

200912024A

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21年度 総括研究報告書

研究代表者 工藤 幸司

平成22年（2010年） 5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

およびAD-likeタウ アッセイ系を用いた検討	-----31
--------------------------	---------

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

-----45
---------

古本祥三（東北大学医学系研究科）

### 3. プローブの結合親和性および選択性の検討

-----55
---------

岡村信行（東北大学医学系研究科）

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

-----65
---------

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

-----67
---------

# 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 21 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2年度目（平成21年度；当該年度）の研究計画は、専らアルツハイマー病（AD）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。当該年度末までに約4300化合物をスクリーニングし、以下の成果を得た。選び出された代表的化合物 THK-5X3X、-6162、-6169、-6175、-6182、および-6189はAD患者脳切片においてタウ選択的染色性を示した。AD脳に見られるタウはインビトロでは再現しにくいことが知られているが、研究代表者らは長年の試行錯誤の末、このアッセイ系（インビトロ AD-like タウ アッセイ系）を構築することができた。同アッセイ系ではタウ特異的・選択的化合物 THK-5X3X は濃度依存的に AD-like タウとの結合量を増加させたが、一方アミロイドβ蛋白に特異的・選択的なプローブ BF-227 では同様の作用態度は全く認められなかった。また AD 患者脳切片においてタウ選択的染色性を示す化合物群は、いずれも濃度依存的に AD-like タウとの結合量を増加させた。血液-脳関門透過性に関してはマウスを用いて非標識3化合物を HPLC で、 $[^{18}\text{F}]$ 標識2化合物をγ-カウンターで検討したがいずれも優れた脳内動態を示した。AD 患者脳切を用いたオートラジオグラフィーにおいて、 $[^{18}\text{F}]$ THK-5X3X はタウ特異的・選択的な集積を示したが、一方、 $[^{18}\text{F}]$ BF-227 の集積はアミロイドβ特異的・選択的であった。 $[^{18}\text{F}]$ THK-5XX の変異型タウ（K18Δ280-tau fibril）に対する結合親和性は  $K_d=1.67\text{ nM}$  であり、 $\text{A}\beta_{1-42}$  fibril に対するのそれよりも 12.4 倍高い結合親和性を示した。またタウトランスジェニックマウスに $[^{18}\text{F}]$ THK-5XX を静脈内投与し、脳内のタウ病変との結合性を評価したところ、野生型マウスに比べて選択的な脳内集積が認められた。以上、研究代表者らのプローブは、タウ特異的・選択的であり、プロミッシングなそれらであることが強く示唆されたことから、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）内には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、探索的臨床研究を実施したい。

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・准教授

分担研究者 古本祥三 東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野・准教授

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、得られる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。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はUCLA Barrioらのチーム、プローブは<sup>18</sup>F]FDDNP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>C]PIBである<sup>2)</sup>。

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 $^{11}\text{C}$ PIB 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 $^{11}\text{C}$ PIB 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（表1）<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 $^{11}\text{C}$ PIB が結合するA $\beta$ 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 $^{11}\text{C}$ PIB 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 $^{11}\text{C}$ PIB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

$^{11}\text{C}$ PIB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、 $^{11}\text{C}$ PIB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2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 $^{11}\text{C}$ BF-227のヒトにおけるPET画像を示したが、図2からでも明らかなように、脳内A $\beta$ の蓄積量と認知症状との間の相関はそれほど高く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A $\beta$ 蓄積にはかなりのばらつきが存在する。 $^{11}\text{C}$ BF-227は $^{11}\text{C}$ PIB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 $^{11}\text{C}$ BF-227においてさえ図2の結果である。 $^{11}\text{C}$ PIBを用いて図2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A $\beta$ ）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Aβ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>6)</sup>。表2の症例7および8ではAβワクチンにより脳内Aβ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3にADにおけるAβ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、Aβ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Aβ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。

1990年代初頭にADの臨床症状に相関する病理像はAβよりもタウであるとする幾つかの報告がある<sup>7)</sup>が、Holmesの報告によって図らずもこれが再認識される結果となった。

