

**厚生労働科学研究費補助金
(医療機器開発推進研究)
平成 26 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**

最適化プローブ^[18F]THK-5351 の結合性・薬物動態特性の検討

研究代表者	工藤幸司	東北大学加齢医学研究所 ・教授
研究協力者	原田龍一	東北大学加齢医学研究所 ・JSPS 特別研究員(PD)
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	東北大学サイクロトロン RI センター・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

研究要旨： タウイメージングプローブとして^[18F]THK-5105、^[18F]THK-5117 を開発し、アルツハイマー病患者においてタウ病理像の画像化に成功した。しかし、両トレーサーは白質や脳幹などへの非特異的な集積が認められ、それらは軽微なタウ病理像の検出の妨げになると考えられる。そこで、さらなる化合物の最適化を進め^[18F]THK-5351 を新たに開発した。本研究では、^[18F]THK-5351 の結合特性、薬理学的特性を明らかにすることを目的とした。In vitro 結合実験の結果、^[18F]THK-5351 はアルツハイマー病海馬脳ホモジネートに対して、 $K_d = 2.9$ nM と高い結合親和性を示した。また、オートラジオグラフィーの結果、タウ病理像に対して選択的に結合し、THK-5117 と比較して白質への結合が大幅に軽減された。また、^[18F]THK-5351 は優れた薬物動態特性を示し、十分な脳移行性と速やかなウォッシュアウトを示した。さらに、^[18F]THK-5351 は末梢で速やかに代謝されるが、その放射性代謝

物の脳移行性はきわめて低く、優れた代謝特性を示した。以上のことから、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ はタウイメージングプローブの有力候補化合物と考えられた。

A. 研究目的

これまでにタウイメージングプローブとして開発した $[^{18}\text{F}]\text{THK-5105}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ を用いた PET イメージングの結果、アルツハイマー病患者におけるタウ病理像の好発部位である海馬、側頭葉などにおいて、トレーサーの高集積が認められた。しかし、両トレーサーは白質や脳幹への非特異的な集積が認められた。これは、軽微なタウ病理像の検出の妨げになる可能性がある。そこで、化合物のさらなる最適化を進め、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ を新たに開発した(図 1)。そこで、本研究では最適化化合物 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ の薬理学的特性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 脳ホモジネートを用いた結合実験

ヒト剖検脳をリン酸バッファー(PBS)で溶解させ、ホモジネートした(1 mL/0.1g)。脳ホモジネートと標識化合物を反応させ、B/F 分離を行った後に、結合した標識化合物量を算出し、結合解離定数 K_d を算出した。また、結合-解離のキネティクスを明らかにするために、 k_{on} は脳ホモジネートと標識化合物を反応させてから、各時間後に反応を止め、結合量を算出し、 k_{off} は脳ホモジネ

ートと標識化合物を反応させてから 2 時間後に、非標識化合物を加え、結合解離を開始し、各時間後に反応を止め、結合量を算出した。各結合パラメーターは GraphPad Prism 5 を用いて求めた。

2. オートラジオグラフィー実験

$[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ (6 $\mu\text{Ci/mL}$)をアルツハイマー病患者脳切片に滴下し、室温で 30 分間反応させた。その後、PBS, 1%BSA に 5 分間浸漬し、次いで PBS に 5 分間浸漬し、その後 PBS に 5 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 FLA-8000 (GE ヘルスケア)にて画像の読み取りを行った。 $[^3\text{H}]\text{THK-5351}$ 、 $[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ 、 $[^3\text{H}]\text{PiB}$ (3 nM)でも同様にオートラジオグラフィーを行い、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 3 日間静置し、FLA-7000 (GE ヘルスケア)にて画像の読み取りを行った。さらに、オートラジオグラフィー後の切片に原子核乳剤(Kodak NTB)を塗布し、冷蔵庫で 2 週間静置し、現像処理を行い、顕微鏡で観察した。連続切片を抗タウ抗体 (AT8、AT100)、 $\text{A}\beta(6\text{F}/3\text{D})$ を用いて免疫染色した。さら

