

るバイオマーカーとして、抗 A β 療法の臨床治験に積極的に導入されている。その一方で、神経原線維変化などのタウ病理像を検出するタウイメージングは、いまだ実用化されていない。老人斑・神経原線維変化の両者を独立して検出することができれば、AD の診断精度が一層向上し、正確な病態把握が可能となる。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もできる。

本年度は、タウ蛋白検出用プローブの最適化化合物である ^{18}F THK-5117 について、トリチウム体である ^3H THK-5117 を用いてタウ蛋白との結合性・選択性ならびにその結合様式について調べた。

B. 研究方法

1. 脳ホモジネートを用いた結合実験

健常人脳、AD 脳を PBS で溶解させ、ホモジネートした。ホモジネート中の不溶性 A β 、タウ蛋白の量を測定するために、超遠心分離後の沈殿物を回収し、70%ギ酸で可溶させ、1 M Tris base で中和した試料を市販の ELISA kit により A β 、タウ蛋白の含有量を定量した。脳ホモジネートと 1 nM の ^3H THK-5117 とを反応させ、化合物の結合量を算出した。 ^3H THK-5117 の結合量とホモジネートに含まれる不溶性の A β とタウ蛋白との相関解析を行った。比較として、 ^3H PiB でも同様に行った。さらに、これらのホモジネートを用いて結合親和性(K_d , B_{\max})を算出した。

2. オートラジオグラフィー実験

^3H THK-5117 を AD, non-AD タウオパチー、 α シヌクレインノパチー、TDP-43 プロテイン

パチー脳切片に滴下し、室温で 30 分間反応させた。その後、PBS, 10%エタノールに 5 分間浸漬し、それを 2 回繰り返す、その後蒸留水に 5 分間浸漬した後、切片を乾燥させた。その後、切片をトリチウム用イメージングプレート(BAS TR-2025)にコンタクトして 2 週間静置し、翌日 FLA-7000 (GE ヘルスケア) にて画像の読み取りを行った。さらに、切片に原子核乳剤(Kodak NTB)を塗布し、冷蔵庫で 2 週間静置し、現像処理を行い、顕微鏡 (Olympus X51) で鏡検した。比較として、 ^3H PiB でも同様に行った。さらに連続切片を抗 A β 抗体 (6F3D)、抗タウ抗体 (AT8)、抗 α シヌクレイン (pSyn#64)、抗 TDP-43 抗体(pS409/410) を用いて免疫染色し、それぞれの病理像の分布を確認した。さらに、タウ特異的染色する嗜銀染色法 Gallyas Braaks 染色を行った。

3. THK-5117 のタウ病変への結合様式の検討

神経原線維変化は β シート化した過剰リン酸化させたタウ蛋白質が主成分である。さらに、AD 脳ではタウ蛋白に存在する微小管結合リピードドメインの数が 3 リピードと 4 リピードのアイソフォームが存在する。THK-5117 の結合がどのような要因に起因しているか、AD 脳切片を用いて検討を行った。AD 脳切片に対して、90%ギ酸処理(β シート破壊)あるいはアルカリフォスファターゼ処理(脱リン酸化)を行い、 ^3H THK-5117 のオートラジオグラフィーを行うことでその影響を検討した。また、タウのリピードを認識する抗体(RD3, RD4)を用いた免疫染色と THK-5117 の蛍光染色とを比較することにより、どのタイプのタウ蛋白に結合してい

るのかを調べた。

(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（S63.3.24）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

THK-5117の $A\beta$ 、タウ蛋白病変との結合性を評価するため、AD患者脳ホモジネートを用いて結合実験を行ったところ、 $[^3H]$ THK-5117の結合量は不溶性タウ蛋白の量と相関し、不溶性 $A\beta$ の量とは相関しなかった。同試料を用いて $[^3H]$ PiBで同様の実験を行ったところ、 $[^3H]$ PiBの結合量は不溶性 $A\beta$ の量と相関し、不溶性タウ蛋白とは相関しなかった（図1）。さらに、これらの脳ホモジネートのうち、 $A\beta$ を含まずタウ蛋白のみを含むホモジネートに対して結合親和性を算出したところ、 K_d 値が4.49 nMと高い親和性を示した。一方、 $A\beta$ を多く含むホモジネートに対する K_d 値は123 nMと比較的低い結合親和性を示した（図2）。

タウ病変に対する高い結合選択性はオートラジオグラフィーによっても証明された。3例の健常人の脳と2例のADの海馬-側頭葉脳切片を用いたオートラジオグラフィーの結果、健常人脳においては、 $[^3H]$ THK-5117の集積はほぼなく、AD脳において高い集積が確認された（図3）。興味深い所見として、健常人の脳でタウの免疫染色陽性でGallyas Braak染色陰性のPretangleと呼ばれるステージのタウ病変には $[^3H]$ THK-5117は結合しなかった。ADの様々な脳の部位を用いたオートラジオグラフィーの結果、その集積パターンは $[^3H]$ PiBのものとは明らかに異なり、タウ蛋白の免疫染色のパター

ンと一致した(図4)。³H]THK-5117のマイクロオートラジオグラフィーを行った標本では、多くの神経原線維変化が観察され、³H]PiBの標本で見られる老人班は観察されなかった。さらに、³H]THK-5117は neuritic plaque の神経突起(dystrophic neurite)の部分に強く集積しており、それはタウの免疫染色と一致していた(図5)。

AD以外のタウオパチー(前頭側頭型認知症(FTD)、進行性核状性麻痺(PSP)、皮質基底核変性症(CBD)などの画像診断への応用の可能性を評価するために、これらの疾患の脳標本に対しても³H]THK-5117の結合性を検討した。その結果、³H]THK-5117はCBDの一部のタウ病変のみに結合し、その他のタウ病変(Pick小体など)には結合しないことがわかった(図6)。さらに、 α シヌクレイノパチーやTDP-43プロテインパチーの病変への結合選択性を検討したところ、THK-5117はレビー小体やTDP-43病変には結合しないことがわかった(図7)。

THK-5117のタウ病変の結合様式をAD脳切片を用いて検討した。³H]THK-5117の結合はギ酸処理した標本では完全に消失していたのに対し、アルカリファスファターゼ処理した標本では処理なしの場合と変わらなかった(図8)。さらに、タウ蛋白のリピードタイプの検討では、THK-5117の染色パターンはRD3、RD4の免疫染色のパターンと一致しており、THK-5117の結合性はタウ蛋白のリピードタイプには依存しないことがわかった(図9)。

D. 考察

本研究の結果から、¹⁸F]THK-5117は高い親和性で選択的にADのタウ病変に結合すること

が明らかになった。興味深いことに、同じタウ蛋白からなる病変でも、CBDの一部の病変を除いてTHK-5117が結合しないことがわかった。したがって、THK-5117はADのタウ病変選択的であると言える。THK-5117の結合様式はタウ病変の β シートコンフォメーションであり、タウ蛋白のリン酸化、微小管結合リピードの数には依存しないことが明らかとなった。本研究により、THK-5117の結合性・結合選択性およびその結合様式が明らかとなり、今後の実用化に期待がかかる。

E. 結論

¹⁸F]THK-5117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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shidahara M, Tashiro M, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Watanuki S, Hiraoka K, Miyake M, Iwata R, Tamura H, Arai H, Kudo Y, Yanai K: Evaluation of the biodistribution and radiation dosimetry of the 18F-labelled amyloid imaging probe [18F]FACT in humans. *EJNMMI Res.* 3:32-41. 2013
- 2) Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Yoshikawa T, Fodero-Tavoletti M, Mulligan R S, Villemagne V L, Akatsu H, Yamamoto T, Arai H, Iwata R, Yanai K., Kudo Y: Novel 18F-labeled arylquinoline derivatives for non-invasive imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *Journal of Nuclear Medicine.* (Accepted) 2013
- 3) Furumoto S, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Ishikawa Y, Sugi K, Tomita N, Waragai M, Harada R, Tago T, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y: A (18)F-Labeled BF-227 Derivative as a Potential Radioligand for Imaging Dense Amyloid Plaques by Positron Emission Tomography. *Mol Imaging Biol.* (Accepted) 2013
- 4) Niu K, Guo H, Guo Y, Ebihara S, Asada M, Ohru T, Furukawa K, Ichinose M, Yanai K, Kudo Y, Arai H, Okazaki T, Nagatomi R.: Royal jelly prevents

the progression of sarcopenia in aged mice in vivo and in vitro. *Journal of Gerontology:Biological Sciences*. (Accepted) 2013

