

201011006A

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22年度 総括研究報告書

研究代表者 工藤 幸司

平成23年（2011年） 6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. タウ画像化プローブの標識合成と結合試験研究 -----15

古本祥三（東北大学医学系研究科）

2. 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脳移行性評価研究-----23

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 -----33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----37

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 22 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3年度目（平成22年度；当該年度）の研究計画は、3年間のタウイメージング用プローブ開発研究の成果として、1) ヒト探索的臨床研究を実施するに耐えうると思われるレベルまで達した複数のタウプローブを拾い上げること、2) それら複数のプローブの拡張型単回静脈内毒性試験を実施すること、3) 可能ならば、ヒト探索的臨床研究を実施するに当たり、東北大学倫理委員会等への申請資料を揃え、同委員会等へ申請する、4) 複数の候補プローブのうち、可能ならば1プローブの探索的臨床研究を本研究課題の研究期間内に実施する、であった。1)についてはCpd.Eを始めとする3化合物を拾い上げることができた。2)については3化合物の拡張型単回静脈内毒性試験を実施し、特に問題のないことを確かめることができた。3) および4) については東北大学の研究用PETセンターの予算のひっ迫および東日本大震災によって同センターが被災したことから、本研究期間内の倫理委員会等への申請および探索的臨床研究は実施することができなかった。 $[^{18}\text{F}]$ Cpd.Eの探索的臨床研究は海外または国内の共同研究先での速やかな実施を考えている。

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 研究目的

本研究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。

AD脳におけるAβとタウの蓄積のスタートはAβの方が10年以上先行していると考えられている。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 ^{11}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 ^{18}F 標識プローブの開発が試みられている。

AD診断においていまだ達成されていないものに、Aβ以外のもう1つの代表的病理像であるタウを追跡するタウイメージングがある。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、アミロイドイメージングよりも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ている。

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Aβを主構成成分とする老人斑(ないしはAβ)は、市販のAβを購入して比較的容易にβシート構造をとったAD患者様のAβ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

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。

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 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(代表的なTg2576マウスの場合)がAD型にかなり類似したA β 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 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。

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 β 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 β 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著者らは何度も経験している。

第4に標識方法の難しさが挙げられる。これはアミロイドイメージングおよびタウプローブを実際に開発(ないしは開発中)

の経験者として感じていることであるが、アミロイドイメージングプローブでは化合物の化学構造における標識位置および側鎖としての標識体の化学構造にはかなりの許容範囲が存在したが、タウはこの範囲が極めて狭いことを痛感している。母化合物とこれの標識体では全く特性が異なることをしばしば経験させられている。

本研究課題も3年計画の3年度目を迎え、本年は主として化合物の更なる最適化を加えた結果、ヒト探索的臨床試験に耐えうると判断された3化合物を見出すことができた。本報告ではその中のCpd.Eを中心に述べてみたい。

本研究課題では研究期間内に可能ならばヒト探索的臨床研究を実施したい旨、これまでの報告書に記載してきたが、後述する考察で詳述したように、残念ながら同臨床研究は次年度(平成23年度)以降に延期をせざるを得なかった。

B 研究方法

1.AD 脳切片における染色性の検討

Cpd.E およびその他化合物を50%エタノールに溶解し、100 μ Mの化合物溶液を作成した。これらの溶液をアルツハイマー病海馬脳切片(6 μ m厚)に滴下し、遮光下で10分間反応させた。PBSに2分間浸漬後、V-2Aフィルター(励起波長380-420nm, 蛍光波長450~nm)を用いて蛍光顕微鏡

(Nikon, Eclipse 80i) で鏡検した。また同一脳切片において AT8 を一次抗体に用いてタウ蛋白の免疫染色を行った。

2. [^{18}F]Cpd.E の標識合成

オートラジオグラフィおよび血液-脳関門透過性検討のために [^{18}F]Cpd.E を合成した。サイクロトロン HM12(住友重機械工業)で加速した 12 MeV の陽子ビームを同位体純度 98%以上の [^{18}O]H₂O に照射して $^{18}\text{F}^-$ を製造した。続いてその溶液を陰イオン交換樹脂(AG1-X8)に通して $^{18}\text{F}^-$ を樹脂上に捕捉し、33 mM K₂CO₃ 溶液で溶出させた。この $^{18}\text{F}^-$ 含有 K₂CO₃ 水溶液 200 μL (3.13 GBq) を褐色バイアルにとり、Kryptofix222 (16 mg)、アセトニトリル(2.3 mL)を加えてオイルバス(110°C)で加熱しながら He ガスを吹き付け、水を共沸させながらアセトニトリルを完全に除去した。さらにアセトニトリル(1.5 mL)を加え同様に加熱条件下でアセトニトリルを除去する操作を 2 回繰り返して、バイアル内を無水の状態にした。そこに、標識前駆体(3.0 mg)を溶解した DMSO 溶液(0.70 mL)を加え、オイルバス(110°C)で 10 分間加熱攪拌した。その後、反応溶液に塩酸(2M, 0.2 mL)を添加してさらに 110°C で 3 分間反応させた後、酢酸カリウム溶液(4M, 0.1 mL)と蒸留水(7.0 mL)で反応溶液を希釈して Sep-Pak tC18 カートリッジ(Waters)にロードし、蒸留水でカートリッジを洗浄後、

