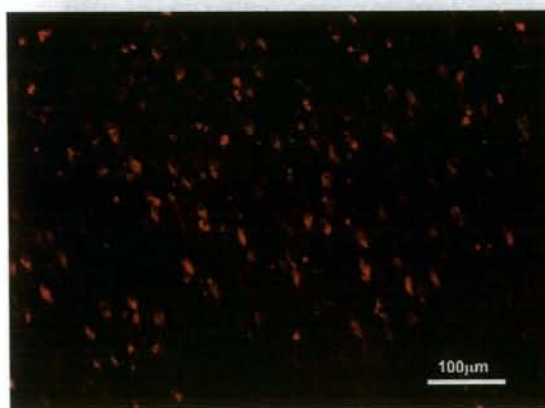


THK-6024



THK-960



THK-6034

図6-2. 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

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）が見られた。

近赤外線蛍光化合物 THK-960 および6034 はCy5.5（励起; 635~675nm、蛍光; 696~736nm）フィルターを使用して撮影した例を示した。両化合物は長波長領域においてきわめて明瞭なタウ染色性を示した。

なお、将来の特許申請のため、THK 化合物の番号は一定の法則のもとに変更してあります

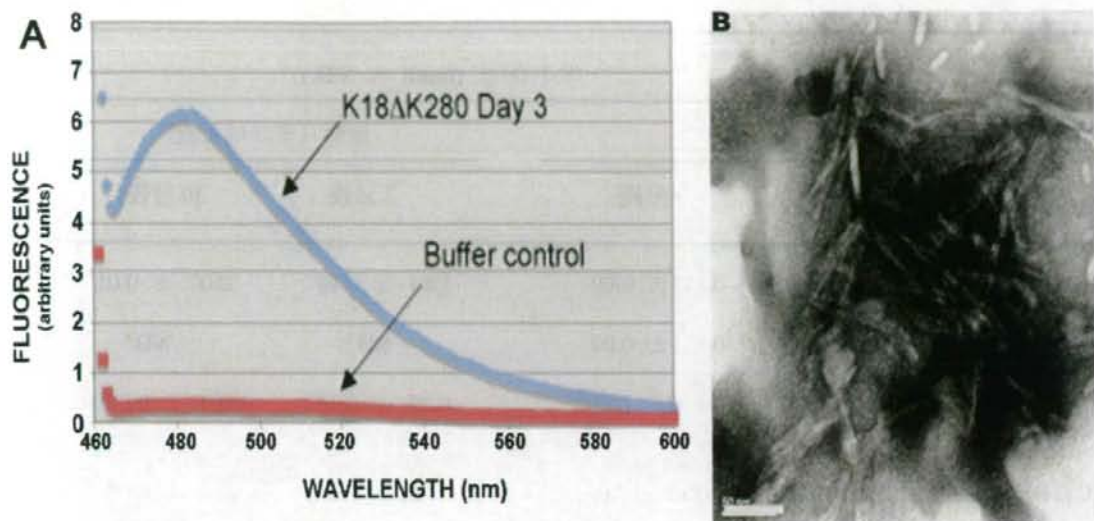


図7. 線維化タウ K18 ($\Delta 280K$)—チオフラビン T 複合体の蛍光スペクトル (A) と線維化タウ K18 ($\Delta 280K$)の電顕像 (Bar = 50nm)

表 2. 各化合物の脳移行と脳からのウオッシュアウト

	% ID/g (mean ± S.D.)			
	脳		血漿 (または血液)	
	2 分後	30 分後	2 分後	30 分後
THK-1017	10.02 ± 0.48	0.35 ± 0.07	1.84 ± 0.10	0.07 ± 0.01
THK-1043	2.32 ± 0.36	0.15 ± 0.07	ND*	ND*
THK-1049	2.04 ± 0.58	0.005 ± 0.001	0.70 ± 0.15	0.001 ± 0.0004
[¹¹ C]THK-1062	3.23 ± 0.27	0.15 ± 0.05	2.65 ± 0.46	0.20 ± 0.04
[¹⁸ F]THK-2352	2.72 ± 0.31	1.47 ± 0.07	1.11 ± 0.25	1.63 ± 0.04

