

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、DPOD および 2-PI 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。また、本結果は NSAIDs を基盤分子としたアミロイドイメージングプローブ開発の妥当性を示すものであり、今後更なるリード化合物の探索研究の必要性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Ono M, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Development of novel β -amyloid probes based on 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 6867-72, 2008.

小野正博、佐治英郎、PET/SPECT による β アミロイドの分子イメージング—アルツハイマー病の早期診断を目指して、*化学*, 63, 64-65, 2008.

小野正博、PET/SPECT を用いたアルツハイマー病の画像診断、*薬剤学*, 68, 427-424, 2008.

Maya Y, Ono M, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Novel radioiodinated aurones as probes for SPECT imaging of b-amyloid plaques in the brain. *Bioconjugate Chemistry*, 20, 95-101 (2009).

Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Kawai T, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M. ^{18}F -labeled flavones for *in vivo* imaging of b-amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 2069-2076 (2009).

Watanabe H, Ono M, Ikeoka R, Haratake M, Saji H, Nakayama M. Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazoles for detecting b-amyloid plaques in the brain. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 6402-6406 (2009).

Ono M, Hayashi S, Kimura H, Kawashima H, Nakayama M, Saji H. Push-pull benzothiazole derivatives as probes for detecting b-amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 7002-7009 (2009).

Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H,

Haratake M, Saji H, Nakayama M. Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of b-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**, 6394-6401 (2009).

小野正博、中山守雄、長崎大学、平成20年2月26日

特願 2009-37773、佐治 英郎、小野 正博、河嶋 秀和、木村 寛之、ベンゾチアゾール誘導体含有診断用組成物、京都大学、平成21年2月20日

Ono M. Molecular imaging by PET/SPECT. *Yakugaku Zasshi*, **129**, 279-287 (2009).

特願 2009-50186、テクネチウム標識化合物含有診断用組成物、中山 守雄、原武 衛、小野 正博、長崎大学、平成21年3月4日

Ono M. Development of positron-emission tomography/single-photon emission computed tomography imaging probes for in vivo detection of b-amyloid plaques in Alzheimer's brains. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **57**, 1029-1039 (2009).

特願 2009-107457、佐治 英郎、小野 正博、コンフォメーション病診断用組成物、京都大学、平成21年4月27日

特願 2009-222156、佐治 英郎、小野 正博、木村 寛之、河嶋 秀和、コンフォメーション病診断のための組成物、京都大学、平成21年9月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2008-043750、ジフェニルオキサジアゾール誘導体含有診断用組成物、

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
Ono M, Haratake M, Saji H, Nakayama M	Development of novel β -amyloid probes based on 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole	Bioorganic& Medicinal Chemistry	16	6867-6872	2008
小野正博, 佐治英郎	PET/SPECT による β アミロイドの分子イメージングーアルツハイマー病の早期診断を目指して	化学	63	64-65	2008
小野正博	PET/SPECT を用いたアルツハイマー病の画像診断	薬剤学	68	427-434	2008
Maya Y, Ono M, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M	Novel radioiodinated auronas as probes for SPECT imaging of β -amyloid plaques in the brain.	Bioconjugate Chemistry	20	95-101	2009
Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Kawai T, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M.	^{18}F -labeled flavones for <i>in vivo</i> imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains	Bioorganic& Medicinal Chemistry	17	2069-2076	2009
Watanabe H, Ono M, Ikeoka R, Haratake M, Saji H, Nakayama M	Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazole for detecting β -amyloid plaques in the brain.	Bioorganic& Medicinal Chemistry	17	6402-6406	2009

Ono M, Hayashi S, Kimura H, Kawashima H, Nakayama M, Saji H	Push-pull benzothiazole derivatives as probes for detecting β -amyloid plaques in Alzheimer's brains.	Bioorganic & Medicinal Chemistry	17	7002-7007	2009
Ono M, Watanabe R, Kawashima H, Cheng Y, Kimura H, Watanabe H, Haratake M, Saji H, Nakayama M.	Fluoro-pegylated chalcones as positron emission tomography probes for in vivo imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease.	Journal of Medicinal Chemistry	52	6394-6401	2009
小野正博	PET/SPECT による分子イメージング研究	薬学雑誌	129	279-287	2009
Ono M	Development of positron-emission tomography/ single-photon emission computed tomography imaging probes for in vivo detection of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains.	Chemical & Pharmaceutical Bulletin	57	1029-1039	2009



Development of novel β -amyloid probes based on 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole

Masahiro Ono^{a,b,*}, Mamoru Haratake^a, Hideo Saji^b, Morio Nakayama^a

^a Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

^b Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida Simoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 May 2008

Revised 23 May 2008

Accepted 24 May 2008

Available online 29 May 2008

Keywords:

Alzheimer's disease

β -Amyloid

PET

SPECT

ABSTRACT

In the search for novel probes for the imaging in vivo of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease (AD) brain, we have synthesized and evaluated a series of 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole (DPOD) derivatives. The affinity for β -amyloid plaques was assessed by an in vitro-binding assay using pre-formed synthetic A β 42 aggregates. The new series of DPOD derivatives showed excellent affinity for A β aggregates with K_i values ranging from 4 to 47 nM. In biodistribution experiments using normal mice, [¹²⁵I]**12**, [¹²⁵I]**13**, [¹²⁵I]**14**, and [¹²⁵I]**15** examined displayed sufficient uptake for imaging, ranging from 2.2 to 3.3% ID/g. But the washout of the four ligands from the brain was relatively slow. Although additional modifications are necessary to improve the uptake and rapid clearance of non-specifically bound radiotracers, the DPOD pharmacophore with high-binding affinity for A β aggregates may be useful as a backbone structure to develop novel β -amyloid imaging agents.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder of the elderly and is characterized clinically by dementia, cognitive impairment, and memory loss. The neuropathological hallmarks of AD include abundant deposits of β -amyloid plaques and neurofibrillary tangles. The deposition of β -amyloid plaques has been regarded as an initial event in the pathogenesis of AD.^{1,2} Therefore, the quantitative evaluation of β -amyloid plaques in the brain with non-invasive techniques such as positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT) could lead to the presymptomatic detection of AD and new anti-amyloid therapies.^{3–5}

Developing β -amyloid imaging probes is currently an emerging field of research. The basic requirements for suitable probes include (i) good penetration of the blood–brain barrier, (ii) selectively binding or labeling β -amyloid plaques, and (iii) displaying clear and contrasting signals between plaques and non-plaques. Based on these requirements, several promising agents with the backbone structure of DDNP, thioflavin-T, and Congo Red have been synthesized and evaluated for use in vivo as probes to image β -amyloid plaques in AD brain. Clinical trials in AD patients have been conducted with several agents including [¹⁸F]FDDNP,^{6,7} [¹¹C]6-OH-BTA-1,^{8,9} [¹¹C]SB-13,^{10,11} [¹⁸F]BAY94-9172,¹² and [¹²³I]JIMPY^{13,14} (Fig. 1) indicating the imaging of β -amyloid plaques in the living human brain to be useful for the diagnosis of AD.

Recently, a number of groups have reported new β -amyloid-binding probes without the basic structures of DDNP, thioflavin-T and Congo Red. Most of these probes have two aromatic rings. Among them, 1,4-diphenyltriazole and 2,5-diphenylthiophene derivatives have triazole and thiophene between two benzene rings, respectively, and it has been shown that they have tolerance for binding to A β aggregates.^{15,16} In an attempt to further develop novel ligands for the imaging of amyloid plaques in AD, we designed a series of 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole (DPOO) derivatives, in which triazole or thiophene of the 1,4-diphenyltriazole and 2,5-diphenylthiophene backbone was replaced with 1,2,4-oxadiazole. To our knowledge, this is the first time the use of DPOD derivatives in vivo as probes to image β -amyloid plaques in the AD brain has been proposed. Described herein is the synthesis of a novel series of DPOD derivatives and the characterization as β -amyloid imaging agents.

2. Results and discussion

The synthesis of the DPOD derivatives is outlined in Schemes 1 and 2. A wide variety of reaction conditions have been published for the synthesis of 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazoles.¹⁷ Among them, we used the reaction of an amidoxime with a carboxylic acid to form 1,2,4-oxadiazoles. In this process, the 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazoles (**1** and **5**) were prepared by the condensation of 4-bromobenzamidoxime with 4-nitrobenzoic acid and 4-methoxybenzoic acid in the presence of DCC and HOBT. The amino derivative **2** was readily prepared from **1** by reduction with SnCl₂ (80.8% yield). Conversion of **2** to the monomethylamino derivative **3** was achieved by a method reported previously¹⁸ (50.3% yield).

* Corresponding author. Tel.: +81 75 753 4608; fax: +81 75 753 4568.
E-mail address: ono@pharm.kyoto-u.ac.jp (M. Ono).

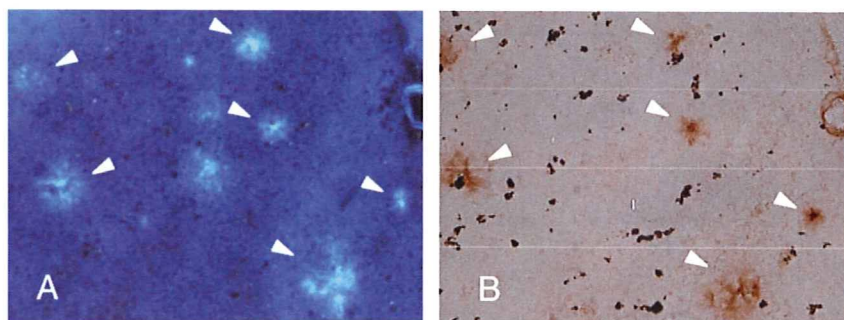
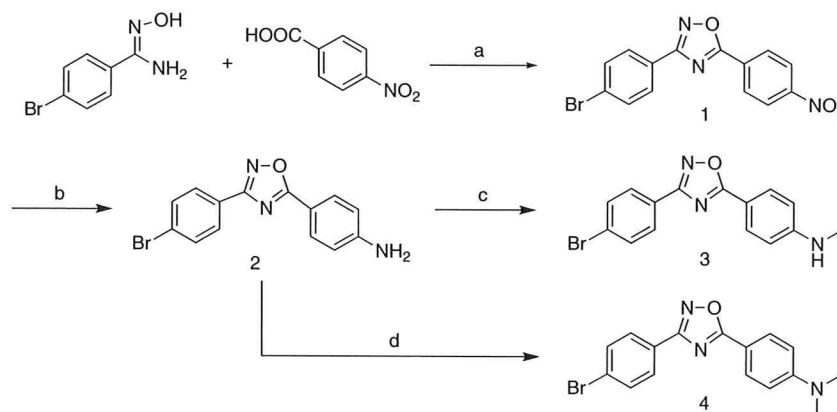
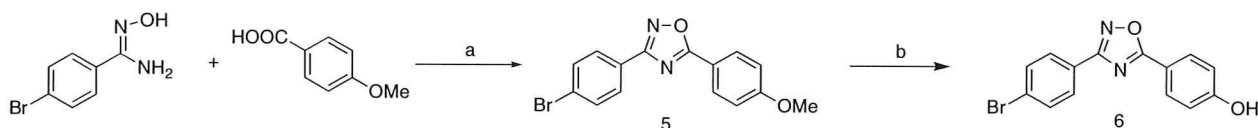


Figure 1. Neuropathological staining of compound **14** on 10- μ m AD model mouse sections. (A) Many β -amyloid plaques were clearly stained with **14**. (B) The serial sections were immunostained using an antibody against β -amyloid.