粗生成物をエタノールで溶出した。もっとも放射能の高いエタノール画分を蒸留水で希釈してセミ分取高速液体クロマトグラフィー(カラム: Inertsil ODS-4 (10×250 mm)、移動相: MeCN/NaH₂PO₄ (20 mM) = 50/50、流速: 5.0 mL/min)にかけ、約 18.5 分に溶出する [^{18}F]Cpd.E 由来の放射性ピーク(988 MBq, 減衰未補正值)を分取した。分取サンプルを分析したところ、放射化学的純度は 98%以上、比放射能は 137 GBq/ μmol (分析時)であった。

3. オートラジオグラフィ実験

[^{18}F]Cpd.E 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 β 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。

4. 血液-脳関門透過性

Cpd.E、THK-6236、-6239、および-6267 の 4 化合物は非標識体を用いて HPLC (SHISEIDO NANOSPACE SI-2) で、

THK-523 および Cpd.E の 2 化合物は^[18F]標識体を用いてγカウンター(アロカ、AccuFLEXγ7000)で測定した (Cpd.E 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 の Slc:ICR 雄性マウスを 1 群 4 匹として実験に用いた。

5.マウスにおける拡張型単回静脈内投与による毒性試験

Cpd.E、F (Cpd.E の近縁化合物) および THK-6236 の 3 化合物につきマウスにおける拡張型単回静脈内投与による毒性試験を専門業者 (三菱化学メディエンス) に委託した。

6.倫理委員会等への申請およびヒトにおける探索的臨床研究

考察にて詳述します。

(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.AD 脳切片における染色性の検討

Cpd.E、THK-6236、-6367 および-6264 の Aβ、タウ蛋白病変との結合性を評価するため、AD 患者脳切片を用いて染色を行った

ところ、神経原線維変化が明瞭に染色された(図1、2)。その染色像は Cpd.E では同一切片上で行ったタウ蛋白の免疫染色像と一致していた(図1)。

2. [¹⁸F]Cpd.E の標識合成

フッ素 18 アニオンを出発原料として標識合成を行い、分取 HPLC で目的生成物を 988 MBq(減衰未補正值)することができた。放射化学的には約 40~50%程度の収率で合成ができた。分析 HPLC による検定では、放射化学的純度は 98%以上、比放射能は 137 GBq/ μ mol (分析時)であった。

3. オートラジオグラフィー実験

Cpd.E の [¹⁸F]標識体を用いたオートラジオグラフィーにおいても、AD 脳切片におけるタウ免疫染色像と一致した集積像が観察された(図3)。

4. 血液-脳関門透過性

非標識 Cpd.E、THK-6236、-6239、および -6267 の 4 化合物はいずれも優れた血液-脳関門透過性および脳からのウオッシュアウトを示した(表1)

[¹⁸F]Cpd.E の投与 2 分、10 分、30 分、60 分、120 分の脳集積量は、それぞれ 9.2 ± 0.5 %ID/g、 8.6 ± 0.5 %ID/g、 3.6 ± 0.6 %ID/g、 1.0 ± 0.08 %ID/g、 0.4 ± 0.04 %ID/g であった。既報の [¹⁸F]THK-523 (2 分: 2.7 ± 0.3 %ID/g、60 分: 1.5 ± 0.05 %ID/g、G.研究発表-1 論文

発表の 1) と比較すると、 [¹⁸F]Cpd.E の方が投与 2 分後の脳移行量が約 3.4 倍高く、またより速やかなクリアランス特性を示した。また脱フッ素化による骨集積も認められなかった。

5. マウスにおける拡張型単回静脈内投与による毒性試験

外部の専門業者に委託した Cpd.E、F (Cpd.E の近縁化合物) および THK-6236 の拡張型単回静脈内投与による毒性試験の結果、臨床想定用量の 10000 倍の用量を投与しても特に問題となる作用は見られなかった。

6. 理委員会等への申請およびヒトにおける探索的臨床研究

考察にて詳述します。

D. 考察

3年計画の3年度目(平成22年度;当該年度)の研究計画は、3年間のタウイメージング用プローブ開発研究の成果として、1) ヒト探索的臨床研究を実施するに耐えうと思われるレベルまで達した複数のタウプローブを拾い上げること、2) それら複数のプローブの拡張型単回静脈内毒性試験を実施すること、3) 可能ならば、ヒト探索的臨床研究を実施するに当たり、東北大学倫理委員会等への申請資料を揃

