

表2. Aβ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状

	Baseline MMSE (points)	AN1792 dose (μg)	Mean antibody response (ELISA units)	Evidence of Aβ plaque removal*	Aβ load	Braak tau stage†	Survival time (months)	MMSE before death (points)
1†	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

(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): Aβワクチン(AN1792) 処置前の認知機能(MMSE)のレベル

Evidence of Aβ 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

Aβ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Aβの側から見ると、Aβ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している。

一方、Braakのタウ蓄積レベルを見てみると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。

## 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3.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。

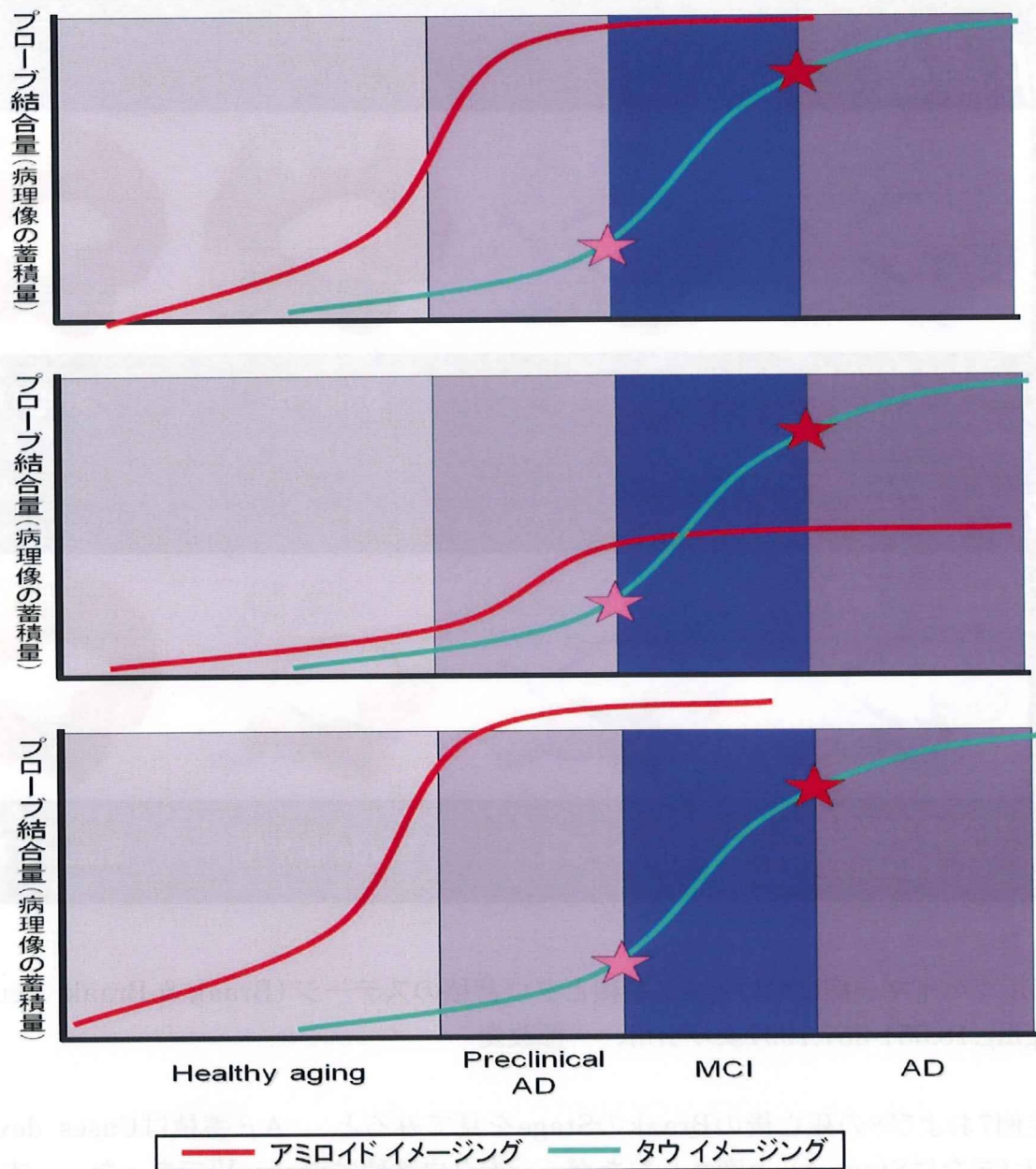


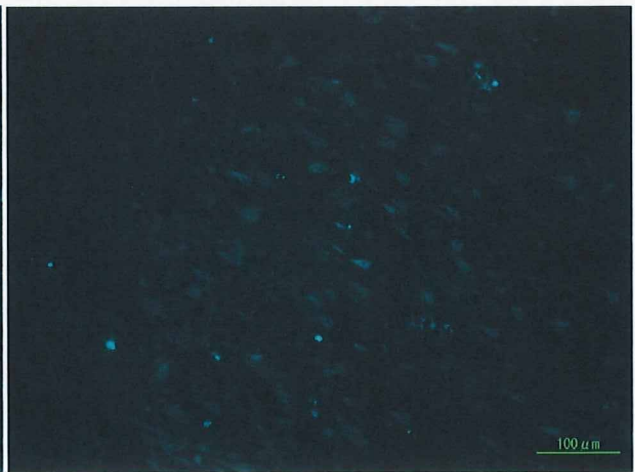
図4. ADにおけるアミロイド（ないしはA $\beta$ ）とタウの関係（研究代表者らの提唱）