これらのことはAD発症後のAβ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、Aβ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Aβ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Aβ)とタウとの関連は図4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4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Aβ)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2年度目(平成21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および AD-like タウ アッセイ系を用いた検討」で述べた様に、解決することが難しいいくつかの問題がある。これらの問題点の中に「AD 患者脳に見られるタウはインビトロで極めて再現しにくい」ことが挙げられる。研究代表者らはこの問題を解決すべく長年の試行錯誤を繰り返してきたが、ようやく本年度になってこの問題の解決に成功したので、その結果および AD 患者脳切片における染色性につき工藤らが分担研究報告「アルツハイマー病患者脳標本における化合物の染色性および AD-like タウ アッセイを用いた検討」として報告した。

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」において非標識 3 化合物の、岡村らは分担研究報告書「プローブの結合親和性および選択性の検討」において標識 2 化合物の脳移行性を評価した。

岡村らは分担研究報告書「プローブの結

合親和性および選択性の検討」においてプローブ候補化合物のタウおよび A $\beta$  蛋白凝集体との結合親和性を検討し、AD 患者脳切片でオートラジオグラフィーを撮影するとともに、タウトランスジェニックマウスにおける脳内のタウ病変との結合性を小動物用 PET を用いて画像撮影した。

## B. 研究方法

### 1. スクリーニングに用いた化合物

平成 21 年度（2 年度目）末までにスクリーニングに供した化合物は約 4,300 化合物であった。その内訳は工藤研究室で所蔵している化合物ライブラリー約 4200、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約 100 であった。

なお、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。

### 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 $\mu$ 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%KMnO<sub>4</sub> 20 分間、PBS 2 分間×2 回、0.1%K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> / 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%エタノールで 200 μM の濃度に溶解後、純水で 100 μM 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 μM 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。

タウ免疫染色は以下のように行った。脱パラフィン処理したスライドガラス上の切片の周囲を DAKO ペンで取り囲み、3%過酸化水素メタノール溶液 (30%過酸化水素水 (WAKO 081-04215), メタノール(WAKO 131-01826))を切片に滴下して室温で 10 分反応させた。その後冷 PBS-tween20 (0.2g tween20 in 1L PBS) で 5 分間の洗浄を 2 回行い、ブロッッキング用血清 (WAKO 299-56701)を滴下、室温で 30 分反応させた。その後一次抗体 (AT8, 1:20, INNOGENETICS 90206) を滴下し、室温で一晩反応させた。反応後に切片を冷 PBS-tween20 で 2 分間の洗浄を 5 回繰り返すし、二次抗体 (抗マウス IgG(H+L), ヤギ,

ビオチン結合溶液, WAKO 229-56701) を滴下して 1 時間反応させた。次に冷 PBS-tween20 で 2 分間の洗浄を 3 回繰り返すし、ABC 溶液 (WAKO 229-56701) を滴下して 30 分反応させた。最後に冷 PBS-tween20 で 2 分間の洗浄を 3 回繰り返すし、DAB (WAKO 049-22831) / 0.05mol/L Tris-HCl buffer (pH 7.6, WAKO 208-14691) = 10mg / 20mL を滴下して発色したところを水道水に入れて反応を停止させた。免疫染色した切片は顕微鏡 (Nikon, Eclips E800) で観察、デジタルカメラ (Nikon, DMX1200F) で撮像を行った。

なおブロッッキング用血清、二次抗体、ABC 溶液にはアミロイド β-プロテイン免疫組織染色キット (WAKO 299-56701) のものを用いた。

### 3.インビトロ AD-like タウアッセイ系を用いた評価

96 穴マイクロプレートに各化合物溶液 50 μL と AD-like タウ 50 μL を加えて分注し室温で 15 分間攪拌した。攪拌終了後、蛍光光度計 (SPECTRA MAX 190) を用いてそれぞれの蛍光を測定し、 $\Delta F = [\text{化合物} + \text{AD-like タウの蛍光強度}] - [\text{化合物単独の蛍光強度} + \text{AD-like タウ単独の蛍光強度}]$  を算出した。