に、タウ特異的染色する嗜銀染色法 Gallyas Braaks 染色でも同様にタウ病理像の分布を確認した。

3. 脳血液脳関門透過性の評価

[¹⁸F]THK-5351 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 1 g 当たりの投与量に対する集積量(%ID/g)で算出した。

4. [¹⁸F]THK-5351 の代謝物解析

[¹⁸F]THK-5351 を ICR マウスの尾静脈より投与し、静注 2 分、10 分、30 分に、血漿、脳を回収し、抽出後に、逆相 TLC により展開した。また、血漿中で見られた放射性代謝物を肝臓から単離し、脳移行性を検討した。また、その放射性代謝物の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

ヒト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。

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、被爆

および汚染の防護に努める。

C. 研究結果

1. 脳ホモジネートを用いた結合実験

[¹⁸F]THK-5351 はアルツハイマー病海馬脳ホモジネートに対して、 $K_d = 2.9$ nM と高い結合親和性を示した。また、非特異的結合を示すパラメーターである NS は 2.1 と THK-5117 と比較して低い値を示した(表 1)。THK-5351 と THK-5117 の 1 nM における結合量の相関を評価したところ、高い相関が認められた($r = 0.98$, $P < 0.0001$)。その一方で、同濃度におけるトレーサーの結合量は THK-5351 の方が高い値を示した。THK-5351 の健常人白質脳ホモジネートに対する k_{off} は THK-5117 と比較して、小さく、白質からの解離が速いことが明らかとなった。

2. オートラジオグラフィー実験

オートラジオグラフィーの結果、上記の結合実験の結果を反映するように、THK-5351 は白質への集積が低く、アルツハイマー病脳切片において高いシグナル-バックグラウンド比を示した。THK-5351 は THK-5117 同様、灰白質にラミナー状の集積パターンが見られ、その分布はタウの免疫染色と一致した(図 2)。また、アミロイド PET プローブ PiB とは明らかに異なる集積パターンを示した。マイクロオートラジオグ

ラフィーの結果、THK-5351 のタウ病理像への選択的な結合が確認され、そのラベリング像は Gallyas Braak 染色像とそっくりであった(図 3)。

3. 脳血液脳関門透過性の評価

[¹⁸F]THK-5351 と [¹⁸F]THK-5117 の脳血液脳関門透過性を正常組織からのクリアランスを ICR マウスで比較した(図 4)。投与 2 分後の [¹⁸F]THK-5351 の脳集積量は、 $4.36 \pm 0.19\%ID/g$ と [¹⁸F]THK-5117 ($6.95 \pm 0.33\%ID/g$) よりも低い、脳イメージングプローブとしては十分であり、 [¹⁸F]THK-5351 の正常組織からのクリアランスは [¹⁸F]THK-5117 よりも速やかであった。また、脱フッ素による骨への集積は [¹⁸F]THK-5117 同様、 [¹⁸F]THK-5351 においても認められなかった。

4. [¹⁸F]THK-5351 の代謝物解析

投与 30 分後において、血漿中の未変化体は約 10%程度と [¹⁸F]THK-5351 は末梢において速やかに代謝された。一方で、脳における代謝物はほとんど見られなかった(図 5)。また、肝臓から単離した放射性代謝物を正常マウスに投与したところ投与 2 分後における脳集積量は 0.5%以下と低く、放射性代謝物の脳移行性はきわめて低いと考えられた(図 5)。非標識 THK-5351 を投与したマウスの血漿サンプルを HPLC で分取し、

質量分析で解析を行ったところ、THK-5351 の硫酸抱合体が同定された。

D. 考察

最適化化合物 [¹⁸F]THK-5351 は [¹⁸F]THK-5117 よりも白質への非特異的結合が低減され、かつ優れた薬物動態特性を示した。したがって、ヒト PET 画像においても高いシグナル-バックグラウンド比でタウ病理像を描出することが期待できる。

E. 結論

[¹⁸F]THK-5351 はタウイメージング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. 論文発表

