

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 5 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01282

研究課題名(和文) 神経難病診断のためのMR画像用試薬の開発

研究課題名(英文) Development novel probes for fluorine MRI to detect neurodegenerative diseases

研究代表者

田口 弘康 (Taguchi, Hiroyasu)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・特任教授

研究者番号：90102912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病でみられる老人斑、タウオパチーでみられる神経線維変化、レビー小体型認知症およびパーキンソン病でみられる α -シヌクレイン凝集体を検出するフッ素MR画像化試薬の開発を目的に研究を行った。老人斑の検出では新たにShiga-Y25を合成し、アルツハイマー病の遺伝子改変マウスに投与し、フッ素MR画像法で老人斑の画像化に成功した。また、神経原線維変化に特異的に結合する化合物としてShiga-X35を新規合成し、タウ遺伝子改変マウスに投与し、世界で初めてフッ素MR画像法によるタウイメージングに成功した。一方、研究期間内に α -シヌクレイン凝集体に特異的に結合する化合物の合成はできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最大の特色は、最先端のフッ素MR画像技術を駆使しアルツハイマー病、タウオパチー、パーキンソン病など、神経難病のMR画像診断薬を開発する点にある。その結果、アミロイドイメージング試薬としてShiga-x25、タウイメージング試薬としてShiga-X35を新規合成した。現在、神経難病の画像診断としては、PETによるアミロイドイメージング法が使われている。しかしながら、MR画像法は、PETに比べ放射性同位体を使わない、くり返し測定が可能、サイクロトロンのような高価な施設がいらぬなど利点が多いため、将来的にPET診断法を補う(あるいは置き換わる)画像診断法になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined novel chemicals for fluorine MRI to detect senile plaques, neurofibrillary tangles and Lewy bodies in mouse brain. We synthesized a novel chemical, named Shiga-Y25. We injected Shiga-Y25 into a tail vein of APP/PS1 mouse. Using 7 Tesla MRI, Shiga-Y25 successfully revealed senile plaques in the mouse brain. We also synthesized a novel chemical, named Shiga-Y35. We injected Shiga-Y35 into a tail vein of rTg4510 mouse. Using 7 Tesla MRI, Shiga-Y35 successfully detected neurofibrillary tangles in the mouse brain. We could not find chemicals that specifically bind to alpha-synuclein aggregations.

研究分野：有機合成化学

キーワード：有機化学 脳神経疾患 神経科学 核磁気共鳴画像 診断薬

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

高磁場 MR 画像装置 (7-11 テスラ) の登場は、従来は不可能であった新しい画像診断法を可能にしつつある。そのひとつが、従来のプロトン MR 画像のみならず、フッ素などプロトン以外の原子をも画像化する多原子 MR 画像技術である。なかでもフッ素 MR 画像法は、比較的感度が高く、フッ素原子が体内にほとんど存在しないため、フッ素原子を含む良質の診断薬を合成できれば、感度よく MR 画像化することができる。我々はこれまで、フッ素 MR 画像法によるアルツハイマー病の老人斑検出試薬の開発に取り組み、Shiga-X (特許第 5182747 号)、Shiga-Y (PCT/JP2010/053590) などの新規試薬を発表してきた。

フッ素 MR 画像法では、不溶性凝集体に強く結合したリガンドの NMR 信号は、個体 NMR と同様に著減ないし消失することが欠点であった。我々は、不溶性凝集体に強く結合したリガンドでも強いフッ素 NMR 信号を出すことのできる共通構造を見だし、ユニバーサル試薬と名付け特許を出願するとともに論文発表した (図 1)。本研究では、このユニバーサル試薬を老人斑、神経原線維変化、レビー小体、TDP-43 凝集体に特異的に検出する化合物に付加することで、老人斑、神経原線維変化、レビー小体、TDP-43 封入体を特異的に検出するフッ素 MR 画像法用の試薬を開発する。