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」。



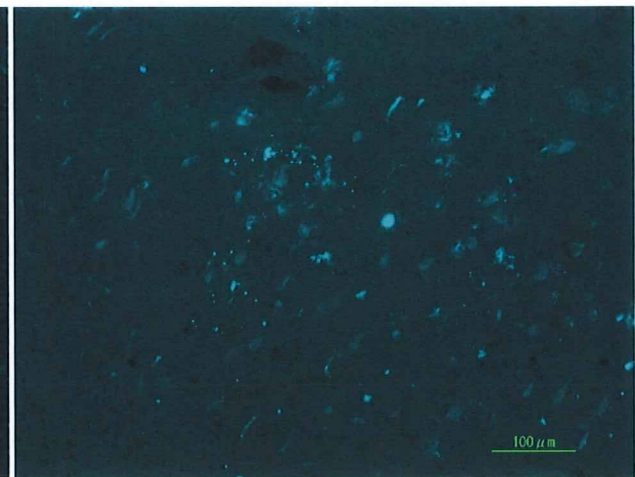
THK-5X3X



THK-6162



THK-6169



THK-6175

図 5-1. アルツハイマー病患者様脳切片における代表的化合物による染色像

図に示すように例示した代表的4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。

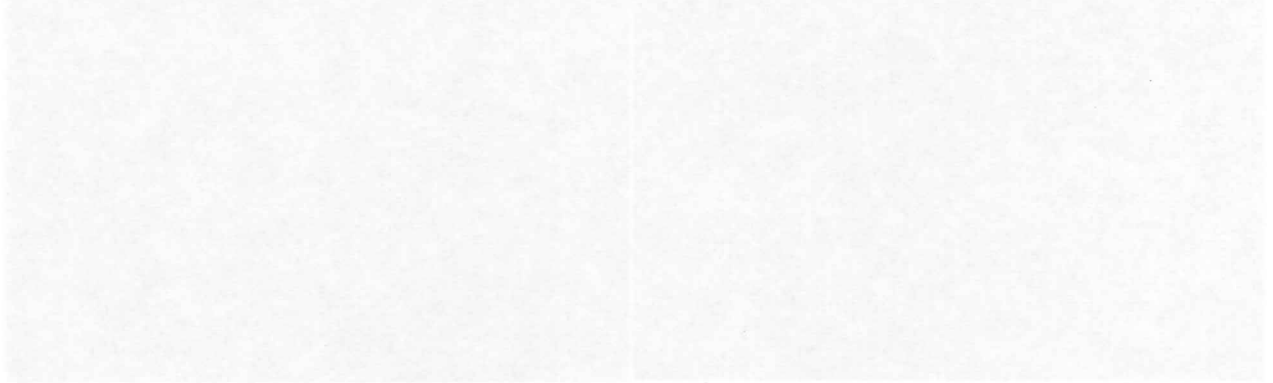


THK-6182

THK-6189

図 5-2 アルツハイマー病患者様脳切片における代表的化合物による染色像

図に示すように例示した代表的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。



THK-6182

THK-6189

化合物とタウ結合の阻害効果の比較は、タウタンパク質の過剰発現を抑制する効果を示している。

タウタンパク質の過剰発現を抑制する効果を示している。タウタンパク質の過剰発現を抑制する効果を示している。

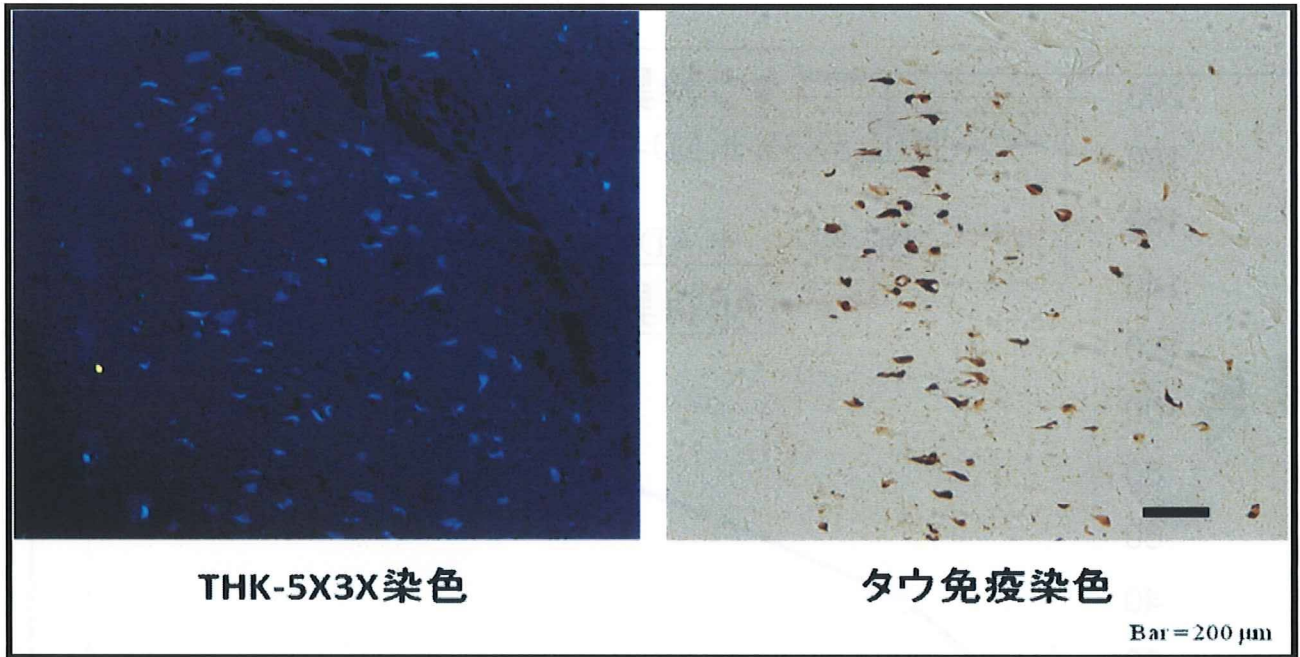


図6. アルツハイマー病患者脳切片におけるTHK-5X3Xのタウに対する特異性・選択制  
 左：THK-5X3X染色、 右：左の隣接切片におけるタウ免疫（AT-8）染色

アルツハイマー病患者脳切片における THK-5X3X の染色像は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。

