



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

非環式レチノイドの¹¹C標識化と脳PET分子イメージング

メタデータ	言語: ja 出版者: 公開日: 2023-12-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 恵一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/0002000255

非環式レチノイドの ^{11}C 標識化と脳 PET 分子イメージング

2023 年

鈴木恵一

岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科

目次

序章		1
第 1 章	研究の背景と目的	6
1-1.	天然レチノイドとその人工誘導体について	6
1-2.	肝がんの再発予防医薬としての非環式レチノイド (ペレチノ イン)の開発	10
1-3.	レチノイド類の中樞神経系疾患における改善効果	13
1-4.	陽電子放射断層撮像法 (PET)	16
1-5.	PET が活用されるレチノイド類プローブの開発と脳 PET イ メージング	18
1-6.	本章のまとめ	24
第 2 章	高速 C-[¹¹ C]メチル化反応によるペレチノインの ¹¹ C 標識化 と脳 PET イメージング	25
2-1.	ペレチノインおよびそのエステルプロドラッグの短寿命放 射性核種 ¹¹ C による標識プローブの設計	25
2-2.	標識ペレチノインの合成	28
2-3.	高速 C-[¹¹ C]メチル化反応に供される ¹¹ C 標識用スズ前駆体 の合成	30

2-4.	非放射性ヨウ化メチルを用いた高速 C-メチル化によるペレチノインの合成	35
2-5.	^{11}C 標識ペレチノインエステルプロドラッグ合成	36
2-6.	^{11}C 標識ペレチノインエステルプロドラッグの PET イメージング	38
2-7.	^{11}C 標識ペレチノインの合成と PET イメージング	41
2-8.	^{11}C 標識ペレチノイン投与後のマウス全身 PET イメージング	43
2-9.	^{11}C 標識ペレチノインのラット血漿および脳ラジオ HPLC 分析結果	45
2-10.	ペレチノインの生理機能評価	47
2-11.	本章のまとめ	49
第 3 章	結語	51
第 4 章	実験の部	53
参考文献		88
謝辞		93
発表論文		95

略語

A β PP : amyloid-beta precursor protein, アミロイド β 前駆体タンパク質

AD : Alzheimer's disease, アルツハイマー病

APL : acute promyelocytic leukemia, 急性前骨髄球性白血病

ATRA : all-*trans*-retinoic acid, all-*trans*-レチノイン酸

BBB : blood-brain barrier, 血液脳関門

CNS : central nervous system, 中枢神経系

CRABP : cellular retinoic acid-binding protein, 細胞内レチノイン酸結合タンパ

ク質

CuTC : copper(I) 2-thiophenecarboxylate, チオフェン-2-カルボン酸銅

DMF : *N,N*-dimethylformamide, *N,N*-ジメチルホルムアミド

DMSO : dimethylsulfoxide, ジメチルスルホキシド

ERK : extracellular signal-regulated kinase, 活性化細胞外シグナル制御キナー

ゼ

GGA : geranylgeranoic acid, ゲラニルゲラニル酸

HBD : hydrogen bond donor, 水素結合供与の数

HPLC : high performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィ

HRMS : high resolution mass spectrometer, 高分解能質量スペクトル

HWE : Horner-Wadsworth-Emmons, ホーナー・ワズワース・エモンズ

KHMDS : potassium hexamethyldisilazide, カリウムヘキサメチルジシラジド

MAP2 : microtubule-associated protein 2, 微小管結合タンパク質 2

MW : molecular weight, 分子量

NMP : *N*-methylpyrrolidone, *N*-メチルピロリドン

NMR : nuclear magnetic resonance, 核磁気共鳴

PBS : phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水

PDL : poly-*D*-lysine, ポリ-*D*-リシン

%ID : percentage of injected dose, 放射能集積率

PET : positron emission tomography, 陽電子放射断層画像撮像法

RA : retinoic acid, レチノイン酸

RAR : retinoic acid receptor, レチノイン酸受容体

Ras-MAPK : Ras- mitogen-activated protein kinase, Ras-マイトジェン活性化プ

ロテインキナーゼ

RXR : retinoid X receptor, レチノイド X 受容体

RCY : radiochemical yield, 放射性化学収率

SUV : standardized uptake value, 標準化取込値

TBAT : tetrabutylammonium difluorotriphenylsilicate, テトラブチルアンモニ

ウムジフルオロトリフェニルシリケート

TBDMS : *tert*-butyldimethylsilyl, *tert*-ブチルジメチルシリル

TLC : thin layer chromatography, 薄層クロマトグラフィー

THF : tetrahydrofuran, テトラヒドロフラン

TMEDA : *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, *N,N,N',N'*-テトラメチルエ

チレンジアミン

TPSA : topological polar surface area, 極性表面積

p-TSA : *p*-toluenesulfonic acid, *p*-トルエンスルホン酸

序章

ビタミン A の活性代謝物である all-*trans*-レチノイン酸 (ATRA) およびその人工類縁体 (レチノイドと総称) は、核内受容体の結合を介して発現する抗がん作用から、これまでがんの化学的療法薬として研究・開発が行われてきたが、近年、中枢神経系 (CNS) 疾患に対しても改善効果が認められ、治療薬候補として注目されている。実際、アルツハイマー病発症に関わるとされるアミロイド β の産生抑制および除去機能が認められており ¹⁾、また、ヒトの脳皮質におけるシナプス可塑性の強力なメディエーターであることが生理学的に示され ²⁾、脳機能保護薬候補として注目されている。CNS において候補薬が効果を発揮するためには、血管と脳との間に存在する血液脳関門 (BBB) による厳しい薬物移行の制限を緩和する必要があるが、CNS 活性を賦活する、適した脂溶性をもつ新たなレチノイド類の設計・標識化や、その脳内取り込み評価および脳内取り込み機構に関する研究は未だ乏しい状況にある。

CNS 疾患治療薬の開発過程では、候補薬を陽電子放出核種で標識したのち生体への投与により、ヒトを含めて生体丸ごと低侵襲的に標識薬の動態が可視化される陽電子放射断層撮像法 (PET) が有効と言える。これまでに当該研究グループにおいて、天然レチノイドである ATRA が独自の高速炭素-炭素カップリング反応 (高速 C-[¹¹C]メチル化反応と呼称) を基にして ¹¹C 標識化し ³⁾、予備的

ながらラット脳 PET イメージング実験によりある程度の脳への集積を観測したが、標識用前駆体の多段階な合成、パラジウム 0 価錯体を介した ^{11}C 標識化反応において二重結合の容易な幾何異性化、複数生成物による煩雑な分離精製が必要となることから詳細な動態解析を展開するには再考を余儀なくされ、合成効率および安定性の高い新規 PET プローブの開発が必要となった。また、他の研究グループにおいて核内受容体との構造-活性相関研究から導きだされた核内 X 受容体 (RXR)フルアゴニストである環式レチノイドのベキサロテンの ^{11}C 標識体が合成され、ラットおよびサル脳内での集積が認められたが、脳内における結合形態としては非選択的であり、その原因としてベキサロテンの高い脂溶性のために CNS 内の RXR ヘテロおよびホモ二量体に加えて他の多くの高発現標的分子との作用などが考えられている⁴⁾。

本邦で肝がんの再発に対する予防医薬候補として開発された非環式レチノイド (一般名 ペレチノイン)は⁵⁾、ATRA と同等の脂溶性 (ATRA : $\log P = 4.65$, ペレチノイン : $\log P = 5.18$)を有し、また、共役系を短縮した構造をもつことから化学的および代謝的に安定性が高いと予想され、その ^{11}C 標識体を本研究の合成対象 PET プローブとして選択した。本研究では、ペレチノインの中樞神経活性の賦活に重要な脳内移行性に焦点をあて、ペレチノインの ^{11}C 標識プローブを合成し、PET イメージング実験によりペレチノインの脳内移行性を検証す

ることを目的とした。まず、高いBBB透過性を考慮して、脂溶性の高いエステル体の標識化を考えた。その意図は、脳内に移行した後、エステル加水分解により親化合物であるペレチノインが再生すると推定されるからである。実際のエステル構造は脳移行性が認められているベキサロテンの脂溶性 ($\log P = 7.00$) を参考にペレチノインのベンジルエステル体 ($\log P = 7.17$)とした。その ^{11}C 標識体は、天然化合物であるファルネソールの構造修飾を基に、ビニルスズ前駆体を合成し、そのビニル結合への高速 $C\text{-}[^{11}\text{C}]$ メチル化反応⁶⁾を活用して ^{11}C 標識PETプローブを合成することにした。実際、ファルネソールから合成したホスホン酸エステルとトリブチルスズ置換アルデヒド中間体とのホーナー・ワズワース・エモンズ反応により ^{11}C 標識用スズ化合物前駆体を短工程経路で効率よく合成した⁷⁾。続いて得られた ^{11}C 標識用スズ化合物前駆体と放射性ヨウ化メチルを用いた高速 $C\text{-}[^{11}\text{C}]$ メチル化反応により、異性化を伴うことなく望む ^{11}C 標識体のみを単一化合物として得られ、 ^{11}C 標識メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステルプロドラッグ体を放射性化学収率(RCY) 82%、66%、57%で合成できた。ラットおよびサルを用いて、得られた ^{11}C 標識ベンジルエステルプロドラッグ体の経静脈投与による脳PETイメージング実験を行ったところ、投与直後にある程度の脳内放射能濃度が認められたのち、いったん濃度が低くなり、10分程度の時間差を経て、再び放射能濃度が増大する予想と異な

る現象を観測した。この事実は、プロドラッグによるBBB透過の考えに反し、いったん、血中で加水分解されたカルボン酸自身あるいは何らかの分子が介在した透過機構により ^{11}C 標識体が脳内に移行することを示唆した。そこで別途調製した ^{11}C 標識メチルエステルプロドラッグ体を素早く強塩基で加水分解し、 ^{11}C 標識したペレチノインを $\text{RCY}13 \pm 8\%$ ($n = 3$) で合成した。続いて、ラットおよびサル脳PETイメージング実験を行ったところ、経静脈投与直後、ピークが観測され、放射能濃度はいったん下がり、今度は数分の時間差で高くなり、ベンジルエステルよりも高い放射能濃度を観測した。これまでペレチノインの脳機能に関する知見は皆無であったが、本研究によるペレチノインの高い脳移行性の発見をきっかけに、これまで行われてこなかったCNS機能に関しても評価したところ、ATRAで認められている幹細胞の神経細胞への分化誘導能を観測し、さらに分化誘導した神経細胞がNMDA型グルタミン酸受容体を発現することでシナプスを形成していることを認め、脳移行性の重要性を裏付けた。これらの成果により、これまで知られていなかったペレチノインのCNSにおける作用を明らかにするとともに、レチノイド類の脳移行分子機構やCNS疾患診断・治療薬の設計・開発のための有益かつ新たな知見を与えると期待される。

なお、 ^{11}C 標識ペレチノインのラット静脈内投与後の血漿および脳のラジオHPLC分析による放射性代謝物のプロファイルの観測により、血漿中で ^{11}C 標

識ペレチノインは ^{11}C 標識高極性化合物へと変化し、同時に脳内では同様な高極性をもつ ^{11}C 標識高極性化合物の蓄積増大が観測された。この現象は、単に ^{11}C 標識ペレチノインの受動拡散による脳への取り込み機構だけではなく、本ペレチノインの脳内移行にはその代謝物である高極性化合物が介在する特別な脳移行機構の存在を示唆し、その本体はジアシルグリセロリン脂質であると推定している。

第1章では、CNS疾患治療薬候補として着目されているレチノイド類のPETプローブの開発と課題について述べる。第2章では、共役系が短縮された安定なペレチノインに焦点を当てた新規PET分子プローブの創製と高い脳移行性の発見について述べる。加えて、これまで未知であった非環式レチノイドの中枢系作用について述べる。

第1章 研究の背景と目的

1-1. 天然レチノイドとその人工誘導体について

レチノイドはビタミン A の活性体である *all-trans*-レチノイン酸 (*all trans-retinoic acid* : ATRA、(1)) そのものおよびそれと同等の活性を示す化合物群の総称である^{8,9)}。食物の葉緑体内でファルネシル二リン酸を経由する非メバロン酸経路から合成される β -カロテンを生体内に摂取することで15-15'位二重結合が β -カロテン 15,15'-オキシゲナーゼ 1 により酸化的に開裂し生成したレチナールを経てレチノール (ビタミン A₁) へと代謝される。レチノールは血中で、レチノイド脱水素酵素によりレチナールに変換され、さらにレチナールアルデヒド脱水素酵素により ATRA が生合成される (図 1)¹⁰⁾。非標的組織に取り込まれるとシトクロム 26 (CYP26) の働きにより酸化代謝を受け 4-ヒドロキシレチノイン酸 (2)、18-ヒドロキシレチノイン酸 (3)、4-オキソレチノイン酸 (4)、5,6-エポキシレチノイン酸 (5) に分解する (図 2)¹¹⁾。細胞内レチノイン酸結合タンパク質 (cellular retinoic acid-binding protein : CRABP) に結合した ATRA は標的組織に取り込まれると、核内受容体であるレチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor : RAR) およびレチノイド X 受容体 (retinoid X receptor : RXR) に

結合して遺伝子を制御し、細胞の分化誘導・細胞死などに関わる^{8,12,13)}。ATRAは急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia : APL)の分化誘導療法剤として用いられているが、APLの治療薬として ATRA の副作用を抑制するための RAR (α , β) 選択的な人工レチノイドである Am80 (6)が開発された^{14,15)}。また、ATRA の構造異性体である曲がった構造を持つ 9-*cis*-レチノイン酸 (9cRA) (7)は RXR (α , β , γ) パンアゴニストとなる。RXR のリガンド結合部位はこのような曲がった構造を持つ化合物が入り込むポケットを有するという考えからベキサロテン (8)が設計・合成され、皮膚 T 細胞性リンパ腫治療薬として臨床使用されている (図 3)^{8,11,16)}。

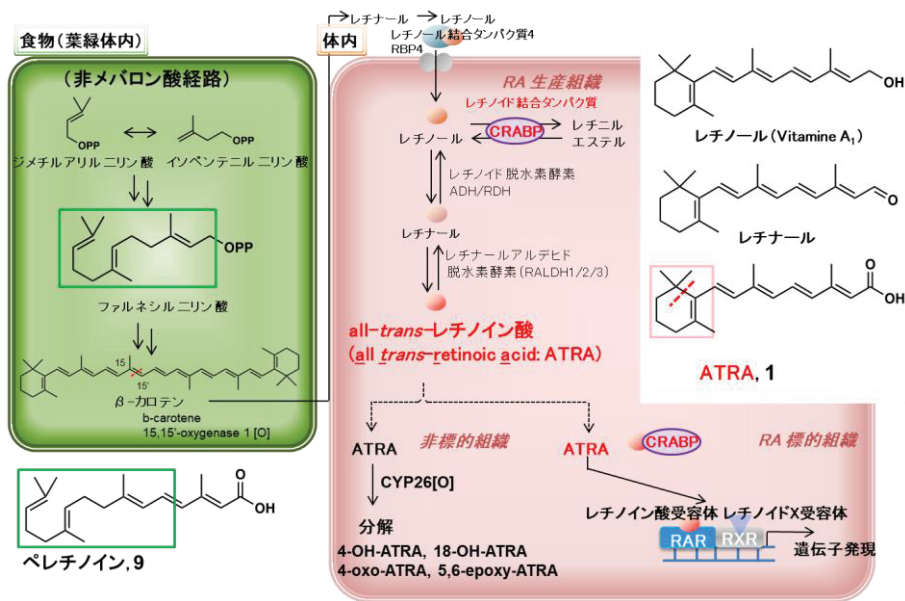


図 1. ATRA (1)の生合成経路とシグナル伝達経路。構造に付した赤四角は β-イオン環、緑四角はファルネソールの炭素骨格を示す。

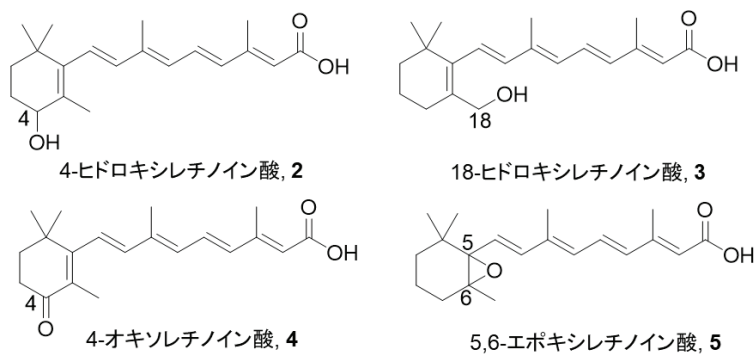


図 2. ATRA (1)の酸化的代謝物の構造式

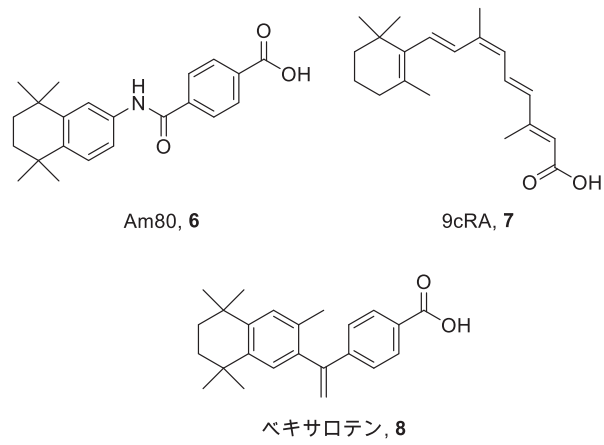


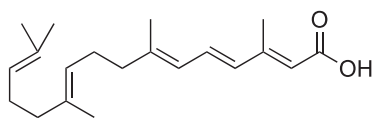
図 3. ATRA の構造異性体の 9-*cis*-レチノイン酸 (9cRA, (7))および安定人工レチノイド Am80 (6)およびベキサロテン (8)の構造