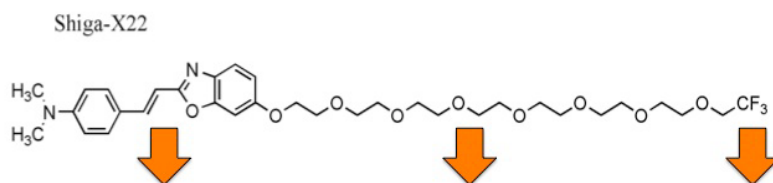


図 1. ユニバーサル試薬 脳内異常蛋白結合部 F 原子の自由度を増す PEG フッ素原子

2. 研究の目的

老人斑の主成分である β -アミロイドペプチド ($A\beta$) 凝集体、神経原線維変化の主成分であるリン酸化タウ凝集体、レビー小体の主成分である α -シヌクレイン凝集体に特異的に結合する化合物を選別あるいは合成する。その上で、選別した化合物にユニバーサル試薬を結合させて、上記凝集体を検出する MR 画像候補薬を合成する。上記候補薬をモデルマウスに血管内投与し、安全性、血液脳関門の透過性を検証するとともに、MR 画像化ができるか検討する。以上により、アルツハイマー病に限らず、前頭側頭型認知症などのタウオパチー、レビー小体病、パーキンソン病、などの多くの神経変性疾患のフッ素 MR 画像診断試薬を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

3-1. 老人斑、神経原線維変化、 α -シヌクレイン凝集体に特異的に結合する化合物の合成

老人斑、神経原線維変化、 α -シヌクレイン凝集体に特異的に結合する化合物を見出すことが重要である。老人斑、神経原線維変化、 α -シヌクレイン凝集体はそれぞれを構成するタンパク質 (またはペプチド) は異なるものの、どちらもベータシート構造に富む異常凝集体であるという共通の特徴を有する。我々はこれまで老人斑の画像化プローブを開発する過程でベータシート構造に結合する様々な化合物からなるライブラリを有している。これまでに合成した化合物ライブラリや文献検索の中から、神経原線維変化のみに、あるいは α -シヌクレイン凝集体のみに高い親和性を有する化合物を見出す。方法の概要は、以下の通りである。

1) ヒトアルツハイマー病剖検脳およびレビー小体病剖検脳切片に候補化合物溶液を処置し、老

人斑、神経原線維変化、レビー小体への親和性を比較することで行う。

2) 有望な化合物については、チオフラビン蛍光阻害試験や水晶発振子マイクロバランス (QCM) 測定装置等を用いた *in vitro* アッセイで、結合能を定量解析する。

3-2. フッ素 MR 画像化するための良質なプローブの合成

上記の選定した老人斑、神経原線維変化、 α -シヌクレイン凝集体に特異的に結合する化合物にユニバーサル試薬を結合させてフッ素 MR 画像化するための良質なプローブを合成する。

3-3. モデル動物を用いてフッ素 MR 画像法による脳内異常蛋白の画像化試験

滋賀医科大学動物実験委員会の承認を得て、遺伝子改変モデルマウスを用いて、老人斑と神経原線維変化の画像化試験を実施する。老人斑を形成するモデルとして、Jackson 研究所から導入して繁殖させた APP/PS1 のダブルトランスジェニックマウスを用いる。また、神経原線維変化の蓄積が認められるモデルマウスとして、タコニック (米国) が販売している P301L 変異型ヒトタウ遺伝子改変マウス (JNPL3 マウス) あるいは rTg4510 マウスを用いる。

実験の概要は以下の通りである。

1. モデルマウスにプローブを投与する。
2. 自作の 19F-MR 画像化用サーフェスコイルにマウスを固定し、実験動物用高磁場MR画像装置で 19F-MR 信号を測定する。
3. 得られたデータから専用ソフトウェアを用いて 19F-MR 画像を構築する。
4. MR 測定終了後のマウスから脳を摘出し、老人斑あるいは神経原線維変化へのプローブの集積を蛍光顕微鏡観察により評価する。19F-MR 信号の画像化測定には、これまでに実績のあるケミカルシフトイメージング法を採用する。

フッ素MR画像は、分担研究者である遠山と連携研究者の MR 医学研究部門 (旧 MR 医学研究センター) の森川茂廣教授が共同で行う。

3-4. 予定通りに進まなかった場合の対処方法

老人斑に特異的に結合する化合物はすでに入手済みで、神経原線維変化に特異的に結合する候補化合物も複数個選定しており (Shiga-T シリーズと呼ぶ)、 α -シヌクレイン凝集体についても同様の方法でリガンドを見いだせると考えている。もし、予定通りに進まなかった場合は、PET リガンドとして論文発表されたリガンドから、放射性標識前の化合物を合成して、上記方法で確認を行う。

4. 研究成果

4-1. アルツハイマー病でみられる老人斑のフッ素 MR 画像化試薬 (アミロイドイメージング)

