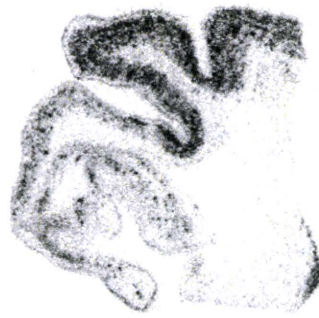


**AD**  
blocking (-)



**Control**  
blocking (-)



**AD**  
blocking (+)



**Control**  
blocking (+)



図8  $[^{18}\text{F}]\text{Cpd.E}$  を用いたアルツハイマー病患者 (AD ; 左)、健常コントロール (Control ; 右) の海馬脳切片のオートラジオグラフィー画像 (上段) と非標識体 ( $25\ \mu\text{M}$ ) 付加によるブロッキング像 (下段)

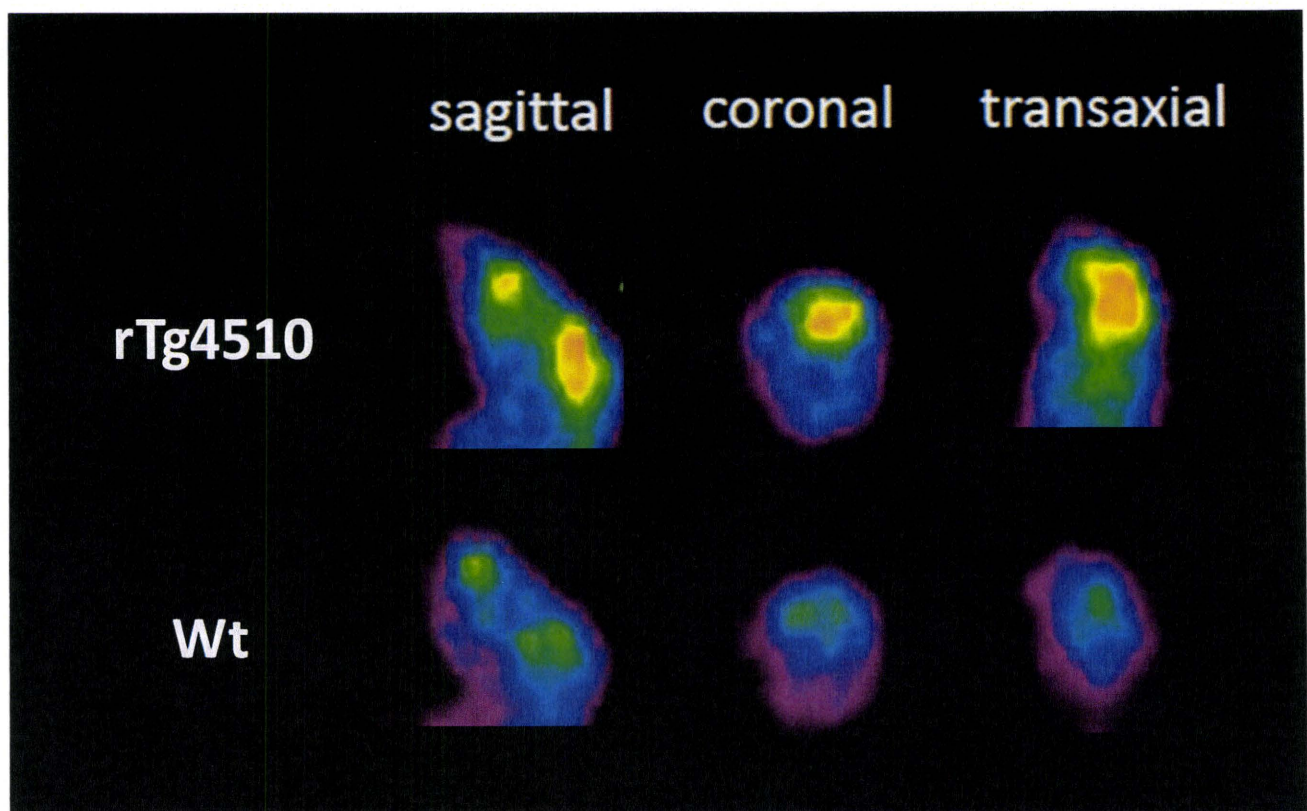


図 11. タウトランスジェニックマウス (rTg4510)、野生型マウス (Wt) の $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$  投与 30 分後の PET 画像