使用動物；雄性マウス、投与ルート；静脈内、N=4

ND*；血漿成分由来ピークと THK-1043 由来ピークが重なり、分離できなかったため、測定を中断した。

THK-1017 は投与 2 分後で最も高い脳内移行性を示した。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 以下の集積率となり脳内動態特性的に画像化プローブとして有用性が示唆された。

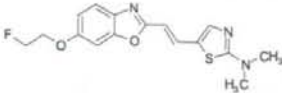


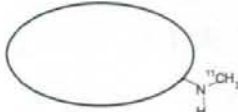

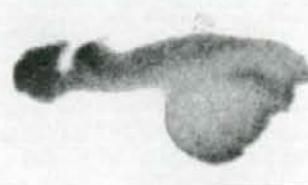



	Frontal cortex	Hippocampus
<p>[¹¹C]BF-227</p> 		
<p>[¹¹C]THK-1062</p> 		
<p>[¹⁸F]THK-2153</p> 		

図 8 [¹¹C]BF-227, [¹¹C]THK-1062, [¹⁸F]THK-2153 によるアルツハイマー病患者前頭葉 (Frontal cortex), 海馬 (Hippocampus) オートラジオグラフィ像の比較



Blocking (-)



Blocking (+)

図9 $[^{18}\text{F}]\text{THK-2153}$ によるアルツハイマー病患者海馬(Hippocampus) オートラジオグラフィー像(左) と非標識 THK-2153 によるブロッキング (右)

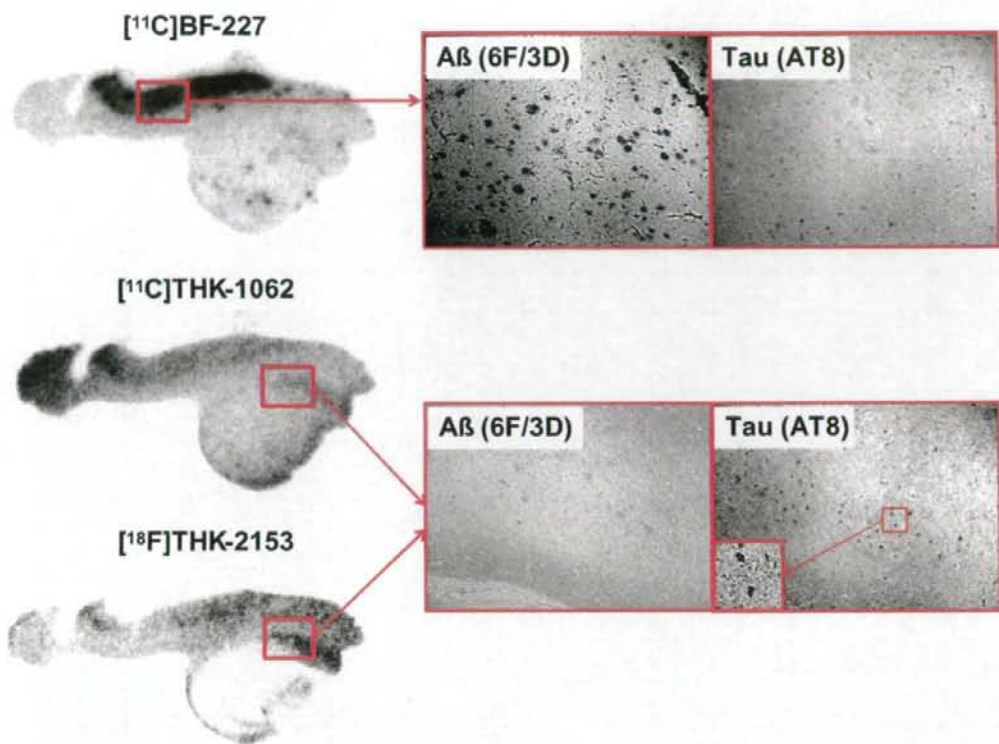


図 10 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$, $[^{11}\text{C}]\text{THK-1062}$, $[^{18}\text{F}]\text{THK-2153}$ によるオートラジオグラフィー像とアミロイド β 蛋白 ($\text{A}\beta$)、タウ蛋白 (Tau) 免疫染色との対比