え、同委員会等へ申請する、4) 複数の候補プローブのうち、可能ならば1プローブの探索的臨床研究を本研究課題の研究期間内に実施する、であった。

3年間の研究の成果としてAD患者脳切を用いた染色におけるタウ選択性、オートラジオグラフィにおけるタウ選択的集積性、さらに動態等から見て、 $[^{18}\text{F}]\text{Cpd.E}$ が優れたタウプローブ候補となりうると判断された。

外部の業者に委託した Cpd.E、F (Cpd.Eの近縁化合物) および THK-6236 の拡張型単回静脈内投与による毒性試験の結果、臨床想定用量の 10000 倍の用量を投与しても特に問題となる作用は見られなかった。

ここまで研究が進捗すると次はヒト探索的臨床研究を目指して、1 または複数の $[^{18}\text{F}]$ 標識体の倫理委員会等（東北大学では薬剤委員会、臨床研究委員会、利益相反委員会、倫理委員会）へ申請する資料の準備に入るのが次なる段階と思われるが、東北大学の研究用 PET センターの予算の逼迫および東日本大震災により同センターがかなりの被害を受けたことにより、同 PET センターを利用しての倫理委員会用申請資料（例えば被ばく量測定等）作成が不可能となるとともに、ヒト探索的臨床研究の期間内の実施もあきらめざるを得なかった。現時点（平成 23 年 6 月末）では東北大学の研究用 PET センターの再開は平成 23 年度末頃との見

通しであることから、 $[^{18}\text{F}]\text{Cpd.E}$ の探索的臨床研究は海外または国内の共同研究先での実施を考えている。

E. 結論

$[^{18}\text{F}]\text{Cpd.E}$ 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。東北大学の研究用 PET センターの予算の逼迫および東日本大震災によって同センターが被災したことから、本研究期間内の探索的臨床研究は実施することができなかった。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, Mulligan RS, Connor A, McLean CA, Cao D, Rigopoulos A, O'Keefe G, Gong S, Adlard PA, Barnham KJ, Rowe CC, Masters CL, Kudo Y, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL. $[^{18}\text{F}]\text{-THK523}$, a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain* 2011; 134: 1089-1100.
2. Okamura N, Mori M, Furumoto S, Yoshikawa T, Harada R, Ito S, Fujikawa Y, Arai H, Yanai K, Kudo Y. In vivo detection of amyloid plaques in the mouse brain using the near-infrared fluorescence probe THK-265. *J Alzheimers Dis.* 2011; 23: 37-48.
3. Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Arai H, Kudo Y, Yanai K. Noninvasive detection of misfolded proteins in the brain using $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ PET. *Early detection and rehabilitation technologies for dementia: Neuroscience and biomedical application*, edited by Jinglong Wu, Hershey, IGI Global, p.212-219, 2011
4. Tashiro M, Okamura N, Watanuki S, Furumoto S, Furukawa K, Funaki Y, Iwata R, Kudo Y, Arai H, Watabe H, Yanai K. Quantitative analysis of amyloid β deposition in patients with Alzheimer's disease using positron emission tomography. *Early detection and rehabilitation technologies for dementia: Neuroscience and biomedical application*, edited by Jinglong Wu, Hershey, IGI Global, p.220-230, 2011

