

Furumoto S, Okamura N, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y	Recent advances in the development of amyloid imaging agents	Current Topics in Medicinal Chemistry	7	1773-1789	2007
Okamura N, Furumoto S, Funaki Y, Suemoto T, Kato M, Ishikawa Y, Ito S, Akatsu H, Yamamoto T, Sawada S, Arai H, Kudo Y, Yanai K	Binding and safety profile of novel benzoxazole derivative for in vivo imaging of amyloid deposits in Alzheimer's disease	Geriatr Gerotol Int	7	393-400	2007
Rainov NG, Tsuboi Y, Krolak-Salmon P, Vighetto A, Doh-Ura K	Experimental treatments for human transmissible spongiform encephalopathies: is there a role for pentosan polysulfate	Expert Opin Biol Ther	7	713-726	2007
Doh-ura K, Tamura K, Karube Y, Naito M, Tsuruo T, Kataoka Y	Chelating compound, chrysoidine, is more effective in both antiprion activity and brain endothelial permeability than quinacrine	Cell Mol Neurobiol	27	303-316	2007
Doh-Ura K, Kuge T, Uomoto M, Nishizawa K, Kawasaki Y, Iha M	Prophylactic effect of dietary seaweed Fucoidan against enteral prion infection	Antimicrob Agents Chemother	51	2274-2277	2007
Kawasaki Y, Kawagoe K, Chen CJ, Teruya K, Sakasegawa Y, Doh-ura K	Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner	J Virol	81	12889-12889	2007
Shiga Y, Satoh K, Kitamoto T, Kanno S, Nakashima I, Sato S, Fujihara K, Takata H, Nobukuni K, Kuroda S, Takano H, Umeda Y, Konno H, Nagasato K, Satoh A, Matsuda Y, Hidaka M, Takahashi H, Sano Y, Kim K, Konishi T, Doh-ura K, Sato T, Sasaki K, Nakamura Y, Yamada M, Mizusawa H, Itoyama Y	Two different clinical phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease with a M232R substitution	J Neurol	254	1509-1517	2007
Hao HP, Doh-ura K, Nakanishi H	Impairment of microglial responses to facial nerve axotomy in cathepsin S-deficient mice	J Neurosci Res	85	2196-2206	2007

工藤幸司、古本祥三、岡村信行	アミロイドイメージング「アミロイド画像化用プローブ」	日本臨床	66 Suppl 1	300-306	2008
岡村信行、谷内一彦、古川勝敏、荒井啓行、工藤幸司	アミロイドイメージング「PET」	日本臨床	66 Suppl 1	288-292	2008
荒井啓行、古川勝敏、工藤幸司	アルツハイマー病バイオマーカー開発の現状と Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative	ヒューマンサイエンス	19	12-17	2008
岡村信行、古本祥三、工藤幸司、谷内一彦	脳の分子イメージング「アルツハイマー病」	日本臨床	65	320-326	2007
荒井啓行、工藤幸司	病理像を画像化する分子神経イメージング法による Alzheimer 病の早期診断 -日本での BF-227 の開発と臨床応用	医学のあゆみ	220	404-408	2007
逆瀬川祐二、堂浦克美	プリオン病の分子標的	Brain and Nerve	59	405-414	2007
堂浦克美	プリオン病の治療アプローチ	神経治療学	24	647-650	2007
逆瀬川祐治、堂浦克美	プリオン病の診断支援・治療への試み	日本松臨床	65	1417-1422	2007

研究成果の刊行物・別刷

Brief Communication

Quinoline and Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes for *In Vivo* Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease

Nobuyuki Okamura,^{1,2} Takahiro Suemoto,¹ Shozo Furumoto,³ Masako Suzuki,¹ Hiroshi Shimadzu,¹ Hiroyasu Akatsu,⁴ Takayuki Yamamoto,⁴ Hironori Fujiwara,⁵ Miyako Nemoto,⁶ Masahiro Maruyama,⁶ Hiroyuki Arai,⁵ Kazuhiko Yanai,² Tohru Sawada,¹ and Yukitsuka Kudo^{1,3}

¹BF Research Institute, Osaka 541-0045, Japan, ²Department of Pharmacology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai 980-8575, Japan, ³Tohoku University Biomedical Engineering Research Organization, Sendai 980-8575, Japan, ⁴Choju Medical Institute, Fukushima Hospital, Toyohashi 441-8124, Japan, and Departments of ⁵Geriatric and Complementary Medicine and ⁶Geriatric and Respiratory Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai 980-8574, Japan

Neurofibrillary tangles (NFTs), neuropil threads, and neuritic elements of senile plaques predominantly comprise hyperphosphorylated tau protein and represent pathological characteristics of Alzheimer's disease (AD). These lesions occur before the presentation of clinical symptoms and correlate with the severity of dementia. *In vivo* detection of these lesions would thus prove useful for preclinical diagnosis of AD and for tracking disease progression. The present study introduces three novel compounds, 4-[2-(2-benzimidazolyl)ethenyl]-*N,N*-diethylbenzenamine (BF-126), 2-[(4-methylamino)phenyl]quinoline (BF-158), and 2-(4-aminophenyl)quinoline (BF-170), as candidate probes for *in vivo* imaging of tau pathology in the AD brain. When solutions of these compounds are injected intravenously into normal mice, these agents exhibit excellent brain uptake and rapid clearance from normal brain tissue. These compounds display relatively lower binding affinity to β -amyloid fibrils and higher binding affinity to tau fibrils, compared with previously reported probe BF-168. In neuropathological examination using AD brain sections, BF-126, BF-158, and BF-170 clearly visualize NFTs, neuropil threads, and paired helical filament-type neuritis. Autoradiography using ¹¹C-labeled BF-158 further demonstrated labeling of NFTs in AD brain sections. These findings suggest the potential usefulness of quinoline and benzimidazole derivatives for *in vivo* imaging of tau pathology in AD.

Key words: imaging; neuropathology; $A\beta$ peptide; tau; neurofibrillary tangles; paired helical filaments

Introduction

The deposition of senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles (NFTs) represents a pathological hallmark of Alzheimer's disease (AD). Definitive diagnosis of AD relies on the postmortem assessment of these pathological changes. SPs are extracellular deposits containing β -amyloid ($A\beta$) peptide cleaved from a longer amyloid precursor protein to produce a 40–43 aa peptide. NFTs comprise bundles of paired helical filaments (PHFs) that result from the abnormal aggregation of tau protein (Lee et al., 1991). PHFs accumulate in the neuronal cytoplasm and form NFT with age. Initial lesions of NFTs occur in the transentorhinal cortex, followed by involvement of the entorhinal cortex and hippocampus, progressing to the neocortex (Braak and Braak, 1991). Severity of neurofibrillary pathology correlates with severity of cognitive impairment (Dickson, 1997). However, these pathological changes can be observed in elderly individuals with normal cognition. The pathological process of AD must therefore begin be-

fore the presentation of the clinical symptoms of dementia (Price and Morris, 1999). Recent drug development has been aimed at preventing the accumulation of SPs and NFTs in presymptomatic AD patients. The ability to measure levels of these lesions in the living human brain is thus desirable for presymptomatic diagnosis of AD.

Many attempts have been made to visualize AD-specific pathological changes in the living brain (Nordberg, 2004). Currently, the most practical methods for this purpose are to measure the distribution of intravenously administered radiotracers that selectively bind to SPs or NFTs using positron emission tomography (PET) or single photon emission computed tomography. Such radiotracers require sufficient permeability to the blood–brain barrier (BBB). Several researchers have focused on developing lipophilic radiotracers for imaging AD-specific pathology (Shoghi-Jadid et al., 2002; Klunk et al., 2004; Kung et al., 2004; Mathis et al., 2004; Okamura et al., 2004a). To obtain a better understanding of the pathophysiology of AD, individual evaluation of the distributions of $A\beta$ pathology and tau pathology is desirable. However, no surrogate markers exist that allow evaluation of the severity of neurofibrillary pathology in AD brains, because of the difficulty in developing an NFT-specific imaging probe (Small et al., 2002).

We screened >2000 small molecules to develop novel agents

Received May 2, 2005; revised Sept. 26, 2005; accepted Sept. 27, 2005.

This study was supported by the Organization for Pharmaceutical Safety and Research of Japan, the New Energy and Industrial Technology Development Organization, and the Novartis Foundation for Gerontological Research.

Correspondence should be addressed to Yukitsuka Kudo, Tohoku University Biomedical Engineering Research Organization, 2-1, Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan. E-mail: kudoyk@tubero.tohoku.ac.jp.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.1738-05.2005

Copyright © 2005 Society for Neuroscience 0270-6474/05/2510857-06\$15.00/0

for use in PET with a high affinity for SPs and NFTs. This process has identified novel quinoline and benzimidazole derivatives with a preference to bind NFTs rather than SPs and readily cross the BBB. The present study evaluated whether these compounds may offer a good indicator of tau pathology in AD patients.

Materials and Methods

Preparation of BF compounds. Three novel compounds, 4-[2-(2-benzimidazolyl)ethenyl]-*N,N*-diethylbenzamine *p*-toluenesulfonate (BF-126), 2-[(4-methylamino)phenyl]quinoline (BF-158), and 2-(4-aminophenyl)quinoline (BF-170), were originally designed by us and custom-synthesized by Tanabe R&D Service (Osaka, Japan) (see Fig. 1A). [¹¹C]BF-158 was synthesized from *N*-Boc-protected BF-170 and [¹¹C]methyl triflate (see Fig. 1B). Briefly, to a solution of *N*-Boc-protected BF-170 and NaH in dry acetone was bubbled thorough [¹¹C]methyl triflate at room temperature, followed by heating at 80°C for 1 min. The reaction was then acidified with a dioxane solution of hydrochloric acids and heated for an additional 5 min. After neutralizing the reaction with sodium phosphate buffer, the crude mixture was purified with semipreparative reverse-phase HPLC to give [¹¹C]BF-158 with a radiochemical purity of >95% and a specific activity of 11–15 GBq/μmol at the end of synthesis. Isolated [¹¹C]BF-158 was solubilized into 40% ethanol solution for *in vitro* autoradiography of AD brain sections and saline with polysorbate 80 for *in vivo* brain-uptake study using normal mice.

Biodistribution of BF compounds in normal mice. Brain uptake after intravenous injection of BF-126 and BF-170 in mice was analyzed using HPLC with a fluorescence detector, as described previously (Okamura et al., 2004b). Briefly, each compound (1 mg/kg), dissolved in diluted HCl, was administered into the tail vein of male Institute of Cancer Research (ICR) mice (7 weeks of age; body weight, 30–40 g; *n* = 3). At 2 and 30 min after the injection of compounds, the brain was removed. Brain homogenates were centrifuged at 14,000 rpm for 10 min, and the supernatant was used for extraction. The mobile phase was 20 mM phosphate buffer, pH 6.5, and acetonitrile at a ratio of 2:3 for BF-126 and 1:1 for BF-170, at a flow rate of 1 ml/min. An FS-8020 fluorescence detector (Tosoh, Tokyo, Japan) was operated at excitation/emission wavelengths of 420/525 nm for BF-126 and 280/500 nm for BF-170. Brain uptake of BF-158 was measured using [¹¹C]-labeled compound. [¹¹C]BF-158 (2.6–3.3 MBq) was administered into the tail vein of ICR mice (*n* = 12; male; average weight, 24 g). The mice were then killed by decapitation at 2, 10, 30, and 60 min after injection. The brains were removed and weighed, and the radioactivity was counted with an automatic γ -counter (Wizard 1480; PerkinElmer Wallac, Turku, Finland). The percentage injected dose per gram (%ID/g) was calculated by comparison of tissue count to tissue weight. Each %ID/g value is an average \pm SEM of three separate experiments.