- 1) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Hiraoka K, Watanuki S, Shidahara M, Miyake M, Ishikawa Y, Matsuda R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y.: [¹⁸F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Eur Nucl Med Mol Imaging*. DOI 10.1007/s00259-015-3035-4
- 2) Li Y, Tsui W, Rusinek H, Butler T, Mosconi L, Pirraglia E, Mozley D, Vallabhajosula S, Harada R, Furumoto S, Furukawa K, Arai H, Kudo Y, Okamura N: Cortical Lamina Binding of PET Amyloid and Tau Tracers in Alzheimer's disease. *J N M* (2015)56.270-273
- 3) Villemagne VL, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Hodges J, Harada R, Yates P, Piguet O, Pejoska S, Dore V, Yanai K, Masters CL, Kudo Y, Rowe CC, Okamura N: In vivo

evaluation of a novel tau imaging tracer for Alzheimer's disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging(2014) DOI 10.1007/s00259-013-2681-7

- 4) Okamura N, Harada R, Furumoto S, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Tau PET Imaging in Alzheimer's Disease. Curr Neurol Neurosci Rep (2014) DOI 10.1007/s11910-014-0500-6
- 5) Fodero-Tavoletti MT, Furumoto S, Taylor L, McLean CA, Mulligan RS, Birchall I, Harada R, Masters CL, Yanai K, Kudo Y, Rowe CC, Okamura N, Villemagne VL: Assessing THK523 selectivity for tau deposits in Alzheimer's disease and non Alzheimer's disease tauopathies. Alzheimers Res Ther (2014)26.11
- 6) Okamura N, Furumoto S, Fedoro-Tavoletti MT, Mulligan RS, Harada R, Yates P, Pejoska S, Kudo Y, Masters CL, Yanai K, Rowe CC, Villemagne VL: Non-invasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using 18F-THK-5105 PET. Brain (2014) doi:10.1093/brain/awu064
- 7) Tago T, Furumoto S, Okamura N, Harada R, Ishikawa Y, Arai H, Yanai K, Iwata R, Kudo Y: Synthesis and preliminary evaluation of 2-arylhydroxyquinoline derivatives for tau imaging. J Labelled Comp Radiopharm(2014)57.18-24
- 8) Villemagne VL, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Hodges J, Harada R, Yates P, piguet O, Pejoska S, Dore V, Yanai K, Masters CL, Kudo Y, Rowe CC, Okamura N.: In vivo evaluation of a novel tau imaging tracer for alzheimer's disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 41.816-826.2014

2. 学会発表 海外

- 1) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Iwata R, H, Arai H, Yanai K, Kudo Y: [18F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. AD/PD 2015. March 10-17, 2015 Nice France
- 2) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Iwata R, H, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Preclinical evaluation of a novel tau PET tracer [18F]THK-5351. AD/PD 2015. March 10-17, 2015 Nice France
- 3) Okamura N, Harada R, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y.: Validation of Automated Analysis of Tracer Binding on THK Tau PET Images. 9th Human Amyloid Imaging. 2015年1月14日-16日. アメリカ・マイアミ
- 4) Tago T, Furumoto S, Okamura N, Harada R, Adachi H, Ishikawa Y, Yanai K, Iwata R, Kudo Y.: Chirality of [18F]THK-5105 Affects its Preclinical Characteristics as a PET Tau Imaging Probe. 9th Human Amyloid Imaging. 2015年1月14日-16日. アメリカ・マイアミ
- 5) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Furukawa K, Ishiki A, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y.: First-in-Human PET Study of a Novel Tau Tracer [18F]THK-5351. 2015年1月14日-16日. アメリカ・マイアミ
- 6) Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Iwata R, Tashiro M, Furukawa K, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Characterization of [18F]THK-5351, a novel PET tracer for imaging tau pathology in Alzheimer's disease. EANM'14 (ヨーロッパ核医学会). Oct 18, 2014. スウェーデン Gothenburg
- 7) Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Iwata R, Tashiro M, Furukawa K, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Characterization of [18F]THK-5351, a novel PET tracer for imaging tau pathology in Alzheimer's disease. EANM'14 (ヨーロッパ核医学会). Oct 18, 2014. スウェーデン Gothenburg
- 8) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Iwata R, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Development of tau selective PET tracers. NIH-Japan-JSPS Symposium. 2014年10月23日. アメリカ ベセスダ
- 9) Ishiki A, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y, Arai H: Accumulation of the novel tau imaging tracer, 18F-5117 is associated with brain atrophy in Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference 2014. 2014年7月12-17日. コペンハーゲン
- 10) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Yoshikawa T, Akatsu H, Iwata R, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Binding characterization of PET tracer 18F-5117 in non-Alzheimer's neurodegenerative diseases. Alzheimer's Association International Conference

