

氏名(本籍)	前田 純	(千葉県)
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙 第146号	
学位授与年月日	平成17年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	Development and pharmacological evaluation of positron emitted-ligands for imaging of benzodiazepine receptors at <i>in vivo</i>	
論文審査委員	主査	教授 鈴木 勉
	副査	教授 中澤 裕之
	副査	教授 吉田 正

## 論文内容の要旨

### 1. 緒言

ポジトロン断層撮像法(PET)は体内投与された放射性のポジトロン標識リガンドの動態を断層カメラで画像化し, その動態および分布により疾患の診断を行う方法である. 主要なポジトロン放出元素は $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  および  $^{18}\text{F}$  などであるため, 様々な生理活性物質, 神経伝達物質受容体リガンドおよび医薬品などへの応用が可能であり, 新たなポジトロン標識リガンドの開発および研究はPET 研究の中核的な課題である. ベンゾジアゼピン受容体は不安, てんかん, 不眠などの精神神経疾患の治療に欠かせない薬物標的であり, PET 用リガンドの中で古くから開発の対象となっている. ベンゾジアゼピン受容体は中枢性ベンゾジアゼピン受容体および末梢性ベンゾジアゼピン受容体の2つに分類され, それぞれに特異的な PET リガンド [ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil(構造式②)および [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195(構造式④)が開発されている. 中枢性ベンゾジアゼピン受容体は  $\text{GABA}_A$ /ベンゾジアゼピン受容体の結合部位であり, 主に $\alpha$ ,  $\beta$ および $\gamma$ サブユニットの5量体によって形成されている. 特に $\alpha$ サブユニットは $\alpha 1$  から $\alpha 6$  の6種類のサブユニットが存在しており, [ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil は6種類のサブユニットに対し均一な親和性を示す. 近年の遺伝子改変マウスによる研究からベンゾジアゼピンの多様な薬理作用は異なる $\alpha$ サブユニットを介して発現することが示唆されている. したがって, $\text{GABA}_A$ /ベンゾジアゼピン受容体機能の解明のためサブユニット特異的なPET用リガンドの開発が待たれている. 一方, 末梢性ベンゾジアゼピン受容体は  $\text{GABA}_A$ /ベンゾジアゼピン受容体とは異なる結合部位であり, ミト

ミトコンドリア膜上に受容体が豊富に存在している。脳内における末梢性ベンゾジアゼピン受容体の密度は少ないものの、グリア細胞に局在することが示唆されており、グリア細胞のマーカーとして近年注目されている。現在臨床 PET で多用されている $^{11}\text{C}$ PK11195 は脳への移行性が非常に悪く、特異的結合に由来するシグナル量が少ないため、新たな PET 用リガンドの開発が待たれている。本研究ではベンゾジアゼピン受容体の新たな PET 用リガンド開発を目的に、それぞれ中枢性および末梢性ベンゾジアゼピン受容体に親和性を示す $^{11}\text{C}$ Ro15-4513(構造式①)および $^{11}\text{C}$ DAA1106(構造式③)の *in vivo* 受容体リガンドとしての薬理学的特徴について検討を行った。また、DAA1106 については将来的な他施設輸送等を考慮し、約 2 時間と比較的半減期の長い $^{18}\text{F}$ fluoro-ethyl-DAA1106 (構造式⑤)および $^{18}\text{F}$ fluoro-methyl-DAA1106 (構造式⑥)の合成および動物への評価についても実施した。

## 2. 実験方法

実験には ddY 系雄性マウス、Sprague-Dawley 系雄性ラットおよび rhesus monkey(アカゲザル)を用いた。*In vitro* オートラジオグラフィ法は凍結組織裁断機にて作成した 20 $\mu\text{m}$  脳切片をスライドガラスに貼付して実験に使用した。各スライドガラスは $^{11}\text{C}$ 標識リガンドを溶解した Tris-塩酸緩衝液 (pH=7.4) に 60 分間浸した。60 分後スライドガラスを氷冷した Tris-塩酸緩衝液で洗浄し、温風で乾燥させた。乾燥した脳切片はイメージングプレートに 90 分間密着感光させ、BAS-1800 にてオートラジオグラムを作成して各関心領域の放射能濃度を算出した。*Ex vivo* オートラジオグラフィ法はラットの尾静脈よりポジトロン標識リガンドを投与して 30 分後に脳を摘出した。摘出した脳を粉末状のドライアイスにより速やかに凍結させ、凍結組織裁断機にて 40 $\mu\text{m}$  の切片を作成して *in vitro* オートラジオグラフィ法と同様に関心領域内の放射能濃度を算出した。アカゲザルの PET スキャンは浜松ホトニクス社製の動物用 PET カメラ SHR7700 を用い、スキャンは ketamine 麻酔下 (10mg/kg/hr) 座位の状態で行った。頭部の放射能を計測した。放射線量は核種の半減期で減衰補正を行い、Colsher 4mm のフィルターで画像再構成を行って PET 断層像を得た。各 PET 断層像