### 4. 脳移行性評価

THK-5X3X、-6162、-6182の3化合物は非標識体を用いて HPLC (SHISEIDO NANOSPACE SI-2) で、THK-533 および -5X3X の2化合物は $[^{18}\text{F}]$ 標識体を用いて  $\gamma$  カウンター(アロカ、AccuFLEX $\gamma$ 7000)で測定した(THK-5X3X は非標識および標識体の両方で検討した)。マウスは、体重 30-40g、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実験

$[^{18}\text{F}]$ THK-5X3X および $[^{18}\text{F}]$ BF-227 を AD 海馬-側頭葉脳切片に滴下し、室温で10分間反応させた。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、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 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。

## 6. A $\beta$ 、タウ蛋白との結合親和性の検討

$[^{18}\text{F}]$ THK-5XX の A $\beta$ 、タウ蛋白との結合親和性を評価する目的で、合成 A $\beta$  1-42 線維、および変異型タウ (K18 $\Delta$ 280-tau) 線維との結合飽和試験を行った。A $\beta$  1-42 線維は、A $\beta$  1-42 溶液を 37°C で3日間、1200rpm でインキュベートして作製した。またタウ

線維は、10  $\mu\text{M}$  の K18(K $\Delta$ 280)を 5  $\mu\text{M}$  へパリン/PBS pH 7.4 とともに 37°C で3日間、1200rpm でインキュベートして作製した。

## 7. タウトランスジェニックマウスに対する In vivo 投与実験

タウトランスジェニック (Tg) マウス (rTg(TauP301L)4510, n=8) および野生型 (Wt) マウス (n=7) に $[^{18}\text{F}]$ THK-5XX を尾静脈より投与し、小動物用 PET スキャナー (Philips Mosaic microPET) で撮像を行い、投与後 30 分後の局所放射能濃度を Tg マウスと Wt マウスで比較した。

### (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

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（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 22 年 3 月 31 日までに約 4300 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 5-1 および 5-2 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-5X3X、-6162、-6169、-6175、-6182、および-6189）の染色像を示した。代表的 6 化合物によって染色される構築物はタウ特有の形態を示していた。

また、AD 患者脳切片における THK-5X3X の染色像は、隣接切片におけるタウ免疫染色陽性構築物とその形態像を含めてよく一致していた（図 6）。

### 3. インビトロ AD-like タウアッセイ系を用いた評価

AD 患者脳標本を用いた染色（図 5 の上段左および図 6）およびオートラジオグラフィ試験（図 9 および 10）においてタウに特異的・選択的に結合することが確かめられている THK-5X3X は濃度依存的に AD-like タウとの結合を増加させたが、一方、A $\beta$  特異的選択的プローブとして知られている BF-227 では同様の現象は全く観察されなかった（図 7）。

図 5 に示した AD 患者脳切片のタウを選択的に染色した化合物の内、THK-6162、-6169、および-6189 と AD-like タウとの結合性を見たところ、3 化合物はいずれも濃度依存的に AD-like タウとの結合を増加させた（図 8）

### 4. 脳移行性評価

非標識体を用いて HPLC で測定した THK-5X3X、-6162、-6182 の 3 化合物はいずれも優れた脳内動態を示したが、脳移行性および脳からのウォッシュアウトを勘案すると THK-6162 がより優れた脳内動態を示していると考えられた（表 3）。

一方、 $[^{18}\text{F}]$ 標識体を用いて  $\gamma$ -カウンター

で測定した THK-5XX、-5X3X では THK-5X3X がより優れた脳内動態を示していると考えられた (表 4)。

## 5. オートラジオグラフィ実験

図 9 に示すように AD 海馬-側頭葉脳切片における  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  の集積分布は  $[^{18}\text{F}]\text{BF-227}$  とは異っており、海馬領域における集積は  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  の方が顕著であった。また  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  の集積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 および 10 に見られるように  $[^{18}\text{F}]\text{BF-227}$  の集積は外側側頭葉において優位であり、 $\text{A}\beta$  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。一方、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  の集積は、神経原線維変化の沈着が多い海馬 CA1 領域で顕著であり、老人斑のみの沈着がみられる歯状回では軽微であった。

