

全身性アミロイドーシスの核医学診断に資する
放射性プローブの開発

2023

薬品物理化学

原武 芳江

目次

略語表

序論	1
本論	4
第1章 Thioflavin-T-Congo-red ハイブリッド型プローブの開発	4
1-1 緒言	4
1-2 結果	6
1-2-1 Thioflavin-T-Congo-red ハイブリッド型プローブの合成	6
1-2-2 アミロイド線維に対する結合親和性評価	8
1-2-3 <i>In vitro</i> オートラジオグラフィ	10
1-2-4 マウスにおける生体内放射能分布評価	11
1-2-5 <i>Ex vivo</i> オートラジオグラフィ	14
1-3 考察	15
1-4 小括	16
第2章 酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体プローブの開発	17
2-1 緒言	17
2-2 結果	19
2-2-1 酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体 プローブの合成	19
2-2-2 安定性評価	21
2-2-3 カルボキシエステラーゼとの反応性評価	22

2-2-4	<i>In vitro</i>	オートラジオグラフィ	23
2-2-5		マウスにおける生体内放射能分布評価	24
2-2-6		尿中代謝物分析	27
2-2-7	<i>Ex vivo</i>	オートラジオグラフィ	28
2-3		考察	29
2-4		小括	31
総括			32
謝辞			34
実験の部			35
第1章			37
第2章			42
参考文献			49

略語表

本文において以下の略号を用いた。

A β : amyloid beta

Ac: acetyl

AEF: amyloid-enhancing factor

ANOVA: analysis of variance

ARG: autoradiography

B_{\max} : maximum number of binding sites

Bu: butyl

CES: carboxyesterase

DCC: *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DMF: *N,N*-dimethylformamide

DMSO: dimethyl sulfoxide

EDCI·HCl: 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

ESI: electrospray ionization

Et: ethyl

HOBt: 1-hydroxy-1*H*-benzotriazole

HPLC: high performance liquid chromatography

HRMS: high-resolution mass spectrometry

IC₅₀: half maximal inhibitory concentration

K_d : dissociation constant

K_i : inhibition constant

Me: methyl

NCS: *N*-chlorosuccinimide

NHS: *N*-hydroxysuccinimide

NMR: nuclear magnetic resonance

PB: phosphate buffer

PBS: phosphate-buffered saline

序論

アミロイドーシスは、異常タンパク質であるアミロイドが全身の様々な臓器や組織に沈着し、機能障害を引き起こす疾患群である[1]。アミロイドーシスには、1つの限局した臓器にアミロイドが沈着する限局性アミロイドーシスと複数の臓器にアミロイドが沈着する全身性アミロイドーシスがあり、さらにアミロイドを形成するアミロイド前駆タンパク質によって病型が分類され、それぞれ病変臓器や症状が異なる (Table 1)。限局性アミロイドーシスの代表疾患であるアルツハイマー病は、脳へのアミロイド β (A β)の沈着により発症し、認知機能の低下を伴う神経変性疾患である。2030年には世界における患者数が7800万人に達すると推定されており、高齢社会の進展に伴う患者数の増加が大きな社会問題となっている[2]。対して、全身性アミロイドーシスは希少疾患であり、代表疾患にはALアミロイドーシス、ATTRアミロイドーシス、AAアミロイドーシス等がある。ALアミロイドーシスでは、骨髄内の形質細胞から産生される免疫グロブリン軽鎖が心臓、神経系、消化管等へ沈着し、多発性骨髄腫の患者の10~15%で合併するとされている[3]。ATTRアミロイドーシスでは、肝臓で産生されるトランスサイレチンが心臓、靭帯組織、腱、神経系等へ沈着し、これには加齢により生じる野生型とトランスサイレチンの遺伝子変異により発症する遺伝型の2タイプが存在する[4]。ALアミロイドーシスおよびATTRアミロイドーシスは共に心臓への障害が生じるため、アミロイドーシスの中でも特に診断時期とその後の治療によって予後が大きく左右される[5]。AAアミロイドーシスでは、炎症反応によって産生が亢進する血清アミロイドA (SAA) がアミロイドを形成し、脾臓を初発部位として、次いで腎臓や肝臓へと病変が進展する[6]。慢性的に炎症反応が続き血液中のSAA濃度が高い状態で維持されると、アミロイドが形成されやすくなるため、AAアミロイドーシスは感染症や自己免疫疾患等から続発的に発症することが多い[7]。

現在、全身性アミロイドーシスの診断には、血液検査や生体組織検査を用いることが主流であり、バイオマーカーや穿刺部におけるアミロイドの沈着の有無を指標に評価される[4,5]。しかし、疾患特異的な症状が乏しいことや疾患の希少性により早期の適切な診断が困難であり、剖検でアミロイド沈着が発覚するケースも報告されている[8]。一方、臓器へのアミロイドの沈着は疾患特異的な現象であり、症状の発現前から徐々に進行することから、アミロイドの検出を目的とした核医学診断法が有効であると考えられている[9,10]。核医学診断法は、放射性プローブを体内に投与し、プローブと相互作用する

Table 1 Main types of amyloidosis in human.

Fibril protein	Precursor protein	Acquired/ hereditary	Target organs
I. Localized amyloidosis			
A β	Amyloid β protein precursor, wild-type Amyloid β protein precursor, variants	Acquired Hereditary	CNS*
ATau	Tau	Acquired	CNS
A α Syn	α -Synuclein	Acquired	CNS
APrP	Prion protein, wild-type Prion protein, variants	Acquired Hereditary	CNS
AIAPP	Islet amyloid polypeptide	Acquired	Islets
II. Systemic amyloidosis			
AA	Serum amyloid A	Acquired	Spleen, kidney, liver, heart
AL	Immunoglobulin light-chain	Acquired	Heart, kidney, liver, PNS**, ANS#, gastrointestinal tract, soft tissues
AH	Immunoglobulin heavy-chain	Acquired	Kidney, others
ATTR	Transthyretin wild-type Transthyretin variants	Acquired Hereditary	Heart, ligaments, tenosynovium PNS, ANS, heart, eye, leptomeningeal, kidney
A β 2M	β 2-microglobulin wild-type β 2-microglobulin variants	Acquired Hereditary	Musculoskeletal system ANS, heart
ALECT2	Leucocyte chemotactic factor 2	Acquired	Kidney, liver
AApoA-I	Apolipoprotein A-I, variants	Hereditary	Heart, liver, kidney, PNS, testis, larynx, skin
AApoA-II	Apolipoprotein A-II, variants	Hereditary	Kidney, others
AApoA-IV	Apolipoprotein A-IV, wild-type	Acquired	Kidney, medulla
AApoC-II	Apolipoprotein C-II, variants	Hereditary	Kidney, others
AApoC-III	Apolipoprotein C-III, variants	Hereditary	Kidney, others

*Central nervous system. **Peripheral nervous system. #Autonomic nervous system.

標的分子を単一光子放射断層撮影 (single photon emission computed tomography; SPECT) やポジトロン放射断層撮影 (positron emission tomography; PET) によって体外から捉えることができる画像診断法であり、血液検査や生体組織検査と比較し、全身におけるアミロイドの分布や病変の進展の程度等を非侵襲的に高感度で検出することが可能という長所を有する。これまでに全身性アミロイドーシスの核医学診断を目的として SPECT プローブ (^{123}I -serum amyloid P component; ^{123}I -SAP[11]) の開発やアルツハイマー病の診断に用いられる A β 検出用 PET プローブ (^{11}C -Pittsburgh compound B; ^{11}C -PiB[12]、 ^{18}F -florbetaben[13]、 ^{18}F -florbetapir[14]) の適用がなされている。SAP は、全てのアミロイド沈着部位に共通して含まれる内因性のタンパク質であり、カルシウム依存的にアミロイドへ結合する性質を有する[15]。このことから、放射性ヨウ素で標識された ^{123}I -SAP は AL アミロイドーシス、ATTR アミロイドーシス、AA アミロイドーシスの核医学診断や治療モニタリングに使用されている。上述の A β 検出用プローブは、アルツハイマー病

の核医学診断を目的として開発されており、中でも ^{11}C -PiB は現在のアルツハイマー病の PET 検査薬のスタンダードとなっている。一方で、近年、心アミロイドーシスにおいて ^{11}C -PiB を用いた心臓病変の検出が有用であることが示された[16]。これを皮切りに ^{18}F 標識プローブについても同様に心アミロイドーシスの核医学診断に応用する研究が報告されている。 ^{18}F -Florbetaben、 ^{18}F -florbetapir に関しては病型によって心臓病変への放射能集積に差が見られ、核医学診断による病型判別の可能性も見出されている[17,18]。しかし、これらのプローブには、課題も存在する。SAP は、ヒト由来の内因性タンパク質製剤であるため、生産や品質の面で課題があること、SAP 自身がアミロイド形成促進作用および細胞毒性を有すること、高感度でアミロイドを描写出来る一方で心臓への移行性が低く、適用可能な病型に限られる等の問題点から汎用性は低い。A β 検出用プローブについては thioflavin-T や stilbene を母格とし (Fig. 1)、それぞれ脳内の A β へ高い結合性を示すように誘導化されている。また、共通して分子内に電荷を持たない中性分子であり、高い脳移行性を示すプローブ設計がなされている。そのため、種々のアミロイドに対する結合親和性の違いやプローブの体内動態の面から全身性アミロイドーシスへの適用は最適ではないと考えられる。さらに、既存プローブの多くは、化合物の脂溶性が高いという特徴からアミロイド以外の正常組織部位にも集積しやすく[19]、全身の複数の臓器にアミロイド病変が分布する全身性アミロイドーシスの核医学診断では、画像コントラストの低下も懸念される。

そこで、本研究では全身性アミロイドーシスの核医学診断に最適な放射性プローブの開発を計画した。放射性プローブの開発にあたり、生体内のアミロイドを特異的に検出することを目指し、(1) アミロイドに対するプローブの結合親和性の向上 (2) 正常組織におけるバックグラウンドの低減の 2 つのアプローチからそれぞれ新規放射性プローブを設計、合成し、AA アミロイドーシスモデルマウスを用いてそれらの有効性について評価した。

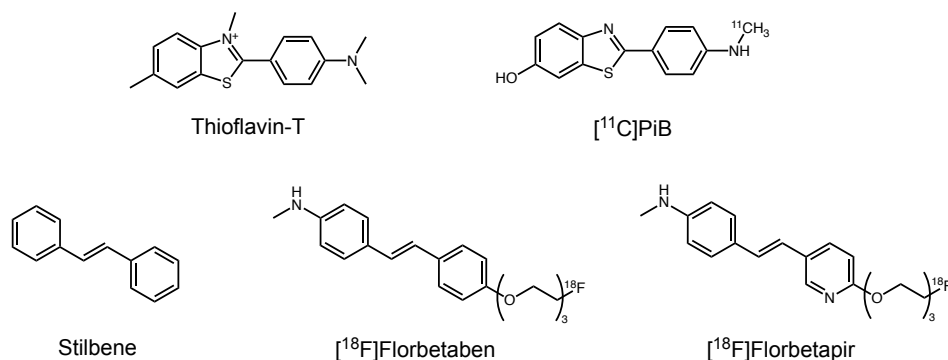


Fig. 1 Chemical structures of thioflavin-T, stilbene, and their radiolabeled derivatives.

本論

第1章 Thioflavin-T-Congo-red ハイブリッド型プローブの開発

1-1 緒言

アミロイドは、共通してタンパク質の β シート構造が積層したクロス β シート構造という特徴的な構造を形成し、この構造を認識して thioflavin-T や Congo-red といった蛍光色素が結合することが知られている[20,21]。この特徴を利用し、これまでに開発されたアミロイドイメージングプローブには thioflavin-T や Congo-red の誘導体があるが[22-29]、正常組織への非特異的な集積が懸念されており、この課題に対し、プローブがアミロイドへより選択的に結合するための分子設計が必要であると考えた。

近年、単一の分子で複数の標的と相互作用するマルチターゲット薬が注目されている[30]。この戦略は、1 剤が 1 つの薬効を示す従来の薬剤と比較して薬効の相乗効果が期待されており、複数の因子が関与するアルツハイマー病等の神経系疾患の治療薬開発に取り入れられている[31]。そこで、単分子内にアミロイド認識部位を増やすことで、アミロイドに対する結合親和性の向上と、それに伴いプローブの集積量の向上を達成出来るのではないかと考えた。本研究では、全身性アミロイドーシスの核医学診断に最適な放射性プローブの開発にあたり、新規プローブ (**1**) を設計した (Fig. 1-1)。**1** は、thioflavin-T と Congo-red の骨格を融合させたハイブリッド化合物である。両者は共通して疎水性相互作用、イオン間相互作用、水素結合等の分子間力によりアミロイド線維へ結合する[20,21]。一方、相互作用する官能基とアミノ酸残基が異なるため、アミロイド線維における両者の結合部位は異なると考えられている[32-36]。すなわち、プローブ分子内に thioflavin-T と Congo-red のアミロイド認識部位を併せ持つことにより、アミロイドに対する結合選択性の向上を狙った分子設計とした。また、**1** は溶液中でイオンとなり、分子量が 500 よりも大きいことから、脳への移行性を示さず、比較的速やかに体外へ排泄されることが期待される。以上を踏まえて、**1** の放射性ヨウ素標識体を合成して全身性アミロイドーシスの核医学診断用プローブとしての有効性を評価した。

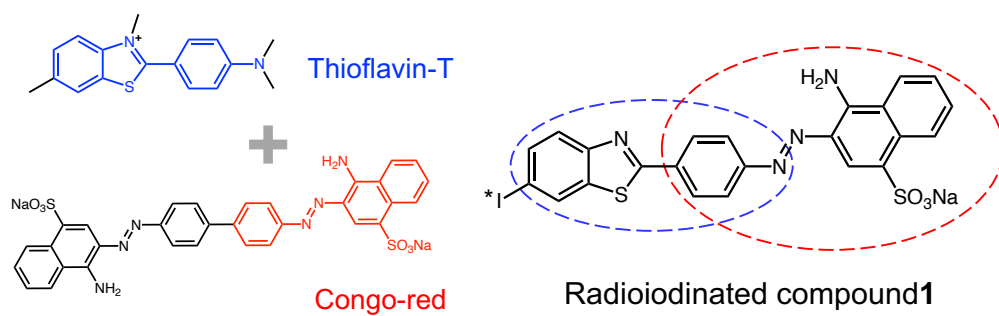
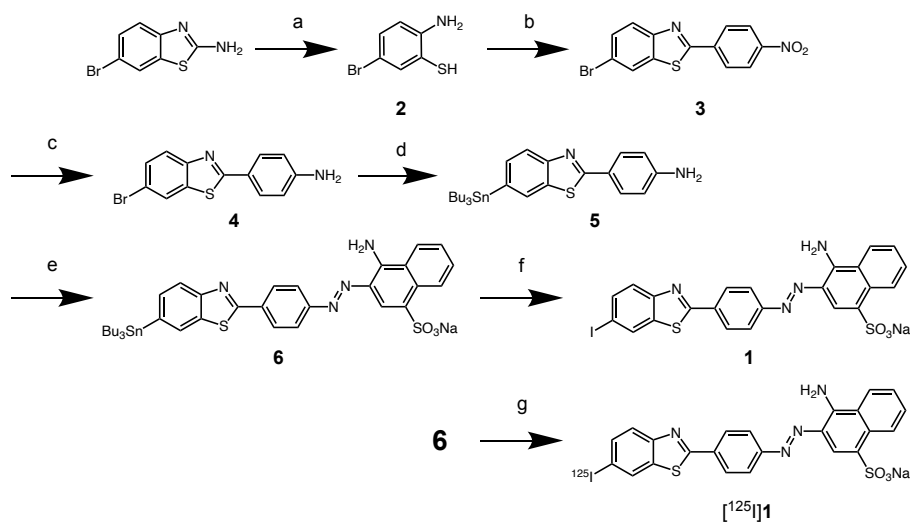


Fig. 1-1 Drug design of radioiodinated compound 1.

