

氏名(本籍)	原武 芳江 (福岡県)
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	博第 51 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 7 日
学位授与の条件	学位規程第 4 条第 1 項該当者
学位論文の題名	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
論文審査委員	主 査 教 授 土反 伸和 副 査 教 授 向 高弘 副 査 教 授 上田 昌史 副 査 教 授 田中 将史

論文内容の要旨

緒言

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。例えば、全身性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[2]。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などから続発的に発症することが多い。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[3,4]。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[5]。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。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る。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[6]) の開発や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の診断に用いられるアミロイド β (A β) 検出用PETプローブ (^{11}C -Pittsburgh compound B; ^{11}C -PiB[7]、 ^{18}F -florbetaben[8]、 ^{18}F -florbetapir[9]) の適用がなされている。しかし、これらのプローブには、課題も存在する。 ^{123}I -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。また、心臓への移行性が低いことから、心臓に蓄積したアミロイドへ結合することが出来ず、適用可能な病型に限られる。上述の A β 検出用プローブについては、脳内に沈着する A β を標的とした分子設計がなされており、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てしまい[10]、全身の複数の臓器にアミロイド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の特異的な検出を目指し、(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。

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

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[11,12]。この特徴を利用し、アミロイドイメージングプローブとして、thioflavin-T や Congo-red の誘導体が開発されてきた[13,14]。一方で、それらは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[15,16]。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いる。そこで、プローブ分子内の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を達成出来るのではないかと考え、新規プローブ (1) を設計した (Fig. 1)。1 は、アミロイドに対して異なる部位に結合する 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。また、1 は溶液中ではイオンとなり、分子量が 500 よりも大きいことから、脳移行性を示さず、比較的速やかに体内から排泄されることが期待される。本研究では、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。

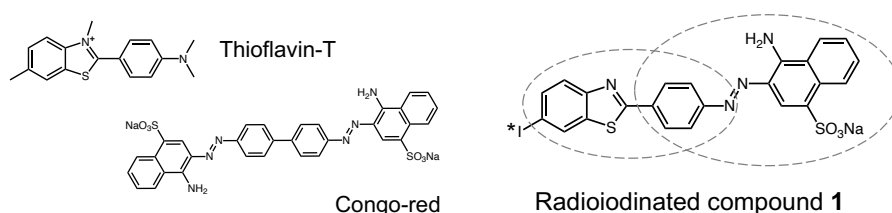


Fig. 1 Drug design of radioiodinated compound 1.

2-Amino-6-bromobenzothiazole を出発原料とした 5 段階の反応によりトリブチルスズ標識前駆体を合成した。スズ-ヨウ素交換反応を用いて放射性ヨウ素標識を行い、[¹²⁵I] 1 を放射化学的収率 66%、放射化学的純度 95%以上で合成した。まず、A β ₁₋₄₂ 線維に対する結合親和性を評価した。1 および[¹²⁵I] 1 を用いた結合飽和実験の結果から Scatchard-plot を描出し、1 の解離定数 (K_d) を 65 nM と算出した。次に、[¹²⁵I]1 を競合リガンドに用いた *in vitro* 競合阻害アッセイを実施し、各評価化合物の 50%阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。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) を算出した

結果、**1**の K_i 値は43 nMとなり、thioflavin-TおよびCongo-redよりも高い結合親和性を示すことを明らかにした。また、thioflavin-TよりもCongo-redの方が30倍以上低い IC_{50} 値を示し、Congo-red存在下では添加量に応じて $[^{125}I]$ **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結合部位へ選択的に結合することが示唆された。