In vitro binding assays. The dissociation constant (K_d) and maximum specific binding of BF-180 were determined as described previously (Okamura et al., 2004a). For inhibition studies, binding studies were performed using aggregates of synthetic A β 1–42 (Peptide Institute, Osaka, Japan). A mixture containing 50 μl of BF-126, BF-158, and BF-170, 50 μl of 0.05 nM [¹²⁵I]BF-180, 100 μl of 100 nM A β 1–42, and 800 μl of 8% ethanol was incubated at room temperature for 4 h. The mixture was then filtered, and filters containing bound [¹²⁵I] ligand were counted using the γ -counter. Values for half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) were determined from displacement curves of three independent experiments using GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA), and those for the inhibition constant (K_i) were determined using the Cheng–Prusoff equation.

In addition, fluorescence assay of the compounds with A β 1–42 and tau fibrils was performed. The 412 aa isoform of human tau was expressed from cDNA clone httau46 in *Escherichia coli* and purified as described previously (Hasegawa et al., 1998). A β 1–42 (0.2 mg/ml; Peptide Institute) in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, was incubated at 37°C for 72 h with gentle shaking. Tau protein (1 mg/ml) was incubated in the presence of 0.1 mg/ml heparin for 72 h with continuous shaking. Fluorescence spectra of a mixture of the same amount of 0.2 mg/ml A β 1–42 or 0.1 mg/ml tau and 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, and 0.01 μM con-

centrations of each compound were measured using a microplate spectrofluorometer (Gemini XS; Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Optimal excitation wavelength for the mixture of four BF compounds and A β 1–42 or tau fibrils were determined. Then, EC₅₀ values (effective concentrations to achieve 50% maximal fluorescence intensity at optimal excitation wavelength) were calculated using GraphPad Prism. All measurements were performed in duplicate.

Measurement of octanol/water partition coefficients. 1-Octanol (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) and PBS was saturated with PBS and 1-octanol before use, respectively. Test compounds were dissolved in 1-octanol and shaken with equal amounts of PBS for 30 min at room temperature. After centrifugation at 2000 per min for 15 min, the absorbency of 1-octanol layer was measured at the peak wavelength of the absorbance spectrum of each compound using a microplate reader (Molecular Devices Spectra Max 190). The octanol/water partition coefficients were determined by comparing the absorbency with that before shaking with PBS. Each data point was performed in duplicate.

Neuropathological staining. Stainability of tested compounds were examined using postmortem brain tissues from cases of autopsy-confirmed AD (78-year-old woman), Pick's disease (75-year-old woman), and progressive supranuclear palsy (PSP) (78-year-old man). Brain sections were obtained from Fukushima Hospital. Experiments were performed in accordance with the regulations of the ethics committee of the BF Research Institute. Serial sections (6 μm thick) from paraffin-embedded blocks of hippocampus were used for staining. After deparaffinization, quenching of autofluorescence was performed as described previously (Okamura et al., 2004a). Quenched tissue sections were immersed in 100 μM compound or 0.125% thioflavin-S solution containing 50% ethanol for 10 min. Finally, sections were dipped briefly into water, rinsed in PBS for 60 min, coverslipped with FluorSave Reagent (Calbiochem, Darmstadt, Germany), and examined using a Nikon (Tokyo, Japan) Eclipse microscope equipped with a violet filter (excitation, 380–420 nm; dichroic mirror, 430 nm; barrier filter, 450 nm) and a blue filter (excitation, 450–490 nm; dichroic mirror, 505 nm; barrier filter, 520 nm). For the comparison of stainability between BF compounds and thioflavin-S, a blue-violet filter (excitation, 400–440 nm; dichroic mirror, 455 nm; long-pass filter, 470 nm) was used. Staining was also performed in AD brain sections pretreated with 90% formic acid for 5 min. Sections stained with BF compounds were subsequently immunostained with AT8 anti-tau antibody (diluted 1:20; Innogenetics, Ghent, Belgium) to detect tau pathology. An adjacent section was also immunostained with 6F/3D anti-A β antibody (diluted 1:50; Dako, High Wycombe, UK). Sections were placed in blocking buffer for 30 min and then incubated at 4°C with primary antibodies for 18 h (AT8) or 1 h (6F/3D). After washing, sections were incubated with biotinylated anti-mouse IgG (Wako Pure Chemicals, Tokyo, Japan) for 60 min, followed by Texas Red-conjugated avidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 60 min. After coverslipping, sections were examined using a Nikon Eclipse microscope with a green filter set (excitation, 510–560 nm; dichroic mirror, 575 nm; barrier filter, 590 nm).

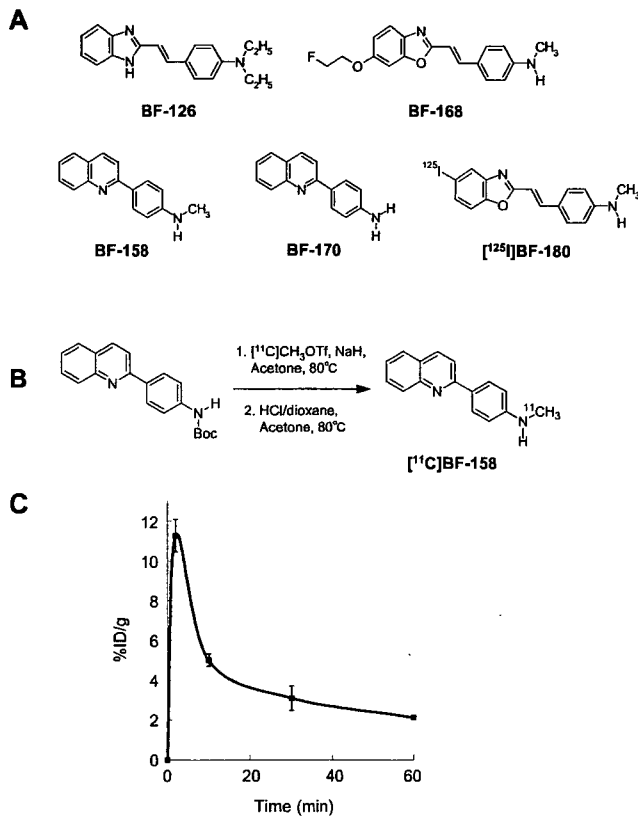
In vitro autoradiography. A 6-μm-thick section from paraffin-embedded blocks of hippocampus was used for autoradiographic study. After deparaffinization, the section was labeled using 4.7 MBq/ml of [¹¹C]BF-158 at room temperature for 10 min, and then washed briefly with H₂O and 50% ethanol. After drying, the labeled section was exposed to a BAS-III imaging plate (Fujifilm, Tokyo, Japan) for 1 h. Autoradiographic images were obtained using a BAS-5000 phosphorimaging instrument (Fujifilm). Adjacent brain sections were immunostained with anti-tau antibody (AT8) and anti-A β antibody (6F/3D), as described previously (Okamura et al., 2004a).

Results

We investigated whether tested compounds would enter the brain in amounts sufficient for *in vivo* brain imaging using PET (Table 1, Fig. 1C). The octanol/water partition coefficients of BF-126, BF-158, BF-168, and BF-170 were 12.5, 47.4, 62.6, and 70.3, respectively. These values indicate that these compounds were highly lipophilic. High uptake of these compounds was ap-

Table 1. Octanol/water partition coefficients, brain uptakes at 2 and 30 min after injection in normal mice, K_i values for A β 1–42 fibrils, EC_{50} values for A β 1–42, and tau fibrils from fluorescence assay of the compounds

	Octanol/water partition coefficient	Brain uptakes (%ID/g)		K_i values for A β fibrils (nM)	Fluorescence assay	
		2 min	30 min		EC_{50} for A β fibrils (nM)	EC_{50} for τ fibrils (nM)
BF-126	12.5	7.2 \pm 0.49	0.16 \pm 0.030	1.2 \pm 0.68	1280 \pm 1.64	583 \pm 2.07
BF-158	47.4	11.3 \pm 0.81	3.1 \pm 0.61	>5000	659 \pm 2.04	399 \pm 2.41
BF-170	70.3	9.1 \pm 1.2	0.25 \pm 0.027	>5000	786 \pm 1.79	221 \pm 2.31
BF-168	62.6	3.9 \pm 0.22 ^a	1.6 \pm 0.0071 ^a	6.4 \pm 1.0 ^a	346 \pm 2.21	1010 \pm 1.72

Brain uptake and EC_{50} values are shown as the mean \pm SEM. K_i values for A β fibrils are shown as the mean \pm SD.^aFrom Okamura et al., 2004a.**Figure 1.** *A*, Chemical structures of BF-126, BF-158, BF-168, BF-170, and [¹²⁵I]BF-180. *B*, Radiolabeling of BF-158. *C*, The %ID/g obtained in the brains of mice after intravenous administration of [¹¹C]BF-158.

parent in the brain after intravenous administration of each compound, with 7.2%ID/g for BF-126 and 9.1%ID/g for BF-170 at 2 min. These values were higher than those reported previously for compound BF-168 (Okamura et al., 2004a). In addition, brain uptake at 30 min after injection was 0.16%ID/g for BF-126 and 0.25%ID/g for BF-170. Brain uptake of BF-158 was measured using ¹¹C-labeled compound. Brain uptake at 2, 10, 30, and 60 min after intravenous injection of [¹¹C]BF-158 was 11.3 \pm 0.81, 5.0 \pm 0.31, 3.1 \pm 0.61, and 2.1 \pm 0.097%ID/g, respectively (Fig. 1C). *In vitro* binding of tested compounds to A β was examined using synthetic A β fibrils. In competitive binding assays with [¹²⁵I]-labeled styrylbenzoxazole compound BF-180, BF-126 displayed high binding affinity to A β 1–42 fibrils, comparable with BF-168. In contrast, K_i for BF-158 and BF-170 was >5000 nM, suggesting a difference in binding sites between quinoline derivatives and benzoxazole derivatives (Table 1). In the fluorescence binding assay of the mixture of tested compounds and A β 1–42