5. Zhang D, Tashiro M, Shibuya K, Okamura N, Funaki Y, Yoshikawa T, Kato M, Yanai K. Next-day residual sedative effect after nighttime administration of an over-the-counter antihistamine sleep aid, diphenhydramine, measured by positron emission tomography. *J Clin Psychopharmacol.* 2010; 30: 694-701.
 6. Xu A, Sakurai E, Kuramasu A, Zhang J, Li J, Okamura N, Zhang D, Yoshikawa T, Watanabe T, Yanai K. Roles of hypothalamic subgroup histamine and orexin neurons on behavioral responses to sleep deprivation induced by the treadmill method in adolescent rats. *J Pharmacol Sci.* 2010; 114: 444-453.
 7. Okamura N, Yanai K. Florbetapir (¹⁸F), a PET imaging agent that binds to amyloid plaques for detection of Alzheimer's disease. *IDrugs* 2010; 13: 890-899.
 8. Shao H, Okamura N, Sugi K, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Iwata R, Matsuda H, Kudo Y, Arai H, Fukuda H, Yanai K. Voxel-based analysis of amyloid PET probe [¹¹C]BF-227 uptake in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2010; 30: 101-111.
 9. 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, Fukuda H, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Itoyama Y. In vivo visualization of alpha-synuclein deposition by carbon-11-labelled 2-[2-(2-dimethylaminothiazol-5-yl)ethenyl]-6-[2-(fluoro)ethoxy] benzoxazole positron emission tomography in multiple system atrophy. *Brain* 2010; 133: 1772-1778.
 10. 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.* 2010; 257: 721-727.
 11. Arai H, Okamura N, Furukawa K, Kudo Y. Geriatric medicine, Japanese Alzheimer's disease neuroimaging initiative and biomarker development. *Tohoku J Exp Med.*, 2010; 221: 87-95.
 12. 岡村信行, 古本祥三, 谷内一彦, 工藤幸司. 新しいPET製剤の開発. アミロイド・タウイメージングプローブ開発の現状. *インナービジョン* 26(1): 50-53, 2011.
 13. 岡村信行. PET アミロイドイメージングを中心に. *臨床放射線* 55(11): 1419-1426, 2010.
 14. 岡村信行. アミロイドイメージングの基礎. *Cognition and Dementia.* 9(4): 7-12, 2010.
 15. 岡村信行. PiB 以外のアミロイドイメージング. 見て診て学ぶ認知症の画像診断. 改訂第2版. P374-379. 永井書店
 16. 岡村信行. アミロイドイメージング. *Medico* 41(8): 15-18, 2010.
 17. 工藤幸司, 岡村信行, 古本祥三, 古川勝敏, 谷内一彦, 荒井啓行. タウイメージング. *Dementia Japan* 24(2):146-154, 2010.
 18. 岡村信行, 谷内一彦, 古川勝敏, 荒井啓行, 工藤幸司. 脳神経疾患におけるバイオマーカー. *臨床薬理* 41(3): 101-106, 2010.
 19. 岡村信行, 古本祥三, 渋谷勝彦, 原田龍一, 谷内一彦, 工藤幸司. 認知症のアミロイド分子イメージング. *PET Journal.* 10: 28-30, 2010.
 20. 谷内一彦, 田代学, 古本祥三, 吉川雄朗, 岡村信行. ヒスタミン H1 受容体占拠率による脳内移行性評価. 遺伝子医学 MOOK 別冊 創薬技術の革新 マイクロドーズから PET 分子イメージングへの新展開. P147-152. 株式会社メディカルドゥ
 21. 岡村信行. 認知症の分子イメージング. *臨床放射線* 55(4): 487-495, 2010.
 22. 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. *日本薬理学雑誌* 135(1): 3-7, 2010.
2. 学会発表
1. Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Binding and Pharmacokinetic Properties of Novel ¹⁸F-labeled Agents for In Vivo Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease. 2010 International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), July 12, 2010, Honolulu
 2. Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Mulligan R, Furumoto S, Connor AR, Kudo Y, Cao DX, Rigopoulos A, O'Keefe G, Gong S, Adlard PA, Masters CL, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL. Characterisation of [¹⁸F]-THK523, a novel in vivo tau imaging ligand. 2010 International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), July 12, 2010, Honolulu
 3. Waragai M, Okamura N, Furukawa K, Shao H, Tashiro M, Furumoto S, Sugi K, Yanai K, Kudo Y, Arai H. Amyloid PET in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease with [¹¹C]BF-227: comparison to voxel-based morphometric MRI. 2010 International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), July 11, 2010, Honolulu
 4. Shao H, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Waragai M, Arai H, Kudo Y, Yanai K. PET amyloid imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using novel amyloid ligand [¹⁸F]FACT - the hydroxylated BF-227 derivative. 2010 International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD), July 11, 2010, Honolulu
 5. Okamura N, Mori M, Furumoto S, Yanai K,

Kudo Y. Noninvasive detection of amyloid deposits using near-infrared fluorescence probe X50 in mice. 2010 World Molecular Imaging Congress, September 8-11, 2010, Kyoto

6. 岡村信行. タウイメージング用プローブの開発状況. AD 画像診断サブコミッティ 2011年2月5日 東京

7. 岡村信行、古川勝敏、藁谷正明、富田尚希、田代学、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦. 軽度認知障害の進行予後予測のための画像バイオマーカーの比較検討. 第31回日本臨床薬理学会年会 2010年12月1日 京都

8. 古本祥三、岡村信行、石川洋一、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司、M. Fodero-Tavoletti、V. Villemagne フッ素18標識タウ画像化プローブの開発 第50回日本核医学会学術総会 2010年11月11日 大宮

9. Okamura N, Villemagne VL, Pejoska S, Mulligan RS, O'Keefe G, Jones G, Skovronsky D, Rowe CC. Measurement of Vesicular Monoamine Transporter Type 2 Density in Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies with [¹⁸F]AV-133 PET. 第50回日本核医学会学術総会 2010年11月11日 大宮

10. 岡村信行、菊池昭夫、武田篤、古本祥三、田代学、船木善仁、工藤幸司、岩田錬、谷内一彦. αシヌクレイノパチーにおける [¹¹C]BF-227PET 画像所見. 第50回日本核医学会学術総会 2010年11月12日 大宮

11. 岡村信行、古川勝敏、富田尚希、藁谷正明、古本祥三、田代学、岩田錬、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦. ¹⁸F 標識アミロイドイメージング用 PET プローブ FACT の臨床評価. 第29回日本認知症学会学術集会 2010年11月4日 名古屋

12. 岡村信行、古本祥三、邵和、渋谷勝彦、谷内一彦、田代学、古川勝敏、富田尚希、荒井啓行、工藤幸司. アミロイド PET 画像評価への Easy Z-score Imaging System の活用. 第17回東