- 5) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Maruyama M, Higuchi M, Yosikawa T, Arai H, Iwata R, Kudo Y, Yanai K: Comparison of the binding characteristics of [(18)F]THK-523 and other amyloid imaging tracers to Alzheimer's disease pathology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 40. 125-132. 2013
 - 6) Tomita N, Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Ue K, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Brain accumulation of amyloid β protein visualized by positron emission tomography and BF-227 in Alzheimer's disease patients with or without diabetes mellitus. *Geriatr Gerontol Int*. 13. 215-221. 2013
 - 7) Villemagne V L, Furumoto S, Fodero-Tavoletti M, Harada R, Mulligan R S, Kudo Y, Masters C L, Yanai K, Rowe C C, Okamura N: The challenges of tau imaging. *Future Neurology*. 7. 409-421. 2012
 - 8) Furukawa K, Ikeda S, Okamura N, Tashiro M, Tomita N, Furumoto S, Iwata R, Yanai K, Kudo Y, Arai H : Cardiac positron-emission tomography images with an amyloid-specific tracer in familial transthyretin-related systemic amyloidosis. *Circulation*. 125. 556-557. 2012
 - 9) 工藤幸司、荒井啓行：脳アミロイドーシス。編集 田村和夫。In”血液症候群（第2版）別冊 日本臨床” 株式会社 日本臨床社。大阪市.pp648-652. 2013
2. 学会発表
海外学会発表
- 1) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Yoshikawa, Arai H, Yanai K, Kudo Y : Binding of the novel pet tracer [18F]THK-5117 reflects the amount of tau in Alzheimer's Disease Brain. The 11th International conference on Alzheimer's & Parkinson's diseases. 2013年3月6日～10日(3月8日ポスターセッション) イタリア (フローレンス)
 - 2) Okamura N, Furumoto S, Harada R, Fodero-Tavoletti M.T, Mulligan R.S, Masters C.L, Yanai K., Kudo Y, Rowe C.C, Villemagne V.L.: In vivo tau imaging in Alzheimer's Disease using [18F]THK-5105. The 11th International conference on Alzheimer's & Parkinson's diseases. 2013年3月6日～10日(3月8日ポスターセッション) イタリア (フローレンス)
 - 3) Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Fodero-Tavoletti M, Villemagne VL, Iwata R, Arai H, Yanai K, Kudo Y: [18F]THK-5105 and [18F]THK-5117 as possible PET probes for in vivo detection of tau pathology in Alzheimer's disease. *Human Amyloid Imaging 2013*. (2013年1月16日～18日) 米国・マイアミ
 - 4) Furumoto S, Kawauchi T, Okamura N, Tago T, Harada R, Zhang MR, Higuchi M, Yanai K, Iwata R, Kudo Y: Novel fluorine-18 labeled benzothiazole derivatives for amyloid imaging by PET. *Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2012* (2012年10月26日～10月31日) MiCo-Milano Congressi (イタリア・ミラノ)
 - 5) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Yoshikawa T, Arai H, Kudo Y, Yanai K: Wavelength-dependent selective detection of tau pathology in Alzheimer's disease using a novel fluorescent probe THK-1188. *Alzheimer's Association International Conference 2012* (2012年7月14日～19日) バンクーバーコンベンションセンター (カナダ)
 - 6) Suzuki M, Tomita N, Okamura N, Furukawa K, Kudo Y, Arai H: The relationships between memory impairment and dense beta-amyloid deposition reflected by BF-227. *Alzheimer's Association International Conference 2012* (2012年7月14日～19日) バンクーバーコンベンションセンター (カナダ)
 - 7) Villemagne V L, Furumoto S, Fodero-Tavoletti M T, Mulligan R S, Hodges J, Piguot O, Pejoska S, Kudo Y, Masters C L, Yanai K, Rowe C C, Okamura N: In vivo tau imaging in Alzheimer's disease and other dementias. *Alzheimer's Association International Conference 2012* (2012年7月14日～19日) バンクーバーコンベンションセンター (カナダ)
 - 8) Okamura N, Furumoto S, Harada R, Fodero-Tavoletti M, Villemagne V, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: Novel 18F-labeled quinoline derivatives for in vivo detection of tau pathology in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Association International Conference 2012* (2012年7月14日～19日) バンクーバーコンベンションセンター (カナダ)
 - 9) Okamura N, Furukawa k, Tashiro M, Furumoto S, Harada R, Arai H, Kudo Y, Yanai K: [11C]BF-227 PET study in patients with dementia with Lewy bodies. 第59回米国核医学会議 SNM 2012 (2012年6月12日) 米国・

マイアミ

国内学会発表

- 1) 原田龍一、岡村信行、古本祥三、多胡哲郎、吉川雄朗、荒井啓行、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司: タウイメージングプローブ候補化合物 18F 標識アリールキノリン誘導体の前臨床評価. 第 86 回 日本薬理学会年会. 2013 年 3 月 21 日～23 日 (3 月 22 日 オーラルセッション) 福岡国際会議場
- 2) 岡村信行、原田龍一、古本祥三、吉川雄朗、工藤幸司、谷内一彦: 生体内のアミロイド線維を非侵略的に検出する近赤外蛍光プローブ X65 の開発. 第 86 回 日本薬理学会年会 2013 年 3 月 21 日～23 日 (3 月 23 日ポスター発表) 福岡国際会議場
- 3) 古本祥三、岡村信行、多胡哲郎、原田龍一、石川洋一、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司: 2-アリールキノリンを母核とするフッ素 18 標識タウ画像化プローブ. 第 52 回日本核医学会学術総会(2012 年 10 月 11 日～13 日) ロイトン札幌・さっぽろ芸術文化の館
- 4) 工藤幸司、丸山将浩: 特異的プローブによるタウ及び A β 蓄積メカニズムの解明. 分子イメージング研究戦略推進プログラム 成果発表シンポジウム 2012 (2012 年 8 月 1 日) 神戸国際会議場メインホール
- 5) 岡村信行、古本祥三、工藤幸司: 特異的プローブによるタウ及び A β 蓄積メカニズムの解明 (タウイメージング). 分子イメージング研究戦略推進プログラム 成果発表シンポジウム 2012 (2012 年 8 月 1 日) 神戸国際会議場メインホール
- 6) 古本祥三、岡村信行、工藤幸司: 特異的プローブによるタウ及び A β 蓄積メカニズムの解明 (アミロイド イメージング) 分子イメージング研究戦略推進プログラム 成果発表シンポジウム 2012 (2012 年 8 月 1 日) 神戸国際会議場メインホール
- 7) 原田龍一、岡村信行、古本祥三、吉川雄朗、工藤幸司、谷内一彦: アルツハイマー病病理像検出のための光イメージング. 分子イメージング研究戦略推進プログラム 成果発表シンポジウム 2012 (2012 年 8 月 1 日) 神戸国際会議場メインホール
- 8) 原田龍一、岡村信行、古本祥三、吉川雄朗、谷内一彦、工藤幸司: アルツハイマー病病理像を生体画像化するための光イメージングプローブの開発. 第 7 回日本分子イメージング学会総会・学術集会.(2012 年 5 月 24-25 日)アクトシティ浜松 (静岡県)
- 9) 岡村信行、古本祥三、原田龍一、多胡哲郎、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司: 新規 18F 標識プローブ THK-5105 によるタウ蛋白の生体イメージング. 第 7 回日本分子イメージング学会総会・学術集会.(2012 年 5 月 24-25 日)アクトシティ浜松 (静岡県)
- 9) 原田龍一、岡村信行、古本祥三、吉川雄朗、谷内一彦、工藤幸司: 波長依存性蛍光プローブによるアミロイド・タウの選択的検出. 第 7 回日本分子イメージング学会総会・学術集会.(2012 年 5 月 24-25 日)アクトシティ浜松 (静岡県)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
次ページの出願が国際公開されました。
(2013 年 4 月以降、次ページ特許を複数の国に各国移行させる予定)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