$[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$ は より選択的にTgマウスの脳に集積した。

資 料

# 厚生労働科学研究費補助金

## (医療機器開発推進事業)

### 平成 20-22 年度分担研究報告書

## タウ画像化プローブの標識合成と評価

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

#### [研究要旨]

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するフッ素 18 標識プローブについてその標識合成法と生物学的有用性について検討した。まず、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 TX-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。TX-1017 は投与 2 分後で最も高い脳内移行性を示した。TX-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。続いて、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。さらに、 $[^{18}\text{F}]\text{Cpd-E}$  の標識合成法とタウに対する結合試験を行った。その結果、THK-5X3X 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

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。

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。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。

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キノリン誘導体化合物[<sup>11</sup>C]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標識合成と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 TX-1017、-1043、-1049、-1062、-2352、-5X3X、-6162、-6182、Cpd-E である。

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。

TX-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 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 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 ①アセトニトリル 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 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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 TX-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 TX-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上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。

TX-1043 についても TX-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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (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。

TX-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 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 6.5) / アセトニトリル = 600 : 400 を、HPLC のカラムには L-column ODS 5  $\mu$ m 4.6 $\times$ 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。

TX-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、0.2mL 当り約 20-50  $\mu$  Ci 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  $\gamma$  カウンター (アロカ、AccuFLEX $\gamma$ 7000) で測定し、投与放射エネルギーに対する各組織重量当りの放射エネルギーの割合 (%ID/g) を算出し、放射能集積率の指標とした。

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  $^{\circ}$ C、10,000 g で 5 分間遠心し、上澄みを血漿として -80  $^{\circ}$ C で保存した。脳 (小脳を含む) は採材後 -80  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ 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 N ANOSPACE 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 $^{\circ}$ 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、20 mM 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 20 mM 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  $\mu$ m 4.6 $\times$ 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  $\mu$ l MeOH 溶液、50 pmol/10  $\mu$ l MeOH 溶液、500 pmol/10  $\mu$ l MeOH 溶液、5 nmol/10  $\mu$ l MeOH 溶液をそれぞれ 10  $\mu$ l 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  $\mu$ l MeOH 溶液、50 pmol/10  $\mu$ l MeOH 溶液、500 pmol/10  $\mu$ l MeOH 溶液、5 nmol/10  $\mu$ l MeOH 溶液をそれぞれ 10  $\mu$ l 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。

[<sup>18</sup>F]Cpd-E の標識合成では、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 [<sup>18</sup>O]H<sub>2</sub>O に照射して <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 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 <sup>18</sup>F<sup>-</sup> を樹脂上に捕捉し、33 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液で溶出させた。この <sup>18</sup>F<sup>-</sup> 含有 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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、[<sup>18</sup>F]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 [<sup>18</sup>F]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は、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。



結合試験では、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  $\mu$ L を plastic 96 well plate に分注して PBS を 60  $\mu$ L ずつ well に分注した。そこに [ $^{18}$ F]Cpd-E 溶液(20  $\mu$ Ci/mL)を 50  $\mu$ L ずつ加え、さらによく攪拌した Tau 粗抽出液を well に 40  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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、他の条件を同様にして測定を行った。比較として、人工ペプチドアミロイドベータ 42(A $\beta$ <sub>42</sub>) の凝集体を作製し、同様の方法で結合試験を実施した。

### C. 研究結果

TX-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  $\pm$  0.48 %ID/g を示し、30 分後には 0.35  $\pm$  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  $\pm$  0.10 %ID/g、30 分後では、0.07  $\pm$  0.01 %ID/g と減少した。

TX-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  $\pm$  0.36 %ID/g を示し、30 分後には 0.15  $\pm$  0.07 %ID/g と減少した。一方、血漿における含量は、血漿成分由来ピークと TX-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。

TX-1049 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 2.04  $\pm$  0.58 %ID/g を示し、30 分後には 0.005  $\pm$

0.001 %ID/g と減少した。一方、血漿における含量は、2 分後では、0.70  $\pm$  0.15 %ID/g を示し、30 分後では 0.001  $\pm$  0.0004 と減少した。

TX-1062 に関しては、静脈内投与から 2 分後の脳内集積率は 3.23  $\pm$  0.27 %ID/g を示し、30 分後には 0.15  $\pm$  0.05 %ID/g と減少した。一方、血液は 2 分後では 2.65  $\pm$  0.46 %ID/g、30 分後では、0.20  $\pm$  0.04 %ID/g と減少した。