北脳循環カンファランス 2010年10月23日 仙台

13. 岡村信行. 認知症の分子イメージング. シンポジウム 9. イメージングによる精神・神経疾患研究の新しい展開. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会 2010年9月16日 仙台

14. 岡村信行. 蓄積分子を可視化する分子イメージング. スタディグループ3 次世代の対認知症戦略. 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会合同年会 2010年9月15日 仙台

15. 岡村信行. 蛋白ミスフォールディングの分子イメージング. 第8回脳核医学画像解析研究会 2010年9月4日 東京

16. 岡村信行. アルツハイマー病のアミロイドイメージング. J-CAN 2010年8月28日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし

但し出願あり(次ページ)

○出願番号 特願 2010-243532

○発明の名称 タウイメージングプローブ

○出願日 平成22年10月29日

○出願人 クリノ株式会社/東北大学

○発明者 工藤幸司、岡村信行、古本祥三

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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	出願	特願 2010-243532	タウイメーキングプ ローブ	平成 22 年 10 月 29 日	クリノ 株式会 社/東北 大学	工藤幸司 岡村信行 古本祥三

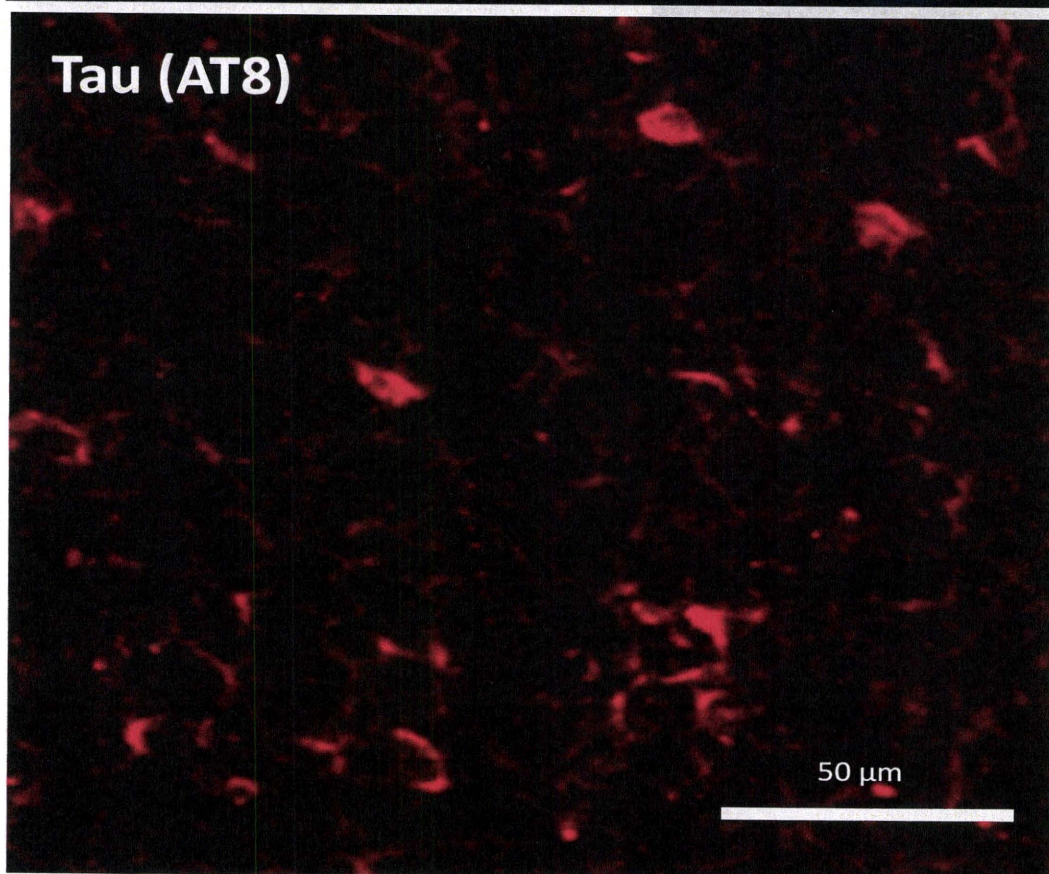
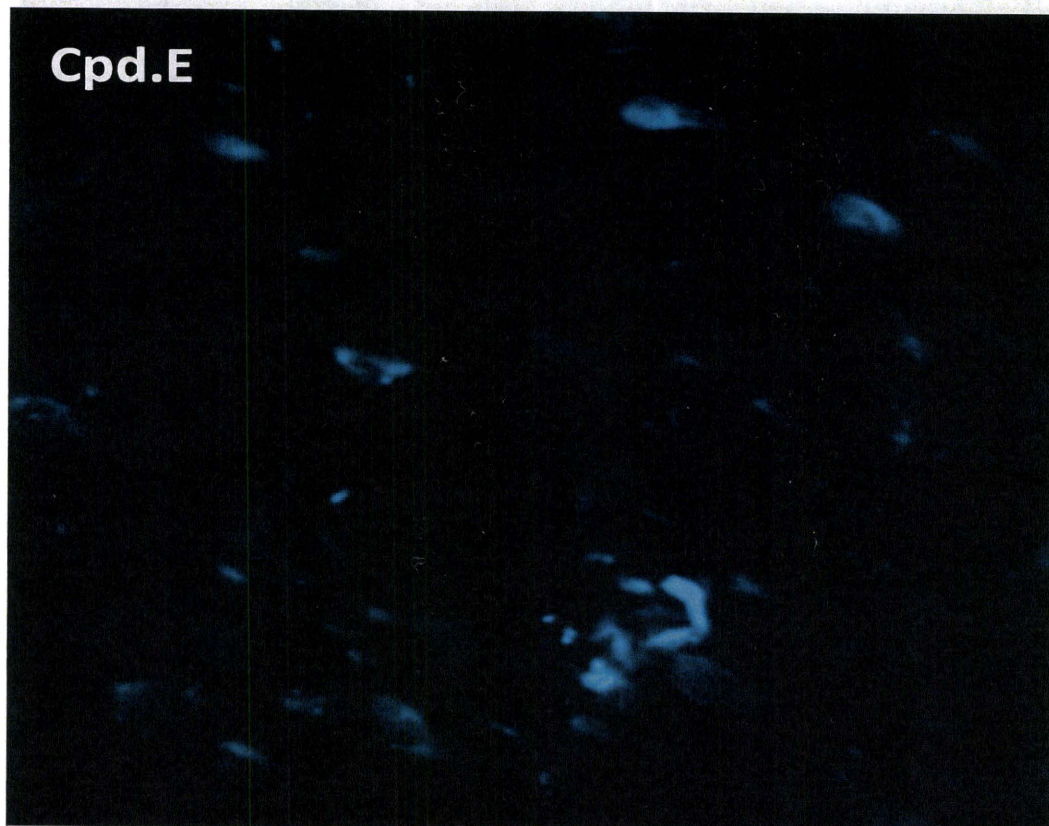


