

- 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.Brain. Doi:10.1093/brain/awq091 (2010)
- 3) 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)
  - 4) 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
  - 5) 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
  - 6) 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
  - 7) 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
  - 8) 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
  - 9) 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 p430-435. 2009年.医歯薬出版、東京
2. 学会発表  
(国内学会)
- 1) 工藤幸司: タウイメージング. 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 プローブの開発.  
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  
像化プローブの開発研究. 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、 鷲野谷  
利幸、工藤幸司、谷内一彦： 【11C】  
BF227-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]BF227 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

(国際学会)

- 1) Sugi.k,Okamura.N,Furumoto.S,Tashiro.M,  
Furukawa.K,Funaki.Y,Arai.H,Kudo.Y,Iwat  
a.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 consituent  
1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyrano  
se have potent anti-aggregation effects on  
Alzheimer's amyloid $\beta$ proteins in vitro and

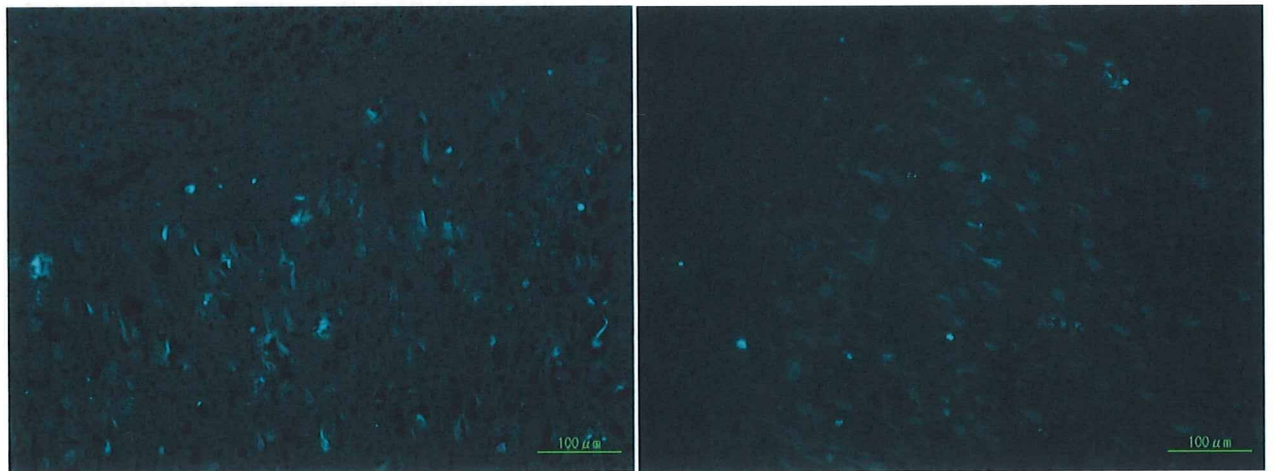
vivo. ICAD : International Conference on Alzheimer's Disease. 2009年7月11日-16日.オーストリア ウイーン

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 ウイーン

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 ウイーン

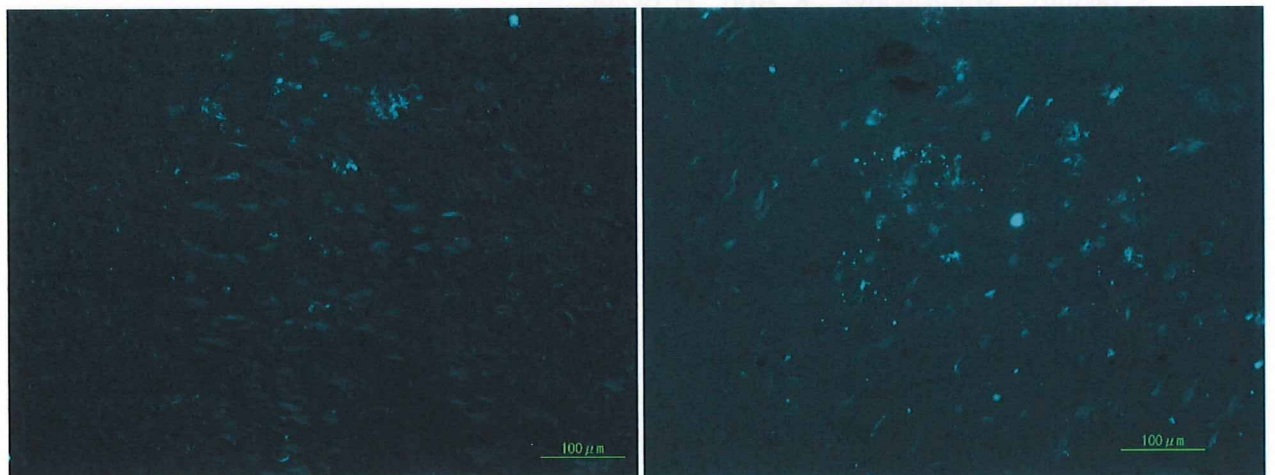
G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