特許出願状況

以下の出願が国際公開されました。

発明の名称	発明者	出願登録区分	出願番号 (出願日)	出願区分	出願国	登録番号(登録日)	メモ
タウイメーjingプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	出願	PCT/JP2011/074930 (2011年10月28日)	P C T	日本		国際公開番号 W02012/057312 公開日 <u>2012年5月3日</u>

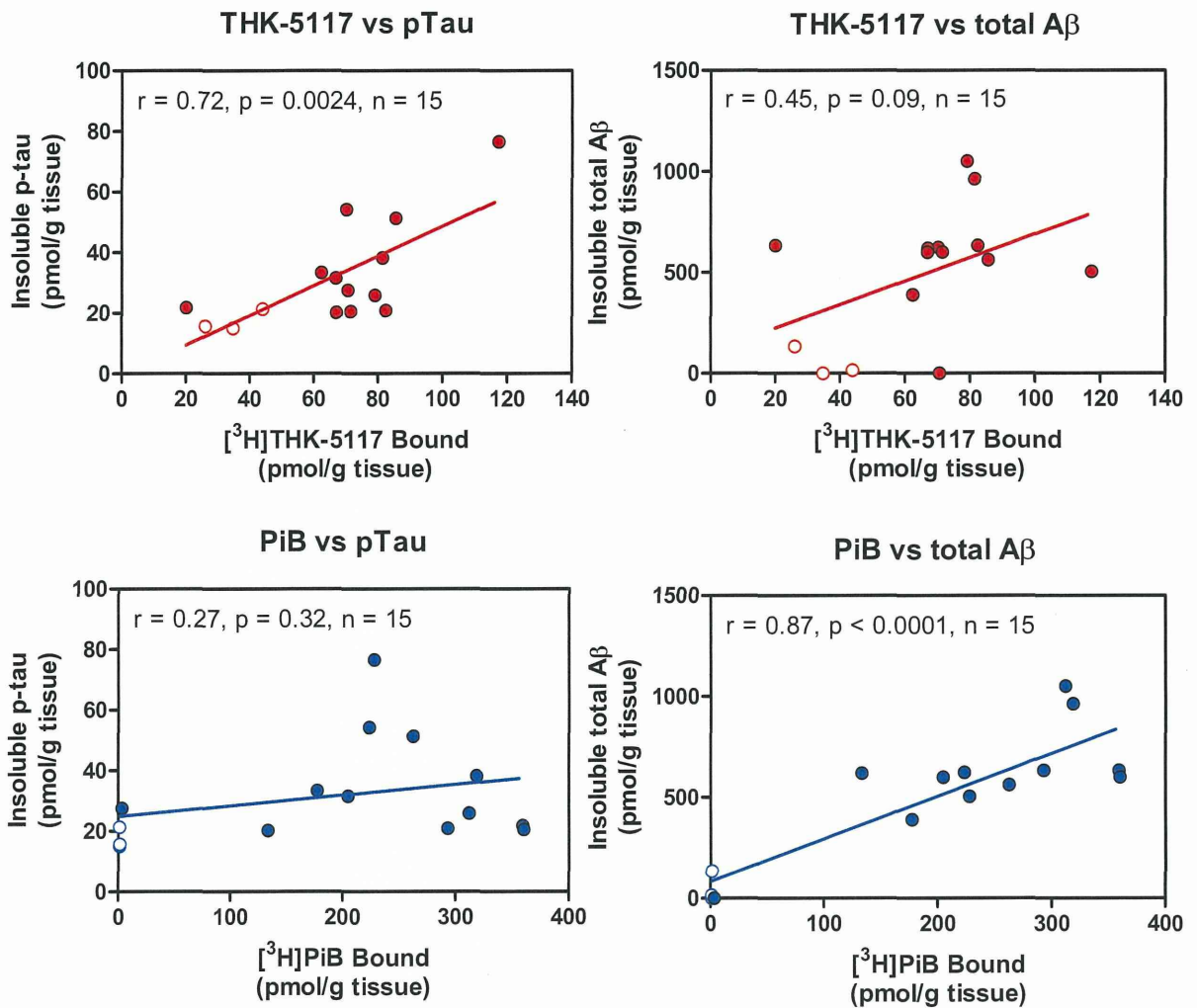


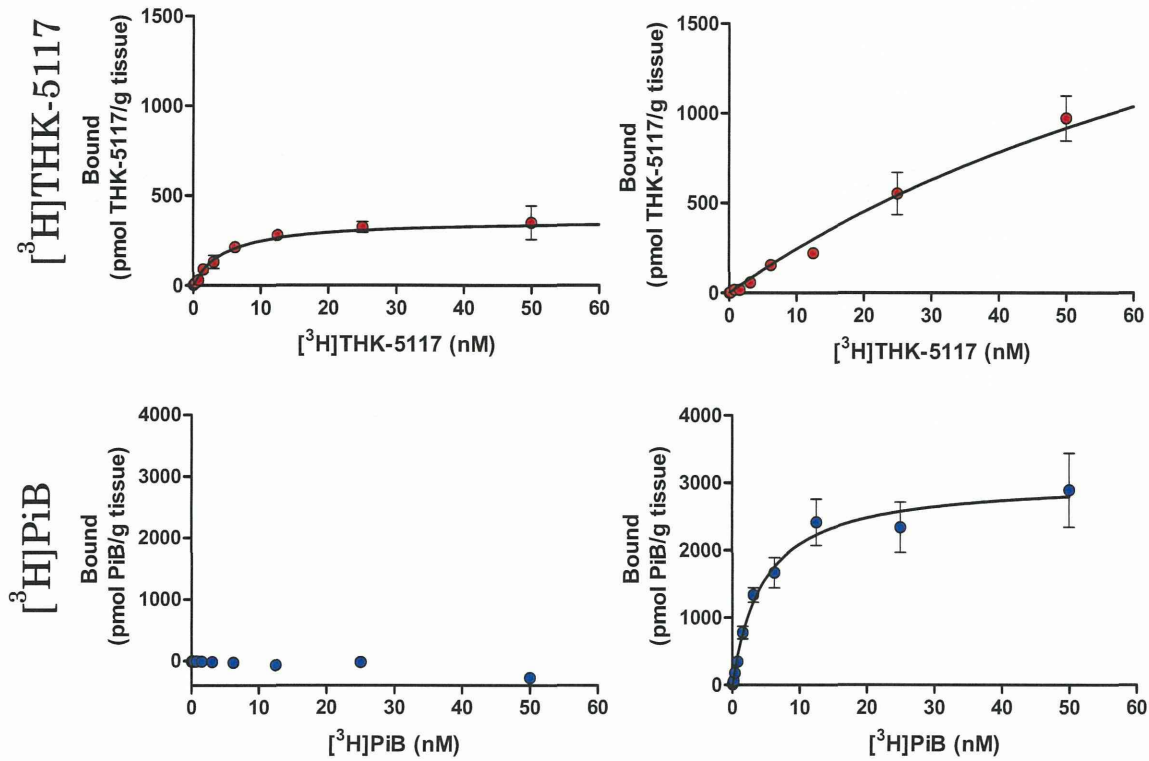
図1 [³H]THK-5117 および [³H]PiB の結合量とホモジネート中における不溶性 Aβ、タウ蛋白の含有量の相関解析。 [³H]THK-5117 の結合量は不溶性タウ蛋白の量と相関する。(○：健常人、●：AD)

**A β -free/tau-rich brain
(NAD2)**

A β : N.D.,
p-tau: 27.5 pmol/g

**A β -rich brain
(AD5)**

A β : 949.4 pmol/g,
p-tau: 21.8 pmol/g



	K_d (nM)		B_{max} (pmol/g tissue)	
	NAD2	AD5	NAD2	AD5
THK-5117	4.49 ± 0.75	123.2 ± 25.2	354.2 ± 16.1	3150 ± 424
PiB	n.d.	4.31 ± 0.46	n.d.	2982 ± 88