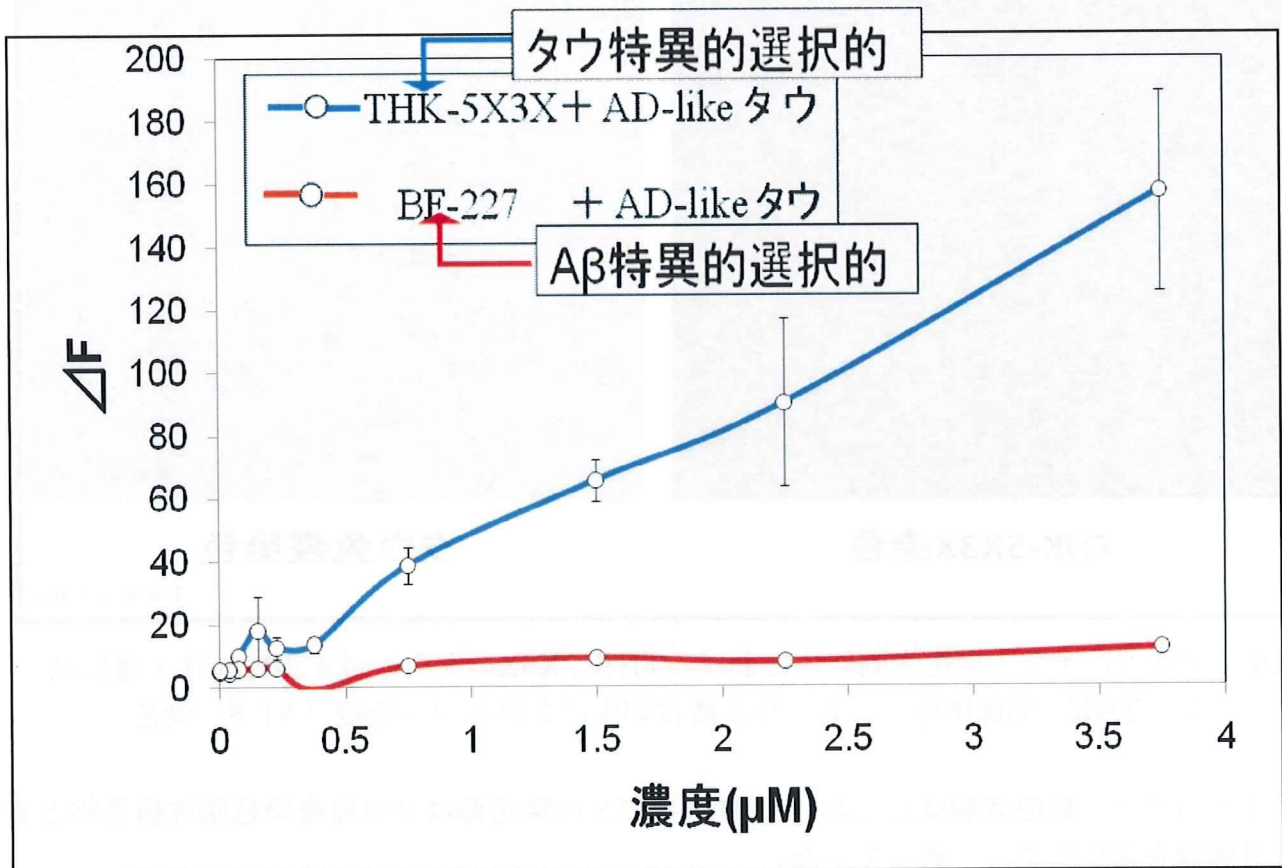


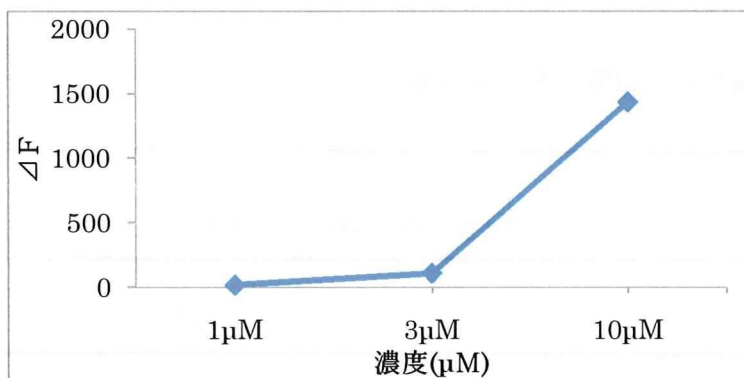
図7.インビトロAD-likeタウを用いた試験系におけるHK-5X3XとBF-227の作用

アルツハイマー病患者脳標本を用いた染色およびオートラジオグラフィ試験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プローブ 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、アミロイド  $\beta$  蛋白 ( $A\beta$ ) 特異的選択的プローブとして知られている BF-227 では同様の作用態度は全く観察されなかった。

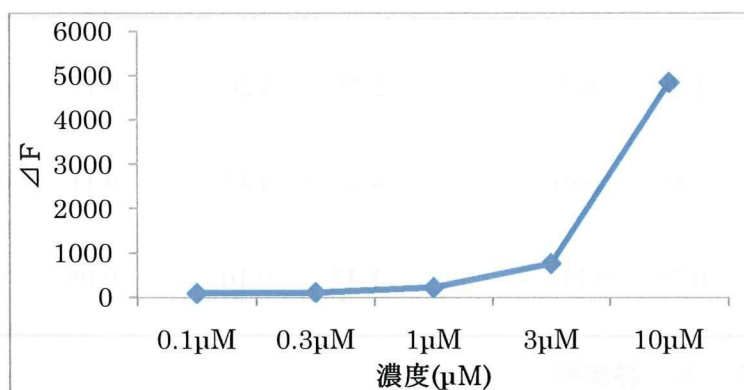
以上よりこのアッセイ系ではタウ特異的選択的プローブでは結合がみられるが、 $A\beta$  特異的選択的プローブでは結合がみられないことが確かめられた。