Scheme 1. (a) DCC, HOBT, DMF; (b) SnCl_2 , EtOH; (c) NaOMe, $(\text{CH}_2\text{O})_n$, NaBH_4 , MeOH; (d) $(\text{CH}_2\text{O})_n$, NaCNBH₃, AcOH.



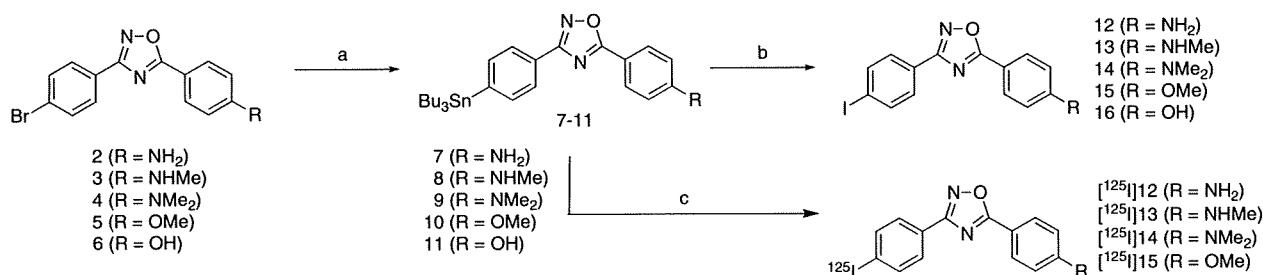
Scheme 2. (a) DCC, HOBT, DMF; (b) BBr_3 , CH_2Cl_2 .

Compound **2** was also converted to the dimethylamino derivative **4** by an efficient method¹⁹ with paraformaldehyde and acetic acid (68.4% yield). Compound **5** was converted to **6** by demethylation with BBr_3 in CH_2Cl_2 (50.6% yield). The tributyltin derivatives (**7**, **8**, **9**, **10**, and **11**) were prepared from the corresponding bromo compounds (**2**, **3**, **4**, **5**, and **6**) using a bromo to tributyltin exchange reaction catalyzed by Pd(0) for yields of 16.8%, 15.8%, 20.3%, 22.8%, and 60.1%, respectively. These tributyltin derivatives were readily reacted with iodine in chloroform at room temperature to give the iodo derivatives (**12**, **13**, **14**, **15**, and **16**) for yields of 66.1%, 86.0%, 72.4%, 69.2%, and 81.8%. Furthermore, these tributyltin derivatives can be also used as the starting materials for radioiodination in the preparation of [¹²⁵I]**12**, [¹²⁵I]**13**, [¹²⁵I]**14**, and [¹²⁵I]**15**. Novel radioiodinated DPOD derivatives were achieved by an iododestannylation reaction using hydrogen peroxide as the oxidant which produced the desired radioiodinated ligands (Scheme 3). It was anticipated that the no-carrier-added preparation would result in a final product bearing a theoretical specific activity similar to that of ¹²⁵I (2200 Ci/mmol). The radiochemical identities of the radioiodinated ligands were verified by co-injection with non-radioactive compounds from their HPLC profiles. The final radioiodinated compounds, [¹²⁵I]**12**, [¹²⁵I]**13**, [¹²⁵I]**14**, and [¹²⁵I]**15**, showed a single peak of radioactivity at a retention time of 8.4, 15.7, 25.5, 22.3, and 7.1 min, respectively. Four radio-

iodinated products were obtained in 50–70% radiochemical yields with a radiochemical purity of >95% after HPLC.

The affinity of DPOD derivatives (compounds **12**, **13**, **14**, **15**, and **16**) was evaluated based on inhibition of the binding of [¹²⁵I]IMPY to $\text{A}\beta(1-42)$ aggregates. As shown in Table 1, all the derivatives competed well with [¹²⁵I]IMPY to bind the aggregates. The K_i values estimated for **12**, **13**, **14**, **15**, and **16** were 14, 14, 15, 4, and 47 nM, respectively. The introduction into the DPOD backbone of an aminophenyl moiety, such as aminophenyl, methylaminophenyl or dimethylaminophenyl, resulted in good affinity. Further modification of the aminophenyl moiety with another electron-donating group, such as methoxyphenyl or hydroxyphenyl, resulted in a difference in binding to $\text{A}\beta$ aggregates, with the methoxy derivative **15** having 10-fold higher affinity than the hydroxy derivative **16**.

To confirm the affinity of DPOD derivatives for β -amyloid plaques in the AD brain, fluorescent staining of sections of mouse brain from an animal model of AD was carried out with compound **14** (Fig. 1). Many β -amyloid plaques were clearly stained with compound **14**, as reflected by the affinity for $\text{A}\beta$ aggregates in *in vitro* competition assays. The labeling pattern was consistent with that observed by immunohistochemical labeling with an antibody specific for $\text{A}\beta$, indicating that DPOD derivatives show specific binding to β -amyloid plaques. Thus, the results suggest that DPOD



Scheme 3. (Bu₃Sn)₂, Pd(PhP₃)₂, Et₃N, dioxane; (b) I₂, CHCl₃; (c) [¹²⁵I]NaI, H₂O₂, HCl.

Table 1
Inhibition constants for the binding of DPOD derivatives determined using [¹²⁵I]JMPY as the ligand in Aβ(1–42) aggregates

Compound	K _i ^a (nM)
12	14.2 ± 1.4
13	14.3 ± 3.6
14	15.4 ± 1.4
15	4.3 ± 2.1
16	47.1 ± 4.1

^a Values are means ± standard error of the mean for 3–6 independent experiments.

derivatives may be applicable to the in vivo imaging of β-amyloid plaques in the brain.

To evaluate the uptake of DPOD derivatives in the brain, biodistribution experiments in normal mice were performed with four radioiodinated DPOD derivatives ([¹²⁵I]12, [¹²⁵I]13, [¹²⁵I]14, and [¹²⁵I]15), which showed strong affinity for Aβ aggregates in the in vitro-binding assays (Table 2). All four ligands penetrated the brain well with a delayed peak time at 30 and 60 min for uptakes (2.3–3.3%ID/g brain) in normal mice. But as a prerequisite for an imaging agent, they should be washed out from the normal brain, because there is no trapping mechanism for DPOD derivatives. Nevertheless, the long retention of these probes in the normal mouse brain suggested extensive non-specific binding which will contribute to a high level of background noise in vivo. Previously, we reported radioiodinated benzofuran derivatives as potential β-amyloid-binding agents.²⁰ The radioiodinated benzofurans penetrated the brain well with a peak uptake at 30–60 min postinjection, but a slow washout in normal mice prevents these probes from being used for imaging in vivo. More recently, we developed ¹¹C-labeled benzofuran derivatives, which are less lipophilic by replacing the iodine with a hydroxy group.²¹ [¹¹C]benzofuran showed a higher and faster peak of brain uptake and a faster washout from the brain in the normal mice. The improved properties in vivo observed with [¹¹C]benzofuran make it a better candidate for the imaging of β-amyloid plaques. Indeed, the initial result obtained with [¹¹C]benzofuran in a transgenic2576 mouse showed a relatively high S/N ratio.²¹ Similar to [¹²⁵I]benzofuran, the DPOD derivatives had unfavorable in vivo pharmacokinetics in normal mice, despite their good affinity for Aβ aggregates. Additional structural changes, that is, reducing the lipophilicity by introducing a hydrophilic group, are necessary to improve the in vivo properties of the DPOD derivatives.

3. Conclusion

In conclusion, we successfully designed and synthesized a new series of DPOD derivatives as probes for the in vivo imaging of β-amyloid plaques in the brain. The derivatives displayed excellent affinity for Aβ aggregates in in vitro-binding experiments. The de-

Table 2
Biodistribution of radioactivity after intravenous administration of [¹²⁵I]12, [¹²⁵I]13, [¹²⁵I]14, and [¹²⁵I]15 in mice^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[¹²⁵I]12				
Blood	4.55 (0.64)	2.32 (0.63)	3.09 (0.22)	2.99 (0.31)
Liver	21.36 (3.13)	17.37 (1.72)	14.89 (1.47)	12.33 (2.19)
Kidney	8.24 (1.26)	6.94 (0.70)	5.86 (0.56)	5.15 (0.74)
Intestine	1.50 (0.36)	3.08 (0.47)	5.84 (0.75)	8.33 (1.39)
Spleen	6.13 (1.67)	8.87 (2.35)	6.89 (0.81)	5.02 (0.55)
Pancreas	3.69 (2.30)	3.88 (0.54)	3.36 (0.36)	2.83 (0.32)
Heart	9.29 (1.66)	4.02 (0.48)	3.48 (0.24)	3.51 (0.61)
Stomach ^b	0.92 (0.31)	1.70 (0.18)	4.05 (0.96)	5.15 (1.32)
Brain	1.61 (0.23)	2.48 (0.16)	3.32 (0.31)	3.29 (0.58)
[¹²⁵I]13				
Blood	3.54 (0.26)	1.84 (0.24)	1.52 (0.13)	1.54 (0.09)
Liver	14.62 (1.30)	12.37 (2.09)	8.53 (0.98)	7.30 (0.78)
Kidney	9.53 (0.83)	5.30 (0.94)	3.39 (0.66)	3.02 (0.58)
Intestine	1.36 (0.21)	2.83 (0.93)	5.67 (1.44)	8.46 (1.36)
Spleen	4.58 (0.62)	4.70 (0.48)	2.84 (0.35)	2.14 (0.22)
Pancreas	3.34 (0.38)	3.91 (0.60)	3.06 (0.58)	1.88 (0.25)
Heart	9.51 (0.77)	3.05 (0.50)	1.68 (0.21)	1.27 (0.20)
Stomach ^b	1.08 (0.11)	2.32 (0.62)	4.89 (0.99)	7.38 (0.97)
Brain	1.44 (0.12)	1.98 (0.36)	2.56 (0.44)	2.70 (0.33)
[¹²⁵I]14				
Blood	5.42 (0.85)	2.41 (0.22)	1.79 (0.24)	1.56 (0.27)
Liver	13.94 (3.26)	8.27 (1.49)	5.89 (1.75)	5.15 (1.92)
Kidney	7.83 (3.53)	7.67 (1.62)	4.81 (1.01)	3.31 (0.77)
Intestine	1.59 (0.28)	2.40 (0.36)	4.12 (0.99)	5.37 (1.01)
Spleen	6.26 (1.53)	4.56 (1.11)	3.11 (0.62)	2.41 (0.29)
Pancreas	3.17 (0.73)	3.80 (0.50)	2.86 (1.64)	2.47 (0.62)
Heart	11.04 (2.43)	4.81 (1.07)	2.20 (0.54)	1.24 (0.68)
Stomach ^b	1.28 (0.21)	3.28 (0.36)	4.80 (0.56)	5.75 (2.47)
Brain	1.07 (0.23)	1.45 (0.27)	2.23 (0.61)	2.32 (0.64)
[¹²⁵I]15				
Blood	1.96 (0.66)	1.63 (0.14)	1.23 (0.39)	1.12 (0.26)
Liver	11.94 (1.92)	9.35 (1.17)	6.13 (0.76)	4.44 (0.60)
Kidney	8.77 (1.17)	6.22 (0.87)	3.85 (1.01)	2.95 (0.66)
Intestine	1.70 (0.27)	3.53 (0.32)	6.62 (0.90)	8.21 (1.84)
Spleen	4.41 (0.72)	3.62 (0.28)	2.13 (0.53)	1.34 (0.40)
Pancreas	4.55 (0.77)	4.94 (0.26)	2.84 (0.48)	1.45 (0.28)
Heart	11.30 (1.92)	4.44 (0.67)	1.84 (0.32)	1.35 (0.29)
Stomach ^b	0.62 (0.21)	1.64 (0.10)	2.46 (0.80)	3.16 (1.39)
Brain	2.06 (0.45)	2.76 (0.23)	2.82 (0.34)	2.01 (0.33)

^a Expressed as % injected dose per gram. Each value represents the mean (s.d.) for 3–5 animals at each interval.