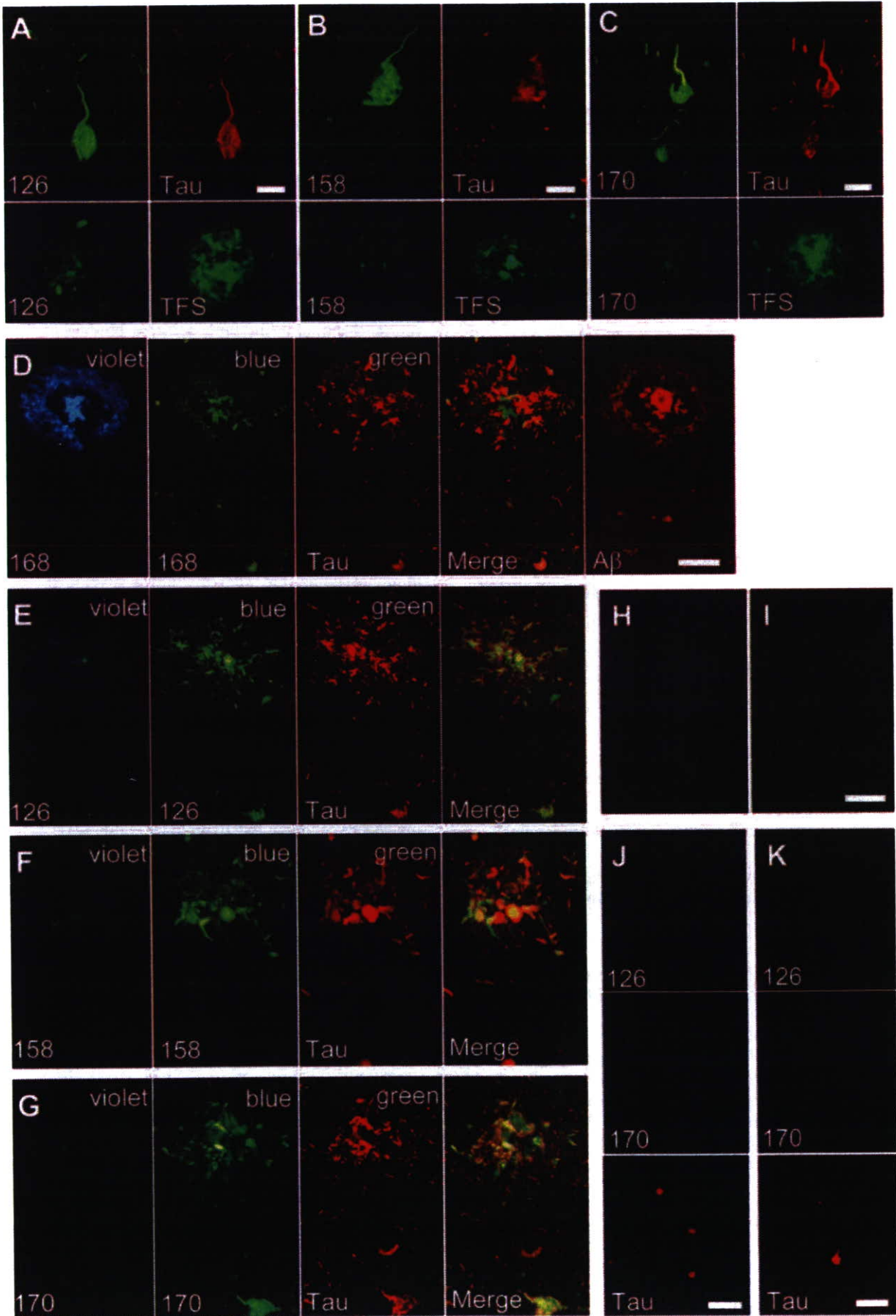
fibrils, EC_{50} value was lowest in BF-168, suggesting higher affinity to A β compared with the other agents. In contrast, in the assay of the mixture of compounds with tau fibrils, EC_{50} values of BF-170, BF-158, and BF-126 was lower than that of BF-168, suggesting relatively higher binding affinity to tau fibrils.

Subsequently, neuropathological staining was performed using AD brain samples to examine the *in vitro* binding characteristics of tested compounds for AD pathology. BF-126, BF-158, and BF-170 clearly stained NFTs and neuropil threads in the hippocampal section of AD brain (Fig. 2A–C). In the comparison with tau immunostaining in the same sections, binding of these compounds with tau pathology was confirmed. In contrast, SPs were faintly stained with BF-126, BF-158, and BF-170, as opposed to clear staining of SPs with thioflavin-S (Fig. 2A–C). We further investigated the stainability of neuritic changes using these compounds and BF-168. BF-168 clearly visualized both the central core and peripheral zone of core plaques under violet and blue filters (Fig. 2D). The staining pattern for BF-168 did not coincide with that for tau immunostaining in the same section but closely resembled A β immunostaining in the adjacent section (Fig. 2D). In contrast, BF-126, BF-158, and BF-170 predominantly stained neuritic elements under a blue filter and coincided well with tau immunostaining (Fig. 2E–G). Under a violet filter, the central core and peripheral halo were barely visible. These findings suggest that BF-126, BF-158, and BF-170 prefer to bind to PHF-type neurites rather than A β fibrils. Pretreatment with formic acid eliminated the staining of NFTs with BF-170 (Fig. 2H, I), BF-158, and BF-126 (data not shown), suggesting that both compounds recognize the β -sheet structure of NFTs rather than monomeric tau protein. To investigate whether these compounds detect neuropathological lesions in non-AD tauopathy, staining was performed in brain sections from Pick's disease and PSP patients. As a result, BF-126, BF-170, and BF-158 (data not shown) were unable to identify Pick bodies (Fig. 2J), globose tangles (Fig. 2K), and glial pathology in PSP brain (data not shown).

Finally, *in vitro* autoradiography using [¹¹C]BF-158 was performed in AD brain section. Accumulation of tracer was observed primarily in the gray matter region of the brain. The distribution of labeling with [¹¹C]BF-158 correlated well with tau immunostaining in the adjacent section (Fig. 3A, B). In particular, high levels of tracer accumulation were observed in NFT-rich brain regions (Fig. 3D, E, arrows). This finding indicates the binding of [¹¹C]BF-158 for NFTs in the AD brain.

Discussion

Although the present research did not confirm whether the studied compounds can visualize tau pathology in the living brain, the results strongly suggest that quinoline and benzimidazole derivatives represent potential candidates for an *in vivo* tau-imaging agent in AD patients. Requirements for the ideal tau-imaging probe include the following: (1) high BBB and cell membrane permeability; (2) rapid clearance from normal brain tissue; (3) high affinity for NFTs, neuropil threads, and PHF-type neurites; and (4) low nonspecific binding. Our results indicate that BF-126, BF-158, and BF-170 display sufficient BBB permeability for use as PET imaging tracers. Permeability of the neuronal membrane represents another important factor for *in vivo* imaging of intracellular tau aggregates (Small et al., 2002). High lipophilicity



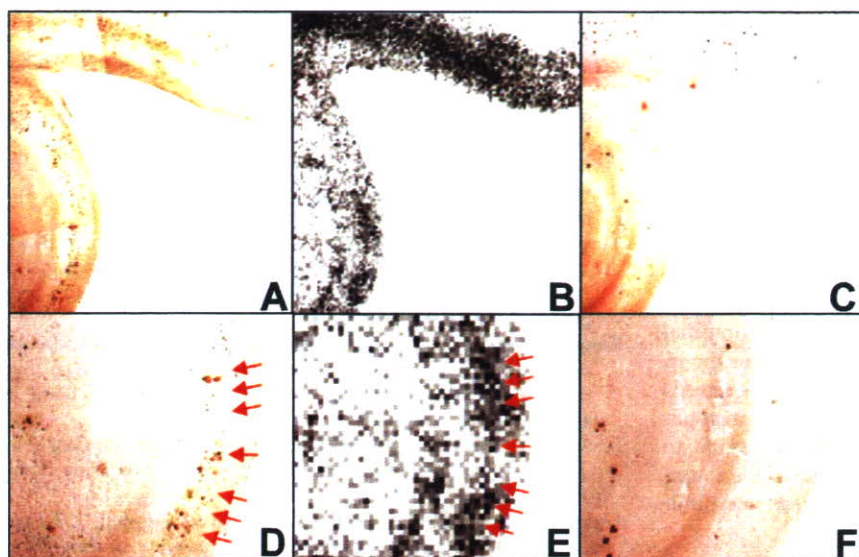


Figure 3. *A–C*, Autoradiography of AD hippocampal brain section using [^{11}C]BF-158 (*B*) and immunostaining by anti-tau (*A*) and anti- $\text{A}\beta$ (*C*) antibodies in adjacent sections. *D–F*, Close-up images of *A*, *B*, and *C*, respectively. *D*, *E*, Accumulation of [^{11}C]BF-158 (*E*, arrows) correlates well with tau immunostaining (*D*).

of these compounds has the advantage in this factor. *In vivo* imaging using a tangle-laden mouse model that accurately reflects AD pathology will elucidate this issue. Furthermore, three tested compounds demonstrated fast clearance from normal brain tissue. This property will contribute to improving the sensitivity of detecting NFT accumulation by minimizing residual background levels of tracer.

The most intriguing point of this study was that BF-126, BF-158, and BF-170 have a preference for tau pathology in AD brain. Results from fluorescence binding assay suggest relatively higher binding affinity to tau fibrils of these three compounds. These compounds also show excellent stainability for tau pathology and little background fluorescence in AD brain. An autoradiographic study using [^{11}C]BF-158 confirmed the accumulation of this tracer in tangle-rich brain regions, emphasizing the binding preference of these compounds to tau pathology in AD brains. However, fluorescence assay data show the binding ability of these agents to $\text{A}\beta$ fibrils. In neuropathological staining, these agents faintly stained amyloid plaques. Thus, these compounds are not completely specific to tau pathology. Nevertheless, our data suggest that these three agents have relatively higher binding affinity to tau pathology rather than to $\text{A}\beta$ pathology in AD brain.

Previous neuropathological research suggests that the deposition of NFTs occurs before the presentation of clinical symptom in AD. Even in the very early stages of AD, patients display considerable numbers of NFTs in the entorhinal cortex and hippocampus, sufficient for the neuropathological diagnosis of AD. Thus, *in vivo* imaging of NFTs in conjunction with imaging SPs

could prove useful for the early and accurate diagnosis of AD. Quantitative evaluation of tau pathology could also be helpful for tracking severity of dementia, because the formation of neuritic pathology correlates well with clinical severity of dementia (Dickson, 1997). NFT deposition in the entorhinal cortex is closely associated with neuronal loss in very early AD patients (Gomez-Isla et al., 1996). Prevention of NFT formation is thus an important target of anti-dementia drugs. If novel treatments that prevent the pathological formation of neurofibrillary pathology could be turned into clinical applications, this imaging technique would be applicable for the evaluation of treatment efficacy.