図2 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ および $[^3\text{H}]\text{PiB}$ の A β -free/tau-rich (NAD2)、A β -rich(AD5) 脳ホモジネートに対する結合親和性評価。 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ は A β -free/tau-rich な脳である NAD2 に対して、 $K_d = 4.49$ nM と高い結合親和性を示し、その一方で、A β -rich な脳である AD5 に対しては $K_d = 123$ nM と低い結合親和性を示した。比較として行った $[^3\text{H}]\text{PiB}$ は、A β -free/tau-rich な脳である NAD5 には結合性を示さず、A β -rich な脳である AD5 に対しては $K_d = 4.31$ nM と高い結合親和性を示した。

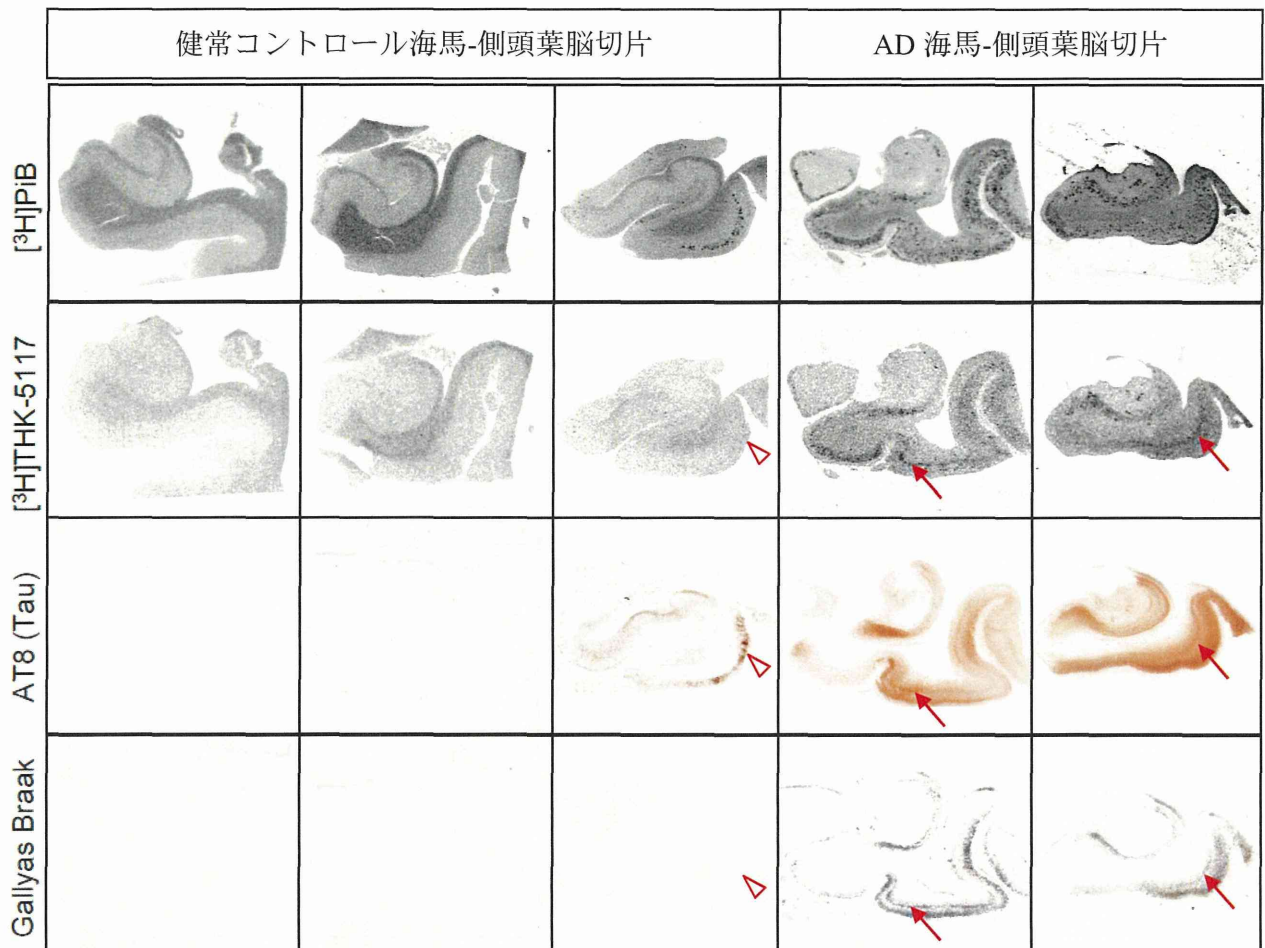


図3 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$, $[^3\text{H}]\text{PiB}$ を用いたアルツハイマー病患者 (AD ; 左二例)、健常コントロール (Control ; 右三列) の海馬脳切片のオートラジオグラフィ画像 (上の一列目(PiB)と二列目(THK-5117))とタウの免疫染色(上から3列目)、タウ特異的染色する嗜銀染色法 Gallyas Braaks 染色 (下段) $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ は健常コントロール脳においては結合を示さず、AD 脳においてタウの免疫染色、Gallyas Braak 染色と一致するライン状の結合分布を示した。興味深いことに、健常人の脳に存在するタウの免疫染色陽性・Gallyas Braak 陰性(中央、矢じり)のいわゆる Pretangle と呼ばれるステージのタウ病変には $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ は結合しない。

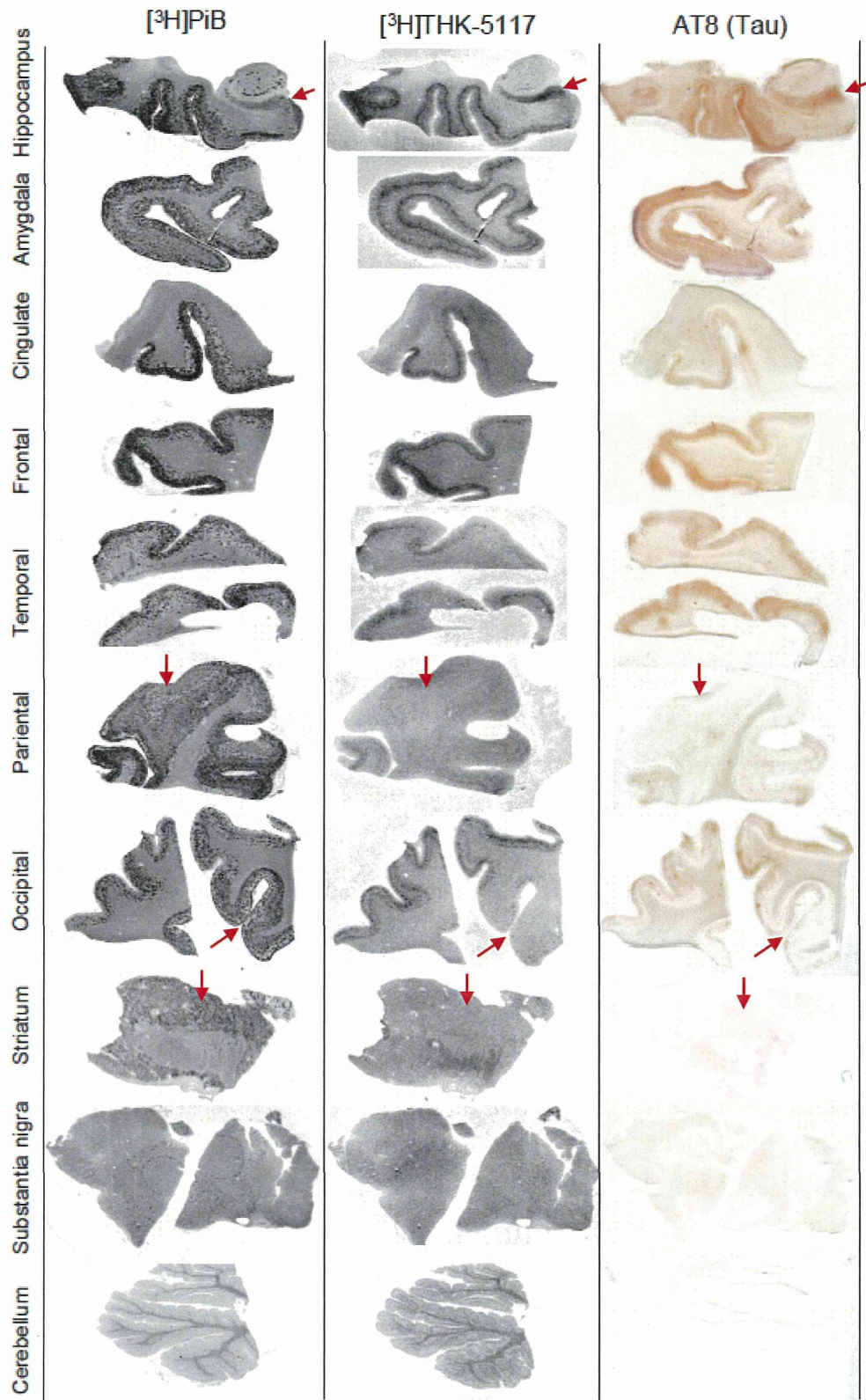


図4 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ (中央), $[^3\text{H}]\text{PiB}$ (右) の様々な脳の一部位(AD)におけるオートラジオグラフィ画像とタウの免疫染色画像 (左)。 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ の集積パターンは $[^3\text{H}]\text{PiB}$ のものとは明らかに異なり、タウ蛋白の免疫染色のパターンと一致した。矢印：THK-5117 と PiB の集積分布の差が顕著な部位。

