

200812039A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

タウイメージングによるアルツハイマー病診断

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 工藤 幸司

平成21年（2009年） 4月

# 目 次

## I. 総括研究報告

タウイメージングによるアルツハイマー病診断 -----1

工藤 幸司（東北大学未来医工学治療開発センター）

## II. 分担研究報告

1. アルツハイマー病患者脳標本における化合物の染色性 -----25

工藤 幸司（東北大学未来医工学治療開発センター）

2. タウ画像化プローブの脳移行性評価研究 -----35

古本祥三（東北大学加齢医学研究所）

3. アルツハイマー病患者脳切片におけるオートラジオグラフィ

およびタウ凝集評価システムの構築 -----45

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----55

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----57

# 総括研究報告

# 厚生労働科学研究費補助金

(医療機器開発推進研究)

平成 20 年度 総括研究報告書

## タウ イメージングによるアルツハイマー病診断

研究代表者 工藤幸司 東北大学未来医工学治療開発センター・教授

**研究要旨：** 3年計画の1年度目(平成20年度;当該年度)の研究計画は、専らアルツハイマー病診断に用いるタウイメージング用PETプローブの最適化を図ることであった。当該研究の外部環境は当該年度中に劇的な変化を見せている。即ち、アミロイド仮説に基づく治療薬群(生物製剤を含む)が期待をはるかに下回る効果しか示さなかったこと、アミロイドβ蛋白に結合する代表的PETプローブを用いたアルツハイマー病診断において相当の偽陽性が見られたことから、治療薬においてはタウをターゲットにした戦略の、また診断においてはタウイメージングの重要性がさらに強調されつつある。タウイメージングプローブを開発するために146化合物をスクリーニングし、6化合物にアルツハイマー病患者脳標本のタウにおいて明瞭な染色像が観察された。その中で2化合物はタウイメージング用近赤外線蛍光プローブとして使用できるとともに、いわゆるハイブリッドプローブとしてタウイメージング用PETプローブとしても応用できる可能性が示唆された。脳移行性試験では検討した5化合物はいずれも十分なる脳移行性を示し、うち4化合物が十分なる脳からのウオッシュアウトを示した。これらの化合物はいずれも新しい化合物群である。今後の最適化化合物のドラッグデザインにこれらの知識を生かしたい。アルツハイマー病患者脳を用いたオートラジオグラフィ実験では $^{18}\text{F}$ THK-2153、 $^{11}\text{C}$ THK-1062の集積像はタウ特異的選択的であり、また $^{18}\text{F}$ THK-2153の集積の大部分は同化合物の非標識体を付加することによりブロックされたことから、2年目、3年目にむけてプロミシングなプローブの開発に目処がついたと感じている。インビトロにおけるβシート構造をとったタウはミュタントのタウであるK18(KΔ280)を使用して、今後研究を進める予定である。以上、今後これらの化合物にさらなる最適化を加え、平成22年度(3年計画の3年目)中にはアルツハイマー病診断に画期的な進歩をもたらすことが確実であろうタウイメージング用PETプローブ(日本発、世界初)を開発したい。

分担研究者	岡村信行	東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野・講師
分担研究者	古本祥三	東北大学加齢医学研究所 機能画像医学研究分野・助教
分担研究者	荒井啓行	東北大学加齢医学研究所加齢老年医学分野・教授
分担研究者	谷内一彦	東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野・教授

### A 究目的

本課題はアルツハイマー病(AD)発症前からの病理像のうち、過剰リン酸化タウ蛋白を主構成成分とする神経原線維変化(以下これらをまとめてタウ)に特異的選択的に結合し、しかも血液-脳関門を容易に透過するプローブ

(=低分子有機化合物)を見だし、このプローブをPET(Positron Emission Tomography; 陽電子断層撮影装置)で扱える核種で標識後、静脈内投与して、PET画像を基に脳内標識プローブの集積(=タウの集積)の定量およびその空間的分布からADを診断しようとするも

のである。

ADにおいては患者の周辺または臨床家がこの疾患特有の臨床症状に気付いた時には、アミロイドβ蛋白を主構成成分とする老人斑（以下これらをまとめてAβ）およびタウはもはや手の施しようのない状態まで進んでいることが知られている。すなわち、現状のAD診断を癌のそれに例えらるなら、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、ADの一部前駆状態と考えられているMCI (Mild Cognitive Impairment; 軽度認知障害)に相当するVery Mild ADという極めて早期の症例であっても、その剖検例ではすでに多数のAβおよびタウが出現し、病理学的にはすでに立派なAD状態であることが明らかにされていることから、ADは物忘れ症状が発現するかなり以前からその病理像がスタートしていることになる。つまりADの病理像と臨床像との間には極めて大きな乖離が存在していることになる（いわゆるPathological ADとClinical ADとの乖離）。

AD脳におけるAβとタウの蓄積のスタートは図1に示すようにAβの方が10年以上先行していると考えられている。図1からも明らかなようにADを超早期ないしは発症前に診断するためにはAβを追跡することが最も妥当と考えられたことから、20世紀から21世紀にかけてのAD診断用PETプローブの殆どすべてがAβを追跡する、いわゆるアミロイドイメージング用プローブであった（図2）。当初は<sup>11</sup>C標識プローブが主であったが、その後、半減期が長く、臨床で使用しやすい<sup>18</sup>F標識プローブの開発が試みられている。

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<sup>1)</sup>。この栄誉に浴したのにはUCLA Barrioらのチーム、プローブは<sup>18</sup>FJFDDNPであった。しかし、その後、アミロイドイメージングプローブの主流となったのは、今や臨床例1000例を超すであろうピッツバーグ大学・General Electricの<sup>11</sup>CPIBである。

AD診断におけるアミロイドイメージングは高い感度および特異度をもって同病を診断できると共に、早期診断、鑑別診断、重症度（ないしは進行度）診断、さらに発症前診断（いわゆる発症前高リスク者の検出）をも可能にする、いわゆる万能診断法であろうと多くの研究者が想定していたことは確実であり、研究代表者らもそう考えていた。

しかし臨床研究が進むにつれ、万能診断法と考えられていたアミロイドイメージングにも少しずつ綻びが表れてきた。それらの綻びを<sup>11</sup>CPIBを例に説明すると、以下のとおりである。

まず第1に重症度（ないしは進行度）診断が不可能であることが挙げられる。すなわち<sup>11</sup>CPIBによってADと診断された患者の2年後においては、臨床症状の進行の早遅に関係なく同プローブの集積に増減が全く見られなかった<sup>3)</sup>。これはAD発症をさかのぼるMCIのはるか以前にすでに<sup>11</sup>CPIBが結合するAβの蓄積はプラトー状態に達しているためと考えられている。したがって<sup>11</sup>CPIBではアルツハイマー病の重症度ないしは進行度は診断不可能である。