分 担 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 分担研究報告書

アルツハイマー病患者脳標本における化合物の染色性

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
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
	森 雅憲	東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野・大学院生
	長橋淑子	東北大学未来医工学治療開発センター・研究補助員
	笹峯 梢	東北大学未来医工学治療開発センター・研究補助員

研究要旨： 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 プローブの開発を目的に、アルツハイマー病患者脳標本における選出された化合物によるタウ染色性につき検討した。その結果、THK-1043、-1061、-1062、-1074、-2153、-960 および-6034 にタウ特異的な染色像が観察された。その中でも THK-1074、-2153 および-6024 タウ親和性が特に高いと判断された。一方、近赤外線蛍光化合物 THK-960 および-6034 においても高いタウ親和性を有すると判断され、これら化合物群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。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) における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) をイメージングする、いわゆるタウイメージングの同病診断における意義、有用性等については総括研

究報告書で述べた。

さて、その開発に成功すれば 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、その開発には解決することが難しいいくつかの問題がある。

その第1はAD患者のタウをインビトロで再現できにくいことである。ADのもう1つの代表的な病理像である β シート構造をとったアミロイド 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A β)は、市販のA β を購入して容易に β シート構造をとったAD患者様のA β をインビトロにおいて作り出すことができる。これに対してタウは市販のタウ、または大腸菌に遺伝子を組み込んで作製したタウのいずれにおいても、AD患者に見られる β シート構造をとったAD型、成熟型、または過剰リン酸化型タウをインビトロにおいて再現することが極めて難しいことが知られている。

さらにこの状態はインビボ、特にTgマウスにおいても同様である。A β が蓄積するTgマウスでは20カ月ほどの飼育が必要ではあるがAD型にかなり類似したA β を再現することができる。これに対して遺伝子を改変してタウが蓄積するTgマウスにおいては正常なタウが主として蓄積するのみで、 β シート構造をとる割合が不十分であり、AD型、成熟型、または過剰リン酸化型タウを再現できにくいのが現状である。

本課題を進めていく上でどうしてもTgマウスを用いた試験が必要となるが、これに関しては24から30カ月齢付近までこれらのTgマウスを飼育すると、 β シート構造の割合が増加したタウが蓄積する可能性が高いことを経験していることから、飼育途中で大半の個体が死亡する確率が高いが、タウTgマウスを2008年12月に購入し現在飼育中である。

一方、インビトロにおける β 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(KA280)を使用して、今後研究を進める予定である。

本分担報告書ではADのタウそのものを用いるインビトロでの評価法、すなわちAD患者脳標本におけるタウの染色性について検討したので報告する。

研究代表者らはAD診断用PETプローブ以外に、同病診断用近赤外線蛍光プローブの開発をも進めている。同プローブを開発するために最適化した化合物群の中にタウ特異的選択的に結合するそれらが見いだされた。これらの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る。本報告書ではAD患者脳標本におけるこれらの化合物の染色性についても併せて報告する。

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、次いでいく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。標本は共同研究先である愛知県豊橋市、医療法人さわらび会、福祉村病院から提供を受け、患者遺族から研究目的での使用に対する承諾を得ている(医療法人さわらび会福祉村病院長寿医学研究所倫理委員会 受付番号:020)。パラフィン包埋された脳組織は厚さ8 μ mで薄切し、ポリ-L-リジンコート付きのスライドガラス(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 \times 2回、100% ethanol 5分間 \times 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% KMnO₄ 20分間、PBS 2分間 \times 2回、0.1% K₂S₂O₈/oxalic acid 約5秒、PBS 2分間 \times 3回の順で処理を行った。

各化合物は100%エタノールを200 μ Mの濃度に溶解後、純水で100 μ 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 μ 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。

(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ー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 (S 63.3.24) 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化合物を以下の試験に供した。

2. AD患者脳標本における化合物による染色

ほぼ1/2の確率でAD患者脳標本においてタウ and/or A β を染色する化合物群が見出された。その中で最も多かったのは、タウ and A β を染色する化合物群、次いでA β を染色する化合物群であり、タウ特異的に染色する化合物数