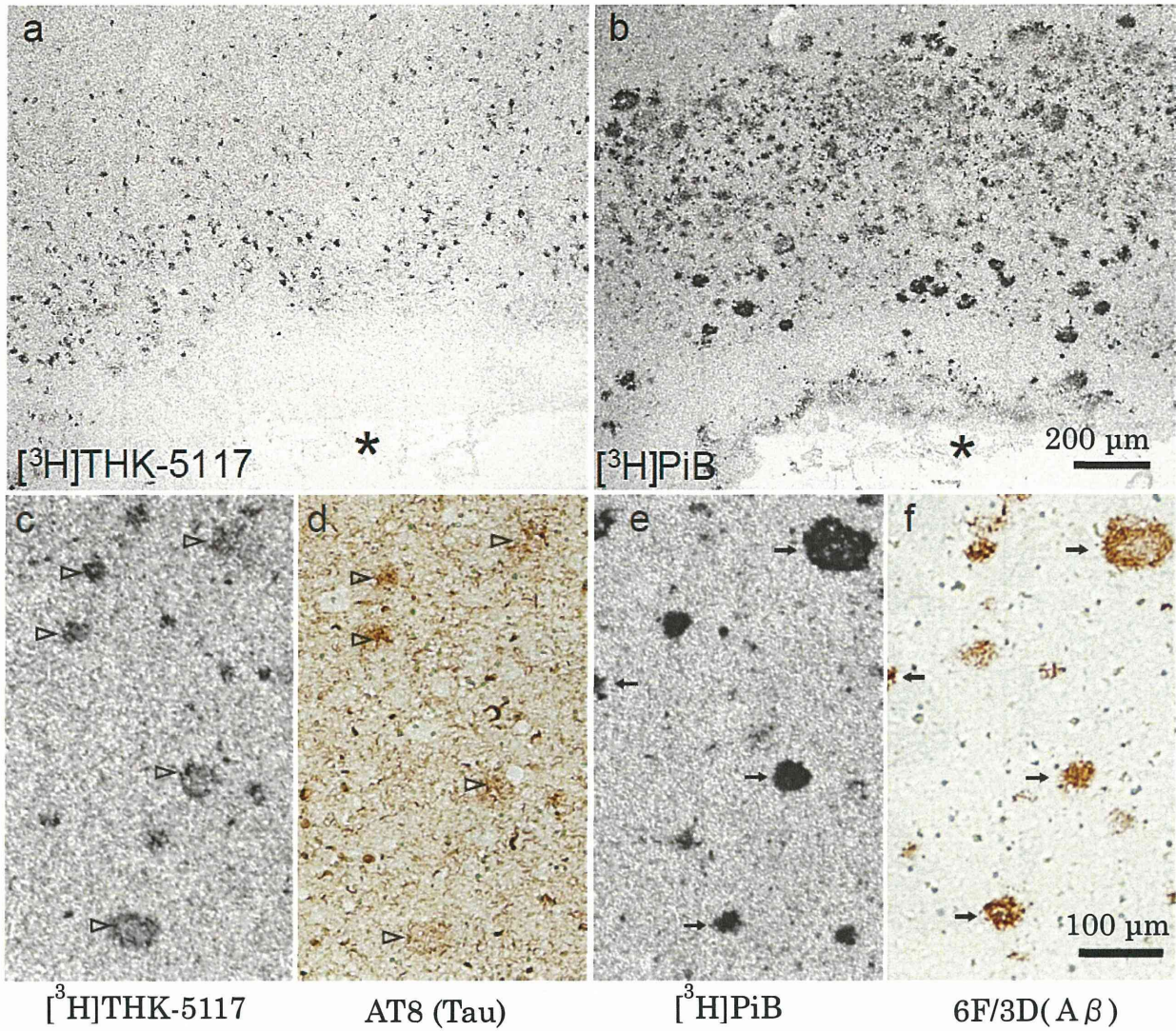


図5 [³H]THK-5117(一番左), [³H]PiB (右から二番目) のAD脳におけるマイクロオートラジオグラフィ画像と隣接切片におけるタウ(左から二番目)とAβ(一番右)の免疫染色画像(左)。
 [³H]THK-5117の標本では、多くの神経原線維変化が観察され、³H]PiBの標本で見られる老人斑は観察されなかった。さらに、³H]THK-5117は neuritic plaque の神経突起の部分(矢じり)に強く集積しており、それはタウの免疫染色と一致していた。矢印:Aβプラーク、*:隣接切片で同じ場所を示す目印

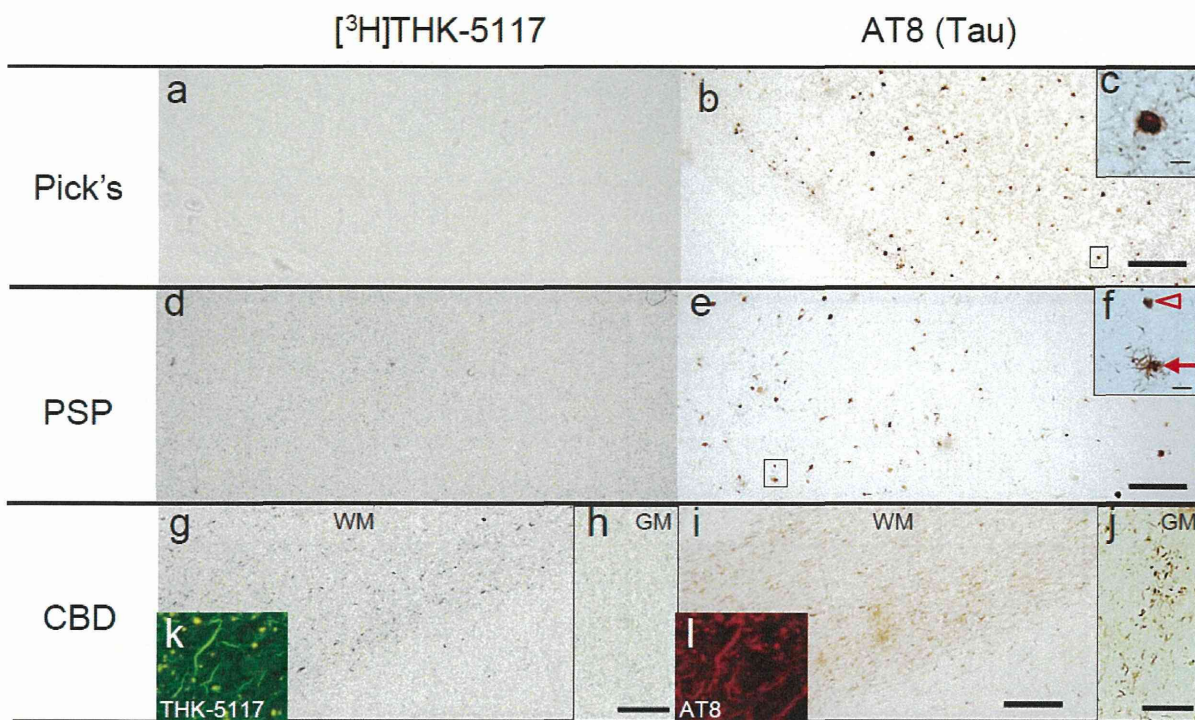


図6 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ の non-AD タウオパチー(Pick's 病、進行性核上性麻痺(PSP)、皮質基底核変性症(CBD)の脳切片におけるマイクロオートラジオグラフィ画像とタウの免疫染色画像。THK-5117 は CBD の argyrophilic thread と coiled body にのみ結合し、その他のタウ病変(Pick 小体など)には結合しない。c: Pick's 病の Pick 小体、e: PSP の tuft-shaped astrocyte(矢印)と globose tangle(矢じり)、j: CBD の astrocytic plaque。THK-5117 の蛍光染色画像(k)において CBD の argyrophilic thread が確認でき、タウの免疫染色画像(l)と一致する。