The general mechanism of abnormal protein aggregation leading to disease is β -sheet formation. AD is accompanied by the formation of two distinct β -sheet aggregates, $\text{A}\beta$ fibrils and PHFs. As is the case with previously reported imaging agents, BF-126, BF-158, and BF-170 recognize β -pleated sheet structure, because staining

in AD brain sections was disturbed by pretreatment with formic acid (Kitamoto et al., 1987). Our results suggest that tested compounds display relatively higher binding affinities to PHFs than to $\text{A}\beta$ fibrils. Previous reports describe 2-(1-{6-[(2-fluoroethyl)(methyl)amino]-2-naphthyl}ethylidene)malononitrile (FDDNP) as a candidate of tau imaging agent (Agdeppa et al., 2001). This compound is a highly lipophilic agent and specifically labels NFTs as well as SPs in AD brain sections. [^{18}F]FDDNP, the first PET probe to see clinical use for AD patients, reportedly detects the combined signals of SPs and NFTs (Shoghi-Jadid et al., 2002). FDDNP shows high binding affinity to $\text{A}\beta$ fibrils; however, binding affinity to tau fibrils is unknown. Pittsburgh compound B, another promising PET probe, preferentially detects the accumulation of SPs rather than NFTs (Klunk et al., 2003). BF-145 and TZDM (2-[4'-(dimethylamino)phenyl]-6-iodobenzothiazole) also reportedly preferentially recognize SPs (Kung et al., 2003; Okamura et al., 2004b). Why these β -sheet binding agents show such a variety of binding characteristics with SPs and NFTs is not well understood. The diameter of a PHF is 18–20 nm at the widest portion and 8–10 nm at the narrowest portion (Wisniewski et al., 1984), whereas $\text{A}\beta$ fibrils are 7–12 nm in diameter (Sunde et al., 1997). Although the nature of PHF structure remains contentious, both structures share a common pattern, with 4.76 Å meridional spacing and 10.6 Å equatorial spacing, characteristic of a cross- β structure (Berriman et al., 2003; Barghorn et al., 2004). A recent study indicated the presence of multiple ligand-binding sites on $\text{A}\beta$ fibrils (Lockhart et al., 2005). If

←

Figure 2. *A–J*, Neuropathological staining of brain sections from cases of AD (*A–I*), Pick's disease (*J*), and progressive supranuclear palsy (*K*). BF-126 (*A*), BF-158 (*B*), and BF-170 (*C*) clearly stained neurofibrillary tangles and neuropil threads. These stainings were consistent with tau immunostaining. In contrast, these compounds faintly stained amyloid plaques, which were clearly stained with thioflavin-S (TfS) in adjacent sections. *D–G*, Double staining with BF compounds and anti-tau antibody was performed in hippocampal brain sections. *D*, Cored plaque is clearly visualized by BF-168 using violet and blue filters. A merged image of BF-168 fluorescence using a blue filter and tau immunostaining (green) indicates that BF-168 does not recognize PHF-type neurites. The image of $\text{A}\beta$ immunostaining in an adjacent section closely resembles BF-168 staining. BF-126 (*E*), BF-158 (*F*), and BF-170 (*G*) faintly stain the core and halo of amyloid plaque using a violet filter. However, images using a blue filter closely resemble tau immunostaining. *E–I*, A merged image indicates that these three compounds preferentially bind to PHF-type neurites (*E–G*). BF-170 (*H*), BF-158, and BF-126 (data not shown) did not stain any pathological structures in the section pretreated with formic acid, in contrast to the clear visualization of NFTs in non-pretreated brain sections (*I*). *J, K*, Staining of Pick bodies and globose tangles were compared with tau immunostaining in brain sections from cases of Pick's disease (*J*) and progressive supranuclear palsy (*K*). Neither Pick bodies (*G*; green) nor globose tangles (*H*; green) are detected in brain sections treated with BF-126 and BF-170. Scale bars: *A–C*, 25 μm ; *D–G*, 50 μm ; *H–I*, 400 μm ; *J–K*, 100 μm .

PHF also includes multiple binding sites for β -sheet binding agents, this factor will contribute to the difference in ligand-binding affinity to SPs and NFTs. The manner of binding between β -sheet binding agents and both NFTs and SPs is not well clarified. However, differences in conformation between SPs and NFTs and differences in ligand-binding sites may result in the diversity of binding properties in these compounds to SPs and NFTs.

Tau lesions are not only the hallmark of AD but are also characteristic of non-AD tauopathy such as PiD and PSP (Goedert, 2004). However, tested compounds did not show any significant binding to pathological lesions in these diseases, implying that both compounds are highly specific to PHFs in AD. Accordingly, these probes are potentially useful for differentiating between AD and other neurodegenerative disorders. For future clinical applications, optimization of the compounds is necessary to assure compound safety, facilitate radiolabeling, and reduce non-specific binding. We are currently investigating the *in vivo* binding characteristics of these optimized probes.

References

- Agdeppa ED, Kepe V, Liu J, Flores-Torres S, Satyamurthy N, Petric A, Cole GM, Small GW, Huang SC, Barrio JR (2001) Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21:RC189(1–5).
- Barghorn S, Davies P, Mandelkow E (2004) Tau paired helical filaments from Alzheimer's disease brain and assembled *in vitro* are based on beta-structure in the core domain. *Biochemistry* 43:1694–1703.
- Berriman J, Serpell LC, Oberg KA, Fink AL, Goedert M, Crowther RA (2003) Tau filaments from human brain and from *in vitro* assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9034–9038.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 82:239–259.
- Dickson DW (1997) Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol Aging* 18 [4 Suppl]:S21–S26.
- Goedert M (2004) Tau protein and neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol* 15:45–49.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel Jr DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16:4491–4500.
- Hasegawa M, Smith MJ, Goedert M (1998) Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett* 437:207–210.
- Kitamoto T, Ogomori K, Tateishi J, Prusiner SB (1987) Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab Invest* 57:230–236.
- Klunk WE, Wang Y, Huang GF, Debnath ML, Holt DP, Shao L, Hamilton RL, Ikonovic MD, DeKosky ST, Mathis CA (2003) The binding of 2-(4'-methylaminophenyl)benzothiazole to postmortem brain homogenates is dominated by the amyloid component. *J Neurosci* 23:2086–2092.
- Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, et al. (2004) Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55:306–319.
- Kung MP, Skovronsky DM, Hou C, Zhuang ZP, Gur TL, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM, Kung HF (2003) Detection of amyloid plaques by radioligands for A β 40 and A β 42: potential imaging agents in Alzheimer's patients. *J Mol Neurosci* 20:15–24.
- Kung MP, Hou C, Zhuang ZP, Skovronsky D, Kung HF (2004) Binding of two potential imaging agents targeting amyloid plaques in postmortem brain tissues of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* 1025:98–105.
- Lee VM, Balin BJ, Otvos Jr L, Trojanowski JQ (1991) A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science* 251:675–678.
- Lockhart A, Ye L, Judd DB, Merritt AT, Lowe PN, Morgenstern JL, Hong G, Gee AD, Brown J (2005) Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on beta-amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem* 280:7677–7684.
- Mathis CA, Wang Y, Klunk WE (2004) Imaging beta-amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the aging human brain. *Curr Pharm Des* 10:1469–1492.
- Nordberg A (2004) PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 3:519–527.
- Okamura N, Suemoto T, Shimadzu H, Suzuki M, Shiomitsu T, Akatsu H, Yamamoto T, Staufenbiel M, Yanai K, Arai H, Sasaki H, Kudo Y, Sawada T (2004a) Styrylbenzoxazole derivatives for *in vivo* imaging of amyloid plaques in the brain. *J Neurosci* 24:2535–2541.
- Okamura N, Suemoto T, Shiomitsu T, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Arai H, Sasaki H, Yanai K, Staufenbiel M, Kudo Y, Sawada T (2004b) A novel imaging probe for *in vivo* detection of neuritic and diffuse amyloid plaques in the brain. *J Mol Neurosci* 24:247–255.
- Price JL, Morris JC (1999) Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45:358–368.
- Shoghi-Jadid K, Small GW, Agdeppa ED, Kepe V, Ercoli LM, Siddarth P, Read S, Satyamurthy N, Petric A, Huang SC, Barrio JR (2002) Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 10:24–35.
- Small GW, Agdeppa ED, Kepe V, Satyamurthy N, Huang SC, Barrio JR (2002) *In vivo* brain imaging of tangle burden in humans. *J Mol Neurosci* 19:323–327.
- Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 273:729–739.
- Wisniewski HM, Merz PA, Iqbal K (1984) Ultrastructure of paired helical filaments of Alzheimer's neurofibrillary tangle. *J Neuropathol Exp Neurol* 43:643–656.

アルツハイマー病診断用プローブ

工藤 幸司

要約: アルツハイマー病 (AD) においては最初の臨床症状が顕性化するはるか以前からアミロイドβタンパク (Aβ) を主構成成分とする老人斑 (senile plaque) の蓄積が始まっている。Aβのβシート構造を認識するプローブ (低分子有機化合物) を開発し、これをPETまたはSPECTで扱える核種で標識して生体に投与し、脳内Aβとプローブの結合量およびその空間的分布からADを診断しようとするのがアミロイドイメージングである。アミロイドイメージングはADの病理像を追跡することから発症前診断を可能にすると考えられている。すでにいくつかのプローブの探索的臨床研究が開始されており、従来の診断法に比し明らかに優れていることが確かめられている。本稿ではAD診断法としてのアミロイドイメージングの有用性、プローブの現状および薬理作用等について概説する

1. はじめに

ここ数年のAD研究はこれをさかのぼるさらに10年に比しても急速な進歩がみられた。進歩の第1はADを発症前に診断できる技術が目途がついたこと、第2は免疫療法(1-6)やβおよびγセクレターゼ阻害薬(7-12)等によって根本的治療が可能になりそうなこと、第3は第1の診断をもとに、第2の治療的介入を加えることによって、診断時点で発症前でさえあればADに罹患せずに人生をおくれる時代がやがて到来しそうなことである。

本稿では進歩の第1、すなわちアミロイドイメージングと呼ばれる新しい診断法の意義、波及効果、さらなる発展等について論じるとともに、本診断法の鍵をにぎるβシート構造をとったAβを認識するプローブ

(低分子有機化合物)の現状、開発状況、薬理学的特性等につき薬理学者の眼からも述べてみたい。但し、現時点においても、著者らのプローブもさらに最適化中であり、そのプローブの最前線および開発ノウハウの深層部分を明らかにできないことをお許しいただきたい。

ADは現状では臨床症状を指標にMMSE (Mini Mental State Examination) や長谷川式などの神経心理学的テストによって主として診断されている。しかし患者を取り巻く家族、または臨床家がAD特有の臨床症状に気付いた時には、それぞれAβおよび過剰リン酸化タウタンパクを主構成成分とする老人斑および神経原線維変化、さらに神経細胞脱落 (脳萎縮) 等の病理像はもはや取り返しのつかないほど進行していることが知られている。すなわち、現状のAD診断をガンのそれに例えるなら、末期状態に達した時点でしか検出されていないことになる。近年、一部ADの前駆状態と考えられているMCI (Mild Cognitive Impairment; 軽度認知障害) という概念が起こってきた(13, 14)が、ADに進行するMCIにおいても病理学的にはすでに立派なAD状態である(15, 16)ことが明らかにされている。ADの病理像は老人斑、神経原線維変化、神経細胞脱落の順にあらわれ、最初の病理像である老人斑蓄積は臨床症状が顕在化する数10年前(40年前からとする研究者もいる)から始まると考えられている。これらの事実はADの臨床像と病理像、言い換えるとclinical ADとpathological ADとの間には大きな乖離が存在することを示唆している(図1参照)。この乖離にはいわゆる代償機能が関与しているものと考えられる。AD病理像が進行してもかなりの部分代償機能がこれを補い続け症状発現を抑えているが、病理