## 6. $\text{A}\beta$ 、タウ蛋白との結合親和性の検討

$[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  の  $\text{A}\beta$  線維、タウ蛋白線維との結合親和性を評価した結果、変異型タウ (K18 $\Delta$ 280-tau) 線維に対する  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  の  $\text{Kd}$  値は 1.67 nM であり、 $\text{A}\beta$ 1-42 fibril ( $\text{Kd}$ : 20.68 nM) に対するそれよりも高い結合親和性を示した。

## 7. タウトランスジェニックマウスに対す

## る In vivo 投与実験

$[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  の in vivo でのタウ蛋白との結合能力を評価するため、タウ Tg マウスおよび Wt マウスに  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  を投与し、PET スキャンを実施した結果、投与 30 分後の段階で、Tg マウスの脳においてより選択的な  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  の集積が確認された (図 11)。

## D. 考察

3年計画の2年度目 (平成21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。平成22年3月末までに約4300化合物をスクリーニングした。

その中から選び出された代表的化合物群 (THK-5X3X、-6162、-6169、-6175、-6182、および-6189) は、AD患者脳切片においてタウ選択的染色性を示し、THK-5X3Xの選択性はタウ免疫染色によっても裏付けられた。

タウプローブを開発するためには AD 患者脳におけるタウをインビトロで再現し、再現したアッセイ系を用いて化合物をスクリーニングすることが求められる。しかし、AD 患者脳 of タウはインビトロで再現することが極めて難しいことが知られている。AD のもう 1 つの代表的な病理像である  $\beta$  シート構造をとった  $\text{A}\beta$  を主構成成分とする老人斑 (ないしは  $\text{A}\beta$ ) は、市販の  $\text{A}\beta$  を購入して比較的容易に  $\beta$  シート構造をとった AD 患者様の  $\text{A}\beta$  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正常または変異をもっ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。研究代表者らは長年の試行錯誤の末、インビトロにおけるAD-like タウ アッセイ系を構築することができた。

同アッセイ系においてタウ特異的選択的THK-5X3Xは濃度依存的にAD-like タウとの結合を増加させたが、一方、Aβ特異的選択的プローブとして知られているBF-227では同様の作用態度は全く観察されなかった。またAD患者脳切片においてタウを選択的に染色するTHK-5X3X、-6162、-6169、および-6189とAD-likeタウとの結合性を見たところ、いずれの化合物とも濃度依存的にAD-likeタウとの結合を増加させた。

AD-like タウ アッセイ系はタウプローブ開発における我々の大きな武器となるであろう。

血液-脳関門透過性に関してはマウスを用いて非標識3化合物をHPLCで、<sup>18</sup>F標識2化合物をγ-カウンターで検討したがいずれも優れた脳内動態を示した。

AD患者脳切片を用いたオートラジオグラフィにおいて<sup>18</sup>FTHK-5X3Xの結合はタウ特異的・選択的であり、一方、<sup>18</sup>FBF-227はAβ特異的・選択的であった。

<sup>18</sup>FTHK-5XXのAβ線維、タウ蛋白線維

との結合親和性を評価した結果、タウに対する親和性(K<sub>d</sub>=1.67 nM)は、Aβに対するそれよりも約12.4倍高い結合親和性を示した。

またタウTgマウスにおけるin vivo実験から、<sup>18</sup>FTHK-5XXは生体脳におけるタウ蛋白を非侵襲的に検出する能力も持つことを確認することができた。

以上、研究代表者ら開発した化合物群はタウ特異的・選択的PETプローブないしは候補になりうることを強く示唆させる。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、各種薬理作用等を検討し、プロミシングなプローブの開発に目処をつけることができた。

## 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.
  - 7) Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT: Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 42. 631-639. 1992