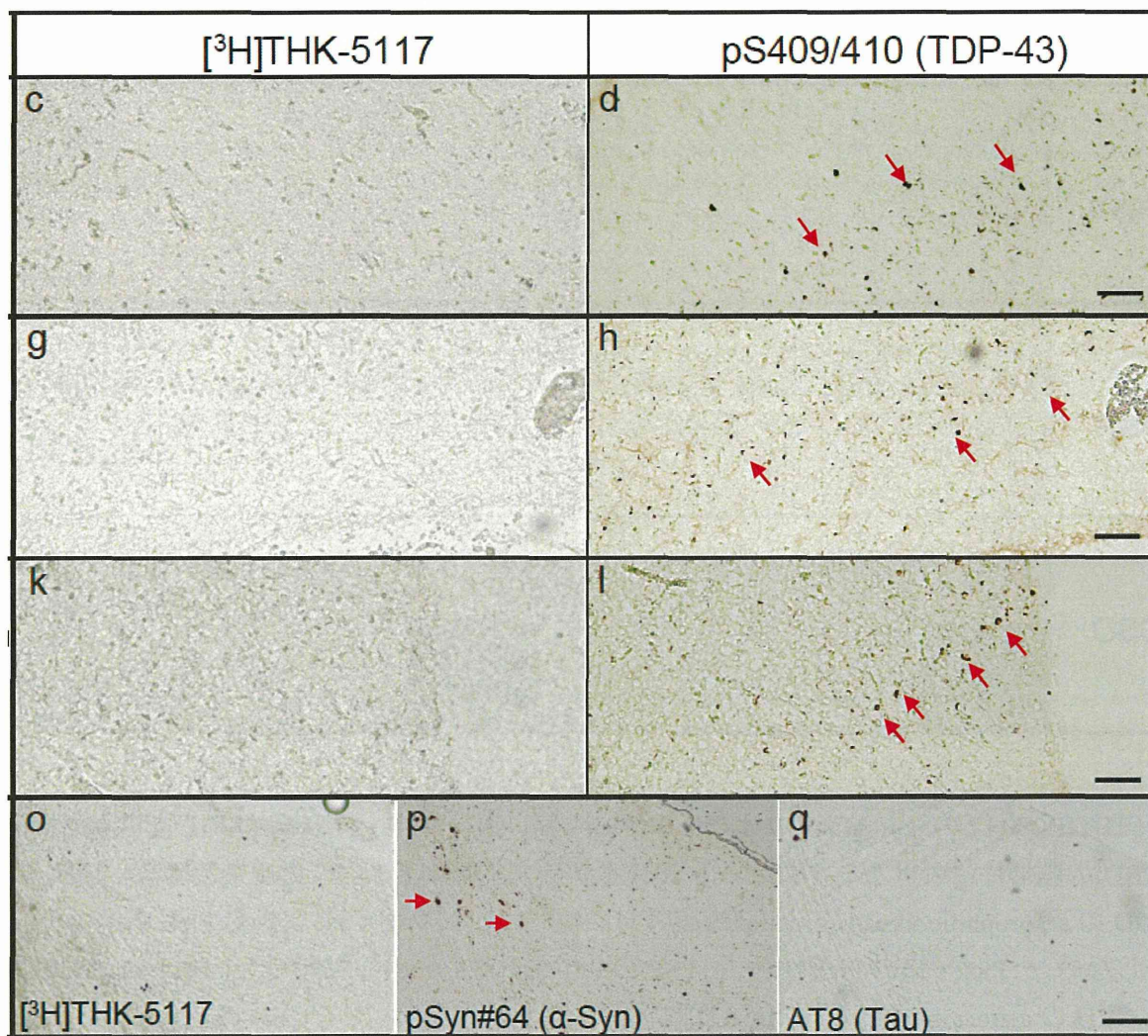


図7 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ の TDP-43 プロテインパチー (最上段と2段目: 進行性非流暢性失語 PNFA、3段目: FTD)、 α シヌクレインパチー(4段目: DLB)脳切片におけるマイクロオートラジオグラフィ画像と TDP-43、タウ、 α シヌクレインの免疫染色画像。 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ は α シヌクレイン病変であるレビー小体(矢印)や TDP-43 病変(矢印)には結合しない。

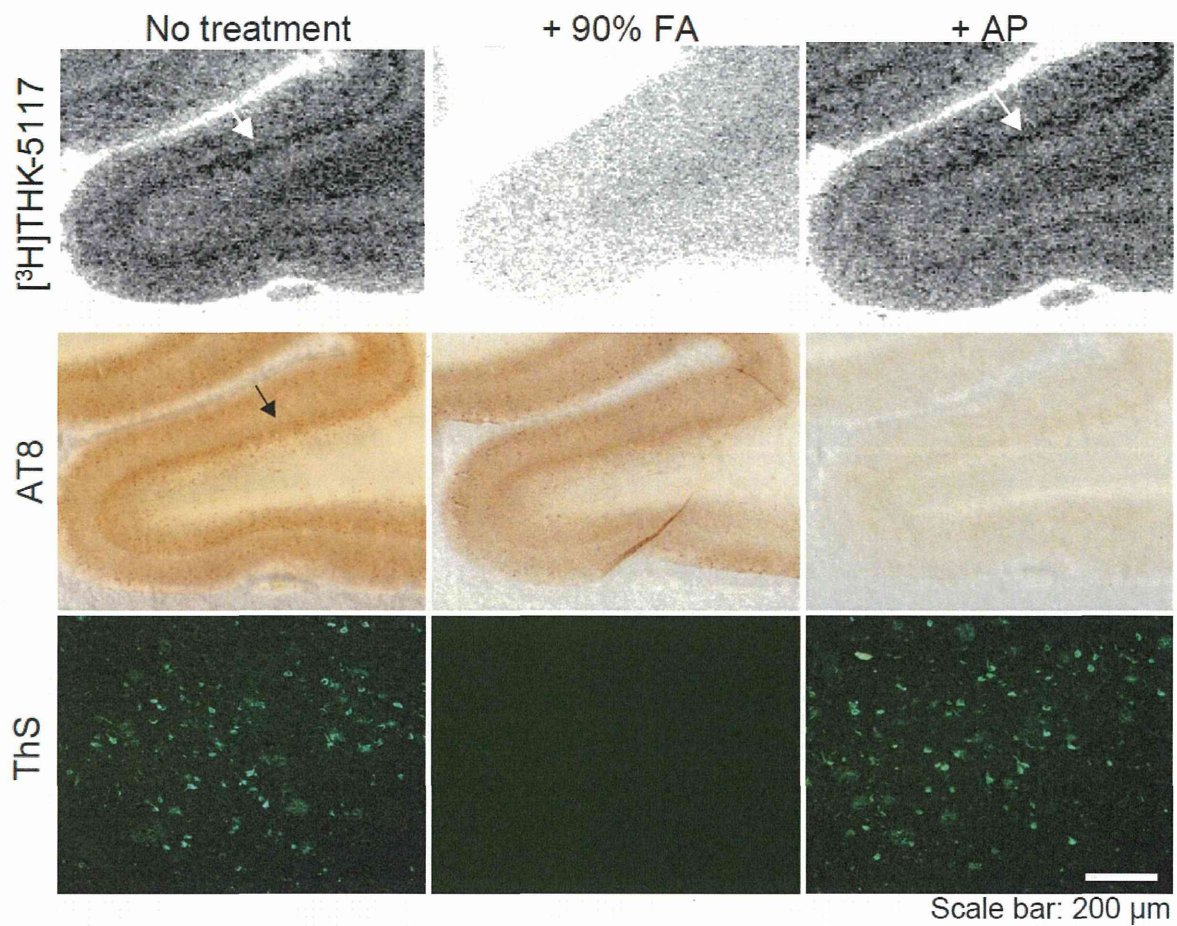


図8 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ のギ酸処理あるいは脱リン酸化処理した AD 脳切片におけるオートラジオグラフィ画像と抗リン酸化抗体(AT8)による免疫染色画像と β シート構造に結合する Thioflavin-S の染色画像。THK-5117 は主にタウ病変の β シートコンフォメーションを認識しているが、タウ蛋白のリン酸基はその結合に関与していない。FA:ギ酸、AP:アルカリフォスファターゼ (脱リン酸化酵素)。矢印：タウ病変の分布