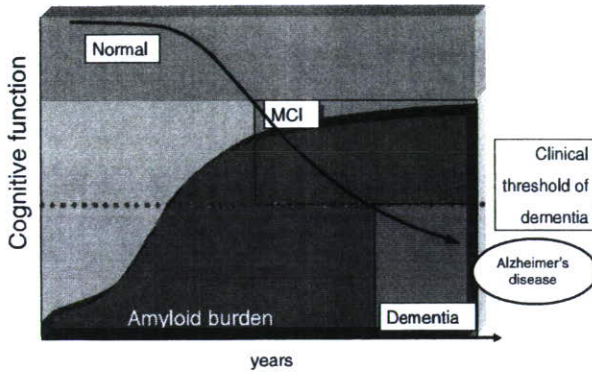


図1 アルツハイマー病における臨床像と病理像との乖離

Cognitive function (認知機能) を指標とすると、同機能が低下し MCI (Mild Cognitive Impairment) を経て、一定の閾値を下回った時点からアルツハイマー病と診断されるが、病理像 (Amyloid burden) は MCI 以前からすでに AD 状態である。(文献 15,16 を参考とした)

像が代償機能を上回り症状が表に現れたときにはすでに手遅れの病理像を呈することになるのであろう。脳は AD に関しては沈黙の器官とすることができる。

2. アミロイドイメージングの原理

昨年 (2004 年) 6 月、かねて AD であることを公表していたロナルド レーガン アメリカ第 40 代大統領が 93 歳の生涯を閉じた。彼が AD の初期であることを公表したのは 1994 年であるが、これをきっかけとしていわゆるレーガン研究所が設立された。この研究所の大きな業績の 1 つが AD 診断に関するコンセンサスレポート (17) である。同レポートが求めているのは、病態像を捉えていること、鑑別および早期診断ができること、診断の感度および特異度はいずれも 80%、陽性的中率は 90% などである。同レポートは現時点においても AD 診断法開発におけるバイブルないしはガイドライン的役割を果たしている。

コンセンサスレポートが発表された当初は同レポートが求めている基準、特に感度、特異度、陽性的中率はかなり高いハードルと考えられていたが、これを克服する可能性が高いと期待されているのがアミロイドイメージングである。

アミロイドイメージングは AD の病理像を追跡し、その病理像から AD を診断しようとする技術である。それではこの診断法はいかなる戦略に基づく技術であるかについて解説すると、概念は以下の通りであり、その概念図を図 2 に示した。

1) AD の病理学的主徴のひとつ、老人斑のほとんど

は β シート構造をとった $A\beta$ によって形成されている。

- 2) 同シート構造をとった $A\beta$ に特異的選択的に結合し、かつ容易に血液-脳関門を透過する低分子有機化合物を見いだす。
- 3) この化合物を PET または SPECT で扱うことが可能な核種で標識する。
- 4) これをプローブとして生体に静脈内投与する。
- 5) プローブは血液-脳関門を越えて脳内の老人斑を形成している $A\beta$ に結合する。一定時間後には非結合プローブは洗い流され、 $A\beta$ に結合したプローブのみが脳内に残る。
- 6) これを PET または SPECT を用い、イメージング画像として取り込み、 β シート構造をとった脳内 $A\beta$ (=老人斑) 蓄積量の定量およびその空間的分布から AD を診断する。

画像診断における画像は普通、形態と機能とに分けられるが、アミロイドイメージングは脳の病理像を覗き込むことから、むしろ病理画像と呼ぶのがふさわしいのかもしれない。

アミロイドイメージングは臨床症状に先立つ病理像の内、 $A\beta$ ないしは老人斑を追跡することから、原理的に鑑別、早期さらに発症前診断が可能である。このことはアミロイドイメージングと近年開発が進んでいる免疫療法、 β および γ セクレターゼ阻害薬等の根本療法を組み合わせることにより、前述したように、診断時点で発症前でさえあれば、AD に罹患しないで一生を送れることを意味する。この世から AD が消え去るのも夢ではないのかもしれない。

3. アミロイドイメージングプローブの現状

さて、ここでアミロイドイメージングによる診断法に絶対不可欠なプローブに話題を移そう。この技術が臨床で応用されるための最大のハードルは、 β シート構造をとった $A\beta$ に特異的選択的に結合し、且つ血液-脳関門を容易に透過し、さらに標的 (β シート構造をとった $A\beta$) 以外からは速やかにクリアランスされるなどの優れた特性を有するプローブを見いだすことにある。著者らの経験では、プローブとして必要とされるいくつかの特性のうち一方の特性を上げると別の特性が下がるといったまさに匙加減をみながらの創業であり、なかなか理想とするプローブへ到達することが難しいのが現実である。

世界でこの領域の研究に参画している主なチームは、UCLA Barrio ら、ピッツバーグ大 Klunk ら、ペンシ

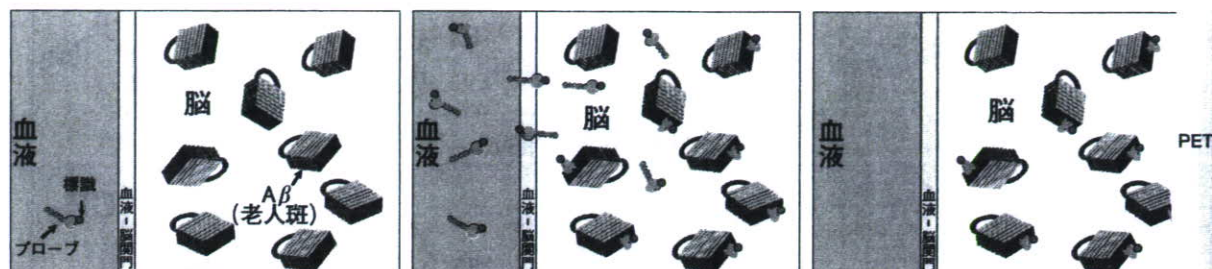


図2 アミロイドイメージングのストラテジー概念図

左：標識プローブを静脈内投与する。中：標識プローブは血液-脳関門を越えて脳内のAβ（老人斑）に結合する。右：一定時間後には非結合プローブは洗い流され、Aβに結合したプローブのみが残る。これをPETを用いて画像診断する。

ルベニア大 Kung ら、それにビーエフ研究所-東北大学先進医工学研究機構の著者らの4チームである。1994年、Klunk らは Chrysamine-G と名づけたこの分野の先駆的プローブを発表した(18) (以下、プローブの化学構造はすべて図3参照)。このプローブは図3で見るとCongo Redの誘導体であり、Aβに対しては高い親和性が認められるものの、親化合物の持つ脳移行性の低さは解決されていなかった(18, 19)。彼らの Chrysamine-G 系統プローブは X-34 (20)、さらに Methoxy-X-04(21) へと引き継がれている。X-34 がさらに修飾されたのが BSB(22)、ISB(23)、IMSB(23) であり、これらは主としてペンシルベニア大 Kung 夫妻らによって報告された。

2001年、Klunk らは Thioflavin-T の3位の N を4級から3級に替えることによって、脳からのクリアランスに優れたプローブ (BTA シリーズ) が得られることを見だし(24)、以後彼らはこのシリーズに集中して研究を続けている。

一方、Kung 夫妻は BTA シリーズ周辺の TZDM(25)、TZPI(25)、IBOX(25) を経て、Klunk らの特許に抵触しない SB-13(26)、IMPY(27, 28) へと研究を移している。UCLA Barrio らのプローブ FDDNP(29) は蛍光染料 DDP(30) の F 化合物である。

2002年初頭、世界で初めて AD 患者にアミロイドイメージング用 PET プローブが投与された画像が紹介された(31)。この荣誉に浴したのは Barrio らのチーム、プローブは ^{18}F FDDNP であった。 ^{18}F FDDNP の集積は ^{18}F FDG 代謝の低下している部位にみられ、また側頭葉部位における集積は Aβ および神経原線維変化を反映していると考えられる。しかし ^{18}F FDDNP は脳幹、特に橋付近の非特異的結合があまりにも多く、このプローブがスタンダードな AD 診

断用プローブになるとは考えにくい。

現在、最も進捗度の高いプローブは ^{11}C PIB (= ^{11}C 6-OH BTA-1) である。このプローブ関連の情報を要約すると以下の通りである。

- 1) スウェーデン ウプサラ大学 PET センター(32) においてまず最初の、次いでカナダ トロント大学(33) でヒト PET スタディが行われ、その後かなりの施設で追試が行われている模様である。現在までのところ感度、特異度のデータは出ていないが、学会発表および論文データからみて AD と非 AD との鑑別は十分に可能であり、また従来の診断法に比し明らかに優れている。が著者の意見である。
- 2) Klunk ら(32) によると AD 患者脳において高い集積の認められる部位は前頭葉、側頭頭頂葉などであるが、これらは明らかに健常コントロール画像と異なっており、また ^{18}F FDDNP と同様、 ^{18}F FDG 代謝の低下している部位に集積がみられた。 ^{11}C PIB 集積と ^{18}F FDG の代謝率を比較したところ、前者の集積の方が後者の代謝率よりも AD 患者 - 健常コントロール間のデータのオーバーラップが少なかった。このことはこのプローブによる診断の方が ^{18}F FDG を用いたそれよりも AD の診断精度が優れていることを示唆している。しかし一方、AD 患者において ^{11}C PIB 集積が正常レベルであった例、正常コントロールでも集積の高かった例なども見られている。これらが false positive/negative なのか、または発症前高リスク者であったのかは今後多例数を重ねて検討する必要がある。
- 3) 老人斑がそれほど蓄積しないことが知られている視床、線条体、後部帯状回等へもかなりの集積が