1-2 結果

1-2-1 Thioflavin-T-Congo-red ハイブリッド型プローブ (1) の合成

1 およびその放射性ヨウ素標識体 ($[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$) の合成経路を Scheme 1 に示す。2-Amino-6-bromobenzothiazole を出発原料として **2**、**3**、**4** を既報[37-39]に従い合成し、**4** を bis(tributyltin) と反応させることで **5** を得た。続いて、**5** を sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate tetrahydrate とジアゾカップリングさせ、標識前駆体である **6** を合成した。さらに、**6** にヨウ素を反応させ **1** を得た。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ は **6** を用いたスズ-ヨウ素交換反応により放射化学的収率 66%、放射化学的純度 95%以上で無担体状態として得た後、逆相高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いた **1** との同時分析により同定した (Fig. 1-2)。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ の比放射能は、 Na^{125}I の比放射能に基づいて 80 GBq/ μmol とした。



Scheme 1 Synthesis protocol of **1** and $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$. (a) KOH; (b) 4-Nitrobenzaldehyde; (c) Pd/C, H_2 ; (d) $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2$, Et_3N ; (e) 1) HCl, NaNO_2 , 2) 4-Amino-1-naphthalenesulfonate tetrahydrate, K_2CO_3 ; (f) I_2 , NaHSO_3 , KF; (g) Na^{125}I , NCS, CH_3COOH

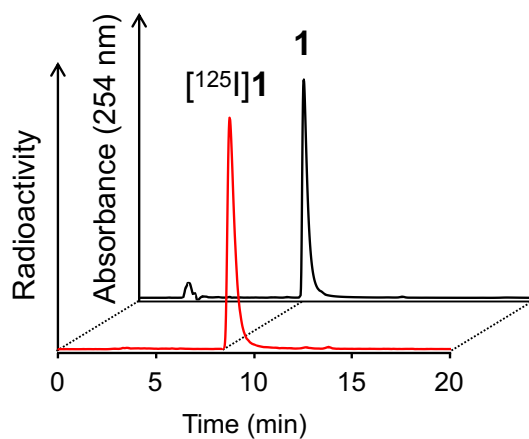


Fig. 1-2 HPLC chromatograms of the mixture of [¹²⁵I]1 and nonradioactive 1. HPLC (LC-2010CHT, Shimadzu Co.) on a Cosmosil 5C₁₈-AR-II column with eluate of water (0.1% trifluoroacetic acid)/acetonitrile (0.1% trifluoroacetic acid) = 4/6 at a flow rate of 1.0 mL/min.

1-2-2 アミロイド線維に対する結合親和性評価

A β ₁₋₄₂ ペプチドおよび SAA₁₋₂₇ ペプチドを用いてアミロイド線維を作製し、それぞれのアミロイド線維存在下で thioflavin-T の蛍光強度が増大したことにより線維の形成を確認した (Fig. 1-3(A),(B))。一方、結合親和性評価に用いる溶媒条件 (30% DMSO 含有 PBS) で同様に thioflavin-T の蛍光強度を測定したところ、A β ₁₋₄₂ 線維では蛍光強度が維持されたのに対し、SAA₁₋₂₇ 線維では thioflavin-T の蛍光が消失した (Fig. 1-3(C),(D))。このことから、高濃度の DMSO 存在下では SAA₁₋₂₇ の線維構造が破綻したと考えられたため、A β ₁₋₄₂ 線維を用いて **1** の結合親和性を評価した。まず、**1** および [¹²⁵I]**1** を用いた結合飽和実験を実施し、Scatchard-plot から **1** の解離定数 (K_d) を 65 ± 42 nM、最大結合部位数 (B_{max}) を 54 ± 37 pmol/ μ g protein と算出した。また、[¹²⁵I]**1** を競合リガンドに用いた *in vitro* 競合阻害アッセイの結果から阻害曲線を描出し、各評価化合物 (**1**、thioflavin-T、Congo-red) の 50%阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。それらの値を Cheng-Prusoff の式 ($K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d)$) に代入して阻害定数 (K_i) を算出し、各化合物の A β ₁₋₄₂ に対する結合親和性を評価した。その結果、**1** の A β ₁₋₄₂ に対する K_i 値は 43 nM となり、thioflavin-T および Congo-red と比較して有意に高い結合親和性を示した (Table 1-1)。また、*in vitro* 競合阻害アッセイの結果、thioflavin-T よりも Congo-red の方が 30 倍以上低い IC₅₀ 値を示し、Congo-red 存在下では添加量に応じて [¹²⁵I]**1** の結合が阻害されたことから、**1** はアミロイドの thioflavin-T 結合部位よりも Congo-red 結合部位選択的に結合することが示唆された。

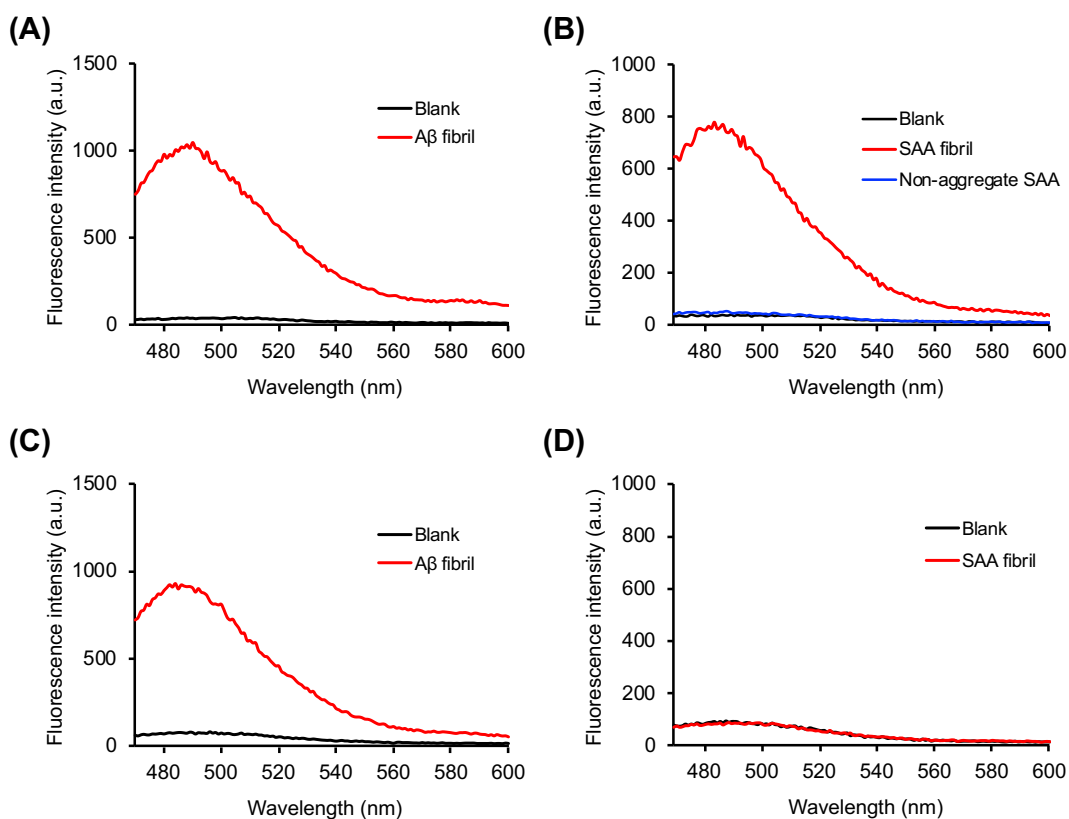


Fig. 1-3 Fluorescence emission spectra ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 470\text{--}600 \text{ nm}$) of thioflavin-T (10 μM) when incubated with fibrillar A β_{1-42} (A, C) or SAA $_{1-27}$ (B, D) (each amyloid fibril 20 $\mu\text{g/mL}$). Thioflavin-T fluorescence signals increased when incubated with A β_{1-42} fibrils in both 10 mM PB containing 1 mM EDTA (A) and PBS containing 30% DMSO (C). On the contrary, an increased fluorescence signal was observed when incubated with SAA $_{1-27}$ fibrils in 20 mM Tris-HCl buffer containing 1% DMSO (B), but not in phosphate-buffered saline (PBS) containing 30% DMSO (D).

Table 1-1 Comparison of K_i values for A β_{1-42} fibril.

compound	K_i value (nM)
1	43.0 ± 33.6
Thioflavin-T	>24000
Congo-red	657 ± 172

Each value represents mean \pm S.D. of 3-4 independent experiments.

1-2-3 *In vitro* オートラジオグラフィ

AA アミロイドーシスモデルマウスは、ICR 系マウスの腹腔内に amyloid-enhancing factor (AEF) を腹腔内投与することにより作製した[40]。AA アミロイドーシスでは、脾臓を初発部位とすることから、脾臓組織を用いた評価を実施した。マウスの脾臓凍結切片を作製し、thioflavin-S によるアミロイド蛍光染色を行った結果、病態モデルマウスの脾臓ではリンパ濾胞の周囲に thioflavin-S の蛍光像が見られ、アミロイドが形成されたことを確認した。また、アミロイドの分布は放射能集積と一致した (Fig. 1-4(A))。一方、健常マウスの脾臓組織内にはアミロイドの存在を認めず、また、放射能集積の程度も極めて低いレベルであった (Fig. 1-4(A))。これらの結果より、**1** は脾臓組織内のアミロイドへ特異的に結合することが示された。また、Fig. 1-4(A)に示す病態モデルマウスの隣接切片を用いて、thioflavin-T あるいは Congo-red を用いたブロッキング実験を実施した。その結果、thioflavin-T が存在する条件下では、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ の結合が阻害されなかったのに対し、Congo-red が存在する条件下では、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ の結合が顕著に阻害された (Fig. 1-4(B))。このことから、結合親和性評価の結果と同様に、**1** のアミロイドへの結合には特に Congo-red ユニットが寄与することが示唆された。

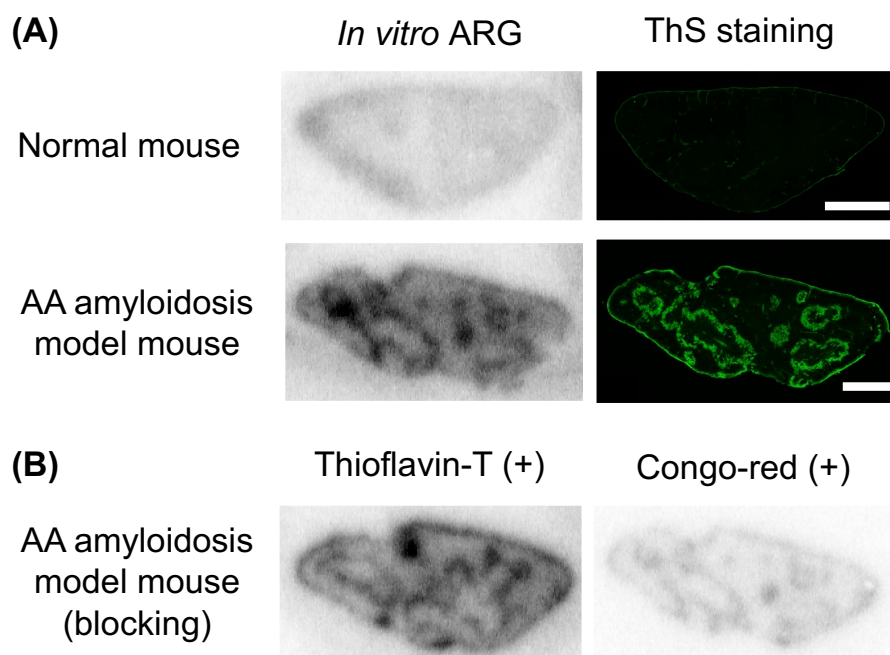


Fig. 1-4 (A) *In vitro* autoradiograms (ARG) of $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ with spleen sections from normal mouse and AA amyloidosis model mouse. The same sections were stained with thioflavin-S (ThS). Scale bar = 1 mm. (B) *In vitro* autoradiograms of the blocking study. Blocking study was performed by co-addition of excess thioflavin-T or Congo-red (30 μM) with $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ on adjacent spleen section of (A).

1-2-4 マウスにおける生体内放射能分布評価

Table 1-2 に健常マウスおよび病態モデルマウスにおける $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ 投与後の生体内放射能分布の結果を示す。健常マウスの結果より、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ は投与後早期に肝臓、肺、腎臓、脾臓へ高く集積し、胃、筋肉、甲状腺、脳への集積は低かった。放射能は血液を含む正常臓器から比較的速やかに消失し、投与 24 時間後には約 50%が糞便中、約 7%が尿中へ排泄された。病態モデルマウスにおける放射能分布は、健常マウスと同様であった。肝臓や腸で放射能が滞留する傾向が見られたが、本検討で用いた AA アミロイドーシスモデルマウスでは臓器機能が低下することが知られており、このことがプローブの体内動態に影響した可能性がある。また、病態モデルマウスの臓器機能の低下の度合に個体差があることで、放射能集積割合にばらつきが生じたと考えられた。脾臓における放射能集積は、健常マウスでは経時的に放射能が消失した一方で、病態モデルマウスでは投与 1 時間後以降に放射能が保持される傾向が見られ、投与 3、6 時間後において健常マウスよりも有意に高い放射能集積を認めた。さらに、病態モデルマウスでの脾臓と血液における放射能集積比は、投与 3、6 時間後において健常マウスよりも有意に高かった (Fig. 1-5)。

Table 1-2 Biodistribution of radioactivity after injection of [¹²⁵I]1 into normal mice (A) and AA amyloidosis model mice (B).

(A)

Organ	Time after injection				
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
Blood	2.21 ± 0.38	1.09 ± 0.22	0.65 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.26 ± 0.05
Spleen	5.67 ± 1.37	2.62 ± 0.87	1.24 ± 0.37	0.42 ± 0.01	0.20 ± 0.04
Pancreas	1.70 ± 0.22	1.17 ± 0.16	0.65 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.12 ± 0.002
Stomach	1.12 ± 0.64	0.76 ± 0.10	0.85 ± 0.67	0.44 ± 0.31	0.23 ± 0.09
Intestine	2.16 ± 1.32	10.0 ± 2.96	19.7 ± 4.70	20.7 ± 7.71	3.40 ± 1.76
Kidney	7.53 ± 1.32	5.86 ± 0.84	5.34 ± 0.46	4.65 ± 0.36	3.76 ± 0.54
Liver	37.7 ± 3.74	26.7 ± 3.38	19.1 ± 0.34	7.06 ± 1.78	1.70 ± 0.48
Heart	3.59 ± 0.25	1.15 ± 0.23	0.54 ± 0.02	0.21 ± 0.05	0.09 ± 0.009
Lung	12.4 ± 0.81	4.19 ± 0.59	1.91 ± 0.10	1.14 ± 0.26	0.43 ± 0.04
Muscle	0.88 ± 0.03	0.54 ± 0.05	0.40 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.04 ± 0.01
Thyroid	0.04 ± 0.003	0.03 ± 0.004	0.02 ± 0.005	0.03 ± 0.002	0.06 ± 0.04
Brain	0.13 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.007	0.05 ± 0.003	0.03 ± 0.003

(B)

Organ	Time after injection				
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
Blood	2.48 ± 1.35	1.07 ± 0.69	0.83 ± 0.89	0.53 ± 0.13	0.28 ± 0.12
Spleen	5.56 ± 1.39	2.97 ± 1.94	1.89 ± 0.98	1.07 ± 0.24*	0.60 ± 0.40*
Pancreas	1.95 ± 0.54	1.17 ± 0.52	1.41 ± 0.40	0.85 ± 0.29	0.61 ± 0.18
Stomach	0.74 ± 0.33	0.67 ± 0.35	0.54 ± 0.29	0.39 ± 0.06	0.64 ± 0.43
Intestine	1.23 ± 0.58	3.41 ± 1.84	12.0 ± 6.00	22.8 ± 6.55	15.8 ± 8.60
Kidney	4.08 ± 1.71	3.21 ± 1.63	2.54 ± 1.26	1.60 ± 0.87	2.49 ± 1.32
Liver	24.1 ± 9.59	19.6 ± 7.84	12.6 ± 3.04	7.05 ± 2.36	4.27 ± 4.16
Heart	4.32 ± 1.67	1.66 ± 1.12	0.83 ± 0.50	0.39 ± 0.14	0.38 ± 0.32
Lung	12.7 ± 5.78	4.65 ± 3.46	2.50 ± 1.29	1.32 ± 0.30	0.97 ± 0.56
Muscle	1.05 ± 0.42	0.72 ± 0.43	0.58 ± 0.26	0.40 ± 0.32	0.29 ± 0.22
Thyroid	0.04 ± 0.009	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.04
Brain	0.16 ± 0.08	0.10 ± 0.06	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.05	0.11 ± 0.02

*p<0.05 vs normal mice

Data are expressed as the average percentage of the injected dose (%ID) per gram of tissue or %ID (thyroid). Each value represents mean ± S.D. (n = 3–4 for normal mice (A) and n = 6 for AA amyloidosis model mice (B)).