次はかなりの偽陽性者が見られるという問題である。2008年7月シカゴでの国際アルツハイマー病学会に先駆けて開催されたADNI (Alzheimer's Disease Imaging Initiative)において健常高齢者の53%が<sup>11</sup>CPIB陽性であったという驚くべき報告がなされた<sup>4)</sup>。AD発症率は65歳以上人口の4から6%と考えられているが、ADNIの報告はAD患者を除いた高齢者の53%が<sup>11</sup>CPIB陽性であったということである。53%は多少over estimateと研究代表者は考えるが、<sup>11</sup>CPIBの開発者自身、かなりの偽陽性が現れることを認めている<sup>5)</sup>。

なぜこれほどの偽陽性者が出るかについては以下のように説明できると研究代表者は考えている。図3に研究代表者らが開発したアミロイドイメージングプローブ<sup>11</sup>CBF-227のヒトにおけるPET画像を示したが、図3からでも明らかなように、脳内Aβの蓄積量と認知症状との間の相関はそれほど高くはないことが示唆される。すなわち正常健常者、MCIおよびADのいずれにおいてもAβ蓄積にはかなりのばらつきが存在する。<sup>11</sup>CBF-227は<sup>11</sup>CPIBに比較して正常健常者における偽陽性者が極めて少ないプローブであることが判明しているが、そのプローブ<sup>11</sup>CBF-227においてでさえ図3の結果である。<sup>11</sup>CPIBを用いて図3を描いたならばおそらくNormal（正常健常者）の約半数に高集積者が見られたのであろう。

さらに2008年6月から7月にかけて、それまでADの病因の主流を占めていたAD・アミロイド（ないしはAβ）仮説に基づく根本治療薬として大きな期待をかけられていた治療薬（ワクチンおよびセクレターゼ阻害薬類）群の効果がいずれもはるかに期待を下回る成績しか得られなかったことが次々と報告された。そ

の中でも最も衝撃を受けたのはA $\beta$  ワクチンによりAD患者の脳内からA $\beta$ は除去されたが、それにもかかわらず臨床症状の進行は全く食い止めることができなかった、というLancetのHolmesらの報告であった(表2にそのデータを示した)<sup>9</sup>。表2の症例7および8ではA $\beta$  ワクチンにより脳内A $\beta$ はほぼ完全に除去されたにも関わらず、認知機能テストとしてのMMSEスコアは0であった。

しかしこのLancetの報告にはもう1つの重要な情報が記載されていた。即ちLancetの患者のタウ蓄積度はすべて最終Stageまで進行していたことであった(表2参照)。図4にADにおけるA $\beta$ とタウの蓄積のBraakのstageを示したが、症例7および8の死亡後のBraakのStageを見てみると見てみると、A $\beta$ 蓄積はCases devoid of amyloid (またはStage A)と考えられたが、一方タウ蓄積はStage VIであった。すなわち両症例においてはA $\beta$ 蓄積は軽度以下であるが、タウは最も蓄積レベルの高いStage VIであったことを意味している。

このことはAD発症後のA $\beta$  ワクチンは治療薬としての効果が乏しいことを示唆するとともに、A $\beta$ の蓄積度は必ずしもADの重症度を反映していないことを強く示唆するとともに、ADの重症度診断はA $\beta$ を追跡するよりも、タウを追跡する方がより妥当性が高いことをも強く示唆している。

ワクチン類、その他の治療薬およびアミロイドイメージングプローブの臨床成績から、ADにおけるアミロイド(ないしはA $\beta$ )とタウとの関連は図5に改められるべきであろう、と研究代表者ら考えている。図5に示すようにアミロイド蓄積がそれほど多くない場合でも、タウ蓄積が閾値に達するとMCI、ADが発症し、またアミロイドが蓄積が極めて多くても、タウ蓄積が閾値に達しない場合、MCI、ADは発症しない。つまり、アミロイド蓄積の多寡は、MCI、AD発症には関係なく、タウ蓄積がこれを規定する。言い換えると「アミロイド(ないしはA $\beta$ )には閾値がない、タウには閾値がある」、が研究代表者らの提唱である。

以上述べてきたようにADの重症度(ないしは進行度)診断、また真のADの発症前高リスク者の正確な抽出にはタウイメージングの方が優れていることが強く示唆される。

「将来のAD診断はタウイメージングが主役であり、これを補うのがアミロイドイメージング」であることは確実であろうと研究代表者らは考えている。

以上、当該研究を取り囲む外部環境の変遷について述べてきたが、以下当該研究の本年度の進捗について述べる。

3年計画の1年度目(平成20年度;当該年度)の研究計画は、専らタウイメージング用PETプローブの最適化を図ることであった。

さて、開発に成功すればAD診断に画期的な進歩をもたらすことが確実であろうタウイメージング用PETプローブであるが、その開発には工藤らの分担研究報告「アルツハイマー病患者脳標本における化合物の染色性」で述べたとおり、解決することが難しいいくつかの問題がある。

その解決策として、インビトロにおける試験には岡村らの「アルツハイマー病患者脳切片におけるオートラジオグラフィおよびタウ凝集評価システムの構築」および工藤らの「アルツハイマー病患者脳標本における化合物の染色性」で述べたとおりミュータントのタウ蛋白であるK8(K $\Delta$ 280)を使用する評価法の確立を試み、またADのタウそのものを用いる評価法、すなわちAD患者脳標本におけるタウの染色性、およびオートラジオグラフィについて検討した。

AD診断用PETプローブには速やかに脳へ移行するとともに、標的部位(この場合はタウ)以外からはまた、速やかにウオッシュアウトされることが求められる。古本らは分担研究報告書「タウ画像化プローブの脳移行性評価研究」において5化合物の脳移行性を評価した。

## B.研究方法

### 1. スクリーニングに用いた化合物

まず、化合物供給商社の膨大な化合物ライブラリーの中から、タウイメージング用プローブのシードになりうる化学構造を有していると研究代表者らが判断した化合物群、次いで幾つかの基礎的なスクリーニングの結果を基に、研究代表者らが更なる作用の増強を目論んでドラッグデザインした、いわゆる最適化合物を、それぞれ119化合物および31化合物、計150化合物を入手した。

2. AD患者脳標本における化合物による染色  
病理学的にアルツハイマー病と確定診断された症例のパラフィン包埋脳標本を使用した。パラフィン包埋された脳組織は厚さ  $8\mu\text{m}$  で薄切し、ポリ-L-リジンコート付きのスライドグラス (MICRO SLIDE GLASS, S7441, MATSUNAMI) 上に伸展、乾燥させたものを使用した。

パラフィン脳切片は、100% xylene 10分間×2回、100% ethanol 5分間×2回、95% ethanol 5分間、90% ethanol 5分間、流水洗浄 10分間の順で脱パラフィン化した。

化合物による染色の前処理として、リポフスチンによる自己蛍光を除去する処理を行った。脱パラフィン化した脳切片を、PBS 5分間、0.25%  $\text{KMnO}_4$  20分間、PBS 2分間×2回、0.1%  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  / oxalic acid 約5秒、PBS 2分間×3回の順で処理を行った。