^b Expressed as % injected dose per organ.

gree to which the DPOD derivatives penetrated the brain was also very encouraging. However, non-specific binding in vivo reflected by a slow washout from the normal mouse brain makes them unsuitable for the imaging of β-amyloid plaques. The less than ideal in vivo biodistribution results in normal mice indicate that there is a critical need to fine-tune the kinetics of brain uptake and washout. Additional changes to the DPOD pharmacophore with

high-binding affinity for β aggregates may lead to useful probes for detecting β -amyloid plaques in the AD brain.

4. Experimental

4.1. General information

All reagents were commercial products and used without further purification unless otherwise indicated. ^1H NMR spectra were obtained on a Varian Gemini 300 spectrometer with TMS as an internal standard. Coupling constants are reported in Hertz. Multiplicity is defined by s (singlet), d (doublet), t (triplet), br (broad), and m (multiplet). Mass spectra were obtained on a JEOL IMS-DX instrument.

4.1.1. 3-(4-Bromophenyl)-5-(4-nitrophenyl)-1,2,4-oxadiazole (1)

To a stirring solution of 4-bromobenzamidoxime (645 mg, 3 mmol) and 4-nitrobenzoic acid (495 mg, 3 mmol) in DMF (10 mL) was added a solution of DCC (3.6 mmol) and HOBT (6.0 mmol) in DMF (5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 18 h, and then at 100 °C for 2 h. The solvent was removed, and the residue was purified by silica gel chromatography (hexane/ethyl acetate = 9:1) to give 370 mg of **1** (35.6%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.06 (d, J = 8.7 Hz, 2H), and 8.43 (s, 4H). MS m/z 346 (M^+).

4.1.2. 4-(3-(4-Bromophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)aniline (2)

A mixture of **1** (350 mg, 1 mmol), SnCl_2 (948 mg, 5 mmol) and EtOH (15 mL) was stirred under reflux for 2 h. After the mixture had cooled to room temperature, 1 M NaOH (100 mL) was added until the mixture became alkaline. After extraction with ethyl acetate (100 mL \times 2), the combined organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and evaporated to give 258 mg of **2** (80.8%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.16 (s, 2H), 6.75 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.00 (d, J = 9.0 Hz, 2H), and 8.03 (d, J = 6.3 Hz, 2H). MS m/z 316 (M^+).

4.1.3. 4-(3-(4-Bromophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-*N*-methylaniline (3)

A solution of NaOCH_3 (28 wt% in MeOH, 0.4 mL) was added to a mixture of **2** (185 mg, 0.59 mmol) and paraformaldehyde (176 mg, 0.59 mmol) in methanol (10 mL) dropwise. The mixture was stirred under reflux for 30 min. After NaBH_4 (225 mg, 5.9 mmol) was added, the solution was heated under reflux for 1.5 h. 1 M NaOH (50 mL) was added to the cold mixture and extracted with CHCl_3 (50 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 and filtered. The solvent was removed, and the residue was purified by silica gel chromatography (hexane/ethyl acetate = 4:1) to give 98 mg of **3** (50.3%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.93 (s, 3H), 4.30 (s, 1H), 6.66 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.7 Hz, 2H), and 8.03 (d, J = 8.7 Hz, 2H). MS m/z 330 (M^+).

4.1.4. 4-(3-(4-Bromophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-*N,N*-dimethylaniline (4)

To a stirred mixture of **2** (35 mg, 0.10 mmol) and paraformaldehyde (36 mg, 1.2 mmol) in AcOH (5 mL) was added NaCNBH_3 (50 mg, 0.80 mmol) in one portion at room temperature. The resulting mixture was stirred at room temperature for 2 h. After 1 M NaOH (30 mL) was added and extraction with CH_3Cl (30 mL), the organic phase was dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed and the residue was purified by silica gel chromatography (hexane/ethyl acetate = 4:1) to give 24 mg of **4** (68.4%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.09 (s, 6H), 6.75 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.35 (d, J = 8.7 Hz, 2H), and 8.43 (d, J = 8.7 Hz, 2H). MS m/z 344.

4.1.5. 3-(4-Bromophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazole (5)

The same reaction as described above to prepare **1** was used, and 153 mg of **5** was obtained in a 23.1% yield from 4-bromobenzamidoxime and 4-anisic acid. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.91 (s, 3H), 7.05 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.15 (d, J = 9.0 Hz, 2H). MS m/z 330 (M^+).

4.1.6. 4-(3-(4-Bromophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (6)

BBr_3 (4.5 mL, 1 M solution in CH_2Cl_2) was added to a solution of **5** (300 mg, 0.91 mmol) in CH_2Cl_2 (10 mL) dropwise in an ice bath. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 42 h. Water (30 mL) was added while the reaction mixture was cooled in an ice bath. The mixture was extracted with chloroform (30 mL \times 2) and the organic phase was dried over Na_2SO_4 and filtered. The solvent was removed and the residue was purified by silica gel chromatography (hexane/ethyl acetate = 4:1) to give 146 mg of **6** (50.6%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.99 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 8.04 (d, J = 8.1 Hz, 2H), and 8.12 (d, J = 9.0 Hz, 2H). MS m/z 316 (M^+).

4.1.7. 4-(3-(4-(Tributylstannyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)aniline (7)

A mixture of **2** (100 mg, 0.32 mmol), bis(tributyltin) (0.2 mL) and $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$ (16 mg, 0.014 mmol) in a mixed solvent (10 mL, 3:2 dioxane/triethylamine mixture) was stirred for 10 h under reflux. The solvent was removed, and the residue was purified by silica gel chromatography (hexane/ethyl acetate = 3:1) to give 28 mg of **7** (16.8%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.87–1.61 (m, 27H), 4.13 (s, 2H), 6.76 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 8.1 Hz, 2H), and 8.28 (s, 1H).

4.1.8. *N*-Methyl-4-(3-(4-(tributylstannyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)aniline (8)

The same reaction as described above to prepare **7** was employed, and 23 mg of **8** was obtained in a 15.8% yield from **3**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.87–1.63 (m, 27H), 2.92 (s, 3H), 4.27 (s, 1H), 6.66 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H), and 8.08 (d, J = 7.8 Hz, 2H).

4.1.9. *N,N*-Dimethyl-4-(3-(4-(tributylstannyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)aniline (9)

The same reaction as described above to prepare **7** was employed, and 45 mg of **9** was obtained in a 20.3% yield from **4**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.87–1.58 (m, 27H), 3.09 (s, 6H), 6.76 (d, J = 9.6 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.05 (d, J = 8.4 Hz, 2H), and 8.08 (d, J = 8.4 Hz, 2H).

4.1.10. 5-(4-Methoxyphenyl)-3-(4-(tributylstannyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazole (10)

The same reaction as described above to prepare **7** was employed, and 42 mg of **10** was obtained in a 22.8% yield from **5**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.87–1.59 (m, 27H), 3.91 (s, 3H), 7.04 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 8.07 (d, J = 9.0 Hz, 2H), and 8.17 (d, J = 9.0 Hz, 2H).

4.1.11. 4-(3-(4-(Tributylstannyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (11)

The same reaction as described above to prepare **7** was employed, and 28 mg of **11** was obtained in a 60.1% yield from **6**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.87–1.58 (m, 27H), 6.99 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.61 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 8.07 (d, J = 8.7 Hz, 2H), and 8.12 (d, J = 8.7 Hz, 2H).

4.1.12. 4-(3-(4-Iodophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)aniline (12)

To a solution of **7** (27 mg, 0.05 mmol) in CHCl_3 (5 mL) was added a solution of iodine in CHCl_3 (1 mL, 50 mg/mL) at room temperature. The mixture was stirred at room temperature for 10 min and a saturated NaHSO_3 solution (25 mL) was added. The mixture was stirred for 5 min and the organic phase was separated. The aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (25 mL \times 2), and the combined organic phase was dried over Na_2SO_4 and filtered. The solvent was removed and the residue was washed with hexane to give 12 mg of **12** (66.1%). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4.15 (s, 2H), 6.76 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.89 (d, J = 8.4 Hz, 2H), and 8.01 (d, J = 8.7 Hz, 2H). HRMS m/z $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{OI}$ found 362.9855/ calcd 362.9869 (M^+).

4.1.13. 4-(3-(4-Iodophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-*N*-methylaniline (13)

The same reaction as described above to prepare **12** was employed and 20 mg of **13** was obtained in a 86.0% yield from **8**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2.93 (s, 3H), 4.29 (s, 1H), 6.66 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.85 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 8.4 Hz, 2H), and 8.02 (d, J = 8.4 Hz, 2H). HRMS m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{OI}$ found 377.0022/ calcd 377.0025 (M^+).

4.1.14. 4-(3-(4-Iodophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)-*N,N*-dimethylaniline (14)

The same reaction as described above to prepare **12** was employed and 34 mg of **14** was obtained in a 72.4% yield from **9**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.09 (s, 6H), 6.75 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 8.7 Hz, 2H), and 8.04 (d, J = 9.3 Hz, 2H). HRMS m/z $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{OI}$ found 391.0192/ calcd 391.0182 (M^+).

4.1.15. 3-(4-Iodophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazole (15)

The same reaction as described above to prepare **12** was employed and 17 mg of **15** was obtained in a 69.2% yield from **10**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.89 (s, 3H), 6.97 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 7.48 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.80 (d, J = 9.3 Hz, 2H), and 7.85 (d, J = 9.0 Hz, 2H). HRMS m/z $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2\text{I}$ found 377.9865/ calcd 377.9872 (M^+).

4.1.16. 4-(3-(4-Iodophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenol (16)

The same reaction as described above to prepare **12** was employed and 14 mg of **16** was obtained in a 81.8% yield from **11**. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 6.99 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.88 (d, J = 8.1 Hz, 2H), and 8.12 (d, J = 8.1 Hz, 2H). HRMS m/z $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2\text{I}$ found 363.9704/ calcd 363.9709 (M^+).