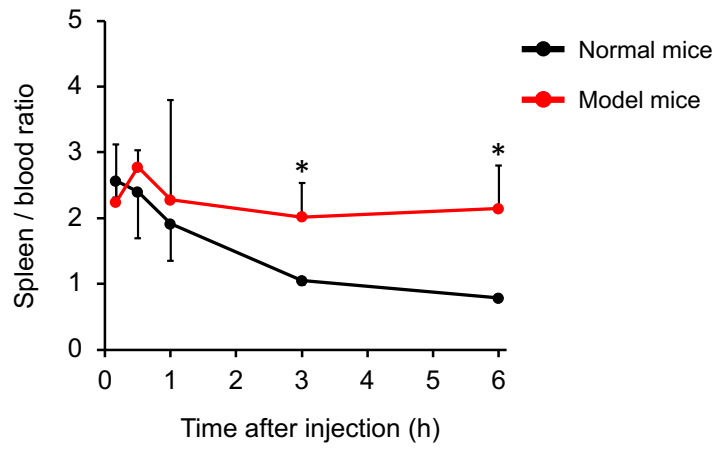


Fig. 1-5 Spleen-to-blood ratio in normal mice and AA amyloidosis model mice. * $p < 0.05$ vs normal mice.

1-2-5 Ex vivo オートラジオグラフィ

[¹²⁵I]**1** の投与 3 時間後におけるマウスの脾臓切片を用いて、*ex vivo* オートラジオグラフィおよび同一切片における thioflavin-S 染色を実施し、組織内の放射能分布およびアミロイド分布を分析した。健常マウスではアミロイドの沈着が認められず、放射能の集積もわずかであった。一方で、病態モデルマウスの脾臓では、アミロイドがリンパ濾胞周囲に不均一に形成され、[¹²⁵I]**1** 由来の放射能分布と局在が概ね一致した (Fig. 1-6)。このことから **1** は *in vivo* においてもアミロイドへ特異的に結合することが示された。

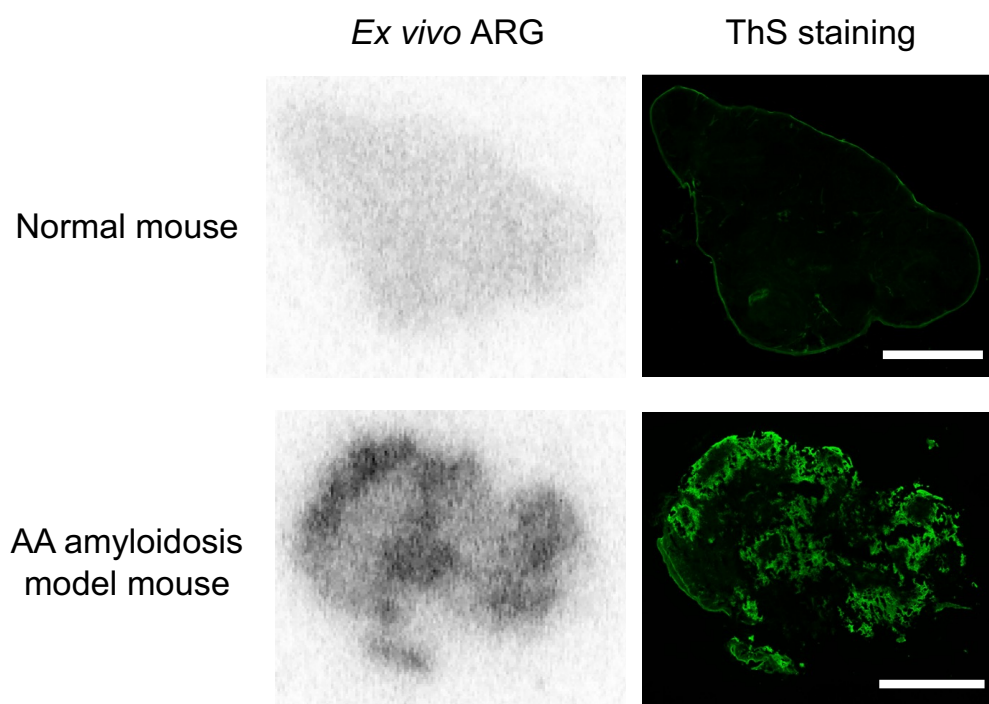


Fig. 1-6 *Ex vivo* autoradiograms (ARG) of [¹²⁵I]**1** using spleen sections from normal mouse and AA amyloidosis model mouse. [¹²⁵I]**1** was intravenously injected into mice, and the spleens were excised at 3 h post-injection. The same sections were then stained with thioflavin-S (ThS) to confirm the localization of amyloid deposits. Scale bar = 1 mm.

1-3 考察

本研究では、アミロイドイメージングを目的とした thioflavin-T と Congo-red のハイブリッド型プローブ **1** の放射性ヨウ素標識体を開発し、全身性アミロイドーシスの核医学診断用プローブとしての有効性を評価した。今回の検討では、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ が AA アミロイドーシスにおける脾臓組織内のアミロイドを特異的に検出することを示した。**1** は、アミロイドへの結合サイトが異なる thioflavin-T と Congo-red の骨格を有することから、複数の結合モードを示すことが期待された。しかし、競合阻害アッセイや *in vitro* オートラジオグラフィの結果から、**1** のアミロイドへの結合には主に Congo-red ユニットが寄与していることが示唆された。**1** が thioflavin-T の結合モードを示すことが困難であった理由として、(i) **1** の thioflavin-T ユニットは、本来 thioflavin-T が有するチアゾール部位のメチル基を消失したことによりカチオン性を失い、アミロイドタンパク質とのイオン間相互作用が減少したこと、(ii) thioflavin-T のアミロイド結合部位のひとつであるアニリン部位を Congo-red とのアゾ結合により消失していること等が考えられた。一方、Congo-red ユニットはイオン化部位を有していることでアミロイドへ結合しやすく、thioflavin-T ユニットとの融合による疎水性相互作用やスタッキング作用の向上によって Congo-red よりも結合性が向上したと考えられた。

また、生体内放射能分布評価では、胃や甲状腺への放射能集積がほとんど見られず、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ が生体内における脱ヨウ素反応に対して非常に安定であることが示唆された。さらに、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ は分子設計で意図したように脳へはほとんど分布せず、アミロイドが沈着した脾臓に高く集積した。一方、投与 6 時間後においても肝臓、腸への高い放射能集積が見られた。これは排泄過程にある $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ 由来の放射能であり、非特異的な集積だと考えられた。肝臓、腎臓、腸は薬物の排泄に関与すると同時に、全身性アミロイドーシスの多くの病型における好発部位として知られており[1,4]、本研究で作製した AA アミロイドーシスモデルマウスでも腎臓、肝臓においてアミロイドの沈着が見られた。すなわち、全身性アミロイドーシスの核医学診断における対象臓器への非特異的な放射能集積は、高精度な診断の障害になると考えられる。このことは、他のアミロイドイメージングプローブにおいても同様に言及されており[19]、今後プローブの排泄を促進する化学修飾等を組み込んだプローブを開発することが望まれる。

1-4 小括

- 新規アミロイドイメージングプローブとして thioflavin-T および Congo-red の骨格を融合したハイブリッド型プローブ **1** の放射性ヨウ素標識体 [¹²⁵I]**1** を設計、合成した。
- A β ₁₋₄₂ 線維を用いた *in vitro* 結合親和性アッセイにおいて、**1** は thioflavin-T および Congo-red よりも高い結合親和性を示した。
- AA アミロイドーシスモデルマウスの脾臓切片を用いた *in vitro* オートラジオグラフィにおいて、 [¹²⁵I]**1** はアミロイド沈着部位を明瞭に描出した。
- マウスを用いた生体内放射能分布評価において、 [¹²⁵I]**1** は全身へ分布した後、比較的速やかに生体内から消失した。一方で、AA アミロイドーシスの好発部位である脾臓においては健常マウスと比較してモデルマウスで放射能が高く保持された。
- *Ex vivo* オートラジオグラフィの結果から、 [¹²⁵I]**1** は *in vivo* においても脾臓組織内のアミロイドへ特異的に結合することが示された。

以上の結果より、thioflavin-T および Congo-red ハイブリッド型プローブ **1** の放射性ヨウ素標識体は、AA アミロイドーシスの核医学診断用プローブとして有効である可能性が示された。

第 2 章 酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体プ

ローブの開発

2-1 緒言

核医学診断において標的分子を特異的に検出する手法として、バックグラウンドの放射能を速やかに消失させることが有効であると考えられる。本研究では、非特異的に集積した放射能の速やかな消失による画像コントラストの改善を目指したアミロイドイメージングプローブ (7) を設計した (Fig. 2-1)。7 の分子設計にあたり、アミロイドへ結合しなかったプローブに対して、正常組織内の酵素を利用して代謝を促し、放射性代謝物を遊離、排泄させることでバックグラウンドを低減できるのではないかと考えた。中でも全身性アミロイドーシスの核医学診断では、全身の臓器を検査対象とするため、肝臓をはじめとした腸、腎臓、肺、脾臓、心臓、皮膚、筋肉、血漿等の多くの臓器や組織に分布するカルボキシエステラーゼ (CES) [41,42]による代謝を狙った分子設計とした。遊離する放射性代謝物は、速やかに体外へ排泄されること、放射性ヨウ素を安定に結合するためのベンゼン環を有することが望ましいことから、高い尿排泄性を示す hippuric acid (馬尿酸) に放射性ヨウ素を導入した iodohippuric acid とした。また、ヨウ素の導入部位は、生体内における結合安定性を考慮し、hippuric acid 中のベンゼン環のメタ位とした[43]。一方、プローブのアミロイド認識骨格には、thioflavin-T の骨格を基盤としたアルツハイマー病の核医学診断用プローブで、心アミロイドーシスの核医学診断にも応用されている *N*-methyl-2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole (Pittsburgh compound B; PiB) を選択した。すなわち、7 は、PiB と *m*-iodohippuric acid をエステル結合させた構造であり、アミロイド沈着部位では PiB の構造を介してアミロイドに結合する一方で、それ以外の正常組織部位では CES によって代謝を受け、放射性ヨウ素を含む *m*-iodohippuric acid として速やかに体外へ排泄されることが期待される。

本研究では、7 の放射性ヨウ素標識体を合成し、全身性アミロイドーシスの核医学診断用プローブとしての有効性を評価した。

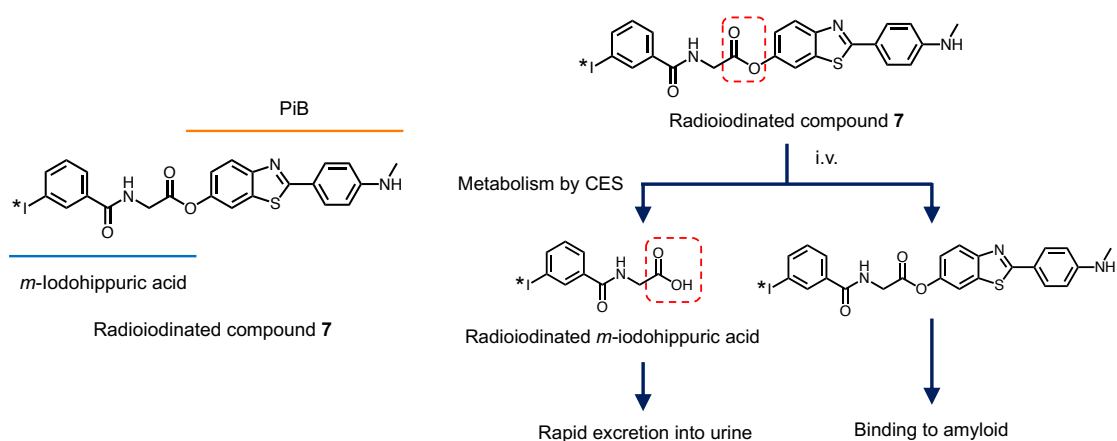
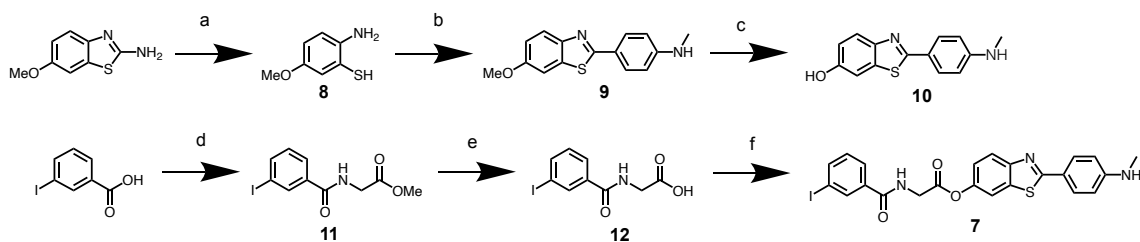


Fig. 2-1 Drug design of radioiodinated compound 7. In normal tissues, compound 7 is expected to be metabolized by CES into radioiodinated *m*-iodohippuric acid which could be rapidly excreted into urine. On the contrary, compound 7 could bind to amyloid fibril in diseased tissues.

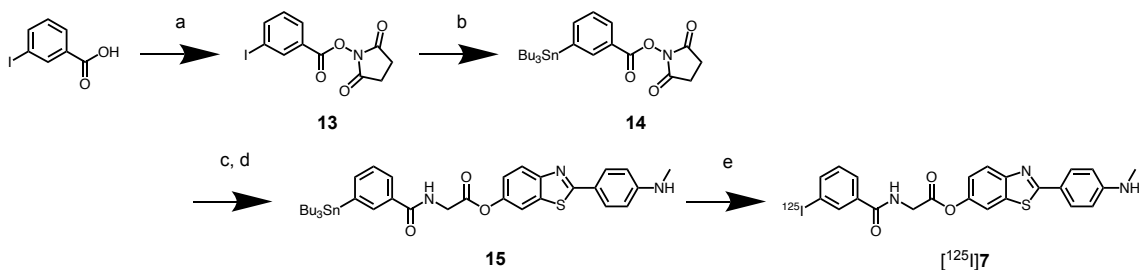
2-2 結果

2-2-1 酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体プローブの合成

Scheme 2-1 および Scheme 2-2 に **7** およびその放射性ヨウ素標識体 ($[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$) の合成経路を示す。まず、既知の合成法[23,44]に従い、2-amino-6-methoxybenzothiazole を原料として3段階の反応を経て **10** (PiB) を合成した。次に、3-iodobenzoic acid から得た **12** (*m*-iodohippuric acid) と **10** を縮合し、**7** を合成した。また、**14** を glycine と縮合した後、さらに **10** と縮合し、標識前駆体である **15** を合成した。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ はスズ-ヨウ素交換反応により放射化学的収率 59%、放射化学的純度 95%以上で無担体状態として得た後、非標識体 **7** との同時分析により同定した (Fig. 2-2)。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の比放射能は、 Na^{125}I の比放射能に基づいて $80 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ とした。また、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の生体内放射能分布を評価するにあたり、比較対照として $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の代謝により遊離する **12** の放射性ヨウ素標識体 ($[^{125}\text{I}]\mathbf{12}$) および馬尿酸骨格を含まない **7** の誘導体 **16** とその放射性ヨウ素標識体 ($[^{125}\text{I}]\mathbf{16}$) を合成した (Scheme 2-3、2-4)。



Scheme 2-1 Synthesis protocol of **7**. (a) KOH; (b) PPh_3 , 4-methylaminobenzoic acid; (c) BBr_3 ; (d) Glycine methyl ester, EDCI·HCl, HOBT, Et_3N ; (e) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$; (f) **10**, EDCI·HCl, HOBT, Et_3N



Scheme 2-2 Synthesis protocol of $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$. (a) NHS, DCC; (b) $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$; (c) Glycine, Et_3N ; (d) **10**, EDCI·HCl, HOBT, Et_3N ; (e) Na^{125}I , chloramine T, CH_3COOH

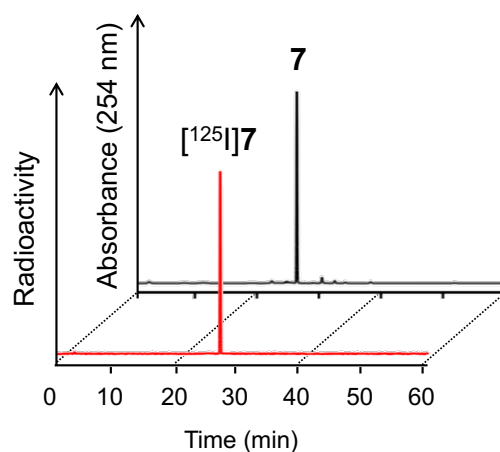
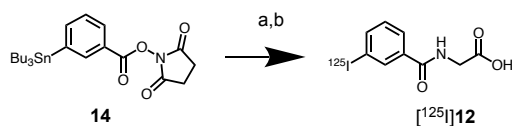
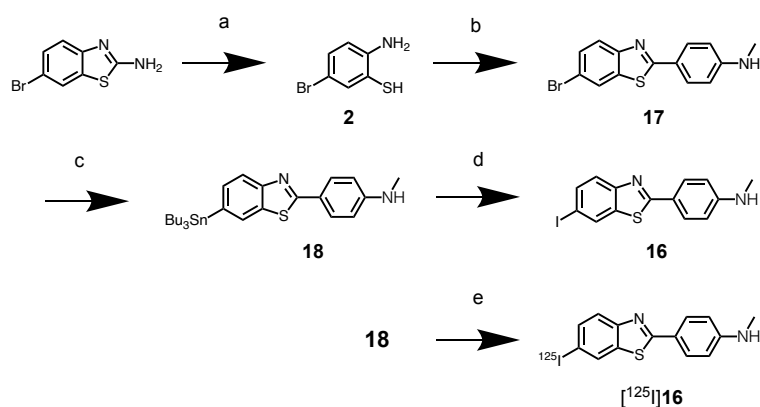


Fig. 2-2 HPLC chromatograms of the mixture of [^{125}I]7 and nonradioactive 7. HPLC (GL-7450, GL-7410, GL Sciences Inc.) on a Cosmosil 5C₁₈-AR-II column with eluate of 0.1% phosphoric acid /acetonitrile=7/3-2/8 (t_r =15-20 min) at a flow rate of 1.0 mL/min.