各化合物は100%エタノールを  $200\mu\text{M}$  の濃度に溶解後、純水で  $100\mu\text{M}$  に希釈した。

脱パラフィンおよびリポフスチン自己蛍光除去処理した脳切片に、 $100\mu\text{M}$  化合物溶液を滴下し 10分間反応させた後、水道水で数回洗い反応を止めた。蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i, Nikon) で観察し、デジタルカメラ (DXM 1200F, Nikon) で撮影した。

なお、近赤外線蛍光化合物で染色した際の撮影には、長波長用デジタルカメラ (ROPER SCIENTIFIC Cool SNAP ES) を用いた。

### 3. 線維化タウ蛋白の作製とチオフラビン法による測定

メルボルン大学において作成したミュータントのタウ蛋白である K18(K $\Delta$ 280)を使用した。 $10\mu\text{M}$  の K18(K $\Delta$ 280)を  $5\mu\text{M}$  ヘパリン/PBS pH 7.4 とともに室温で3日間、1200rpm でインキュベートした。線維化したタウをチオフラビンT溶液と混合し、線維形成度を励起波長  $440\text{nm}$  で蛍光スペクトルを測定することにより評価した。比較のため buffer の蛍光スペクトルも同様に測定した。さらにタウの線維化を確認するため、電子顕微鏡 (Tecnaï G2 electron microscope) を用いて観察を行った。

### 4. 脳移行性評価

THK-1017、-1043、-1049、-1062、-2352 の5化合物のうち、前半の3化合物は非標識体を用いて HPLC (SHISEIDO NANOSPACE SI-2) で、後半2化合物はポジロン標識体を用いて  $\gamma$  カウンター (アロカ、AccuFLEX $\gamma$ 7000) で測定

した。マウスは、体重  $30\text{--}40\text{g}$ 、7週齢の Slc:ICR 雄性マウスを1群4匹として実験に用いた。

### 5. オートラジオグラフィー実験

AD パラフィン包埋脳切片 (前頭葉および海馬) を脱パラフィン後、PBS に10分浸した。約  $400\mu\text{Ci/ml}$  の  $^{18}\text{F}$  THK-2153、 $^{11}\text{C}$  THK-1062 または  $^{11}\text{C}$  BF-227 を切片に滴下し、室温で10分間反応させた。 $^{18}\text{F}$  THK-2153 に関しては  $10\mu\text{M}$  の非標識 THK-2153 との混合溶液も用いて同様に実験を行った。その後、蒸留水に2分間浸漬し、続いて50% EtOH 内で2分間軽く振盪、その後再び蒸留水に2分間浸漬した後、パラフィン伸展器にて切片を乾燥させた。その後、切片をイメージングプレートにコンタクトして一晩静置し、翌日 BAS5000 (富士フィルム) にて画像の読み取りを行った。さらに連続切片を抗  $\text{A}\beta$  抗体 (6F3D)、抗タウ抗体 (AT8) を用いて免疫染色し、老人斑および神経原線維変化の分布を確認した。

### (倫理面への配慮)

AD患者脳標本を使用する場合、ヘルシンキ宣言を基準として倫理面に配慮し、東北大学医学部倫理委員会の承認を得た上で使用する。

新規標識プローブを用いた探索的PET臨床研究では「東北大学における新規PET薬剤の臨床開発の指針」に従って、東北大学放射性薬剤品質管理委員会、同放射性核種を用いる臨床研究委員会、同医学部倫理委員会の承認を得るとともに東北大学利益相反マネジメント委員会の承認を得た上で実施する。

また臨床研究においてはヘルシンキ宣言を基準として倫理面に十分配慮し、研究の目的、ご協力いただきたい内容、PET検査の概要、予想される危険性・副作用、健康被害が生じた場合の補償、プライバシー (秘密) の保護、検査内容・結果の説明、研究結果の公表、利害関係 (利益相反)、問い合わせ・苦情の窓口等について患者様および家族に十分なる説明を行うとともに「患者様とご家族へのご協力の同意文書」、または「被験者の方への協力の同意文書」に同意・署名 (インフォームド・コンセント) をいただいた上で実施する。

動物実験においては、東北大学における動物実験に関する指針 (S63.3.24) に従い、十分なる愛護精神をもってできるだけ動物に苦痛を与えぬように配慮する。放射性同位元素を取

り扱う試験においては 東北大学放射線障害予防規定 (H14.6.18) を遵守し、被曝および汚染の防護に努める。

## C. 研究結果

### 1. スクリーニングに用いた化合物

平成 21 年 3 月 31 日までに化合物供給商社から購入した 119 化合物、最適化 31 化合物計 150 化合物のうち、それぞれ 119 化合物および 27 化合物、計 146 化合物を試験に供した。

### 2. AD 患者脳標本における化合物による染色

図 6-1 および 6-2 に AD 患者脳標本においてタウを特異的選択的、且つ明瞭に染色した化合物 (THK-1043、-1061、-1062、-1074、-2153、-960 および-6034) の染色像を示した。

近赤外線蛍光化合物 (THK-960 および-6034) 以外の化合物では、特に以下の 3 化合物がタウに親和性が高いと判断された。THK-1074 は典型的なタウに加えてニューロピルスレッド (背景の糸くず状の構築物; ニューロンの樹状突起に蓄積したタウ由来と考えられている) が見られたこと、THK-2153 は染色像が明瞭かつ抗リン酸化タウ抗体染色とほぼ類似した位置に染色像が見られたこと、THK-6024 はディストフィックニューライト (この構築物は老人斑と共存し、あたかも老人斑の上に乗ったような状態のタウをディストフィックニューライトと呼ぶあたかも老人斑の上に乗ったような状態のタウ) が見られたこと、である。

近赤外線蛍光化合物 THK-960 および-6034 は AD 患者脳標本においてタウに対して極めて明瞭な染色性を示した。

### 3. 線維化タウ蛋白の作製とチオフラビン法による測定

タウ蛋白の結合実験系を確立するため、線維形成性が高いとされているミュータントのタウ蛋白である K18(KA280) の凝集を試みた。その結果、ヘパリンを混合することで効率よくタウ蛋白の線維化が促進され、チオフラビン T の蛍光増強を確認できるレベルに達した (図 7A)。さらに電子顕微鏡にて線維化像を確認することができた (図 7B)。

### 4. 脳移行性評価

THK-1017 は投与 2 分後で最も高い脳内移行性を示し、その他の化合物も十分なる脳移行性を示した。THK-1017、-1043、-1049、-1062 はいずれも投与後 30 分で、2 分後よりも 20 分の