THK-5X3X

THK-6162

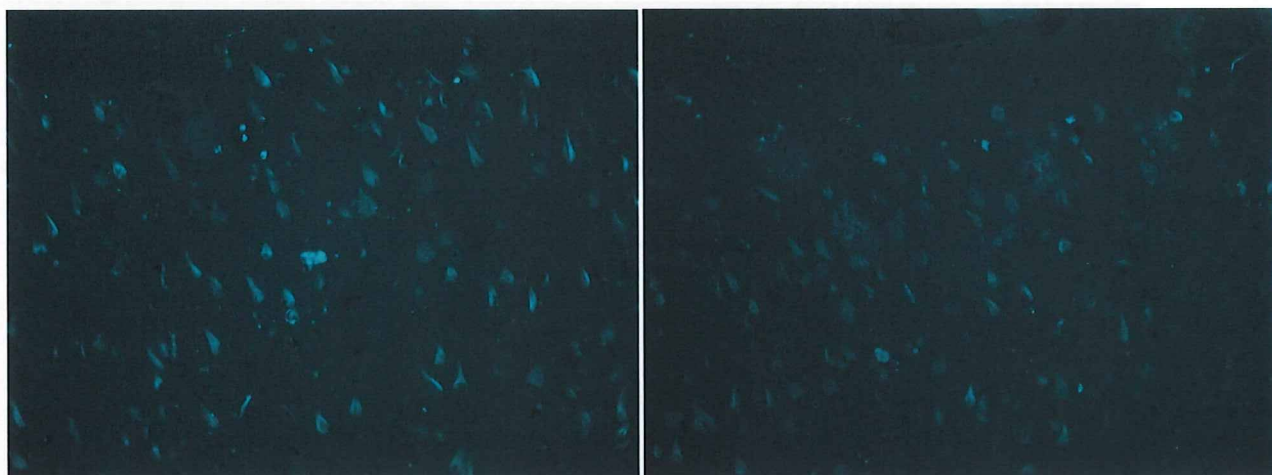


THK-6169

THK-6175

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 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。