Scheme 2-3 Synthesis protocol of [^{125}I]12. (a) Glycine, Et₃N; (b) Na¹²⁵I, NCS, CH₃COOH



Scheme 2-4 Synthesis protocol of 16 and [^{125}I]16. (a) KOH; (b) PPh₃, 4-methylaminobenzoic acid; (c) Pd(Ph₃P)₄, (Bu₃Sn)₂, Et₃N; (d) I₂, NaHSO₃, KF; (e) Na¹²⁵I, H₂O₂, HCl

2-2-2 安定性評価

動物実験を想定した投与液 (0.1% Tween80 含有 PBS、4°C) およびマウス血漿 (37°C) における^[125I]7 の安定性を逆相 HPLC で経時的に評価した (Table 2-1)。その結果、投与液中では、6 時間後も 90%以上が未変化体として存在した。一方で、マウス血漿中では、インキュベート後から 7 が消失し、^[125I]12 (*m*-^[125I]iodohippuric acid) の生成を認めた。このことから、^[125I]7 は血液中で分解されやすく、やや不安定であることが示された。

Table 2-1 Stability of ^[125I]7 after incubation in 0.1% Tween80/PBS (A) and in murine plasma (B).

(A)

	Time (h)			
	0	1	3	6
^[125I] 12	0.3	0.1	0.9	1.5
^[125I] 7	90	93	93	93

(B)

	Time (min)		
	0	5	30
^[125I] 12	11	90	90
^[125I] 7	77	0.4	0.4

Data are expressed as the percentage of ^[125I]12 and ^[125I]7 analyzed by HPLC.

2-2-3 カルボキシエステラーゼとの反応性評価

CES は、アミノ酸配列の相同性から CES1～CES5 の 5 つのアイソザイムに大別され、特に薬物の代謝に関与することが知られている CES1 および CES2 は、臓器分布や基質特異性が異なる[41,42]。CES1 は脾臓、腸、腎臓、肝臓、心臓、血漿等、生体内で幅広く発現し、CES2 は肝臓、腸等の比較的限られた臓器に発現する。また、CES1 は、アルコキシ基に比べてアシル基が嵩高い構造を認識しやすく、対して CES2 は、アルコキシ基に比べてアシル基が小さいものが反応しやすいことが知られている。そこで、マウスのリコンビナント CES1 および CES2 (2500 pmol/min) を用いて^[125I]7 のエステラーゼに対する反応性を逆相 HPLC で分析した。その結果、CES1、CES2 ともにインキュベート後から ^[125I]7 の経時的な消失と^[125I]12 の生成が見られ、アイソザイム間での反応性は同等であった (Table 2-2 (A))。一方で、37°C の投与液中で^[125I]7 をインキュベートした場合にも^[125I]12 の生成が見られたが (Table 2-2(B))、CES 存在下の方が^[125I]12 の生成割合が高かった。CES2 については酵素活性を上げることが可能であったため再度検討を行った結果、より代謝反応が進むことを確認した (Table 2-2(A))。このことから^[125I]7 は CES と反応し、^[125I]12 (*m*-^[125I]iodohippuric acid) を遊離することが示された。

Table 2-2 Metabolite analysis after reaction of ^[125I]7 with CES (A) and stability of ^[125I]7 after incubation in 0.1% Tween80/PBS at 37°C (B).

(A)

		Time (h)		
		0	1	3
CES1 (2500 pmol/min)	^[125I] 12	2.2	9.0	23
	^[125I] 7	85	83	68
CES2 (2500 pmol/min)	^[125I] 12	2.2	11	29
	^[125I] 7	85	79	60
CES2 (16000 pmol/min)	^[125I] 12	2.4	31	61
	^[125I] 7	88	61	23

(B)

		Time (h)		
		0	1	3
	^[125I] 12	1.4	9.0	13
	^[125I] 7	86	78	68

Data are expressed as the percentage of ^[125I]12 and ^[125I]7 analyzed by HPLC.

2-2-4 *In vitro* オートラジオグラフィ

第1章 1-2-3と同様に健常マウスおよびAAアミロイドーシスモデルマウスの脾臓組織切片を用いて評価した。健常マウスにおいては、組織内にアミロイドの沈着を認めず、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ 由来の放射能集積は低いレベルであった (Fig. 2-3(A))。一方、病態モデルマウスにおいては脾臓のリンパ濾胞周囲にアミロイドが形成されており、その局在は、放射能分布と概ね一致していた (Fig. 2-3(A))。また、病態モデルマウスの隣接切片を用いて $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の代謝時に生じる $[^{125}\text{I}]\mathbf{12}$ のオートラジオグラフィを実施した結果、放射能の集積は見られなかった。以上の結果より、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は脾臓組織内のアミロイドへ特異的に結合することが示された。さらに、Fig. 2-3(A)に示す病態モデルマウスの隣接切片を用いて、 $\mathbf{7}$ あるいは $\mathbf{10}$ を用いたブロッキング実験を実施した。その結果、それぞれが過剰に存在する条件下 ($50\ \mu\text{M}$) で、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の結合が阻害された (Fig. 2-3(B))。このことから、 $\mathbf{7}$ はアミロイドに対して $\mathbf{10}$ (PiB)と同様の結合部位と相互作用することが示唆された。

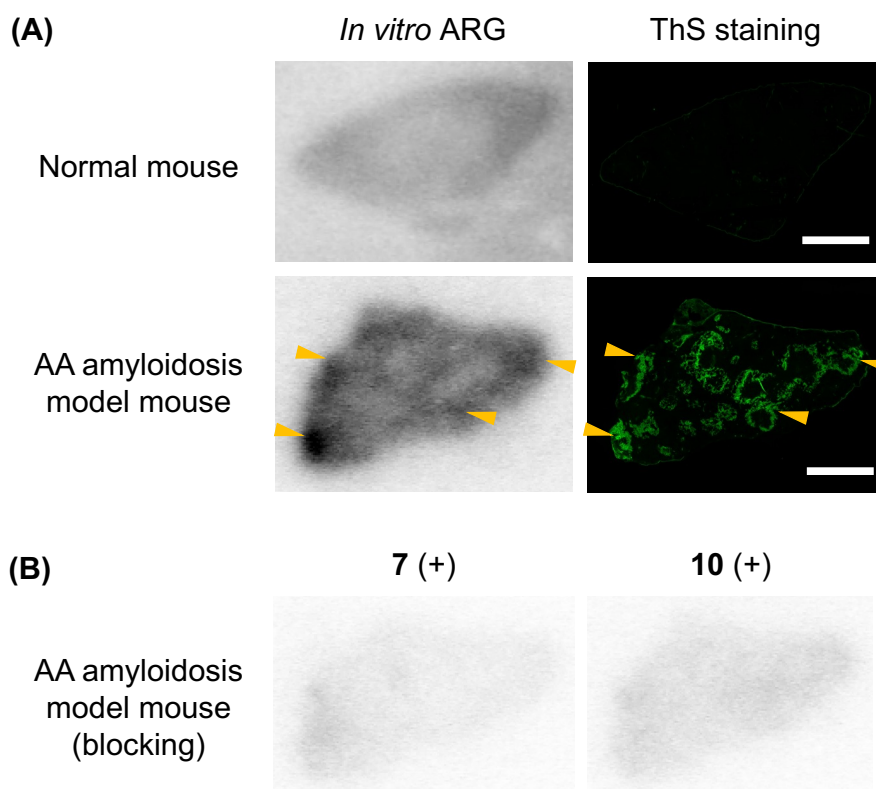


Fig. 2-3 (A) *In vitro* autoradiograms (ARG) of $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ with spleen sections from normal mouse and AA amyloidosis model mouse. The same sections were stained with thioflavin-S (ThS) and arrowheads indicate representative sites corresponding to the position of amyloid deposits and radioactivity. Scale bar = 1 mm. (B) *In vitro* autoradiograms of the blocking study. Blocking study was performed by co-addition of excess nonradioactive $\mathbf{7}$ or $\mathbf{10}$ ($50\ \mu\text{M}$) with $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ on adjacent spleen section of (A).

2-2-5 マウスにおける生体内放射能分布評価

Table 2-3 に健常マウスおよび病態モデルマウスにおける $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の生体内放射能分布の結果を示す。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は、全身の臓器へ分布後、血液を含む正常組織から速やかに放射能が消失し、投与 24 時間後には約 5%が糞便中、約 65%が尿中へ排泄された。特に投与後早期から腎臓へ高く集積し、胃、甲状腺、脳への集積は低かった。病態モデルマウスにおいても同様の分布を示したが、投与 10 分後の脾臓においては病態モデルマウスの方が高い放射能集積を示した。さらに、健常マウスに $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の代謝物である $[^{125}\text{I}]\mathbf{12}$ および従来のアミロイドイメージングプローブと同様の thioflavin-T 誘導体で、馬尿酸骨格を含まない $\mathbf{7}$ の誘導体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{16}$ を投与し、主要臓器（血液、脾臓、腸、腎臓、肝臓）における放射能集積の経時的な変化を比較した (Fig. 2-4)。その結果、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は $[^{125}\text{I}]\mathbf{12}$ と同様の挙動を示したが、腎臓以外の臓器において投与 3 時間後までは $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の方が高く集積する傾向が見られた。一方、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{16}$ は、全ての臓器において最も高く集積した。

Table 2-3 Biodistribution of radioactivity after injection of [¹²⁵I]7 into normal mice (A) and AA amyloidosis model mice (B).

(A)

Organ	Time after injection				
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
Blood	1.53 ± 0.11	0.56 ± 0.06	0.32 ± 0.04	0.18 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Spleen	0.44 ± 0.07	0.23 ± 0.02	0.14 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.01
Pancreas	0.39 ± 0.07	0.18 ± 0.07	0.13 ± 0.09	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.005
Stomach	1.27 ± 0.30	0.91 ± 0.26	0.75 ± 0.08	0.30 ± 0.05	0.08 ± 0.03
Intestine	0.59 ± 0.14	0.95 ± 0.17	0.89 ± 0.13	0.71 ± 0.17	0.13 ± 0.03
Kidney	4.77 ± 0.66	0.94 ± 0.28	0.37 ± 0.05	0.16 ± 0.02	0.09 ± 0.02
Liver	1.94 ± 0.10	0.94 ± 0.07	0.56 ± 0.07	0.34 ± 0.04	0.16 ± 0.03
Heart	0.49 ± 0.16	0.19 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.005
Lung	1.40 ± 0.20	0.46 ± 0.08	0.21 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.06
Muscle	0.17 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.06	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.11
Thyroid	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.08	0.12 ± 0.003	0.14 ± 0.08
Brain	0.09 ± 0.03	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.003	0.005 ± 0.002

(B)

Organ	Time after injection				
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
Blood	2.67 ± 2.32	0.56 ± 0.68	0.40 ± 0.67	0.10 ± 0.11	0.02 ± 0.008
Spleen	0.85 ± 0.66	0.14 ± 0.13	0.11 ± 0.19	0.04 ± 0.04	0.01 ± 0.005
Pancreas	1.15 ± 1.05	0.33 ± 0.28	0.32 ± 0.50	0.04 ± 0.05	0.02 ± 0.004
Stomach	0.31 ± 0.12	0.14 ± 0.04	0.17 ± 0.14	0.32 ± 0.47	0.05 ± 0.05
Intestine	0.56 ± 0.42	0.13 ± 0.10	0.13 ± 0.20	0.10 ± 0.08	0.01 ± 0.01
Kidney	9.67 ± 7.50	4.39 ± 4.48	1.73 ± 3.30	0.51 ± 0.94	0.03 ± 0.02
Liver	1.12 ± 1.00	0.22 ± 0.23	0.17 ± 0.28	0.06 ± 0.06	0.01 ± 0.01
Heart	0.79 ± 0.71	0.17 ± 0.23	0.12 ± 0.21	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.01
Lung	1.55 ± 1.19	0.45 ± 0.34	0.28 ± 0.37	0.14 ± 0.14	0.01 ± 0.004
Muscle	0.41 ± 0.39	0.08 ± 0.09	0.05 ± 0.08	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01
Thyroid	0.03 ± 0.04	0.01 ± 0.004	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.02
Brain	0.14 ± 0.13	0.02 ± 0.02	0.02 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.003 ± 0.002

Data are expressed as the average percentage of the injected dose (%ID) per gram of tissue or %ID (thyroid). Each value represents mean ± S.D. (n = 5 for normal mice (A) and n = 3-4 for AA amyloidosis model mice (B)).

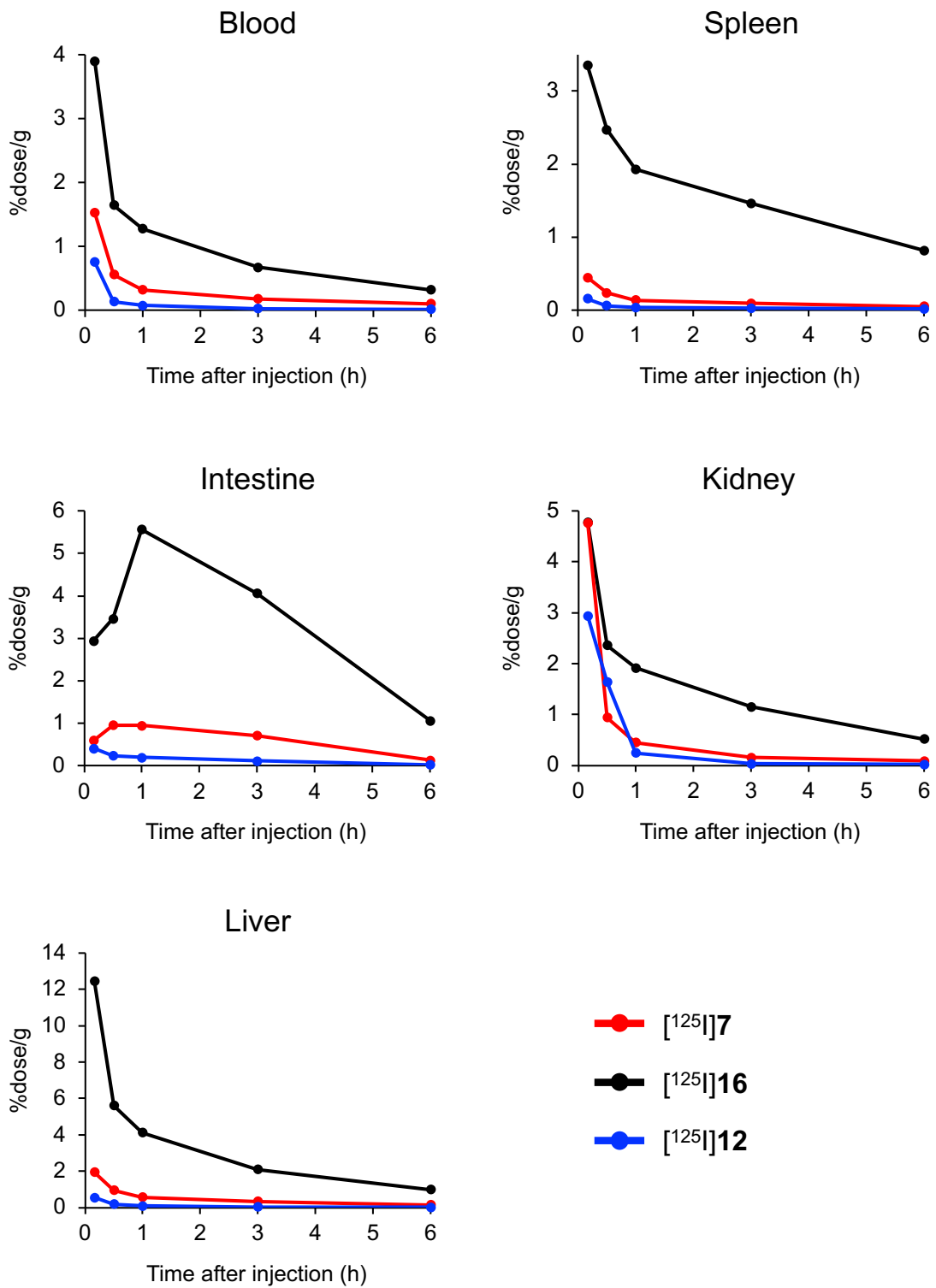


Fig. 2-4 Biodistribution of radioactivity after injection of $[^{125}\text{I}]7$, $[^{125}\text{I}]16$ and $[^{125}\text{I}]12$ in normal mice.