1 以下の集積率であった (表 2)。

## 5. オートラジオグラフィー実験

前頭葉および海馬の連続切片を用いて、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-2153}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-1062}$  および  $\text{A}\beta$  を検出するプローブである  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  を用いて、これらの化合物の老人斑、神経原線維変化との結合性をオートラジオグラフィーにて比較した。図 8 に示すように、前頭葉脳切片では  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  の顕著な集積が観察されたものの、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-2153}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-1062}$  の集積は目立たなかった。一方、海馬脳切片では  $[^{18}\text{F}]\text{THK-2153}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-1062}$  の集積が観察され、 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  とは異なる集積分布を示した (図 8)。海馬における  $[^{18}\text{F}]\text{THK-2153}$  の集積の大部分は同化合物の非標識体を付加することによりブロックされた (図 9)。海馬脳切片における  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  の集積部位は、 $\text{A}\beta$  免疫染色で老人斑の沈着が多数観察される部位に一致していた (図 10)。同部位における  $[^{18}\text{F}]\text{THK-2153}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-1062}$  の集積は  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  に比べて軽微であった。一方、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-2153}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-1062}$  の集積を認めた部位では、タウ免疫染色陽性の神経原線維変化の沈着が確認されたが、同部位の老人斑の沈着は軽微であり、 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  の集積は目立たなかった (図 10)。

## D. 考察

3年計画の1年度目 (平成20年度; 当該年度) の研究計画は、専らタウイメージング用PETプローブの最適化を図ることであった。当該研究の外部環境は当該年度中に劇的な変化を見せている。即ち、アミロイド仮説に基づく治療薬群 (生物製剤を含む) が期待をはるかに下回る効果しか示さなかったこと、アミロイド  $\beta$  蛋白に結合する代表的PETプローブを用いたアルツハイマー病診断において相当の偽陽性が見られたことから、治療薬においてはタウをターゲットにした戦略の、また診断においてはタウイメージングの重要性がさらに強調されつつある。

タウイメージングプローブを開発するために 146 化合物をスクリーニングし、6 化合物に AD 患者脳標本のタウにおいて明瞭な染色像が観察された。その中で 2 化合物はタウイメージング用近赤外線蛍光プローブとして使用できるとともに、いわゆるハイブリッドプローブとしてタウイメージング用 PET プローブとして



も応用できる可能性が示唆された。

脳移行性試験では検討した5化合物はいずれも十分なるのう移行性を示し、うち4化合物が十分なる脳からのウオッシュアウトを示した。これらの化合物はいずれもこれまで研究代表者らが経験していない化合物群である。今後の最適化合物のドラッグデザインにこれらの知識を生かしたい。

AD患者脳を用いたオートラジオグラフィ実験では $^{18}\text{F}$ ]THK-2153、 $^{11}\text{C}$ ]THK-1062の集積像はタウ特異的選択的であり、また $^{18}\text{F}$ ]THK-2153の集積の大部分は同化合物の非標識体を付加することによりブロックされたことから、2年目、3年目にむけてプロミッシングなプローブの開発に目処がついたと研究代表者は感じている。

インビトロにおける $\beta$ シート構造をとったタウの作製であるが、本年度にはいくつかの試行錯誤を繰り返したが、岡村らの分担研究報告書「アルツハイマー病患者脳切片におけるオートラジオグラフィおよびタウ凝集評価システムの構築」に記載したとおり、ミュータントのタウであるK18(K $\Delta$ 280)を使用して、今後研究を進める予定である。

以上、今後これらの化合物にさらなる最適化を加え、平成22年度(3年計画の3年目)中にはAD診断に画期的な進歩をもたらすことが確実であろうタウイメージング用PETプローブ(日本発、世界初)を開発したい。

## E. 結論

ADの病理像としてのタウに特異的に結合する、いわゆるタウイメージング用PETプローブを開発するために、AD患者脳標本におけるタウ染色性、脳移行性、オートラジオグラフィ等を検討し、2年目、3年目にむけてプロミッシングなプローブの開発に目処をつけることができた。インビトロにおける $\beta$ シート構造をとったタウについては、ミュータントのタウであるK18(K $\Delta$ 280)を使用して、今後研究を進める予定。

## 参考文献

- 1) Shoghi-Jadid K, Small GW, Agdeppa ED, Kepe V, Ercoli LM, Siddarth P, Read S, Satyamurthy N, Petric A, Huang SC, Barrio JR: Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* 10, 24-35. 2002

- 2) 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 and Langstrom B.: Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* 55:306-319(2004)
- 3) Engler H, Forsberg A, Almkvist O, Blomqvist G, Larsson E, Savitcheva I, Wall A, Ringheim A, Långström B, Nordberg A: Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain.* 129:2856-2866.2006
- 4) Weiner: International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD) meeting, Chicago, 2008. Jul 19.
- 5) Aizenstein HJ, Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi W, Cohen AD, Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM, Klunk WE.: Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol.* 65:1509-1517. 2008
- 6) Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JA.: Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet.* 372:2132-2142. 2008.

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1. 論文発表

- 1) Okamura N, Furumoto S, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: Imaging amyloid pathology in the living brain. *Curr Med Imaging Rev.* 4: 56-62. 2008.
- 2) Okamura N, Funaki Y, Tashiro M, Kato M, Ishikawa Y, Maruyama M, Ishikawa H, Meguro K, Iwata R, Yanai K. In vivo visualization of donepezil binding in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol.* 2008; 65: 472-479.
- 3) Suzuki M, Okamura N, Kawachi Y, Tashiro M, Arao H, Hoshishiba T, Gyoba J, Yanai K. Discrete cortical regions associated with the musical beauty of major and minor chords.

Cogn Affect Behav Neurosci. 2008; 8: 126-131.

- 4) Jia F, Mobarakeh JI, Dai H, Kato M, Xu A, Okuda T, Sakurai E, Okamura N, Takahashi K, Yanai K. Blocking histamine H(1) improves learning and mnemonic dysfunction in mice with social isolation plus repeated methamphetamine injection. J Pharmacol Sci. 2008; 107: 167-174.
- 5) Tashiro M, Sakurada Y, Mochizuki H, Horikawa E, Maruyama M, Okamura N, Watanuki S, Arai H, Itoh M, Yanai K. Effects of a sedative antihistamine, D-chlorpheniramine, on regional cerebral perfusion and performance during simulated car driving. Hum Psychopharmacol. 2008; 23: 139-150.
- 6) 古本祥三、工藤幸司 “アミロイド斑の可視化によるアルツハイマー病の早期診断”、Isotope News, No 655、2-6 項、2008 年
- 7) 工藤幸司、古本祥三、岡村信行:アミロイド画像化用プローブ. 日本臨床. 66. 300-306. 2008.
- 8) 岡村信行、古本祥三、工藤幸司:アミロイドイメージング.分子精神薬理. 2.188-190. 2008.
- 9) 古本祥三、“マウスの脳内アミロイド斑のポジトロン断層撮影に成功”、ファルマシア、Vol 44、993-994 項、2008
- 10) 岡村信行、谷内一彦、古本祥三、工藤幸司、古川勝敏、荒井啓行. [<sup>11</sup>C]BF-227 を用いた脳アミロイド斑の画像化. 臨床放射線, 53(7):876-884, 2008.
- 11) 谷内一彦、岡村信行、田代学. レビュー: ポジトロン医学と創薬. PET journal, 1:21-23, 2008.
- 12) 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.