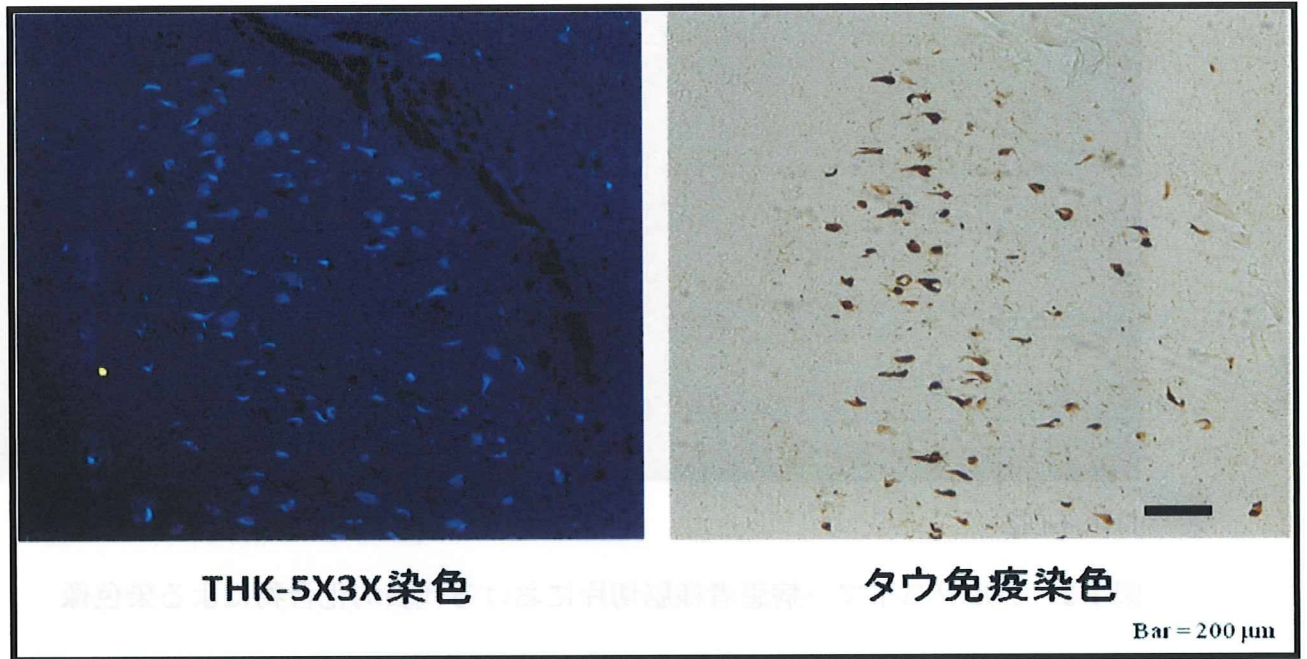


図2. アルツハイマー病患者脳切片におけるTHK-5X3Xのタウに対する特異性・選択制  
左：THK-5X3X染色、 右：左の隣接切片におけるタウ免疫（AT-8）染色