縦軸： $\Delta F =$  (THK-5X3X または BF-227 と AD-like タウとが結合した際の蛍光強度)  
 - (THK-5X3X または BF-227 単独の蛍光強度 + AD-like タウ単独の蛍光強度)

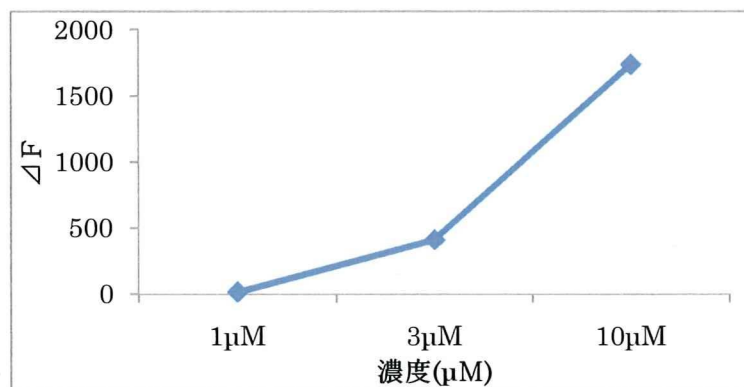
横軸：THK-5X3X または BF-227 の濃度



THK-6162



THK-6169



THK-6186

図 8. インビトロ AD-like タウを用いた試験系における THK-6162、-6169、および -6186 の作用

アルツハイマー病患者脳切片を用いた染色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-6162、-6169、および-6186 (いずれも図 5 参照) 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。