## 2. 学会発表

### (国内学会)

- 1) 森雅憲、岡村信行、古本昭三、工藤幸司、谷内一彦:近赤外線蛍光プローブ X50 による脳内アミロイドの検出.第 82 回日本薬理学会年会、横浜、3 月 16 日-18 日、2009 年 3 月 23 日
- 2) 杉健太郎、岡村信行、古本昭三、加藤元久、森雅憲、田代学、岩田鍊、工藤幸司、岡村信行、古本昭三、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦: [11C]BF-227-PET を用いた軽度認知障害段階でのアルツハイマー病の早期診断.第 82 回日本薬理学会年会、横浜、3 月 16 日-18 日、2009 年 3 月 23 日
- 3) 古本祥三、岡村信行、加藤元久、石川洋一、丸山将浩、岩田鍊、谷内一彦、樋口真、須原哲也、工藤幸司、“フッ素 18 標識アミロイドイメージング剤の開発”、第 48 回日本核医学会学術総会、千葉市、10 月 25 日、2008 年。
- 4) 工藤 幸司:アルツハイマー病診断法の T R. 東北大学未来医工学治療開発センターシンポジウム.仙台.2008 年 11 月 17 日
- 5) 杉健太郎、岡村信行、加藤元久、森雅憲、古川勝敏、藁谷正明、田代学、岩田鍊、工藤 幸司、谷内一彦、荒井啓行:アルツハイマー病早期診断における[11C]BF-227 PET 有用性の検討.CYRIC 共同実験第 29 回報告会.仙台.2008 年 11 月 18 日
- 6) 岡村信行、古本祥三、田代学、岩田鍊、工藤幸司、谷内一彦、堂浦克美:プリオン病における BF-227-PET 所見. CYRIC 共同実験第 29 回報告会.仙台.2008 年 11 月 18 日
- 7) 岡村信行、古本祥三、田代学、古川勝敏、藁谷正明、岩田鍊、工藤 幸司、谷内一彦、荒井啓行:[18F]FACT を用いた脳内アミロイドの画増化. CYRIC 共同実験第 29 回報告会.仙台.2008 年 11 月 18 日
- 8) 岡村信行、古川勝敏、藁谷正明、古本祥三、田代学、森雅憲、岩田鍊、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司:BF-227PET による脳内沈着アミロイド斑の検出.第 27 回日本認知症学会学術集会.前橋.2008 年 10 月 10 日~12 日
- 9) 森雅憲、岡村信行、古本祥三、藁谷正明、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦:光イメージングを用いた生体における脳内蓄積アミロイドの検出.第 27 回日本認知症学会学術集会.前橋.2008 年 10 月 10 日~12 日.
- 10) 岡村信行、古本祥三、田代学、古川勝敏、船木善仁、岩田鍊、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦:軽度認知症害による BF 227- P E T 画像所見.第 48 回日本核医学会学術総会.幕張メッセ.2008 年 10 月 24 日~26 日
- 11) 岡村信行、志賀裕正、古本祥三、田代学、岩田鍊、工藤幸司、谷内一彦:プリオン病患者における BF-227-PET 画像所見.第 48 回日本核医学会学術総会. 幕張メッセ.2008 年 10 月 24 日~26 日
- 12) 古本祥三、岡村信行、加藤元久、石川洋一丸山将浩、岩田鍊、谷内一彦、樋口真人、須原哲也、工藤幸司:フッ素 18 標識アミロイドイメージング剤の開発. 第 48 回日本核医学会学術総会. 幕張メッセ.2008 年 10 月 24 日~26 日

- 13) 工藤幸司:アルツハイマー病の分子イメージング:βアミロイドイメージング.第5回 Molecular Imaging 研究会 In “第48回日本核医学会学術総会”.幕張メッセ.2008年10月24日
- 14) 杉健太郎,岡村信行,加藤元久,森雅憲,田代学,岩田錬,工藤幸司,谷内一彦:[11C]BF-227を用いたアルツハイマー病早期診断法の確立.第59回日本薬理学会北部会.仙台.2008年9月27日
- 15) Shao he,Okamura N,Furumoto S,Kato M, Mori M, Kudo Y,Yanai K:THK-778 –Optimized candidate for amyloid plaques imaging in Alzheimer’s disease. 第59回日本薬理学会北部会.仙台.2008年9月27日
- 16) 森雅憲,岡村信行,古本祥三,工藤幸司,谷内一彦:光イメージング用プローブX50による脳内アミロイドの検出.第59回日本薬理学会北部会.仙台.2008年9月27日
- 17) 工藤幸司,古本祥三,森雅憲,岡村信行:アルツハイマー病の光技術を用いた診断.第3回日本分子イメージング学会総会・学術集会(2008年定期総会).大宮.2008年5月23日

(国際学会)

- 1) S. Furumoto, N. Okamura, M. Kato, Y. Ishikawa, M. Maruyama, R. Iwata, K. Yanai, M. Higuchi, T. Suhara, Y. Kudo; “A Fluorine-18 Labeled 2-(2-(Thiazol-5-yl)vinyl)benzoxazole Derivative for In Vivo Imaging of Amyloid Deposits” World Molecular Imaging Congress 2008, Nice (France), September 10-13, 2008.
- 2) Mori M, Okamura N, Furumoto S, Sugi K, Kudo Y, Arai H, Yanai K: Non-invasive detection of amyloid-β deposits by near-infrared fluorescence imaging. XI WORKSHOP ON APOPTOSIS IN BIOLOGY AND MEDICINE. Sendai.2008年9月12日-14日
- 3) Okamura N,Furumoto S,Furukawa K,Tashiro M, Kato M,Mori M,Iwata R,Yanai K,Arai H,

Kudo Y : PET imaging of brain Amyloid deposits using BF-227 and its derivative. Alzheimer's Imaging Consortium In “ International conference on Alzheimer’s disease”.Chicago. 2008年7月26日

- 4) Mori M,Okamura N,Furumoto S, Kudo Y, Yanai K,Arai H:Noninversive detection of Amyloid deposits by near infrared fluorescence probe THK-265. International conference on Alzheimer’s disease. Chicago. 2008年7月26日-31日
- 5) Okamura N,Furumoto S,Furukawa K,Tashiro M, Kato M,Mori M,Iwata R,Yanai K,Arai H, Kudo Y : PET imaging of brain Amyloid deposits using BF-227 and its derivative. International conference on Alzheimer’s disease. Chicago. 2008年7月26日-31日
- 6) Okamura N, Furumoto S,Tashiro M, Kato M, Funaki Y, Furukawa K, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: In vivo imaging of brain amyloid deposits using BF-227 and its derivative. 55th SNM Annual Meeting. New Orleans. 2008年6月14日-18日

A. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

特許出願状況については下記参照

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

特許出願状況

	出願/登録の別	出願番号	発明の名称	出願日	出願人	発明者
1	出願	PCT/JP2008/061032	(EN) PET PROBE HAVING ALKOXY GROUP SUBSTITUTED BY FLUORINE AND HYDROXY GROUP	平成 20 年 6 月 17 日	東 北 大 学	工藤幸司 古本祥三 岡村信行
2	予定		アルツハイマー病の真の高リスク者を正確に抽出することを可能にするタウイメーシングプローブ	平成 21 年 7 月末以内	東 北 大 学	工藤幸司 古本祥三 岡村信行

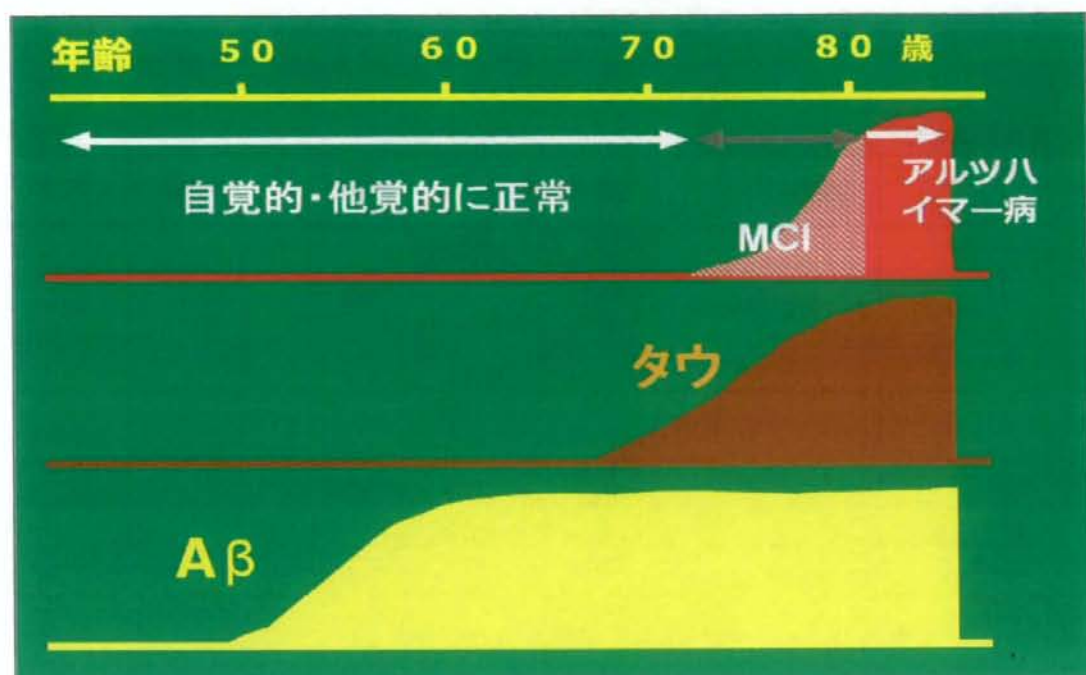
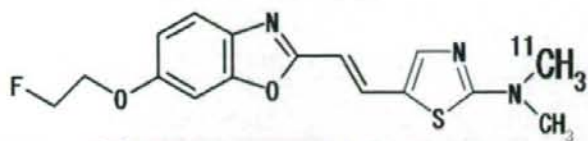


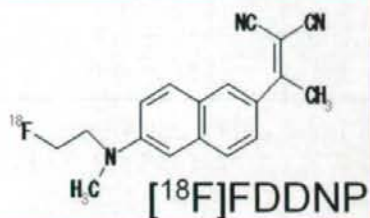
図1.アルツハイマー病における臨床像と病理像の乖離

80歳でのアルツハイマー病発症では50歳からAβの蓄積が始まり60歳ではすでにプラトーに達している。一方、タウは70歳から年齢依存的に蓄積が進行する。

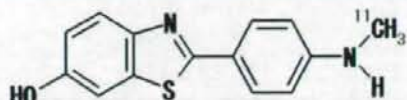
(井原康夫、荒井啓行 著：アルツハイマー病、朝日新聞社、2007、東京より引用、一部改変)



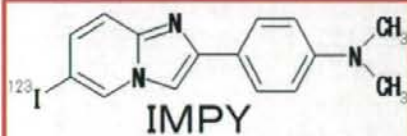
$[^{11}\text{C}]\text{BF-227(THK-002)}$



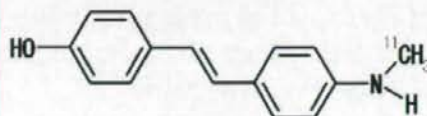
$[^{18}\text{F}]\text{FDDNP}$



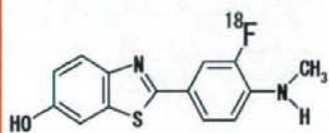
$[^{11}\text{C}]\text{6-OH BTA-1(=PIB)}$



$\text{IMPY}$



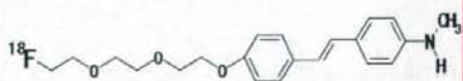
$[^{11}\text{C}]\text{SB-13}$



$[^{18}\text{F}]\text{F3'-PIB}$



$[^{18}\text{F}]\text{AV45}$



$[^{18}\text{F}]\text{BAY94-9172(AV1/ZK)}$

図2. これまでに開発されたアミロイドイメージング用 PET プローブ

表 1. [<sup>11</sup>C] PIB を用いてアルツハイマー病と診断された際の同プローブの集積 (ベースライン) と、2 年後における同プローブの集積 (2 年後のフォローアップ) (アルツハイマー病において A β が蓄積しない小脳における [<sup>11</sup>C] PIB 集積を 1 として算出)。

	AD (stable, n=10)		AD (progressive, n=5)	
	ベースライン	2 年後のフォローアップ	ベースライン	2 年後のフォローアップ
前頭葉	1.86 ± 0.74	1.90 ± 0.72	2.38 ± 0.35	2.32 ± 0.25
頭頂葉	1.81 ± 0.55	1.85 ± 0.55	2.21 ± 0.27	2.18 ± 0.26
側頭葉	1.51 ± 0.55	1.52 ± 0.37	1.82 ± 0.22	1.78 ± 0.19

アルツハイマー病において最も A β が蓄積する大脳皮質 3 部位における [<sup>11</sup>C] PIB 集積を示した。AD(Stable)および AD(progressive)は 2 年間で MMSE(認知機能)テストスコアがそれぞれ 3 点未満および 3 点以上低下した群を示す(Engler H et al.:Brain. 2006 .129. 2856-66. の Table 3 より引用)。

[<sup>11</sup>C] PIB によってアルツハイマー病と診断された患者の 2 年後においては、臨床症状の進行の早遅に関係なく同プローブの集積に増減が全く見られなかった。これはアルツハイマー病発症をさかのぼる MCI (Mild 軽度認知障害) のはるか以前にすでに A β の蓄積はプラトー状態に達しているためと考えられている。