は最も少なかった。

図1-1および1-2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) 染色像が見られたこと、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は3種の長波長フィルター、すなわちCy5 (励起；590-650nm、蛍光；662.5-737.5nm)、Cy5.5 (励起；635-675nm、蛍光；696-736nm) および Cy7 (励起；672.5-747.5nm、蛍光；765-855nm) を用い撮影した。

THK-960 および-6034 はいずれのフィルターを用いても、タウに極めて明瞭な染色性を示した。図1-2にはCy5.5フィルターを用いた結果を示した。

D. 考察

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プローブの開発を目的に、AD患者脳標本における選出された化合物のタウ染色性につき検討した。

その結果、THK-1043、-1061、-1062、-1074、-2153、-960 および-6034にタウ特異的な染色像が観察された。その中でもTHK-1074、-2153 および-6024 タウ親和性が特に高いと判断された。

一方、近赤外線蛍光化合物 THK-960 および-6034 においても高いタウ親和性を有すると判断された。光は600nm以下の波長ではヘモグロビンの、また1200nm以上の波長では水の吸収があり生体を透過しがたいことが知られている。光が生体を透過する600から1200nmの領域は「生体における分光学的窓 (Optical Window)」と呼ばれ、最大10cm生体を透過することが知られている。THK-960 および-6034の周辺化合物の光学的解析の結果、これらの化

化合物群の励起および蛍光波長はそれぞれ 680-700nm、700-720nm(内部資料)の範囲内であったことから、これら化合物群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る。

THK-960 および-6034 の AD 患者脳染色像からみて、両化合物のタウ親和性はかなり高いことが示唆されるが、プローブに求められるもう 1 つの特性、すなわち脳移行性については THK-960 の試験途中のデータではあるが、静脈内投与 2 分後では 3%ID/g 以上を示しており、脳内移行は充分と考えている。

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選り出された化合物のタウ染色性につき検討し、2 個の近赤外線蛍光化合物を含む 7 化合物にタウ特異的選択的、且つ明瞭な染色像が得られた。

F. 研究発表

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. [¹¹C]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、岩田錬、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、岩田錬、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、岩田錬、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、岩田錬、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、岩田錬、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦:軽度認知症による BF 227-PE 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、岩田錬、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、岩田錬、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: Noninvasive 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
- なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

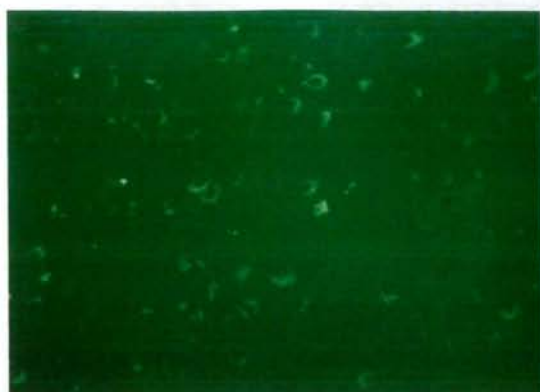
G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