4.2. Iododestannylation reaction

The radioiodinated forms of compounds **12**, **13**, **14**, and **15** were prepared from the corresponding tributyltin derivatives by iododestannylation. Briefly, to initiate the reaction, 50 μL of H_2O_2 (3%) was added to a mixture of a tributyltin derivative (100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ EtOH), ^{125}I NaI (0.1–0.2 mCi, specific activity 2200 Ci/mmol), and 100 μL of 1 N HCl in a sealed vial. The reaction was allowed to proceed at room temperature for 10 min and terminated by addition of NaHSO_3 . After neutralization with sodium bicarbonate and extraction with ethyl acetate, the extract was dried by passing it through an anhydrous Na_2SO_4 column and then blown dry with a stream of nitrogen gas. The radioiodinated ligand was purified by HPLC on a Cosmosil C18 column with an isocratic solvent of $\text{H}_2\text{O}/\text{acetonitrile}$ (3/7) at a flow rate of 1.0 mL/min. The purified ligand was stored at -20°C for the in vitro binding and biodistribution experiments.

4.3. Binding assays using the aggregated A β peptide in solution

A solid form of A β (1–42) was purchased from Peptide Institute (Osaka, Japan). Aggregation of peptides was carried out by gently dissolving the peptide (0.25 mg/mL) in a buffer solution (pH 7.4) containing 10 mM sodium phosphate and 1 mM EDTA. The solutions were incubated at 37°C for 42 h with gentle and constant shaking. Binding experiments were carried out as described previously.²² ^{125}I IMPY (6-iodo-2-(4'-dimethylamino)phenyl-imidazo[1,2]pyridine) with 2200 Ci/mmol specific activity and greater than 95% radiochemical purity was prepared using the standard iododestannylation reaction as described previously.¹³ Binding assays were carried out in 12×75 mm borosilicate glass tubes. The reaction mixture contained 50 μL of A β (1–42) aggregates (29 nM in the final assay mixture), 50 μL of ^{125}I IMPY (0.02 nM diluted in 10% EtOH), 50 μL of inhibitor (8 pM–12.5 μM diluted in 10% EtOH), and 850 μL of 10% EtOH. Non-specific binding was defined in the presence of 400 nM IMPY in the same assay tubes. The mixture was incubated at 37°C for 3 h and the bound and the free radioactivities were separated by vacuum filtration through Whatman GF/B filters using a Brandel M-24R cell harvester followed by 2×3 mL washes with 10% EtOH at room temperature. Filters containing the bound I-125 ligand were placed in a gamma counter (Aloka, ARC-380) for measuring radioactivity. Under the assay conditions, the specifically bound fraction accounted for less than 15% of the total radioactivity. Values for the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) were determined from displacement curves using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA), and those for the inhibition constant (K_i) were calculated using the Cheng-Prusoff equation.²³

4.4. Neuropathological staining of model mouse brain sections

The Tg2576 transgenic mice (female, 23-month-old) were used as Alzheimer's model mice. After the mice were sacrificed by decapitation, the brains were immediately removed and frozen in powdered dry ice. The frozen blocks were sliced into serial sections, 10- μm thick. Each slide was incubated with a 50% ethanol solution (100 μM) of compound **14**. The sections were washed in 50% ethanol for 3 min two times. Fluorescent observation was performed with the Nikon system. Thereafter, the serial sections were also immunostained with DAB as a chromogen using monoclonal antibodies against β -amyloid (Amyloid β -Protein Immunohistostain kit, WAKO).

4.5. In vivo biodistribution in normal mice

The experiments with animals were conducted in accordance with our institutional guidelines and were approved by Nagasaki University Animal Care Committee. A saline solution (100 μL) containing ethanol (10 μL) of radiolabeled agents (0.5 μCi) was injected intravenously directly into the tail vein of ddY mice (5-week-old, 22–25 g). The mice were sacrificed at various time points post-injection. The organs of interest were removed and weighed, and the radioactivity was measured with an automatic gamma counter (Aloka, ARC-380).

Acknowledgments

This study was supported by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) and Health Labour Sciences Research Grant.

References and notes

- Selkoe, D. J. *Physiol. Rev.* **2001**, *81*, 741.
- Hardy, J.; Selkoe, D. J. *Science* **2002**, *297*, 353.

3. Selkoe, D. J. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 823.
4. Nordberg, A. *Lancet Neurol.* **2004**, *3*, 519.
5. Mathis, C. A.; Wang, Y.; Klunk, W. E. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1469.
6. Agdeppa, E. D.; Kepe, V.; Liu, J.; Flores-Torres, S.; Satyamurthy, N.; Petric, A.; Cole, G. M.; Small, G. W.; Huang, S. C.; Barrio, J. R. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, RC189.
7. Shoghi-Jadid, K.; Small, G. W.; Agdeppa, E. D.; Kepe, V.; Ercoli, L. M.; Siddarth, P.; Read, S.; Satyamurthy, N.; Petric, A.; Huang, S. C.; Barrio, J. R. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2002**, *10*, 24.
8. Mathis, C. A.; Wang, Y.; Holt, D. P.; Huang, G. F.; Debnath, M. L.; Klunk, W. E. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2740.
9. Klunk, W. E.; Engler, H.; Nordberg, A.; Wang, Y.; Blomqvist, G.; Holt, D. P.; Bergstrom, M.; Savitcheva, I.; Huang, G. F.; Estrada, S.; Ausen, B.; Debnath, M. L.; Barletta, J.; Price, J. C.; Sandell, J.; Lopresti, B. J.; Wall, A.; Koivisto, P.; Antoni, G.; Mathis, C. A.; Langstrom, B. *Ann. Neurol.* **2004**, *55*, 306.
10. Ono, M.; Wilson, A.; Nobrega, J.; Westaway, D.; Verhoeff, P.; Zhuang, Z. P.; Kung, M. P.; Kung, H. F. *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 565.
11. Verhoeff, N. P.; Wilson, A. A.; Takeshita, S.; Trop, L.; Hussey, D.; Singh, K.; Kung, H. F.; Kung, M. P.; Houle, S. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **2004**, *12*, 584.
12. Rowe, C. C.; Ackerman, U.; Browne, W.; Mulligan, R.; Pike, K. L.; O'Keefe, G.; Tochon-Danguy, H.; Chan, G.; Berlangieri, S. U.; Jones, G.; Dickinson-Rowe, K. L.; Kung, H. P.; Zhang, W.; Kung, M. P.; Skovronsky, D.; Dyrks, T.; Holl, G.; Krause, S.; Friebe, M.; Lehman, L.; Lindemann, S.; Dinkelborg, L. M.; Masters, C. L.; Villemagne, V. L. *Lancet Neurol.* **2008**, *7*, 129.
13. Kung, M.; Kung, M. P.; Hou, C.; Zhuang, Z. P.; Zhang, B.; Skovronsky, D.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M.; Kung, H. F. *Brain Res.* **2002**, *956*, 202.
14. Newberg, A. B.; Wintering, N. A.; Plossl, K.; Hochold, J.; Stabin, M. G.; Watson, M.; Skovronsky, D.; Clark, C. M.; Kung, M. P.; Kung, H. F. *J. Nucl. Med.* **2006**, *47*, 78.
15. Qu, W.; Kung, M. P.; Hou, C.; Oya, S.; Kung, H. F. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3380.
16. Chandra, R.; Kung, M. P.; Kung, H. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1350.
17. Santagada, V.; Frecentese, F.; Perissutti, E.; Cirillo, D.; Terracciano, S.; Caliendo, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4491.
18. Barluenga, A. M.; Bayron, G.; Asensio, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 1334.
19. Gribble, G. W.; Nutaitis, C. F. *Synthesis* **1987**, 709.
20. Ono, M.; Kung, M. P.; Hou, C.; Kung, H. F. *Nucl. Med. Biol.* **2002**, *29*, 633.
21. Ono, M.; Kawashima, H.; Nonaka, A.; Kawai, T.; Haratake, M.; Mori, H.; Kung, M.-P.; Kung, H. F.; Saji, H.; Nakayama, M. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2725.
22. Kung, M. P.; Hou, C.; Zhuang, Z. P.; Skovronsky, D.; Kung, H. F. *Brain Res.* **2004**, *1025*, 98.
23. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099.

PET/SPECT によるβアミロイドの分子イメージング

——アルツハイマー病の早期診断を目指して

O no Masahiro Saji Hideo
小野 正博・佐治 英郎

Keyword

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD), PET/SPECT (positron emission tomography/single photon emission computed tomography), アミロイドβタンパク質 (amyloid beta protein ; Aβ), 分子イメージング (molecular imaging)

近年の急速な高齢化に伴い、アルツハイマー病 (AD) をはじめとする痴呆性疾患の増加が大きな社会問題の一つになっている。AD の早期診断は早期治療に不可欠であるが、現在、AD の確定診断は死後脳の病理学的所見にゆだねられており、広範な脳障害が生じる前の早期段階で AD を診断することは困難となっている。これまでに AD の生物学的診断マーカーとしていくつかの報告があるが、臨床上実用的な方法はいまだ確立されていない。このように AD の早期診断に対する社会的要求は高く、その早急な開発が強く望まれている。

特徴的な AD の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¹⁾。前者のおもな構成成分はβシート構造をとったアミロイドβタンパク質 (Aβ) であり、後者は過剰リン酸化されたタウタンパク質である。とくに Aβ の蓄積は AD 発症過程の最も初期段階より始まることから、その検出は AD の早期診断につながる可能性がある。このような概念のもと、AD 脳内に沈着する老人斑アミロイドを体外から鋭敏に画像化できる化合物 (分子プローブ) の開発が活発に行われている²⁾。ここでは、βアミロイドのイメージング用分子プローブの開発状況について紹介する。

アミロイドイメージングの原理

脳内アミロイドイメージングは、AD の初期脳病変である老人斑の主要な構成成分であるアミロイドβタンパク質を、陽電子断層撮像法 (PET) や単光子コンピュータ断層撮像法 (SPECT) によって体外から画像化する技術である。老人斑アミロイドは、セクレターゼβおよびγにより切断されたアミロイドβタンパク質 [Aβ (1-40) および Aβ (1-42)] が凝集・繊維化し脳内に蓄積する。脳内に蓄積した老人斑アミロイドを体外から画像化するためには、生体内に投与さ

れたプローブが血液脳関門を透過し、脳組織内へ移行することが必須である。次に、脳移行後に老人斑アミロイドへ選択的に結合する必要がある。結合性に関しては、アミロイドとの結合解離定数 (K_d) が 20 nM 以下であれば、アミロイドイメージングに応用可能と考えられている³⁾。さらに、アミロイドの画像精度を向上させるためには、脳内移行後にアミロイドの存在しない正常脳部位から、血液中に可能な限り速やかに消失する必要がある。これらの条件を同時に満たすプローブが脳内アミロイドイメージングに理想的であり、現在、高性能なプローブの開発研究が活発に行われている。