したがって [<sup>11</sup>C] PIB ではアルツハイマー病の進行度は診断不可能である。

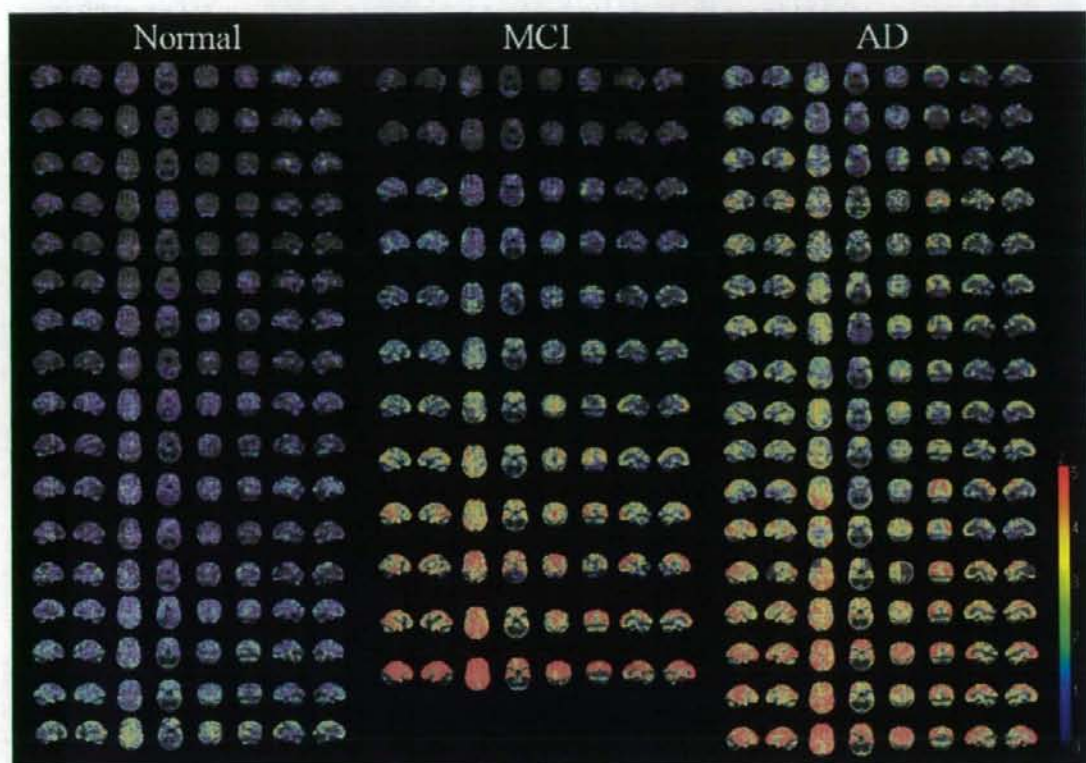


図3.研究代表者らによって開発されたアミロイド イメージングプローブ $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ のヒトにおける PET 画像。 3D SSP(3 Dimensional Stereotactic Surface Projection) 解析  
 Normal: 正常健常者、MCI: 軽度認知障害患者、AD: アルツハイマー病患者

$[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  はアミロイド イメージング プローブであるが、図からも明らかなようにアミロイド  $\beta$  の蓄積量と臨床症状の進行度（重症度）との間の相関性は高くない。  
 2008 年 7 月の ADNI における $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  の画像においては、おそらく Normal の約半数において高集積（画面上で赤い個体）者が見られたのであろう。



表2. A $\beta$  ワクチン (AN1792) 治療を受けた患者における脳内アミロイドの除去と臨床症 (すべて死亡された患者様のデータ) (Lancet : 372.216-223.2008.より引用)

	Baseline MMSE (points)	AN1792 dose ( $\mu$ g)	Mean antibody response (ELISA units)	Evidence of A $\beta$ plaque removal*	A $\beta$ load	Braak tau stage†	Survival time (months)	MMSE before death (points)
11	16	50	<1:100	None	2.76%	V	4	16
2	15	225	<1:100	None	2.52%	VI	41	0
3	21	50	1:119	Intermediate	0.75%	VI	20	0
4	16	225	1:4072	Intermediate	6.65%	VI	44	0
5	25	50	1:1707	Intermediate	2.19%	VI	57	0
6	21	225	1:491	Intermediate	1.18%	VI	63	0
7	23	50	1:4374	Very extensive	0.12%	VI	60	0
8	20	50	1:6470	Very extensive	0.35%	VI	64	0

Baseline MMSE (points): A $\beta$  ワクチン(AN1792) 処置前の認知機能(MMSE)のレベル

Evidence of A $\beta$  plaque removal : 脳内アミロイド除去の程度

Braak tau stage: アルツハイマー病におけるBraakのタウ蓄積レベル (図4参照)

MMSE before death (points): 死亡直前の認知機能(MMSE)のレベル

A $\beta$  ワクチン(AN1792) 処置前の認知機能レベルはMMSEスコア15~25であったが、20~64ヵ月後のそれらは総てMMSEスコア 0 (=極めて重症な認知症)であった(但し、No.1の症例は4ヵ月後に死亡しているため、MMSEスコアは変わらず)。これを A $\beta$  の側から見ると、A $\beta$  除去の程度がNone、Intermediate、さらにVery extensiveに関係なく総ての症例において死亡直前のMMSEスコアは 0 であった。このことはAD発症後のA $\beta$  ワクチンは治療薬としての効果が乏しいことを示唆するとともに、A $\beta$  の蓄積度は必ずしもADの重症度を反映していないことを強く示唆している。