図1 Cpd.Eによるアルツハイマー病脳切片染色像（上段）と同一切片でのタウ免疫染色像（下段）

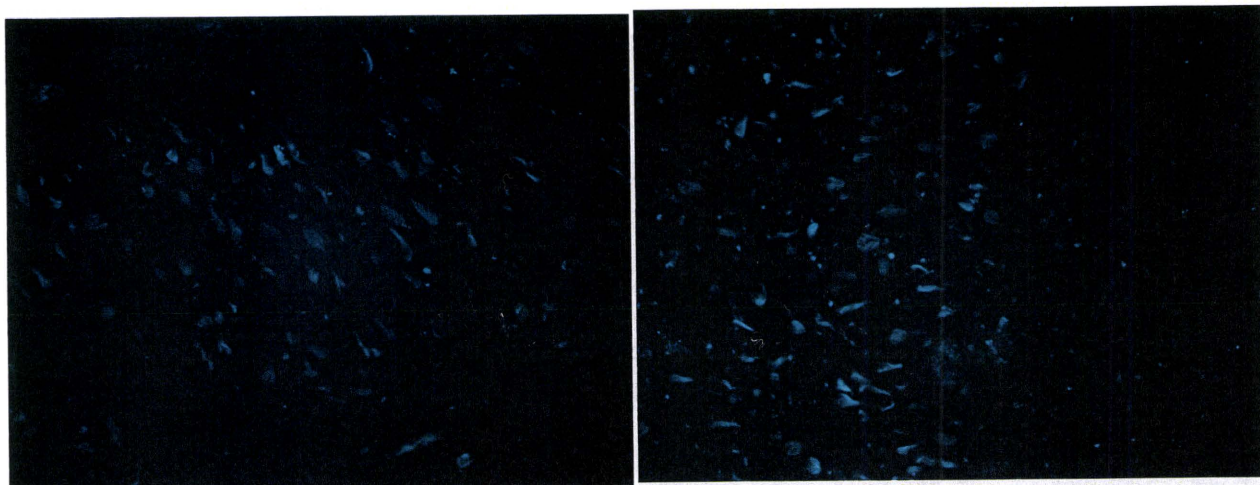


図 2-1. アルツハイマー病脳切片における THK-6236(左)および-6267(右)の染色像

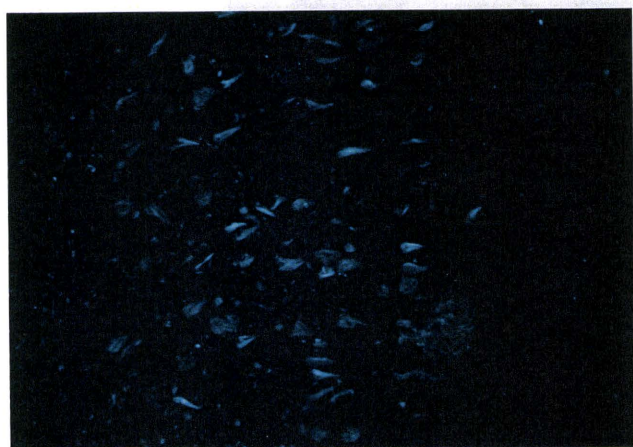


図 2-2. アルツハイマー病脳切片における THK-6264
の染色像

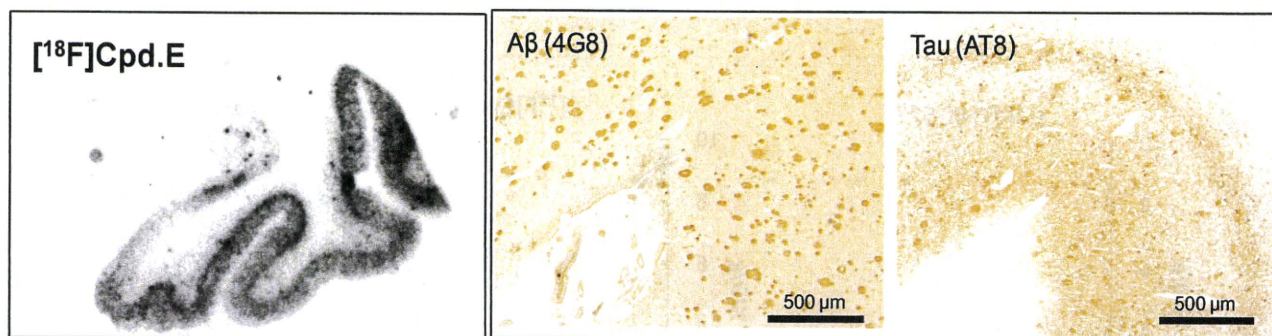


図 3 $[^{18}\text{F}]\text{Cpd.E}$ によるアルツハイマー病患者海馬一側頭葉脳切片のオートラジオグラフィー像 (左、) と隣接切片におけるアミロイド β 蛋白 ($\text{A}\beta$ 、中央)、タウ蛋白免疫染色像 (右)

表 1. 各化合物静脈内投与後の脳における含量
(非標識体-HPLCによる測定)

	脳 %ID/g (mean \pm S.D.)	
	2分後	30分後
Cpd.E	9.60 \pm 1.41	3.15 \pm 0.34
THK-6236	7.36 \pm 0.47	1.39 \pm 0.50
THK-6239	6.03 \pm 0.68	0.52 \pm 0.08
THK-6267	4.40 \pm 0.34	0.56 \pm 0.13

使用動物；雄性マウス、投与ルート；静脈内

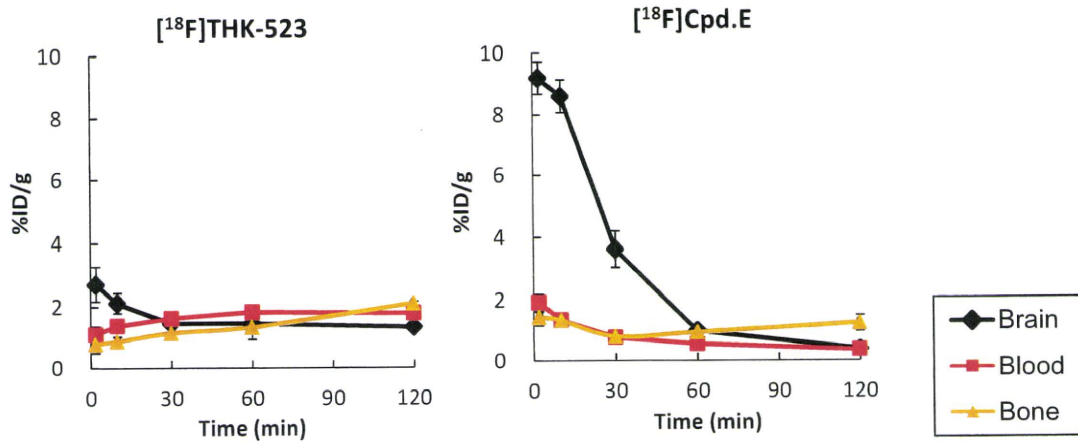