表 3. 各化合物静脈内投与後の脳および血漿における含量

	%ID/g or mL (mean ± S.D.)			
	脳		血漿	
	2 分後	30 分後	2 分後	30 分後
THK-5X3X	4.51 ± 0.29	1.70 ± 0.33	2.21 ± 0.26	0.17 ± 0.04
THK-6162	3.98 ± 0.47	0.10 ± 0.01	4.03 ± 0.41	0.11 ± 0.02
THK-6182	5.26 ± 0.68	0.71 ± 0.21	1.47 ± 0.10	0.09 ± 0.04

使用動物；雄性マウス、 投与ルート；静脈内

表 4. [<sup>18</sup>F]THK-5XX および [<sup>18</sup>F]THK-5X3X 静脈内投与後の脳における放射能変化

	脳 %ID/g (mean ± S.D.)	
	2 分後	60 分後
[ <sup>18</sup> F]THK-5XX	2.72 ± 0.31	1.46 ± 0.05
[ <sup>18</sup> F]THK-5X3X	6.01 ± 0.54	1.32 ± 0.07

使用動物；雄性マウス、 投与ルート；静脈内

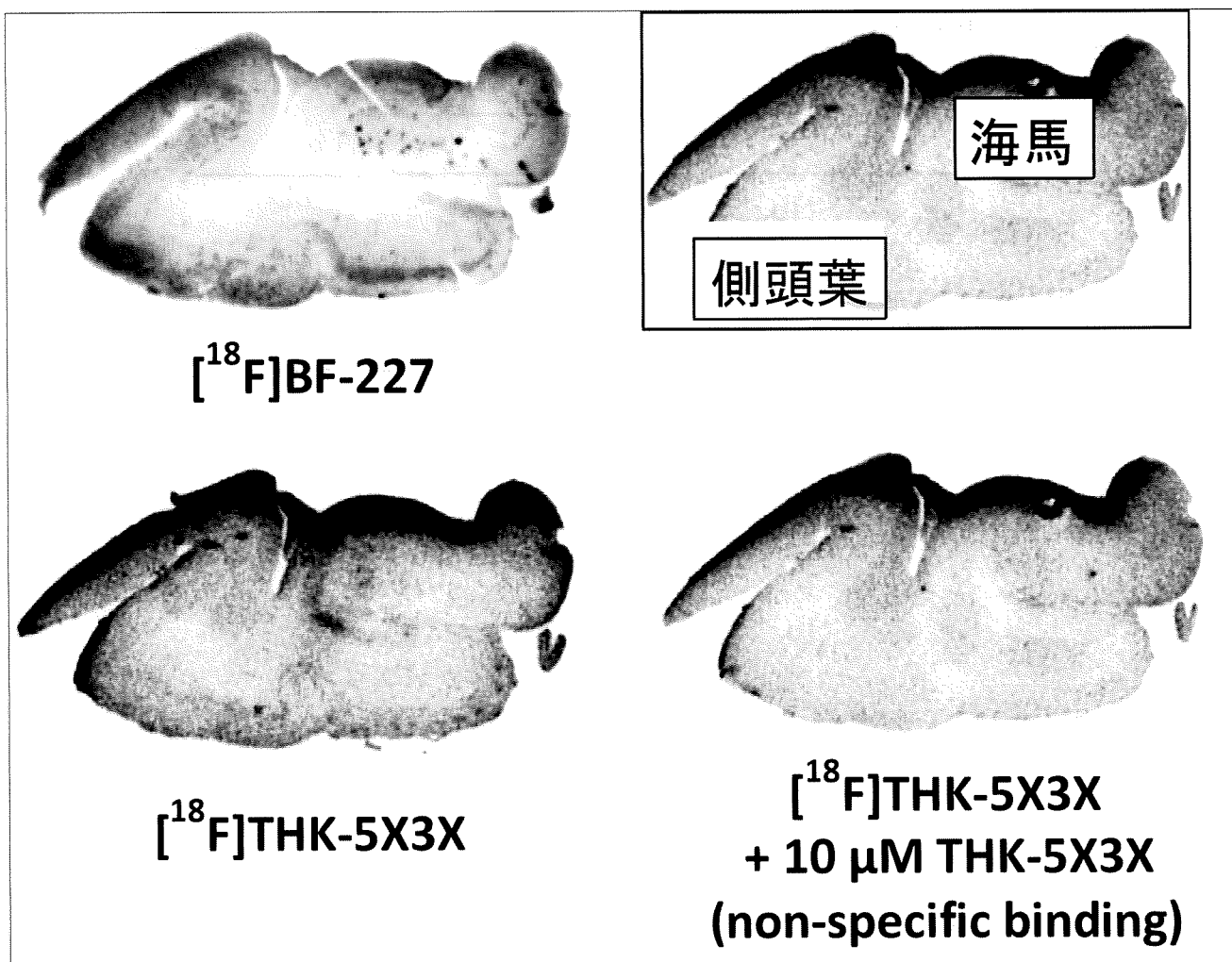


図 9. [<sup>18</sup>F]THK-5X3X、[<sup>18</sup>F]BF-227 によるアルツハイマー病患者海馬—側頭葉脳切片のオートラジオグラフィ像