次に生体内のアミロイドに対する結合性評価として、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を作製し *in vitro* オートラジオグラフィ (ARG) を実施した。病態モデルマウスの脾臓組織内における $[^{125}I]$ **1**由来の放射能分布は、thioflavin-S (ThS) の蛍光像で示されたアミロイドの分布に概ね一致したことから、**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、thioflavin-T、Congo-redを用いたブロック実験では、Congo-red存在下で $[^{125}I]$ **1**の結合が顕著に阻害された。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。続いて、健常マウスおよび病態モデルマウスに $[^{125}I]$ **1**を静脈内投与し、全身の臓器への放射能分布を経時的に評価した。 $[^{125}I]$ **1**は投与後早期に肝臓、肺、腎臓、脾臓へ高く集積し、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10%が尿中へ排泄された。病態モデルマウスにおいても同様の分布が見られたが、投与3、6時間後において、病態モデルマウスの脾臓では、健常マウスよりも有意に高い放射能集積を認めた。最後に $[^{125}I]$ **1**の投与3時間後における健常マウスおよびAAアミロイドーシスモデルマウスの脾臓凍結切片を作製し、*ex vivo* ARGを実施した (Fig. 2)。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、アミロイドが組織内に不均一に分布し、 $[^{125}I]$ **1**由来の放射能分布と一致した。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。

本検討では、 $[^{125}I]$ **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部位が異なる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が、**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。さらに**1**はCongo-redよりも K_i 値が有意に低かったことから、Congo-redユニットとthioflavin-Tユニットを融合させた相乗効果により、結合親和性が高まったと考えられた。一方、生体内放射能分布評価では排泄過程における $[^{125}I]$ **1**の放射能集積が懸念された。核医学診断に

おける非特異的な放射能集積は、高精度な診断の障害になるため、今後正常組織からのプローブの排泄を促進する化学修飾などを組み込んだプローブの開発が望まれる。

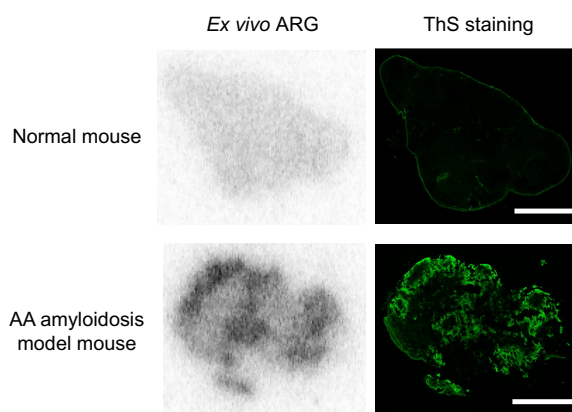


Fig. 2 *Ex vivo* autoradiograms (ARG) of $[^{125}I]$ **1** using spleen sections from normal mouse and AA amyloidosis model mouse. The same sections were then stained with thioflavin-S (ThS). Scale bar = 1 mm.

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

従来のアミロイドイメージングプローブは、アミロイドに対する高い結合親和性を示す一方で、標的的部位以外にも集積してしまうことが問題となっていた。そこで、正常組織において非特異的に集積したプローブを代謝させ、放射性代謝物として速やかに排泄させることで、バックグラウンドの低減による

画像コントラストの改善を達成し得るのではないかと考え、代謝型アミロイドイメージングプローブ (7) を設計した (Fig. 3)。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) による代謝を狙った分子設計とした。7 のアミロイド認識部位には、アルツハイマー病の核医学診断用プローブとして開発され、心アミロイドーシスの核医学診断にも応用されている PiB[7] を選択した。また、代謝後に遊離する放射性代謝物は、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 *m*-iodohippuric acid とした。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 として速やかに尿中に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、正常組織内の酵素を利用した代謝型プローブが全身性アミロイドーシスの核医学診断における画像コントラストの改善に有効であるかを評価した。