図4 ICR マウスへの^[18F]THK-523、^[18F]Cpd.E 静注後の脳 (Brain)、血液 (Blood)、骨 (Bone) における放射エネルギーの時間変化

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金

(医療機器開発推進事業)

平成 22 年度分担研究報告書

タウ画像化プローブの標識合成と結合試験研究

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

[要旨] アルツハイマー病の進行度を評価する指標として、脳内に異常に蓄積したタウ病変の形成程度がある。本研究では、その非侵襲的評価手段となる PET タウイメージング技術で使用されるフッ素 18 標識プローブについてその標識合成法と結合性について検討した。その結果、当該化合物は従来の化合物と比べて収率良く合成でき、十分実用性を備えていることが確認された。また、結合試験により、タウ特異的結合性が示され、タウ画像化プローブとして十分利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)の神経病理学的特徴である老人斑と神経原線維変化は、AD の確定診断を行う際の必須の病理所見である。通常、死後の剖検によって採取された病変の検査によって評価される。AD の早期診断や治療の観点からは、できるだけ早期にその病理学的所見の有無を判断できることが望ましいが、生前にそのような病理学検査を実施することは難しい。そこで、老人斑や神経原線維変化を画像バイオマーカーとして非侵襲的に評価するための技術開発が望まれている。このような背景から、老

