

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成24年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	アルツハイマー病の診断・治療に資する次世代分子イメージングプローブの開発
研究機関・ 部局・職名	京都大学・大学院薬学研究科・准教授
氏名	小野 正博

1. 当該年度の研究目的

本研究では、申請者が独自に開発する新規化合物の中から、 $A\beta$ およびタウ凝集体に対して選択的結合性を有する化合物の探索研究を行い、見出された化合物をリードとした放射性および蛍光性化合物を開発し、 $A\beta$ およびタウ凝集体に対する分子イメージングプローブとして応用することを目標とする。平成23年度までの検討において、 $A\beta$ およびタウ凝集体への高い結合親和性と良好なマウス体内放射能動態を示したプローブに関して、病態モデルマウスを用いて、そのイメージングプローブとしての有用性を評価する。プローブを各病態マウスに投与後、マウスを屠殺、脳を摘出し、凍結組織切片作製用ミクロトームにより、凍結脳切片を作製し、その脳切片上のオートラジオグラフィによる放射能分布あるいは蛍光プローブの蛍光分布と、 $A\beta$ およびタウ抗体を用いた免疫染色、チオフラビン S などのアミロイド蛍光染色剤で処理後の蛍光分布との比較検討より、プローブの $A\beta$ およびタウ凝集体への結合性について評価を行う。一方、 $A\beta$ とタウの凝集度とプローブの結合性に関する検討を行うため、凝集度の異なる種々の $A\beta$ およびタウ凝集体を作製し、それぞれの凝集体とプローブとの反応後、凝集体に結合したプローブの放射能あるいは蛍光を検出することにより評価を行う。新規化合物の設計・合成、インビトロ結合性評価、正常マウス体内動態実験も並行して行い、候補化合物の最適化研究は継続する。

2. 研究の実施状況

平成24年度は、アミロイド蛍光染色試薬であるチオフラビン T をリード化合物として選択し、脳移行性、SPECT イメージングに適した放射性ヨウ素-123 の効率良い導入を考慮したピリジルベンゾオキサゾール (PBOX)誘導体を設計・合成した。PBOX 誘導体の中で最も老人斑を明瞭に描出した PBOX-3 について、アミロイド斑を過剰産生するトランスジェニック(Tg2576)マウスを用いた SPECT 撮像および ex vivo ARG を行った結果、SPECT 撮像では、Tg2576 マウスの脳において、野生型マウスに比べ高い放射能集積を認め、また、Tg2576 マウス脳切片での ex vivo ARG において、チオフラビン S の蛍光染色部位と一致した放射能集積を認めた。これらの結果より、PBOX-3 が SPECT 用 $A\beta$ イメージングプローブとして有用であることが示された。蛍光プローブの開発に関しては、低分子量、電氣的に中性かつ分子修飾が容易であるボロンジピロメテン(BODIPY)を蛍光母核として選択し、種々の置換基を導入した数種の BODIPY 誘導体(BAPs)を設計・合成した。さらに BODIPY の置換部位を BODIPY と同様に強い電子吸引基であるジシアノビニル基に変換した数種の化合物を設計・合成した。これらの中でも DTM-2 は、Tg2576 マウスにおける in vivo 撮

様式19 別紙1

像の結果、野生型マウスに比べて高い蛍光集積を示し、さらに、摘出後の Tg2576 マウス脳切片でアミロイド斑に結合したDTM-2由来の蛍光像が観察された。以上の結果より、DTM-2が脳内Aβの光イメージング法に有効な近赤外蛍光Aβイメージングプローブであることを見出した。

タウイメージングプローブの開発に関しては、ステリルベンゾイミダゾール(SBIM)を母核にした放射性および蛍光性化合物を設計・合成し、タウイメージングプローブとしての有用性について評価を行った。その結果、SBIM誘導体はAβ凝集体に比べ、タウ凝集体への高い結合親和性を示した。マウス体内分布実験において、脳内への放射能滞留性が認められるものの、いずれの誘導体も高い脳への移行性を示した。また、アルツハイマー病患者脳組織切片を用いたSBIM誘導体による蛍光染色実験において、タウの明瞭な染色画像が得られた。以上の結果より、Aβ凝集体との選択的結合性の向上は必要であるが新規SBIM誘導体はアルツハイマー病脳内タウイメージングプローブとして有効な基礎的性質を有することが示された。