特許出願状況については下記参照

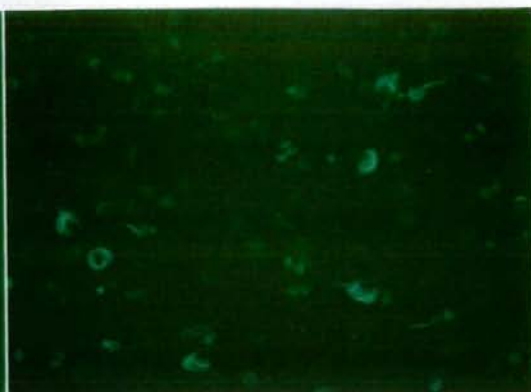
1. 特許取得

特許出願状況

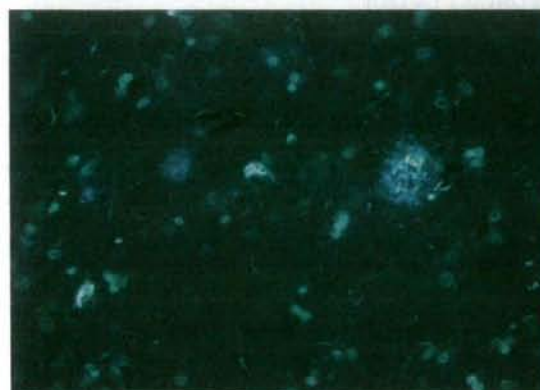
	出願/登録の別	出願番号	発明の名称	出願日	出願人	発明者
1	出願	PCT/JP2008/061032	(EN) PET PROBE HAVING ALKOXY GROUP SUBSTITUTED BY FLUORINE AND HYDROXY GROUP	平成 20 年 6 月 17 日	東 北 大 学	工藤幸司 古本祥三 岡村信行
2	予定		アルツハイマー病の真の高リスク者を正確に抽出することを可能にするタウイメーシングプローブ	平成 21 年 7 月末以内	東 北 大 学	工藤幸司 古本祥三 岡村信行



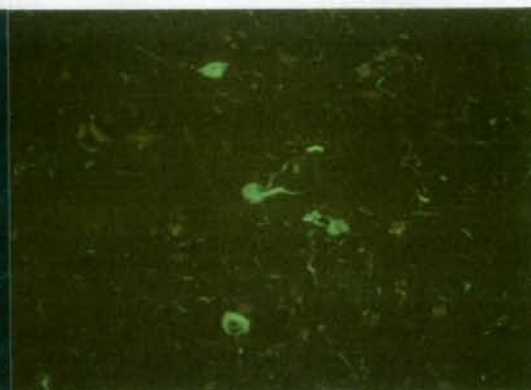
THK-1043



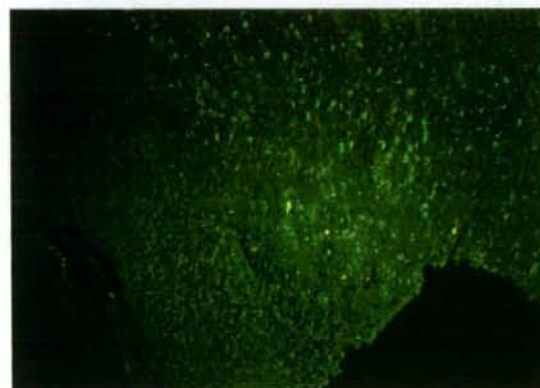
THK-1061



THK-1062



THK-1074



THK-2153

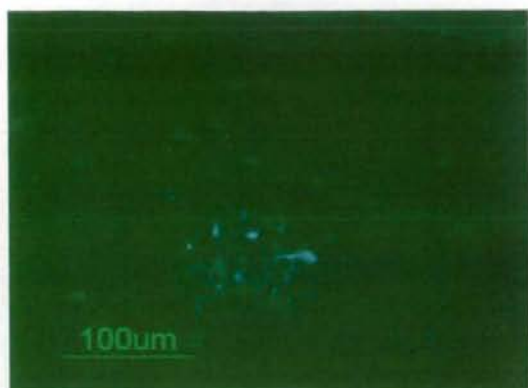


左の隣接切片の抗リン酸化タウ抗体染色像

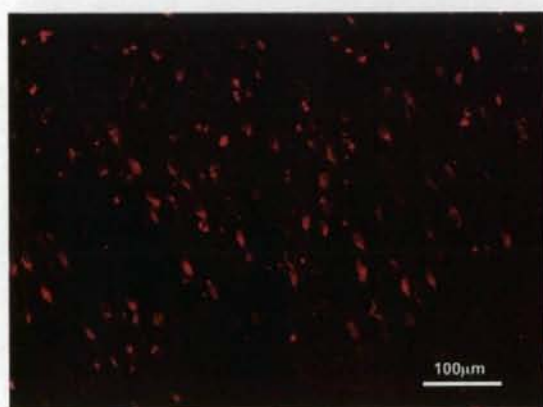
図1-1. アルツハイマー病患者様脳切片における代表的化合物の染色像

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ビルスレッド（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。