- 2014.2014年7月12-17日.コペンハーゲン
- 11) Okamura N, Harada R, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Tashiro M, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y: Comparison of 18F-THK5117 and 11C-PiB PET images in the Patients with Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference 2014.2014年7月12-17日.コペンハーゲン
- 12) Okamura N, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Ishiki A, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y: In vivo selective imaging of tau pathology in Alzheimer's disease with 18F-THK5117. Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2014.2014年6月7日-11日.セントルイス
- 13) Barret O, Alagille D, Jennings D, Okamura N, Furumoto S, Kudo Y, Marek K, Seibyl J, Tamagnan G: In vivo assessment of four tau protein tracers isomers of [18F]-THK5105 and [18F]-THK5117. Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2014.2014年6月7日-11日.セントルイス

国内

- 4) 岡村 信行、古本 祥三、原田 龍一、多胡 哲郎、古川 勝敏、石木 愛子、富田 尚希、平岡 宏太良、四月朔日 聖一、松田 林、石川 洋一、田代 学、岩田 錬、谷内 一彦、荒井 啓行、Mulligan RS, Rowe CC, Villemagne VL, 工藤幸司: タウ蛋白検出用 PET プローブ [18F]THK-5105, [18F]THK-5117 の開発. 分子イメージング研究戦略推進プログラム成果報告シンポジウム 日経ホール、平成 26 年 2 月 18 日
- 5) 岡村 信行、古本 祥三、原田 龍一、荒井 啓行、谷内 一彦、工藤 幸司、レイチェル マリガン、クリストファー ロウ、ビクター ビルマーニ: THK-5105 PET を用いたアルツハイマー病タウ病理像の生体画像化. 第 32 回日本認知症学会学術集会 キッセイ文化ホール、松本市総合体育館(長野県松本市) 2013 年 11 月 8 日~10 日
- 6) 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: タウイメージング用トレーサー[18F]THK-5117 の前臨床評価. 第 32 回日本認知症学会学術集会 キッセイ文化ホール、松本市総合体育館(長野県松本市) 2013 年 11 月 8 日~10 日
- 7) 工藤 幸司、岡村 信行、古本 祥三、原田 龍一、古川 勝敏、樋口 真人、Victor L Villemagne、谷内 一彦、荒井 啓行: タウイメージング用 PET プロブの現状. 第 32 回日本認知症学会学術集会 ホットトピック. キッセイ文化ホール、松本市総合体育館(長野県松本市) 2013 年 11 月 8 日~10 日
- 8) 多胡 哲郎、古本 祥三、岡村 信行、原田 龍一、石川 洋一、谷内 一彦、工藤 幸司、岩田 錬: PET 用タウイメージング剤 [18F]THK-5105 のエナンチオマー体の合成と評価. 第 53 回日本核医学会学術総会福岡国際会議場 2013 年 11 月 8 日~10 日
- 9) 岡村 信行、古本 祥三、原田 龍一、多胡 哲郎、谷内 一彦、工藤 幸司、レイチェル マリガン、クリストファー ロウ、ビクタービルマーニ: アルツハイマー病患者における[18F]THK-5105 の臨床評価. 第 53 回日本核医学会学術総会 福岡国際会議場 2013 年 11 月 8 日~10 日
- 1) 原田龍一、岡村信行、古本祥三、多胡哲郎、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、岩田錬、田代学、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司: タウ蛋白を標的とした分子イメージングプローブの開発. 日本薬学会 第 134 年会 熊本大学、パレアホール、ホテル日航、同仁堂ホール、水道町エリア、鶴屋百貨店、平成 26 年 3 月 29 日
- 2) 原田龍一、岡村信行、古本祥三、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、多胡哲郎、吉川雄朗、岩田錬、田代学、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦: Binding characterization and clinical application of novel PET tracer 18F-THK5117 for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. 第 88 回日本薬理学学会東北大学百周年記念会館川内萩ホール 仙台国際センター. 平成 26 年 3 月 20 日
- 3) 岡村信行、原田龍一、古本祥三、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司: PET tau imaging in Alzheimer's disease using 18F-THK-5105 and 18F-THK5117. 第 88 回日本薬理学学会 東北大学百周年記念会館川内萩ホール 仙台国際センター. 平成 26 年 3 月 18 日