アルツハイマー病海馬-側頭葉脳切片における[<sup>18</sup>F]THK-5X3X の集積分布は[<sup>18</sup>F]BF-227 のそれと明らかに異なっていた(上段左と下段左)。海馬領域における集積は[<sup>18</sup>F]THK-5X3X の方が顕著であった(下段左)。また[<sup>18</sup>F]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(下段右)。

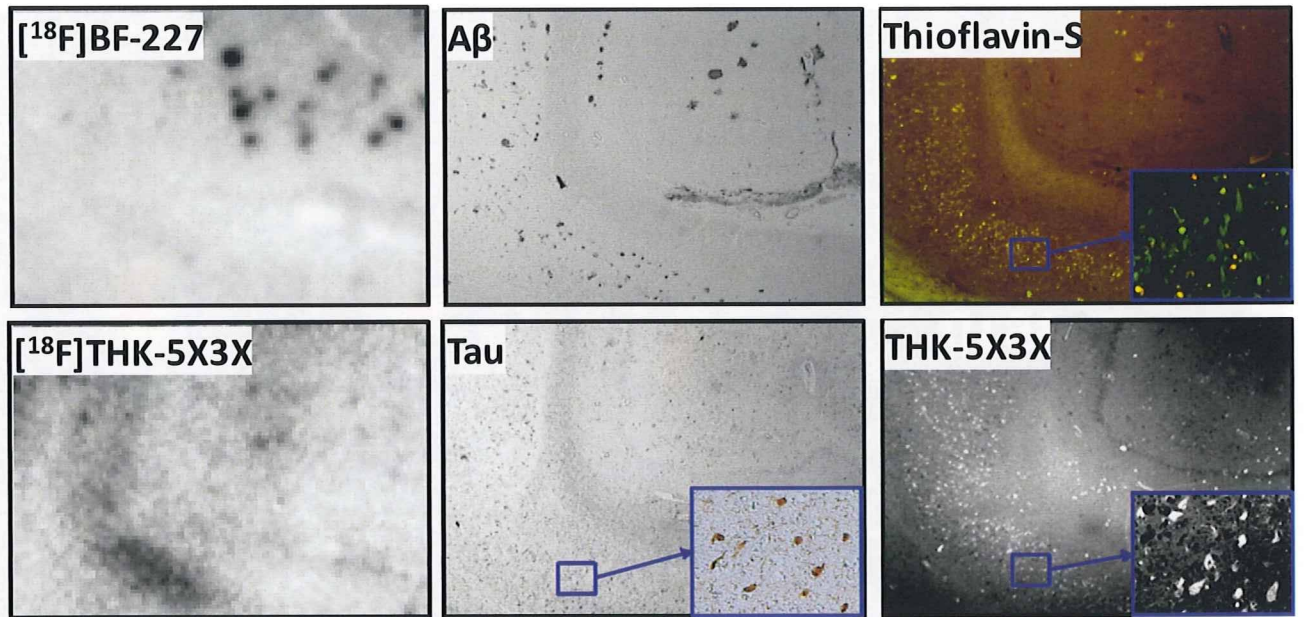


図10. アルツハイマー病患者脳切片における $[^{18}\text{F}]$ THK-5X3Xのオートラジオグラフィ (A $\beta$ 特異的選択的プローブ $[^{18}\text{F}]$ BF-227との比較)

上段左： $[^{18}\text{F}]$ BF-227のオートラジオグラフィ、上段中：A $\beta$ 免疫染色、上段右：Thioflavin-S 染色

下段左： $[^{18}\text{F}]$ THK-5X3Xのオートラジオグラフィ、上段中：タウ免疫染色、THK-5X3X染色

$[^{18}\text{F}]$ THK-5X3X の集積像はタウ選択的であり、また非標識 THK-5X3X 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（上段右の Thioflavin-S 染色および下段中のタウ免疫染色との比較より）。