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。



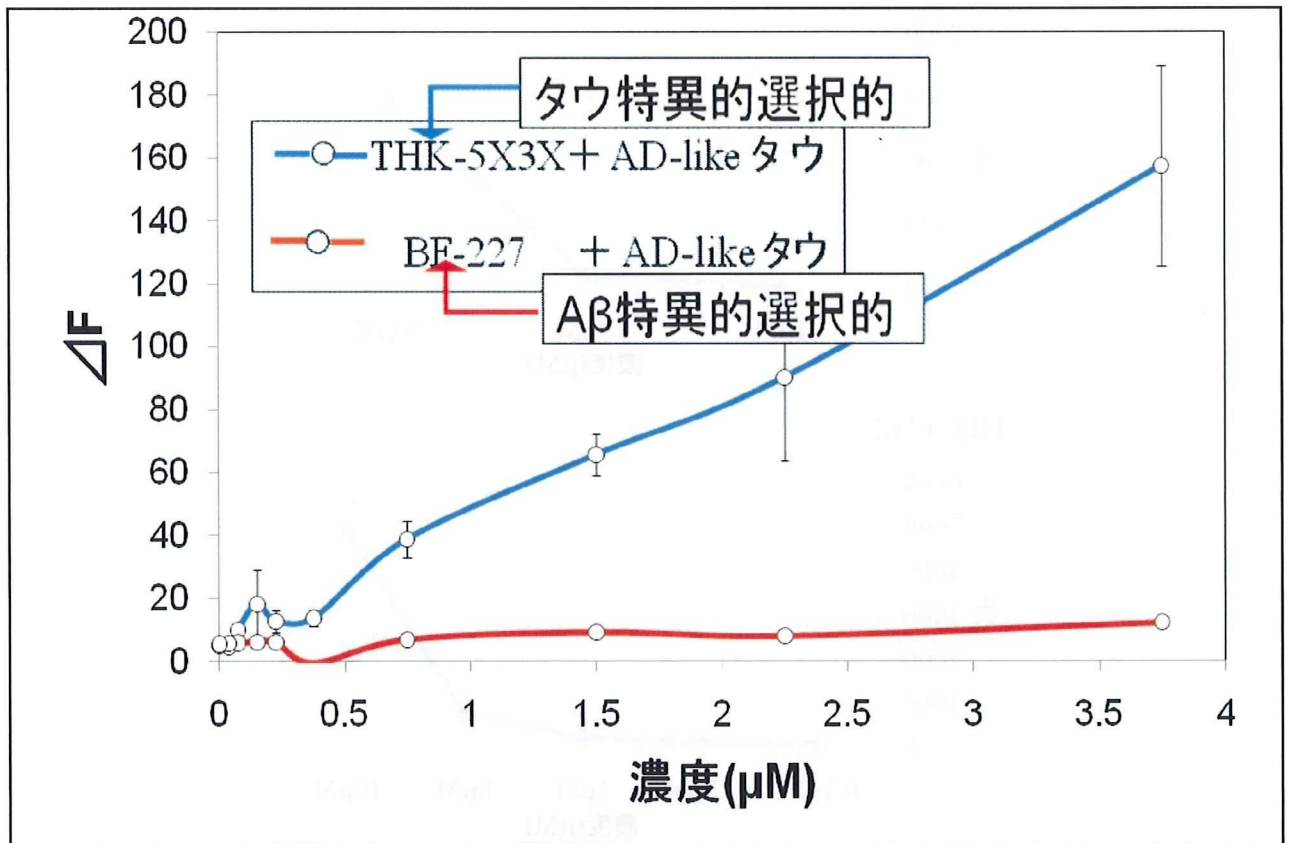


図3.インビトロAD-likeタウを用いた試験系におけるHK-5X3XとBF-227の作用

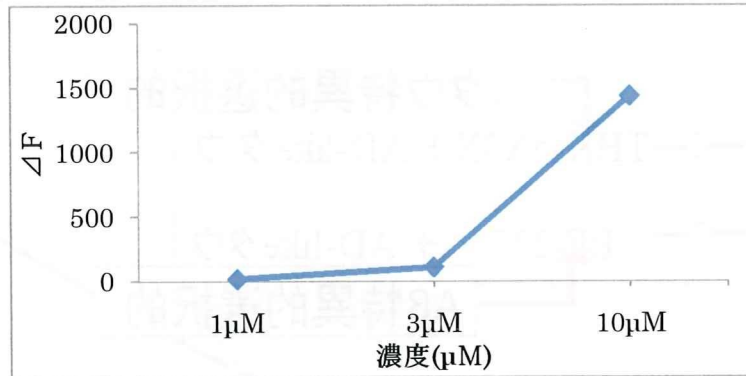
アルツハイマー病患者脳標本を用いた染色およびオートラジオグラフィ試験においてタウに特異的選択的に結合することが確かめられているプローブ THK-5X3X は濃度依存的に AD-like タウとの結合を増加させたが、一方、アミロイドβ蛋白 (Aβ) 特異的選択的プローブとして知られている BF-227 では同様の現象は全く観察されなかった。

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、Aβ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。

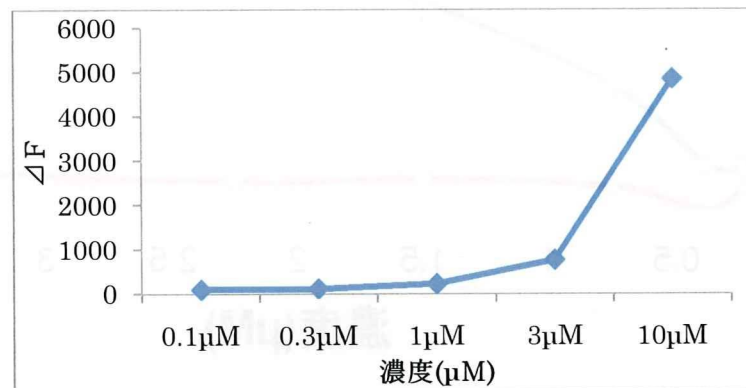
縦軸： $\Delta F =$  (THK-5X3X または BF-227 と AD-like タウとが結合した際の蛍光強度)