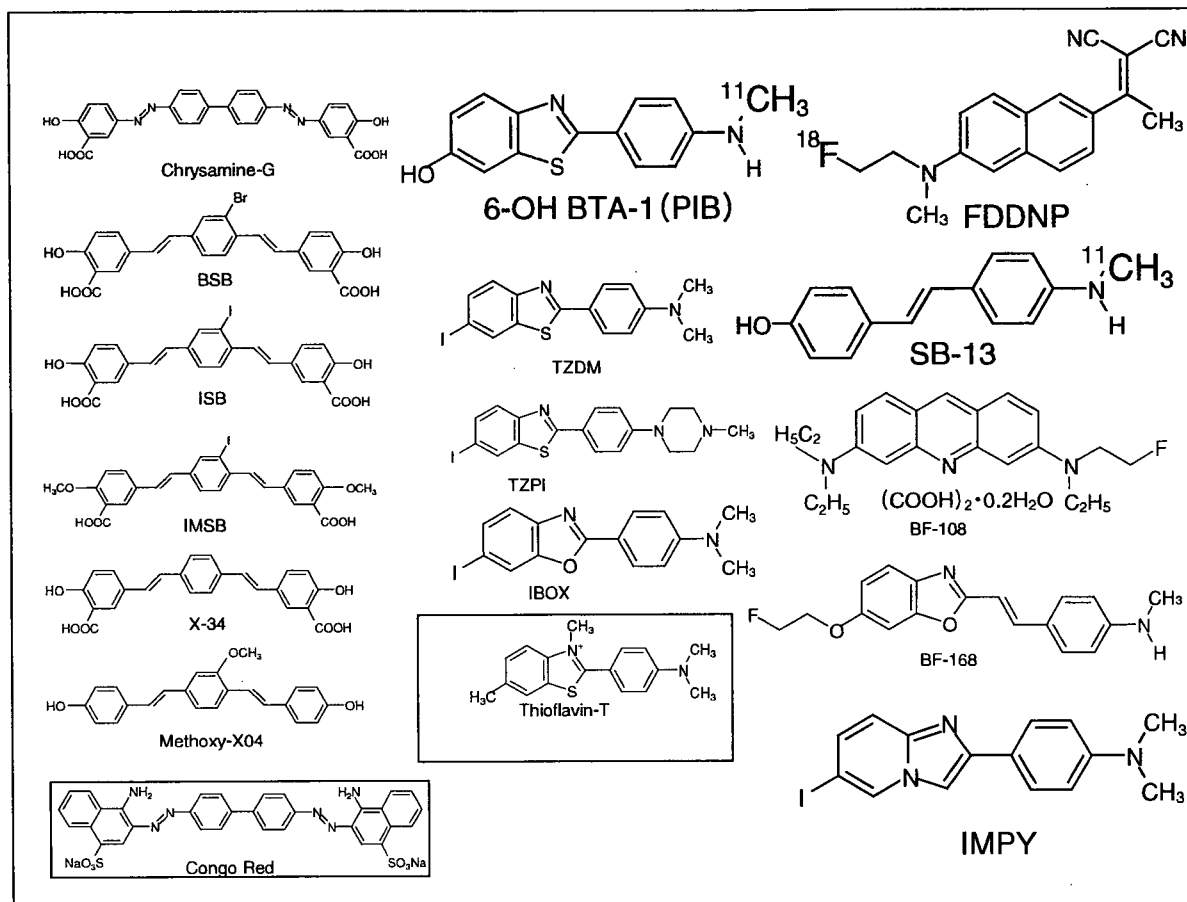


図3 アミロイドイメージング用に開発されたプローブ群

認められる(32,33) ようである。皮膚における集積はADの病理像から見て一応納得できるが、なぜ線条体等においてかなりの非特異的集積が見られるかは不明である。

- 4) A β が脳内に蓄積するトランスジェニック(Tg)マウスにおいては、このプローブとA β との結合性はそれほど高くないことが、開発者自らによって報告されている(34)。
- 5) ゼネラル エレクトリックス-アマーシャムヘルスのもとで開発が進められているようである。

次に、 ^{11}C SB-13であるが、最近トロント大学より ^{11}C PIBとの比較という形で探索的臨床研究データが発表された(33)。AD患者におけるプローブの集積部位は、前頭葉、後頭側頭-下部頭頂連合皮質であり、 ^{11}C PIBの集積とよく似ていた(線条体への集積をも含めて)と報告されている。

4. 著者らのプローブ

さて、日本であるが時限研究法人(1997年2月-2004年2月)ビーエフ研究所において著者らによって研究がなされていたが、東北大学(著者ら)チームによって同研究所の成果が引き継がれている。著者らのそれらはAD脳病理像に対する親和性から以下の3つのグループに大別される。

- 1) びまん性老人斑を含む老人斑に対して結合特異性の高いプローブ群
びまん性老人斑は老人斑に先立つ(時間的に)病理所見といわれることから、これらのプローブを用いることにより、より早期診断が可能になるものと推測される。
- 2) 老人斑および神経原線維変化の両者をほぼ同等に認識するプローブ群
現在までのところ、競合研究者のプローブはアミ

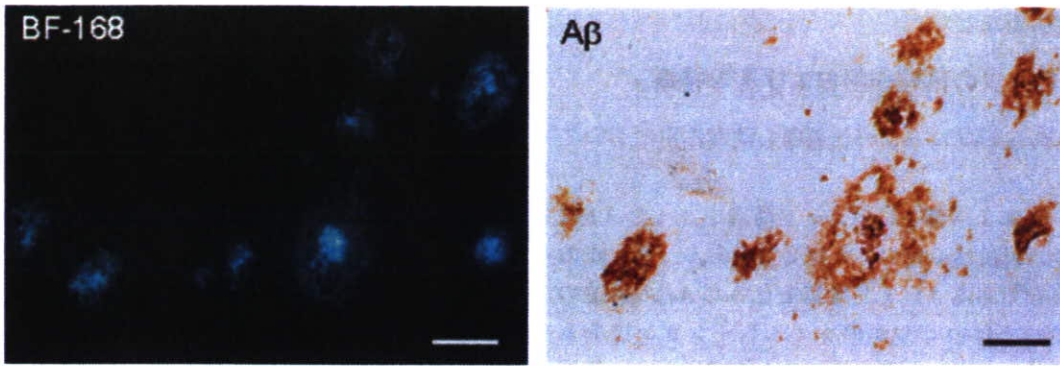


図4 アルツハイマー病患者脳切片におけるBF-168の染色像(蛍光顕微鏡下)
左:BF-168 右:抗A β 抗体染色。スケールは50 μ m。(文献38より引用、一部改変)

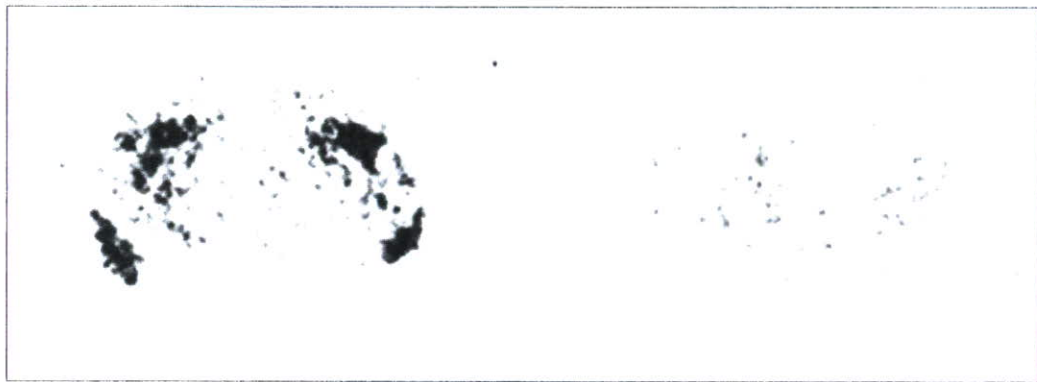


図5 APP23トランスジェニックおよび野生型マウスにおける[18F]BF-168静脈内投与後のオートラジオグラフィ像
左:APP23トランスジェニックマウスにおけるオートラジオグラフィ像。右:野生型マウスにおけるオートラジオグラフィ像。(文献38より引用、一部改変)

ロイドイメージング用プローブとはいうものの、両病理所見に対する認識度に多少の差こそあれ、すべてこのタイプのプローブである。

3) 神経原線維変化に対して結合特異性の高いプローブ群

このような特性を有するプローブは世界的にみても未だ報告されていない。

著者らのプローブはBF-108(35,36)から始まり、ついでBenzoxazole誘導体(37-39)へと研究が転換した。Benzoxazole誘導体の中で代表的プローブBF-168の成績を示す(37,38)と、同プローブはAD患者脳の老人斑に結合特異性が高かった(図4)。また同プローブの^[18F]体は遺伝的に脳内にA β が蓄積するTgマウスにおいて特異的にアミロイド斑に結合した(図5)。また、著者らが見いだした前述3プローブ群は、脳切片に蟻酸を前処理することによってタンパクの β シ-

ト構造を破壊すると、その結合性が完全に失われることから、彼らは両タンパクの β シート構造を認識していると結論される。

著者らが2005年度初頭からヒト探索的臨床試験を計画しているプローブはBF-168とはほぼ同様の性質を有する更なる進化体BF-227(=THK-002)である。これまで報告されてきた競合研究者のプローブは総て、老人斑および神経原線維変化の両者を認識するが、著者らはそれぞれに選択性の高いプローブ、すなわち、「びまん性老人斑を含む老人斑に対して結合特異性の高いプローブ」および「神経原線維変化に対して結合特異性の高いプローブ」を持っている。前者のプローブは老人斑に選択性が高く、従来のプローブでみられる神経原線維変化のノイズが入りにくいということで、老人斑をターゲットとした免疫療法、 β および γ セクレターゼ阻害薬の臨床評価には、まさにぴったりの評価モニターとなるであろう。また後者はAD診断に前

者とは異なった切り口を与えてくれるであろう (AD の重症度診断など)。

5. プロープの薬理作用およびその特徴

次にこれらのプロープの代表的な薬理作用について述べる。

プロープはまず第1に β シート構造をとった $A\beta$ に対して高い親和性を持つことが必要である。老人斑の主構成成分である β シート構造をとった $A\beta$ の構造の詳細についてはいくつかのシミュレーションはある(40, 41)が、必ずしも確立されたものではない。高度な専門家が集まる学会等によく見かけるスライドでさえもアミノ酸をパラレル配置にする研究者がいる一方、アンチパラレル配置にする研究者もいる。また、 $A\beta$ は市販されており、緩衝液中でこれを容易に β シート構造をとらせることができるが、この β シート構造とTgマウス脳における $A\beta$ 、さらにAD患者脳の $A\beta$ とは三者間でそれぞれ少しずつではあるが構造が異なることが示唆されている。例えばTgマウスの $A\beta$ には結合しないが、AD患者脳のそれには結合するなど、プロープによってさまざまな結合パターンを示すことを著者自身しばしば経験している。

ADにおいて観察される老人斑の前駆状態と考えられている、いわゆるびまん性老人斑 (diffuse plaque) も $A\beta$ の蓄積像であるが、これを認識するプロープ(38, 39)と認識しないそれら(29)とがある。プロープは総て $A\beta$ の β シート構造を認識すると謳っているが、前者を用いるとびまん性老人斑は β シート構造をとっていることになるが、後者のそれでは同シート構造をとっていないことになる。これらは化合物の結合性からタンパクの構造を推定することからくる矛盾と考えられる。

$A\beta$ にはアミノ酸の長さから $A\beta$ 1-40と $A\beta$ 1-42とがあるが、AD患者脳標本上でこれを見分ける免疫染色と対比すると、現在報告されているプロープではこの違いを見分けることができない。抗体ではタンパクのアミノ酸配列を、プロープでは構造をそれぞれ認識しているからであろう。

プロープは化学構造的にCongo Redタイプ、Thioflavin Tタイプおよびその他に大きく分類される。普通のレセプターアッセイでは多少の標識リガンドの構造の違いは克服できるが、例えばCongo Redタイプ標識リガンドの $A\beta$ バインディングは同タイプのプロープによってよく置換されるが、その他のタイプのそれらによっては極めて置換されにくく、またその逆も真であることが知られている(23)。このことはプロ

ープの基本構造の違いによって $A\beta$ バインディングサイトはそれぞれ異なること、いかにいえばプロープの基本構造の違いの数だけバインディングサイトが存在することを示唆している(42)。

いわゆるアミロイドイメージングを謳ったいくつかのプロープが臨床試験に供されてきたが、これらは必ずしも $A\beta$ のみに選択性が高いわけではない。これらはAD病理像のうち1つの β シート構造をとるタンパク、すなわち過剰リン酸化タウタンパク (ないしは神経原線維変化) をもほぼ同程度に認識することが知られている。したがって、結果として得られたこれらプロープの集積画像にそれぞれの病理像がどの程度関与しているのかを決定することはできない。その意味でそれぞれ過剰リン酸化タウタンパク(43, 44)または $A\beta$ のどちらか一方のみに選択性の高いプロープの出現が待たれており、ここに前述した我々のプロープ群の存在意義の一つがあると著者は考えている。