## F.健康危険情報

なし。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okamura N, Shiga Y, Furumoto S, Tashiro M, Tsuboi Y, Furukawa K, Yanai K, Iwata R, Arai H, Kudo Y, Itoyama Y, Doh-ura K: In vivo detection of prion amyloid plaques using [11C]BF-227 PET. *Eur J Nuc Med.*37.934-941.2010
- 2) Kikuchi A, Takeda A, Okamura N, Tashiro M, Hasegawa T, Furumoto S, Kobayashi M, Sugeno N, Baba T, Miki Y, Mori F, Wakabayashi K, Funaki Y, Iwata R, Takahashi S, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y : In vivo visualization of {alpha}-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylamino-thiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy] benzoxazole positron emission

- tomography in multiple system atrophy. *Brain*. Doi:10.1093/brain/awq091 (2010)
- 3) Okamura N, Villemagne VL, Drago J, Pejoska S, Dhamija RK, Mulligan RS, Ellis JR, Ackermann U, O'Keefe G, Jones G, Hughes A, Kung HF, Pontecorvo MJ, Skovronsky D, Rowe CC. In vivo measurement of vesicular monoamine transporter type 2 density in Parkinson's disease with <sup>18</sup>F-AV-133. *J Nucl Med.*, 2010; 51: 223-228.
  - 4) Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Waragai M, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H.: Amyloid PET in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease with BF-227: comparison to FDG-PET. *J Neurol.* Doi10.1007/s00415-009-5396-8 (2009)
  - 5) Waragai M, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Funaki Y, Kato M, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H.: Comparison study of amyloid PET and voxel-based morphometry analysis in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 285: 100-105.2009
  - 6) Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Yaegashi N, Kase Y, Arai H.: A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid beta proteins in vitro and in vivo.. *J Neurochem.*1009.1648-1657.2009
  - 7) Okamura N, Fodero-Tavoletti MT, Kudo Y, Rowe CC, Furumoto S, Arai H, Masters CL, Yanai K, Villemagne VL.: Advances in molecular imaging for the diagnosis of dementia. *Expert Opin. Med. Diagn.* 3.705-716.2009
  - 8) Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Okamura N, Furumoto S, Rowe CC, Kudo Y, Masters CL, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL : In vitro characterisation of BF227 binding to alpha-synuclein/Lewy bodies. *Eur J Pharmacol.* 617. 54-58..2009
  - 9) Takino N, Sakurai E, Kuramasu A, Okamura N, Yanai K. Roles of the histaminergic neurotransmission on methamphetamine-induced locomotor sensitization and reward: a study of receptors gene knockout mice. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 85: 109-116.
  - 10) Okuda T, Zhang D, Shao H, Okamura N, Takino N, Iwamura T, Sakurai E, Yoshikawa T, Yanai K. Methamphetamine- and 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced behavioral changes in histamine H3-receptor knockout mice. *J Pharmacol Sci.* 2009; 111: 167-174.
  - 11) Hiraoka K, Okamura N, Funaki Y, Watanuki S, Tashiro M, Kato M, Hayashi A, Hosokai Y, Yamasaki H, Fujii T, Mori E, Yanai K, Watabe H. Quantitative analysis of donepezil binding to acetylcholinesterase using positron emission tomography and [5-(11)C-methoxy]donepezil.

Neuroimage. 2009; 46: 616-623.