3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計10件
計14件	<ol style="list-style-type: none"> 1) <u>Ono M*</u>, Ohgami M, Haratake M, Saji H, Nakayama M. A novel bifunctional chelating agent based on bis(hydroxamamide) for ^{99m}Tc labeling of polypeptides. <i>Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals</i>, 55, 71–79 (2012). 2) Kimura H, Mori D, Harada N, <u>Ono M</u>, Ohmomo Y, Kajimoto T, Kawashima H, Saji H. Microwave-assisted synthesis of organometallic complexes of ^{99m}Tc(CO)₃ and Re(CO)₃: its application to radiopharmaceuticals. <i>Chemical and Pharmaceutical Bulletin</i>, 60, 79–85 (2012). 3) Matsumura K, <u>Ono M*</u>, Kimura H, Ueda M, Nakamoto Y, Togashi K, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. ¹⁸F-Labeled phenyldiazenyl benzothiazole for in vivo imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. <i>ACS Medicinal Chemistry Letters</i>, 3, 58–62 (2012). 4) <u>Ono M*</u>, Watanabe H, Kimura H, Saji H. BODIPY-based molecular probe for imaging of cerebral β-amyloid plaques. <i>ACS Chemical Neuroscience</i>, 3(4), 319–324, (2012). 5) Cheng Y, <u>Ono M*</u>, Kimura H, Ueda M, Saji H. Technetium-99m labeled pyridyl benzofuran derivatives as single photon emission computed tomography imaging probes for β-amyloid plaques in Alzheimer's brains, <i>Journal of Medicinal Chemistry</i>, 55(5), 2279–2286 (2012). 6) Cui M, <u>Ono M*</u>, Kimura H, Ueda M, Nakamoto Y, Togashi K, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Liu B, Saji H. Novel ¹⁸F-labeled benzoxazole derivatives as potential positron emission tomography probes for imaging of cerebral β-amyloid plaques in Alzheimer's disease, <i>Journal of Medicinal Chemistry</i>, 55(21), 9136–9145 (2012). 7) Watanabe H, <u>Ono M*</u>, Kimura H, Matsumura K, Yoshimura M, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. Synthesis and biological evaluation of novel oxindole derivatives for

	<p>imaging neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease, <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i>, 22(17), 5700–5703 (2012).</p> <p>8) Yu P, Cui M, Wang X, Zhang X, Li Z, Yang Y, Jia J, Zhang J, <u>Ono M</u>, Saji H, Jia H, Liu B. ¹⁸F-Labeled 2-phenylquinoxaline derivatives as potential positron emission tomography probes for in vivo imaging of β-amyloid plaques. <i>European Journal of Medicinal Chemistry</i>, 57, 51–58 (2012).</p> <p>9) Cui M, Wang X, Yu P, Zhang J, Li Z, Zhang X, Yang Y, <u>Ono M</u>, Jia H, Saji H, Liu B. Synthesis and evaluation of novel ¹⁸F labeled 2-pyridinylbenzoxazole and 2-pyridinylbenzothiazole derivatives as ligands for positron emission tomography (PET) imaging of β-amyloid plaques. <i>Journal of Medicinal Chemistry</i>, 55(21), 9283–9296 (2012).</p> <p>10) <u>Ono M*</u>, Saji H. Molecular Approaches to the Treatment, Prophylaxis, and Diagnosis of Alzheimer's Disease: Novel PET/SPECT imaging probes for diagnosis of Alzheimer's disease. <i>Journal of Pharmacological Science</i>, 118(3), 338–344 (2012).</p> <p>*Corresponding author</p> <p>(掲載済みー査読無し) 計2件</p> <p>1) 小野正博、上田真史、佐治英郎、アルツハイマー病 PET 診断薬開発の最先端、PET journal, 19, 13–15 (2012).</p> <p>2) 小野正博、βアミロイドイメージング剤: Amyvid (¹⁸F-AV45)、PET journal, 20, 30–32 (2012).</p> <p>(未掲載) 計2件</p> <p>1) Watanabe H, <u>Ono M*</u>, Matsumura K, Yoshimura M, Kimura H, Saji H. Molecular Imaging of β-Amyloid Plaques with Near Infrared Boron Dipyrromethane (BODIPY)-Based Fluorescent Probes, <i>Molecular Imaging</i>, in press.</p> <p>2) Matsumura K, <u>Ono M*</u>, Yoshimura M, Kimura H, Watanabe H, Okamoto Y, Ihara M, Takahashi R, Saji H. Synthesis and biological evaluation of novel styryl benzimidazole derivatives as probes for imaging of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i>, in press.</p> <p>*Corresponding author</p>
<p>会議発表 計12件</p>	<p>専門家向け 計12件</p> <p>1) 小野正博、「平成24年度福井大学 RI 取扱に関する再教育訓練: 福井大学高エネルギー医学研究センター」アルツハイマー病の早期診断のための分子イメージングプローブの開発(福井)、平成24年5月11日</p> <p>2) 松村憲志、小野正博、吉村優志、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎: 神経原線維変化の生体イメージングを目的とした新規ステリルベンゾイミダゾール誘導体の合成と評価、第7回日本分子イメージング学会(浜松)、2012年5月24–25日</p> <p>3) Watanabe H, Ono M, Kimura H, Saji H: Near infrared fluorescence imaging of cerebral β-amyloid plaques with</p>