$A\beta$ はAD患者脳内に蓄積する。当然プロープは血液-脳関門を透過することが必要である。現在、臨床試験成績が報告、実施中あるいは計画中のPIB(45)、SB-13(46)およびIMPY(22, 28)のマウス実験例を示すと、静脈内投与2分後には脳1g当たり投与絶対量の3%以上が脳内へ移行し、30分後では2分後の20%以下まで脳内含量が減少している。このように投与直後には急速且つ大用量が脳へ移行し、その後急速に脳からクリアランスされるという相反する2つの特性を持たせなければならないことが、これらプロープのドラッグデザインを難しいものにしていく。

現状のアミロイドイメージングはプロープのいずれかの部位に標識された同位体を追跡することから、代謝された同位体が脳内にとどまったり、脳へ再移行するような標識法は避けなければならない。プロープごとに適切な標識法および部位を開発しなくてはならないことも、プロープ開発を難しくしている一因である。

6. その他のアミロイドイメージング法

最近、HiguchiらのMRIを用いたアミロイドイメージング法(47)とPETを用いたそれとの違いについてよく質問を受ける。彼らの方法は $A\beta$ を認識するF化合物のFを追跡する技術であるが、測定原理上、PETと比較して空間分解能は圧倒的に優れているが、時間的分解能、感度は劣っている。MRIの感度は $10^{-4}M$ 、PETのそれは $10^{-12}M$ と考えられている(48)ことなどから、Higuchiらも述べているように(47)この方法のヒト臨床応用にはハードおよびソフトウェアの更なる進化に加えて優れたF化合物の開発が必

要であろう。進化が現実になったならばPETにとって代わるのは必然と思われるが。

近年、分子イメージングに新しい手法、特に光技術が進出してきた。著者周辺では、各種ガン細胞にLuciferase 遺伝子を導入してこれをマウスに植え込み、その後 Luciferin を静脈内投与して得られる発光画像から抗ガン剤の効果を評価する際に汎用されている。いわゆるレポーターマウスを用いる方法であり、Luciferin-Luciferase 系以外にも GFP を用いる系などがある(49)。感度は発光では 10^{-17} M, 蛍光では 10^{-12} M と考えられている(49)。小動物用測定装置としては6社ほどから発売されているが、これらのいくつかを使用した経験からみて、光技術ないしはレポーターマウスは多少の問題点はあるものの、有用性の高い薬理的評価法ないしは分子イメージング法に成長することは確実と感じている。

AD 関連では黄色蛍光タンパクと A β を共発現させたダブル Tg マウスが報告されている(50)。同マウスを用いることによりインビボにおいてプローブなしに A β をイメージングすることが可能である。

7. プローブの更なる最適化および更なる発展性

今後より非特異的結合の少ないアミロイドイメージング用 PET プローブを目指して更なるプローブの最適化が加えられるであろうと思われる。^[18F]FDDNP から始まる数プローブを第1世代と呼ぶならば、誰もが納得するプローブは第2または第3世代のそれ(ら)になるのかもしれない。特により臨床有用性の高い^[18F]標識プローブ、また前述したように A β または過剰リン酸化タウタンパクのいずれか一方に選択性の高いプローブの開発に向けて研究が進んでいる。アミロイドイメージングというこの診断法がもっている本質的に極めて優れた特長が生かされ、欠点が解消されたプローブを目指して各チームの努力、そしてプローブの更なる進化も続いている。

これまで述べてきたプローブは総てタンパクの β シート構造を認識する化合物群である。タンパクの β シート構造とこれに関連する疾病に目を向けてみると、同シート構造をとったタンパクの出現が病因、または病因の一部に関与していると考えられている疾病、さらに同シート構造をとったタンパクをマーカーとして検出することが診断の物差しとなりうる疾病には、AD 以外に多数存在することが知られている。これらの疾病はタンパクの高次構造の変化により疾病が引き起こされるという概念から、コンフォメーション病(またはフォールディング病)とも呼ばれ、多くの神経変

性疾患、神経難病疾患が含まれている。今回述べてきたプローブは AD 特有の2つのタンパクの β シート構造を認識することは明らかではあるが、同時にこれらのプローブおよびその周辺化合物はコンフォメーション病特有の β シート構造を取ったタンパクを認識する、すなわち(AD 診断プローブと同じようなストラテジを導入することにより)診断プローブとなりうる可能性、さらに同シート構造を認識することを介して同シート構造をとるタンパクの産生を抑制する、すなわち治療薬となる可能性が示唆されており(51-53)、著者らもこれらに関していくつかの成果を得ている。

アミロイドイメージング(およびその周辺技術)は、AD(および周辺疾患)の早期、鑑別、発症前診断を可能とすることから、結果として、また波及効果として得られる患者(予備軍)・家族、臨床家、そして社会、国民の保健・医療福祉に対する福音および医療経済的節約効果は多大なものになるであろう。

文 献

- 1) Schenk D, et al. Nature. 1999;400:173-177.
- 2) Bard F, et al. Nat Med. 2000;6:916-919.
- 3) Hock C, et al. Nat Med. 2002;8:1270-1275.
- 4) Hara H, et al. J Alzheimers Dis. 2004;6:483-488.
- 5) Tabira T, et al. Rinsho Shinkeigaku. 2004;44:778-780.
- 6) Oddo S, et al. Neuron. 2004;43:321-332.
- 7) John V, et al. J Med Chem. 2003;46:4625-4630.
- 8) Schmidt B. Chembiochem. 2003;4:366-378.
- 9) Tian G, et al. J Biol Chem. 2002;277:31499-31505.
- 10) Takahashi Y, et al. J Biol Chem. 2003;278:18664-18670.
- 11) Kimura T, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2004;14:1527-1531.
- 12) Kimura T, et al. Bioorg Med Chem Lett. 2005;15:211-215.
- 13) Petersen RC, et al. JAMA. 1995;273:1985-1992.
- 14) Winblad B, et al. J Intern Med. 2004;256:240-246.
- 15) Gomez-Isla T, et al. J Neurosci. 1996;16:4491-4500.
- 16) Price JL, et al. Ann Neurol. 1999;45:358-368.
- 17) The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer's Association and National Institute on Aging Working Group. Consensus Report on: "Molecular and Biochemical Markers of Alzheimer's Disease". Neurobiol Aging. 1998;19:No.2.
- 18) Klunk WE, et al. Neurobiol Aging. 1994;15:691-698.
- 19) Klunk WE, et al. Neurobiol Aging. 1995;16:541-548.
- 20) Styren SD, et al. J Histochem Cytochem. 2000;48:1223-1232.
- 21) Klunk WE, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2002;61:797-805.
- 22) Skovronsky DM, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:7609-7614.
- 23) Zhuang ZP, et al. J Med Chem. 2001;44:1905-1914.
- 24) Klunk WE, et al. Life Sci. 2001;69:1471-1484.
- 25) Zhuang ZP, et al. Nucl Med Biol. 2001;28:887-894.
- 26) Ono M, et al. Med Biol. 2003;30:565-571.
- 27) Kung MP, et al. Brain Res. 2002;956:202-210.
- 28) Zhuang ZP, et al. J Med Chem. 2003;46:237-243.
- 29) Agdeppa ED, et al. J Neurosci. 2001;21:RC189.
- 30) Jacobson A, et al. J Am Chem Soc. 1996;118:5572-5579.
- 31) Shoghi-Jadid K, et al. Am J Geriatr Psychiatry. 2002;10:24-35.
- 32) Klunk WE, et al. Ann Neurol. 2004;55:306-319.
- 33) Verhoeff NP, et al. Am J Geriatr Psychiatry. 2004;12:584-595.
- 34) Klunk WE, et al. Neurobiol Aging. 2004;25: No. S2, p. S232.
- 35) Shimadzu H, et al. J Label Compd Radiopharm. 2003;46:765-772.
- 36) Suemoto T, et al. Neurosci Res. 2004;48:65-74.
- 37) Shimadzu H, et al. J Label Compd Radiopharm. 2004;47:181-190.

- 38) Okamura N, et al. *J Neurosci*. 2004;24:2535-2541.
- 39) Okamura N, et al. *J Mol Neurosci*. 2004;24:247-255.
- 40) Ohhashi Y, et al. *J Biochem*. 2002;131:45-52.
- 41) Tycko R. *Biochemistry*. 2003;42:3151-3159.
- 42) Lockhart A, et al. *J Biol Chem*. 2005;280:7677-7684.
- 43) Small GW, et al. *J Mol Neurosci*. 2002;19:323-327.
- 44) Hardy J. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31:1539-1540.
- 45) Mathis CA, et al. *J Med Chem*. 2003;46:2740-2754.
- 46) Ono M, et al. *Nucl Med Biol*. 2003;30:565-571.
- 47) Higuchi M, et al. *Nat Neurosci*. 2005;8:527-533.
- 48) Fujita M, et al. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. Lippincott Williams & Wilkins. 2002. p. 411-425.
- 49) Maggi A, et al. *TIPS*. 2004;25:337-342.
- 50) Brendza RP, et al. *J Clin Investigation*. 2005;115:428-433.
- 51) Bresjanac M, et al. *J Neurosci*. 2003;23:8029-8033.
- 52) Sadowski M, et al. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63:775-784.
- 53) Ishikawa K, et al. *J General Virology*. 2004;85:1785-1790.

著者プロフィールは 125(4)235 頁をご参照ください。

ORIGINAL ARTICLE

Development of amyloid imaging PET probes for an early diagnosis of Alzheimer's disease

YUKITSUKA KUDO

Tohoku University Biomedical Engineering Research Organization (TUBERO), Sendai, Japan

Abstract

Progressive accumulation of senile plaques (SPs) is one of the major neuropathological features of Alzheimer's Disease (AD) that precedes cognitive decline. Noninvasive detection of SPs could, therefore, be a potential diagnostic test for early or presymptomatic detection of AD patients. For this purpose, many attempts have been made to visualize AD-specific pathological changes in the living brain. Currently, a most practical method for the *in vivo* measurement of SP depositions is using positron emission tomography (PET) and contrast agent that specifically label SPs. We have developed a novel compound 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl) ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy] benzoxazole (BF-227) as a candidate for an amyloid imaging probe for PET. BF-227 displayed high affinity to synthetic amyloid β fibrils and clearly stained both SPs and diffuse plaques in AD brain sections. Intravenous administration of [^{11}C]BF-227 into normal mice indicated that this labeled tracer readily penetrated the blood brain barrier (BBB) and was washed out quickly from brain tissue. Currently, we have investigated the clinical trial of [^{11}C]BF-227 in healthy subjects and AD patients.

Key words: Alzheimer's disease, early diagnosis, amyloid imaging probes, senile plaques, positron emission tomography

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent cause of dementia characterized by irreversible impairment of the cognitive function with accumulation of senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles (NFTs). It is well known that the pathological features in AD brains, especially accumulation of SPs, precede the clinical symptoms by more than a decade. These several lines of evidence indicate the existence of a temporally wide dissociation between the clinical and neuropathological features of AD. Direct imaging of SPs in patients with AD *in vivo* would be very useful for the early or presymptomatic diagnosis of AD.

