法によって行った。4-Bromo-2-iodoaniline に無水酢酸を加えることによって得た化合物 **1** と、種々の置換基を導入したエチニルベンゼンとを反応させることで、イン

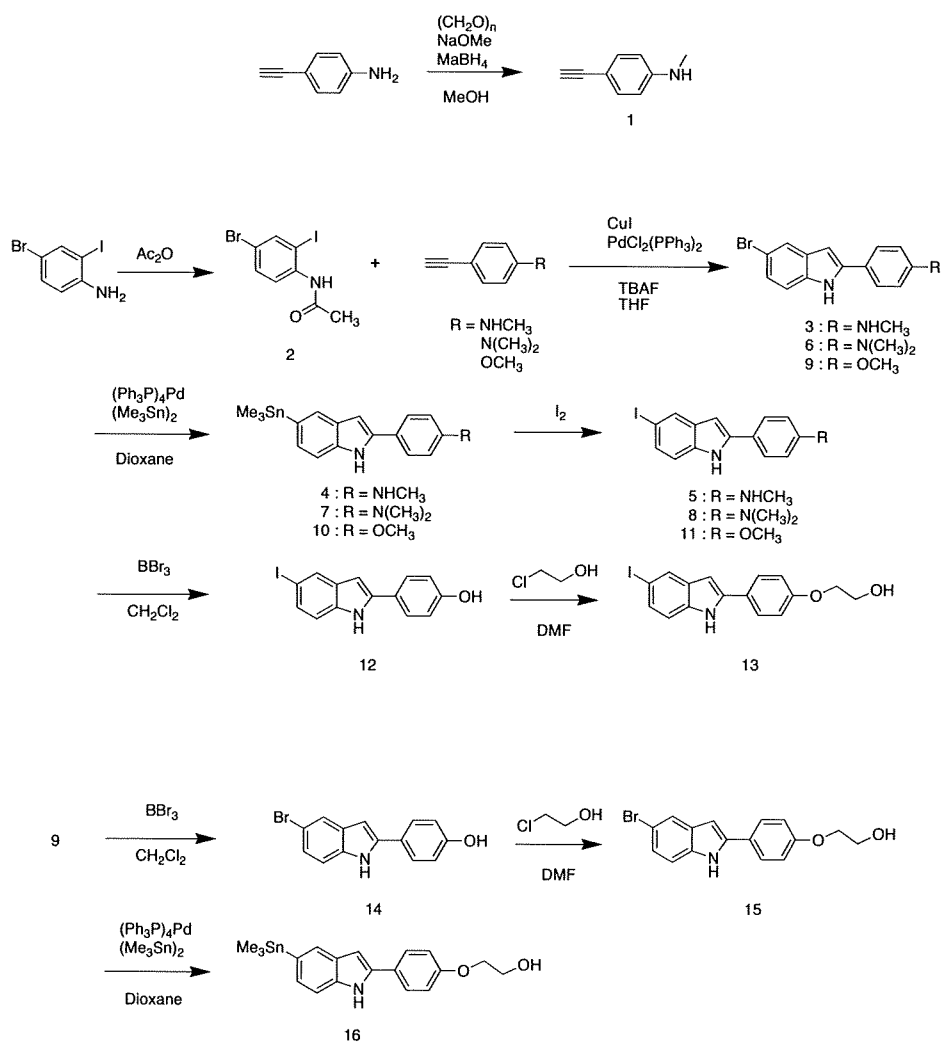
引ろ過し、 $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体に結合した化合物と結合していない化合物とを分離した。ろ過後、フィルターに残存した放射能をガンマカウンターで測定し、GraphPad Prism 4.0 を用いて阻害曲線を作成し、 IC_{50} を算出した。