の各脳領域に 3 ないし 4mm の円形の関心領域を設定して時間-放射能曲線を求めた。この曲線をもとに各種パラメーター解析を行った。また、必要に応じて脛部の伏在動脈より動脈血採血を行い血漿中放射能濃度の測定し、4-5 点の未変化体/代謝物量の比により代謝物補正を行った。

### 3. [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 の結合機序の解明

アカゲザルにおいて [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 は前部帯状回皮質、島皮質および海馬に高い集積を認めた。この集積は flumazenil (0.1mg/kg, *i.v.*) を前処置することによって完全に抑制され、 [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 の各部位への集積はベンゾジアゼピン受容体への結合に由来することが確認できた。一方、 [ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil の集積は後頭葉皮質に最も高く集積することから [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 は [ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil とは異なる機序で結合することが考えられた。1 頭のアカゲザルについて、 [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 の比放射能を変えてスキャンを施行して飽和曲線を求めたところ、前部帯状回皮質などの高い集積が認められた複数の領域で高親和性および低親和性の 2 つの結合部位が確認された。しかしながら、後頭葉皮質および小脳においては低親和性結合部位のみ確認された。 [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 結合は  $\alpha$ 1-3 サブユニットに選択的な zolpidem (10mg/kg, *i.v.*) を処置したところ、後頭葉皮質および小脳においてほぼ完全に抑制されたものの、他の高親和性結合が多く認められた領域では 3-4 割の減少にとどまった。この [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 高親和性結合部位は zolpidem 非感受性の  $\alpha$ 4-6 サブユニット由来するものと推察された。また、  $\alpha$ 4,6 サブユニットに非結合性の diazepam (5.0mg/kg, *i.v.*) を処置したところ、 [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 の結合は全領域で抑制された。これらの結果から、 [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 の *in vivo* 結合は高親和性結合部位に依存しており、この高親和性結合は  $\alpha$ 5 サブユニットに由来するものと判断した。

### 4. [ $^{11}\text{C}$ ]DAA1106 の標識合成と有用性の検討

[ $^{11}\text{C}$ ]DAA1106 はデスマチル前駆体である DAA1123 に [ $^{11}\text{C}$ ]CH<sub>3</sub>I を反応することにより高収量で得ることができた。また、マウスに投与したところ肺、副腎、心臓および腎臓で高い集積が認められ脳への集積は比較的低かった。また、マウスおよびラットの脳内では嗅球に最も集積が高く、脳領域間においての *ex vivo* および *in vitro* の結合は有意に相関していた。また、血中では未変化濃度が速やかに減少していたが、マウスの脳内では代謝物の存在は確認されな

った. このことから $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$  の脳内集積は未変化体に由来することが確認できた. カイニン酸による海馬神経損傷モデルにおいて, 損傷 1 週間後に $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$  の総結合は 2 倍と有意に増加した. アカゲザルにおいて $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$  は持続的な集積が確認され, トレーサー処置 30 分後の後頭葉皮質における放射能濃度は $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$  と比べ 4 倍高かった.  $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$  の集積は DAA1106 (1.0mg/kg, *i.v.*) もしくは PK11195(5.0mg/kg, *i.v.*)を処置することにより約 80%抑制された. これらの結果から $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$  は脳内の末梢性ベンゾジアゼピン受容体に由来する特異的なシグナルを得ることができ, この結合はグリア細胞に由来することが示唆された.