For early diagnosis of AD, several imaging techniques have been developed that can noninvasively detect SPs in the brain using positron emission tomography (PET), single photon emission computed tomography (SPECT), and magnetic resonance imaging (MRI).

SPs are composed of the amyloid- β protein ($A\beta$), which is proteolytically cleaved from amyloid precursor proteins (1). NFTs, in contrast, are composed of phosphorylated tau(2). Many attempts have been made to visualize AD-specific pathological changes in the living brain. Currently, a most practical method for the *in vivo* measurement of SP depositions uses PET and a contrast agent that specifically labels SPs (3). The development of amyloid imaging agents starts with Congo-red and thioflavin-T, which have been commonly used for histochemical staining of amyloid. However, these agents lack some characteristics for suitable amyloid imaging probes as shown in Table I. In the past 10 years many candidate agents have been developed for amyloid imaging probes with different chemical structures and properties (Figure 1). A Congo-red derivative, Chrysamine-G was first introduced as a candidate for an *in vivo* probe of amyloid deposition (4). As a consequence of compound optimization, (trans, trans)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-1,4-hydroxy) styrylbenzene

Table I. Requirements for amyloid imaging probes for clinical application

- High binding affinity to amyloid- β fibrils
- Selective binding to amyloid plaques
- High BBB permeability
- Fast clearance from normal brain tissue
- Metabolic stability
- Drug safety

(BSB) and methoxy-X04 have successfully visualized the brain amyloid deposits of APP transgenic mice after intravenous administration of these compounds (5,6).

The first clinical amyloid imaging of the brain of AD patients used [^{18}F] 2-(1-{ 6-(2-fluoroethyl)-methyl-amino}-2-naphthyl } ethylidene) malononitrile ([^{18}F]FDDNP) (7). The following second and third imaging used *N*-methyl-[^{11}C]2-(4-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole ([^{11}C]PIB) and [^{11}C]4-*N*-methylamino-4-hydroxystilbene ([^{11}C]SB-13), respectively (8,9).

However, FDDNP has some weakness in practical use due to their considerable amount of nonspecific accumulation in normal brain tissue (10).

Compared with controls, AD patients typically showed marked retention of [^{11}C]PIB in areas of association cortex known to contain large amounts of amyloid deposits in AD. In the AD patient group, PIB retention was increased most prominently in the frontal cortex. Large increases were also observed in parietal, temporal, and occipital cortices and the striatum. [^{11}C]PIB retention was equivalent in AD patients and controls in areas known to be relatively unaffected by amyloid deposition (such as subcortical white matter, pons, and cerebellum) (8). The high retention of [^{11}C]PIB in the frontal cortex conflicts with evidence from postmortem studies, in which the amyloid load is rarely highest in the frontal cortex (3).

Another amyloid imaging probe [^{11}C]SB-13 was also applied in a human PET study and exhibited binding properties similar to [^{11}C]PIB (9).

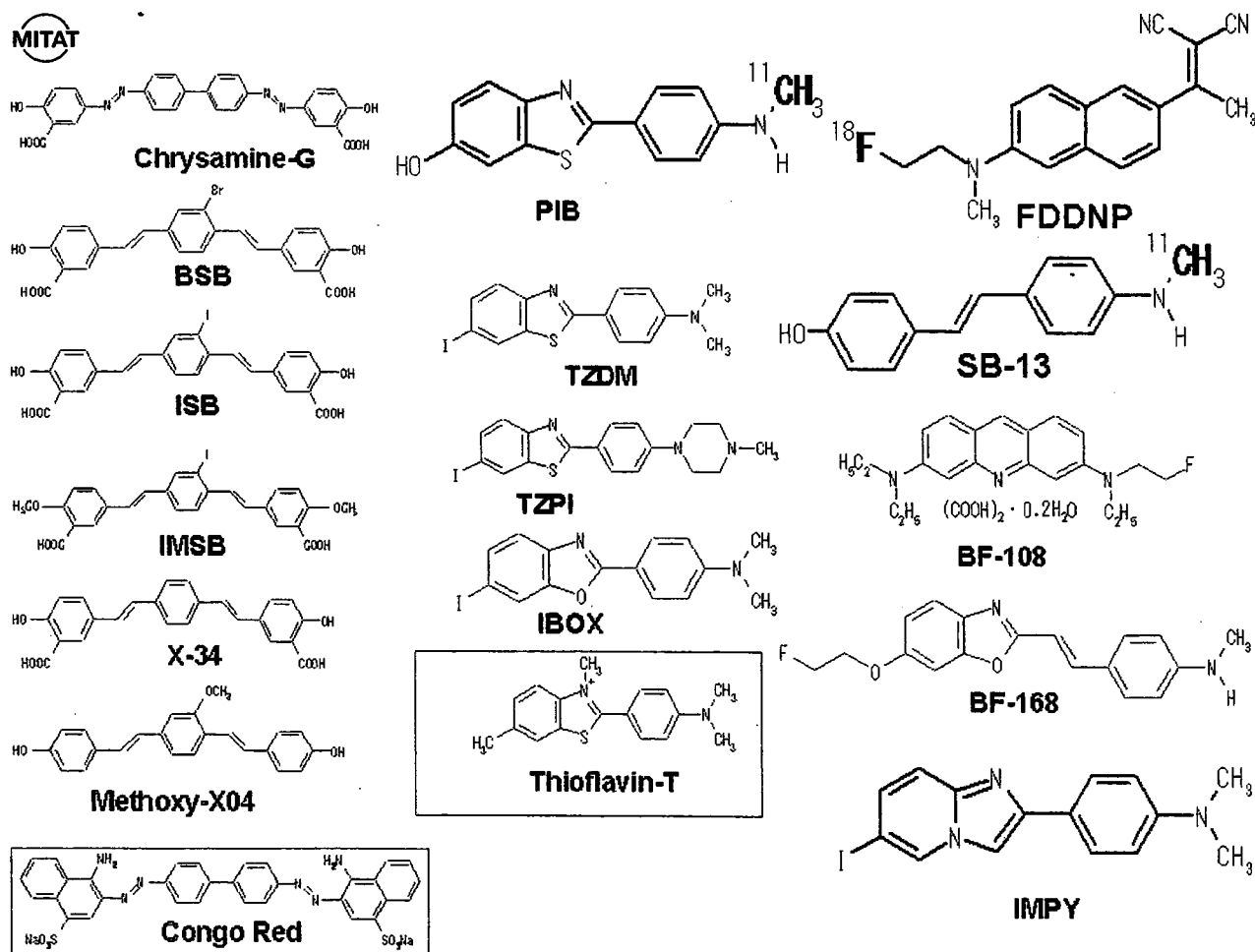


Figure 1. Chemical structures of imaging probes for *in vivo* detection of amyloid.

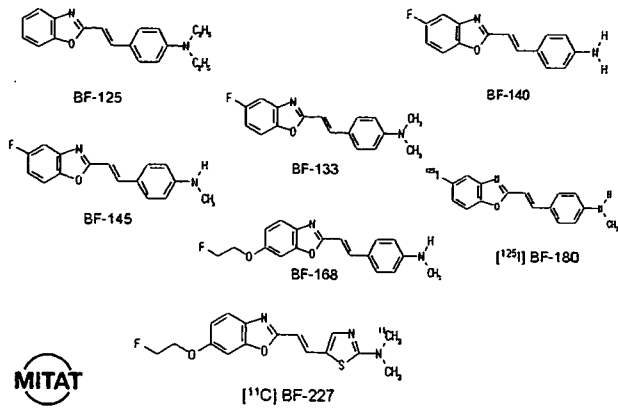


Figure 2. Chemical structures of our benzoxazole derivatives.

In Japan, our team has developed amyloid imaging probes since 1997 (Figure 2). We have previously reported a novel series of compounds including 6-(2-fluoroethoxy)-2-[2-(4-methylaminophenyl) ethenyl]-benzoxazole (BF-168), [2-(4-methylaminophenyl) ethenyl]-5-fluorobenzoxazole (BF-145) as promising candidates for *in vivo* imaging probes of SPs(11–13). These benzoxazole derivatives showed comparatively high permeability of blood-brain barrier (BBB), high affinity for A β aggregates, and high specificity for amyloid plaques including diffuse plaques, which suggests potential merit for detection of AD-related pathology. However, for application of these derivatives in a clinical PET study, we need to optimize the pharmacokinetic and safety of these molecules, and introduce an optimized derivative 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl) ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy] benzoxazole (BF-227) as a candidate probe for *in vivo* imaging of amyloid in humans.

Material and methods

Affinity for synthetic A β 1-42

Binding affinity of BF-227 for synthetic A β 1-42 aggregates was examined as reported previously (12). Briefly, the binding assay was performed by mixing aliquot of aggregated A β 1-42 with ^{125}I -labeled BF-180 (Figure 2).

Neuropathological staining in AD brain section

Postmortem brain tissues from autopsy-conformed AD cases were obtained from Fukushima Hospital (Toyohashi, Japan). Experiments were performed under regulations of the ethics committee of the BF Research Institute. Brain sections were immersed in 100 μM of BF-227 solution containing 50 % ethanol.

BBB permeability of $[^{11}\text{C}]$ BF-227 in normal mice

Brain uptakes of BF-227 were measured using ^{11}C -labeled compound. $[^{11}\text{C}]$ BF-227 was administered into the tail vein of normal mice. The mice were then sacrificed by decapitation at 2 and 60 min post injection (p.i.). The brains were removed and weighted, and the radioactivity was counted with an automatic γ -counter.

Acute and subacute toxicity of BF-227

Non-GLP toxicity study was carried out using female and male mice.

Other actions of BF-227

Postmortem brain section from autopsy-conformed AD cases was immersed in saline containing $[^{11}\text{C}]$ BF-227, dipped in water, washed with EtOH, dried, and an autoradiographic image of the dried section was obtained using BAS-5000 phosphorimaging system (Fujifilm, Japan).

Ex vivo plaque labeling with BF-227 was evaluated using PS1/APPsw double transgenic mice. A BF-227 solution was administered into the tail vein.

Results

Affinity for synthetic A β 1-42

The K_i value for A β 1-42 fibrils in competitive binding assay using $[^{125}\text{I}]$ BF-180 was 4.3 ± 1.3 nM in BF-227 (K_d value of $[^{125}\text{I}]$ BF-180: 10.8 ± 1.5 nM). This result suggests that BF-227 has a high binding affinity for A β 1-42 fibrils.

Neuropathological staining in AD brain section

BF-227 clearly stained many SPs and diffuse plaques. This staining pattern corresponded to that of A β immunostaining in the adjacent section (Figure 3).

BBB permeability of $[^{11}\text{C}]$ BF-227 in normal mice

Intravenous administration of $[^{11}\text{C}]$ BF-227 into normal mice indicated that this labeled tracer readily penetrated the BBB (7.9 %ID/g at 2 min p.i.) and was washed out quickly (0.64 %ID/g at 60 min p.i.) from brain tissue.

Acute and subacute toxicity of BF-227

In an acute toxicity study, the lethal dose of BF-227 was larger than 10mg/kg (i.v.) for male and female