人斑の場合は、その主要構成成分のアミロイド β 凝集体に結合するポジロン標識化合物の開発が進み、現在、全世界的に治験が進められている。一方、神経原線維変化については、その構成タンパク質であるタウ凝集体に対する結合性プローブの開発研究が前臨床レベルで進められている。本研究においても、タウ凝集体に結合する PET 用のフッ素 18 標識プローブの開発を独自に推進してきた。本年度は、タウ画像化プローブ候補の ^{18}F Cpd-E 標識合成法および結合特性について検討した。

B. 研究方法

[¹⁸F]Cpd-E の標識合成

サイクロトロン HM12(住友重機械工業)で加速した 12 MeV の陽子ビームを同位体純度 98% 以上の [¹⁸O]H₂O に照射して ¹⁸F⁻ を製造した。続いてその溶液を陰イオン交換樹脂 (AG1-X8) に通して ¹⁸F⁻ を樹脂上に捕捉し、33 mM K₂CO₃ 溶液で溶出させた。この ¹⁸F⁻ 含有 K₂CO₃ 水溶液 200 μL を褐色バイアルにとり、Kryptofix222 (16 mg)、アセトニトリル (2.3 mL) を加えてオイルバス (110°C) で加熱しながら He ガスを吹き付け、水を共沸させながらアセトニトリルを完全に除去した。さらにアセトニトリル (1.5 mL) を加え同様に加熱条件下でアセトニトリルを除去する操作を 2 回繰り返して、バイアル内を無水の状態にした。そこに、標識前駆体を溶解した溶液 (0.70 mL) を加え、オイルバス (110°C) で加熱攪拌した。その後、脱保護反応処理を行い、蒸留水 (7.0 mL) で反応溶液を希釈して Sep-Pak tC18 カートリッジ (Waters) にロードし、蒸留水でカートリッジを洗浄後、粗生成物をエタノールで溶出した。もっとも放射能の高いエタノール画分を蒸留水で希釈して逆相分取高速液体クロマトグラフィーによって目的生成物を分離し、^{[¹⁸F]Cpd-E} の放射性ピークを分取した。分取サンプルについては、分析 HPLC にて放射化学的純度の分析を行ったこの合成法に従って合成した ^{[¹⁸F]Cpd-E} について、適宜溶媒、濃度を調製して結合試験で使用した。

AD 脳組織粗抽出液の調製

AD 脳組織から灰白質を取り出し、髄膜、血管を取り除いたものを 1g 準備し、1.5mL の 0.75M NaCl/RAB バッファー (0.5mM PMSF、1μg/mL N-tosyllysine chloromethyl ketone、

1μg/mL N-tosyl-L-phenylalanylchloromethyl ketone、1μg/mL pepstatin A + 1μg/mL leupeptin、1μg/mL soybean trypsin inhibitor、を加え、ホモジネートを行った。続いて 4°C で 20 分間インキュベートを行った後、11,000g、4°C 下で 20 分遠心した。ペレットを回収し、上清は 100,000 g、4°C 下で 60 分遠心機にかけた。そのペレットと先のペレットを合わせて PHF 希釈バッファー (1 : 10 w/v) 10 mL (10 mM Tris, 10% sucrose, 0.85 M HCl, 1 mM EGTA (pH 7.4)) で希釈した。15,000 g、4°C で 20 分遠心し、上清を回収した。ペレットを同様に再処理し、上清を回収して、結合試験に使用した。抽出したサンプルについては、ELISA によってリン酸化タウおよびアミロイドの濃度を測定した。

結合試験

cold 標品を DMSO に溶解させ、希釈系列を作製し、それぞれ PBS で 100 倍に希釈した。各濃度の 50 μL を plastic 96 well plate に分注して PBS を 60 μL ずつ well に分注した。そこに ^{[¹⁸F]Cpd-E} 溶液 (20 μCi/mL) を 50 μL ずつ加え、さらによく攪拌した Tau 粗抽出液を well に 40 μL ずつ加え、ゆっくり振とうさせながら 30 分間インキュベートした。その後、グラスフィルターにサンプルを移して溶液を吸引除去し、50 % EtOH 水溶液 200 μL で 3 回吸引洗浄を行った。フィルターを移し、放射能をガンマカウンターで測定した。コントロールとして、Tau 粗抽出液の代わりに PBS を加えた plate も用意し、他の条件を同様に測定を行った。比較として、人工ペプチドアミロイドベータ 42 (A_{β42}) の凝集体を作製し、同様の方法で結合試験を実施した。