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む) 下記参照

特許出願状況

出願/公開番号	発明の名称	出願/公開日	出願人	発明者
国際出願番号： PCT/JP2011/074930 公開番号 WO/2012/057312	タウイメージング プローブ	国際出願日 平成 23 年 10 月 28 日 国際公開日 2012(H24) 年 5 月 3 日	クリノ(株) 東北大学	工藤幸司 岡村信行 古本祥三

特許出願状況

PCT/JP2011/074930、公開番号WO/2012/057312については、現在、以下の14ヶ国（および地域）へ国内移行中。特許として成立したものはまだない。

日本、ロシア、オーストラリア、イスラエル、中国、韓国、ヨーロッパ、カナダ、ブラジル、インドネシア、メキシコ、シンガポール、インド、アメリカ。

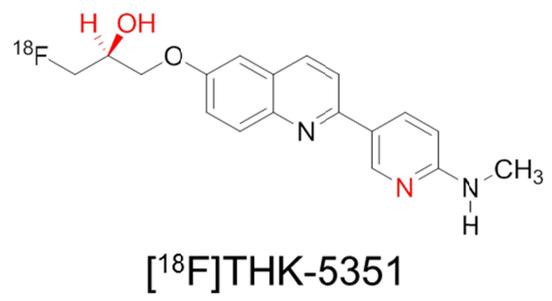
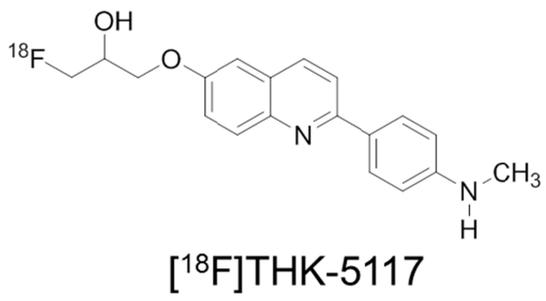


図1 $[^{18}\text{F}]$ THK-5117 と $[^{18}\text{F}]$ THK-5351 の化学構造式

	[¹⁸ F]THK-5117	[¹⁸ F]THK-5351
K_D (nM)* ¹	10.8	2.9
B_{max} (pmol/g tissue) * ¹	1485	368.3
B_{max}/K_D * ¹	137.5	127.0
NS* ¹	12.6	2.10
k_{on} (min ⁻¹ /nM) (AD GM)	0.0025	0.0053
k_{off} (min ⁻¹) (AD GM)	0.016	0.017
k_{off} (min ⁻¹) (Normal WM)	0.005	0.021