- 12) 荒井啓行、岡村信行、藁谷正明、古川勝敏、谷内一彦、工藤幸司: アルツハイマー病の病態とバイオマーカー開発. 日薬理誌. 135.3-7. 2010
  - 13) 工藤幸司: アミロイドーシスの分子イメージング. In”アミロイドーシス UPDATE”企画 山田正仁. 医学のあゆみ. 299 巻. 第 5 号 p 430-435. 2009 年. 医歯薬出版、東京
  - 14) 岡村信行. PET をもちいた脳アミロイドの画像化. 臨床神経学, 49(11):922-924, 2009.
2. 学会発表  
(国内学会)
- 1) 工藤幸司: タウイメーキング. 第 28 回日本認知症学会(シンポジウム). 2009 年 11 月 20 日~11 月 22 日. 仙台市東北大学百周年記念会館
  - 2) 藁谷正明、岡村信行、古川勝敏、谷内一彦、工藤幸司、荒井啓行: 軽度認知障害の予後予測における BF227-PET と MRI の比較検討. 第 28 回日本認知症学会. 2009 年 11 月 20 日~11 月 22 日. 仙台市東北大学百周年記念会館
  - 3) 岡村信行、古本祥三、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司: 神経原線維変化を検出する 18F 標識 PET プロープの開発. 第 28 回日本認知症学会 (ポスター). 2009 年 11 月 20 日~11 月 22 日. 仙台市東北大学百周年記念会館
  - 4) 古本祥三、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦: ポジトロン標識アミロイド画像化プロープの開発研究. 第 37 回薬物活性シンポジウム. 2009 年 10 月 9 日. 仙台市東北薬科大学
  - 5) 杉健太郎、岡村信行、石井賢二、石渡喜一、伊藤健吾、加藤隆司、鷺野谷利幸、工藤幸司、谷内一彦: 【11C】BF 227-PET によるアルツハイマー病早期診断法の多施設共同臨床試験. 第 49 回日本核医学会学術総会. 2009 年 10 月 1 日-3 日. 旭川市民文化会館
  - 6) 岡村信行、古本祥三、田代学、古川勝敏、杉健太郎、船木善仁、岩田錬、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦: アルツハイマー病診断における [18F]FACT-PET の有用性の検討. 第 49 回日本核医学会学術総会. 2009 年 10 月 1 日-3 日. 旭川市民文化会館
  - 7) 杉健太郎、岡村信行、石井賢二、石渡喜一、伊藤健吾、加藤隆司、工藤幸司、谷内一彦: [11C]BF 227 を用いたアツルハイマー病早期診断法の多施設共同臨床試験. 日本分子イメージング学会 第 4 回総会・学術集会. 2009 年 5 月 14 日・15 日. 東京学術総合センター
  - 8) 岡村信行、谷内一彦. 脳神経疾患におけるバイオマーカー. 第 30 回日本臨床薬理学会 年会 ワークショップ 1「臨床試験とバイオマーカー」 2009 年 12 月 3 日 横浜



(国際学会)

- 1) Sugi.k,Okamura.N,Furumoto.S,Tashiro.M,  
Furukawa.K,Funaki.Y,Arai.H,Kudo.Y,Iwata.R, Yanai K: [18F]FACT PET is Useful for Noninvasive Detection of Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. THE EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR MEDICINE. 2009年10月9日-4日. スペイン バルセロナ
  - 2) Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Funaki Y, Kikuchi A, Shiga Y, Furukawa K, Arai H, Doh-ura K, Iwata R, Yanai K, Kudo Y. : [11C]BF-227 PET Study in Protein Conformational Diseases.. THE EUROPEAN ASSOCIATION OF NUCLEAR MEDICINE. 2009年10月9日-4日. スペイン バルセロナ
  - 3) Arai H,Fujiwara H,Tabuchi M,Yamaguchi T,Iwasaki K,Furukawa K,Sekiguchi K,Ikarashi Y,Kudo Y,Yaegashi N,KaseY: A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid $\beta$ proteins in vitro and vivo. ICAD : International Conference on Alzheimer's Disease. 2009年7月11日-16日.オーストリア ウィーン
  - 4) Furukawa K,Okamura N,Tashiro M,Furumoto S,Iwata R,Yanai K,Kudo Y,Arai H : PET imaging for mild cognitive impairment with FDG and beta-amyloid tracer,11C-BF-227. ICAD : International Conference on Alzheimer's Disease. 2009年7月11日-16日.オーストリア ウィーン
  - 5) Okamura N,Kikuchi A,Takeda A,Furumoto S,Tashiro M,Furukawa K,Arai H,Iwata R,Yanai K,Kudo Y: Noninvasive Detection of  $\alpha$ -synuclein Deposits In Human Brain Using [11C]BF-227-PET. ICAD : International Conference on Alzheimer's Disease. 2009年7月11日-16日.オーストリア ウィーン
- A. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