#### 5. $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-methyl-DAA1106}$ および $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-ethyl-DAA1106}$ の標識合成と有用性の評価

$[^{18}\text{F}]\text{fluoro-methyl-DAA1106}$  および $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-ethyl-DAA1106}$  の標識合成は $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{I}$  および $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ を中間体とした 2 段階の合成により行った. 小脳における $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$  結合に対する fluoro-methyl-DAA1106 および fluoro-ethyl-DAA1106 の阻害係数をオートラジオグラフィ法で算出したところ, DAA1106 とほぼ同等の親和性を維持していた. また, 中枢性ベンゾジアゼピン受容体に対する結合は全く認められなかった. アカゲザルにおいて $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-ethyl-DAA1106}$  は $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$  より 1.5 倍高い集積量を示した. この集積は DAA1106 (1.0mg/kg, *i.v.*) もしくは PK11195(5.0mg/kg, *i.v.*)を処置することにより抑制された. これらの結果から $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-ethyl-DAA1106}$  は $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$  と同様な性質を維持しており, 末梢性ベンゾジアゼピン受容体の PET 標識リガンドとして有用と考えられた. 一方 $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-methyl-DAA1106}$  は $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$  と同程度の集積が認められたものの, 血中において脱離した $[^{18}\text{F}]\text{F}$  イオンが確認され, 頭蓋骨に高い集積が確認された. こうした理由から $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-methyl-DAA1106}$  は脳内の末梢性ベンゾジアゼピン受容体の測定には適当でないと判断した.

#### 6. 結論

中枢性および末梢性ベンゾジアゼピン受容体のポジトロン標識リガンドについて以下の結論を得た.

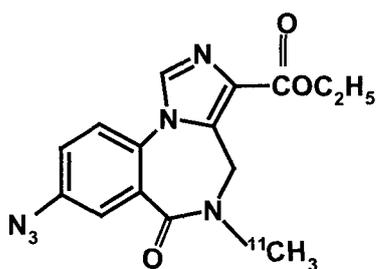
1)  $[^{11}\text{C}]\text{Ro15-4513}$  は親和性の異なる 2 つの結合部位が存在しており, 高親和

性結合は GABA<sub>A</sub>/ベンゾジアゼピン受容体の $\alpha 5$ サブユニットに由来することが明らかとなった。 $\alpha 5$ サブユニットはアルコール依存症、ベンゾジアゼピン系薬物による先行性健忘および耐性に関与していると考えられており、薬物依存症や認知機能の解明に有用なツールであると考えられた。

2) [<sup>11</sup>C]DAA1106 は中枢における末梢性ベンゾジアゼピン受容体の画像化に極めて有用であり、従来の PET 標識リガンドの脳移行性の低さを克服した。また、神経損傷により [<sup>11</sup>C]DAA1106 の結合量が増加することからグリア細胞に由来する結合であることが示唆された。

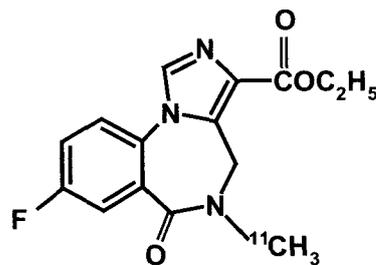
3) [<sup>18</sup>F]Fluoro-ethyl-DAA1106 は [<sup>11</sup>C]DAA1106 と同様の性質を維持しており、問題となる代謝物の存在も確認されなかった。<sup>18</sup>F 標識リガンドは半減期が約 2 時間と長く、他施設への輸送が可能であることから、合成施設を持たない病院等でも本トレーサーの PET 検査が可能であると考えられる。末梢性ベンゾジアゼピン受容体はアルツハイマー病において受容体量が増加することが知られている。このことから、将来的に [<sup>11</sup>C]DAA1106 および [<sup>18</sup>F]fluoro-ethyl-DAA1106 の PET を利用した客観的かつ早期的なアルツハイマー病の画像診断への応用が期待される。

## 中枢性ベンゾジアゼピン受容体PETリガンド



構造式 ①

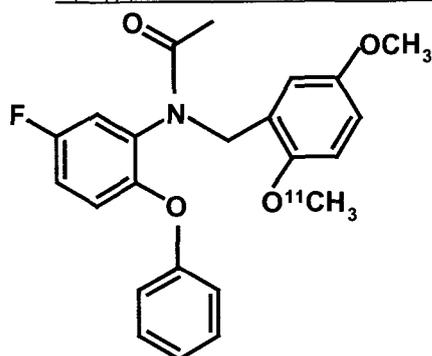
8-Azido-5,6-dihydro-5-<sup>[11C]</sup>-methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine-3-carboxylic acid ethyl ester;  
<sup>[11C]</sup>Ro15-4513