様式19 別紙1

	<p>BODIPY-based molecular probes. Alzheimer's Association International Conference 2012 (バンクーバー) 平成24年7月14-19日</p> <p>4) 片柳莉果子、小野正博、渡邊 裕之、木村 寛之、佐治 英郎: β アミロイドタンパク質の生体イメージングを可能とする近赤外蛍光イメージングプローブの開発、第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム(京都)、平成24年8月6-7日</p> <p>5) 小野正博、「第7回 IVIS Imaging System ユーザー会」アルツハイマー病の診断を目的とした分子イメージングプローブの開発(東京)、平成24年10月5日</p> <p>6) 小野正博、佐治英郎、「BioJapan 2012」アルツハイマー病診断用分子イメージングプローブの開発(横浜)、平成24年10月10日</p> <p>7) 松村憲志、小野正博、吉村優志、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎: タウイメージングプローブの開発を目的とした新規スチリルベンゾイミダゾール誘導体の合成と評価、第52回日本核医学会(札幌)、2012年10月11-13日</p> <p>8) 吉村優志、小野正博、松村憲志、木村寛之、岡本洋子、猪原匡史、高橋良輔、佐治英郎、キノキサリンを母核とする新規 ^{18}F 標識アミロイドイメージングプローブの合成と評価、第52回日本核医学会学術総会(札幌)、平成24年10月11-13日</p> <p>9) 渡邊裕之、小野正博、飯國慎平、木村寛之、佐治英郎: β-アミロイドタンパク質の SPECT イメージングを目的とした新規 ^{123}I 標識ピリジルベンゾオキサゾール誘導体の開発、第133年会日本薬学会(横浜)、平成25年3月28-30日</p> <p>10) 吉村優志、小野正博、松村憲志、木村寛之、佐治英郎: 新規 PET 用 β アミロイドイメージングプローブの開発を目的とした ^{18}F 標識フェニルキノキサリン誘導体の合成と評価、第133年会日本薬学会(横浜)、平成25年3月27-30日</p> <p>11) 飯國慎平、小野正博、渡邊裕之、木村寛之、中山守雄、佐治英郎: アミロイド結合性の向上を目指した多価 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 錯体の開発、日本薬学会第133年会(横浜)、平成25年3月27-30日</p> <p>12) 小野正博、生命科学をリードするバイオイメージング分子から個体までーPET/SPECTによるアルツハイマー病の生体分子イメージング、日本薬学会第133年会(横浜)、平成25年3月30日</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>京都大学大学院薬学研究科 病態機能分析学分野ホームページ http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byotai/</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>標題: 京都大学オープンキャンパス 2011「最先端・次世代研究開発支援プログラム展示コーナー」 実施日: 平成24年8月10日 場所: 京都大学薬学部</p>

様式19 別紙1

	<p>対象者;高校生</p> <p>参加者数:400名</p> <p>内容;京都大学大学院薬学研究科にて実施されたオープンキャンパスにて、「最先端・次世代研究開発支援プログラム」の研究内容について、ポスター展示するとともに、来場者に説明を行った。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	<p>1)「片柳莉果子、小野正博ら: β アミロイドタンパク質の生体イメージングを可能とする近赤外蛍光イメージングプローブの開発、第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム(京都)、平成24年8月6-7日」にて、若手研究者奨励賞を受賞。</p> <p>2)「吉村優志、小野正博ら:キノキサリンを母核とする新規 ^{18}F 標識アミロイドイメージングプローブの合成と評価、第52回日本核医学会学術総会(札幌)、平成24年10月11-13日」にて、優秀ポスター賞を受賞。</p>

4. その他特記事項

特になし

実施状況報告書(平成24年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	111,000,000	37,550,000	36,450,000	37,000,000	0
間接経費	33,300,000	11,265,000	10,935,000	11,100,000	0
合計	144,300,000	48,815,000	47,385,000	48,100,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	15,103,104	36,450,000	0	51,553,104	35,970,678	15,582,426	0
間接経費	5,632,500	10,935,000	0	16,567,500	5,467,500	11,100,000	0
合計	20,735,604	47,385,000	0	68,120,604	41,438,178	26,682,426	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	23,848,257	合成用試薬、評価用試薬、実験動物など
旅費	637,060	研究成果発表旅費(カナダ、札幌、浜松)等
謝金・人件費等	2,134,857	研究員の人件費
その他	9,350,504	拡張型単回投与毒性試験委託費用、英文校正等
直接経費計	35,970,678	
間接経費計	5,467,500	
合計	41,438,178	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
株式会社島津製作 所製 島津紫外可 視分光光度計	UV-1800	1	836,850	836,850	2012/10/3	京都大学
米国Caliper LS 社製 マルチスペク トルイメージングシ ステム	Nuance EX	1	7,864,500	7,864,500	2012/12/20	京都大学