アミロイドイメージング用分子プローブの開発状況

既報のアミロイドイメージング用分子プローブの多くは、コンゴローレッドおよびチオフラビン T という、2 種類の古典的ア

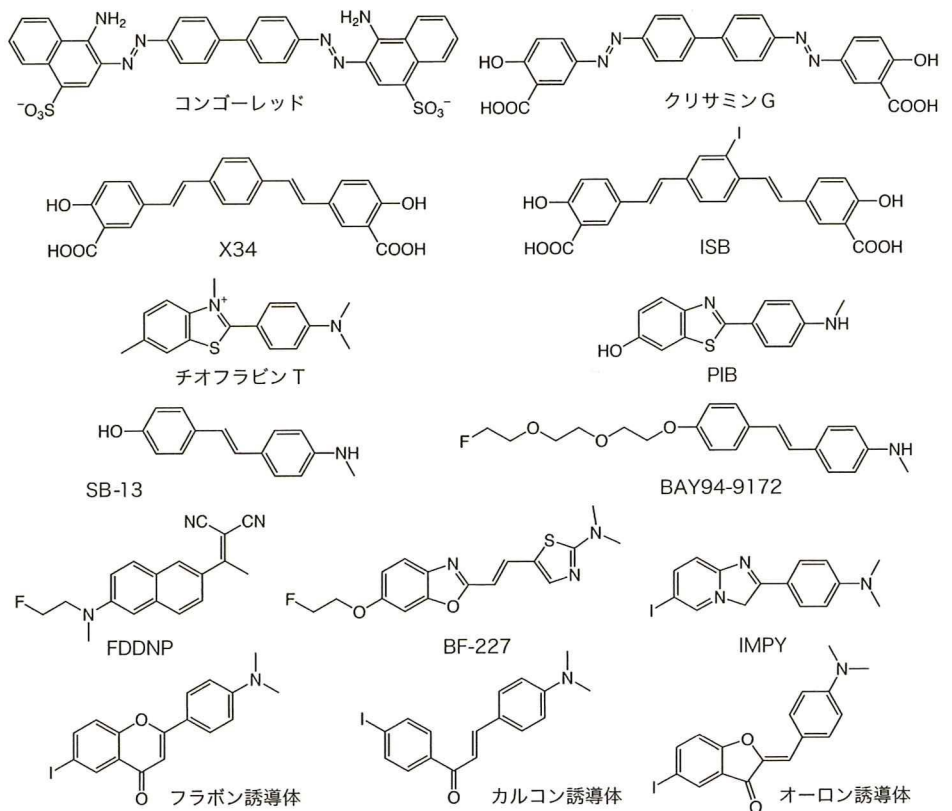


図 1 代表的なアミロイドイメージング用分子プローブの化学構造

ミロイド蛍光染色試薬の化学構造から派生した化合物である。いずれもアミロイドに高い結合性をもつため、これら化合物を放射性同位元素で標識し、生体内に投与すれば、脳内のアミロイドを画像化できる、という戦略に基づいている。

コンゴレッドは、イオン性化合物で電荷をもつこと、分子サイズが大きいこと、などの理由から血液脳関門の透過には適していない。これまでに、コンゴレッド派生化合物として、クリサミン G, X34, ISB など (図 1) が開発されてきたが、いずれもその分子量の大きさのため、十分な脳移行量が達成されず、臨床試験まで到達したプローブの報告はいまだない³⁾。

チオフラビン T は、コンゴレッドに比べ分子量が小さく、生体内へ投与後の脳移行性が期待されることから、多くの誘導体が開発されてきた (図 1)。なかでも、Mathis らから報告された ^{11}C 標識の 6-OH-BTA-1 (PIB) は、現在、最も代表的な分子プローブであり⁴⁾、臨床試験において、前頭葉や側頭葉など老人斑の沈着が多い部位への放射能集積が確認され、PIB-PET によりアルツハイマー病脳と健常脳とが鑑別可能であることが報告されている (図 2)⁵⁾。 ^{11}C PIB はヒトのアミロイド斑への高い結合性を示す一方で、モデルマウスのアミロイド斑への結合性は低いことから、ヒトとマウスで生成するアミロイド斑のコンフォメーションの違いも指摘される⁶⁾。

そのほか、DDNP という蛍光化合物に ^{18}F を導入した PET 用プローブ、 ^{18}F FDDNP が Shoghi-Jadid らより報告された (図 1)⁷⁾。このプローブは最初に臨床試験に供されたプローブであるが、非常に高い脂溶性のために脳内での非特異的放射能滞留が問題となっている。また、Kung らにより、多数のステルベン誘導体がアミロイドイメージングプローブとして開発され、 ^{11}C 標識である ^{11}C SB-13⁸⁾、 ^{18}F 標識体である ^{18}F BAY94-9172⁹⁾ に関する臨床試験が行われ、有望な結果が報告されている (図 1)。日本においても、工藤らによりベンゾオキサゾール誘導体の PET 用プローブ (BF-227) が開発され、その有用性が報告されている (図 1)¹⁰⁾。さらに最近、SPECT 用アミロイドイメージングプローブとしてはじめて、イミダゾピリ

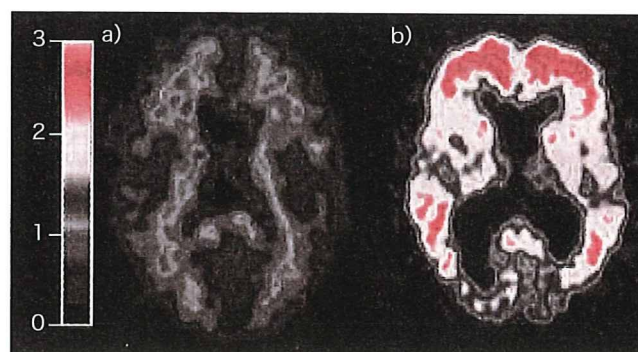


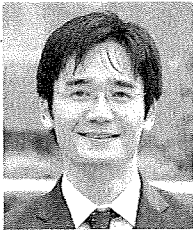
図 2 ^{11}C PIB による PET 画像⁵⁾
a) 健常者, b) アルツハイマー病患者。

ジン誘導体である ^{123}I 標識の IMPY の臨床試験が行われ、その有用性が報告された (図 1)¹¹⁾。われわれもまた、フラボン¹²⁾、カルコン¹³⁾、オーロン¹⁴⁾ などのフラボノイド化合物が有効な SPECT 用アミロイドイメージングとして機能することを明らかにしている (図 1)。これらの結果は、PET だけではなく、SPECT でもアミロイドイメージングが可能であることを期待させるものであり、今後、 ^{123}I のみならず、臨床核医学診断において最も汎用性の高い $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を標識核種として用いるアミロイドイメージングプローブの開発の契機になると考えられる。

最近、アミロイドワクチン¹⁵⁾をはじめとする老人斑アミロイドをターゲットにした AD 治療薬が開発中であるが、生体のアミロイド蓄積量を定量的に評価可能なアミロイドイメージングは、これら治療薬の開発や薬剤の治療効果判定にもおおいに貢献すると考えられる。さらに、患者の QOL の向上を図り、介護などによるさまざまな社会的・経済的負担を軽減するうえで、AD の早期診断技術の開発の必要性はきわめて大きいと考えられることから、これを実現するためのアミロイドイメージング技術の確立が期待される。 【京都大学大学院薬学研究所】

1) D. J. Selkoe, *Physiol. Rev.*, **81**, 741 (2001). 2) A. Nordberg, *Lancet Neurol.*, **3**, 519 (2004). 3) C. A. Mathis, Y. Wang, W. E. Klunk, *Curr. Pharm. Des.*, **10**, 1469 (2004). 4) C. A. Mathis, Y. Wang, D. P. Holt, G. F. Huang, M. L. Debnath, W. E. Klunk, *J. Med. Chem.*, **46**, 2740 (2003). 5) W. E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, Y. Wang, G. Blomqvist, D. P. Holt, M. Bergstrom, I. Savitcheva, G. F. Huang, S. Estrada, B. Ausen, M. L. Debnath, J. Barletta, J. C. Price, J. Sandell, B. J. Lopresti, A. Wall, P. Koivisto, G. Antoni, C. A. Mathis, B. Langstrom, *Ann. Neurol.*, **55**, 306 (2004). 6) J. Maeda, B. Ji, T. Irie, T. Tomiyama, T. Okauchi, M. Staufenbiel, N. Iwata, M. Ono, T. C. Saido, K. Suzuki, H. Mori, M. Higuchi, T. Suhara, *J. Neurosci.*, **27**, 10957 (2007). 7) K. Shoghi-Jadid, G. W. Small, E. D. Adgeppa, V. Kepe, L. M. Ercoli, P. Siddarth, S. Read, N. Satyamurthy, A. Petric, S. C. Huang, J. R. Barrio, *Am. J. Geriatr. Psychiatry.*, **10**, 24 (2002). 8) N. P. Verhoeff, A. A. Wilson, S. Takeshita, L. Trop, D. Hussey, K. Singh, H. F. Kung, M. P. Kung, S. Houle, *ibid.*, **12**, 584 (2004). 9) C. C. Rowe, U. Ackerman, W. Browne, R. Mulligan, K. L. Pike, G. O'Keefe, H. Tochon-Danguy, G. Chan, S. U. Berlangieri, G. Jones, K. L. Dickinson-Rowe, H. F. Kung, W. Zhang, M. P. Kung, D. Skovronsky, T. Dyrks, G. Holl, S. Krause, M. Friebe, L. Lehman, S. Lindemann, L. M. Dinkelborg, C. L. Masters, V. L. Villemagne, *Lancet Neurol.*, **7**, 129 (2008). 10) Y. Kudo, N. Okamura, S. Furumoto, M. Tashiro, K. Furukawa, M. Maruyama, M. Itoh, R. Iwata, K. Yanai, H. Arai, *J. Nucl. Med.*, **48**, 553 (2007). 11) A. B. Newberg, N. A. Wintering, C. M. Clark, K. Plossl, D. Skovronsky, J. P. Seibyl, M. P. Kung, H. F. Kung, *ibid.*, **47**, 78P (2006). 12) M. Ono, N. Yoshida, K. Ishibashi, M. Haratake, Y. Arano, H. Mori, M. Nakayama, *J. Med. Chem.*, **17**, 7253 (2005). 13) M. Ono, M. Haratake, H. Mori, M. Nakayama, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 6802 (2007). 14) M. Ono, Y. Maya, M. Haratake, K. Ito, H. Mori, M. Nakayama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **361**, 116 (2007). 15) Y. Okura, A. Miyakoshi, K. Kohyama, I. K. Park, M. Staufenbiel, Y. Matsumoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 9619 (2006).