– (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)

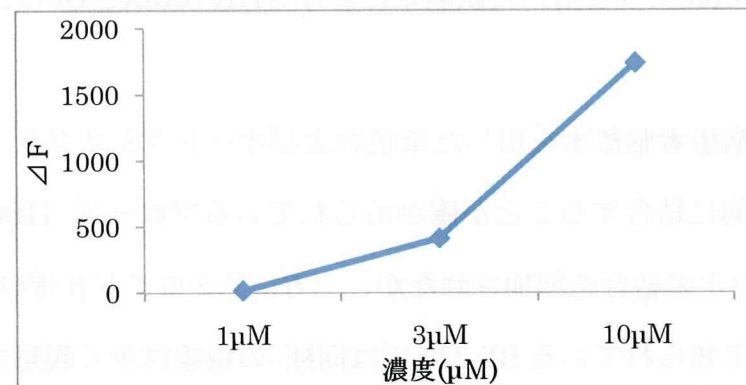
横軸：THK-5X3X または BF-227 の濃度



THK-6162



THK-6169



THK-6186

図4. 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 (図1参照) 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。



# 厚生労働科学研究費補助金

## (医療機器開発推進事業)

平成 21 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 | 東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野・准教授  |
| 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 | 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      |
|       | 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 |
|       | 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   |

[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。アルツハイマー病患者脳に高い結合性を示す THK-5X3X、-6162、-6182 の 3 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-6162 に関しては、投与 2 分後に十分高い脳内への移行性 (3.98%ID/g) を示し、30 分後には約 40 分の 1 程度まで低下したことから、最も優れた脳内動態特性を有することが明らかになった。その他 2 化合物も優れた脳内動態特性を示した。

#### A. 研究目的

アルツハイマー病 (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  $\beta$  蛋白 ( $A\beta$ ) 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、治療標的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A $\beta$ 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A $\beta$ とタウは、ともに病的に凝集・沈着する場合、立体構造的に $\beta$ 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 $\beta$ 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化合物群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。

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ともに、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-5X3X、-6162、-6182 の 3 化合物である。なお、化合物の構造式については、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-5X3X は、Tween80 溶液 (5%分)、EtOH 溶液 (5%分)、生理食塩水 (大塚製薬 : 90%分) 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、AcCN 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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、オートサンプレー : 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 ①AcCN 2 ml ②MeOH 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

(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 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=6.5) / AcCN = 600 : 400 (流速 1.0 ml/min) の条件下で、HPLC のカラムには L-column2 ODS 5 µm 4.6×150 mm を用い、吸光 310 nm、蛍光の Ex 320 nm、Em 500 nm で検出した。

検量線を引く目的で、血漿は標準として、THK-5X3X の 5 pmol/10 µl MeOH 溶液、50 pmol/10 µl MeOH 溶液、500 pmol/10 µl MeOH 溶液、5 nmol/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-5X3X の 5 pmol/10 µl MeOH 溶液、50 pmol/10 µl MeOH 溶液、500 pmol/10 µl MeOH 溶液、5 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。

また、今回、THK-5X3X は、蛍光強度が強いため、蛍光検出器のフォトマル感度を、Medium に設定し分析を行った。

THK-6162 についても THK-5X3X 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 6.5) / アセトニトリル = 350 : 650 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 310 nm、蛍光の Ex 320 nm、Em 496 nm で検出した。

THK-6182 についても THK-5X3X 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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 6.5) / アセトニトリル = 500 : 500 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 360 nm、蛍光の Ex 370 nm、Em 490 nm で検出した。

### C. 研究結果

表 1 に 3 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-5X3X 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  $4.51 \pm 0.29$  %ID/g を示し、30 分後には  $1.704 \pm 0.33$  %ID/g と減少した。一方、血漿における含量は 2 分後では  $2.21 \pm 0.26$  %ID/g、30 分後では、 $0.17 \pm 0.04$  %ID/g と減少した。