TX-2352 に関しては、静脈内投与から 2 分後の脳内集積率は 2.72  $\pm$  0.31%ID/g を示し、30 分後には 1.47  $\pm$  0.07 %ID/g と減少した。一方、血液は 2 分後では 1.11  $\pm$  0.25 %ID/g、30 分後では、1.63  $\pm$  0.04 %ID/g と微増した。

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。

3.5 GBq のフッ素 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/ $\mu$ mol (分析時)であった。

結合試験で使用する AD 脳病理組織からの粗抽出液については、リン酸化タウ蛋白質 (pTau) およびアミロイド  $\beta$  タンパク質について ELISA 法で濃度を測定したところ、pTau は 29700 pg/mL、アミロイド  $\beta$  タンパク質は 25 pmol/L 以下であった。結合試験では、pTau の最終濃度は 500 pg/mL となるように調製して使用した。すると、粗抽出液を使用した場合、被験化合物の結合割合は濃度の上昇とともに飽和性が観察され、その飽和曲線から算出された解離定数  $K_d$  は 85nM となった。一方、 $A_{\beta 42}$  の場合も同様に結合飽和性が確認され、それから求めた  $K_d$  は 290nM となった。

#### D. 考察

脳画像化プローブに必要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(2~3%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、TX-1017 に関しては、投与 2 分後に十分高い脳内への移行性(10%ID/g)を示し、30 分後には約 28 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。ただし、投与直後の集積率が高すぎる場合、その後の脳外への排泄が速やかであっても、バックグラウンド放射能の高い画像が得られることになるため、最適化合物を選出する際にはこの点を考慮に入れる必要がある。

TX-1043 に関しては、投与 2 分後で適度な脳内取り込み (2.3%ID/g) が見られ、その後 30 分で約 26 分の 1 にまで取り込み率が低下し、脳病変画像化プローブとして非常に優れた性能を示した。本化合物はフッ素原子をその構造に有しているため、ポジトロン標識化合物として利用可能である。今後、実際にフッ素 18 標識体の合成を行い、それをを用いた脳移行性評価の検討を進める。

TX-1049 も同様に投与 2 分後で適度な脳内への移行性 (2.0%ID/g) が見られ、その後 30 分で約 400 分の 1 にまで取り込み率が低下し、脳病変画像化プローブとして非常に優れた性能を示した。本化合物もフッ素原子をその構造に有しているため、フッ素 18 標識体の合成を行い、それをを用いた脳移行性評価の検討を進める。

TX-1062 に関しては、実際に炭素 11 で標識した PET プローブのかたちで脳移行性評価を行ったところ、投与 2 分後で適度な脳内への移行性 (3.2%ID/g) が見られ、その後 30 分で約 21 分の 1 にまで取り込み率が低下し、非常に優れた脳内動態特性を示した。タウ病変に対する結合性も確認されていることから臨床応用の第一

候補化合物になる可能性を秘めている。

TX-2352 に関しては、投与後 2 分で適度の脳内移行性(2.7%ID/g)を示したが、その後の脳外排泄性は悪く、30 分後で 2 分後の 2 分の 1 以下に達しなかった。この場合、血中放射能が投与 2 分後よりも 30 分後の方が高くなっていることから、血液中からの消失速度が非常に遅いため脳内からの排泄も遅くなったと考えられる。また、血液中に代謝物が滞留する性質もあると考えられ、PET 用画像化プローブとしてふさわしくないことが確認された。

脳画像化プローブに必要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(2~3%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 分後に十分な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。

Cpd-E の標識合成に関しては、THK-5X3X と比べて良好な収率で目的とする標識体を合成することができ、実用性の観点からは大変好ましいと考えられる。放射化学的純度もイメージングプローブとして十分に使用できる値となった。

タウ画像化プローブとしての実用性の観点からは、病理組織中のタウに対する結合親和性の評価が重要となる。本研究では、AD 患者脳について神経原線維変化の好発部位からリン酸化タウの粗抽出液を調製し、結合試験を実施した。結果として得られた解離定数  $K_d$  の値は 85nM となり、通常アミロイド画像化プローブなどで議論されている最低限必要とされる最大  $K_d$  値 20nM よりも大きい値となった。別に実施したオートラジオグラフィーの結果からは、この被験化合物はタウ病変に対して十分な結合親和性を有していることが強く示唆されている。従ってこの結合試験の結果は、今回使用したサンプルが粗抽出液であり、病理学的に重要なリン酸化タウ以外の夾雑物も多く含まれていたために、それらに対して弱い結合性を示し、見かけ上大きな  $K_d$  を示した可能性がある。従って、この  $K_d$  の絶対値からは有用性の有無を正確に