*¹ hippocampal AD brain homogenate

表 1 [¹⁸F]THK-5117 と [¹⁸F]THK-5351 のアルツハイマー病患者、健常脳ホモジネートに対する結合パラメーター

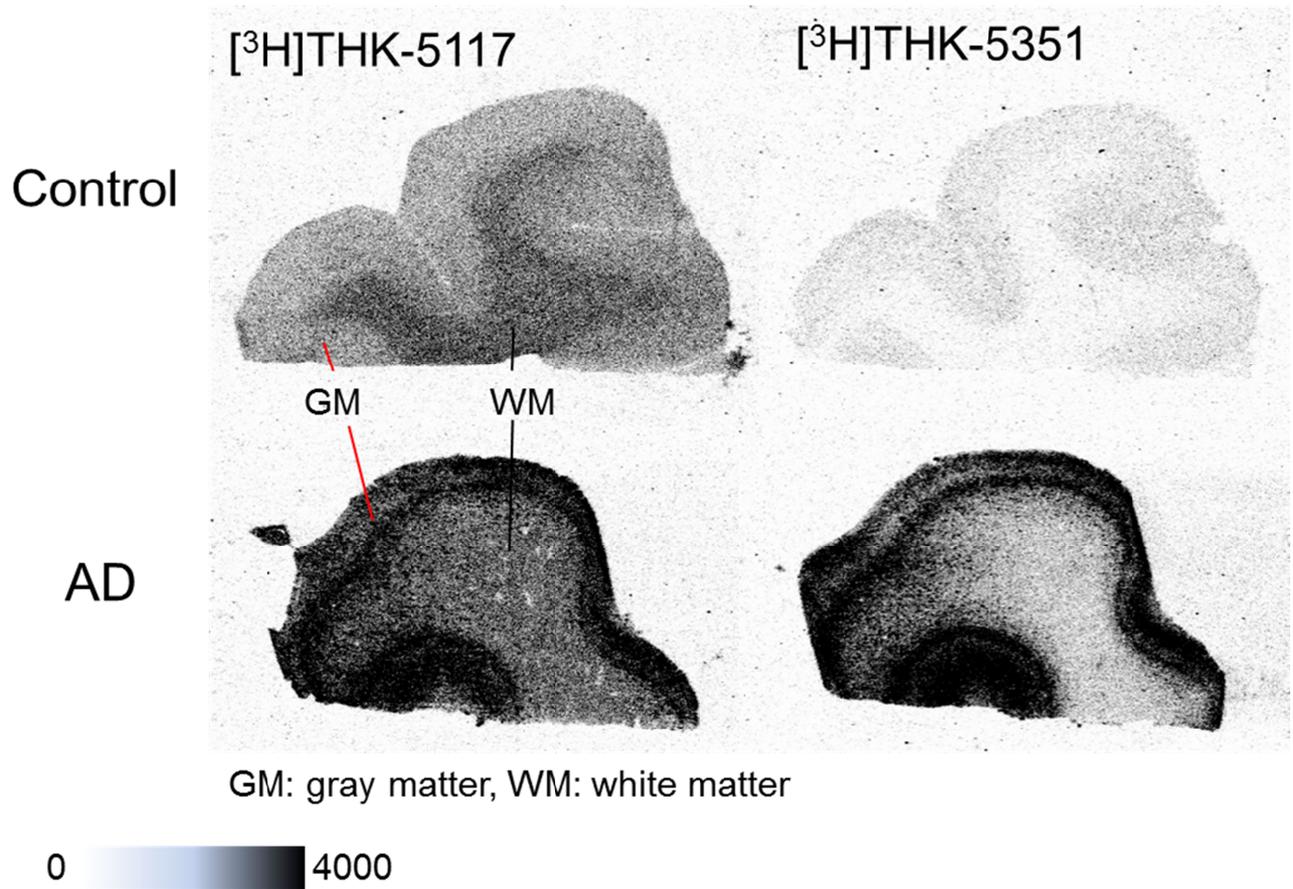


図 2 健常脳(Control)とアルツハイマー病患者(AD)脳切片における[³H]THK-5117 