THK-6162 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

$3.98 \pm 0.47$  %ID/g を示し、30 分後には  $0.10 \pm 0.01$  %ID/g と減少した。一方、血漿における含量は、2 分後では  $4.03 \pm 0.41$  %ID/g、30 分後では、 $0.11 \pm 0.02$  %ID/g と減少した。

THK-6182 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  $5.26 \pm 0.68$  %ID/g を示し、30 分後には  $0.71 \pm 0.21$  %ID/g と減少した。一方、血漿における含量は、2 分後では、 $1.47 \pm 0.10$  %ID/g を示し、30 分後では  $0.09 \pm 0.04$  と減少した。

### D. 考察

脳画像化プローブに必要なとされる脳内動態特性は、投与直後に速やかに脳内へプローブが移行し、その後正常脳組織に対しては非特異的結合性を示さず脳外へ排泄されるという性質である。これによって、タウ病変の存在領域と非存在領域の画像コントラストが明瞭になり、また、健常者との差が明確になって診断精度の向上につながる。

実際の臨床 PET 検査では、撮像時における認知症患者に対する負担を大きくしないために、撮像時間は通常 2 時間以内となる。この撮像時間内で明瞭な PET 画像を得るためには、当研究グループがこれまでにアミロイド画像化プローブの開発研究で培ってきた経験から、正常マウス脳内における動態特性としては、投与後 2 分で十分な取り込み ( $2 \sim 3$  %ID/g 以上) があり、なおかつ投与後 30 分でその取り込み率が 10 分の 1 以下に減少することが望ましいと分かっている。

このような観点から本研究結果を考察した場合、THK-6162に関しては、投与2分後に十分高い脳内への移行性(3.98%ID/g)を示し、30分後には約40分の1程度まで低下したことから、優れた脳内動態特性を有することが明らかになった。

THK-6182に関しては、投与2分後で高い脳内取り込み(5.26%ID/g)が見られ、その後30分で約7.5分の1にまで取り込み率が低下した。

THK-5X3Xも同様に投与2分後で適度な脳内への移行性(4.51%ID/g)が見られ、その後30分で約2.65分の1まで取り込み率が低下した。

今回検討した3化合物はいずれもAD患者脳切片においてタウ特異的な染色像を示した化合物であるが、脳内動態から見ると最も優れているのはTHK-6162、以下THK-6182、-5X3Xの順と考えられた。

## E. 結論

本研究では、タウ病変画像化プローブの候補化合物3つについて脳移行性評価を行った。そのうちTHK-6162は優れた脳内動態特性を示し、タウ画像化プローブとして有用性が示唆された。その他2化合物も優れた脳内動態特性を示した。

## 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 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.Brain. Doi:10.1093/brain/awq091 (2010)
- 3) 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)
- 4) 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

- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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 p430-435. 2009 年.医歯薬出版、東京

## 2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 工藤幸司: タウイメージング. 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 プローブの開発. 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ブの開発研究. 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、鷲野谷利幸、工藤幸司、谷内一彦: B F 227-P E T によるアルツハイマー



- 病早期診断法が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]B F 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  
  
(国際学会)
- 1) Sugi.k,Okamura.N,Furumoto.S,Ta  
shiro.M,Furukawa.K,Funaki.Y,Ar  
ai.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  
consituent  
1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-gluco  
pyranose 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 ウイーン
- 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 ウイーン
- 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 ウイーン

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

A. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

表 1. 各化合物静脈内投与後の脳および血漿（または血液）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、N=4

**厚生労働科学研究費補助金  
(医療機器開発推進研究・ナノメディスン研究・分子イメージング)  
平成 21 年度 分担研究報告書**

**タウイメージングによるアルツハイマー病診断**

**—プローブの結合親和性および選択性の検討—**

|       |      |                              |
|-------|------|------------------------------|
| 分担研究者 | 岡村信行 | 東北大学大学院医学系研究科<br>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<br>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<br>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<br>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<br>センター・教授     |