2-2-6 尿中代謝物分析

健常マウスに $[^{125}\text{I}]7$ を静脈内投与した後、24 時間採尿した尿を逆相 HPLC で分析した。その結果、 $[^{125}\text{I}]7$ はほとんど存在せず、尿中の放射能の 80~90%が $[^{125}\text{I}]12$ (*m*- $[^{125}\text{I}]$ iodohippuric acid) として検出された。

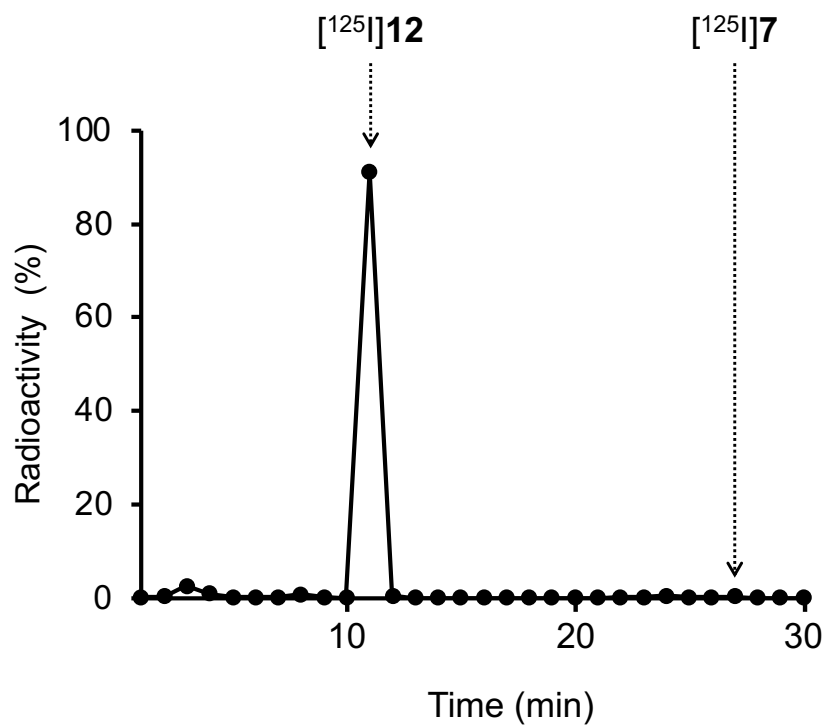


Fig. 2-5 Analysis of radiolabeled metabolite ($[^{125}\text{I}]12$) excreted into urine at 24 h post-injection of $[^{125}\text{I}]7$.

2-2-7 Ex vivo オートラジオグラフィ

[¹²⁵I]7 の投与 10 分後におけるマウスの脾臓切片を用いて、*ex vivo* オートラジオグラフィを実施した。健常マウスではアミロイドの沈着が認められず、放射能の集積も低いレベルであった (Fig. 2-6)。一部、組織内に放射能が集積する箇所も見られたが、生体内放射能分布評価の結果 (Table 2-3) から血液中に滞留する放射能に由来すると考えられた。病態モデルマウスの脾臓では、アミロイドがリンパ濾胞周囲に不均一に分布し、[¹²⁵I]7 由来の放射能分布と一致した (Fig. 2-6)。このことから [¹²⁵I]7 は *in vivo* においてもアミロイドへ結合することが示された。

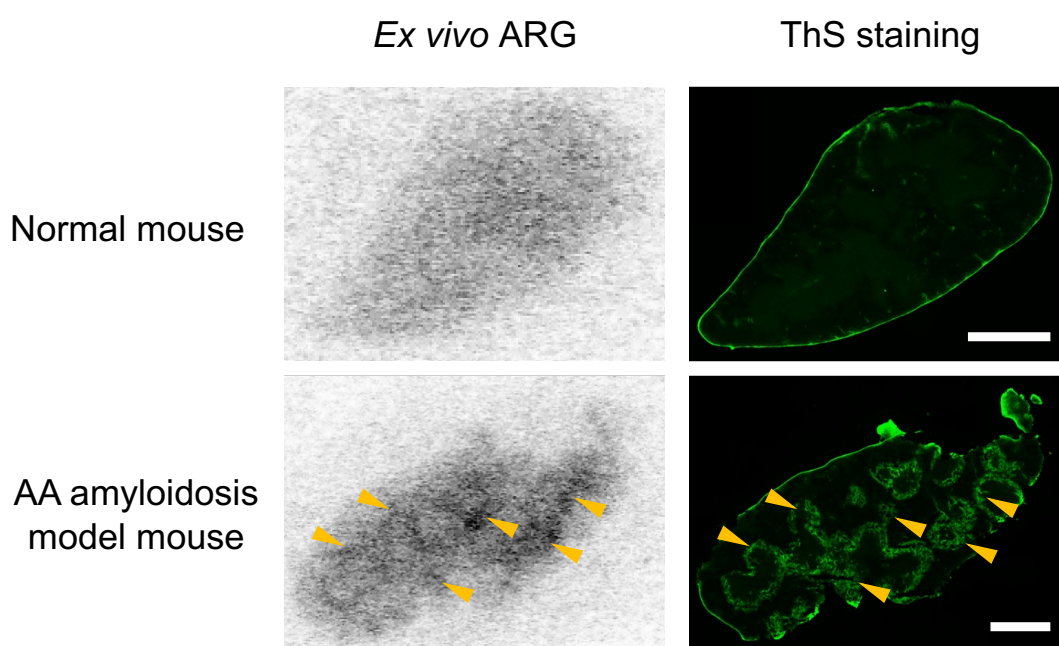


Fig. 2-6 *Ex vivo* autoradiograms (ARG) of [¹²⁵I]7 using spleen sections from normal mouse and AA amyloidosis model mouse. [¹²⁵I]7 was intravenously injected into mice, and the spleens were excised at 10 min post-injection. The same sections were then stained with thioflavin-S (ThS) to confirm the localization of amyloid deposits. Arrowheads indicate representative sites corresponding to the position of amyloid deposits and radioactivity. Scale bar = 1 mm.

2-3 考察

本研究では、アミロイドイメージングを目的とした酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体 **7** の放射性ヨウ素標識体を開発し、全身性アミロイドーシスの核医学診断用プローブとしての有効性を評価した。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は所期の通り、*in vitro* において CES による代謝を受け、それに伴い $[^{125}\text{I}]\mathbf{12}$ (*m*- $[^{125}\text{I}]\text{iodohippuric acid}$) を遊離することが示された。血漿中での安定性評価や尿中代謝物の分析からも $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の消失と $[^{125}\text{I}]\mathbf{12}$ の生成が認められ、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は生体内においても CES による代謝を受けることが示唆された。また、**7** は構造中にアミドも有しているが、アミド部位が分解した場合に生成される *m*- $[^{125}\text{I}]\text{iodobenzoic acid}$ は、いずれの分析においても検出されなかった。

生体内放射能分布評価では、胃や甲状腺への放射能集積が低く、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は生体内における脱ヨウ素反応に対して非常に安定であることが示された。一方、血漿中での安定性評価から $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は生体内へ投与後すぐに代謝されることが示唆されたため、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の代謝物として生じる **12** および従来のアミロイドイメージングプローブと同様の thioflavin-T 誘導体で、馬尿酸骨格を含まない **7** の誘導体 **16** の健常マウスにおける体内動態と比較検討した。その結果、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は生体内で $[^{125}\text{I}]\mathbf{12}$ と似た挙動を示したが、腎臓以外の臓器において投与 3 時間後までは $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の方が高く集積する傾向が見られた。また、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{16}$ よりも血液、脾臓、腸、腎臓、肝臓における放射能集積が低く、各臓器から速やかに消失した。このことから、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は投与後から血液中で代謝され始めるが、一部は未変化体として全身の臓器へ分布することが示唆された。また、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ が正常組織内で代謝され $[^{125}\text{I}]\mathbf{12}$ として排泄されることにより、従来のアミロイドイメージングプローブで懸念されていた正常組織における非特異的な放射能集積は低減される可能性が示された。さらに、*in vitro* および *ex vivo* オートラジオグラフィの結果、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は AA アミロイドーシスにおける脾臓組織内のアミロイドに特異的に集積した。これらのことから、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は生体内で CES と鋭敏に反応する一方で、その未変化体はアミロイドへ結合することが示された。

しかし、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の構造では、血液中での安定性がやや低いことから臨床への応用は困難であると考えられた。代謝型プローブは、生体内へ投与されてからアミロイドへ結合するまでは安定な状態で存在し、その後アミロイドに結合しなかったプローブが徐々に代謝を受け、排泄されることが望ましい。この課題を解決するには、代謝機構の制御が必要であると考えられた。これまでに腎臓への非特異的な放射能集積を低減することを目的として、腎刷子縁膜酵素を利用した放射性プローブの開発が報告されている[44]。

このように、非特異的集積が問題となっている肝臓、腎臓、腸等の対象とする臓器に特異的に発現する酵素をターゲットとした分子設計を施すことにより、血液中でのプローブの代謝を回避することが出来ると考えられる。また、エステラーゼはアイソザイムによって臓器分布や基質特異性が異なることが知られており[41,42]、それらの性質を考慮したプローブの分子設計も有効であると考えられる。さらに、代謝機構の制御に加え、アミロイドに対するプローブの結合親和性についても改善の余地があると考えられた。代謝型プローブは生体内へ投与された後、次第に代謝を受け未変化体が減少するため、標的へのより高い結合親和性が重要となる。*In vitro* オートラジオグラフィの結果より、病態モデルマウスの脾臓切片を用いたブロッキング実験では、**7**または**10**を添加したサンプルで¹²⁵I**7**の結合が抑制され、両者における放射能集積はほぼ同等であった。このことから、**10** (PiB) の6位に馬尿酸骨格を導入することによる顕著な結合親和性の低下は示唆されなかった。一方、*in vitro*および*ex vivo*オートラジオグラフィの結果、病態モデルマウスの脾臓組織内のアミロイドに集積した¹²⁵I**7**の放射能シグナルはやや弱かったことから、¹²⁵I**7**は核医学診断に用いるにはアミロイドに対する結合親和性が不十分であることが示唆された。すなわち、AAアミロイドーシスモデルマウスの脾臓組織内のアミロイドの検出には、¹²⁵I**7**におけるアミロイド認識骨格にPiBを選択することが最適ではないと考えられた。PiBは、本来標的とするAβ以外のアミロイドにも結合するが、タンパク種や組織によってその親和性が異なることが報告されている[46]。よって、本プローブ内のアミロイド認識骨格を誘導化し、標的部位への結合親和性を精査することが有効であると考えられた。

2-4 小括

- ・ 新規アミロイドイメージングプローブとして酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体 **7** の放射性ヨウ素標識体^[125I]**7** を設計、合成した。
- ・ ^[125I]**7** は投与液中で安定に存在した一方で、血漿中ではやや不安定であった。
- ・ ^[125I]**7** は CES に対して高い反応性を示し、*m*-^[125I]iodohippuric acid の遊離を認めた。
- ・ AA アミロイドーシスモデルマウスの脾臓切片を用いた *in vitro* オートラジオグラフィにおいて、^[125I]**7** はアミロイド沈着部位を描出した。
- ・ マウスを用いた生体内放射能分布評価において、^[125I]**7** は全身へ分布した後、速やかに生体内から消失した。投与後早期には AA アミロイドーシスの好発部位である脾臓において健常マウスと比較してモデルマウスで放射能が高く集積した。
- ・ *Ex vivo* オートラジオグラフィの結果から、^[125I]**7** は *in vivo* においても脾臓組織内のアミロイドへ結合することが示された。

以上の結果より、酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体 **7** の放射性ヨウ素標識体は、AA アミロイドーシスの核医学診断用プローブとして有効である可能性が示された。

総括

本研究では、全身性アミロイドーシスの核医学診断用プローブの開発を目的に、(1) thioflavin-T-Congo-red ハイブリッド型プローブ、(2) 酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体プローブについてそれぞれ設計、合成し、AA アミロイドーシスモデルマウスを用いてそれらの有効性について評価し、以下の知見を得た。

(1) Thioflavin-T-Congo-red ハイブリッド型プローブの開発

アミロイドに対するプローブの結合性の向上を目的として、thioflavin-T および Congo-red の骨格を併せ持つハイブリッド型プローブ **1** を設計し、放射性ヨウ素標識体 [¹²⁵I]**1** を合成した。 [¹²⁵I]**1** のアミロイドに対する結合親和性は thioflavin-T および Congo-red よりも有意に高く、アミロイドへの結合には thioflavin-T ユニットよりも Congo-red ユニットの方が寄与することが示唆された。また、 [¹²⁵I]**1** は、健常マウスと比較して病態モデルマウスの好発部位である脾臓へ有意に高く集積し、オートラジオグラフィによる評価において脾臓組織内のアミロイド分布を明瞭に描出した。これらの結果から、プローブ **1** 分子内に thioflavin-T および Congo-red の 2 つの骨格を融合させたハイブリッド型プローブの分子設計は、アミロイドに対する結合性が増大され、全身性アミロイドーシスの核医学診断用プローブとして有効である可能性が示された。

(2) 酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体プローブの開発

正常組織内の CES を利用してプローブの非特異的集積の低減を目指した酵素代謝型馬尿酸結合ベンゾチアゾールアニリン誘導体 (**7**) を設計し、放射性ヨウ素標識体 [¹²⁵I]**7** を合成した。 [¹²⁵I]**7** は水系溶媒中では未変化体として安定に存在していたのに対し、CES 存在下では高い反応性を示し、エステルの代謝により *m*- [¹²⁵I]iodohippuric acid が遊離された。また、 [¹²⁵I]**7** は投与後早期の病態モデルマウスの脾臓において健常マウスよりも高く集積し、オートラジオグラフィでは脾臓組織内のアミロイド分布と一致したことから、 [¹²⁵I]**7** は生体内でアミロイドへ特異的に結合することが示された。さらに、 [¹²⁵I]**7** は従来のアミロイドイメージングプローブと同様の thioflavin-T 誘導体 ([¹²⁵I]**16**) よりも健常マウスの主要臓器における集積が低かった。これらの結果から、アミロイドへの結合性を有するプローブが CES に

よる代謝機構を利用し、放射性プローブの排泄を促進する分子設計は核医学診断におけるバックグラウンドの低減に有効である可能性が示された。

本研究において開発した2つのプローブは、AA アミロイドーシスにおける脾臓組織内のアミロイドへ特異的に結合することを示した。AA アミロイドーシスは、脾臓を初発部位とし、次いで腎臓や肝臓へと病変が進展することが知られているが、その一方で、患者の多くは腎症状や消化器症状を呈した段階で病気の発見に至る。特に、関節リウマチ等の炎症性疾患から続発的に発症しやすい AA アミロイドーシス[7]において、アミロイドイメージングによって初期の脾臓病変を捉えることが出来れば、早期診断、早期治療介入へと繋がるのが期待される。さらに、両者のプローブはアミロイドへの結合親和性の向上やバックグラウンドの低減を指向した分子設計により、全身性アミロイドーシスの核医学診断における診断精度を向上できる可能性を示した。