I - vi Tg2576 マウス脳切片を用いた蛍光染色

アミロイド前駆蛋白質(APP)を過剰発現するモデルマウスとして、Tg2576 マウス(28 ヶ月齢)を選択した。マウスを屠殺後、脳組織を取り出し、カルボキシメチルセルロース (4%) で包埋し、ドライアイスにより凍結させた後、ミクロトームを用いて、厚さ 10 μm の連続切片を作製した。切片は実験に用いるまで、 -80°C で保存した。

ドール骨格の2位にフェニル基を導入した化合物 **3**、**6**、**9** を 27.2 - 49.5% の収率で得た。その後、ビストリメチルスズと反応させることによってスズ体である **4**、**7**、**10** を得、スズ-ヨウ素交換反応によって、2-PI 誘導体である化合物 **5**、**8**、**11** をそれぞれ得た。**9**、**11** の三臭化ホウ素による脱メチル化反応によって **14**、**12** をそれぞれ 13%、19.5% の収率で得、**14**、**12**

とエチレンクロロヒドリンとそれぞれ反応させることによって **15**、**13** を得た。



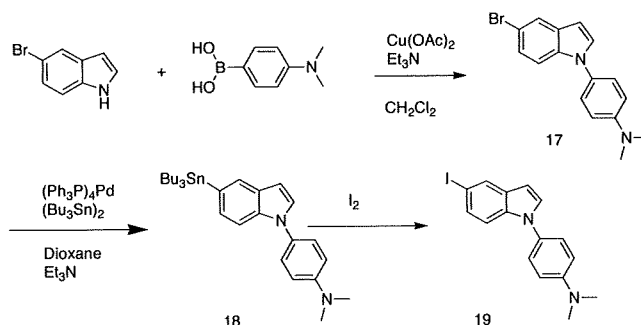
Scheme 1.

1-PI

の合成は、以前に報告された方法によって行った。5-Bromoindole と 4-(dimethylamino)phenylboronicacid を 酢酸銅存在化で反応させることでインドール骨格の 1 位にフェニル基を

導入した **17** を 44.2%の収率で得た。ビストリブチルスズと反応させることによってスズ体である **18** を得、スズ-ヨウ素交換反応によって **19**

を得た。



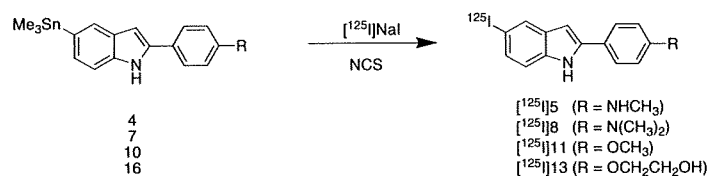
Scheme 2.

II - ii 2-PI 誘導体の ^{125}I

標識

Scheme 3 に ^{125}I 標識経路を示す。 ^{125}I 標識は以前報告された方法に従って得られた。

行い、目的とする $[^{125}\text{I}]\mathbf{5}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{8}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{11}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{13}$ を放射化学的収率 14 ~ 56%、放射化学的純度 99%以上でそれぞれ



Scheme 3.

II - iii フェニルインド

ール誘導体の $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体に対する結合親和性の検討

合成した種々のフェニルインドール誘導体の $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体への結合性を検討するため、 $[^{125}\text{I}]\text{IMPY}$ を放射性リガンドに用いたインビトロ競合阻害実験を行い、GraphPad Prism 4.0 を用いて阻害実験曲線を作成し IC_{50} を

算出した(Table 1)。阻害定数は、 $\text{Ki} = \text{IC}_{50}/(1+[\text{L}]/\text{Kd})$ の式を用いて算出した。 $[\text{L}] = [^{125}\text{I}]\text{IMPY}$ 濃度、 Kd は IMPY の解離定数($\text{Kd} = 5.0 \text{ nM}$)を用いた。

インドール骨格の2位にフェニル基を導入した 2-PI 誘導体である化合物 **5**, **8**, **11**, **12**, **13** は Ki 値がそれぞれ、27、4、20、33、26 nM と算出され、いず