《最近のトピックス》



PET/SPECT を用いたアルツハイマー病の画像診断

小 野 正 博* Masahiro Ono

京都大学大学院薬学研究科

1. は じ め に

生体内における遺伝子やタンパク質などの分子を生物が生きたままの状態画像化する「分子イメージング」は、様々な病態に関与する分子を画像化することで疾患の高度な診断を可能にすると考えられている。分子イメージングには、放射性プローブを用いる PET (positron emission tomography)/SPECT (single photon emission computed tomography)、蛍光プローブを用いる光イメージング、核磁気共鳴イメージング (MRI) などが汎用されている。なかでも、PET/SPECT は、放射線の高い透過性を生かし、生体での画像情報を、非侵襲、高感度、高精度で観察することが可能である。現在、PET/SPECT による画像診断が期待される疾病のひとつにアルツハイマー病があり、アルツハイマー病の原因物質であるアミロイドβ 蛋白を体外から画像化する、いわゆる「アミロイドイメージング」と呼ばれる分子イメージング技術が注目されている。

現在、アルツハイマー病の生物学的診断マーカーはなく、一般的に問診、脳波測定、CT スキャンなどの方法がその診断に用いられている。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のは困難であり、確定診断には患者剖検脳の病理学的所見が必要である。また、多くの研究から、最初の臨床症状が現れる数十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おり、患者に臨床症状が現れたときには、

脳内の病理学的変化はかなり進行した状態になっていると考えられている (図 1)。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要求は高く、早急な診断技術の開発が強く望まれている。

アルツハイマー病の特徴的な病理学的変化として、脳内における老人斑の沈着と神経原線維変化の出現が知られている¹⁾。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病理学的変化の確認に委ねられている。特にアミロイドβ 蛋白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アミロイドβ 蛋白の検出は、アルツハイマー病の早期診断につながると考えられる。

こうした背景をもとに、現在、脳内に蓄積した老人斑アミロイドを体外より鋭敏に画像化できる、PET/SPECT 用アミロイドイメージングプローブの開発研究が活発に行われている。重篤な痴呆症状が

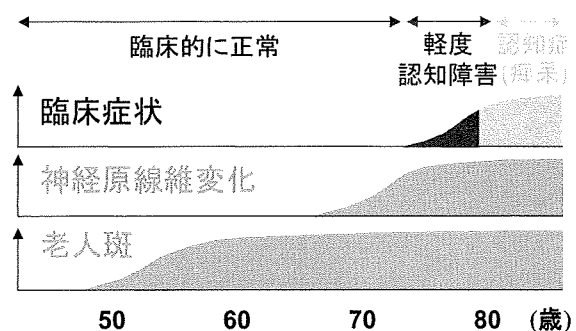


図 1 アルツハイマー病の発症過程 (80 歳で臨床的に認知症になるとすると 50 歳くらいから老人斑の蓄積が始まっていると考えられる)「アルツハイマー病はここまでわかった」(クバプロ)より引用 (一部改変)

*〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29
TEL: 075-753-4608, FAX: 075-753-4568
E-mail: ono@pharm.kyoto-u.ac.jp

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脳内アミロイドイメージング技術の開発は、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²⁻⁴⁾。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。本稿では、アルツハイマー病の診断を目的とする脳内アミロイドのPET/SPECTによる分子イメージング技術について、アミロイドイメージングプローブの開発状況とともに概説を行う。

2. アミロイドイメージングの原理

脳内アミロイドイメージングは、アルツハイマー病の初期脳病変である老人斑の主要な構成成分であるアミロイド β 蛋白に選択的な結合性を有する放射性分子プローブを利用して、生体の老人斑アミロイドを体外から画像化する技術である。脳内アミロイドイメージングの概念図を図2に示す。

老人斑アミロイドは、セクレターゼ β および γ により切断されたアミロイド β 蛋白 ($A\beta(1-40)$ および $A\beta(1-42)$) が凝集・繊維化し脳内に蓄積する。脳内に蓄積した老人斑アミロイドを体外より画像化するためには、生体内に投与されたプローブが血液脳関門を透過し、脳組織内へ移行することが必須である (図2-①)。アミロイドイメージングプローブの血液脳関門の透過性には、分子サイズ、脂溶性、分

子量、電荷など多くのファクターが関与しており、一般的には、電氣的に中性、適度な脂溶性 (分配係数 $\log P$ が 1 ~ 3)、分子量が 650 Da 以下の低分子化合物が適している^{5,6)}。次に、脳移行後に老人斑アミロイドへ選択的に結合する必要がある (図2-②)。アミロイドとの結合性に関しては、アミロイドとの結合解離定数 (K_d) が 20 nM 以下を示す化合物であれば、アミロイドイメージングに応用可能であると考えられている^{3,7)}。さらに、アミロイドの画像精度を向上させるためには、脳内移行後にアミロイドに選択的に結合するとともに、正常脳部位から血液中に可能な限り速やかに消失する必要がある (図2-③)。これらの条件を同時に満たすプローブが脳内アミロイドイメージングには理想的であり、現在、高性能なプローブの開発研究が活発に行われている。以下にその開発の現状について述べる。

3. アミロイドイメージングプローブの開発状況

既報のアミロイドイメージングプローブの多くは、コンゴレッドおよびチオフラビンTという、2種類の古典的アミロイド蛍光染色試薬の化学構造から派生した化合物である。コンゴレッド、チオフラビンTはいずれもアミロイドに高い結合性を有するため、これら化合物を放射性同位元素で標識し、生体内に投与すれば、脳内のアミロイドを画像化できる、という戦略に基づいている。

3.1 コンゴレッド誘導体

コンゴレッドは、イオン性化合物で電荷を持つこと、分子サイズが大きいこと、などの理由から血

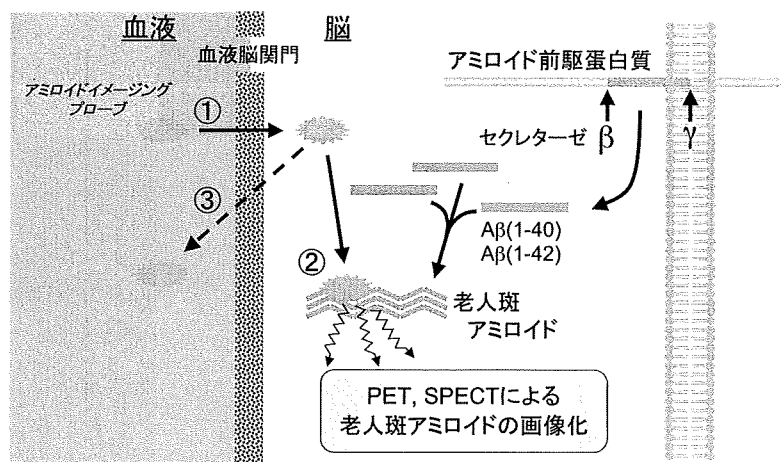


図2 脳内アミロイドの分子イメージングの概念図

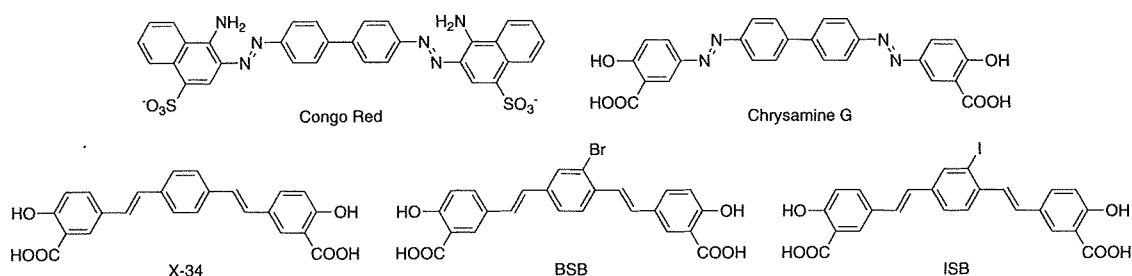


図3 コンゴレッドおよびその誘導体の化学構造

液脳関門の透過には適していない(図3)。この問題を解決するため、コンゴレッドの分子量を低減し、かつ脂溶性を高めたクリサミンG⁸⁾、さらに、毒性の高いアゾ基をビニル基に、ジフェニル基をフェニル基に変換したスチリルベンゼン骨格を持つX34⁹⁾が開発された(図3)。このスチリルベンゼン骨格に臭素を導入した化合物(BSB)により、マウスに投与後、マウス脳の老人斑アミロイドに結合し、画像化が可能であることが初めて実証された¹⁰⁾。BSBの臭素を放射性ヨウ素に変換したISBはアミロイドへの高い結合性を示したが、顕著な脳移行性を示さなかった¹¹⁾。コンゴレッドから派生したスチリルベンゼンを骨格とする誘導体は他にも開発されているが、いずれもその分子量の大きさのため、十分な脳移行量が達成されず、臨床試験まで到達したプローブの報告は未だない。

3.2 チオフラビンT誘導体

チオフラビンTは、コンゴレッドに比べ分子量が小さく、生体内投与後の脳移行性が期待されることから、多くの誘導体が開発されてきた(図4)。コンゴレッドと同様に、チオフラビンTも分子内に電荷をもつ4級アミノ基を含んでいることから、チオフラビンTをそのまま放射標識しても、血液脳関門の透過性は低くなる。そこで、チオフラビンTの4級アミノ基に結合したメチル基を除去、中性化し、ジメチルアミノ基をモノメチルアミノ基に変換した化合物6-Me-BTA-1¹²⁾がピッツバーグ大学より、チオフラビンTを中性化し、さらにチアゾール環のメチル基を放射性ヨウ素に置換した化合物TZDM¹¹⁾がペンシルバニア大学より開発された。いずれの化合物もチオフラビンTを中性化することにより脳移行性が向上した。さらに、6-Me-BTA-1のメチル基を水酸基に置換した化合物6-OH-BTA-1(PIB)の¹¹C標識体がピッツバーグ大学から報告され、マウスに投与早期に高い脳への移行性と移行後に速やか

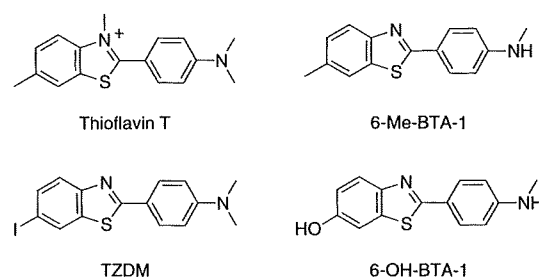


図4 チオフラビンTおよびその誘導体の化学構造

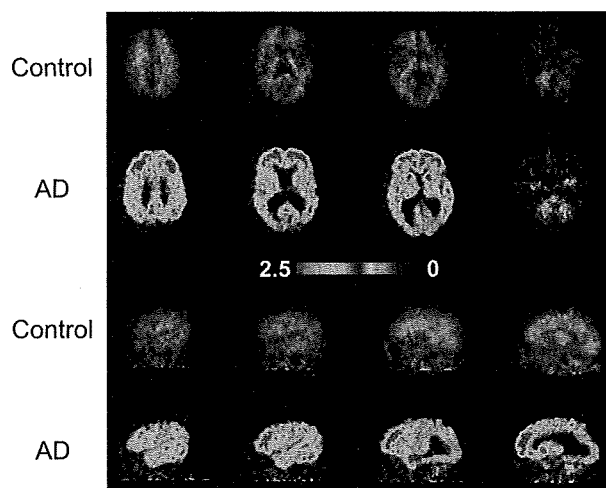


図5 健常人とアルツハイマー病患者の^{[11}C]PIBによるPET画像(上2段:冠状断, 下2段:矢状断)

なクリアランスが確認された¹³⁾。^{[11}C]PIBは臨床試験においても、前頭葉や側頭葉などの老人斑の沈着が多い部位への放射能集積が確認され、現在最も臨床評価の進んだプローブである(図5)¹⁴⁾。^{[11}C]PIBはヒトのアミロイド斑への高い結合性を示す一方で、モデルマウスのアミロイド斑への結合性は低いことから、ヒトとマウスで生成するアミロイド斑のコンフォーメーションの違いも指摘される¹⁵⁾。さらに最近の詳細な検討により、PIBのマウスアミロイドとヒトアミロイドへの結合性の差は、マウス脳で沈着するアミロイド凝集体がAβ42を主成分とするのに対して、ヒトの脳内に沈着するアミ