さらに、近年では、アミロイドーシスの発症メカニズムの解明が進み、治療標的となり得るポイントが明らかになりつつある[47,48]。以前まではアミロイドーシスの中でも罹患患者数が多いアルツハイマー病の薬剤開発が中心であったが、特に予後が悪い心アミロイドーシスをはじめとする全身性アミロイドーシスの治療薬開発も注目されており、これまでに低分子医薬品[49,50]、抗体医薬品[51]、核酸医薬品[52]等、多岐にわたる薬剤が開発されている。他にも基礎研究として遺伝子治療[53]、ナノ粒子を用いた治療[54]、光酸素化治療[55,56]等が検討されており、これまで治療が難しいと考えられていたアミロイドーシスも適切な診断と治療を施すことができれば、治癒しうる疾患であると認識されるようになってきている。このように、より早期の適切な診断や治療効果判定が重要視される中、本研究で開発したプローブを診断時だけでなく治療時のモニタリングにも利用することで、適切な治療を施すことに繋がり、重症化の予防や予後の改善に寄与することが期待できる。

以上、本研究で得られた知見が、全身性アミロイドーシスの核医学診断や新たな医薬品開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました本学薬品物理化学講座教授・向高弘先生に深く感謝の意を表します。

本研究論文の審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました本学医薬細胞生物学講座教授・土反伸和先生、薬品化学講座教授・上田昌史先生、機能性分子化学講座教授・田中将史先生に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、研究内容への適切な御助言・御教示を賜りました本学薬品物理化学講座准教授・佐野紘平先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有機化学や分子イメージング手法をはじめとした多くの技術を御教示して頂きました本学薬品物理化学講座講師・山崎俊栄先生、金沢大学臨床分析科学研究室助教・宗兼将之先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有益なる御助言と深い御理解を頂きました本学放射線管理室准教授・安岡由美先生に深く感謝致します。

第1章の研究に際しまして、有益なる御助言を賜りました武庫川女子大学分析学研究室教授・萩森政頼先生に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、御協力頂きました本学薬品物理化学講座 皆木香織学士、土屋美希学士、藤岡知佳学士、大島皐月氏に感謝致します。

本研究の遂行にあたり討論に参加して頂きました本学薬品物理化学講座 甘中健登博士、田中寿枝学士、東里沙学士をはじめとする薬品物理化学講座の諸氏に感謝致します。

最後に、これまでの研究生活を支え、励まし続けてくれた家族に心から感謝致します。

実験の部

研究全般に関する項目

本研究に用いた主要な試薬、機器等について以下に一括する。動物実験は、神戸薬科大学動物実験委員会の承認を得たのち、神戸薬科大学動物実験実施規定を遵守し、動物に不必要な苦痛を与えぬよう十分に配慮して行った。

試薬・使用動物・機器

Thioflavin-T、4-methylaminobenzoic acid、 BBr_3 は、Sigma-Aldrich 社から購入した。Pd/C (Pd 10%)、bis(tributyltin)、sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate tetrahydrate、3-iodobenzoic acid、glycine methyl ester hydrochloride、EDCI·HCl は、東京化成工業社から購入した。2-Amino-5-bromobenzothiazole、KOH、 CH_3COOH 、4-nitrobenzaldehyde、 Et_3N 、tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)、35% HCl 水溶液、 NaNO_2 、 Na_2CO_3 、KF、Tris、EDTA、sodium dihydrogenphosphate dihydrate、disodium hydrogenphosphate 12-water、Congo-red、2-amino-6-methoxybenzothiazole、 PPh_3 、NaOH、 NaHCO_3 、 Na_2SO_4 、LiOH、NHS、DCC、glycine、phosphoric acid、 H_2O_2 、Tween80、その他合成に用いた有機溶媒は、富士フィルム和光純薬社から購入した。 NaHSO_3 、PBS(-)、NCS、HOBt、chloramine-T は、ナカライテスク社から購入した。Freund's complete adjuvant、thioflavin-S は Santa Cruz Biotechnology 社から購入した。SAA₁₋₂₇ は、GenScript 社から購入した。A β ₁₋₄₂ は、ペプチド研究所から購入した。リコンビナントマウス CES1、CES2 は、R&D システム社から購入した。生理食塩水は大塚製薬工場社から購入した。 Na^{125}I 、液体シンチレーター (MICROSCINT-20) は、PerkinElmer 社から購入した。

実験に用いたマウスは、日本クレア社から購入した。

中圧分取液体クロマトグラフィーには、山善社製の自動設定中圧分取液体クロマトグラフィシステム (YFLC AI-580) を使用し、Purif-Pack-EX (充填材：シリカゲル SiOH、粒子径：50 μm 、カラムサイズ：M-L) を装着した。核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance; NMR) 測定には、Agilent Technologies 社製の Varian Mercury 300 あるいは日本電子株式会社製の JNM-ECZ400S FT-NMR を用い、重水素化溶媒中の残留溶媒を内標準物質として測定した。エレクトロスプレーイオン化高分解能質量分析 (electrospray ionization high-resolution mass spectrometry; ESI-HRMS) には、Thermo Fisher Scientific 社製の Thermo

Scientific Exactive を使用した。放射能の測定には、PerkinElmer 社製の Wizard 1480 および TopCount NXT、Aloka 社製の CURIEMETER IGC-3 を用いた。プレートリーダーには、日立ハイテクサイエンス社製の MICROPLATE READER SH-9000 Lab を使用した。ミクロトームは、Leica Microsystems 社製のクリオスタット CM1850 を使用した。蛍光画像は、キーエンス社製の BZ-X710 All-in-one Fluorescence Microscope により取得した。逆相 HPLC には、GL Sciences 社製の UV 検出器 GL-7450、ポンプ GL-7410 を使用し、ナカライテスク社の Cosmosil 5C₁₈-AR-II column 4.6 mmI.D.×250 mm を装着した。オートラジオグラムは、GE Healthcare 社製の Typhoon FLA 7000Imager により取得し、画像解析には Image J を使用した。セルハーベスターは、PerkinElmer 社製の FilterMate と Self-Aligning glass fiber filter を使用した。

第 1 章

【1】 2-Amino-5-bromobenzenethiol (2) の合成

Aiello らの方法[37]を参考に合成を行った。2-Amino-6-bromobenzothiazole (2.5 g, 11 mmol) を 50% KOH 水溶液 (30 mL) に溶かし、24 時間還流した。反応溶液を冷却し、CH₃COOH で中和した。中和時に析出した固体を回収し、水洗した。残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane=3/7) で精製し、目的物 **2** を収量 (収率) 1.1 g (49%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[35]。

【2】 6-Bromo-2-(4-nitrophenyl)benzo[d]thiazole (3) の合成

Lee らの方法[38]を参考に合成を行った。**2** (0.35 g, 1.7 mmol) と 4-nitrobenzaldehyde (0.26 g, 1.7 mmol) を DMSO (10 mL) に溶解し、2 時間還流した。反応溶液を冷却後、超純水を加え、析出した固体を減圧ろ過により回収した。残渣を THF-MeOH 中で再結晶させ、目的物 **3** を収量 (収率) 0.26 g (46%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[36]。

【3】 4-(6-Bromobenzo[d]thiazol-2-yl)aniline (4) の合成

Chen らの方法[39]を参考に合成を行った。**3** (0.30 g, 0.90 mmol) と Pd/C (Pd 10%) (50 mg, 0.50 mmol) を EtOAc (20 mL) に加え、室温で 24 時間水素化した。反応溶液をセライト濾過し、濾液を減圧留去した。残渣を中圧分取クロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane=3/7) で精製し、目的物 **4** を収量 (収率) 0.16 g (52%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[37]。

【4】 4-(6-(Tributylstannyl)benzo[d]thiazol-2-yl)aniline (5) の合成

4 (0.10 g, 0.33 mmol)、Et₃N (5.0 mL)、bis(tributyltin) (0.50 mL, 1.0 mmol) を 1,4-dioxane (10 mL) に溶解し、tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (50 mg, 0.043 mmol) を加えて 24 時間還流した。反応溶液を冷却後セライトで濾過し、濾液を減圧留去した。残渣を中圧分取クロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane=3/7) で精製し、目的物 **5** を収量 (収率) 85 mg (50%) で得た。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7.97 - 8.17 (m, 1H), 7.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35 - 7.58 (m, 1H), 6.66 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.91 (s, 2H), 1.40 - 1.69 (m, 6H), 1.30 (sxt, *J* = 7.4 Hz, 6H), 1.09 (t, *J* = 8.0 Hz, 6H), 0.85 (t, *J* = 7.2 Hz, 9 H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃-*d*) δ ppm 9.9, 13.8, 27.5, 29.2, 114.8, 122.0, 124.1,

129.0, 129.2, 133.7, 134.9, 138.1, 149.3, 154.2, 168.1. HRMS (ESI) m/z : calcd for $C_{25}H_{37}N_2SSn$ $[M+H]^+$ 517.1621, found 517.1678.

【5】 Sodium (*E*)-4-amino-3-((4-(6-(tributylstannyl)benzo[*d*]thiazol-2-yl)phenyl)diazenyl)naphthalene-1-sulfonate (6) の合成

5 (74 mg, 0.14 mmol) を MeOH (3.0 mL) と 1 M HCl (1.0 mL) に溶かし、1 M $NaNO_2$ 水溶液 (2.0 mL) を氷冷下で加えた。そこに 5% Na_2CO_3 水溶液に溶解させた sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate tetrahydrate (46 mg, 0.14 mmol) を氷冷下で滴下して加えながら、2 時間攪拌した。反応溶液を濾過後、残渣を中圧分取クロマトグラフィー ($CHCl_3/MeOH=8/2$) で精製し、目的物 6 を収量 (収率) 27 mg (36%) で得た。 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 0.85 (t, $J = 7.3$ Hz, 9H), 8.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.32 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 8.12 - 8.29 (m, 4H), 8.05 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.95 (br. s, 2H), 7.38 - 7.76 (m, 2H), 1.54 (dt, $J = 15.5, 7.6$ Hz, 6H), 1.30 (dq, $J = 14.5, 7.2$ Hz, 6H), 0.98 - 1.18 (m, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 9.5, 13.6, 26.8, 28.7, 79.2, 122.5, 123.1, 124.0, 124.3, 125.2, 128.3, 128.4, 128.7, 129.2, 129.7, 132.1, 132.6, 133.1, 133.9, 135.0, 139.1, 146.6, 153.8, 154.5, 166.3. HRMS (ESI) m/z : calcd for $C_{35}H_{41}N_4O_3S_2Sn$ $[M-Na]^-$ 749.1647, found 749.1660.

【6】 Sodium (*E*)-4-amino-3-((4-(6-iodobenzo[*d*]thiazol-2-yl)phenyl)diazenyl)naphthalene-1-sulfonate (1) の合成

6 (11 mg, 0.014 mmol) の $DMSO$ 溶液 (5.0 mL) に $CHCl_3$ に溶解させた 1 M iodine を滴下しながら十分量加え、室温で攪拌した。1 M $NaHSO_3$ 溶液 (2.0 mL) と 1 M KF 水溶液 (1.0 mL) を加え、反応を停止した。反応溶液を濾過後、残渣を中圧分取クロマトグラフィー ($CHCl_3/MeOH=8/2$) で精製し、目的物 1 を収量 (収率) 0.28 mg (3.3%) で得た。 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 8.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.44 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.29 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 8.22 (d, $J = 1.0$ Hz, 2H), 8.15 (d, $J = 1.0$ Hz, 2H), 7.89-7.94 (m, 1H), 7.86 (m, 1H), 7.55-7.64 (m, 1H), 7.45-7.53 (m, 1H). ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 90.6, 117.5, 123.0, 123.9, 124.1, 124.6, 125.0, 128.3, 128.4, 128.5, 129.2, 130.7, 132.1, 132.4, 132.9, 135.5, 136.9, 146.6, 153.1, 154.7, 167.3. HRMS (ESI) m/z : calcd for $C_{23}H_{14}IN_4O_3S_2$ $[M-Na]^-$ 584.9630, found 584.9566.

【7】放射性ヨウ素標識体 [¹²⁵I]1 の合成

DMSO に溶解した **6** (1.0 mg/mL、20 μ L)、MeOH に溶解した NCS (0.50 mg/mL、20 μ L)、Na¹²⁵I (5.9 MBq) を混合した。CH₃COOH で溶液の pH を 3 に調整した後、30 分間遮光して室温で静置した。放射性ヨウ素標識体は逆相 HPLC (5C₁₈-AR-II column 4.6 mmI.D.×250 mm、water (0.1% TFA) /acetonitrile (0.1% TFA) =5/5-1/9 (t=0-30 分)、流速 1.0 mL/分) にて精製し、非標識体 (**1**) との同時分析により同定した。

【8】アミロイド線維の作製

(1) Serum amyloid A 線維

Serum amyloid A₁₋₂₇ peptide を DMSO で 10 mg/mL になるように溶解した。20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) で 0.10 mg/mL になるように希釈し、37°C で 60 時間インキュベートした。

(2) Amyloid β 線維

Amyloid β ₁₋₄₂ peptide に 1 mM EDTA を含む 10 mM phosphate buffer (PB, pH 7.4) を加えて 0.25 mg/mL に調製した。60°C で加温しながら溶解させたのち、37°C で 48 時間インキュベートした。

(3) Thioflavin-T の蛍光強度測定

作製したアミロイド線維を 20 μ g/mL になるように作製時の溶媒で希釈し、同様の溶媒で thioflavin-T を 50 μ M に調製した。96 well プレート内にアミロイド線維 (160 μ L) と thioflavin-T (40 μ L) を加え、混合した後、30 分間遮光して室温で静置した。プレートリーダーを用いて、励起波長を 440 nm に設定し、470-600 nm の蛍光スペクトルを得た。Thioflavin-T の 480 nm を極大とした蛍光強度の上昇をもって、線維構造の形成を確認し、使用時まで-80°C で保管した。

【9】結合親和性評価

(1) 結合飽和アッセイ

30% DMSO 含有 PBS (150 μ L)、**1** (30 μ L/30% DMSO 含有 PBS、最終濃度 : 0.49-62.5 nM)、[¹²⁵I]**1** (30 μ L/30% DMSO 含有 PBS、0.16-20 kBq)、A β 線維溶液 (30 μ L/1 mM EDTA 含有 10 mM PB (pH 7.4)、最終濃度 : 0.11 μ g/mL) を混合し、室温で 1 時間インキュベートした。混合溶液をセルハーベスターおよびグラスファイバーフィルターを用いて吸引濾過した後、フィルターに液体シンチレーターを添加して液

体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。得られた結果から GraphPad Prism 6.0 を用いて Scatchard plot を作成し、 K_d 値および B_{max} 値を算出した。

(2) 競合阻害アッセイ

30% DMSO 含有 PBS (150 μ L)、評価化合物 (30 μ L/30% DMSO 含有 PBS、最終濃度 : 0.4-6250 nM)、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ (30 μ L/30% DMSO 含有 PBS、10 kBq)、 $\text{A}\beta$ 線維溶液 (30 μ L/1 mM EDTA 含有 10 mM PB (pH 7.4)、最終濃度 : 0.11 μ g/mL) を混合し、室温で 1 時間インキュベートした。混合溶液をセルハーベスターおよびグラスファイバーフィルターを用いて吸引濾過した後、フィルターに液体シンチレーターを添加して液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。得られた結果から GraphPad Prism 6.0 を用いて結合阻害曲線を作成し、 IC_{50} 値を算出した。 IC_{50} 値から Cheng-Prusoff の式 : $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + [\text{L}] / K_d)$ に基づいて K_i を算出した。 K_d 値は $\mathbf{1}$ の K_d : 65 nM を使用した。

【10】 AA アミロイドーシスモデルマウスの作製

(1) Amyloid-enhancing factor の調製

AA アミロイドーシスモデルマウスから肝臓を摘出し、1g あたり 10 mL の生理食塩水を加えてホモジナイズした。ホモジネートをガーゼで濾過し、濾液を生理食塩水で 2.5 倍希釈して AEF として使用した。