1-2. 肝がんの再発予防医薬としての非環式レチノイド (ペレチノイン) の開

発

レチノイド受容体の中でも RXR はそれ自身とホモ二量体を形成するのみならず、RAR をはじめとするさまざまな核内受容体とヘテロ二量体を形成するため、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしていると考えられている。正常な肝細胞では RXR α はユビキチン化 (Ub) され、プロテアソームにより分解される (図 5)。一方、RXR α の異常なリン酸化は、肝発がんに決定的に関与すると考えられている。特に活性化細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase : ERK) は肝がん細胞で高発現マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (mitogen-activated protein kinase : Ras-MAPK) シグナル伝達経路において RXR α タンパク質の異常リン酸化修飾に伴う分解の遅れ、低い転写活性化、がん細胞の成長促進に深く関係している。加えてリン酸化された RXR α はユビキチン/プロテアソーム系による分解を受けずに細胞内に異常蓄積し、正常な RXR の機能を阻害する可能性があると考えられている¹⁷⁾。武藤らにより細胞内レチノイン酸結合タンパク質 (cellular retinoic acid binding protein : CRABP) との結合親和性を指標として非環式レチノイド (4,5-didehydro GGA : 一般名 ペレチノイン、(9)) が開発され、RAR および RXR のアゴニストとして認められ

た^{5,18)}。ペレチノイン(図4)はゲラニルゲラニルニリン酸と類似の構造を持ち、ATRAの β イオン環が開環した構造であることから非環式レチノイドと呼ばれている。RXR α のリン酸化がヘテロ二量体のパートナーの機能を制御していることから、RARリガンドであるATRAでは細胞死を誘導することができない肝がん細胞にもアポトーシスを誘導する。また、ペレチノインはRas-MAPKシグナル系を不活化し、RXR α のリン酸化を阻害することでRXR α の機能を回復する作用がある(図5)^{12, 19, 20)}。実際にペレチノインは肝がんモデルマウスの肝臓においてRasの活性化、ERKおよびRXR α タンパク質のリン酸化を抑制することが報告されている。さらに、ペレチノインは他のレチノイド類に共通する過剰投与による中毒症の発症を低く抑え、長時間の投与が可能であるとの報告もあり、肝がんの発生を予防する上で重要な役割を果たす機能があるとされている。



非環式レチノイド(ペレチノイン), 9

図4. 非環式レチノイド(ペレチノイン、(9))の構造

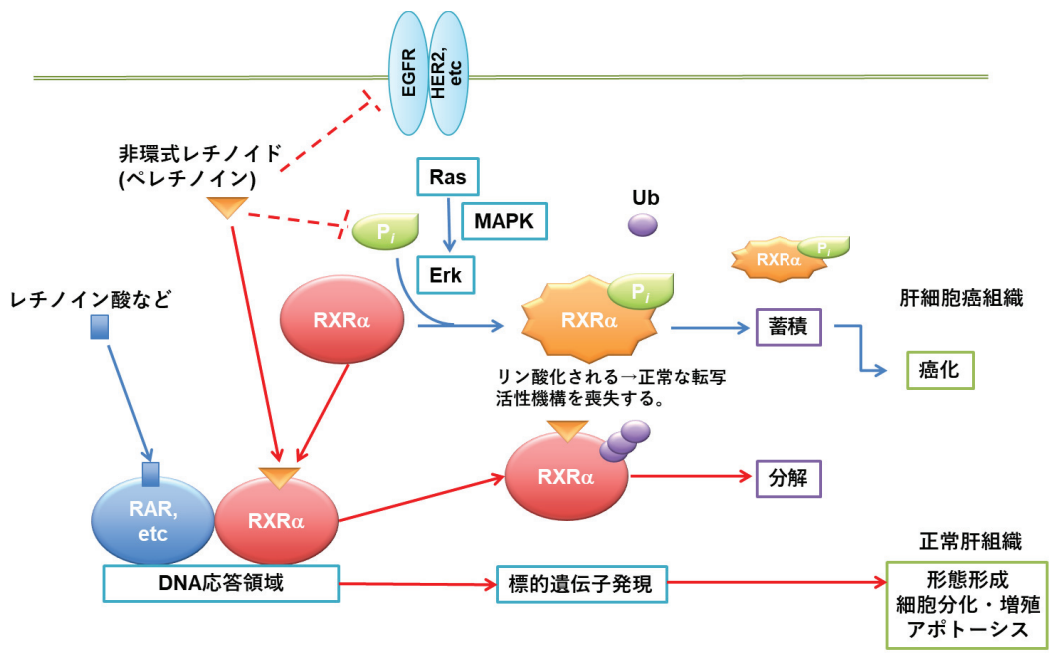


図 5. RXR α の異常による肝がん発癌メカニズムとペレチノイン抗がん作用機

序

1-3. レチノイド類の中樞神経系疾患における改善効果

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease : AD)は高齢化社会が急速に進む日本をはじめとした先進国において患者数が増大し大きな社会問題となっている。AD の発症原因のひとつとされるアミロイド仮説はアミロイド β ($A\beta$)前駆体タンパク質 (amyloid- β precursor protein : $A\beta$ PP)から、 β セクレターゼによりそのN末端側が切断され、つづけて γ セクレターゼによりC末端側が切断されて $A\beta$ が産生され、この $A\beta$ が凝集して老人斑として細胞外に沈着する。ごく最近、この $A\beta$ の産生および凝集を抑えることを創薬ターゲットとした抗体医薬の成功が示され、AD治療に大きな期待が集まっている。なお、 α セクレターゼの働きにより、 β セクレターゼとは異なる位置でAPPを切断して神経保護作用を示す可溶性APP α を産生する。これまでATRAおよび人工レチノイドは遺伝子を制御することから、がんの分化誘導療法薬として研究・開発が行われてきたが、近年、レチノイドは α セクレターゼの活性を担う酵素ADAM10の発現を亢進し、一方、 β セクレターゼの活性を担う酵素BACE-1の発現を抑制し、その結果、抗アルツハイマー病効果を示すことが報告された(図6)²¹⁾。加えて、ATRAのRXR α のアゴニストとしての働きによりPPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ : ペルオキシソーム増殖因子活性

化受容体 γ) と二量体を形成する結果、ミクログリアが活性化され $A\beta$ の食作用を強化、つまり $A\beta$ の除去機能が活性化されることが示された (図7)¹⁾。さらに最近、ATRA はヒト大脳皮質におけるシナプスの可塑性の強力なメディエーターであることが生理学的に示された²⁾。このようにレチノイドは中枢神経系 (central nervous system : CNS) 疾患に対する治療薬候補として注目されている。CNS において効果を発揮するためには、血管と脳との間に存在する血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) による薬物の移行制限を緩和する必要があるが、CNS 疾患に関わる診断・治療薬の開発に必要な脳内取り込み機構や CNS 活性の賦活に関する研究は未だ乏しい状況にある。

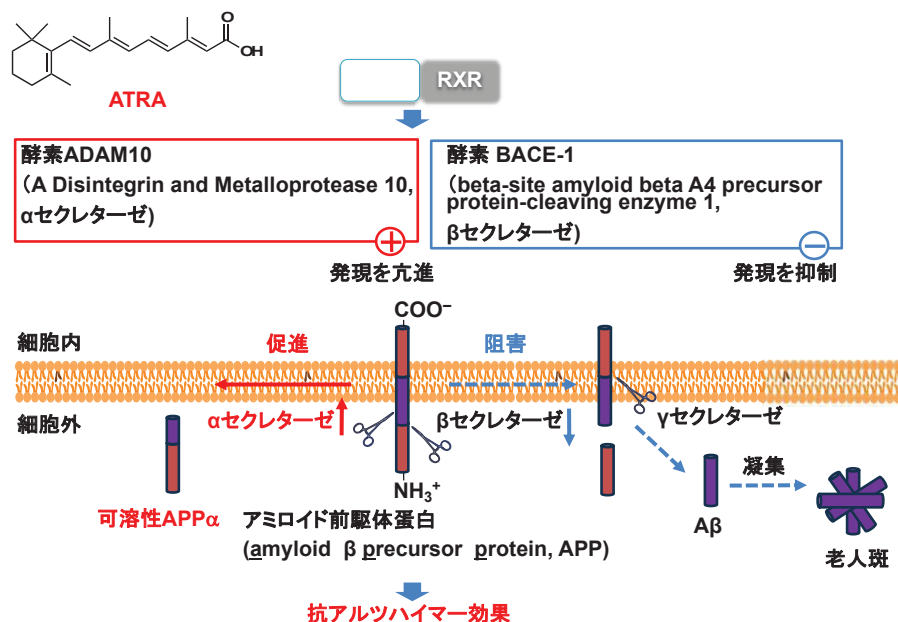


図6. アミロイド仮説におけるレチノイドの効果

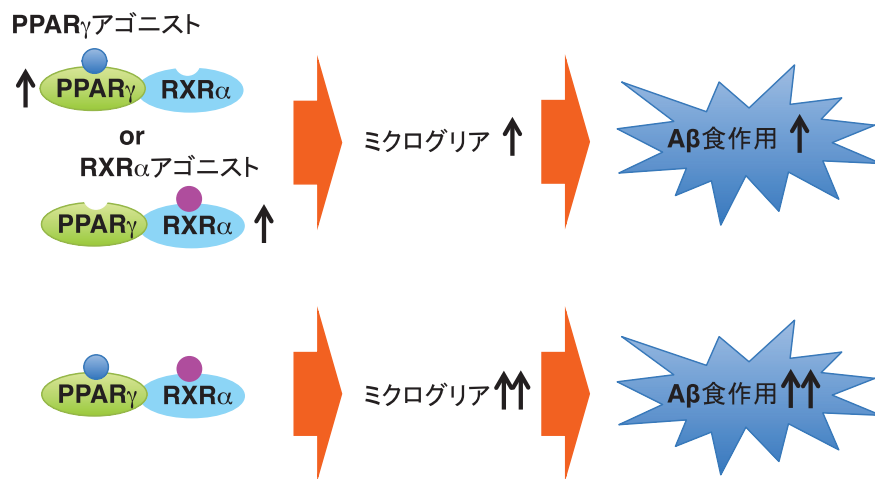


図 7. Aβ 除去機能の活性化

1-4. 陽電子放射断層撮像法 (PET)

陽電子放射断層撮像法 (positron emission tomography : PET)とは、ポジトロン放出核種により標識した生理活性物質を生体内に投与し、その生理活性物質の体内分布や経時変化を体外のPETカメラにより計測し、コンピュータ画像解析を行うことにより、断層画像化する低侵襲的な手法である²²⁾。

ポジトロンとは正の電荷を持つ電子と同じ質量の粒子で、これを放出する核種は¹¹C (半減期 : 20.4 分)や¹⁸F (半減期 : 110 分)などがある。これらポジトロン放出核種の β^+ 崩壊に伴い放出されるポジトロンが近傍の電子と出会い消滅するとき511 keVのエネルギーを持つ消滅放射線が180度方向に2本放出され、これを同時に計測することにより、ポジトロン放出核種の体内分布を高い感度と空間分解能で定量的に測定できることを特徴とする。これは生きた状態で全身のイメージングが可能であることを意味し、人体への適用も可能である。また、半減期が短いため、放射線による被曝量が極めて小さいが、合成から精製、投与まで短時間(半減期の2倍)で行う必要がある。創薬研究においては、ポジトロン放出核種で標識した候補化合物の組織分布や組織移行性の解析に有効で、極めて少量の薬物投与量でのイメージングが可能である。特に脳を標的とした解析では、候補化合物の脳内移行性の賦活や脳内動態解析を有効にするため、

CNS 疾患治療薬の開発の効率化につながると考えられている。

1-5. PET が活用されるレチノイド類プローブの開発と脳 PET イメージング

CNS 疾患治療薬候補化合物の脳内移行性の評価や脳内動態の解析には、上述のように生体への投与により生体丸ごとでの低侵襲的なりアルタイムでのイメージングが可能である PET の活用が有効である。高島らは ATRA に対応するピナコールボロン酸エステル化合物標識用前駆体を 8 段階で合成し、パラジウム 0 価錯体を介した高速 C-[¹¹C]メチル化とエステル加水分解を組み合わせ、¹¹C 標識 ATRA を放射性化学収率 (radiochemical yield : RCY)25%で合成した (図 8)。しかし、標識用前駆体の合成段階数が長く (8 段階)、パラジウム 0 価錯体の使用が原因で標識化合成の際に 9 位、13 位で異性化するため単離が煩雑になるため ¹¹C 標識 ATRA 自身の詳細な動態解析を進めることが困難であるという問題点があり、さらなる PET 研究は予備的段階に留まっている³⁾。

BBB の実態は、神経細胞などの中枢神経系の細胞を取り囲む毛細血管を構成する内皮細胞とされている。BBB は、脳の恒常性を維持するために脳への物質の移行を厳しく制限している。CNS 疾患に対する候補薬の脳透過性は、その物理化学的性質が大きく影響し、CNS 薬になりやすい物性値として、分配係数の計算値 (c logP)、pH7.4 における分配係数の計算値 (c logD)、極性表面積 (TPSA)、分子量 (MW)、水素結合供与の数 (HBD)、分子内で最も塩基性の強

い置換基の酸解離定数 (pK_a) の適正值が提案されている²³⁾。

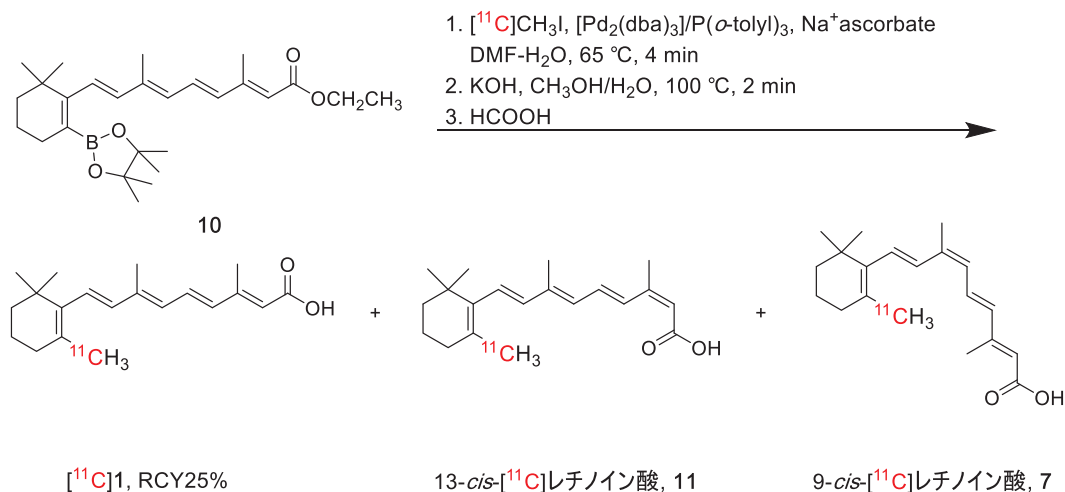


図 8. ATRA (1) の ^{11}C 標識化

RAR (α , β) 選択的で APL 分化誘導療法剤として ATRA の副作用を抑えるために開発された人工レチノイドである Am80 (6) は、対応するピナコールボロン酸エステル化合物を標識用前駆体としてメタノール/DMF 共溶媒下、 $[^{11}\text{C}]\text{CO}$ を用いて常温常圧でのパラジウム 0 価錯体を介した $[^{11}\text{C}]$ カルボキシル基の導入により ^{11}C 標識化が行われたが (図 9)²⁴⁾、ラットに対する PET イメージング実験では BBB 透過性は観測されていない。

ベキサロテン (8) は、RXR アゴニストであり、皮膚浸潤性 T リンパ腫への治療に加え、パーキンソン病治療薬候補として期待されている。Rostein らによ

り **8** の脳内取り込みと生体内分布を評価するため、 ^{11}C 標識化とその小・中動物を用いた PET イメージング研究が行われた。**8** に対応するホウ素標識用前駆体と ^{11}C CO₂ を用いて常圧でチオフェンカルボン酸銅 (copper(I) 2-thiophenecarboxylate : CuTC) 錯体を介した ^{11}C カルボキシル基導入反応により標識体が合成された (図 10)。合成された ^{11}C 標識ベキサロテン (^{11}C **8**) を経静脈内投与後、ラットおよびサルに対する PET イメージング実験が行われ、高い脳内放射能濃度 (ラット : SUV = 2 ; サル : SUV = 0.8) を示した。原理的に、同一の受容体を標的とする非標識リガンドを前投与すると、標的分子での競合現象により、標識体だけの投与時に比べて標識体の集積は減少すると考えられる。しかし、非標識ベキサロテンの前投与による標識ベキサロテン ^{11}C **8** の投与後の脳 PET イメージングの時間放射能曲線から、予想に反して、脳への集積が増大することが観測された。この結果は、ベキサロテンの高い脂溶性 ($\log P = 7.00$) のために、CNS の RXR ヘテロおよびホモ二量体に加え、CNS に高発現する複数の標的分子に非特異的に結合するためであると推定されている^{4, 15)}。

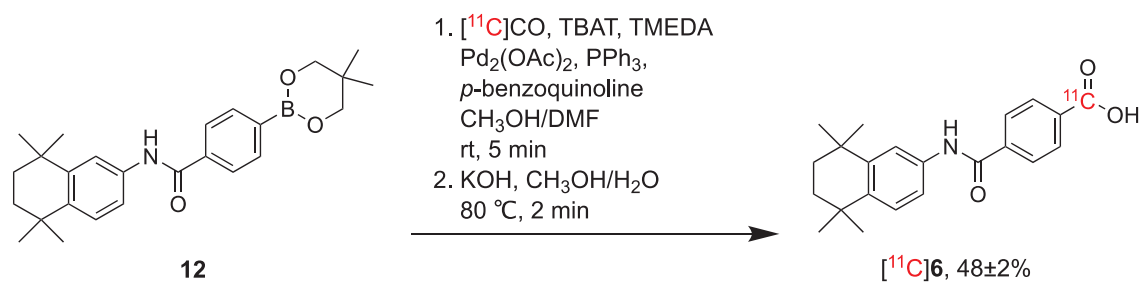


図 9. Am80 (6) の ^{11}C 標識化。(TBAT = tetrabutylammonium difluorotriphenylsilicate、TMEDA = *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine)