THK-6024



THK-960



THK-6034

図1-2. 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

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）が見られた。

近赤外線蛍光化合物 THK-960 および-6034 は Cy5.5（励起; 635~675nm、蛍光; 696~736nm）フィルターを使用して撮影した例を示した。両化合物は長波長領域においてきわめて明瞭なタウ染色性を示した。

なお、将来の特許申請のため、THK 化合物の番号は一定の法則のもとに変更してあります

厚生労働科学研究費補助金

(医療機器開発推進事業)

平成 20 年度分担研究報告書

タウ画像化プローブの脳移行性評価研究

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	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	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
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
	森 雅憲	東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野・大学院生
	長橋淑子	東北大学未来医工学治療開発センター・研究補助員
	笹峯 梢	東北大学未来医工学治療開発センター・研究補助員

[要旨]

アルツハイマー病に特徴的な病理像であるタウ病変は、アルツハイマー病の病態進行度と高い相関性を示すことが知られている。本研究では、PET 用タウ病変画像化プローブの候補化合物について、脳内動態特性の評価を行った。タウ病変に高い結合選択性を示す THK-1017、-1043、-1049、-1062、-2352 の 5 化合物について、投与 2 分後と 30 分後の脳内集積率を調べ、脳内移行性及び消失性を比較した。THK-1017 は投与 2 分後で最も高い脳内移行性を示した。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 以下の集積率となり脳内動態特性的に画像化プローブとして有用性が示唆された。

A. 研究目的

2007 年、日本における高齢者(65 歳以上)人口の割合は 21%に達し、かつて経験したことのない本格的な高齢社会が到来した。その高齢

者人口は 2055 年まで増加の一途をたどり、その割合は 40%前後にまで上昇すると推計されている。このように高齢者人口の増加が進行している社会においては、加齢に伴い発症リスク

が高まる認知症の高齢者数増加が大きな問題となっている。今後、認知症患者の数はほぼ一定の割合(平均で約 8 万人/年)で増加傾向を示し、2035 年にはその総数は約 449 万人に達すると見込まれている。特に、認知症の原因疾患として約 6 割を占めるアルツハイマー病(AD)の患者数が近年顕著な伸びを示しており、医療政策的に迅速な対応が求められている。

AD の臨床症状は、記憶障害、人格変化、高次精神機能障害を特徴とする。病理学的に神経変性を伴い、特徴的な所見として老人斑と神経原線維変化の形成が観察される。この病理学的変化は、臨床症状(認知機能障害)が出現する 10 年以上前から脳内で徐々に進行し、神経変性を誘発する原因になっていると考えられている。その病態は、①アミロイドβ蛋白(Aβ)が不溶性凝集体となって沈着し、老人斑(アミロイド病変)を形成、②タウ蛋白が異常リン酸化によって凝集体となり、沈着して神経原線維変化(タウ病変)を形成、③神経細胞の脱落、④神経機能障害、⑤認知症発症、という順序で進行する。従って、臨床症状が出現する前の段階で老人斑や神経原線維変化の形成を阻害して病態の進行を阻止することができれば、AD を根本的に治療することが可能になると考えられており、そのような“根本治療薬”の開発が全世界的に展開されている。現在、臨床試験で第 II 相、第 III 相まで進んでいる候補薬が数多くあり、近い将来 AD の根本治療が可能になると見込まれている。

一方、この根本治療薬の開発と同時に必要になるのが、優れた精度(感度・特異度)で早期に AD を診断できる技術の開発である。根本治療を最も効果的に実施するためには、認知機能

障害にまで病状が進行する前に、治療標となる老人斑や神経原線維変化の形成を検出し、根本治療薬を処置する必要があるからである。現在、AD の確定診断では、剖検病理検査において老人斑と神経原線維変化の両病理像の存在確認が判定の基準となっている。従って、老人斑及び神経原線維変化をそれぞれ非侵襲的に検出する技術が確立できれば、病気の進行過程を忠実に示す客観的な評価法として利用でき、病理学的確定診断に迫る精度の高さで臨床症状出現前の AD が診断可能となる。