一方、Braakのタウ蓄積レベルを見ても最も蓄積レベルの高い Stage VIであった。(図4参照)。

このことはADの重症度診断はA $\beta$  を追跡するよりも、タウを追跡する方がより妥当性が高いことをも強く示唆している。

## A $\beta$ 蓄積



Cases devoid  
of amyloid

Stage A

Stage B

Stage C

## タウ蓄積



Cases devoid  
of changes

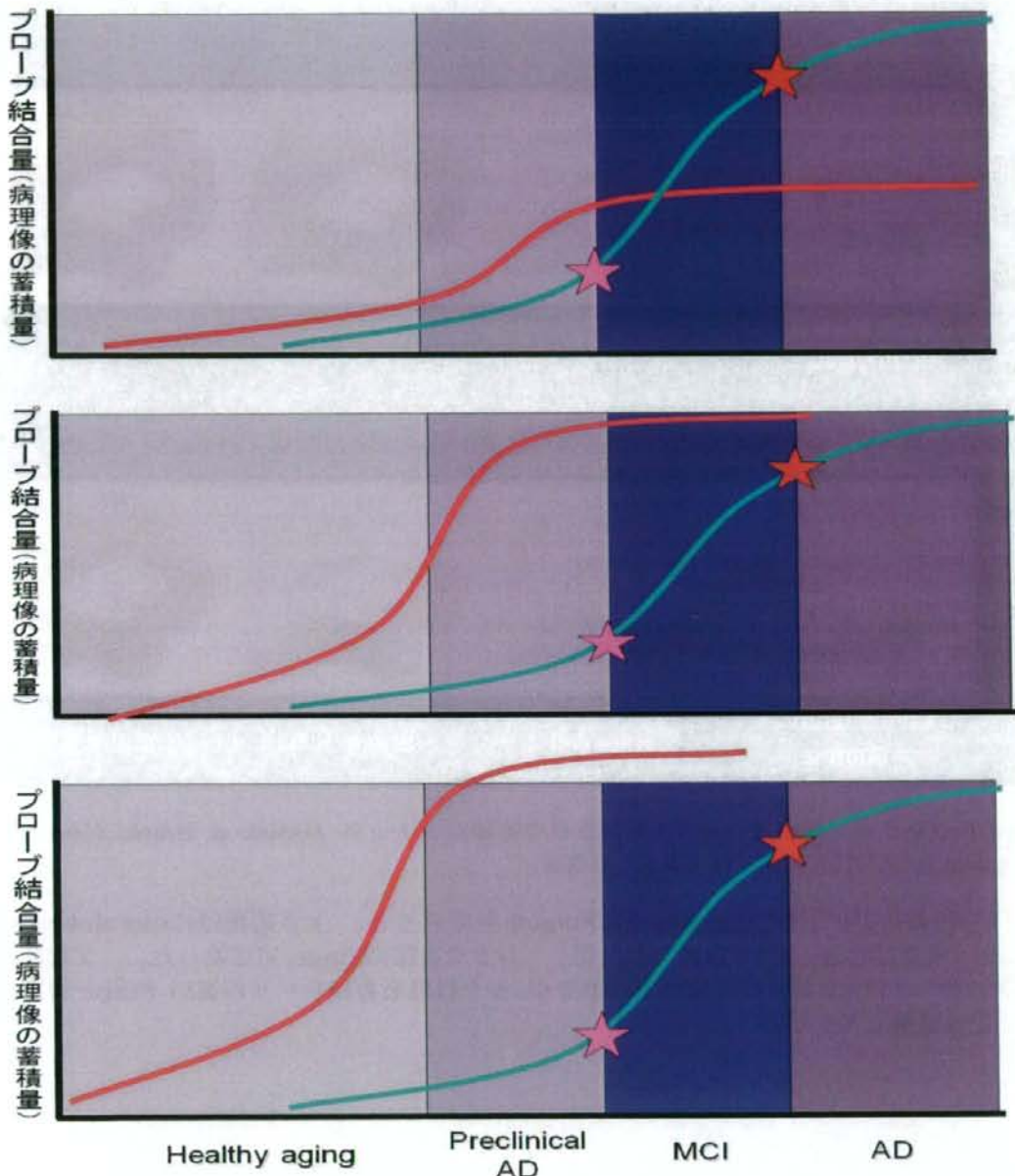
Stage I & II

Stage III & IV

Stage V & VI

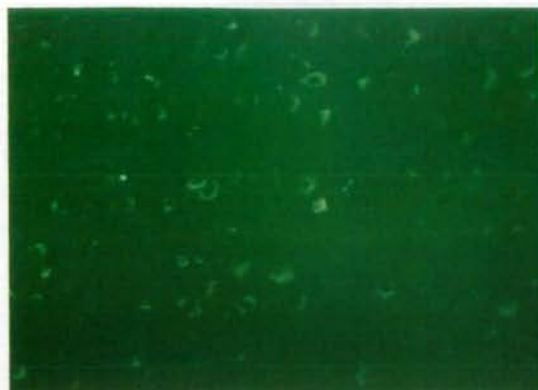
図4.アルツハイマー病におけるA $\beta$ 蓄積とタウ蓄積のステージ (Braak & Braak: Neurobiol aging.18.351-357.1997より引用、一部改変)

表2の症例7および8の死亡後のBraakのStageを見てみると、A $\beta$ 蓄積はCases devoid of amyloid (またはStage A)と考えられたが、一方タウ蓄積はStage VIであった。すなわち両症例においてはA $\beta$ 蓄積は軽度以下であるが、タウは最も蓄積レベルの高い Stage VIであったことを意味している。

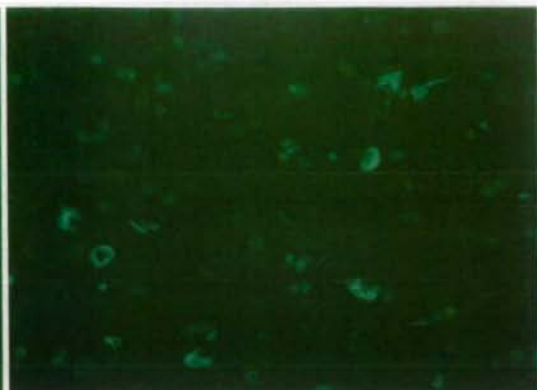


— アミロイド イメージング — タウ イメージング

図5. ADにおけるアミロイド(ないしはA $\beta$ )とタウの関係(研究代表者らの提唱)  
 上、中および下段に示すように、アミロイド蓄積がそれほど多くない場合でも、タウ蓄積が閾値に達するとMCI、ADが発症し、またアミロイド蓄積が極めて多くても、タウ蓄積が閾値に達しない場合、MCI、ADは発症しない。  
 つまり、アミロイド蓄積の多寡は、MCI、AD発症には関係なく、タウ蓄積がこれを規定する。  
 言い換えると「アミロイド(ないしはA $\beta$ )には閾値がない、タウには閾値がある」。



THK-1043



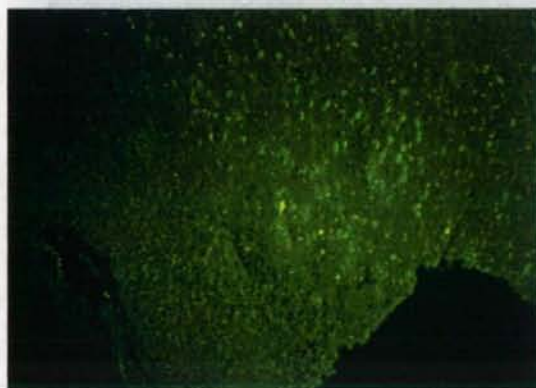
THK-1061



THK-1062



THK-1074



THK-2153



左の隣接切片の抗リン酸化タウ抗体染色像

図6-1. アルツハイマー病患者様脳切片における代表的化合物の染色像

上段は200倍、下段は100倍拡大 例示したすべての化合物がタウに親和性を有していたが、特にTHK-1074およびTHK-2153の染色像が明瞭であった。

THK-1074は典型的なタウに加えてニュールヒルスレッド（背景の糸くず状の構築物；ニューロンの樹状突起に蓄積したタウ由来と考えられている）が見られた。THK-2153は染色像が明瞭でかつ抗リン酸化タウ抗体染色とほぼ類似した位置に染色像が見られた。