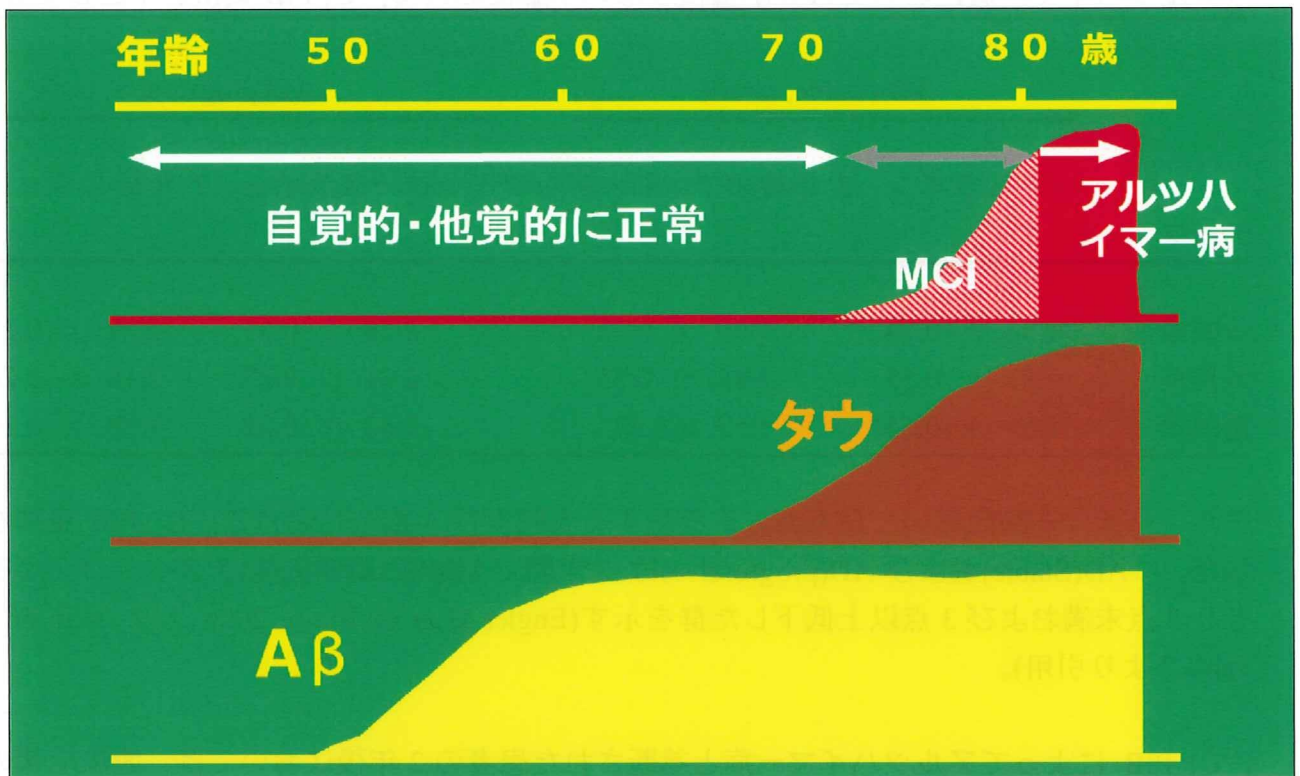


図 1.アルツハイマー病における臨床像と病理像の乖離

80 歳でのアルツハイマー病発症では 50 歳から  $A\beta$  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〉

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Aβ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Aβ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>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。