**研究要旨：** タウイメージング用プローブ候補化合物  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  のタウ蛋白およびアミロイド  $\beta$  蛋白凝集体との結合親和性を評価した。その結果、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  の K18 $\Delta$ 280-tau fibril に対する結合親和性は  $K_d=1.67$  nM と、A $\beta$ 1-42 fibril ( $K_d=20.68$  nM) よりも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 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  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有意なトレーサの脳内集積が認められた。さらに最適化プローブの一つである THK-5X3X の  $^{18}\text{F}$  標識体を用いて、AD 患者脳切片でオートラジオグラフィーを行ったところ、同プローブの神経原線維変化への選択的な結合が確認された。 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  は  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  よりも脳移行性および正常脳組織からのクリアランスにおいて、より優れた特性を有していた。

### 1. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の神経病理学的特徴は、アミロイド  $\beta$  蛋白の凝集物である老人斑と、タウの凝集物である神経原線維変化の脳内への蓄積である。老人斑を検出するプローブは実用化されているが、神経原線維変化を選択的に検出する PET プローブは未だ存在しない。もし老人斑・神経原線維変化の両者をそれぞれ独立して検出することができれば、AD の診断精度がさらに向上し、病態をより正確に把握することが可能となる。またタウ蛋白を標的とした新しいアルツハイマー病治療薬の薬効評価を正確に行うことが可能となる。

そこで本年度は我々がタウ蛋白に結合選択性をもつことを見出したキノリン誘導体の  $^{18}\text{F}$

標識体である  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  に関して、in vitro におけるタウ蛋白との結合親和性を測定した。またタウトランスジェニックマウスを用いて、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  の in vivo でのタウ蛋白検出能力を評価した。さらに正常組織からの wash out を高めた最適化プローブ  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  の脳移行性と正常脳組織からのクリアランスを ICR マウスで測定し、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  と比較した。さらに同プローブの AD 脳病理標本における結合性をオートラジオグラフィーにて評価した。

### 2. 研究方法

#### 1. A $\beta$ 、タウ蛋白との結合親和性の検討

$[^{18}\text{F}]\text{THK-5XX}$  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 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成した。またタウ線維は、10  $\mu$ M の K18(K $\Delta$ 280)を 5  $\mu$ 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成した。

## 2. 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 [ $^{18}$ 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) で撮像を行った。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。

## 3. 脳血液関門透過性の評価

[ $^{18}$ F]THK-5XX、[ $^{18}$ F]THK-5X3X を ICR マウスの尾静脈より投与し、静注 2 分、10 分、30 分、60 分および 120 分後の脳組織濃度を、組織 1g 当たりの投与量に対する集積率 (%ID/g) で算出した。

## 4. オートラジオグラフィ実験

[ $^{18}$ F]THK-5X3X および [ $^{18}$ F]BF-227 を AD 海馬一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。

## 3. 研究結果

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

次に、[ $^{18}$ F]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 [ $^{18}$ F]THK-5XX を投与し、PET スキャンを実施した。その結果、投与 30 分後の段階で、Tg マウスの脳において [ $^{18}$ F]THK-5XX の集積が確認された (図 1)。Tg マウス脳における集積量は Wt マウスよりも有

意に高かったが、脳以外の臓器においては、Tg マウスと Wt マウスの集積に有意差を認めなかった (図 2)。

次に、[ $^{18}$ F]THK-5XX、[ $^{18}$ F]THK-5X3X の脳血液関門透過性と正常脳組織からのクリアランスを ICR マウスで比較した (図 3)。投与 2 分後の脳集積量は、[ $^{18}$ F]THK-5XX (2.72  $\pm$  0.31 %ID/g) よりも [ $^{18}$ F]THK-5X3X (6.01  $\pm$  0.54 %ID/g) の方が 2 倍以上高い集積を示した。一方、投与 60 分以降の脳集積量は、[ $^{18}$ F]THK-5XX (60 分: 1.46  $\pm$  0.05 %ID/g, 120 分: 1.34  $\pm$  0.06 %ID/g) よりも [ $^{18}$ F]THK-5X3X (60 分: 1.32  $\pm$  0.07 %ID/g, 120 分: 0.72  $\pm$  0.08 %ID/g) の方が低く、[ $^{18}$ F]THK-5X3X の方がより速やかに正常脳組織から wash out された。