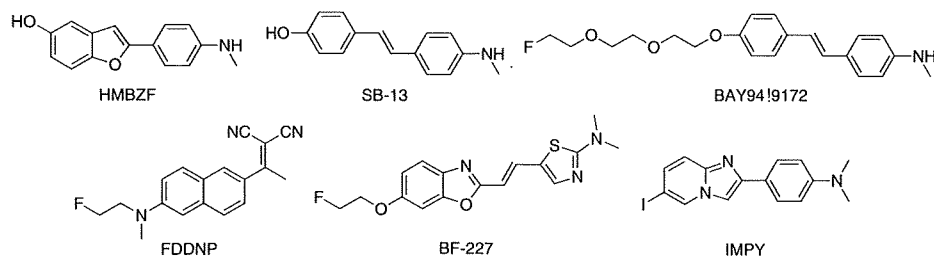


図6 コンゴールレッドおよびチオフラビンTとは異なる基本骨格を持つアミロイドイメージングプローブの化学構造

ロイド凝集体は、N末端がピログルタミン修飾されたAβ42が主成分であり、これら2種類のアミロイド凝集体へのPIBの結合性が異なることに起因することが示されている¹⁶⁾。

3.3 その他の誘導体

著者らは、チオフラビンTの類似構造を有するフェニルベンゾフランを基本骨格とする一連のヨウ素化合物の評価を行った¹⁷⁾。その結果、フェニルベンゾフラン誘導体は、置換基の種類やヨウ素の置換位置に関わらず、いずれもチオフラビンT誘導体と同様に老人斑アミロイドへの高い結合性を示した。フェニルベンゾフラン誘導体はマウス脳への移行性も示したが、脳内での非特異的放射能滞留が観察されるという問題を生じた。ここで、6-Me-BTA-1およびTZDMからPIBへの分子設計を考慮し、フェニルベンゾフラン骨格のヨウ素を水酸基に変換したHMBZFを新たに合成した(図6)¹⁸⁾。アルツハイマー病患者脳ホモジネートを用いた結合実験を行ったところ阻害定数(K_i)値が0.7 nMと非常に高い結合性を有することが示された。¹⁴C標識を行い、正常マウスにおける体内放射能分布を検討したところ、投与2分後に脳1グラムあたり投与量の4.8%の放射能が脳に集積し、その後放射能は急速なクリアランスを示し、投与60分後に残存した放射能は、わずか脳1グラムあたり0.2%であった。さらに、アミロイド前駆蛋白質(APP)を過剰発現させたトランスジェニックマウスに投与後、脳切片を作製し、切片上の放射能をオートラジオグラフィー法により検出したところ、野生型マウスには確認されない、多くの放射能スポットが観察された。また、この放射能スポットは、老人斑アミロイドの蛍光染色試薬であるチオフラビンSの蛍光染色位置とも一致したことから、¹⁴C]HMBZFは生体内に静脈投与後、老人斑アミロイドへ結合することが明らかと

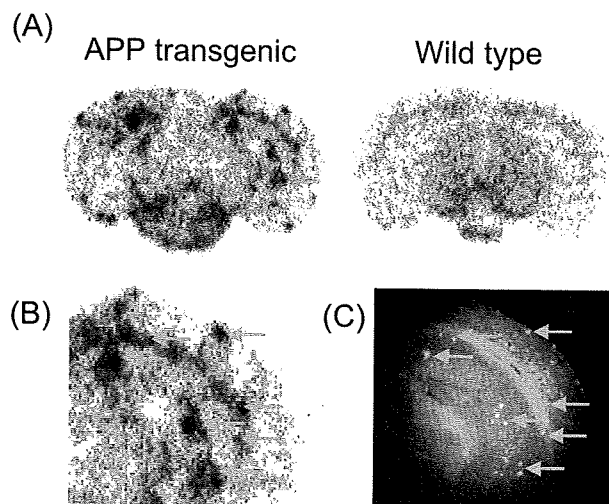


図7 APPトランスジェニックおよび野生型マウスにおける¹⁴C]HMBZF静脈内投与後のオートラジオグラフィー(APPトランスジェニックマウス脳には、野生型マウス脳には認められない多数の放射能スポットが確認された(A)。APPトランスジェニックマウス脳の放射能スポット(B)は、チオフラビンSによる蛍光染色(C)スポットと一致し、¹⁴C]HMBZFがAPPトランスジェニックマウスに静脈投与後、老人斑アミロイドに結合することが明らかとなった。)

なった(図7)。

さらに、著者らは、フェニルベンゾフラン誘導体とは別にスチルベン誘導体の開発研究も行ってきた(図6)。スチルベン骨格はX34やBSBのビススチリルベンゼンから1つのスチリル基を省略した構造をしており、X34やBSBに比べ分子量が小さく、よりコンパクトな化学構造をしている¹⁹⁾。低分子化することにより、生体内投与後の脳への移行性は向上したが、TZDMやフェニルベンゾフランのヨウ素誘導体と同様に脳内での非特異的放射能滞留が観察された。ここでも、先の分子設計戦略に従い、ヨウ素を水酸基を導入したSB-13の開発を行った²⁰⁾。PIB、HMBZFと同様にSB-13もインビトロでのアミロイドとの結合実験において、アミロイドへの非

常に高い結合性を示し、さらに正常マウスにおける体内放射能分布実験においては、投与早期の高い脳移行性と脳からの速やかなクリアランスを示した。SB-13は臨床試験も行われ、その結果はPIBと類似した結果を示し、アミロイドイメージングプローブとしての有用性が確認されている²¹⁾。しかし、PIB, SB-13, HMBZFは、いずれも物理的半減期の短い¹¹C($t_{1/2}$ = 20 min)の標識化合物であり、その使用に制限が生じることから、現在、これらプローブを、¹¹Cより長い半減期の¹⁸F($t_{1/2}$ = 110 min)で標識するための多くの試みが行われている。実際、SB-13の¹⁸F標識化合物である、BAY94-9172の臨床評価が行われ、その有用性が最近報告された²²⁾。

その他、DDNPという蛍光化合物に¹⁸Fを導入したPET用プローブである[¹⁸F]FDDNPがUCLAより報告されている(図6)^{23,24)}。このプローブは、最初に臨床試験に供されたプローブであるが、非常に高い脂溶性のために脳内での非特異的放射能滞留が問題となっている。日本においても、東北大学より、ベンゾオキサゾール誘導体のPET用プローブが開発され、その臨床評価がなされている(図6)²⁵⁾。さらに最近、SPECT用アミロイドイメージングプローブとして初めて、イミダゾピリジン誘導体である¹²³I標識IMPYの臨床試験が行われ、その有用性が報告された(図6)²⁶⁾。この成果は、PETだけではなく、SPECTでもアミロイドイメージングが可能であることを期待させるものであり、今後、¹²³Iのみならず、臨床核医学診断において最も汎用性の高い^{99m}Tcを標識核種として用いるアミロイドイメージングプローブの開発の契機になると考えられる。

4. 新たなアミロイドイメージングプローブの開発

著者は、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、既存の基本骨格とは全く別のプローブ化合物の探索が必要であると考え、アミロイドイメージングプローブとして機能する新たな分子骨格の探索研究を行ってきた。その中で、最近、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(図8-A)²⁷⁾。フラボンは平面性の高い化学構造を持つ蛍光性化合物である。また、いくつかの研究より、アミロイド

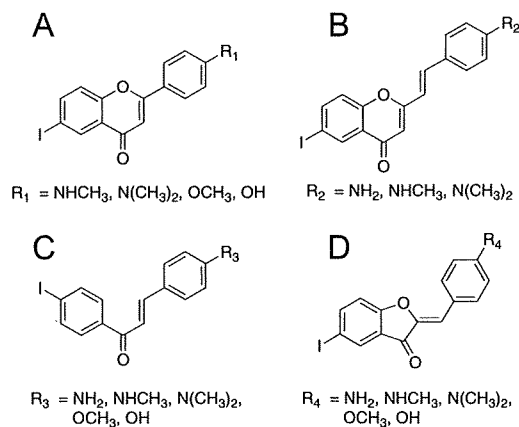


図8 フラボン誘導体(A), スチリルクロモン誘導体(B), カルコン誘導体(C), オーロン誘導体(D)の化学構造

の凝集・繊維化を抑制する効果を有することが報告されており²⁸⁾、アミロイドへの結合親和性が期待された。著者らは、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し、アミロイド凝集体を用いたインビトロ結合実験、正常マウス体内放射能分布実験による脳移行性とクリアランスについての検討を行った。その結果、アミロイド凝集体を用いた結合実験より、フラボン誘導体はいずれもA β 凝集体への高い結合親和性を示した。また、アルツハイマー病患者脳切片を用いた検討において、フラボン誘導体は、びまん性老人斑を含む老人斑アミロイドおよび血管アミロイドへの特異的結合性を有することが明らかとなった。さらに、正常マウスにおける体内放射能分布実験を行い、脳への移行性及びクリアランスについて評価を行った。フラボン誘導体はいずれも投与早期の脳への高い移行性と、速やかな放射能消失を示した。これらの結果より、放射性ヨウ素標識フラボン誘導体は、アミロイドイメージングのための新たなプローブとなりうる可能性が示唆された。また、アルツハイマー病患者の脳切片を用いた検討の結果、フラボン誘導体は、びまん性老人斑を含む老人斑アミロイドに特異的結合性を有することが明らかとなった(図7)。アルツハイマー病における老人斑の主成分であるアミロイド β 蛋白は同病が発症するかなり以前に蓄積が始まると考えられており、この初期の蓄積像がびまん性老人斑であると考えられている。したがって、びまん性老人斑に結合性を有するフラボン誘導体は、これまでのプローブ化合物に比べ、より早期にアミロイドの検出を可能にすることが期待される。

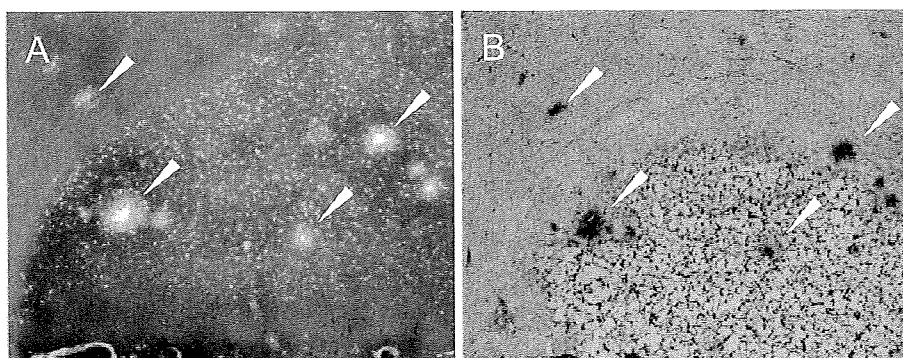


図9 アルツハイマー病モデルマウス (Tg2576) にオーロン誘導体を投与後に作製した脳組織切片における蛍光像 (A) と同一切片の抗アミロイド抗体による免疫染色 (B)