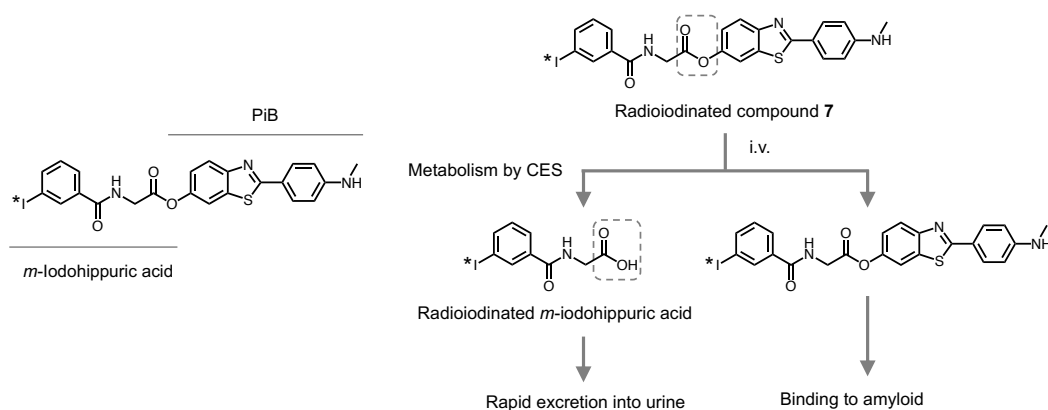


Fig. 3 Drug design of radiiodinated compound 7. In normal tissues, compound 7 is expected to be metabolized by CES into radiiodinated *m*-iodohippuric acid which could be rapidly excreted into urine. On the contrary, compound 7 could bind to amyloid fibril in diseased tissues.

2-Amino-6-methoxybenzothiazole から既知の合成法[17,18]に従い PiB を合成し、同時に 3-iodobenzoic acid から 2 段階の反応を経て *N*-succinimidyl 3-(tributylstannyl)benzoate を合成した。*N*-succinimidyl 3-(tributylstannyl)benzoate に glycine を縮合した後、さらに PiB と縮合し、トリブチルスズ標識前駆体を合成した。スズ-ヨウ素交換反応を用いて放射性ヨウ素標識を行い、 $[^{125}\text{I}]7$ を放射化学的収率 59%、放射化学的純度 95%以上で合成した。まず、動物実験を想定した投与液およびマウス血漿における $[^{125}\text{I}]7$ の安定性を逆相 HPLC で評価した。その結果、投与液中では 6 時間後まで 90%以上が $[^{125}\text{I}]7$ として存在した一方、マウス血漿中では、5 分後には $[^{125}\text{I}]7$ 由来の放射能がほとんど消失し、*m*- $[^{125}\text{I}]$ iodohippuric acid 由来の放射能が増加した。このことから、 $[^{125}\text{I}]7$ 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。次に、CES の中でも特に薬物の代謝に関与する CES1 および CES2[19,20]を用いて $[^{125}\text{I}]7$ のエステラーゼに対する反応性を評価した。 $[^{125}\text{I}]7$ を CES1 または CES2 の存在下でインキュベートさせ、逆相 HPLC で分析した結果、両者で $[^{125}\text{I}]7$ 由来の放射能が経時的に消失し、同時に *m*- $[^{125}\text{I}]$ iodohippuric acid

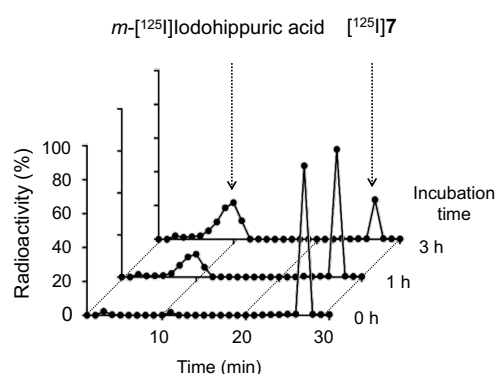


Fig. 4 Metabolite analysis after reaction of $[^{125}\text{I}]7$ with CES2.

由来の放射能が増加した (Fig. 4)。続いて、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を用いて *in vitro* ARG を実施した。病態モデルマウスの脾臓では、thioflavin-S の蛍光像で示されたアミロイドの分布とそれに応じた放射能集積が確認でき、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は脾臓組織内のアミロイドへ結合することが示された。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評価では、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ は全身の臓器へ分布後、血液を含む正常臓器から速やかに放射能が消失した。特に投与後早期から腎臓へ高く集積し、筋肉、甲状腺、脳への集積は低かった。また、投与 24 時間後まで回収した尿を逆相 HPLC で分析した結果、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ 由来の放射能はほとんど存在せず、尿中の放射能の大部分が *m*- $[^{125}\text{I}]\text{iodohippuric acid}$ として存在した。病態モデルマウスにおいても同様の放射能分布を示したが、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集積を示した。最後に $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ の投与 10 分後におけるマウスの脾臓切片を用いて、*ex vivo* ARG と 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、また、放射能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分布し、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ 由来の放射能分布と一致した箇所が見られた。このことから $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ 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。