最後に、[ $^{18}$ F]THK-5X3X と [ $^{18}$ F]BF-227 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にて比較した。AD 海馬一側頭葉脳切片における [ $^{18}$ F]THK-5X3X の集積分布は [ $^{18}$ F]BF-227 とは異なり、海馬領域における集積は [ $^{18}$ F]THK-5X3X の方が顕著であった。また [ $^{18}$ 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 (図 4)。[ $^{18}$ F]BF-227 の集積は外側側頭葉において優位であり、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、[ $^{18}$ F]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 (図 5)。

## 4. 考察

[ $^{18}$ F]THK-5XX はタウ蛋白線維に対する十分な結合親和性を有しており、AD 患者脳における神経原線維変化に対しても同様の結合親和性を有するものと考えられる。またタウ Tg マウスにおける in vivo 実験から、本プローブ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。

最適化プローブの一つである [ $^{18}$ F]THK-5X3X は、[ $^{18}$ F]THK-5XX よりも脳移行性および正常脳組織からのクリアランスに優れており、生体用プローブとしては [ $^{18}$ F]THK-5XX よりも有望と思われる。[ $^{18}$ F]THK-5X3X は [ $^{18}$ F]THK-5XX と同様、神経原線維変化に対する結合選択性を有しており、BF-227 などの従来のアミロイドイメージングプローブとは異なる結合特性を有することが示唆された。

## 5. 結論

[<sup>18</sup>F]THK-5XX, [<sup>18</sup>F]THK-5X3X はタウイメー  
ジング用 PET プローブの有力候補化合物と考  
えられた。

## 6. 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 [<sup>11</sup>C]BF-227 PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*, 2010; 37: 934-941.
2. 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.
3. 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.* 2009; 3: 705-716.
4. 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.* 2009; 285: 100-108.
5. 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.
6. 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.
7. 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.* 2009; 617: 54-58.
8. 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.

9. 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.

## 7. 学会発表

1. Okamura N, Kikuchi A, Takeda A, Furumoto S, Furukawa K, Arai H, Fodero-Tavoletti MT, Villemagne VL, Itoyama Y, Yanai K, Kudo Y. Non-invasive detection of α-synuclein deposits in human brain using [<sup>11</sup>C]BF227-PET. 2009 International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), July 15, 2009, Vienna
2. 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, <sup>11</sup>C-BF-227. 2009 International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), July 14, 2009, Vienna
3. 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. [<sup>11</sup>C]BF-227 PET Study in Protein Conformational Diseases. EANM'09 Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, October 10 - 14, 2009, Barcelona
4. Sugi K, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Funaki Y, Arai H, Kudo Y, Iwata R, Yanai K. [<sup>18</sup>F]FACT PET is Useful for Noninvasive Detection of Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. EANM'09 Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, October 10 - 14, 2009, Barcelona
5. Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Arai H, Doh-ura K, Kudo Y, Yanai K. [<sup>11</sup>C]BF-227 PET study of patients with protein misfolding diseases. The 2009 International Symposium on Early Detection and Rehabilitation Technology of Dementia-DRD2009, December 11, 2009, Okayama
6. Tashiro M, Okamura N, Furumoto S, Kumagai K, Furukawa K, Sugi K, Funaki Y, Kimura Y, Iwata R, Kudo Y, Arai H, Watabe H, Yanai K. Quantitative Analysis of Amyloid Deposition in Alzheimer's Disease Patients and Healthy Volunteers Using PET and [<sup>11</sup>C]BF-227. The 2009 International Symposium on Early Detection and Rehabilitation Technology of Dementia-DRD2009, December 11, 2009, Okayama
7. Okamura N, Kudo Y. Development of novel imaging probe for senile plaques and neurofibrillary tangles. International Symposium for Molecular Imaging Educational Course of Tohoku University 2010, March 12, 2010, Sendai
8. 岡村信行. PET を用いた脳アミロイドの画像化. 第 50 回日本神経学会総会 シンポジウム