議論することはできないが、Ab42 の Kd との相対的な比較でみると、3 倍以上に強い結合性を有していると推察され、オートラジオグラフィで観察されたタウに対する選択的結合を支持する結果と考えられる。これらの結果から、Cpd-E はタウ特異的結合を有していることが示唆され、画像化プローブとしての有用性があると考えられる。結合性の正確な評価を実施するためには、今後は、より純度を高めた病理リン酸化タウ試料を使用した結合試験を実施する必要があるであろう。

## 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 5 つについて脳移行性評価を行った。そのうち炭素 11 標識体の TX-1062 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。また、THK-6162 も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。さらに新規候補 Cpd-E も十分実用的な収率、純度で目的標識体を得ることができ、結合試験においても被験化合物はタウ特異的結合性を示し、タウ画像化プローブとしての有用性が示唆された。

## 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) 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。
- 3) 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.

- 4) 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.
- 5) 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 年。
- 6) 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)
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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 Nuc Med.*37.934-941.2010
- 12) 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* 133:1772-1778. 2010.
- 13) Shao H, Okamura N, Sugi K, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Iwata R, Matusda H, Kudo Y, Arai H, Fukuda H, Yanai K : Voxel-based analysis of amyloid positron emission tomography probe [<sup>11</sup>C]BF-227 uptake in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease . *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 30:101-111. 2010.
- 14) 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 [<sup>11</sup>C]-BF-227 PET in multiple system atrophy. *Brain* 133:1772-1778. 2010.
- 15) 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* 257:721-727. 2010.
- 16) 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.* 23:37-48. 2011.
- 17) Fodero-Tavoletti MT, Okamura N, Furumoto S, Mulligan RS, Connor AR, McLean CA, Cao D, Rigopoulos A, Cartwright GA, O'Keefe G, Gong S, Adlard PA, Barnham KJ, Rowe CC, Masters CL, Kudo Y, Cappai R, Yanai K, Villemagne VL.: 18F-THK523: a novel in vivo tau imaging ligand for Alzheimer's disease. *Brain.* 134:1089-1100.

- 2011.
- 18) Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Arai H, Kudo Y, Yanai K. Noninvasive detection of misfolded proteins in the brain using [11C]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.
  - 19) 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  $\beta$  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.
  - 20) 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* 24:146-154.2010.
  - 21) 岡村信行, 古本祥三, 杉健太郎, 邵和, 谷内一彦, 田代学, 岩田錬, 荒井啓行, 古川勝敏, 工藤幸司. アミロイドイメージングプローブ[18F]FACT のアルツハイマー病早期診断における有用性の検討. 東北脳循環カンファレンス 16:13-15.2010.
  - 22) 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.
  - 23) 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.
  - 24) 古本祥三, 田代学, 谷内一彦. 脳神経受容体イメージングの臨床応用とこれからの課題. *BIO Clinica* 25 (9), 45-50, 2010.
  - 25) 谷内一彦, 吉川雄朗, 古本祥三. 分子イメージングによる受容体占拠率の解析. 遺伝子医学 MOOK18 創薬研究への分子イメージングの応用(佐治英郎編), 133-138, 2010.
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, 岩田錬, 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, 岩田錬, 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) 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
- 5) 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
- 6) 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班の検出. 第27回日本認知症学会学術集会. 前橋. 2008年10月10日～12日
- 7) 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.
- 8) 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：軽度認知障害によるBF227-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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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レンス  
2010 年 10 月 23 日 仙台

18) 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 5 日～7 日 名古屋

19) 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  
～13 日 さいたま

20) 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： $\alpha$  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 さ  
いたま

(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- $\beta$  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 :Noninversive 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

7) Sugi.k,Okamura.N,Furumoto.S,Tashiro.M,Furu  
kawa.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
- 8) 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
- 9) Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Arai H, Ynai K, Kudo Y. : Binding and pharmacokinetic properties of novel 18F-labeled agents for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. International Conference on Alzheimer's Disease 2010. 2010年7月10日~15日. ハワイ
- 10) 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. International Conference on Alzheimer's Disease 2010. 2010年7月10日~15日. ハワイ
- 11) 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. International Conference on Alzheimer's Disease 2010. 2010年7月10日~15日. ハワイ
- 12) Shao H, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Waragai M, Arai H, Kudo Y, Ynamai K. PET amyloid Imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using novel amyloid ligand [18F]FACT-the hydroxylated BF-227 derivative. International Conference on Alzheimer's Disease 2010. 2010年7月10日~15日. ハワイ
- 13) 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, 2010年9月8-11日, 京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得  
なし 但し出願あり(次頁参照)
  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