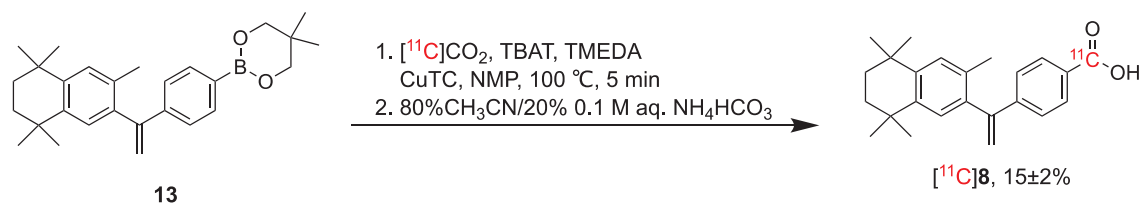


図 10. ベキサロテン (8) の ^{11}C 標識化。(TBAT = tetrabutylammonium difluorotriphenylsilicate、TMEDA = *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine、CuTC = copper(I) 2-thiophenecarboxylate、NMP = *N*-methylpyrrolidone)

また、Shibahara により、ベキサロテンと同程度の脂溶性を有し、RXR パーシャルアゴニストとして活性が認められた 1-[(3,5,5,8,8-ペンタメチル-5,6,7,8-テトラヒドロナフタレン-2-イル)アミノ]ベンゾトリアゾール-5-カルボン酸 (CBt-PMN (15))が対応するトリメチルスズ置換体を前駆体として、リチオ化を経由する [^{11}C]カルボキシル基の導入反応により ^{11}C 標識化し、マウスに対する

る PET イメージング実験が行われた。その結果、心臓への放射能集積率%ID は 4.2 であるのに対して、脳への%ID は 0.6 であった。心臓への集積は循環血流中の標識化合物量に反映し、 ^{11}C 標識ベキサロテンの心臓の SUV は 35 に対して脳の SUV は 0.8 であることから、ベキサロテンよりも高い脳内移行性を示した。しかし、0.33%の低い放射化学収率と再現性が低いことからこれ以上の検討が困難であると考えられる (図 11) ²⁵⁾。

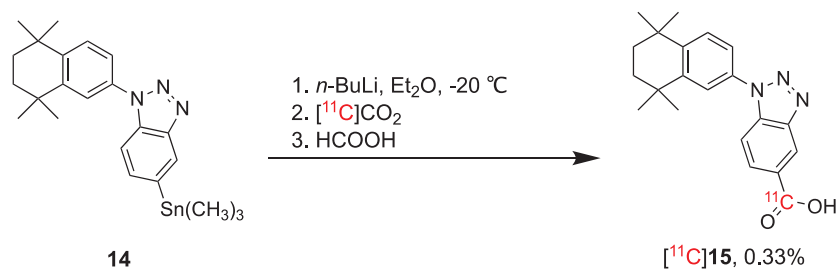


図 11. CBt-PMN (15)の ^{11}C 標識化

次に半減期の長い ^{18}F の導入のために CBt-PMN に対応する ^{18}F 標識体が設計され、その PET プローブ化および PET 実験が行われた。非標識体を用いた RXR 転写活性化能および RXR への結合能の評価では CBt-PMN に比べてやや低い活性を示した。CBt-PMN 臭化ベンジル標識用前駆体 (16)を用いて、 ^{18}F]KF を用いた求核置換反応によりベンジル [^{18}F]フロリド体へと変換し、RCY26.7–38.6%で CBt-PMN の ^{18}F 標識体 ([^{18}F]17)が合成されている (図 12)。

この ^{18}F 標識体と非標識ベキサロテンあるいは CBt-PMN を同時にマウスへ静脈内投与すると、標識体のみの場合 (脳 0.5%ID、心臓 4.6%ID) と比較し、脳 (1.8%ID) や心臓 (7%ID) への集積が増加した。一方、肝臓への集積 (20%ID から 10%ID) は減少した。またマウスの脳と肝臓における放射線量を測定したところ、同様に脳への集積が増加し、肝臓への集積が減少していることがわかった。これらの結果より、肝臓への蓄積が高い ^{18}F 標識体は非標識体によりブロッキングを受け、結果的に循環血液中の ^{18}F 標識体の濃度が高くなり、 ^{18}F 標識体の脳内濃度が向上したものと考察される²⁶⁾。

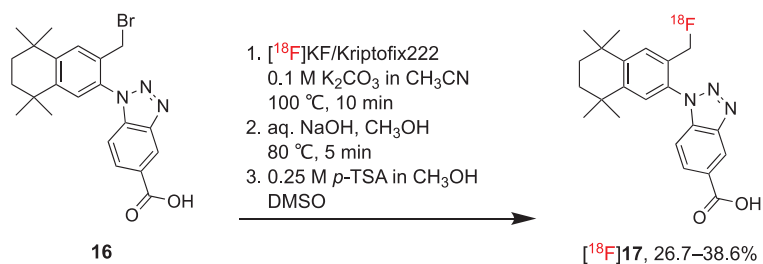


図 12. CBt-PMN の ^{18}F 標識化。 (*p*-TSA = *p*-toluenesulfonic acid)

1-6. 本章のまとめ

レチノイド類はがんの分化誘導療法薬として研究および開発が行われてきたが、最近 CNS 疾患に対しても改善効果が認められ、新たな治療薬候補として注目されている。しかし、CNS 疾患治療薬の開発に必要な脳内移行性の評価や分子的機構に関する研究は未だ乏しいものがある。CNS 疾患治療薬の開発過程では、ヒトを含めて生体丸ごと低侵襲的に候補薬の動態を可視化できる PET 技術の活用が有効と言える。これまで天然レチノイドである ATRA が ^{11}C 標識化されているが、標識用前駆体の多段階合成、 ^{11}C 標識化時に併発する容易な幾何異性化とそれに伴う混合物からの煩雑な分離精製により詳細な動態解析が困難となっていた。また、環式人工レチノイドであるベキサロテンが ^{11}C 標識化され、PET 撮像により高い脳内放射能濃度が観測されたが、高脂溶性による非特異的集積が問題となっている。さらに同様に高い脂溶性を持ち RXR パーシャルアゴニストである CBt-PMN の ^{11}C 標識体はベキサロテンよりもやや高い脳移行性を示したが、合成収率が低く、再現性が低いことから、これ以上の検討が困難であると考えられる。次章では本研究の目的である非環式人工レチノイドのペレチノインに着目した高効率合成法および安定性の高い新規 PET プローブの開発について述べる。

第2章 高速 C-[¹¹C]メチル化反応によるペレチノインの ¹¹C 標識化と脳 PET イ

メージング

2-1. ペレチノインおよびそのエステルプロドラッグの短寿命放射性核種 ¹¹C による標識プローブの設計

ペレチノインは ATRA と同程度の脂溶性を有し (logP : ペレチノイン = 5.18、ATRA = 4.65)、ATRA に比べ短縮された共役構造により、化学的にも代謝的にも安定であると予想されるため PET プローブとして開発するのに適していると考えた。¹¹C 標識化は当該グループにおいて独自に開発されたパラジウム 0 価錯体に対する嵩高いホスフィンリガンドの、非プロトン性極性溶媒を使用した触媒系を利用し、Cu(I)/K₂CO₃ の他に Cu(I)/KF の相乗効果を取り入れることにより実現されたビニル炭素上への高速 C-[¹¹C]メチル化反応⁶⁾を活用した。ペレチノインは、3, 7, 11, 15 位炭素上にメチル基が置換した構造をもつ長鎖脂肪酸である。天然に存在するファルネソールの炭素骨格を含有することから、逆合成法 (retrosynthesis) の考えからファルネソールの構造延長により、カルボン酸 3 位のメチル炭素を ¹¹C 標識化することが最適であると考えた (図 13)。4-5 位でオレフィンを形成したのは、二置換オレフィンで立体制御が可能であるの

に対し、ほかのオレフィンでは三置換オレフィンで立体制御が困難であると考えたからである。

BBB には有機アニオンを基質とする排出輸送系が発現している。その働きを検証するために馬尿酸およびそのエステルプロドラッグ体の PET イメージング実験が行われており、ベンジルエステル体が脳内移行性を示すと同時に適当な酵素による加水分解速度 ($0.66 \pm 0.04 \text{ min}^{-1} \text{ mice brain}^{-1}$) を有することが示されている²⁷⁾。そのため、BBB 透過性を高めるためにペレチノインの脂溶性をベキサロテン程度 ($\log P = 7.00$) に増大させエステルプロドラッグ体 (メチル、エチル、ベンジル) とし、特に脳移行性の高いベキサロテンと同等の脂溶性を持つベンジルエステル ($\log P = 7.17$) を候補化合物とした。エステルプロドラッグは脳内に移行したのち、加水分解を受けて活性体であるカルボン酸が再生すると期待される (図 14)。

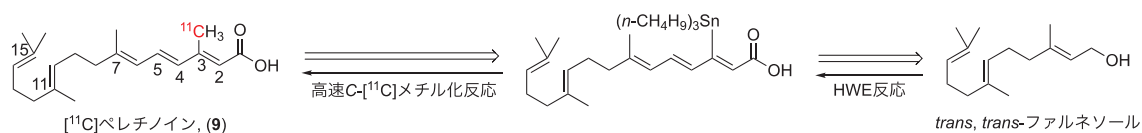


図 13. [¹¹C]ペレチノイン (9) の逆合成解析

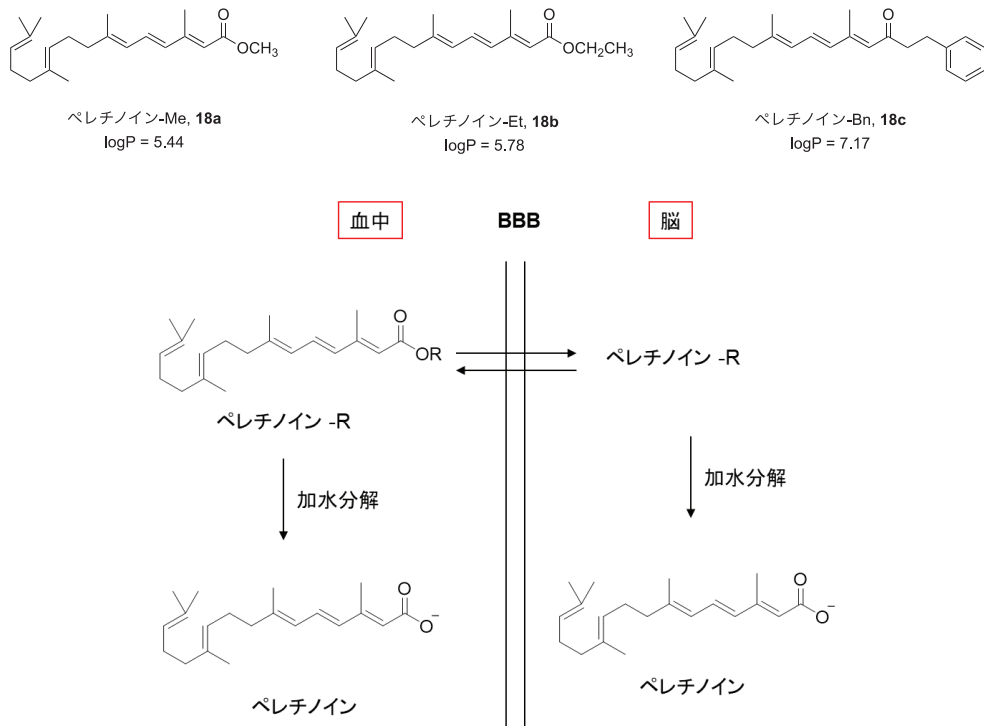


図 14. 設計したエステルプロドラッグ体と想定されるペレチノイン再生機構

2-2. 非標識ペレチノインの合成

ペレチノインの炭素骨格は、4 および 5 位の二重結合の *E* 体高選択的なオレフィンの形成によるホーナー・ワズワース・エモンズ (Horner-Wadsworth-Emmons : HWE) 反応を機軸として合成を行った (Scheme 1)⁷⁾。まず、*trans,trans*-ファルネソール (**19**) を出発原料として、DMF 中、塩基性条件下でメタンスルホニルクロリドを作用させた後、塩化リチウムにより塩化アリル体を合成し、続いて Arbuzov 反応を用いて HWE 反応前駆体であるホスホン酸エステル体 **20a**、**20b** を収率 33%、72% で合成した。

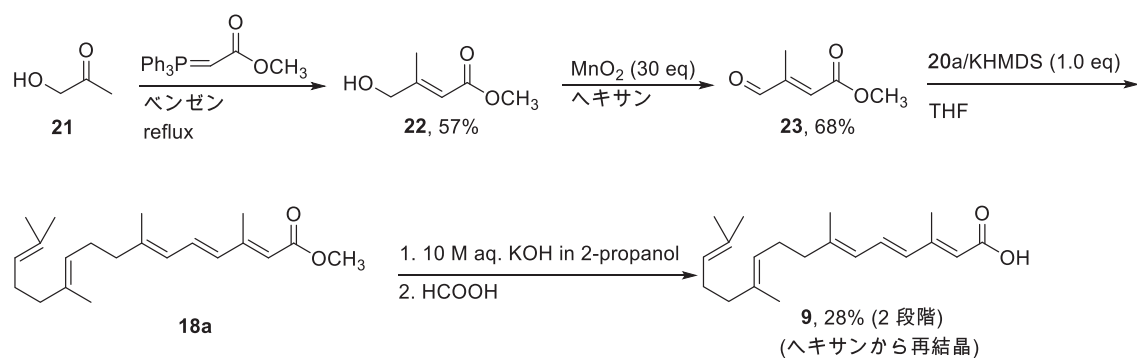
Scheme 1. ホスホン酸エステル (**20a**, **b**) の合成



次に、ヒドロキシアセトン (**21**) を出発原料として、(トリフェニルホスホラニリデン)酢酸メチルを作用させ、HWE 反応前駆体となるビニルアルコール体 **22** を 57% で合成した (Scheme 2)。続いて、得られたアルコール体を、酸化マンガンをを用いて酸化し、アルデヒド体 **23** を得たのち、HWE 反応を用いて、別

途合成したホスホン酸エステル体 **20a** に THF 中で 1 当量のヘキサメチルジシラザンカリウム (pottasium hexamethyldisilazide : KHMDS) を作用させて調製したホスホン酸イリドを、1 当量のアルデヒド体 **23** とで Wittig 反応を行い、ペレチノインメチルエステル **18a** を得た後、水酸化カリウム水溶液を用いた強塩基加水分解により脱エステル化し、ギ酸で中和して目的の非標識ペレチノイン **9** を収率 28% (2 段階) で得た。

Scheme 2. 非標識ペレチノイン (9) の合成



2-3. 高速 C-[¹³C]メチル化反応に供される ¹³C 標識用スズ前駆体の合成

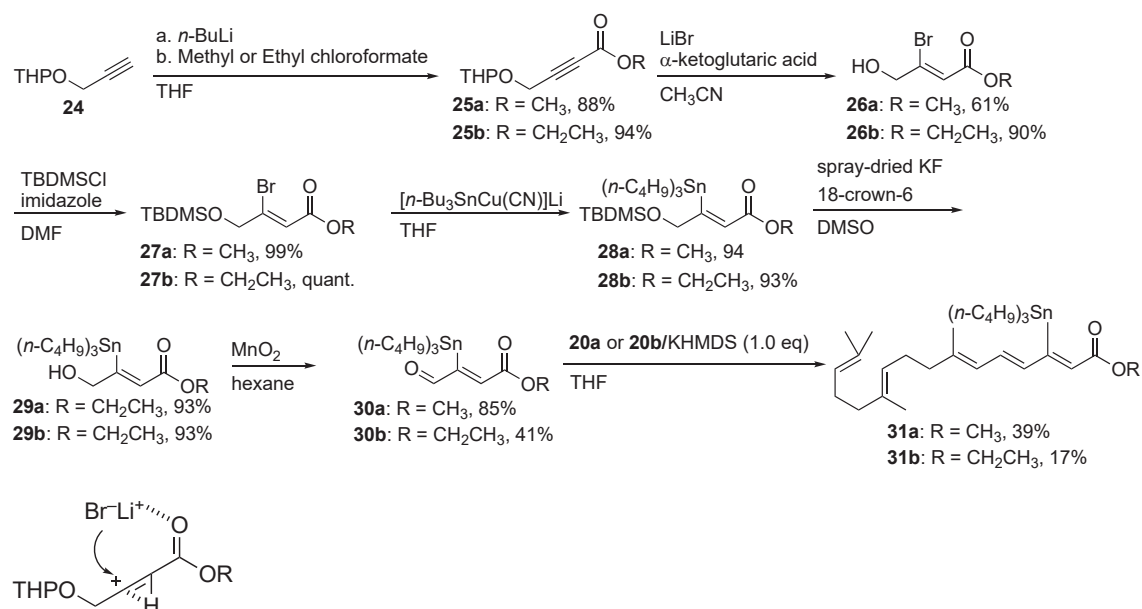
¹³C 標識用スズ前駆体の合成は、まず、THF 中、テトラヒドロ-2-(2-プロピニルオキシ)-2*H*-ピラン (**24**)と *n*-ブチルリチウムを反応させた後、クロロギ酸エステルを作用させて、メチルエステル **25a** およびエチルエステル **25b** を収率 80%、94%で合成した (Scheme 3)。続いて、*Z*体選択的に **26** を得るためにアセトニトリル中、臭化リチウムによるアルキンへの求電子的付加反応により行った²⁸⁾。反応は酸性条件下、反応系において生成するビニル型カルボカチオンへの臭化物イオンの求電子的付加反応により進行し、一般的には熱力学的に安定な(*E*)-アルケンが得られる。しかし、本反応ではリチウムカチオンがカルボニル酸素へ配位し、カルボニル酸素の孤立電子対と同じ平面上にあるアセチレンの反対側の p 軌道にプロトンが付加して三員環中間イオンを形成する。臭化物イオンの付加は環の橋掛けにより妨害され、*anti* 側から付加が進行し、(*Z*)-アルケンが選択的に得られると考えられる (Scheme 3)。合成検討過程で、生成物に酸添加物として用いた酢酸が残留し、その後の反応を妨げていることがわかったため、解決法として種々の酸 (*p*-TSA、10-カンファースルホン酸、トリフルオロ酢酸、 α -ケトグルタル酸 (α KG)、ギ酸) を検討したところ、酸添加物として水溶性の α KG を用いたときに、精製後に酸添加物が残留することな