と [³H]THK-5351 のオートラジオグラフィー像

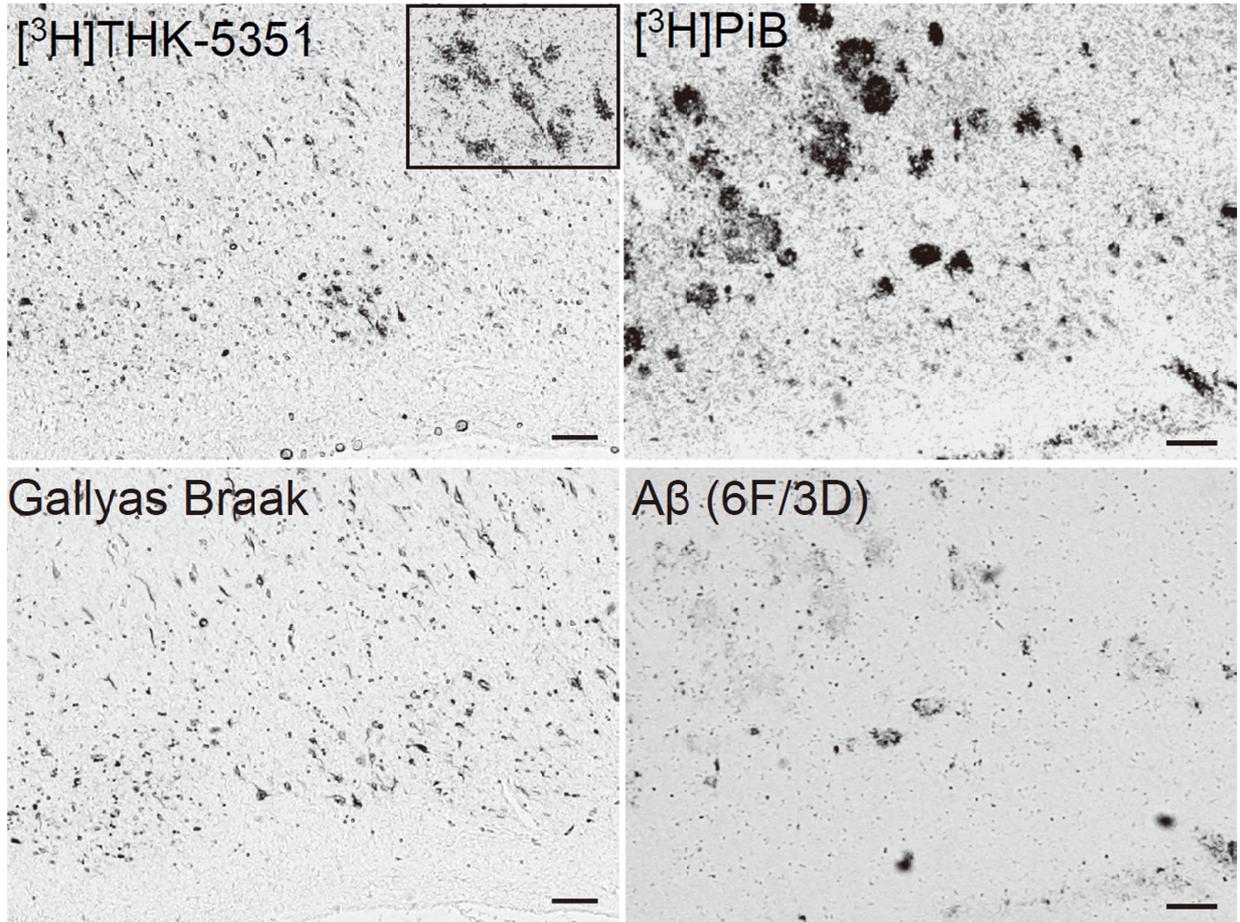


図3 アルツハイマー病患者(AD)脳切片における $[^3\text{H}]\text{THK-5351}$ 、 $[^3\text{H}]\text{PiB}$ のオートラジオグラフィ像および Gallyas Braak 染色像、A 免疫染色像