**厚生労働科学研究費補助金  
(医療機器開発推進研究)  
平成 20-22 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 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
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：** [ $^{18}\text{F}$ ]THK-523、[ $^{11}\text{C}$ ]THK-951、[ $^{18}\text{F}$ ]THK-5X3X、[ $^{18}\text{F}$ ]Cpd.E のタウ病変との結合性、マウスにおける静注投与後の体内動態を評価した。アミロイドイメージングプローブである BF-227 と比較して、[ $^{18}\text{F}$ ]THK-523、[ $^{11}\text{C}$ ]THK-951 の老人斑への結合性は低く、一方、神経原線維変化への結合選択性を有していた。[ $^{18}\text{F}$ ]THK-523 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 [ $^{18}\text{F}$ ]THK-523 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。さらに新規プローブである THK-5X3X、Cpd.E 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。[ $^{18}\text{F}$ ]THK-5X3X、[ $^{18}\text{F}$ ]Cpd.E は [ $^{18}\text{F}$ ]THK-523 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おり、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。

**A. 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。

そこで我々は、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 [ $^{18}\text{F}$ ]THK-523、[ $^{11}\text{C}$ ]THK-951、新規プローブである [ $^{18}\text{F}$ ]THK-5X3X、[ $^{18}\text{F}$ ]Cpd.E に関して、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、[ $^{18}\text{F}$ ]THK-523 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 を高めた新規プローブ [ $^{18}\text{F}$ ]THK-5X3X、[ $^{18}\text{F}$ ]Cpd.E 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、[ $^{18}\text{F}$ ]THK-523 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にて評価した。

## B. 研究方法

### 1. THK-523, THK-951 による染色

THK-523 および THK-951 を 50%EtOH に溶解し、100  $\mu$ M の溶液を作成した。これらの溶液をアルツハイマー病海馬脳切片 (6  $\mu$ 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、B-2A フィルターを用いて蛍光顕微鏡 (Nikon, Eclipse 80i) で鏡検した。

### 2. オートラジオグラフィー実験

AD パラフィン包埋脳切片 (前頭葉および海馬) を脱パラフィン後、PBS に 10 分浸した。 $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-951}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{BF-227}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  および  $[^{18}\text{F}]\text{Cpd.E}$  を切片に滴下し、室温で 10 分間反応させた。その後、蒸留水、続いて 50% エタノールで洗浄し、その後再び蒸留水に浸漬した後、パラフィン伸展器にて切片を乾燥させた。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. 線維化タウ蛋白の作成とチオフラビン法による測定

評価化合物の 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 ヘパリン/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。

### 4. 脳血液関門透過性の評価

評価化合物の標識体を 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。

### 5. 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  $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$  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。

## C. 研究結果

### 1. 化合物の AD 脳病変との結合性

まず THK-523, THK-951 の結合性を蛍光顕微鏡下で評価したところ、両化合物は AD 脳切片において神経原線維変化と結合した (図 1)。老人斑との結合像も観察されたが、蛍光強度は相対的に微弱であった。次に前頭葉および海馬の連続切片を用いて、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-951}$  およびアミロイド  $\beta$  蛋白を検出するプローブである  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  を用いて、これらの化合物の老人斑、神経原線維変化との結合性をオートラジオグラフィーにて比較した。図 2 に示すように、前頭葉脳切片では  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  の顕著な集積が観察されたものの、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-951}$  の集積は目立たなかった。一方、海馬脳切片では  $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-951}$  の集積が観察され、 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  とは異なる集積分布を示した (図 2)。海馬における  $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$  の集積の大部分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 3)。海馬脳切片における  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  の集積部位は、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 (図 4)。同部位における  $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-951}$  の集積は  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  に比べて軽微であった。一方、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{THK-951}$  の集積を認めた部位では、タウ免疫染色陽性の神経原線維変化の沈着が確認されたが、同部位の老人斑の沈着は軽微であり、 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  の集積は目立たなかった (図 4)。

次に、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  と  $[^{18}\text{F}]\text{BF-227}$  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ーにて比較した。AD 海馬一側頭葉脳切片における  $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  の集積分布は  $[^{18}\text{F}]\text{BF-227}$  とは異なり、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 5)。 $[^{18}\text{F}]\text{BF-227}$  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、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5X3X}$  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 (図 6)。

さらに我々は、Cpd.E の  $^{18}\text{F}$  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