一方、 $[^{18}\text{F}]$ BF-227 集積像は A $\beta$  選択的であった。

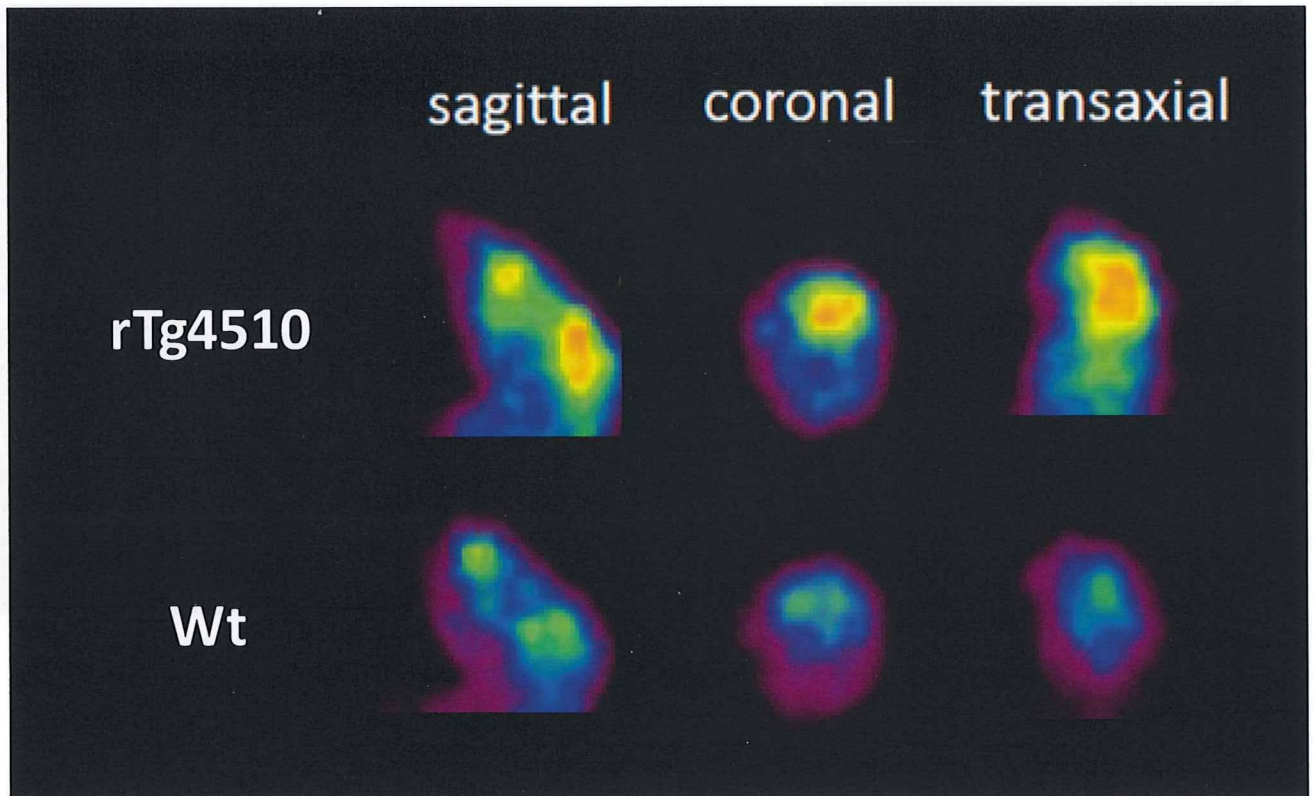


図 11. タウトランスジェニックマウス (rTg4510)、野生型マウス (Wt) の $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$ 投与 30 分後の PET 画像

$[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$ は より選択的にTgマウスの脳に集積した。

# 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 21 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 および

### AD-like タウ アッセイ系を用いた検討

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・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
	原田龍一	東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野・大学院生
	後藤あや	東北大学未来医工学治療開発センター・研究補助員
	門間智美	東北大学未来医工学治療開発センター・研究補助員
	黒沢純一	東北大学未来医工学治療開発センター・研究補助員
	小野寺大	東北大学未来医工学治療開発センター・研究補助員
	福田絵美子	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候補化合物によるタウ染色性を検討した結果、代表的化合物 THK-5X3X、-6162、-6169、-6175、-6182、および-6189 は患者脳切片のタウを選択的に染色した。アルツハイマー病患者脳において見られるタウはインビトロにおいて極めて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、この試験系の構築に成功した（インビトロ AD-like タウ アッセイ系）。同アッセイ系において THK-5X3X、-6162、-6169、および-6189 は濃度依存的に AD-like タウとの結合を増加させた。以上のことから、これら化合物はタウに対して特異的選択的な親和性を有していることが強く示唆された。