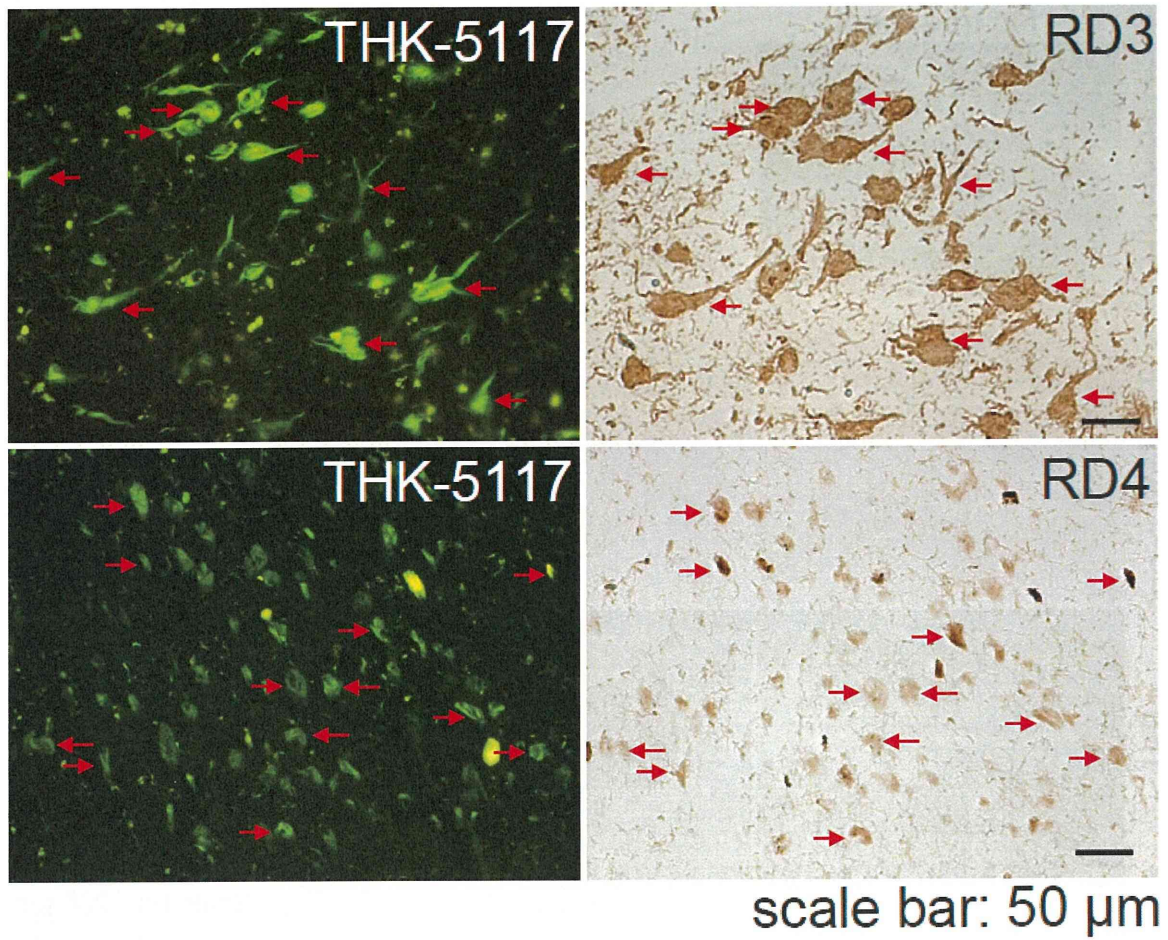


図9 同一切片における THK-5117 の蛍光染色画像とタウ蛋白のリピートドメインに対する抗体 (RD3, RD4)の免疫染色画像。THK-5117 の染色パターンは RD3, RD4 の免疫染色のパターンと一致しており、THK-5117 の結合性はタウ蛋白のリピートタイプには依存しない。矢印：一致しているものを示している。

厚生労働科学研究費補助金
(医療機器開発推進研究)
平成 24 年度 分担研究報告書

アルツハイマー病診断用タウプローブの開発
および
探索的臨床研究

2-(4-モノメチルアミノフェニル)キノリン構造を有する
フッ素 18 標識タウ画像化プローブの合成

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
研究協力者	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
研究代表者	工藤幸司	東北大学病院 臨床試験推進 センター・教授

研究要旨：新しいフッ素 18 標識タウ画像化プローブとして、2-(4-モノメチルアミノフェニル)キノリン構造を有する誘導体 THK-5117 の標品、標識前駆体、そして標識体の合成を試みた。THK-5117 の骨格は、2 クロロキノリン誘導体と 4-アミノフェニルボロン酸誘導体を使用して、鈴木-宮浦反応によって構築した。そして側鎖の導入、構造変換等の操作を経て、標品並びに標識前駆体を良好な収率で合成した。さらにその標識前駆体から、2 段階反応でフッ素 18 標識 THK-5117 を 44% の収率で合成することに成功した。分取 HPLC において夾雑物と目的物は優れた分離を示し、純度良く ^{18}F -THK-5117 を単離精製できたことから、臨床応用の観点からも十分実用的な標識合成法を確立できた。

A. 研究目的

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)は、老年性認知症において最も頻度の高い原因疾患であり、病理学的特徴として老人斑(アミロイド β (A β)の沈着)と神経原線維変化(タウの沈着)を伴う。両病理所見はAD診断基準の必須要件とされ、その形成過程はAD発症機序の中軸をなしていると考えられるが、その過程で臨床症状(認知機能低下)が顕在化するまでには数十年の長い期間を要する。しかし、ADは進行性の神経変性疾患であるため可能な限り早期にその病理変化を検出することが重要である。そこで、早期(発症前)の段階で精度よくADの病理変化を計測する手段として、非侵襲的画像化技術のPETに高い期待が寄せられている。

A β のPET画像化に関しては最近10年で急速に研究が発展し、 ^{11}C -PiBや ^{18}F -Amyvid®など、数多くの臨床用A β 画像化プローブが開発されてきた。これらのプローブは、ADの病態解明研究、AD早期診断法の開発、A β 標的治療薬の評価研究を目的として、世界各国で積極的に臨床利用されている。

一方、ADのタウ病変に関しては、その脳内蓄積量の増加と神経細胞脱落及び認知機能低下が良く相関することから、A β の場合と同様にその画像化手法の確立が強く求

められている。ただしA β の場合と比較して、タウに選択的結合性を示す画像化プローブを開発することは格段に難しく、その開発報告例は数少ない。その中で我々は2-arylquinoline(2-AQ)骨格を有する化合物がタウ凝集体に結合選択性が高いことを発見して、タウ画像化プローブとして ^{11}C -BF-158を世界で初めて報告し(*J Neurol Sci*(2005))、またその ^{18}F 標識類似体の ^{18}F -THK-523を開発した(*Brain*(2012))。このような経緯を踏まえ本研究では、新しい候補化合物として、2-(4-モノメチルアミノフェニル)キノリン構造を有するフッ素18標識タウ画像化プローブ(THK-5117)の合成を検討した。