構造式 ②

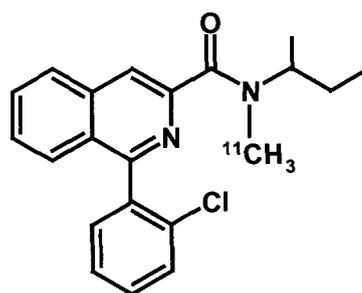
8-Fluoro-5,6-dihydro-5-<sup>[11C]</sup>-methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine-3-carboxylic acid ethyl ester;  
<sup>[11C]</sup>Ro15-1788 (flumazenil)

## 末梢性ベンゾジアゼピン受容体PETリガンド



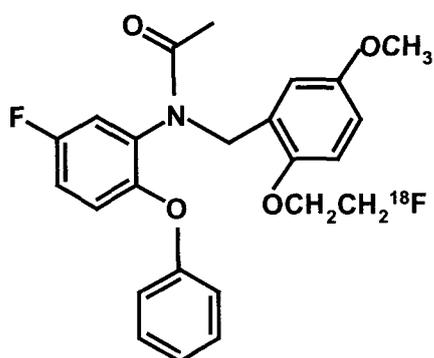
構造式 ③

N-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-<sup>[11C]</sup>-methoxy-5-methoxybenzyl)acetamide;  
<sup>[11C]</sup>DAA1106



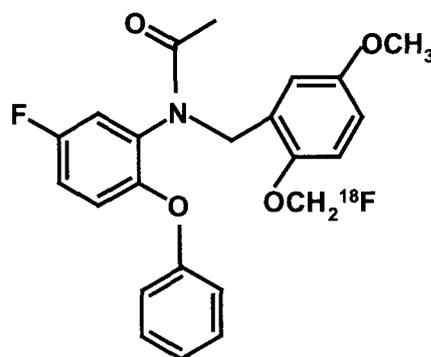
構造式 ④

1-(2-Chlorophenyl)-N-<sup>[11C]</sup>-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide;  
<sup>[11C]</sup>PK11195



構造式 ⑤

N-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-(2-<sup>[18F]</sup>fluoroethoxy)-5-methoxybenzyl)acetamide;  
<sup>[18F]</sup>Fluoro-ethyl-DAA1106



構造式 ⑥

N-(5-fluoro-2-phenoxyphenyl)-N-(2-<sup>[18F]</sup>fluoromethoxy)-5-methoxybenzyl)acetamide;  
<sup>[18F]</sup>Fluoro-methyl-DAA1106

## 論文審査の結果の要旨

ポジトロン断層撮像法 (PET) は放射性ポジトロン標識リガンドの動態を断層カメラで画像化し、その動態および分布により疾患を診断する方法であり、最近臨床において PET の導入が進んでいる。PET 診断の更なる展開のためには、新たなポジトロン標識リガンドの開発・研究が必須である。本論文で注目しているベンゾジアゼピン (BZP) 受容体は不安、てんかん、不眠などの精神神経疾患の治療に欠かせない薬物標的である。BZP 受容体は中枢性および末梢性 BZP 受容体に分類され、それぞれに特異的な PET リガンド [ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil および [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 が開発されている。中枢性 BZP 受容体は GABA<sub>A</sub>/BZP 受容体複合体を形成しており、主に  $\alpha$ 、 $\beta$  および  $\gamma$  サブユニットの 5 量体から成っている。特に  $\alpha$  サブユニットは  $\alpha 1$  から  $\alpha 6$  の 6 種類のサブユニットが存在しており、[ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil は 6 種類のサブユニットに対して均一な親和性を示す。近年 BZP 系薬物の多様な薬理作用は異なる  $\alpha$  サブユニットを介して発現することが示唆されている。したがって、GABA<sub>A</sub>/BZP 受容体機能の解明のためにはサブユニット特異的な PET 用リガンドの開発が切望されている。一方、末梢性 BZP 受容体はミトコンドリア膜上に豊富に存在し、脳内分布は少ないものの、グリア細胞に局在していることから、グリア細胞のマーカーとして注目されている。現在臨床で PET 用リガンドとして繁用されている [ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 は脳への移行性が非常に悪く、シグナル量が少ないため、新たな PET 用リガンドの開発が待たれている。このような背景から、本論文では BZP 受容体の新たな PET 用リガンドの開発を目的に、それぞれ中枢性および末梢性 BZP 受容体に親和性を示す [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 および [ $^{11}\text{C}$ ]DAA1106 の *in vivo* 受容体リガンドとしての薬理学的特徴を検討している。また、DAA1106 については比較的半減期の長い [ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethyl-DAA1106 および [ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-methyl-DAA1106 の合成およびその評価を行ない、以下のような結果を得ている。