く、立体選択的に目的とする **26a**、**26b** を収率 69%、90% で得た。続いて DMF 中、塩基性条件下、*tert*-ブチルジメチルシリル (*tert*-butyldimethylsilyl : TBDMS) で保護し、アリルアルコールのシリル保護体 **27a**、**27b** をそれぞれ収率 55% および定量的に合成した。その後、THF 中でアリルアルコール保護体とあらかじめ調製した低次クプラートを用いたシアノギルマン試薬 ($n\text{-Bu}_3\text{SnCu}(\text{CN})\text{Li}$) を作用させ、ビニルスズ体 **28a**、**28b** を定量的および 93% の収率で合成した²⁹⁾。続いて、DMSO 中、スプレードライフッ化カリウムの 18-クラウン-6-エーテル錯体を作用させ、選択的に TBDMS 保護を脱保護し、アリルアルコール体 **29a**、**29b** を収率 40% および 79% で得た。得られたアルコール体を、二酸化マンガンを用いて酸化し、アルデヒド体 **30a**、**30b** を 85%、41% で得た。最後に、HWE 反応を用いて、別途合成したホスホン酸エステル体 **20a**、**20b** に KHMDS (5.0 当量) を THF/DMF 混合溶媒中、 $-78\text{ }^\circ\text{C}$ で 1 時間作用させたのち、トリブチルスズアルデヒド中間体 (5.0 当量) を反応させたところ、低収率であった。そのため、モデル化合物を用いた HWE 反応の条件検討をホスホン酸エステル : KHMDS : アルデヒドの比を 1 : 1 : 1 として行った (表 1)。

エントリー 1 では、塩基に KHMDS、溶媒に THF を使用し、温度を $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 、ホスホナートカルボアニオン中間体の調整時間を 1 時間としたとき、収率が 15% となり、低かった。エントリー 2 では温度を $-78\text{ }^\circ\text{C}$ にすると収率が 39% に

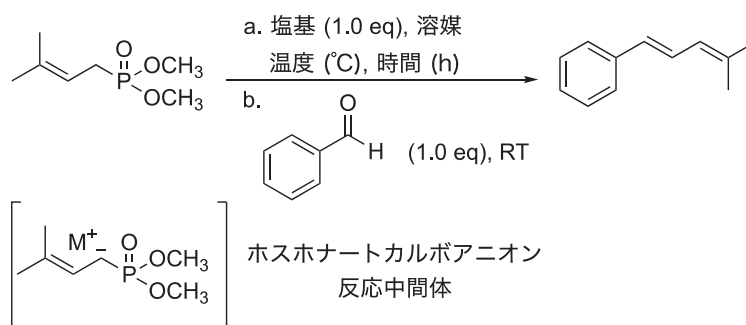
上がったため、エントリー3 で反応温度を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、ホスホナートカルボアニオン中間体の調整時間を 30 分したときに一番高い収率 68% が得られた。なお塩基にナトリウムエトキシドを用いた際は反応が進行しなかった (エントリー4)。得られたエントリー3 の条件をペレチノインエステル体の合成に適用し、メチルエステル体 **31a**、エチルエステル体 **31b** が収率 39%、17% で得られた (Scheme 3)。立体的に嵩高いトリブチルスズ置換基を持つ中間体の使用により HWE 反応の進行速度が遅くなるため収率が 40% 以下になっていると考えられる。

Scheme 3. ^{11}C 標識用スズ化合物前駆体 (**31a**, **b**) の合成



立体選択的(*Z*)-アルケン合成 (化合物 **26** の合成) の推定する反応機構

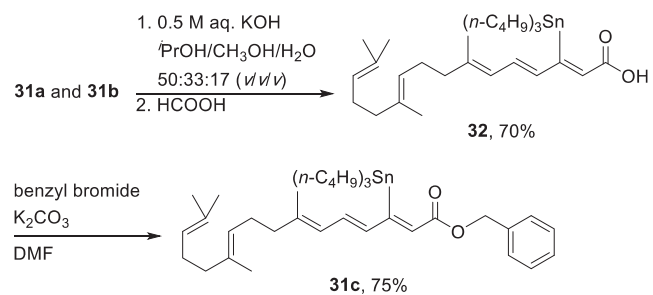
表 1 HWE 反応条件の最適化



エントリー	塩基	溶媒	温度 (°C)	時間 (h)	収率 (%)
1	KHMDS	THF	-20	1.0	15
2	KHMDS	THF	-78	1.0	39
3	KHMDS	THF	-78	0.5	68
4	NaOCH ₂ CH ₃	DMF	-20	1.0	NR

¹¹C 標識用スズ化合物前駆体であるベンジルエステル体 **31c** は ¹¹C 標識用スズ化合物前駆体 **31a** と **31b** との混合物に 2-プロパノール/メタノール/水 (50/33/17 v/v/v) 混合溶媒中、水酸化カリウムを作用させ、ギ酸で中和して、トリブチルスズ置換ペレチノイン **32** を収率 70% で得た後、DMF 中、塩基性条件下、臭化ベンジルを用いた求核置換反応により、収率 75% で合成した (Scheme 4)。

Scheme 4. ^{11}C 標識用スズ化合物前駆体ベンジルエステル (**31c**)の合成

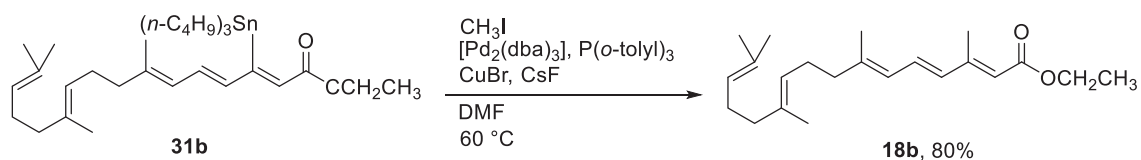


2-4. 非放射性ヨウ化メチルを用いた高速 C-メチル化によるペレチノインエチル

エステルの合成

実際の標識実験を行う前に非放射性ヨウ化メチルを用いて、高速 C-メチル化反応によるペレチノインエチルエステルの合成を行った。PET 合成条件を意図し、過剰量の ^{11}C 標識用スズ化合物前駆体 (5.0 当量) を使い、DMF 中、**31b**/ CH_3I /[$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$]/ $\text{P}(o\text{-tolyl})_3$ / CuBr / CsF (モル比 = 5 : 1 : 0.5 : 4 : 2 : 5) を作用させ、目的物である非標識ペレチノインエチルエステル **18b** を収率 80% で得た (Scheme 5)。

Scheme 5. 非放射性条件下におけるペレチノインエチルエステル **18b** の合成



2-5. ^{11}C 標識ペレチノインエステルプロドラッグの合成

^{11}C 標識用スズ化合物前駆体ベンジルエステル **31c** と放射性ヨウ化メチル (ヨウ化 ^{11}C メチル) を用いて、DMF 中、 $[\text{Pd}_2(\text{dba})_3]$ 、 $\text{P}(o\text{-tolyl})_3$ 、臭化銅(I)、フッ化セシウム (0.5 : 4 : 2 : 5、モル比)存在下、パラジウム 0 価錯体を介した高速 C - ^{11}C メチル化反応により ^{11}C 標識ペレチノインベンジルエステル **18c** を総合成時間 31 分、RCY57%、放射化学純度>99%、比放射能 144 GBq/ μmol で得た (Scheme 6) (表 2)。同様の方法で ^{11}C 標識メチルエステル **18a**、 ^{11}C 標識エチルエステル **18b** を合成した。

Scheme 6. ^{11}C ペレチノインエステルプロドラッグ (^{11}C **18a-c**)の合成

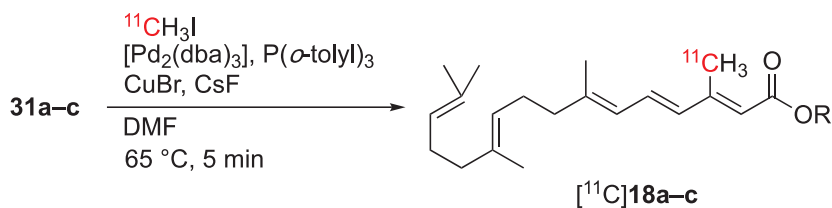


表2 $[^{11}\text{C}]$ ペレチノインエステルプロドラッグ ($[^{11}\text{C}]$ **18a-c**)の注射液調製結果

化合物	放射活性総量 (GBq)	比放射能 (GBq/ μmol)	RCY (%)
$[^{11}\text{C}]$ 18a	4.33	157	82
$[^{11}\text{C}]$ 18b	3.15	134	66
$[^{11}\text{C}]$ 18c	2.87	144	57

2-6. ^{11}C 標識ペレチノインエステルプロドラッグの PET イメージング

合成した ^{11}C 標識ペレチノインエステルプロドラッグ **18a-c** を用いて PET イメージング実験を行った。ここでは脳移行性が示された ^{11}C 標識ベキサロテンと同等の脂溶性を有する ^{11}C 標識ベンジルエステル **18c** を用いた。図 15 に、ラットおよびサルに対する脳 PET イメージング実験の結果を示した。まず、 ^{11}C **18c** のラット静脈内投与後、60 分間の撮像を行ったところ投与直後にピーク ($\text{SUV} = 0.6$) を観測したが、すぐに下がり始め、再び 10 分後から 60 分後まで脳内放射能濃度が漸増することを観測した (図 15(a))。一方、サル脳では 90 分間の撮像を行い、ラットと同様に投与直後にピークを観測した後、脳内放射能濃度がいったん減少し、その後測定終了時まで、増大し続けるという現象が観測された (図 15(b))。上記のように、エステル体は、予想に反して投与初期から低い脳移行性を示したが、10 分程度の時間差をおいて脳内で放射能濃度を観測し、継続的な右上がりの取り込み曲線を示すといった特徴ある挙動を示した。この現象は、標識体のラットおよびサルへの投与直後はベンジルエステル体が脳へ移行し、すぐに排出され血中あるいは臓器で加水分解されてカルボン酸、さらに何らかの脳移行性構造変異体へと代謝された後、再度取り込みが始まる新たな分子を介した機構の存在が推定される (図 16)。

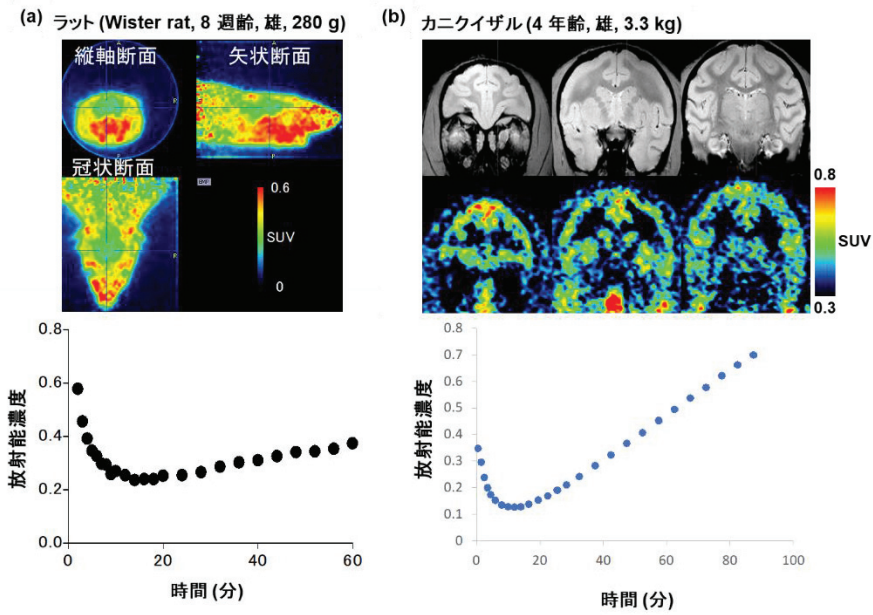


図 15. ^{11}C 標識ペレチノインベンジルエステル [^{11}C]18c 静脈内投与後のラット脳 2-60 分加算平均画像 (上段)および時間放射能曲線 (下段) (a)、サル脳 MRI (上段上)と 30-90 分加算平均画像 (上段下)と時間放射能曲線 (下段) (b)

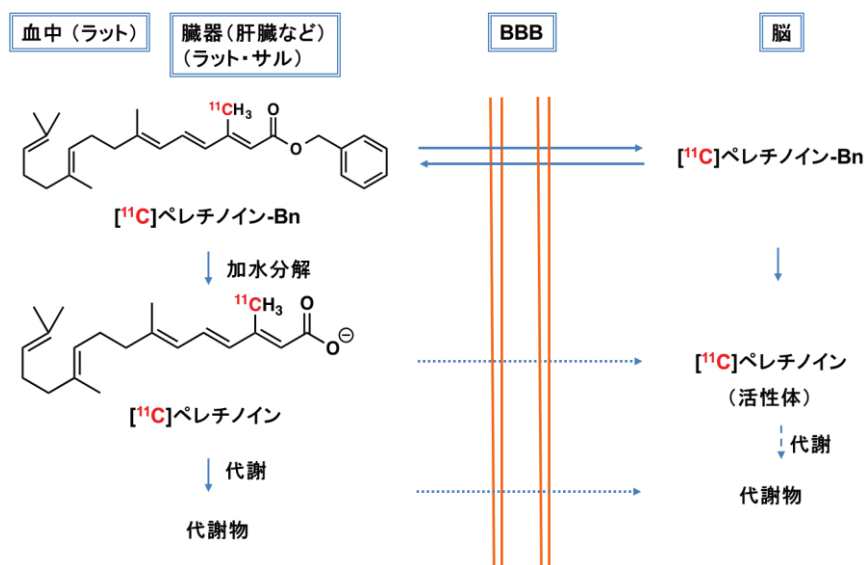


図 16. ¹¹C 標識ペレチノインベンジルエステルの推定脳移行機構

2-7. ^{11}C 標識ペレチノインの合成と PET イメージング

次に、 ^{11}C 標識ペレチノインベンジルエステルの一次代謝物として考えられる加水分解物のカルボン酸であるペレチノインの ^{11}C 標識化を行うこととした。まず、エステル **31a** を標識用前駆体として高速 C - ^{11}C メチル化反応により ^{11}C 標識 **18a** へと変換した後、ワンポットで強塩基を用いた加水分解反応により脱エステル化し、ギ酸で中和して ^{11}C 標識体 ^{11}C **9** を合成した (Scheme 7)。得られた ^{11}C 標識体 ^{11}C **9** を用いて相当するベンジルエステル体と同様にラットおよびサルに対する PET イメージング実験を行った。 ^{11}C **9** のラット静脈内投与後、120 分間の撮像で、投与直後にピークを観測した後、いったん脳取り込みが減少し、その後わずかな時間差 (2 分) を経て、脳内放射能濃度が 30 分まで増加した後、平衡状態となった ($\text{SUV} = 1.3$) (図 17 (a))。一方、サル脳では 90 分間の撮像で、ラット脳での観測がより強調され、投与直後にピークが観測された後、いったん脳取り込みが減少後、脳内放射能濃度が観測終了時の 90 分後まで、増大し続ける現象を観測した ($\text{SUV} = 3.0$) (図 17 (b))。

Scheme 7. ^{11}C ペレチノイン (^{11}C 9) の合成

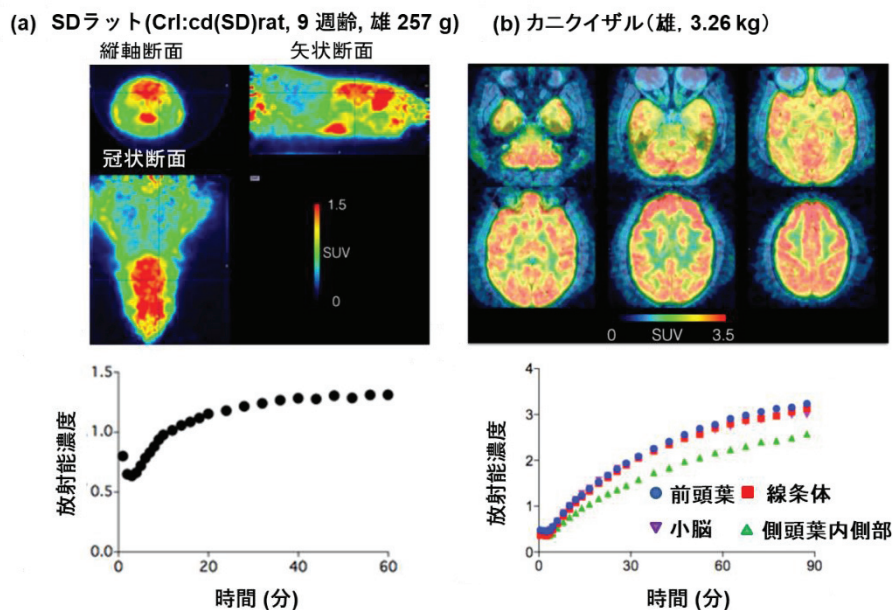
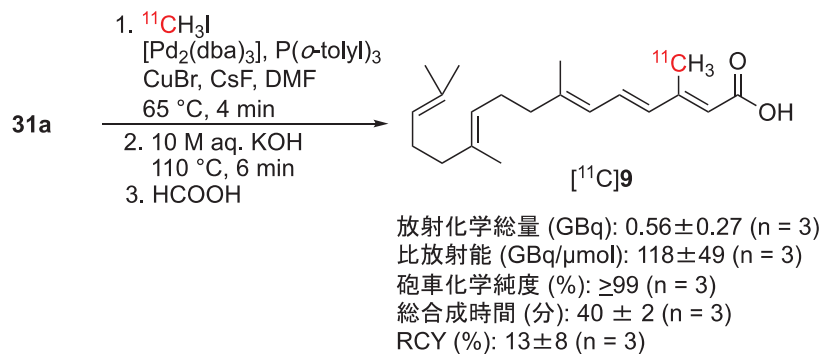


図 17. ^{11}C 標識ペレチノイン ^{11}C 9 のラット脳 2-60 分加算平均画像 (上段) および時間放射能曲線 (下段) (a)、サル脳 MRI と 50-90 分加算平均画像の重ね図 (上段) と時間放射能曲線 (下段) (b)