B. 研究方法

化合物2の合成

化合物1(1.16g, 10mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(20ml)懸濁液に氷冷攪拌下、チオニルクロリド(5g, 42mmol)を滴下し、室温で16時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて、酢酸Etで抽出した。抽出液は水洗して乾燥後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルフラッシュコラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/4)で精製して、114(1.12g, 62%)を無色固体として得た。

mp 190~191°C

化合物 4 の合成

114(1.0g, 5.57mmol), 16(1.2g, 5.76mmol), トリフェニルホスフィン(1.9g, 7.24mmol)のテトラヒドロフラン(20ml)溶液に氷冷攪拌下、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート(1.46g, 7.22mmol)を滴下し、室温で 16 時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去して残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸Et/n-ヘキサン=1/7)で精製して、115(1.78g, 86%)を淡黄色固体として得た。

mp 50~52°C

化合物 6 の合成

115(625mg, 1.69mmol), 66(619mg, 1.86mmol), 炭酸カリウム(467mg, 3.4mmol), テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(195mg, 0.169mmol)および 1,2-ジメトキシエタン(4.5ml)-水(0.5ml)の混合物をアルゴン雰囲気下、85°Cで 16 時間攪拌した。反応液を室温として水を加えて、酢酸エチルで抽出した。抽出液は乾燥して溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:n-ヘキサン、酢酸Et/n-ヘキサン=1/19, 1/9, 1/6)で精製して、132(920mg, 100%)を無色油状物質として得た。

APCI-MS m/z 541[M+H]⁺

化合物 7(THK-5117)の合成

132(912mg, 1.69mmol)のクロロホルム

(10ml)溶液に氷冷攪拌下、トリフロロ酢酸(5ml)を滴下して、室温で 1 時間攪拌後、水(5ml)を滴下して室温でさらに 1 時間攪拌した。反応液は有機溶媒を減圧留去し、氷冷下、飽和炭酸カリウム水溶液で塩基性にして、クロロホルム-メタノールで抽出した。抽出液は乾燥して溶媒を減圧留去し、残渣をジイソプロピルエーテルで洗浄して、THK-5117(468mg, 85%)を黄色固体として得た。

mp 158~159 °C, ¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆)δ 2.75(3H, d, J=1.8Hz), 4.0~4.2(3H, m), 4.4~4.7(2H, m), 5.53(1H, d, J=4.8Hz), 6.09(1H, brs), 6.65(2H, d, J=8.9Hz), 7.3~7.4(2H, m), 7.87(1H, d, J=8.7Hz), 7.94(1H, d, J=8.7Hz), 8.03(2H, d, J=8.6Hz), 8.20(1H, d, J=8.7Hz)

IR (Nujol)1600cm⁻¹

APCI-MS m/z 327[M+H]⁺

化合物 8 の合成

化合物 2(840mg, 4.68mmol), エチルビニルエーテル(1.35ml, 10.0mmol)のテトラヒドロフラン(15ml)溶液にパラトルエンスルホン酸ピリジン塩(120mg, 0.47mmol)を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。反応液をトリエチルアミンで pH9 として溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/9)で精製して、化合物 8(970mg, 82%)を無色油状物質として得た。

APCI-MS m/z 252/254[M+H]⁺

化合物 10 の合成

化合物 8(2.08g, 8.26mmol)および 9(2.90g, 9.09mmol)の 1,2-ジメトキシエタン(70ml)溶液に炭酸カリリウム(3.43g, 24.8mmol)、水(1.44ml)、テトラキストリフェニルホスフィンパラジウム(960mg, 0.83mmol)を加えてアルゴン雰囲気下、80℃で 9 時間攪拌した。反応液を室温として水を加えて酢酸エチルで抽出した。抽出液は水洗後、乾燥して溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/9)で精製して、化合物 10(3.00g, 89%)を無色固体として得た。

mp 115~117℃

APCI-MS m/z 409[M+H]⁺

化合物 11 の合成

化合物 10(1.79g, 4.38mmol)の N,N-ジメチルホルムアミド(25ml)溶液に氷冷攪拌下アルゴン雰囲気下、60%水素化ナトリウム(210mg, 5.25mmol)を加えて、同温で 10 分攪拌後、同温でヨウ化メチル(0.41ml, 6.57mmol)を滴下して、同温で 10 分攪拌した。反応液に氷水を加えて、酢酸エチルで抽出した。抽出液は水洗後、乾燥して溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/4)で精製して、化合物 11(1.85g, 100%)を無色樹脂状物質として得た。

APCI-MS m/z 423[M+H]⁺

化合物 12 の合成

化合物 11(1.85g, 4.38mmol)のクロロホルム(12ml)溶液に氷冷攪拌下、トリフロロ酢酸(8ml)を滴下して、室温で 1 時間攪拌した。反応液に氷水を加えて、酢酸エチルで抽出した。抽出液は水洗後乾燥して溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/n-ヘキサン(1/4)で粉碎後洗浄して、化合物 12(1.04g, 95%)を橙色結晶として得た。

mp 273~275℃

APCI-MS m/z 251[M+H]⁺

化合物 13 の合成

化合物 12(1.03g, 4.12mmol)およびトリエチルアミン(1.72ml, 12.36mmol)の塩化メチレン(40ml)懸濁液に氷冷攪拌下、トリフロロ酢酸無水物(1.40ml, 9.89mmol)を滴下して、同温で 30 分攪拌した。反応液に氷水を加えて酢酸エチルで抽出した。抽出液は水洗後乾燥して溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/2)次いで NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/1, 酢酸エチル)で精製して、化合物 13(1.40g, 98%)を淡黄色固体として得た。

mp 214~216℃

APCI-MS m/z 347[M+H]⁺

化合物 15

化合物 13(1.39g, 4.01mmol)、63(1.74g, 4.82mmol)、トリフェニルホスフィン(1.26g, 4.82mmol)のテトラヒドロフラン(40ml)懸濁液に氷冷攪拌下、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート(0.95ml, 4.82mmol)のテトラヒドロフラン(10ml)溶液を 30 分かけて滴下し、同温で 1 時間、室温で 16 時間攪拌した。反応液に 14(1.45g, 4.01mmol)、トリフェニルホスフィン(1.05g, 4.01mmol)およびジイソプロピルアゾジカルボキシレート(0.80ml, 4.01mmol)を追加して、室温で 1 時間攪拌した。反応液の溶媒を減圧留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/4)に付し、無色油状物質(5.65g)を得た。本品(5.65g)のクロロホルム(24ml)溶液に氷冷攪拌下、トリフロロ酢酸(16ml)を滴下して、水(16ml)を加えて室温で 3 日間攪拌した。反応液を炭酸カリウム水溶液で pH9 として、酢酸エチルで抽出した。抽出液は水洗後乾燥して溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/4, 2/3)で精製して、化合物 15(2.15g, 93%)を黄色アモルファスとして得た。

APCI-MS m/z 575[M+H]⁺

化合物 16

化合物 15(2.14g, 3.72mmol)および 3,4-ジヒドロ-2H-ピラン(6.75ml, 74mmol)の塩化メチレン(60ml)溶液にパラトルエンスルホ

ン酸一水和物(830mg, 4.84mmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液をトリエチルアミンで pH9 として、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=1/9, 1/2)で精製して、化合物 16(2.36g, 96%)を淡黄色アモルファスとして得た。

APCI-MS m/z 659[M+H]⁺

化合物 17 の合成

153(2.35g, 3.57mmol)のテトラヒドロフラン(28ml)-水(11ml)溶液に氷冷攪拌下、水酸化リチウム一水和物(225mg, 5.35mmol)加えて、同温で 30 分攪拌した。反応液に水を加えて酢酸エチルで抽出し、抽出液は水洗後乾燥して溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出溶媒:酢酸エチル/n-ヘキサン=2/3)で精製して、化合物 17(1.78g, 89%)を淡黄色結晶として得た。

mp 126~126.5°C

¹H NMR(500MHz, DMSO-d₆) δ 1.35~1.71(6H, m), 2.34, 2.34(3H, s), 2.75(3H, br), 3.38~3.46(1H, m), 3.66~3.72, 3.81~3.88(1H, m), 4.08~4.37(5H, m), 4.69~4.72, 4.85~4.87(1H, m), 6.10(1H, br), 6.66(2H, d, J=9.0Hz), 7.22~7.25(1H, m), 7.27~7.29(1H, m), 7.39~7.43(2H, m), 7.77~7.81(2H, m), 7.85(1H, d, J=9.0Hz), 7.96(1H, d, J=8.7Hz), 8.03(2H, d, J=8.7Hz), 8.18(1H, d, J=8.7Hz)