アカゲザルにおいて [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 は前部帯状回皮質、島皮質および海馬に高い集積を示し、この集積が flumazenil の前処置によって完全に抑制されたことから、[ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 の集積は BZP 受容体への結合に由来することを確認している。一方、[ $^{11}\text{C}$ ]flumazenil の集積は後頭葉皮質で最も高いことから、[ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 とは異なる機序で結合することを示唆している。また、前部帯状回皮質などにおける [ $^{11}\text{C}$ ]Ro15-4513 の高い集積が認められた複数の領域では高親和性および低親和性の 2 つの結合部位、後頭葉皮質および小脳では低親和性結合部位の

みを確認している。 $[^{11}\text{C}]\text{Ro15-4513}$ 結合は $\alpha$  1-3 サブユニットに選択的なzolpidemの処置により、後頭葉皮質および小脳においてほぼ完全に抑制されたものの、他の高親和性結合が多く認められた領域では3-4割の減少であり、この高親和性結合部位はzolpidem非感受性の $\alpha$  4-6 サブユニットに由来することを示唆している。また、 $\alpha$  4,6 サブユニットに非結合性のdiazepamは $[^{11}\text{C}]\text{Ro15-4513}$ の結合を全領域で抑制している、これらの結果から、 $[^{11}\text{C}]\text{Ro15-4513}$ の*in vivo*結合は高親和性結合部位に依存しており、この高親和性結合は $\alpha$  5 サブユニットに由来することを明らかにしている。

$[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ はデスメチル前駆体であるDAA1123に $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ を反応させることにより高収率で得ている。また、*ex vivo* および *in vitro* 結合実験から $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ の脳内集積は未変化体に由来することを示している。さらに、カイン酸による海馬神経損傷モデルにおいて、 $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ の総結合が有意に増加することを見出している。アカゲザルにおける $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ の持続的な集積は $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ に比べ約4倍高く、この集積はDAA1106もしくはPK11195の処置により約80%抑制されている。これらの結果から $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ は脳内の末梢性BZP受容体に由来する特異的なシグナルを示し、この結合がグリア細胞に由来することを示唆している。

$[^{18}\text{F}]\text{fluoro-methyl-DAA1106}$  および  $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-ethyl-DAA1106}$ の標識合成は $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{I}$  および  $[^{18}\text{F}]\text{FCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ を中間体とした2段階の合成により行っている。また、fluoro-methyl-DAA1106 および fluoro-ethyl-DAA1106はDAA1106とほぼ同等の親和性を維持し、中枢性BZP受容体に対する結合は全く示さないことを明らかにしている。アカゲザルにおいて $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-ethyl-DAA1106}$ は $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ より1.5倍高い集積量を示し、DAA1106もしくはPK11195により抑制される。これらの結果から $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-ethyl-DAA1106}$ は $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ と同様な性質を維持しており、末梢性BZP受容体のPET標識リガンドとして有用であることを示している。

これらの結果は $[^{11}\text{C}]\text{Ro15-4513}$ の高親和性結合が $\text{GABA}_A/\text{BZP}$ 受容体の $\alpha$  5 サブユニットに由来しており、薬物依存症や認知機能の解明に有用なPET標識リガンドとなることが期待できる。さらに、 $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ は中枢における末梢性BZP受容体の画像化に極めて有用であり、グリア細胞に由来する結合と考えられるが、集積性等に問題がある。しかし、本論文で合成した $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-ethyl-DAA1106}$ は $[^{11}\text{C}]\text{DAA1106}$ と同様の性質を維持し、問題となる代謝物はなく、半減期も約2時間と長いことから、合成施設を持たない病院等でも本トレーサーの

PET検査が可能となり、今後この分野に対する貢献は大きいと考えられる。さらに、末梢性 BZP 受容体がアルツハイマー病において増加することから、将来的に [<sup>18</sup>F]fluoro-ethyl-DAA1106 の PET を利用した客観的かつ早期的なアルツハイマー病の画像診断にも応用ができるものと期待できる。また、本論文は英文で正確に記載されている。したがって、本論文は博士論文に値し、博士（薬学）の学位を授与するに相応しいと判断する。