このような観点から、老人斑に関しては、近年、分子の実体である Aβ凝集体に結合する PET 用標識プローブの開発が進み、PET によるアミロイド画像化研究が世界的に急速な勢いで展開されてきた。そして現在、アミロイド画像化技術は、実際の臨床研究で AD 発症前の段階で老人斑の検出に有効であることが示されつつあり、近い将来、確実に広く普及する技術として高い期待が持たれている。

一方、神経原線維変化に関しては、その分子の実体であるタウ凝集体に選択的に結合し、PET 用プローブとして利用可能な低分子化合物の開発は、当研究代表者らが世界で最初に報告した例を除き、ほとんど進展していないのが現状である。しかし、神経原線維変化は老人斑と比較して AD の病態進行度とより相関性の高いことが知られていることから、アミロイド画像化技術の成功をうけて、同様に PET によるタウ画像化技術の開発も AD 研究者や製薬業界などから強く望まれるようになってきた。

通常、AD 病変組織中のアミロイド Aβとタウは、ともに病的に凝集・沈着する場合、立体構造的にβシートの繰り返し構造を形成する

ため、一般的にタウ凝集体 (病変) に結合性を示す化合物は A β 凝集体 (アミロイド病変) に対しても同等に結合性を示す (低い結合選択性)。しかし、当研究代表者らは独自に構築してきた化合物ライブラリーから、病理標本を用いた結合性評価実験によってタウ病変に高い結合選択性を示すキノリン誘導体化合物 [¹⁴C]THK-1158 を見出すことに成功しており、タウ画像化プローブとして利用できる可能性を報告している。当該化合物は結合性の観点からは優れた特性を示したが、脳内動態特性に関しては、将来的に臨床での応用を考慮に入れた場合、更なる改善の余地があった。

このような背景から、本研究プロジェクトではタウ病変に対する結合性ととも、脳内動態性についても優れた特性を示す新規タウ病変画像化プローブの開発を進めるが、本分担研究では、その新規画像化プローブの脳内動態性評価を目的とした研究を実施した。

B. 研究方法

本研究で評価した化合物は、病理標本を用いた結合性評価実験によってタウ病変に高い結合選択性を示すことが確認された THK-1017、-1043、-1049、-1062、-2352 の 5 化合物である。前半の 3 化合物は非標識体を用いて、後半 2 化合物はポジロン標識体を用いて評価した。なお、化合物の構造式、ポジロン標識合成方法の詳細については、現在、特許出願準備中であり、本年度の報告書内での記載は省略する。

マウスは、体重 30-40g、7 週齢の Slc:ICR (日本 SLC 株式会社より購入) 雄性マウスを 1 群 4 匹として実験に用いた。

THK-1017 は、5%Tween80、5%EtOH、90% 生理食塩水 (大塚製薬) の混合溶液に 0.1 mg/ml の濃度で溶解し、1.0 mg/kg となるようにマウス尾静脈より投与した。投与より 2 及び 30 分後にエーテル麻酔下で、頸椎脱臼し、心臓からヘパリン処理注射筒を用いての採血、及び、脳の採材を行った。

血液は採血後 4 °C、10,000 g で 5 分間遠心し、上澄みを血漿として -80 °C で保存した。脳 (小脳を含む) は採材後 -80 °C で保存した。使用時に血漿は 0.1 ml を分注し、アセトニトリルを 0.3 ml 加え vortex した後、4 °C、10,000 g で、5 分間遠心した。遠心を終えた上澄み 0.25 ml を Mini-Uniprep (Whatman) に移し 20mM NaH₂PO₄ (pH = 6.5) を 0.25 ml 加えろ過した。ろ過した溶液のうち 0.2 ml を HPLC (SHISEIDO NANOSPACE SI-2, ポンプ:3001、UV-VIS 検出器:3002、カラム恒温槽:3004、蛍光検出器:3013、オートサンプラー:3023 Rev.2) により分析した。

脳は MeOH を 2 ml 加えて 1 分間ホモジェナイズし、4°C、4000 rpm で 10 分間遠心した。遠心を終えた上澄みを 0.5 ml とり、20mM NaH₂PO₄ (pH = 6.5) を 4.5 ml 加え 10 倍希釈し、固相抽出用カートリッジ (J.T.Baker Speedisk) に ①アセトニトリル 2 ml ② MeOH 2 ml ③超純水 4 ml の順に通しコンディショニングを行った後、10 倍希釈した上澄み溶液を通した。固相抽出用カートリッジに空のシリンジで空気を 2~3 回通し水分除去した後、MeOH を 0.5 ml 加え溶出し、20mM NaH₂PO₄ (pH = 6.5) を 0.5 ml 加え 2 倍希釈した。その溶液中 0.2 ml を HPLC で分析した。