(2) 病態モデルマウスの作製

AEF と Freund's complete adjuvant を等量ずつ混合し、1匹あたり 500 μ L を 12 週齢 ICR 系雌性マウスの腹腔内へ投与した。1 週間後に Freund's complete adjuvant と生理食塩水の等量混合液を同様に腹腔内へ投与した。そこから 2 週間後に AA アミロイドーシスモデルマウスとして実験に用いた。

【11】 *In vitro* オートラジオグラフィ

15 週齢 ICR 系雌性健常マウスおよび AA アミロイドーシスモデルマウスの脾臓凍結切片 (5 μ m 厚) を作製した。切片を水で洗浄したのち、50% EtOH に溶解した $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ (370 kBq/mL) と 1 時間インキュベートした。50% EtOH で洗浄後 (1 分 \times 2 回)、イメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。さらに同

一切片に、50% EtOH で調製した 0.125% thioflavin-S 溶液を添加し、3 分間インキュベートした。50% EtOH で洗浄後（1 分×2 回）、蛍光顕微鏡（励起フィルター：470/40 nm および蛍光フィルター：525/50 nm）にて蛍光観察を行い、脾臓組織内のアミロイドの局在を確認した。また、切片上での競合リガンドによる阻害実験として、AA アミロイドーシスモデルマウスの脾臓切片に 50% EtOH で調製した thioflavin-T 溶液あるいは Congo-red 溶液（最終濃度：30 μ M）と [125 I]1（370 kBq/mL）の混合液を添加し、1 時間インキュベートした。上記と同様に切片を洗浄後、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。

【12】 マウスにおける生体内放射能分布評価

15 週齢 ICR 系雌性健常マウス（n=3-4/タイムポイント）および AA アミロイドーシスモデルマウス（n=6/タイムポイント）に 0.01% Tween80 含有 PBS で溶解した [125 I]1（37 kBq/匹、100 μ L）を静脈内より投与した。投与 10、30 分、1、3、6、24 時間後にマウスを屠殺、採血後、主要な臓器を摘出し、重量と放射能を測定した。放射能集積は % injected dose (%ID) あるいは %ID/g で算出し、データは平均 \pm 標準偏差 (SD) で示した。統計解析は、二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) の後、Student の t 検定により行った。また、統計的有意差の基準として $p < 0.05$ を採用した。

【13】 Ex vivo オートラジオグラフィ

15 週齢 ICR 系雌性健常マウスおよび AA アミロイドーシスモデルマウスに [125 I]1（1850 kBq/匹、100 μ L）を静脈内投与した。投与 3 時間後に脾臓を摘出し、凍結切片（20 μ m 厚）を作製した。切片をイメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。さらに【11】と同様の方法により thioflavin-S による染色を実施し、脾臓組織内のアミロイドの局在を確認した。

第 2 章

【1】 2-Amino-5-methoxybenzenethiol (8) の合成

Mathis らの方法[23]を参考に合成した。2-Amino-6-methoxybenzothiazole (15 g, 83 mmol) を 50% KOH 水溶液 (20 mL) に溶かし、24 時間還流した。反応溶液を冷却し、1 M HCl で中和した。中和時に析出した固体を回収し、水洗した。残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane=85/15) で精製し、目的物 **8** を収量 (収率) 5.5 g (42%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[23]。

【2】 4-(6-Methoxy-benzo[*d*]thiazol-2-yl)-*N*-methylaniline (9) の合成

Mathis らの方法[23]および Coelho らの方法[44]を参考に合成した。**8** (0.63 g, 4.1 mmol) と PPh₃ (1.6 g, 6.0 mmol) を toluene (15 mL) に溶解し、室温で 30 分間撹拌した。4-Methylaminobenzoic acid (0.60 g, 4.0 mmol) を加えて 72 時間還流した。溶媒を留去後、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane=2/8) で精製し、目的物 **9** を収量 (収率) 0.53 g (49%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[28]。

【3】 2-(4-(Methylamino)phenyl)benzo[*d*]thiazol-6-ol (10) の合成

Mathis らの方法[23]を参考に合成した。**9** (0.75 g, 2.8 mmol) を CH₂Cl₂ (10 mL) に溶解させた。氷冷下で撹拌しながら BBr₃ (4.0 mL, 42 mmol) を滴下して加えたのち、室温で 24 時間撹拌した。1 M NaOH で pH 7 に調整後、析出した黄色固体を回収し、目的物 **10** を収量 (収率) 0.52 g (73%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[23]。

【4】 Methyl 2-(3-iodobenzoylamino)acetate (11) の合成

3-Iodobenzoic acid (3.0 g, 12 mmol)、glycine methyl ester hydrochloride (1.5 g, 12 mmol)、EDCI·HCl (3.0 g, 19 mmol)、HOBt (0.65 g, 14 mmol)、Et₃N (2.0 mL) を DMF (3.0 mL) に溶かし、室温で 24 時間撹拌した。飽和 NaHCO₃ 水溶液を用いて反応溶液を pH 7 に調整した。Toluene で抽出し、有機層を Na₂SO₄ で脱水した後、溶媒を減圧留去した。溶媒を留去後、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane=1/1) で精製し、目的物 **11** を収量 (収率) 2.4 g (62%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ ppm 8.22 (s, 1H), 7.92 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.85 (d, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.22-7.31 (m, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.75 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ ppm 42.3, 52.7, 94.7, 127.7, 131.4, 137.0, 137.5,

141.9, 168.8, 171.8. HRMS (ESI) m/z: calcd for C₁₀H₁₁INO₃ [M+H]⁺ 319.9778, found 319.9777.

[5] 2-(3-Iodobenzoylamino)acetic acid (12) の合成

11 (0.70 g, 2.2 mmol)、LiOH·H₂O (0.70 g, 17 mmol) を MeOH (10 mL) に加え、Ar 雰囲気下、室温で 24 時間攪拌した。1 M HCl で反応溶液を pH 1 に調整した。反応溶液を CHCl₃/MeOH 混合液 (4/1) で抽出し、Na₂SO₄ で脱水した後、溶媒を減圧留去した。溶媒を留去後、目的物 **12** を収量 (収率) 0.55 g (82%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[57]。

[6] 2-(4-(Methylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl 2-(3-iodobenzoylamino)acetate (7) の合成

10 (0.15 g, 0.59 mmol)、**12** (0.18 g, 0.59 mmol)、HOBt (0.11 g, 0.81 mmol)、EDCI·HCl (0.15 g, 0.97 mmol)、Et₃N (1.5 mL) を THF (10 mL) に溶かし、室温で 24 時間攪拌した。Diethyl ether で抽出し、有機層を Na₂SO₄ で脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃=3/97) で精製し、目的物 **7** を収量 (収率) 11 mg (3.4%) で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.26 (s, 1H), 7.92 (s, 2H), 7.86 (d, *J*=2.3 Hz, 1H), 7.81 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.33 (t, *J*=7.8 Hz 1H), 7.22 (dd, *J*=8.7, 2.3 Hz, 1H), 6.65 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.60-6.55 (m, 1H), 4.29-4.36 (m, 2H), 2.75 (d, *J*=4.8 Hz, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 29.3, 41.7, 94.8, 111.5, 114.9, 119.8, 120.5, 122.1, 126.8, 128.7, 130.7, 134.4, 135.4, 135.8, 140.2, 146.8, 151.9, 152.6, 165.4, 168.7, 169.0. HRMS (ESI) m/z: calcd for C₂₃H₁₉IN₃O₃S [M+H]⁺ 544.0186 found 544.0187.

[7] N-Hydroxy succinimidyl 3-iodobenzoate (13) の合成

Majumdar らの方法[58]を参考に合成を行った。3-Iodobenzoic acid (1.9 g, 7.8 mmol)、NHS (1.0 g, 8.6 mmol)、DCC (1.8 g, 8.6 mmol) を THF (20 mL) に溶かし、室温で一晩攪拌した。反応溶液を濾過し、濾液の溶媒を留去した。残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane=1/1) で精製し、目的物 **13** を収量 (収率) 2.2 g (81%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[58]。

[8] N-Succinimidyl 3-(tributylstannyl)benzoate (14) の合成

Cordonnier らの方法[59]を参考に合成を行った。**13** (1.0 g, 2.9 mmol)、bis(tributyltin)

(2.7 mL、5.3 mmol) を DMF と toluene の混合液 (1/1、15 mL) に溶解し、tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (80 mg, 0.070 mmol) を加えて 2 時間還流した。反応溶液を冷却後セライトで濾過し、濾液を diethyl ether で抽出した。有機層を Na₂SO₄ で脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を中圧分取クロマトグラフィー (diethyl ether/*n*-hexane=3/7) で精製し、目的物 **14** を収量 (収率) 1.3 g (90%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[59]。

【9】 2-(4-(Methylamino)phenyl)benzo[d]thiazol-6-yl 2-(3-tributylstannylbenzoylamino)acetate (15) の合成

Wakisaka らの方法[60]を参考に合成した。NaHCO₃ (50 mg、0.6 mmol) を含む 0.1 M NaOH (3.0 mL) に glycine (45 mg、0.60 mmol) を溶かした。**14** (0.30 g、0.60 mmol) を acetonitrile (3.0 mL) に溶かした後、glycine 溶液に加え、一晚還流した。反応溶液を冷却後、1 M HCl で pH 2 に調整し、EtOAc で抽出した。有機層を Na₂SO₄ で脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を THF (10 mL) に溶かし、さらに化合物 **10** (50 mg、0.19 mmol)、HOBT (30 mg、0.22 mmol)、EDCI·HCl (45 mg、0.29 mmol)、Et₃N (1.0 mL) を加え、室温で 24 時間攪拌した。Diethyl ether で抽出し、有機層を Na₂SO₄ で脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (MeOH/CHCl₃=3/97) で精製した。目的物 **15** を収量 (収率) 27 mg (16%) で得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7.97 (s, 1H), 7.92 (d, J=8.7 Hz, 1H), 7.86 (d, J=2.3 Hz, 1H), 7.82 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.62 (d, J=6.9 Hz, 1H), 7.40-7.50 (m, 1H), 7.22 (dd, J=8.7 Hz, 2.3 Hz, 1H), 6.65 (d, J=8.7 Hz, 2H), 6.53 (d, J=5.0 Hz, 1H), 4.28-4.37 (m, 2H), 2.75 (d, J=4.6 Hz, 3H), 1.41-1.63 (m, 6H), 1.20-1.35 (m, 6H), 0.98-1.15 (m, 6H), 0.84 (t, J=7.3 Hz, 9H). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9.2, 13.5, 26.6, 28.6, 29.3, 41.7, 111.5, 114.9, 119.7, 120.5, 122.1, 127.0, 127.9, 128.7, 132.8, 134.4, 134.8, 139.4, 141.8, 146.9, 151.9, 152.6, 167.3, 168.7, 169.2. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₃₅H₄₆N₃O₃SSn [M+H]⁺ 708.2276, found 708.2266.

【10】 [¹²⁵I]7 の合成

1% CH₃COOH 含有 EtOH に溶解した **15** (1 mg/mL、50 μL)、EtOH に溶解した chloramine-T (0.5 mg/mL、25 μL)、Na¹²⁵I (13 MBq) を混合し、30 分間静置した。放射性ヨウ素標識体は逆相 HPLC (5C₁₈-AR-II column 4.6 mm I.D.×250 mm、water/acetonitrile=5/5-2/8 (t=0-15 min)、流速 1 mL/min) にて精製し、非標識体 (**7**) との同時分析により同定した。

【11】 [¹²⁵I]12 の合成

14 と glycine を縮合させ溶媒を留去した後、1% CH₃COOH 含有 EtOH で 1 mg/mL に調製した標識前駆体 (50 μL)、EtOH に溶解した NCS (0.5 mg/mL、25 μL)、Na¹²⁵I (0.7 MBq) を加えて混合し、30 分間室温で静置した。放射性ヨウ素標識体は逆相 HPLC (5C₁₈-AR-II column 4.6 mmI.D.×250 mm、0.1% phosphoric acid/acetonitrile=7/3、流速 1 mL/min) にて精製し、非標識体 (12) との同時分析により同定した。放射化学的収率 54%、放射化学的純度 95%以上で合成した。

【12】 4-(6-Bromobenzo[d]thiazol-2-yl)-N-methylaniline (17) の合成

Mathis らの方法[23]および Coelho らの方法[44]を参考に合成した。2 (0.50 g、2.5 mmol) と PPh₃ (2.0 g、3.8 mmol) を toluene (20 mL) に溶解し、室温で 30 分間攪拌した。4-Methylaminobenzoic acid (0.76 g、1.3 mmol) を加えて 48 時間還流した。溶媒を留去後、残渣を中圧分取液体クロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane=3/7) で精製し、目的物 17 を収量 (収率) 0.27 g (34%) で得た。機器分析データは、既報のものと同様であった[23]。

【13】 N-Methyl-4-(6-(tributylstannyl)benzo[d]thiazol-2-yl)aniline (18) の合成

17 (0.13 g、0.40 mmol)、Et₃N (4.0 mL)、bis(tributyltin) (0.50 mL、1.0 mmol) を 1,4-dioxane (30 mL) に溶解し、tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (50 mg、0.040 mmol) を加えて 24 時間還流した。反応溶液を冷却後セライトで濾過し、濾液を減圧留去した。残渣を中圧分取クロマトグラフィー (EtOAc/*n*-hexane=2/8) で精製し、目的物 18 を収量 (収率) 0.11 g (50%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ ppm 7.97 (s, 1H), 7.80-7.90 (m, 3H), 7.52 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 6.67 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 2.85 (s, 3H), 1.54-1.65 (m, 6H), 1.37 (m, 6H), 1.08-1.19 (m, 6H), 0.91 (t, *J*=7.3 Hz, 9H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9.4, 13.7, 26.8, 28.7, 29.4, 111.5, 120.1, 121.5, 128.8, 129.2, 133.4, 134.1, 136.9, 152.6, 154.0, 167.8. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₂₆H₃₉N₂SSn [M+H]⁺ 531.1850 found 531.1854.

【14】 4-(6-Iodobenzo[d]thiazol-2-yl)-N-methylaniline (16) の合成

18 (50 mg、0.090 mmol) を CH₂Cl₂ (5.0 mL) に溶解し、室温で攪拌しながら CHCl₃ に溶解させた 1 M iodine を滴下して十分量加えた。1 M NaHSO₃ 水溶液 (2.0 mL) と 1 M KF 水溶液 (1.0 mL) を加え、反応を停止した。反応溶液を CH₂Cl₂ で抽出し、有機層を Na₂SO₄ で脱水した後、溶媒を減圧留去した。残渣を中圧分取クロマトグラフィー

(EtOAc/*n*-hexane=3/7) で精製し、目的物 **16** を収量 (収率) 29 mg (83%) で得た。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD-*d*₄) δ ppm 8.28 (d, *J*=1.5 Hz, 1H), 7.84 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 7.75 (dd, *J*=8.2, 1.5 Hz, 1H), 7.64 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 6.67 (d, *J*=8.7 Hz, 2H), 2.85 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 29.3, 88.7, 111.6, 119.4, 123.5, 128.9, 130.2, 135.0, 136.2, 152.8, 153.4, 168.8. HRMS (ESI) *m/z*: calcd for C₁₄H₁₂IN₂S [M+H]⁺ 366.9760 found 366.9762.