本検討では、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ 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へ結合することを示した。さらに $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ はCESに対する反応性を有し、エステル代謝に伴い*m*- $[^{125}\text{I}]\text{iodohippuric acid}$ を遊離した。また、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{7}$ を生体内へ投与した後は各臓器から速やかに放射能が消失し、非特異的な放射能集積が低減される可能性が示された。

結論

本研究では、(1) thioflavin-T-Congo-redハイブリッド型プローブおよび(2) 酵素代謝型馬尿酸結合アミロイドイメージングプローブを設計、合成し、それぞれの放射性ヨウ素標識体につい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。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。

参考文献

- 1) Benson MD, et al. *Amyloid*, 2022;**27**:217–22.
- 2) Röcken C, et al. *Virchows Arch*, 2002;**440**:111–22.
- 3) Ihne S, et al. *Dtsch Arztebl Int*, 2020;**117**:159–66.
- 4) Wechalekar AD, et al. *Lancet*, 2016; **87**:2641–54.
- 5) Cornwell GG III, et al. *Am J Med*, 1983;**75**:618–23.
- 6) Hazenberg BP, et al. *Am J Med*, 2006;**119**:e15–24.
- 7) Ezawa N, et al. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2018;**45**:452–61.
- 8) Genovesi D, et al. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2021;**14**:246–55.
- 9) Dorbala S, et al. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2014;**41**:1652–62.
- 10) Mallik A, et al. *Semin Nucl Med* 2017;**47**:31–43.
- 11) Khurana R, et al. *J Struct Biol*, 2005;**151**:229–38.
- 12) Klunk W, et al. *J Histochem Cytochem*, 1989;**37**:1273–81.
- 13) Mathis CA, et al. *Semin Nucl Med*, 2012;**42**:423–32.

- 14) Cai L, et al. *Curr Med Chem*, 2006;**14**:19–52.
- 15) Zimmermann GR, et al. *Drug Discov Today*, 2007;**12**:34–42.
- 16) Kabir MT, et al. *Int J Mol Sci*, 2020; **21**:3272–94.
- 17) Coelho FL, et al. *Tetrahedron Lett*, 2017;**58**:2330-3.
- 18) Mathis CA, et al. *J Med Chem*, 2003;**46**:2740-54.
- 19) Satoh T, et al. *Chem Biol Interact*, 2006;**162**:195–211.
- 20) Imai T. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2006;**21**:173–85.

論文審査の結果の要旨

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。全身性アミロイドーシスの診断では、血液検査や生体組織検査を用いることが主流だが、疾患特異的な症状が乏しいことや希少疾患であることから、適切な診断が困難である。一方、臓器へのアミロイド沈着は疾患特異的な病理学的変化であり、生体内のアミロイドの検出を目的とした核医学診断法の有用性が示されつつある。本学位論文では、全身性アミロイドーシスの核医学診断を目的として、以下2つのアプローチに基づいて新規放射性プローブを設計、合成し、全身性アミロイドーシスの病態モデルマウスを用いてそれぞれの有効性について評価した。

まず、2つのアミロイド結合骨格である Thioflavin-T と Congo-red を融合させたハイブリッド型プローブを設計、合成し、プローブのアミロイドに対する結合親和性の向上を狙った。本プローブは、インビトロにおいてアミロイドへ高い結合親和性を示すとともに、生体内で脾臓組織内のアミロイド沈着部位へ特異的に集積することを明らかにした。

次に、アミロイド結合骨格であるベンゾチアゾール誘導体に代謝性リンカーを介して放射性標識馬尿酸を結合させたプローブを設計、合成した。正常組織での代謝により尿排泄性馬尿酸を放出させることで、非特異的な放射能集積の低減を狙った。本プローブは、生体内で、アミロイドへの結合性を認めた上で、アミロイド非沈着臓器からは放射能が速やかに排泄されることを明らかにした。

以上、本研究は、2つのアプローチに基づき設計したプローブがアミロイドを特異的に検出したことから、これらの薬剤設計が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の向上に貢献できる可能性を示した。これらの知見は、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評価される。

本論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。