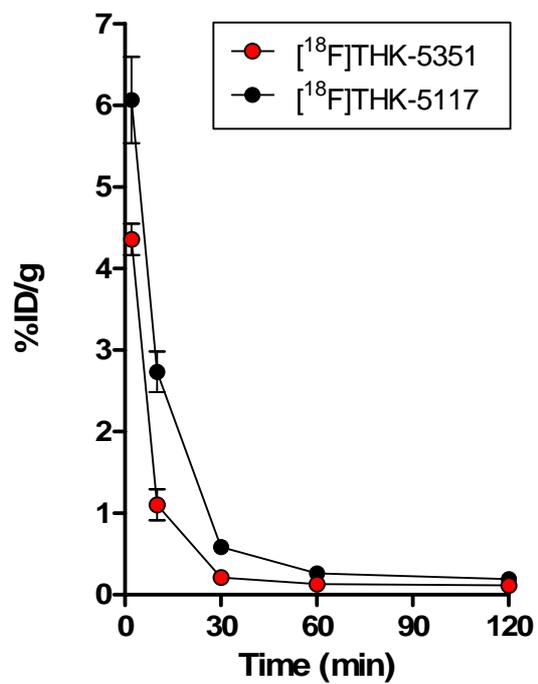
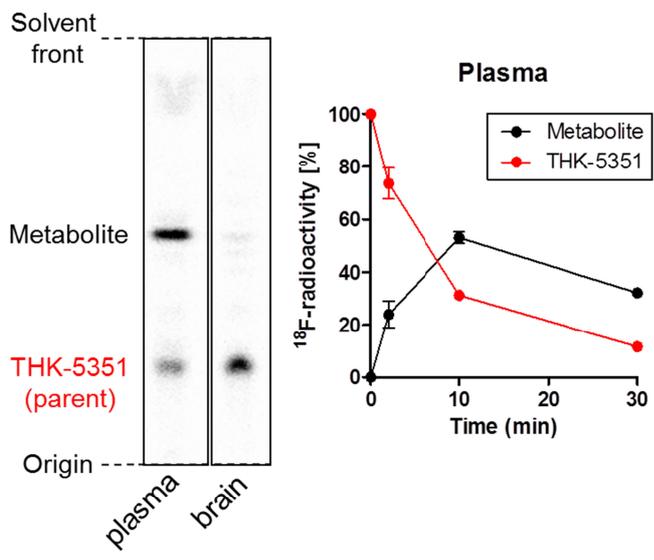


図4 正常マウスにおける $[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ および $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ の脳移行性



RP-HPTLC in plasma and brain at 10 min following injection of [¹⁸F]THK-5351
 CH₃CN:20 mM phosphate buffer, pH 6.5 = 1:1
 Extraction efficiency
 Plasma: 86.8%
 Brain: 82.2%

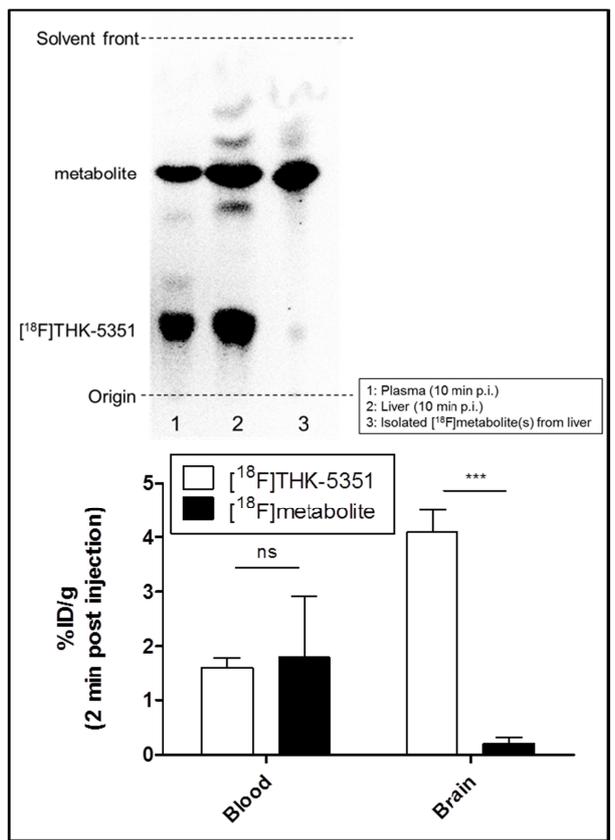


図5 正常マウスにおける¹⁸F]THK-5351の代謝解析および放射性代謝物の脳移行性