2-8. ^{11}C 標識ペレチノイン投与後のマウス全身 PET イメージング

次に PET 撮像時に全身の撮像が可能であるマウスを用いて、 ^{11}C 標識ペレチノイン(^{11}C 9)の静脈内投与後の全身における経時変化を追跡するために全身 PET イメージング実験を行った。実際に、マウス(8.3週齢、31.1g)を用いて、 ^{11}C 9(9.9 MBq)の60分間の撮像を行い、PET画像を基に心臓、肝臓、脳に関心領域を設定し、 ^{11}C 9の経時的な組織移行を調べたところ、マウスへの静脈内投与後、投与直後に心臓(SUV = 5.8)および肝臓組織(SUV = 6.7)に高い集積が観測された(図18)。その後すぐに心臓の放射能濃度が下がり、20分以降平衡状態となった(SUV = 1.6)。放射能濃度の減少は血液と共に全身に標識体が循環したためと考えられる。肝臓への高い集積は40分以降平衡状態となった(SUV = 4.3)、 ^{11}C 9あるいはその代謝物が蓄積されることを示唆している。一方脳へは、わずかなピークを観測した後、いったん放射能濃度が減少し、再び、わずかな時間差を経て放射能濃度が40分まで増加した後、平衡状態となり(SUV = 0.8、60分)、マウスにおいてもラットやサルと同じような脳内取り込み現象が観測された。

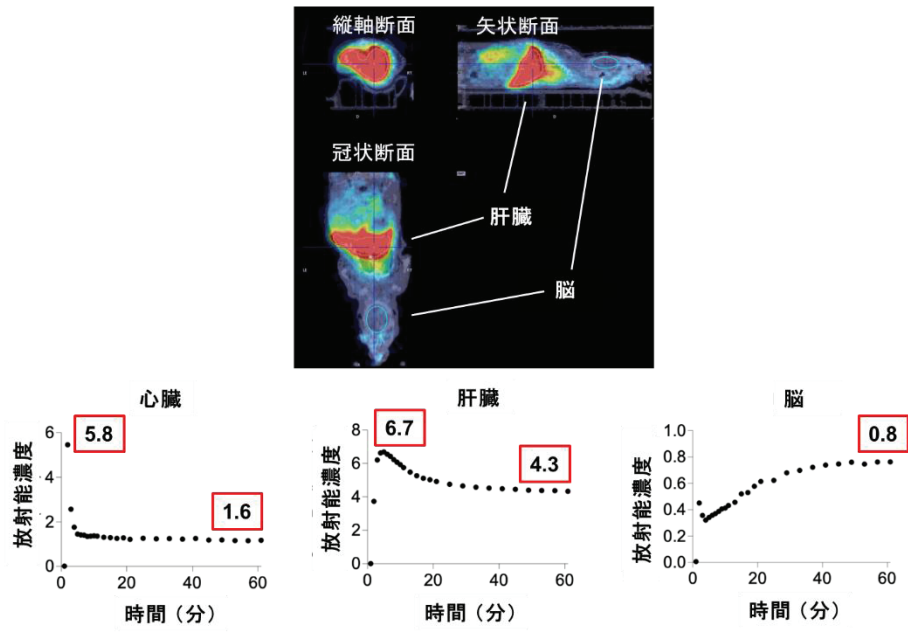


図 18. ^{11}C 標識ペレチノイン [^{11}C]9 のマウスの PET 撮像体内分布図

2-9. ^{11}C 標識ペレチノインのラット血漿および脳ラジオ HPLC 分析結果

^{11}C 標識ペレチノイン ($[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$) のラット静脈内投与後の放射性代謝物プロファイル进行分析するために、 $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ を用いて血漿および脳ホモジネートのラジオ HPLC 分析を行ったところ、血漿中では、投与直後、未変化体 $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ のほかに $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ よりもかなり極性が高い代謝物が観測され、投与 30 分後には $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ の大部分が高極性化合物へと変化する様子が観測された(図 19、血漿)。投与 3 分およびに取り出した脳からはそれぞれ未変化体である $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ のほかに高極性化合物が認められ、投与 90 分には、高極性化合物のみが観測された。このプロファイルにより、 $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ の脳内へのわずかな受動拡散により脳への取り込みと時間経過により血中で変化した高極性化合物が介在して徐々に脳内へ移行していることが推定された(図 19、脳)。このように $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ 由来高極性化合物が脳内に移行する現象は、これまで知られていた脂溶性化合物の受動拡散による脳内移行機構だけではなく、ペレチノインを脳内へ輸送する輸送体の存在が示唆され、この輸送体はリン脂質であるホスファチジルコリンであると推定している。

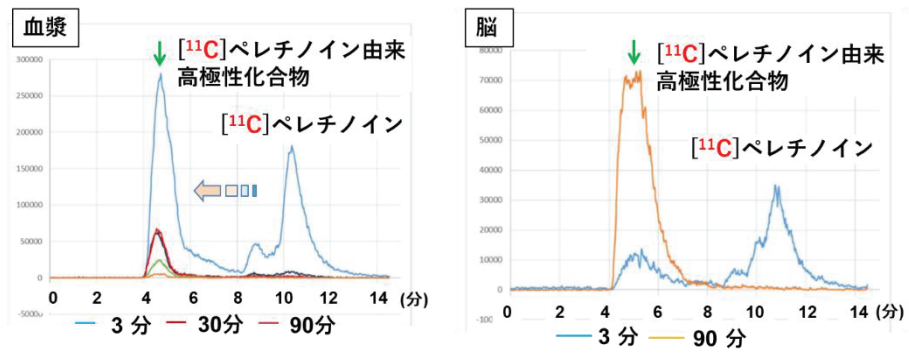


図 19. [¹¹C]ペレチノインのラット血漿および脳ラジオ HPLC 分析結果

2-10. ペレチノインの生理機能評価

生体におけるレチノイン酸シグナルの増強は神経再生の誘導に関与すると考えられており³⁰⁾、神経変性疾患の治療に有効であることが期待されている。この観点から、高い脳移行性が観測されたペレチノインの幹細胞における神経細胞への分化誘導能を評価した。実際に、培養したヒト多能性胎生期癌由来である NTERA-2cl.D1[NT2/D1]細胞 (以下 NT2 細胞と記載) に ATRA (10 μ M) およびペレチノイン (1–10 μ M) を添加して 14 日間培養し、神経細胞への分化誘導を行い、神経幹細胞マーカーである中間径フィラメント質の一種 Nestin (緑色) および神経細胞形成のマーカーで神経細胞前駆細胞から分化すると発現する微小管結合タンパク質である Microtubule Associated Protein (MAP2、赤色) で染色した。ATRA およびペレチノインを 10 μ M 添加した成熟細胞において Nestin (緑色) の発現はほとんど観測されず、MAP2 の発現が認められた。なお、ペレチノインを 1.0 μ M 添加した細胞では、神経細胞への分化がほとんど観測されなかった (図 20)。この結果からペレチノインは ATRA と同様に神経細胞への分化誘導能を示すことがわかった。また、成熟細胞におけるシナプス受容体発現を評価するために、NMDA 型グルタミン酸受容体を介したカルシウム流入の測定を行った³¹⁾。実際に ATRA あるいはペレチノイン投与により分化誘導した神経

細胞に蛍光カルシウム指示薬 Fluo-8-AM 溶液を細胞に添加し、細胞内導入が認められたのち、洗浄後、NMDA に誘導された細胞の蛍光強度を計測した。その結果、図 21（縦軸は蛍光変化率 $\Delta F/F$ 、横軸は時間）に示すカルシウムイメージングから、ATRA およびペレチノインを添加して分化誘導した神経細胞は、NMDA 型グルタミン酸受容体を発現しシナプスを形成していることが示唆された。加えて、ペレチノインは様々な神経障害に対しても抑制作用を示すことがわかった。

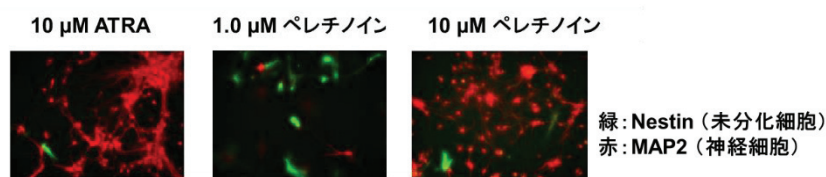


図 20. ATRA およびペレチノインの分化誘導能評価

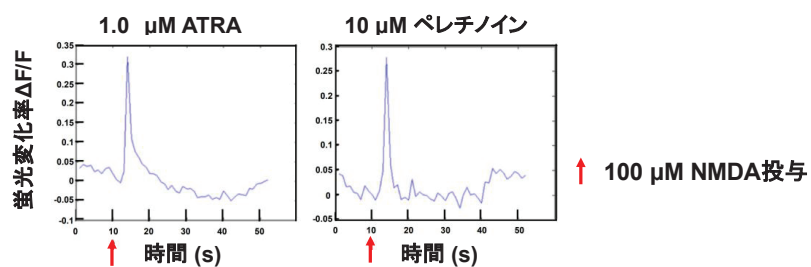


図 21. カルシウムイメージング結果

2-11. 本章のまとめ

本章では、ペレチノインの ^{11}C 標識メチルエステル体、エチルエステル体、ベンジルエステル体を RCY82%、66%、57%で合成した。 ^{11}C 標識ベンジルエステル体を用いてラットおよびサルに対する PET イメージング実験を行った結果、両動物である程度の脳への集積を観測し、いったん放射能濃度が下がって、かなりの時間差 (10 分後) を経て、再度継続的に放射能濃度が増大する特異な脳移行性が観測された。放射性化合物の脳への取り込み量の推移は、血中 (ラット) あるいは肝臓やその他の臓器 (ラットおよびサル)³²⁾ でのエステルの加水分解物あるいはさらに代謝されて生成した脳輸送体の関与を示唆した。次に、一次代謝産物と考えられるカルボン酸 (ペレチノイン) の ^{11}C 標識体を、メチルエステルスズ化合物標識用前駆体の高速 $\text{C}-[^{11}\text{C}]$ メチル化と強塩基によるエステルの加水分解反応をワンポットで行い、 ^{11}C 標識ペレチノインを合成した。得られた ^{11}C 標識ペレチノインのラットおよびサルに対する PET イメージング実験を行った結果、今度は、わずかな時間差 (2 分) を経て高い放射能濃度 (SUV: ラット = 1.3、サル = 3.0) を観測した。また、 ^{11}C 標識ペレチノインのマウスを用いた全身 PET 撮像により ^{11}C 標識ペレチノインあるいはその代謝物が肝臓に高く集積することがわかった。本研究における脳移行性の発見をきつ

かけとしてペレチノインの CNS 活性評価を行い、ペレチノインが幹細胞における神経細胞への分化誘導能を示すことが分かった。別途行った ^{11}C 標識ペレチノインのラット静脈内投与後の血漿および脳ホモジネートの代謝物解析により、血中で代謝された高極性化合物が脳内に移行していることが推定された。なお、このペレチノイン由来高極性化合物がリン脂質であるホスファチジルコリンであると推定しているが、脳と血漿中で構造が同一である可能性があると考えている。

第3章 結語

本研究では、化学的および代謝的に安定構造をもつ非環式人工レチノイドであるペレチノインの ^{11}C 標識 PET プローブを合成対象とし、高速 $\text{C}-[^{11}\text{C}]$ メチル化が適用されるスズ化合物 ^{11}C 標識用前駆体を、天然化合物であるファルネソールの構造修飾を基に、ホスホン酸エステルとトリブチルスズ置換アルデヒド中間体を用いて、HWE 反応により短工程で効率よく合成した。まず、BBB 透過性を考慮し、脂溶性の高いエステル体の標識化をスズ化合物前駆体と放射性ヨウ化メチルを用いた高速 $\text{C}-[^{11}\text{C}]$ メチル化反応により、 ^{11}C 標識メチルエステル、エチルエステル、ベンジルエステルプロドラッグ体を RCY82%、66%、57%で合成した。得られたベンジルエステル体のラットおよびサル脳に対する PET イメージング実験により、投与直後にピークが観測された後、いったん脳内放射能濃度が下がり、10 分の時間差を経て放射能濃度が増大する現象が観測された。続いて、 ^{11}C 標識メチルエステル合成後、ワンポットでの強塩基加水分解により ^{11}C 標識ペレチノインを RCY25%で合成した。ベンジルエステル体と同様にラットおよびサル脳に対する PET イメージング実験を行い、投与直後にピークが観測された後、いったん脳内放射能濃度が下がり、ベンジルエステル体よりも高い脳内放射能濃度を観測した。別途行った ^{11}C 標識ペレチノ

インのラット静脈内投与後の血漿および脳内のラジオ HPLC 分析による経時的観測により、血漿中では ^{11}C 標識ペレチノインは ^{11}C 標識高極性化合物へと変化し、脳内でも ^{11}C 標識高極性化合物が観測された。ペレチノインの脳内移行には特別な脳内輸送機構の存在が示唆され、輸送体がリン脂質のホスファチジルコリンであると推定しており、その構造の解明を進めている。この脳内輸送体の構造を決定することができれば、ペレチノイン (非環式レチノイド) のみならず、生体に重要な長鎖脂肪酸の脳内輸送機構の解明にもつながる可能性がある。

このペレチノインの高い脳移行性の発見をきっかけとして、ペレチノインの幹細胞の神経細胞への分化誘導能を観測し、さらに分化誘導した神経細胞が NMDA 型グルタミン酸受容体を発現し、これによりシナプスを形成していることが示唆された。このようにペレチノインの高い脳移行性と中枢神経系活性の発見により、神経変性疾患や脳腫瘍^{33, 34)}、アルツハイマー病など関連神経疾患への化学療法治療薬候補として開発の一助になることが期待される。

実験の部

一般事項

非放射性条件；全ての化学薬品は特に記さない限り、市販のものをそのまま用いた。脱水テトラヒドロフランは有機溶媒精製装置（ニッコー・ハンセン株式会社製、Glass Contour MINI)のものを用いた。分析用の薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography : TLC)は、0.25 mm のシリカゲルの薄層を固着したもの (E. MERCK Kieselgel 60F₂₅₄ Cat. No. 1.05715)を使用し、紫外線、ヨウ素、リンモリブデン酸ナトリウム溶液 [濃硫酸 (23 mL)、85%オルトリン酸 (7.5 mL)、蒸留水 (455 mL)]を用いて生成物のスポットを確認した。リンモリブデン酸ナトリウム溶液の確認は TLC を溶液の中に浸し、スポットが明確になるまで熱し確認した。¹H、¹³C NMR は JEOL JNM- α 400 を使用し、測定溶媒として重クロロホルム (CCL)を使用した。化学シフト (δ)値は ppm で示し、化学結合定数 (J)は Hz で示した。¹H、¹³C NMR の基準物質にはテトラメチルシラン (TMS) (0.00)を用いた。シグナルの分裂様式は、一重線を s、二重線を d、三重線を t、多重線を m、広幅線を br と略記した。高分解能質量スペクトル (high resolution mass spectrometer : HRMS)は、PE Biosystems Mariner システムおよび JEOL JMS-700/GI で測定した。

放射性条件； [^{11}C]二酸化炭素 ($[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$)は、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターで CYPRIS HM-18 サイクロトロン (住友重機械工業製)を使用した $^{14}\text{N} (p, \alpha) ^{11}\text{C}$ 核反応によって生成した。 ^{11}C 標識反応は、反応混合物中の加熱、希釈、HPLC 注入、分離精製、有機溶媒の蒸発乾固による除去、および滅菌濾過からなる独自の自動放射製標識システムを使用して実施した。放射性条件におけるセミ分種 HPLC による精製は日本分光社製 HPLC; PU-980、UV970 を使用した。放射エネルギーは、ATOMLABTM500 井戸型電離箱式ドーズキャリブレーション (Biodex Medical Systems, Inc.)を使用して測定した。 ^{11}C 標識化合物の分析に用いた HPLC 分析装置は、放射性 HPLC フローモニター-Gabi Star (Eysia-Raytest Co. Ltd.)、2"x2" NaI シンチレーション検出器 (Eysia-Raytest Co. Ltd.)、および島津製作所製のシステムコントローラー (SPD-10Avp)、オンラインデガッサ (DGU-12A)、溶媒デリバリーユニット (LC-10ATvp)、カラムオーブン (CT0-10A)、フォトダイオードアレイ検出器 (SCL-10Avp)を備えた HPLC システムおよびソフトウェア (LC ソリューション)を用いた

動物; 代謝物分析および PET イメージング実験では Cr1 : CD Sprague-Dawley。(SD)ラット (雄、8 週齢、290–300 g、チャールズリバーラボラトリーズジャパン)、ddY マウス (雄、8 週齢、31.1 g)を使用した。使用した動物の維持および取り扱いは、岐阜大学、国立研究開発法人国立長寿医療研究センタ

ー (NCGG)、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構量子医科学研究所 (QST)のガイドラインに従った。動物実験のプロトコルは、岐阜大学の動物倫理委員会、ラットおよびマウス実験については NCGG、サル実験については QST によって承認された。

実験手順

Dimethyl ((2*E*,6*E*)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl)phosphonate (20a)

室温でアルゴン雰囲気下、50 mL 2 ロナスフラスコ中、*trans,trans*-ファルネソール (19) (626 μ L, 2.50 mmol)の脱水 DMF (30 mL)溶液に塩化リチウム (1.27 g, 30 mmol)、2,6-ルチジン (4.63 mL, 4.29 g, 40 mmol)を加えて 15 分間攪拌したのち、0 °Cに冷やし、メタンスルホン酸クロライド (2.32 mL, 3.44 g, 30 mmol)を加え、5 分間 0 °Cで攪拌したのち、室温に戻し 19 時間攪拌した。その後、0 °Cで水を加え、ヘキサンで抽出 (3 \times 15 mL)した後、有機層を飽和食塩水 (45 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた橙色油状の (2*E*,6*E*)-1-chloro-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-triene を得た。この化合物はそのまま次の反応に用いた。

アルゴン雰囲気下、30 mL 2 ロナスフラスコ中、(2*E*,6*E*)-1-chloro-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-triene にヨウ化ナトリウム (74.9 mg, 500 μ mol)、亜リン酸トリメチル (2.5 mL, 2.63 g, 21.2 mmol)を加え、21 時間加熱還流した。その後、ジエチルエーテルで抽出した後 (3 \times 15 mL)、有機層を飽和食塩水で洗浄し (45 mL)、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=1/10)で精製し、黄色油状の目的物 **20a** (480 mg, 153 μ mol, 61% (2 段階))で得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.60 (s, 6H, 2 CH_3), 1.66 (s, 3H, CH_3), 1.69 (s, 3H, CH_3), 1.95–2.10 (m, 8H, 4 CH_2), 2.58 (dd, J = 22.0, 7.6 Hz, CH_2), 3.74 (d, J = 10.4 Hz, 6H, 2 CH_3O), 5.08–5.20 (m, 3H, 3 $\text{C}=\text{CH}$); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 16.00, 16.26 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 1.9 Hz) 17.67, 25.45 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 139.2 Hz), 25.69 (2C), 26.35 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 3.8 Hz), 26.70, 39.69, 52.57 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 6.7 Hz, 2C), 111.98 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 10.5 Hz), 123.72, 124.28, 131.32, 135.32, 140.57 (d, $J_{\text{P-C}}$ = 14.3 Hz).