移動層には 20 mM NaH₂PO₄ (pH = 6.5) / アセトニトリル = 550 : 450 を、HPLC のカラムには L-column ODS 5 μm 4.6×150 mm を用い、流速 1.0 ml/min で溶出、吸光 254 nm、蛍光の Ex 276 nm、Em 444 nm で検出した。

検量線を引く目的で、血漿は標準として THK-1017 の 4 pmol/10 μl MeOH 溶液、40 pmol/10 μl MeOH 溶液、400 pmol/10 μl MeOH 溶液をそれぞれ 10 μl ずつコントロール血漿中に混合し、化合物を静脈内投与された血漿と同様の抽出操作を行った。

一方、脳は標準として THK-1017 の 40 pmol/10 μl MeOH 溶液、400 pmol/10 μl MeOH 溶液、4 nmol/10 μl MeOH 溶液をそれぞれ 10 μl ずつコントロールの脳ホモジネイト中に混合し、化合物を静脈内投与された脳と同様の抽出操作を行った。

静脈内投与後の脳内及び血漿含量は、標準として化合物を加えられたサンプルを測定したクロマトグラムの蛍光のピーク面積より、血漿、脳それぞれについて検量線を引き、それを元に求めた。

THK-1043 についても THK-1017 と同様に薬液の調製、投与、抽出操作を行った。分析 HPLC では、移動層に 20 mM NaH₂PO₄ (pH = 6.5) / アセトニトリル = 800 : 200 を、HPLC のカラムには L-column ODS 3 μm 4.6×50 mm を用い、流速 1.0 ml/min で溶出、吸光 225 nm、蛍光の Ex 315 nm、Em 440 nm で検出した。

THK-1049 については、1N HCl 溶液 (1% 分)、EtOH 溶液 (5% 分)、生理食塩水 (大塚製薬) 混合溶液に 0.1 mg/ml の濃度で溶解し、

1.0 mg/kg となるようにマウス尾静脈より投与した。抽出操作は前述の方法に従った。分析 HPLC では、移動層には 20 mM NaH₂PO₄ (pH = 6.5) / アセトニトリル = 600 : 400 を、HPLC のカラムには L-column ODS 5 μm 4.6×150 mm を用い、流速 1.0 ml/min で溶出、吸光 340 nm、蛍光の Ex 350 nm、Em 470 nm で検出した。

THK-1062、-2352 については、それぞれ炭素 11 及びフッ素 18 で標識した。放射化学的純度 98% 以上の標識化合物を使用し、0.2 mL 当り約 20-50 μCi の生理食塩液を調製して Slc:ICR 雄性マウスに尾静脈内投与した。

一定時間後に、頸椎脱臼により屠殺し、速やかに採血するとともに、脳を摘出した。各試料の重量と放射能を γ カウンター (アロカ、AccuFLEX_γ7000) で測定し、投与放射能に対する各組織重量当りの放射能の割合 (%ID/g) を算出し、放射能集積率の指標とした。

C. 研究結果

表 1 に 5 化合物の静脈内投与 2 および 30 分後の脳ならびに血漿 (または血液) における含量を示した。

THK-1017 に関しては、静脈内投与から 2 分後の投与総量に対する脳内への移行比率は 10.02 ± 0.48 %ID/g を示し、30 分後には 0.35 ± 0.07 %ID/g と減少した。一方、血漿における含量は 2 分後では 1.84 ± 0.10 %ID/g、30 分後では、0.07 ± 0.01 %ID/g と減少した。

THK-1043 に関しては、静脈内投与から 2 分後の投与総量に対する脳内への移行比率は 2.32 ± 0.36 %ID/g を示し、30 分後には 0.15 ± 0.07 %ID/g と減少した。一方、血漿におけ