## 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 患者脳におけるタウをインビトロで再現できにくいことにある。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。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  $A\beta$  を主構成成分とする老人斑 (ないしは  $A\beta$ ) は、市販の  $A\beta$  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  $A\beta$  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を用いても、AD 患者に見られる  $\beta$  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。

第 2 に前述の状態はインビボ、特に Tg

マウスにおいても同様である。  $A\beta$  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(代表的な Tg2576 マウスの場合)が AD 型にかなり類似した  $A\beta$  を再現させることができる。これに対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  $\beta$  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。

第 3 にはタウ特異的選択的プローブ開発の難しさが挙げられる。  $A\beta$  とタウの両者に結合するプローブまでは到達できても、このプローブから  $A\beta$  に対する親和性を失わせた (またはタウのみに親和性を持たせた) プローブまでにはなかなか辿り着きにくい。化合物の最適化を繰り返してもタウ特異的選択的な特性を持たせることができずに行き詰った末、その基本骨格を持つ一連の化合物群そのものを放棄してしまったことを研究代表者らは何度も経験している。

さて、これらの難問をどのように解決するかであるが、第 3 の問題は優れたタウ特異的・選択的 PET プローブの開発に関すること、すなわち本研究課題全体の中心命題、研究開発のノウハウ、ないしは我々のセレンドピティ能力に関することであると思われることから、ここでは述べない。

Tg マウスに関してはかなりの高齢まで Tg マウスを飼育すると、  $\beta$  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、Tg マウスを 2008 年 12 月および 2009 年 12 月に購入し現在飼育中である。

第 1 の問題である AD 患者脳に見られるタウ(以下これを AD-like タウと呼ぶ)のインビトロにおける再現であるが、昨年度の報告書ではミュータントのタウである K18(KΔ280)を使用してこれに当たる予定であると記載したが、その後も試行錯誤を繰り返した結果、ようやく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。

以上、本分担報告書では AD 患者脳標本におけるタウの染色性および AD-like タウアッセイ系を用いて検討したので報告する。

## 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。

### 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 $\mu$ 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  $\times$  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  $\times$  3 回の順で処理を行った。

各化合物は 100% エタノールで 200  $\mu$ M の濃度に溶解後、純水で 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

THK-5X3X 染色の隣接切片の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。

なおブロッキング用血清、二次抗体、ABC

溶液にはアミロイド  $\beta$ -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

このアッセイ系において、AD-like タウ作製法に関する情報は、極めて重要である。もしこの情報を競合研究者ならずとも得たならば、簡単にタウ特異的選択的化合物をインビトロにおいてスクリーニングすることができる。従って本報告では、どのようにして AD-like タウそのものを得るかの情報については開示せずに、同 AD-like タウを用いた化合物の評価について報告する。

まず各化合物溶液 50 $\mu$ L に AD-like タウ 50 $\mu$ L を加えて 96 穴マイクロプレートに分注し室温で 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、 $\Delta F$ (=[化合物+AD-like タウの蛍光強度]-[化合物単独の蛍光強度+ AD-like タウ単独の蛍光強度]) を算出した。

#### (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（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化合物をスクリーニングした。

### 2. AD 患者脳標本における化合物による染色

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代表的6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2）。

### 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1 および2)およびオートラジオグラフィ試験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3）。

図1-1 および1-2に示した化合物の内、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 4)

#### 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、候補化合物の AD 患者脳標本における染色性、および AD-like タウを用いた評価を実施した。

その結果、THK-5X3X、-61621、-6169、-6175、-6182、および-6189 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。

また我々によって開発された AD-like タウを用いた評価系ではタウ特異的選択的プローブでは結合がみられるが、A $\beta$  特異的選択的プローブでは結合がみられないことが確かめられた。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。

タウプローブ開発に取り組んでいる海外、国内の研究者らとディスカッションをする際、必ず話題にあがるのは、「インビトロで信頼できるアッセイ系がないために、多数の化合物を最初のスクリーニングで処理できない」に言及することが多い。その意味で 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。

以上、本分担報告書で示した化合物群はタウに対して特異的選択的な親和性を有していることが強く示唆された。

#### E. 結論

タウイメージング用 PET プローブの開発を目的に、候補化合物の AD 患者脳標本における染色性、および AD-like タウアッセイ系を用いた評価を実施した。その結果、THK-5X3X、-61621、-6169、-6175、-6182、および-6189 は AD 患者脳切片のタウを染色し、THK-5X3X、-6162、-6169、および-6189 は濃度依存的に AD-like タウとの結合を増加させた。以上のことから、これら化合物はタウに対して特異的選択的な親和性を有していることが強く示唆された。

#### F. 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