Diethyl ((2*E*,6*E*)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yl)phosphonate (**20b**)

室温でアルゴン雰囲気下、20 mL 2 ロナスフラスコ中、*trans,trans*-ファルネソール (**19**) (154 μ L, 151 mg, 677 μ mol)の脱水 DMF (1.5 mL)溶液に塩化リチウム (86.3 g, 805 μ mol)、2,6-ルチジン (313 μ L, 298 mg, 2.78 mmol)を加えて15分間攪拌したのち、0 $^{\circ}$ Cに冷やし、メタンスルホン酸クロライド (156 μ L, 233 mg, 2.03 mmol)を加え、5分間0 $^{\circ}$ Cで攪拌したのち、室温に戻し19時間攪拌した。その後、0 $^{\circ}$ Cで水を加え、ヘキサンで抽出 (3 \times 5 mL)した後、有機層を飽和食塩水 (15 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた橙色油状の(2*E*,6*E*)-1-chloro-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trieneを得た。この化合物はそのまま次の反応に用いた。

アルゴン雰囲気下、30 mL 2 ロナスフラスコ中、(2*E*,6*E*)-1-chloro-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-triene にヨウ化ナトリウム (22.5 mg, 150 μ mol)、亜リン酸トリエチル (10.2 mL, 2.00 g, 12 mmol)を加え、21時間加熱還流した。その後、ジエチルエーテルで抽出した後 (3 \times 5 mL)、有機層を飽和食塩水で洗浄し (15 mL)、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=1/10)で精製し、黄色油状の目的物 **20b** (184 mg, 537 μ mol, 72% (2段階))で得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.30 (t, J = 7.0 Hz, 6H, 2 CH_3), 1.59 (s,

6H, 2CH₃), 1.65 (d, $J = 3.6$ Hz, 3H, CH₃), 1.67 (s, 3H, CH₃), 1.89–2.14 (m, 8H, 4CH₂), 2.56 (dd, $J = 7.6$, $^2J(^1\text{H}-^{31}\text{P}) = 21.6$ Hz, 2H, CH₂), 4.00–4.16 (m, 4H, 2CH₂), 5.03–5.13 (m, 2H, 2C=CH), 5.14–5.24 (m, 1H, C=CH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 16.06, 16.40, 16.56 (d, $^3J(^{13}\text{C}-^{31}\text{P}) = 5.7$ Hz, 2C), 17.76, 25.76, 26.49, 26.53, 26.46 (d, $^1J(^{13}\text{C}-^{31}\text{P}) = 139.2$ Hz), 26.81, 39.78, 61.81 (d, $^2J(^{13}\text{C}-^{31}\text{P}) = 5.8$ Hz, 2C), 112.51 (d, $^2J(^{13}\text{C}-^{31}\text{P}) = 11.5$ Hz), 123.88, 124.39, 131.39, 135.37, 140.34 (d, $^3J(^{13}\text{C}-^{31}\text{P}) = 13.4$ Hz); HR-MS (EI+, 100% acetone: m/z : calcd for C₁₉H₃₅O₃P ([M-C₄H₉]⁺) 342.2324; found, 342.2319.

(*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-2-butenic acid methyl ester (22)

室温で 30 mL ナスフラスコにヒドロキシアセトン (**21**) (343 μ L, 5.00 mmol) を加え、ベンゼン (5.0 mL) に溶かした後、(トリフェニルホスホラニリデン) 酢酸メチル (1.68 g, 5.02 mmol) を加え、95 °C で 24 時間攪拌した。ロータリーエバポレーターで減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=3/1) で精製し、黄色油状の目的物 **22** (380 mg, 2.92 mmol, 58%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2.10 (s, 3H, CH₃), 3.72 (s, 3H, CH₃),

4.15–4.16 (m, 2H, CH₂), 5.99–6.01 (m, 1H, C=CH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 15.60, 51.01, 67.04, 113.24, 157.50, 167.19.

Methyl (*E*)-3-methyl-4-oxobut-2-enoate (**23**)

室温で 100 mL ナスフラスコに **22** (228 mg, 1.75 mmol) を加え、ジクロロメタン (10 mL) に溶かした後、二酸化マンガン (4.57 g, 52.6 mmol) を加え、1.5 時間攪拌した。その後、セライト濾過で酸化剤を除去し、減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 3/1) で精製し、黄色油状の目的物 **23** (152 mg, 1.19 mmol, 68%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2.18 (d, 1.2 Hz, 3H, CH₃), 3.84 (s, 3H, CH₃), 6.52 (t, *J* = 1.2 Hz, 1H, C=CH), 9.57 (s, 1H, CHO); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 10.85, 52.00, 135.00, 150.70, 165.92, 194.43.

(*2E,4E,6E,10E*)-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-2,4,6,10,14-pentaenoic acid (**9**)

室温でアルゴン雰囲気下、20 mL シュレンクに THF (3.5 mL) に溶解させた **20a** (349 mg, 1.11 mmol) を加え、-78 °C で 1.0 M ヘキサメチルジシラザンカリ

ウム THF 溶液 (1.19 mL, 237 mg, 1.19 mmol) を加えた。30 分間攪拌した後、
78 °C で THF (1.5 mL) に溶解させた **23** (142 mg, 1.11 mmol) を加え、その後、
室温まで徐々に昇温させながら 15 時間攪拌した。その後、氷冷下、飽和塩化ア
ンモニウム水溶液 (1.2 mL) を加え、酢酸エチルで抽出した (3×5.0 mL)。続い
て、有機層を飽和食塩水 (15 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。
減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/
酢酸エチル=200/1) で精製し、黄色油状の **18a** を得た。この化合物はそのまま
次の反応に用いた。

室温で 20 mL ナスフラスコに **18a** を加え、2-プロパノール (1.0 mL) に溶かし
た後、10 M 水酸化カリウム水溶液 (2.0 mL) を加え、1.5 時間加熱還流した。そ
の後、氷冷下でギ酸 (1.0 mL) を加え、減圧濃縮した後、酢酸エチルで抽出した
(3×5.0 mL)。続いて、有機層を飽和食塩水 (15 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリ
ウムで乾燥した。減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラ
フィー (ヘキサン/酢酸エチル = 8/1) で精製し、薄黄色固体の目的物 (**9**) (94.1
mg, 311 μmol, 28% (2 段階)) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.60 (s, 3H, CH₃), 1.61 (s, 3H,
CH₃), 1.68 (s, 3H, CH₃), 1.86 (s, 3H, CH₃), 1.98–2.16 (m, 8H, 4CH₂), 5.09–5.10
(m, 2H, 2C=CH), 5.77 (s, 1H, C=CH), 5.98 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, C=CH), 6.21

(d, $J = 14.8$ Hz, 1H, C=CH), 6.90 (dd, $J = 15.2, 10.8$ Hz, 1H, C=CH), 9.35–11.97 (br s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 13.90, 16.10, 17.26, 17.77, 25.78, 26.49, 26.77, 39.76, 40.33, 51.01, 117.58, 123.61, 124.35, 125.00, 131.29, 131.45, 133.43, 135.71, 144.15, 155.43, 167.75.

Methyl 4-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)but-2-ynoate (**25a**)

室温でアルゴン雰囲気下の 30 mL 2 ロナスフラスコにテトラヒドロ-2-(2-プロピニルオキシ)-2*H*-ピラン (**24**) (703 μL , 710 mg, 5.00 mmol)を加え、脱水 THF (5.0 mL)に溶かした後、 -78 °Cで 1.65 M *n*-ブチルリチウム *n*-ヘキサン溶液 (3.03 mL, 5.00 mmol)を加え、30 分攪拌した。さらに -78 °Cでクロロギ酸メチル (386 μL , 5.00 mmol)を加え、室温で1 時間攪拌した。その後、 0 °Cで飽和塩化アンモニウム水溶液 (3.0 mL)を加え、酢酸エチルで抽出した (3 \times 8.0 mL)。続いて有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=5/1)で精製し、無色油状の目的物 **25a** (869 mg, 4.38 mmol, 88%)を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.45–1.90 (m, 6H, 3 CH_2), 3.48–3.60 (m,

1H, CH₂), 3.73–3.87 (m, 1H, CH₂), 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.38 (s, 2H, CH₂), 4.80 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H, CH).

Ethyl 4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)but-2-ynoate (25b)

室温でアルゴン雰囲気下の 300 mL 2 ロナスフラスコにテトラヒドロ-2,2-プロピニルオキシ-2H-ピラン(**24**) (2.81 mL, 2.84 g, 20.0 mmol)を加え、脱水 THF (40 mL)に溶かした後、-78 °Cで 1.61 M *n*-ブチルリチウム *n*-ヘキサン溶液 (12.4 mL, 1.28 g, 20.0 mmol)を加え、30 分攪拌した。さらに-78 °Cでクロロギ酸エチル (1.90 mL, 2.17 g, 20.0 mmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、0 °Cで飽和塩化アンモニウム水溶液 (20 mL)を加え、酢酸エチルで抽出した (3×40 mL)。続いて有機層を飽和食塩水 (100 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=5/1)で精製し、無色油状の目的物 **25b** (4.01 g, 18.9 mmol, 94%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.30 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH₃), 1.45–1.90 (m, 6H, 3CH₂), 3.48–3.59 (m, 1H, CH₂), 3.75–3.87 (m, 1H, CH₂), 4.23 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂), 4.37 (s, 2H, CH₂), 4.80 (t, $J = 3.2$ Hz, 1H, CH).

Methyl (*Z*)-3-bromo-4-hydroxybut-2-enoate (26a)

室温でアルゴン雰囲気下の 50 mL 2 口ナスフラスコに **25a** (793 mg, 4.00 mmol)を加え、脱水アセトニトリル (8.0 mL)に溶かした後、0 °Cで無水臭化リチウム (528 mg, 6.08 mmol)および α -ケトグルタル酸 (869 mg, 5.95 mmol)を加え、95 °Cで 23 時間攪拌した。その後、酢酸エチルで抽出し (3×5.0 mL)、有機層を飽和食塩水 (20 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=3/1)で精製し、黄色油状の目的物 **26a** (477 mg, 2.45 mmol, 61%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 2.09 (t, J = 6.4 Hz, 1H, OH), 3.77 (s, 3H, CH₃), 4.35 (dd, J = 1.4, 6.0 Hz, 2H, CH₂), 6.72 (t, J = 1.2 Hz, 1H, C=CH).

Ethyl (*Z*)-3-bromo-4-hydroxybut-2-enoate (26b)

室温でアルゴン雰囲気下の 50 mL 2 口ナスフラスコに **25b** (1.75 g, 8.25 mmol)を加え、脱水アセトニトリル (20 mL)に溶かした後、0 °Cで無水臭化リチウム (1.09 g, 12.6 mmol)および α -ケトグルタル酸 (1.84 g, 12.6 mmol)を加え、95 °C

で 23 時間攪拌した。その後、酢酸エチル (3×10 mL)で抽出し、有機層を飽和食塩水(30 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=4/1)で精製し、黄色油状の目的物 **26b** (1.56 g, 7.46 mmol, 90%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 1.30 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃), 2.10 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, OH), 4.23 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 4.34 (dd, *J* = 1.6, 6.8 Hz, 2H, CH₂), 6.70 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H, C=CH).

Methyl (*Z*)-3-bromo-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)but-2-enoate (**27a**)

室温で 30 mL ナスフラスコに **26a** (477 mg, 2.45 mmol)を加え、脱水 DMF (4.0 mL)に溶かした後、0 °Cでイミダゾール (221 mg, 3.25 mmol)および *tert*-ブチルジメチルクロロシラン (413 mg, 2.74 mmol)を加えた。室温で 4 時間攪拌した後、ジエチルエーテルで抽出し (3×10 mL)、有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=10/1)で精製し、黄色油状の目的物 **27a** (753 mg, 2.43 mmol, 99%)を

得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.10 (s, 6H, 2 CH_3), 0.92 (s, 9H, 3 CH_3), 3.76 (s, 3H, CH_3), 4.30 (d, J = 2.0 Hz, 2H, CH_2), 6.72 (t, J = 1.8 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$).

Ethyl (*Z*)-3-bromo-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)but-2-enoate (**27b**)

室温で 50 mL ナスフラスコに **26b** (1.56 g, 7.46 mmol) を加え、脱水 DMF (10 mL) に溶かした後、0 °C でイミダゾール (667 mg, 9.80 mmol) および *tert*-ブチルジメチルクロロシラン (1.25 g, 8.29 mmol) を加えた。室温で 4 時間攪拌した後、ジエチルエーテルで抽出し (3 × 10 mL)、有機層を飽和食塩水 (30 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 10/1) で精製し、黄色油状の目的物 **27b** (2.40 g, 7.41 mmol, 99%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.10 (s, 6H, 2 CH_3), 0.92 (s, 9H, 3 CH_3), 1.30 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 4.22 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 4.29 (d, J = 2.4 Hz, 2H, CH_2), 6.69 (t, J = 2.4 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = -5.38 (2C), 14.30, 18.38, 25.84 (3C), 60.66, 68.50, 117.16, 139.42, 164.59; HR-MS (EI+, 100% acetone): m/z : calcd for $\text{C}_8\text{H}_{14}^{79}\text{BrO}_3\text{Si}$ ($[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$) 264.9896;

found, 264.9905.

Methyl (Z)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-(tributylstannyl)but-2-enoate
(28a)

室温でアルゴン雰囲気下の 50 mL 2 ロナスフラスコにシアン化銅 (661 mg, 7.38 mmol)と脱水 THF (12 mL)を加えた後、-78 °Cで 1.65 M *n*-ブチルリチウム *n*-へキサン溶液 (4.45 mL, 7.35 mmol)を加え、15 分攪拌した。さらに、-78 °Cでビストリブチルスズ (3.71 mL, 7.35 mmol)を加え、0 °Cで1 時間攪拌した。その後、-78 °Cで脱水 THF (12 mL)に溶解させた **27a** (753 mg, 2.43 mmol)を加え、30 分攪拌した。その後、-78 °Cで 28 %アンモニア水 (1.0 mL)および飽和塩化アンモニウム水溶液 (1.0 mL)を加え、ジエチルエーテルで抽出した (3 × 3.0 mL)。続いて有機層を飽和食塩水 (10 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=150/1)で精製し、黄色油状の目的物 **28a** (1.18 g, 2.27 mmol, 98%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): 0.06 (s, 6H, 2CH₃), δ (ppm) = 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 9H, 3CH₃), 0.90–1.05 (m, 6H, 3CH₂), 0.92 (s, 9H, 3CH₃), 1.20–1.33 (m, 6H,

3CH₂), 1.34–1.53 (m, 6H, 3CH₂), 3.72 (s, 3H, CH₃), 4.41–4.48 (m, 2H, CH₂), 6.56–6.86 (m, 1H, C=CH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = -5.32 (2C), 10.83 (3C), 13.81 (3C), 18.59, 26.03 (3C), 27.46 (3C), 29.27 (3C), 51.55, 68.67, 124.29, 168.73, 172.33.

Ethyl (*Z*)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-(tributylstannyl)but-2-enoate (28b)

室温でアルゴン雰囲気下の 50 mL 2 ロナスフラスコにシアン化銅 (539 mg, 6.02 mmol) と脱水 THF (10 mL) を加えた後、-78 °C で 1.89 M *n*-ブチルリチウム *n*-へキサン溶液 (3.17 mL, 6.00 mmol) を加え、15 分攪拌した。さらに、-78 °C でビストリブチルスズ (3.03 mL, 6.00 mmol) を加え、0 °C で 1 時間攪拌した。その後、-78 °C で脱水 THF (10 mL) に溶解させた **27b** (646 mg, 2.00 mmol) を加え、30 分攪拌した。その後、-78 °C で 28 % アンモニア水 (5.0 mL) および飽和塩化アンモニウム水溶液 (5.0 mL) を加え、ジエチルエーテルで抽出した (3 × 20 mL)。続いて有機層を飽和食塩水 (50 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (へキサン/酢酸エチル=150/1) で精製し、黄色油状の目的物 **28b** (995 mg, 1.87 mmol, 93%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.07 (s, 6H, 2 CH_3), 0.86 (t, J = 7.2 Hz, 9H, 3 CH_3), 0.90–0.98 (m, 6H, 3 CH_2), 0.92 (s, 9H, 3 CH_3), 1.20–1.34 (m, 9H, 3 CH_2 and CH_3), 1.35–1.51 (m, 6H, 3 CH_2), 4.18 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 4.40–4.50 (m, 2H, CH_2), 6.56–6.82 (m, 1H, $\text{C}=\text{CH}$); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = -5.32 (2C), 10.89 (3C), 13.81 (3C), 14.43, 18.61, 26.05 (3C), 27.48 (3C), 29.29 (3C), 60.32, 68.70, 124.70, 168.40, 171.93; HR-MS (EI+, 100% acetone): m/z . calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{41}\text{O}_3\text{Si}^{120}\text{Sn}$ ($[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$) 477.1847; found, 477.1824.

Methyl (*Z*)-4-hydroxy-3-(tributylstannyl)but-2-enoate (**29a**)

室温で 50 mL ナスフラスコに **28a** (1.17 g, 2.25 mmol)を加え、脱水 DMSO (5.0 mL)に溶かした後、0 °Cで 18-クラウン-6-エーテル (1.83 g, 6.92 mmol)およびスプレードライフッ化カリウム (405 mg, 6.97 mmol)を加え、室温で 3 時間攪拌した。その後、0 °Cでリン酸バッファー (pH 7.4) (3.0 mL)を加え、ジエチルエーテルで抽出した (3×10 mL)。続いて有機層を飽和食塩水 (30 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=15/1)で精製し、黄色油状の目的物 **29a** (704 mg, 1.74 mmol, 77%)を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.87 (t, *J* = 7.2 Hz, 9H, 3CH₃), 0.91–1.07 (m, 6H, 3CH₂), 1.20–1.34 (m, 6H, 3CH₂), 1.34–1.52 (m, 6H, 3CH₂), 1.55 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, OH), 3.73 (s, 3H, CH₃), 4.43–4.52 (m, 2H, CH₂), 6.53–6.82 (m, 1H, C=CH).