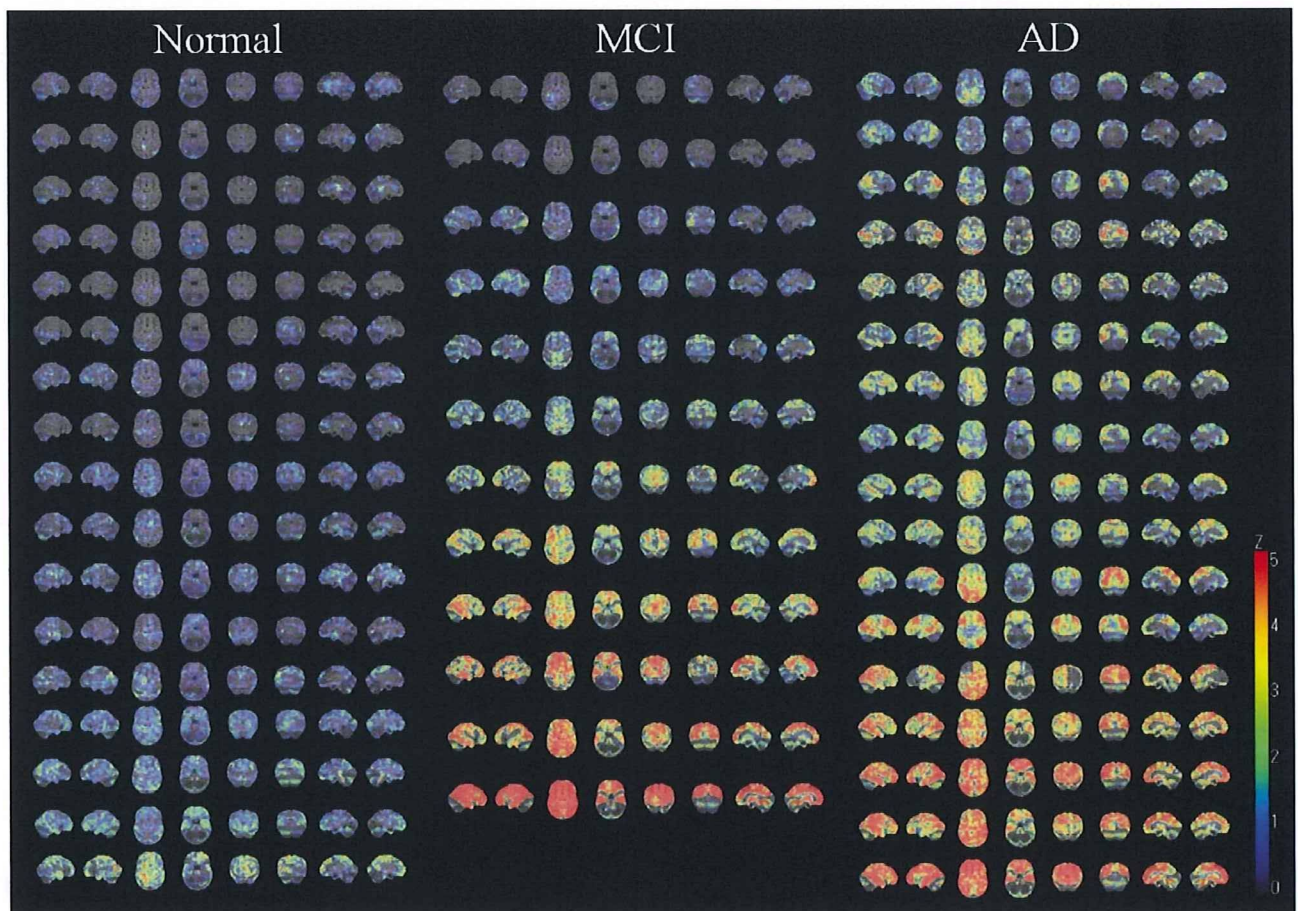


図 2. 研究代表者らによって開発されたアミロイド イメージングプローブ $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  のヒトにおける PET 画像。 3D SSP(3 Dimensional Stereotactic Surface Projection) 解析  
 Normal: 正常健常者、MCI: 軽度認知障害患者、AD: アルツハイマー病患者

$[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  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  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  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) が見られることになる。