【15】 [¹²⁵I]**16** の合成

EtOH に溶解した **18** (1 mg/mL、50 μL)、3% H₂O₂ (50 μL)、1 M HCl (20 μL)、Na¹²⁵I (0.9 MBq) を混合し、15 分間静置した。飽和 NaHSO₃ 水溶液 (100 μL) を加えた後、飽和 NaHCO₃ 水溶液を加え、pH 7 に調整した。反応液を EtOAc で抽出し (700 μL×3)、N₂ ガスを用いて溶媒を留去した。放射性ヨウ素標識体は逆相 HPLC (5C₁₈-AR-II column 4.6 mmI.D.×250 mm、water/acetonitrile=1/9、流速 1 mL/分) にて精製し、非標識体 **16** との同時分析により同定した。放射化学的収率 70%、放射化学的純度 95%以上で合成した。

【16】 安定性評価

(1) 投与液 (0.1% Tween80 含有 PBS (pH 7.4)) における安定性評価

[¹²⁵I]**7** を投与液 200 μL に溶解し、4°C で静置した。溶解直後、1、3、6 時間後に溶液の一部を逆相 HPLC (5C₁₈-AR-II column 4.6 mmI.D.×250 mm、0.1% phosphoric acid/acetonitrile=7/3-2/8 (t=15-20 分)、流速 1 mL/分) にて分析した。溶出した溶液を 1 分ごとにチューブに分取し、ガンマカウンタで放射能を測定した。

(2) マウス血漿における安定性評価

マウスから採取した血漿 180 μL に投与液に溶解した [¹²⁵I]**7** (20 μL) を加え、37°C でインキュベートした。インキュベート直後、5、30 分後に一部を回収し、冷やした acetonitrile を 4 倍量加えて攪拌し、10 分間 4°C で静置した。その後、1700×g、4°C の条件で 15 分間遠心分離した。上清の acetonitrile 溶液を回収後、N₂ ガスを用いて溶媒を留去し、移動相 (0.1% phosphoric acid /acetonitrile=7/3) に溶解して上記 (1) と同様の条件で逆相 HPLC にて分析した。溶出液を 1 分ごとにチューブに分取し、ガンマカウンタで放射能を測定した。

【17】カルボキシエステラーゼとの反応性評価

マウスリコンビナント CES1 および CES2 の酵素活性を 4-nitrophenyl acetate assay で測定し、それぞれの酵素活性を 574 pmol/分/μg、93720 pmol/分/μg と求めた。各 CES を PBS に溶解し、37°C で加温した。投与液に溶解した [¹²⁵I]7 (10 μL) を CES 溶液 (190 μL、2500 pmol/分) に加えた後、37°C でインキュベートした。1、3 時間後に溶液の一部を回収し、冷やした acetonitrile を 4 倍量加えて攪拌し、10 分間 4°C で静置した。その後、1700×g、4°C の条件で 15 分間遠心分離した。上清の acetonitrile 溶液を回収後、N₂ ガスを用いて溶媒を留去し、移動相 (0.1% phosphoric acid /acetonitrile=7/3) に溶解して第 2 章【16】と同様の条件で逆相 HPLC にて分析した。溶出液を 1 分ごとにチューブに分取し、ガンマカウンタで放射能を測定した。なお、0 分後のサンプルは [¹²⁵I]7 を投与液に溶解した直後の溶液を分析した。

【18】AA アミロイドーシスモデルマウスの作製

第 1 章【10】と同様の方法を用いて行った。

【19】*In vitro* オートラジオグラフィ

15 週齢 ICR 系雌性健常マウスおよび AA アミロイドーシスモデルマウスの脾臓凍結切片 (5 μm 厚) を作製した。切片を水で洗浄したのち、50% EtOH に溶解した [¹²⁵I]7 (1480 kBq/mL) と 1 時間インキュベートした。その後、第 1 章【11】と同様の方法により評価した。また、切片上での競合リガンドによる阻害実験として、AA アミロイドーシスモデルマウスの脾臓切片に 50% EtOH で調製した化合物 7 あるいは 16 (最終濃度 : 50 μM) と [¹²⁵I]7 (1480 kBq/mL) の混合液を添加し、第 1 章【11】と同様の方法により評価した。

【20】マウスにおける生体内放射能分布評価

15 週齢 ICR 系雌性健常マウス (n=5/タイムポイント) および AA アミロイドーシスモデルマウス (n=3-4/タイムポイント) に 0.1% Tween80 含有 PBS (pH 7.4) で溶解した [¹²⁵I]7 (37 kBq/匹、100 μL) を静脈内へ投与した。投与 10、30 分、1、3、6、24 時間後にマウスを屠殺、採血後、主要な臓器を摘出し、重量と放射能を測定した。その後、第 1 章【12】と同様の方法で評価した。

【21】尿中代謝物分析

健常マウス (n=4) に 0.1% Tween80 含有 PBS (pH 7.4) で溶解した $[^{125}\text{I}]7$ (370 kBq/匹、100 μL) を静脈内へ投与し、代謝ケージを用いて 24 時間採尿した。採取した尿に冷やした acetonitrile を 9 倍量加えて攪拌し、10 分間 4°C で静置した。その後、1700 \times g、4°C の条件で 15 分間遠心分離した。上清の acetonitrile 溶液を回収後、 N_2 ガスを用いて溶媒を留去し、移動相 (0.1% phosphoric acid/acetonitrile=7/3) に溶解して第 2 章【16】と同様の条件で逆相 HPLC にて分析した。溶出液を 1 分ごとにチューブに分取し、ガンマカウンタで放射能を測定した。

【22】*Ex vivo* オートラジオグラフィ

15 週齢 ICR 系雌性健常マウスおよび AA アミロイドーシスモデルマウスに $[^{125}\text{I}]7$ (1850 kBq/匹、100 μL) を静脈内投与した。投与 10 分後に脾臓を摘出し、凍結切片 (20 μm 厚) を作製した。その後、第 1 章【11】と同様の方法により評価した。

参考文献

- 1) Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, et al. Amyloid nomenclature 2022: update, novel proteins, and recommendations by the international society of amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee. *Amyloid*. 2022;**27**:217-222.
- 2) Gauthier S, Rosa-Neto P, Morais JA, Webster C. World Alzheimer Report 2021: Journey through the diagnosis of dementia. *Alzheimer's Disease International*, London, England. 2021.
- 3) Bahlis NJ, Lazarus HM. Multiple myeloma-associated AL amyloidosis: Is a distinctive therapeutic approach warranted? *Bone Marrow Transplant*. 2006;**38**:7-15.
- 4) Wechalekar AD, Gillmore JD, Hawkins PN. Systemic amyloidosis. *The Lancet*. 2016;**387**:2641-2654.
- 5) Ihne S, Morbach C, Sommer C, Geier A, Knop S, Störk S. Review article amyloidosis—the diagnosis and treatment of an underdiagnosed disease. *Dtsch. Arztebl. Int*. 2020;**117**:159-166.
- 6) Röcken C, Shakespeare A. Pathology, diagnosis and pathogenesis of AA amyloidosis. *Virchows. Archiv*. 2002;**440**:111-122.
- 7) Papa R, Lachmann HJ. Secondary, AA, amyloidosis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am*. 2018;**44**:585-603.
- 8) Cornwell GG, Murdoch WL, Kyle RA, Westermark P, Pitkänen P. Frequency and distribution of senile cardiovascular amyloid. A clinicopathologic correlation. *Am. J. Med*. 1983;**75**:618-623.
- 9) Mathis CA, Lopresti BJ, Klunk WE. Impact of amyloid imaging on drug development in alzheimer's disease. *Nucl. Med. Biol*. 2007;**34**:809-822.
- 10) Selkoe DJ. Imaging alzheimer's amyloid. *Nat. Biotechnol*. 2000;**18**:823-824.
- 11) Hazenberg BPC, van Rijswijk MH, Piers DA, et al. Diagnostic performance of ¹²³I-labeled serum amyloid P component scintigraphy in patients with amyloidosis. *Am. J. Med*. 2006;**119**: 355.e15-355.e24.
- 12) Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol*. 2004;**55**:306-319.
- 13) Rowe CC, Ackerman U, Browne W, et al. Imaging of amyloid β in alzheimer's disease with ¹⁸F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol*. 2008;**7**:129-135.
- 14) Coates DR, Chin JM, Chung STL. Preclinical properties of ¹⁸F-AV-45: a PET agent for A β plaques in the brain. *J. Nucl. Med*. 2009;**50**:1887-1894.

- 15) Pepys MB, Baltz ML, de Beer FC, et al. Biology of serum amyloid P component. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1982;**389**:286-298.
- 16) Ezawa N, Katoh N, Oguchi K, Yoshinaga T, Yazaki M, Sekijima Y. Visualization of multiple organ amyloid involvement in systemic amyloidosis using ¹¹C-PiB PET imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2018;**45**:452-461.
- 17) Genovesi D, Vergaro G, Giorgetti A, et al. [¹⁸F]-Florbetaben PET/CT for differential diagnosis among cardiac immunoglobulin light chain, transthyretin amyloidosis, and mimicking conditions. *JACC: Cardiovasc. Imaging.* 2021;**14**:246-255.
- 18) Dorbala S, Vangala D, Semer J, et al. Imaging cardiac amyloidosis: A pilot study using ¹⁸F-florbetapir positron emission tomography. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2014;**41**:1652-1662.
- 19) Mallik A, Drzezga A, Minoshima S. Clinical amyloid imaging. *Semin. Nucl. Med.* 2017;**47**:31-43.
- 20) Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2010;**1804**:1405-1412.
- 21) Klunk WE, Pettegrew JW, Abraham DJ. Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J. Histochem. Cytochem.* 1989;**37**:1273-1281.
- 22) Cai L, Innis R, Pike V. Radioligand development for PET Imaging of β -amyloid ($A\beta$)-current status. *Curr. Med. Chem.* 2006;**14**:19-52.
- 23) Mathis CA, Wang Y, Holt DP, Huang GF, Debnath ML, Klunk WE. Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J. Med. Chem.* 2003;**46**:2740-2754.
- 24) Zhuang ZP, Kung MP, Hou C, et al. Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates. *J. Med. Chem.* 2001;**44**:1905-1914.
- 25) Newberg AB, Wintering NA, Plo K, et al. ¹²³I-IMPY : A novel amyloid plaque – imaging agent for the diagnosis of alzheimer' s disease. *J. Nucl. Med.* 2006;**47**:748-754.
- 26) Yoshimura M, Ono M, Watanabe H, Kimura H, Saji H. Feasibility of amylin imaging in pancreatic islets with β -amyloid imaging probes. *Sci. Rep.* 2014;**4**:1-5.
- 27) Zhuang ZP, Kung MP, Hou C, et al. IBOX(2-(4'-dimethylaminophenyl)-6-iodobenzoxazole): a ligand for imaging amyloid plaques in the brain. *Nucl. Med. Biol.* 2001;**28**:887-894.
- 28) Styren SD, Hamilton RL, Styren GC, Klunk WE. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for alzheimer's disease pathology. *J. Histochem. Cytochem.* 2000;**48**:1223-1232.

- 29) Mathis CA, Mason NS, Lopresti BJ, Klunk WE. Development of positron emission tomography β -Amyloid plaque imaging agents. *Sev. Nucl. Med.* 2012;**42**:423-432.
- 30) Zimmermann GR, Lehár J, Keith CT. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov. Today.* 2007;**12**:34-42.
- 31) Tanvir Kabir M, Sahab Uddin M, al Mamun A, et al. Combination drug therapy for the management of alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;**21**:3272.
- 32) Lockhart A, Ye L, Judd DB, 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.* 2005;**280**:7677-7684.
- 33) Namioka S, Yoshida N, Konno H, Makabe K. Residue-specific binding mechanisms of thioflavin T to a surface of flat β -sheets within a peptide self-assembly mimic. *Biochemistry.* 2020;**59**:2782-2787.
- 34) Kawai R, Araki M, Yoshimura M, et al. Core binding site of a thioflavin-T-derived imaging probe on amyloid β fibrils predicted by computational methods. *ACS Chem. Neurosci.* 2018;**9**:957-966.
- 35) Frieg B, Gremer L, Heise H, Willbold D, Gohlke H. Binding modes of thioflavin T and Congo red to the fibril structure of amyloid- β (1-42). *Chem. Commun.* 2020;**56**:7589-7592.
- 36) Wu C, Wang Z, Lei H, Zhang W, Duan Y. Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 2007;**129**:1225-1232.
- 37) Aiello S, Wells G, Stone EL, et al. Synthesis and biological properties of benzothiazole, benzoxazole, and chromen-4-one analogues of the potent antitumor agent 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-5-fluorobenzothiazole (PMX 610, NSC 721648). *J. Med. Chem.* 2008;**51**:5135-5139.
- 38) Lee BC, Kim JS, Kim BS, et al. Aromatic radiofluorination and biological evaluation of 2-aryl-6-[^{18}F]fluorobenzothiazoles as a potential positron emission tomography imaging probe for β -amyloid plaques. *Bioorg. Med. Chem.* 2011;**19**:2980-2990.
- 39) Chen YK, Senadi GC, Lee CH, et al. Apoptosis induced by 2-aryl benzothiazoles-mediated photodynamic therapy in melanomas via mitochondrial dysfunction. *Chem. Res. Toxicol.* 2014;**27**:1187-1198.
- 40) Willerson JT, Gordon JK, Talal N, Barth WF. Murine amyloid. II. transfer of an amyloid-accelerating substance. *Arthritis. Rheum.* 1969;**12**:232-240.
- 41) Satoh T, Hosokawa M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem. Biol. Interact.* 2006;**162**:195-211.
- 42) Imai T. Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2006;**21**:173-185.

- 43) Garg PK, Slade SK, Harrison CL, Zalutsky MR. Labeling proteins using aryl iodide acylation agents: influence of meta vs para substitution on in vivo stability. *Int. J. Rad. Appl. Instrum.* 1989;**16**:669-673.
- 44) Coelho FL, Campo LF. Synthesis of 2-arylbenzothiazoles via direct condensation between in situ generated 2-aminothiophenol from disulfide cleavage and carboxylic acids. *Tetrahedron Lett.* 2017;**58**:2330-2333.
- 45) Arano Y. Renal brush border strategy: A developing procedure to reduce renal radioactivity levels of radiolabeled polypeptides. *Nucl. Med. Biol.* 2021;**92**:149-155.
- 46) Hellström-Lindahl E, Westermark P, Antoni G, Estrada S. In vitro binding of [³H]PIB to human amyloid deposits of different types. *Amyloid.* 2014;**21**:21-27.
- 47) Nuvolone M, Merlini G. Systemic amyloidosis: Novel therapies and role of biomarkers. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2017;**32**:770-780.
- 48) Nevone A, Merlini G, Nuvolone M. Treating protein misfolding diseases: therapeutic successes against systemic amyloidoses. *Front Pharmacol.* 2020;**11**:1-17.
- 49) Maurer MS, Schwartz JH, Gundapaneni B, et al. Tafamidis treatment for patients with transthyretin amyloid cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 2018;**379**:1007-1016.
- 50) Ward JE, Ren R, Toraldo G, et al. Doxycycline reduces fibril formation in a transgenic mouse model of AL amyloidosis. *Blood.* 2011;**118**:6610-6617.
- 51) Palladini G, Kastritis E, Maurer MS, et al. Daratumumab plus CyBORd for patients with newly diagnosed AL amyloidosis: safety run-in results of ANDROMEDA. *Blood.* 2020;**136**:71-80.
- 52) Solomon SD, Adams D, Kristen A, et al. Effects of patisiran, an RNA interference therapeutic, on cardiac parameters in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis: analysis of the APOLLO study. *Circulation.* 2019;**139**:431-443.
- 53) Gillmore JD, Gane E, Taubel J, et al. CRISPR-Cas9 In vivo gene editing for transthyretin amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 2021;**385**:493-502.
- 54) Inoue M, Ueda M, Higashi T, et al. Therapeutic potential of polyamidoamine dendrimer for amyloidogenic transthyretin amyloidosis. *ACS Chem. Neurosci.* 2019;**10**:2584-2590.
- 55) Taniguchi A, Shimizu Y, Oisaki K, Sohma Y, Kanai M. Switchable photooxygenation catalysts that sense higher-order amyloid structures. *Nat. Chem.* 2016;**8**:974-982.
- 56) Nagashima N, Ozawa S, Furuta M, et al. Catalytic photooxygenation degrades brain A β in vivo. *Sci. Adv.* 2021;**7**:1-12.
- 57) Harada N, Kimura H, Ono M, Saji H. Preparation of asymmetric urea derivatives that target prostate-specific membrane antigen for SPECT imaging. *J. Med. Chem.* 2013;**56**:7890-7901.

- 58) Majumdar S, Subrath J, le Rouzic V, et al. Synthesis and evaluation of aryl-naloxamide opiate analgesics targeting truncated exon 11-associated μ opioid receptor (MOR-1) splice variants. *J. Med. Chem.* 2012;**55**:6352-6362.
- 59) Cordonnier A, Boyer D, Besse S, et al. Synthesis and in vitro preliminary evaluation of prostate-specific membrane antigen targeted upconversion nanoparticles as a first step towards radio/fluorescence-guided surgery of prostate cancer. *J. Mater. Chem. B.* 2021;**9**:7423-7434.
- 60) Wakisaka K, Arano Y, Uezono T, et al. A novel radioiodination reagent for protein radiopharmaceuticals with L-lysine as a plasma-stable metabolizable linkage to liberate m-iodohippuric acid after lysosomal proteolysis. *J. Med. Chem.* 1997;**40**:2643-2652.