Ethyl (*Z*)-4-hydroxy-3-(tributylstannyl)but-2-enoate (**29b**)

室温で 50 mL ナスフラスコに **28b** (687 mg, 1.29 mmol) を加え、脱水 DMSO (4.0 mL) に溶かした後、0 °C で 18-クラウン-6-エーテル (1.16 g, 4.39 mmol) およびスプレードライフッ化カリウム (242 mg, 4.17 mmol) を加え、室温で 3.5 時間攪拌した。その後、0 °C でリン酸バッファー (pH 7.4) (4.0 mL) を加え、ジエチルエーテルで抽出した (3 × 10 mL)。続いて有機層を飽和食塩水 (30 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=15/1) で精製し、黄色油状の目的物 **29b** (425 mg, 1.01 mmol, 79%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.86 (t, *J* = 7.2 Hz, 9H, 3CH₃), 0.90–1.07 (m, 6H, 3CH₂), 1.20–1.34 (m, 9H, 3CH₂ and CH₃), 1.34–1.54 (m, 6H, 3CH₂),

1.61 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, OH), 4.18 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, CH₂), 4.44–4.49 (m, 2H, CH₂), 6.53–6.80 (m, 1H, C=CH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 10.97 (3C), 13.79 (3C), 14.40, 27.48 (3C), 29.25 (3C), 60.47, 68.56, 124.77, 168.06, 172.25; HR-MS (EI+, 100% acetone): m/z : calcd for C₂₀H₁₇O₃Si¹²⁰Sn ([M-C₄H₉]⁺) 363.0982; found, 363.1002.

Methyl (*Z*)-4-oxo-3-(tributylstannyl)but-2-enoate (**30a**)

室温で 100 mL ナスフラスコに **29a** (623.3 mg, 1.50 mmol) を加え、ジクロロメタン (10 mL) に溶かした後、二酸化マンガン (3.91 g, 45 mmol) を加え、2 時間攪拌した。その後、セライト濾過で酸化剤を除去し、ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 5/1) で精製し、黄色油状の目的物 **30a** (512 mg, 1.27 mmol, 85%) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 0.88 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, 3CH₃), 0.99–1.17 (m, 6H, 3CH₂), 1.25–1.34 (m, 6H, 3CH₂), 1.36–1.68 (m, 6H, 3CH₂), 3.83 (s, 3H, CH₃), 7.90 (s, 1H, C=CH), 9.89 (s, 1H, CHO); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 11.75, 13.83, 27.37, 29.14, 52.49, 145.98, 166.31, 167.34, 168.84.

Methyl (2*Z*,4*E*,6*E*,10*E*)-7,11,15-trimethyl-3-(tributylstannyl)hexadeca-2,4,6,10,14-pentaenoate (31a)

室温でアルゴン雰囲気下、20 mL シュレンクに THF (1.0 mL)に溶解させた **20a** (12.3 mg, 34.2 μmol)を加え、-78 °Cで 1.0 M ヘキサメチルジシラザンカリウム THF 溶液 (34.0 μL , 6.8 mg, 34.2 μmol)を加えた。30 分間攪拌した後、-78 °Cで THF (500 μL)に溶解させた **30a** (13.8 mg, 34.2 μmol)を加え、その後、徐々に昇温させ室温に戻し、19 時間攪拌した。その後、0 °Cで飽和塩化アンモニウム水溶液 (50 μL)を加え、酢酸エチルで抽出した (3 \times 2.0 mL)。続いて、有機層を飽和食塩水 (6.0 mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル = 200/1)で精製し、黄色油状の目的物 **31a** (7.9 mg, 13.4 μmol , 39%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 9H, 3 CH_3), 0.93–1.10 (m, 6H, 3 CH_2), 1.24–1.33 (m, 6H, 3 CH_2), 1.42–1.51 (m, 6H, 3 CH_2), 1.585 (s, 3H, CH_3), 1.594 (s, 3H, CH_3), 1.67 (s, 3H, CH_3), 1.82 (s, 3H, CH_3), 1.93–2.26 (m, 8H, 4 CH_2), 3.72 (s, 3H, CH_3), 5.06–5.10 (m, 2H, 2 $\text{C}=\text{CH}$), 5.92 (d, J = 10.8 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.44 (d, J = 15.6 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.46 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.71 (dd,

$J = 15.6, 11.4$ Hz, 1H, C=CH); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 12.40 (3C), 13.81 (3C), 16.10, 17.26, 17.77, 25.80, 26.55, 26.79, 27.48 (3C), 29.21 (3C), 39.80, 40.29, 51.56, 123.72, 124.37, 125.42, 127.33, 131.43, 132.51, 135.64, 136.23, 143.13, 168.67, 168.78; HR-MS (EI+, 100% acetone): m/z : calcd for $\text{C}_{228}\text{H}_{47}\text{O}_3\text{Si}^{120}\text{Sn}$ ($[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$) 535.2598; found, 535.2603.

Ethyl (*Z*)-4-oxo-3-(tributylstannyl)but-2-enoate (**30b**)

室温で 20 mL ナスフラスコに **29b** (131 mg, 313 μmol)を加え、ヘキサン (3.0 mL)に溶かした後、二酸化マンガン (791 mg, 9.10 mmol)を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。その後、セライト濾過にて酸化剤を取り除き、ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/酢酸エチル=5/1)で精製し、黄色油状の目的物 **30b** (53.0 mg, 127 μmol , 41%)を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.87 (t, $J = 7.2$ Hz, 9H, 3 CH_3), 0.98–1.20 (m, 6H, 3 CH_2), 1.25–1.36 (m, 9H, CH_3 , 3 CH_2), 1.43–1.57 (m, 6H, 3 CH_2), 4.28 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2), 7.09 (s, 1H, C=CH), 9.89 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 11.24 (3C), 13.65 (3C), 14.14, 27.21 (3C), 28.98

(3C), 61.39, 146.38, 165.79, 166.79, 198.68.

Ethyl (2*Z*,4*E*,6*E*,10*E*)-7,11,15-trimethyl-3-(tributylstannyl)hexadeca-2,4,6,10,14-pentaenoate (31b)

室温でアルゴン雰囲気下の 10 mL シュレンクに **20b** (43.4 mg, 127 μ mol) を加え、脱水 THF (500 μ L) に溶かした後、-78 °C で 1.0 M ヘキサメチルジシラザンカリウム THF 溶液 (500 μ L, 127 μ mol) を加え、2 時間攪拌した。続いて脱水 THF (500 μ L) に溶かしたアルデヒド体 **30b** を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、0 °C でリン酸バッファー (pH 7.4) (1.0 mL) を加え、ジエチルエーテルで抽出した (3 \times 3.0 mL)。続いて有機層を飽和食塩水 (10 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサンのみ) で精製し、黄色油状の目的物 **31b** (13.3 mg, 22.0 μ mol, 17%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 9H, 3 CH_3), 0.91–1.12 (m, 6H, 3 CH_2), 1.20–1.35 (m, 9H, 3 CH_2 , CH_3), 1.35–1.57 (m, 6H, 3 CH_2), 1.59 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3), 1.67 (s, 3H, CH_3), 1.82 (s, 3H, CH_3), 1.90–2.20 (m, 8H, 4 CH_2), 4.17 (q, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2), 5.00–5.20 (m, 2H, 2 $\text{C}=\text{CH}$),

5.92 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, C=CH), 6.44 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, C=CH), 6.46 (s, 1H, C=CH), 6.71 (dd, $J = 15.6, 11.4$ Hz, 1H, C=CH); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm) = 12.43 (3C), 13.79 (3C), 14.46, 16.10, 17.24, 17.77, 25.78, 26.57, 26.79, 27.48 (3C), 29.21 (3C), 39.78, 40.29, 60.30, 123.74, 124.39, 125.44, 127.73, 131.43, 132.36, 135.62, 136.21, 142.94, 168.33, 168.42; HR-MS (EI+, 100% acetone): m/z . calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{O}_3\text{Si}^{120}\text{Sn}$ ($[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$) 549.2755; found, 549.2747.

(2*Z*,4*E*,6*E*,10*E*)-7,11,15-Trimethyl-3-(tributylstannyl)hexadeca-2,4,6,10,14-pentaenoic acid (32)

室温で 5 mL 試験管に **31a** と **31b** の混合物 (22.7 mg, 38.4 μmol) を加え、メタノール (200 μL) と 2-プロパノール (200 μL) に溶かした後、10 M 水酸化カリウム溶液 (メタノール/水=2/1) (100 μL , 1.00 mmol) を加え 100 $^\circ\text{C}$ で 30 分撹拌した。その後、0 $^\circ\text{C}$ でギ酸 (1.0 mL) を加えてジエチルエーテルで抽出した (3 \times 3.0 mL)。続いて有機層を飽和食塩水 (10 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=10/1) で精製し、黄色油状の目的物 **32** (15.6 mg, 27.0 μmol , 70%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 9H, 3 CH_3), 0.91–1.12 (m, 6H, 3 CH_2), 1.20–1.35 (m, 6H, 3 CH_2), 1.35–1.54 (m, 6H, 3 CH_2), 1.59 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 3H, CH_3), 1.67 (s, 3H, CH_3), 1.83 (s, 3H, CH_3), 1.90–2.20 (m, 8H, 4 CH_2), 5.02–5.20 (m, 2H, 2 $\text{C}=\text{CH}$), 5.93 (d, J = 11.6 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.47 (d, J = 16.0 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.50 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.71 (dd, J = 16.0, 11.6 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 8.82–9.78 (br s, 1H, COOH).

Benzyl (2*Z*,4*E*,6*E*,10*E*)-7,11,15-trimethyl-3-(tributylstannyl)hexadeca-2,4,6,10,14-pentaenoate (31c)

室温で 5 mL 試験管に **32** (15.6 mg, 27.0 μmol) を加え脱水 DMF (200 μL) に溶かした後、炭酸カリウム (5.60 mg, 40.5 μmol) と臭化ベンジル (3.50 μL , 29.7 μmol) を加え、50 $^\circ\text{C}$ で 1 時間攪拌した。その後、ジエチルエーテルで抽出した (3 \times 3.0 mL)。続いて有機層を飽和食塩水 (10 mL) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=100/1) で精製し、黄色油状の目的物 **31c** (13.5 mg, 20.2 μmol , 75%) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.86 (t, J = 7.6 Hz, 9H, 3 CH_3), 0.91–

1.12 (m, 6H, 3CH₂), 1.20–1.35 (m, 6H, 3CH₂), 1.35–1.54 (m, 6H, 3CH₂), 1.58 (s, 3H, CH₃), 1.59 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H, CH₃), 1.66 (s, 3H, CH₃), 1.81 (s, 3H, CH₃), 1.90–2.19 (m, 8H, 4CH₂), 5.02–5.14 (m, 2H, 2C=CH), 5.17 (s, 2H, CH₂), 5.91 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, C=CH), 6.44 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, C=CH), 6.52 (s, 1H, C=CH), 6.72 (dd, *J* = 15.2, 11.2 Hz, 1H, C=CH), 7.27–7.42 (m, 5H, C₆H₅); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 12.45 (3C), 13.83 (3C), 16.10, 17.28, 17.77, 22.80, 26.55, 26.79, 27.50 (3C), 29.22 (3C), 39.80, 40.31, 66.10, 123.72, 124.37, 125.44, 127.29, 128.18, 128.32 (2C), 128.59 (2C), 131.43, 132.63, 135.64, 136.16, 136.38, 143.25, 168.23, 169.37; HR-MS (EI+, 100% acetone): *m/z*: calcd for C₃₄H₅₁O₃Si¹²⁰Sn ([M-C₄H₉]⁺) 611.2911; found, 611.2915.

非放射性ヨウ化メチルを用いた高速 C-メチル化による (2*E*,4*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-tetramethyl-2,4,6,10,14-hexadecapentaenoic acid ethyl ester (18b)

アルゴン雰囲気下、1 mL シュレンクにトリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム (11.5 mg, 12.6 μmol)、トリ(*o*-トリル)ホスフィン (27.7 mg, 91.1 μmol)、臭化銅 (6.50 mg, 45.3 μmol)、フッ化セシウム (17.3 mg, 114 μmol)を加えたのち、-10 °Cで DMF (2.0 mL)に溶解した **31b** (13.3 mg, 22.0 μmol)を加え、続け

て、ヨウ化メチル (220 μL , 3.12 mg, 22.0 μmol , 0.1 M in DMF)を加え、60 $^{\circ}\text{C}$ で1時間加熱攪拌した。その後、水を加え反応を停止し、ジエチルエーテルで抽出した (3 \times 3 mL)。続いて有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ロータリーエバポレーターにより減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン/酢酸エチル=100/1)で精製し、黄色油状の目的物 **18b** (5.80 mg, 17.5 μmol , 80%)を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3), 1.58 (s, 3H, CH_3), 1.59 (d, J = 0.8 Hz, 3H, CH_3), 1.66 (d, J = 0.8 Hz, 3H, CH_3), 1.84 (d, J = 0.8 Hz, 3H, CH_3), 1.90–2.20 (m, 8H, 4 CH_2), 2.32 (d, J = 0.8 Hz, 3H, CH_3), 4.15 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 5.00–5.17 (m, 2H, 2 $\text{C}=\text{CH}$), 5.73 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 5.95 (d, J = 11.2 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.16 (d, J = 15.6 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 6.83 (dd, J = 15.6, 11.2 Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$).

[^{13}C]Benzyl (2*E*,4*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,10,14-pentaenoate ([^{13}C]18c)

アルゴン雰囲気下、反応容器に、トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム (1.0 mg, 1.1 μmol)、トリ(*o*-トリル)ホスフィン (2.4 mg, 8.0 μmol)、臭化

銅 (0.6 mg, 4 μ mol)、フッ化セシウム (1.5 mg, 10 μ mol)を加え、脱水 DMF (400 μ L)に溶解した **31c** (1.1 mg, 1.6 μ mol)を加え、-10 °Cに冷やした。別容器で水素化アルミニウムリチウムを用いて還元した ^{11}C CO₂ から調製した ^{11}C CH₃I を反応容器に移し、冷却をやめ 65 °Cに加熱した。2 分間 65 °Cに保ち、窒素ガスによりバブリングした後、10 秒間冷やした。その後、アセトニトリル (600 μ L)で希釈し、ファインフィルター (F162, Forte Grow Medical co., ltd.)と石英ガラスウール (Tosho co., ltd.)を用いて濾過した。その後、逆相 HPLC にて精製し、目的物を含む画分の有機層を減圧濃縮後、0.25%ポリソルベート生理食塩水 (3.0 mL)に溶解し、総合成時間 31 分、放射活性総量 2.87 GBq、比放射エネルギー 144 GBq/ μ mol、RCY57%、放射化学純度>99%で ^{11}C **18c**を得た。

分取 HPLC 条件

カラム: CAPCELL PAK C18 UG 120 (10 I.D. \times 250 mm, 粒子径 5 μ m) (大阪ソーダ社製)

移動相: アセトニトリルのみ

流量: 5.0 mL/分

検出: UV 280 nm、RI

18c : $R_t = 7.37\text{--}8.31$ 分

HPLC 分析条件

カラム: CAPCELL PAK C18 (4.6 I.D.×250, 粒子径 5 μm) (大阪ソーダ社製)

移動相: アセトニトリルのみ

流量: 1.0 mL/分

検出: UV 280 nm、 RI

18c : $R_t = 8.0$ 分

[¹¹C]Methyl (2*E*,4*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,10,14-pentaenoate ([¹¹C]18a)

[¹¹C]18c と同様の条件で [¹¹C]18a の合成を行い、放射活性総量 4.33 GBq、比放射エネルギー 157 GBq/μmol、RCY82% で目的物を得た。

[¹¹C]Ethyl (2*E*,4*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,10,14-pentaenoate ([¹¹C]18b)

[¹¹C]18c と同様の条件で [¹¹C]18b の合成を行い、放射活性総量 3.15 GBq、比放射エネルギー 134 GBq/μmol、RCY66% で目的物を得た。

[¹¹C](2*E*,4*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-2,4,6,10,14-pentaenoic

acid ($[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$)

アルゴン雰囲気下、反応容器に、トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム (1.0 mg, 1.1 μmol)、トリ(*o*-トリル)ホスフィン (2.4 mg, 8.0 μmol)、臭化銅 (0.6 mg, 4 μmol)、フッ化セシウム (1.5 mg, 10 μmol)を加え、脱水 DMF (400 μL)に溶解した **31a** (0.9 mg, 1.5 μmol)を加え、 $-10\text{ }^\circ\text{C}$ に冷やした。別容器で水素化アルミニウムリチウムを用いて還元した $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ から調整した $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ を反応容器に移し、冷却をやめ $65\text{ }^\circ\text{C}$ に加熱した。2 分間 $65\text{ }^\circ\text{C}$ に保ち、窒素ガスにより 2 分間バブリングした後、10 秒間冷やした。その後、8 M 水酸化カリウム水溶液 (500 μL)を加え窒素ガスにより 6 分間 $100\text{ }^\circ\text{C}$ でバブリングした。10 秒間冷やした後、アスコルビン酸ナトリウム (2.2 mg, 11 μmol)を含むアセトニトリル/アセトニトリル/水 (60 : 36 : 4 v/v/v、1.0 mL)で希釈し、ファインフィルター (F162, Forte Grow Medical co., ltd.)と石英ガラスウール (Tosho co., ltd.)を用いて濾過した。その後、逆相 HPLC にて精製し、目的物を含む画分の有機層を減圧濃縮後、0.25%ポリソルベート生理食塩水 (3.0 mL)に溶解し、総合成時間 40 分、放射活性総量 0.94 GBq、比放射能量 186 GBq/ μmol 、RCY25%、放射化学純度 $>99\%$ で $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ を得た。

分取 HPLC 条件

カラム: CAPCELL PAK C18 UG 120 (10 I.D.×250 mm, 粒子径 5 μm) (大阪ソーダ社製)