さらに、本検討結果は、アミロイドイメージングプローブの基本骨格が、従来から用いられてきたアミロイドの蛍光染色試薬コンゴレッド、チオフラビンTに限定されないことを示唆する。そこで、最近著者らは、天然物由来のフラボノイド系化合物を母体とするアミロイドイメージングプローブの開発をさらに進展させている。フラボン骨格の2つの芳香環の距離が重要であると考え、フラボンの2つの芳香環（クロモン環およびベンゼン環）の間にビニル基を導入した、スチリルクロモン誘導体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検討を行った (図8-B)。その結果、スチリルクロモン誘導体は、フラボン誘導体に比べ、アミロイド凝集体への高い結合性を持つことが明らかとなった。しかし、正常マウスにおける体内放射能分布実験より、スチリルクロモン誘導体はフラボン誘導体に比べて、投与早期の脳への移行性は低値を示し、さらに、非特異的結合による放射能滞留も観察された。スチリルクロモン誘導体は、優れたアミロイド結合性を持つが、生体内動態を改善するためのさらなる分子修飾が必要であることが示された²⁹⁾。さらに、フラボン骨格のクロモン環のエーテル結合の酸素原子を取り除いた分子構造を持つ、カルコン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も試みた (図8-C)。その結果、カルコン誘導体は、フラボン、スチリルクロモン誘導体と同様に、アミロイド凝集体への高い結合性を示し、さらに正常マウス脳への高い取り込みと、速やかなクリアランスを示した³⁰⁾。さらに最近、フラボン、カルコンと同様のフラボノイドに分類される、オーロンを母体とするアミロイドイメージングプローブを開発した。

オーロン誘導体は、フラボン、カルコン、スチリルクロモン誘導体と同様のアミロイド結合性と、これら誘導体よりも良好な脳内動態を示した³¹⁾。さらに、オーロン誘導体をアルツハイマー病モデルマウスに投与後、脳切片を作製し、脳内のアミロイド斑への結合性を有することを確認した (図9)。

5. 将来の展望

現在、6種類のアミロイドイメージングプローブ (FDDNP²⁴⁾, PIB¹⁴⁾, SB-13, BF-227²⁵⁾, BAY94-9172²²⁾, IMPY²⁶⁾ に関する臨床評価が行われ、いくつかのプローブでは、アルツハイマー病の早期診断の可能性を支持する有望な結果が報告されている。しかし、これら放射性プローブにより描画される画像シグナルが、脳内でどのような老人斑の存在状態を描画しているのかは不明であり、今後詳細な検討が必要であると思われる。また、老人斑にはいくつかのアミロイドプローブ結合部位が存在していること、これら結合部位は形成するアミロイドペプチド数に相違があることから、老人斑における結合部位数の多いアミロイドイメージングプローブの開発が重要であるとの指摘もある³²⁾。今後、これら知見を考慮に入れたアミロイドイメージングプローブの分子設計が必要であると考えられる。

アルツハイマー病の最大のリスクファクターは加齢であることが知られている。したがって、老人人口の増加に伴うアルツハイマー病患者数の増加は、高齢化社会となっている日本、アメリカ、ヨーロッパなどの先進国において顕著であり、現在、日本では100万人、アメリカでは400万人、2025年までには、世界中で2,000万人の人がアルツハイマー病

を発病すると推定されている。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、加速器を保有したPET施設は130施設程度である(2008年6月現在)。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、 ^{11}C 、 ^{18}F で標識された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、 ^{123}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ などのSPECT用核種で標識されたSPECT用薬剤が実用化されれば、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予防的診断も夢ではないと思われる。さらに最近、核磁気共鳴イメージングプローブ³³⁾や近赤外線イメージングプローブ³⁴⁾など、放射性プローブに比べ汎用性に優れたアミロイドイメージング技術の有用性が報告されており、今後の進展が期待される。

アミロイドイメージングは、アルツハイマー病の早期診断への有用性だけではなく、保健医療分野へも大きく貢献すると考えられる。例えば、現在、アミロイドワクチン³⁵⁾をはじめとする老人斑アミロイドを標的分子にしたアルツハイマー病治療薬の開発研究が活発に行われているが、生体のアミロイド蓄積量を定量的に評価可能なアミロイドイメージングは、これら治療薬の開発および薬剤の治療効果判定に多に貢献すると考えられる。さらに、患者のQOLの向上を図り、介護による様々な社会的・経済的負担を軽減する上で、アミロイドイメージング技術の開発の必要性は極めて大きいと考えられる。今後、脳内のアミロイド β に高い特異性を持つ、より高性能なアミロイドイメージングプローブの開発が期待される。

本稿に紹介した研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構および医薬基盤研究所の研究助成により実施されたものであり、記して謝意を表します。

引用文献

- 1) D.J. Selkoe, Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy, *Physiol. Rev.*, **81**, 741-766 (2001).
- 2) D.J. Selkoe, Imaging Alzheimer's amyloid, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 823-824 (2000).
- 3) C.A. Mathis, Y. Wang, W.E. Klunk, Imaging β -

- amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the aging human brain, *Curr. Pharm. Des.*, **10**, 1469-1492 (2004).
- 4) A. Nordberg, PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease, *Lancet Neurol.*, **3**, 519-527 (2004).
- 5) V.A. Levin, Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability, *J. Med. Chem.*, **23**, 682-684 (1980).
- 6) D.D. Dishino, M.J. Welch, M.R. Kilbourn, *et al.*, Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11-labeled radiopharmaceuticals, *J. Nucl. Med.*, **24**, 1030-1038 (1983).
- 7) M.P. Kung, C. Hou, Z.P. Zhuang, *et al.*, Characterization of IMPY as a potential imaging agent for β -amyloid plaques in double transgenic PSAPP mice, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **20**, 1136-1145 (2004).
- 8) W.E. Klunk, M.L. Debnath, J.W. Pettegrew, Development of small molecule probes for the β -amyloid protein of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **15**, 691-698 (1994).
- 9) S.D. Styren, R.L. Hamilton, G.C. Styren, *et al.*, X-34, a fluorescent derivative of Congo red: A novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology, *J. Histochem. Cytochem.*, **48**, 1223-1232 (2000).
- 10) D.M. Skovronsky, B. Zhang, M.P. Kung, *et al.*, *In vivo* detection of amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 7609-7614 (2000).
- 11) Z.P. Zhuang, M.P. Kung, C. Hou, *et al.*, Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates, *J. Med. Chem.*, **44**, 1905-1914 (2002).
- 12) W.E. Klunk, Y. Wang, G.F. Huang, *et al.*, Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain, *Life Sci.*, **69**, 1471-1484 (2001).
- 13) C.A. Mathis, Y. Wang, D.P. Holt, *et al.*, Synthesis and evaluation of ^{11}C -labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents, *J. Med. Chem.*, **46**, 2740-2754 (2003).
- 14) W.E. Klunk, H. Engler, A. Nordberg, *et al.*, Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B, *Ann. Neurol.*, **55**, 306-319 (2004).
- 15) W.E. Klunk, B.J. Lopresti, M.D. Ikonovic, *et al.*, Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain, *J. Neurosci.*, **25**, 10598-10606 (2005).
- 16) J. Maeda, B. Ji, T. Irie, *et al.*, Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography, *J. Neurosci.*, **27**, 10957-10968 (2007).
- 17) M. Ono, M.P. Kung, C. Hou, *et al.*, Benzofuran de-

- rivatives as Abeta-aggregate-specific imaging agents for Alzheimer's disease, *Nucl. Med. Biol.*, **29**, 633–642 (2002).
- 18) M. Ono, H. Kawashima, A. Nonaka, *et al.*, Novel benzofuran derivatives for PET imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease brains, *J. Med. Chem.*, **49**, 2725–2730 (2006).
 - 19) H.F. Kung, C.W. Lee, Z.P. Zhuang, *et al.*, Novel stilbenes as probes for amyloid plaques, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12740–12741 (2001).
 - 20) M. Ono, A. Wilson, J. Nobrega, *et al.*, ^{14}C -labeled stilbene derivatives as Abeta-aggregate-specific PET imaging agents for Alzheimer's disease, *Nucl. Med. Biol.*, **30**, 565–571 (2003).
 - 21) N.P. Verhoeff, A.A. Wilson, S. Takeshita, *et al.*, *In vivo* imaging of Alzheimer disease β -amyloid with [^{11}C]SB-13 PET, *Am. J. Geriatr. Psychiatry.*, **12**, 584–595 (2004).
 - 22) C.C. Rowe, U. Ackerman, W. Browne, *et al.*, Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with ^{18}F -BAY94-9172, a novel PET tracer: Proof of mechanism, *Lancet Neurol.*, **7** (2), 129–135 (2008).
 - 23) E.D. Agdeppa, V. Kepe, J. Liu, *et al.*, Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for β -amyloid plaques in Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **21**, RC189 (2001).
 - 24) K. Shoghi-Jadid, G.W. Small, E.D. Agdeppa, *et al.*, Localization of neurofibrillary tangles and β -amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease, *Am. J. Geriatr. Psychiatry.*, **10**, 24–35 (2002).
 - 25) Y. Kudo, N. Okamura, S. Furumoto, *et al.*, 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-[fluoro]ethoxy) benzoxazole: A novel PET agent for *in vivo* detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients, *J. Nucl. Med.*, **48**, 553–561 (2007).
 - 26) A.B. Newberg, N.A. Wintering, C.M. Clark, *et al.*, Use of ^{123}I IMPY SPECT to differentiate Alzheimer's disease from controls, *J. Nucl. Med.*, **47** (Suppl. 1), 78P (2006).
 - 27) M. Ono, N. Yoshida, K. Ishibashi, *et al.*, Radioiodinated flavones for *in vivo* imaging of β -amyloid plaques in the brain, *J. Med. Chem.*, **48**, 7253–7260 (2005).
 - 28) K. Ono, Y. Yoshiike, A. Takashima, *et al.*, Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, **87**, 172–181 (2003).
 - 29) M. Ono, Y. Maya, M. Haratake, *et al.*, Synthesis and characterization of styrylchromone derivatives as β -amyloid imaging agents, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 444–450 (2007).
 - 30) M. Ono, M. Haratake, H. Mori, *et al.*, Novel chalcones as probes for *in vivo* imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 6802–6809 (2007).
 - 31) M. Ono, Y. Maya, M. Haratake, *et al.*, Aurones serve as probes of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **361**, 116–121 (2007).
 - 32) A. Lockhart, L. Ye, D.B. Judd, *et al.*, Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on β -amyloid peptide fibrils, *J. Biol. Chem.*, **280**, 7677–7684 (2005).
 - 33) M. Higuchi, N. Iwata, Y. Matsuba, *et al.*, ^{19}F and ^1H MRI detection of amyloid beta plaques *in vivo*, *Nat. Neurosci.*, **8**, 527–533 (2005).
 - 34) M. Hintersteiner, A. Enz, P. Frey, *et al.*, *In vivo* detection of amyloid-beta deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 577–583 (2005).
 - 35) Y. Okura, A. Miyakoshi, K. Kohyama, *et al.*, Non-viral Abeta DNA vaccine therapy against Alzheimer's disease: Long-term effects and safety, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 9619–9624 (2006).