移動相: アセトニトリル/0.2% ギ酸水溶液 = 90:10

流量: 5.0 mL/分

検出: UV 280 nm、 RI

9 : $R_t = 8.45\text{--}9.32$ 分

HPLC 分析条件

カラム: CAPCELL PAK C18 (4.6 I.D.×250 mm, 粒子径 5 μm) (大阪ソーダ社製)

移動相: アセトニトリル/0.2% ギ酸水溶液 = 90:10

流量: 1.0 mL/分

検出: UV 280 nm、 RI

9 : $R_t = 7.7$ 分

[¹¹C]ペレチノインベンジルエステル ([¹¹C]18c)のラット脳 PET イメージング

実験

Wistar ラット(雄、8週齢、280 g)の尾静脈に、インフルラン麻酔下 (2%)、

[¹¹C]18c 製剤 (18.5 MBq、142 GBq/μmol)を投与したのち、投与直後から PET スキャナ (FX3200、TriFoil Imaging 製) で 60 分間頭部スキャンした。撮像中は、白熱灯とヒーターを用いて体温を 37 °C 付近に保った。すべての PET 画像は、3 次元逐次近似画像構成法 (4 subsets と 20 iterations、ボクセルサイズ: 0.6 × 0.5 × 0.5 mm、fwhm 0.92 mm、ビューの中心) で再構成した。

[¹¹C]ペレチノインベンジルエステル ([¹¹C]18c)のサル脳 PET イメージング実験

カニクイザル (雄、4 歳、3.3 kg) をケタミン/キシラジン導入後、イソフルラン麻酔下 (1-1.5%)、[¹¹C]18c (349 MBq、57.2 GBq/μmol)を経静脈投与したのち、PET スキャナで (microPET Focus220、シーメンス社製) を用いて 90 分間頭部スキャンした。画像はフィルタ補正逆投影法 (128 × 128 × 95 matrix、ボクセルサイズ 0.38 × 0.38 × 0.80 mm)を用いて再構成した。

[¹¹C]ペレチノイン([¹¹C]9)のラット脳 PET イメージング実験

24 時間絶食した SD ラット (雄、8 週齢、280 g)の尾静脈に、インフルラン麻

酔下 (2%)、 $[^{11}\text{C}]\mathbf{9c}$ 製剤 (29 MBq、22 GBq/ μmol) を経静脈投与したのち、PET スキャナで 60 分間頭部スキャンした。撮像および再構成条件は 18c のラット脳 PET イメージング実験と同様。

$[^{11}\text{C}]\text{ペレチノイン}([^{11}\text{C}]\mathbf{9})$ のサル脳 PET イメージング実験

カニクイザル (雄、4 歳、3.3 kg) をケタミン/キシラジン導入後、イソフルラン麻酔下 (1–1.5%)、 $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ (373 MBq、28.2 GBq/ μmol) を経静脈投与したのち、PET スキャナでカニクイザルを 90 分間頭部スキャンした。撮像および再構成条件は 18c のサル脳 PET イメージング実験と同様。

$[^{11}\text{C}]\text{ペレチノイン}([^{11}\text{C}]\mathbf{9})$ のラット血漿中および脳内放射性代謝物分析

24 時間絶食した SD ラット (306 g) に $[^{11}\text{C}]\mathbf{9}$ (35.8 MBq) を尾静脈内投与し、スキャン中に大腿動脈に挿入されたカテーテルから、投与後 3、10、30、60、90 分に採血した。採取した動脈血のサンプルを 12000 rpm で 3 分間、4 ° C で遠心分離して血漿を分離し、上清 (0.10 mL) をアセトニトリル (0.10 mL) に再懸濁し、混合物を氷上に 3 分間置き、12000 rpm で 3 分間、4 ° C で遠心分離

して除タンパクした。また、投与後、3、90 分に脳を摘出した。そして、半脳を RIPA buffer (wako) に溶解し超音波で破碎し、氷上で3分間置き、遠心分離 (12000 rpm, 3 分間)した。その後、上清にアセトリルを加えて転倒攪拌し、氷上で3分間置き、遠心分離 (12000 rpm, 3 分間)し、その上清を脳ホモジネートとした。血漿あるいは脳ホモジネートをラジオ HPLC (Prominence LC-20 システム、島津製作所製および FC-4100、Eckert & Ziegler Radiopharma 製) を使用して、以下の条件下で分析した。

HPLC 分析条件

カラム: Inertsil ODS-4 (10 I.D.×150 mm, 粒子径 5 μm) (GL Science 社製)

移動相: アセトリル/100 mM 酢酸緩衝液 = 95:5

流量: 3.0 mL/分

検出: UV 300 nm、RI

幹細胞から神経細胞への分化誘導を示す実験

ヒト多能性胎生期癌由来である NTERA-2cl.D1[NT2/D1]細胞 (ATCC CRL-1973)を、維持培養培地 (高グルコース D-MEM (シグマ・アルドリッチ、D6429)、10%FBS、100 U/mL ペニシリン/ストレプトマイシン)中、37 °C、

5%CO₂条件下、3-4日間、10 cm プラスチックディッシュ上でコンフルエントになるまで接着培養した。Accutase (Innovative Cell Technologies、#AT104)により NT2 細胞を剥離し、継代し、50 日間にわたり維持培養した。培地は、週に 3 回交換した。維持培養された NT2 細胞を、 1.5×10^6 – 2.5×10^6 /ディッシュの濃度で低付着微生物用ペトリディッシュ (STAR SDish9015、理科研)に分散し、37 °C、5%CO₂条件下、振動機上で (100 rpm)浮遊培養し、1 日後に 1 μM 又は 10 μM の ATRA を添加して分化を誘導し、スフェロイドを形成させた。14 日後、スフェロイドを回収し、5 μg/mL のポリ-D-リジン (PDL)(シグマ・アルドリッチ)/ラミニン(LAM)(iMatrix-511、ニッピ)によりコートされた 10 cm ディッシュに播き、37 °C、5 %CO₂条件下で接着培養した。翌日から、3 種類の細胞分裂阻害剤 (10 μMのウリジン、10 μMのフロクスウリジン、1 μM の AraC)を添加して培養し、3 日後に細胞を剥離し、 0.1×10^6 /ディッシュの濃度で PDL/LAM コートされた 35 mm ディッシュに播きなおし、3 種類の細胞分裂阻害剤の存在下で 4 日間培養することにより、神経細胞への分化誘導を行った。

分化誘導後の細胞を、0.2%NeuroCult (商標)SM1 Neuronal Supplement 含有 BrainPhys (商標)Neuronal Medium (STEMCELL Technologies)中、37 °C、5% CO₂条件下、2-3 ヶ月維持培養した。培地は、週に 3 回、半量交換した。こ

れにより、神経細胞マーカーMAP2 陽性の細胞が得られ、これを NT-2N細胞とした。

1.0 μM 又は 10 μM のペレチノイン添加による神経細胞分化誘導についても同様の操作で行った。

NMDA 型グルタミン酸受容体を介したカルシウム流入の測定実験

蛍光カルシウム指示薬 Fluo-8 AM (AAT Bioquest)を、0.1 μM グリシン含有 Mg フリー-HHBS (Hepes-buffered Hanks'balanced salt solution(1.26 mM の CaCl_2 、5.33 mM の KCl 、0.44 mM の KH_2PO_4 、4.17 mM の NaHCO_3 、137.93 mM の NaCl 、0.34 mM の Na_2HPO_4 、5.56 mM の D-グルコース、20 mM の HEPES、pH7.4))に溶解した (それぞれ 4 μM 、2 μM)。この溶液 (1 mL)を、37 $^\circ\text{C}$ 、5 % CO_2 条件下、NT-2N細胞にロードした (それぞれ 2 時間、30 分間)、fluo8 を細胞内にロードした。その後、細胞外液を 0.1 μM グリシン含有 Mg フリー-HHBS に置換し、生細胞タイムラプスイメージング装置 (BioStation IM-Q、ニコン) のインキュベーター内 (37 $^\circ\text{C}$ 、5 % CO_2)に 1 時間以上放置したものを以下の測定に用いた。装置内に配置した NT-2N細胞について、解析を行う 5-10 視野を手動で設定し、各視野につき、励起波長 480 nm/蛍光波長 520 nm で、

2 秒ごとに連続して 55 分間、蛍光強度を記録した。また、記録開始から一定時間経過後に、上記で調製した 100 μ M NMDA 溶液 (0.1 μ M グリシン含有 Mg フリー-HHBS) を 100 μ L 投与した。

誘導後培養開始後 2-3 ヶ月の標本の一部を 4 %パラホルムアルデヒド PBS (phosphate-buffered saline : リン酸緩衝生理食塩水) 溶液にて固定した (室温 30 分)。固定後、注意深く PBS で洗浄し、1 %Triton-X100PBS 溶液にて 10 分間処理した。処理後、十分に PBS にて洗浄した後、1 %BSA・3 %正常ヤギ血清 PBS 溶液にてブロッキングし、anti-MAP2 抗体(1 : 1000、Millipore#AB5622) および anti-Nestine 抗体 (1 : 1000。ab22035) 溶液に浸し、さらに洗浄後、蛍光ラベルされた 2 次抗体 (Jackson immune laboratory, 115-545-146 および 111-585-144、それぞれ 1 : 5000) によって染色した。

参考文献

1. M. Yamanaka, T. Ishikawa, A. Griep, D. Axt, M. P. Kummer, M. T. Heneka, *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 17321–17331.
2. M. Lenz, P. Kruse, A. Eichler, J. Straehle, J. Beck, T. Deller, A. Vlachos, *eLife* **2021**, *10*, 1–20.
3. M. Suzuki, M. Takashima-Hirano, H. Ishii, C. Watanabe, K. Sumi, H. Koyama, H. Doi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3622–3525.
4. B. H. Rotstein, J. M. Hooker, J. Woo, T. L. Collier, T. J. Brady, S. H. Liang, N. Vasdev, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 668–672.
5. (a) Y. Muto, H. Moriwaki, *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 157–160; (b) H. Araki, Y. Shidoji, Y. Yamada, H. Moriwaki, Y. Muto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *209*, 66–72.
6. T. Hosoya, K. Sumi, H. Doi, M. Wakao, M. Suzuki, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 410–415.
7. B. Domínguez, R. Alvarez, A. R. de Lera, *Org. Prep. Proced. Int.* **2003**, *35*, 239–306.
8. H. Hukazawa, H. Kagechika, K. Shudo, *Jpn. J. Clin. Immunol.* **2006**, *29*, 114–126.

9. K. Shuto, H. Fukasawa, M. Nakagomi, N. Yamagata, *Curr. Alzheimer Res.* **2009**, *6*, 302–311.
10. B. C. Das, P. Thapa, R. Karki, S. Das, S. Mahapatra, T.-C. Liu, I. Torregroza, D. P. Wallace, S. Kambhampati, P. V. Veldhuizen, A. Verma, S. K. Ray, T. Evans, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 673–683.
11. J. H. Barnard, J. C. Collings, A. Whiting, S. A. Przyborski, T. B. Marder, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11430–11442.
12. R. K. T. Kam, T. Deng, Y. Chen, H. Zhao, *Cell Biosci.* **2012**, *2*, 1–14.
13. D. Dong, S. E. Ruuska, D. J. Levinthal, N. Noy, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23695–23698.
14. Y. Hashimoto, H. Kagechika, K. Shudo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *166*, 1300–1307.
15. T. Tobita, A. Takeshita, K. Kitamura, K. Ohnishi, M. Yanagi, A. Hiraoka, T. Karasuno, M. Takeuchi, S. Miyawaki, R. Ueda, T. Naoe, R. Ohno, *Blood* **1997**, *90*, 967–973.
16. B. H. Rotstein, M. S. Placzek, H. S. Krishnan, A. Pekosak, T. L. Collier, C. Wang, S. H. Liang, E. S. Burstein, J. M. Hooker, N. Vasdev, *Mol. Imaging* **2016**, *15*, 1–5.

17. M. Shimizu, K. Takai, H. Moriwaki, *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 369–374.
18. M. Shimizu, Y. Shirakami, K. Imai, K. Takai, H. Moriwaki, *J. Carcinog.* **2012**, *11*, 1–8.
19. R. Matsushima-Nishikawa, M. Okuno, Y. Takano, S. Kojima, S. L. Friedman, H. Moriwaki, *J. Carcinog.* **2003**, *24*, 1353–1359.
20. (a) Y. Muto, H. Moriwaki, M. Ninomiya, S. Adachi, A. Saito, K. Takasaki, T. Tanaka, K. Tsurumi, M. Okuno, E. Tomita, T. Nakamura, T. Kojima, *N. Engl. J. Med.* **1996**, *334*, 1561–1567; (b) Y. Moto, H. Moriwaki, A. Saito, *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 1046–1047.
21. M. Chakrabarti, A. J. McDonald, J. W. Reed, M. A. Moss, B. C. Das, S. K. Ray, *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, *50*, 335–352.
22. P. M. Matthews, E. A. Rabiner, J. Passchier, R. N. Gunn, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *73*, 175–186.
23. T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest, A. Villalobos, *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, *7*, 767–775.
24. M. Takashima-Hirano, H. Ishii, M. Suzuki, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 804–807.
25. (a) O. Shibahara, M. Watanabe, S. Yamada, M. Akehi, T. Sasaki, A. Akahoshi,

- T. Hanada, S. Nakatani, H. Nishioka, Y. Takeuchi, H. Kakuta, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7139–7145; (b) O. Shibahara, M. Watanabe, Y. Takashima, S. Yamada, M. Akehi, T. Sasaki, A. Akahoshi, T. Hanada, H. Hirano, S. Nakanishi, H. Nishioka, S. Nakatani, H. Nishioka, Y. Takeuchi, H. Kakuta, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 4780–4781.
26. Y. Takamura, O. Shibahara, M. Watanabe, M. Fujihara, S. Yamada, M. Akehi, T. Sasaki, H. Hirano, H. Kakuta, *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 3128–3134.
27. T. Kikuchi, T. Okamura, M. Okada, M. Ogawa, C. Suzuki, H. Wakizawa, J. Yui, T. Fukumura, A. D. Gee, M.-R. Zhang, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 5847–5856.
28. S. Ma, X. Lu, *Org. Synth.* **1995**, *72*, 112–115.
29. E. Inokuchi, T. Narumi, A. Niida, K. Koyabashi, K. Tomita, S. Oishi, H. Ohno, N. Fujii, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3942–3945.
30. L. Huo, D. Cui, X. Yang, Z. Gao, K. Trier, J. Zeng, *Mol. Vis.* **2013**, *19*, 1795–1803.
31. R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1980**, *19*, 2396–2404.
32. L. Di, *Curr. Drug Metab.* **2019**, *20*, 91–102.
33. S. Phuphanich, C. Scott, A. J. Fischbach, C. Langer, W. K. A. Yung, *J. Neuro-*

Oncol. **1997**, *34*, 193–200.

34. A. di Masi, L. Leboffe, E. D. Marinis, F. Pagano, L. Cicconi, C. Rochette-Egly,

F. Lo-Coco, P. Ascezi, C. Nervi, *Mol. Asp. Med.* **2015**, *41*, 1–115.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心な御指導、御助言を賜るとともに、学問の奥深さとその厳しさを学ばせていただきました国立長寿医療研究センター認知症先進医療開発センター・特任研究員である鈴木正昭博士（岐阜大学名誉教授および独立行政法人理化学研究所名誉研究員・現岐阜大学工学部）ならびに岐阜大学工学部化学・生命工学科生命化学コース古山浩子准教授に深く感謝いたします。

また、PET プローブ合成およびラットイメージング実験および生理機能評価において、御協力いただきました国立長寿医療研究センター認知症先端医療開発センター・伊藤健吾博士（現理事長特任補佐）、部長・加藤隆司博士、副部长・木村泰之博士、研究員・小縣綾博士（現岐阜医療科学大学薬学部薬学科助教）、研究技術員・池沼宏博士、阿部純一郎氏、木村哲也博士（現東京都立健康長寿医療センター研究所 認知未来社会創造センター専門副部长）、木村展之博士（現岡山理科大学獣医学部獣医保健看護学科教授）に深く御礼申し上げます。

また、サル PET イメージングにおいて御協力頂きました量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所・石井英樹博士、張明栄博士、河村和紀博士、南本敬史博士、永井裕史博士に感謝申し上げます。

また、ペレチノインの様々な神経障害に対する薬理的活性評価に関わり、熊本大学大学院生命科学研究部薬物活性学分野・香月博志教授に感謝申し上げます。

また、ペレチノイン由来高極性化合物の構造解析にあたり御助言いただきました岐阜薬科大学機能分子学大講座・江坂幸宏教授、高須蒼生助教に感謝申し上げます。

また、ラット代謝物解析にあたり、動物実験の御指導いただきました本学応用生物科学部共同獣医学科・志水泰武教授、椎名貴彦准教授に感謝申し上げます。

また、生体試料の取り扱いについて御指導いただきました本学工学部化学・生命工学科生命化学コース・竹森洋教授に感謝申し上げます。

また、本研究の推進にあたり御助言頂きました研究対象化合物であるペレチノインの開発者の一人である本学大学院医学系研究科消化器病態学・血液病態学第一内科・清水雅仁教授に感謝申し上げます。

また、本研究の初期の段階においてペレチノインおよび標識前駆体合成において、また技術サポートをくださいました中村成政氏、山下敦子氏に感謝いたします。

また、本研究室で研究を行うにあたって、適切な御指導を賜りました岐阜大

学工学部化学・生命工学科生命化学コース・古田享史教授に深く御礼申し上げます。

また、事務的な支援をいただきました大学院連合創薬医療情報研究科事務室の皆様には心より感謝いたします。

また、本研究の一部は東海国立大学機構融合フロンティア次世代リサーチャー事業のご支援の下行っており、心より感謝いたします。

論文をご精読いただきました、岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科創薬科学専攻・池田将教授、創薬科学専攻・横川隆志教授、医療情報学専攻・田中宏幸教授に深く感謝いたします。

研究を行うにあたって、本研究室の先輩方や共に研究に没頭した同期の皆様そして関係者の皆様のおかげで充実した研究生活を送れましたことを心より感謝いたします。

最後に、精神的、経済的に私の支えとなってくださった両親へ深く感謝いたします。

令和5年 鈴木恵一