老人斑の主成分は β -アミロイドペプチド (A β) 凝集体であり、老人斑の画像化をアミロイドイメージングという。我々はフッ素 MR 画像用のアミロイドイメージング試薬として、すでに Shiga-X22 と Shiga-Y5 を国際学術誌に発表している。本研究では、我々が新規に合成してライブラリー化している Shiga-Y 系化合物を *in vitro* および培養細胞を用いたアッセイ系で網羅的にスクリーニングし、その結果を国際学術誌に発表した (6)。その中からひとつの化合物を選び、ユニバーサル試薬を結合した Shiga-Y25 を合成し、アルツハイマー病の遺伝子改変マウスの尾静脈から投与して、フッ素 MR 画像法で老人斑の画像化に成功した (図 2)。その成果を国際学術

誌に論文発表した (4)。また、Shiga-Y 系化合物の合成方法やその構造と老人斑への結合の関係をまとめて国際学術誌に論文発表した (5)。これらの成果は、米国ワシントン DC で開催されたアルツハイマー病国際会議 2015、米国ホノルル市で開催された国際分子イメージング学会 2015、カナダトロント市で開催された国際分子イメージング学会 2016 の国際学会および国内の第 38 回日本神経科学大会、第 10 回日本分子イメージング学会総会、第 39 回神経科学大会で発表した。

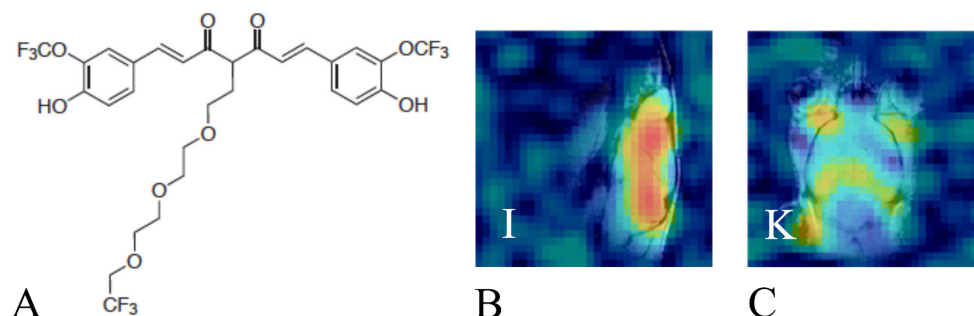


図 2. Shiga-Y25 の構造式 (A) とルツハイマー病の遺伝子改変マウスのフッ素 MR 画像 (B, C)。

4-2. タウオパチーでみられる神経線維変化のフッ素 MR 画像化試薬 (タウイメージング)

タウオパチーでみられる神経原線維変化の主成分は異常にリン酸化されたタウ凝集体である。これまでに合成した試薬の中から神経原線維変化に特異的に結合する試薬をスクリーニングするとともに、PET 画像でのタウイメージング試薬を参考に新規合成を行い検討した。その結果、神経原線維変化に特異的に結合する化合物として Shiga-X34 を新規合成した。ついで Shiga-X34 にユニバーサル試薬を結合させた化合物 Shiga-X35 を合成した。Shiga-X35 を麻酔下のタウ遺伝子改変マウス (rTg4510 マウス) と野生型マウスに尾静脈から投与し、7テスラ MRI 装置 (Agilent) を用いてマウス頭部の MRI を測定した。フッ素 MRI 画像を比較すると、野生型マウス (Wild-type) では、ほとんど信号は検出されなかったが、rTg4510 マウスでは野生型マウスに比べて頭部に強い MR 信号が検出された (図 3)。これはフッ素 MR 画像による世界ではじめてのタウイメージングである。これらの化合物を特許出願 (特願 2017-046350) するとともに国際学術誌に論文発表した (2)。これらの成果をイギリスロンドン市で開催された国際アルツハイマー病会議 2017、京都で開催された第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議で発表するとともに、国内の第 12 回日本分子イメージング学会、第 36 回日本認知症学会総会、第 44 回日本脳科学学会総会で発表した。

一方、アミロイドイメージング試薬として発表した Shiga-Y5 を APP/PS1 マウスと rTg4510 マウスに投与して治療効果のみたところ、APP/PS1 マウスには効果がみられたが、rTg4510 マウスに対する治療効果はみられなかった。このことは、Shiga-Y5 はアミロイド病変に特異的に作用することを示している。この成果を国際学術誌に論文発表 (1) するとともに、第 45 回日本脳科学学会で発表した。

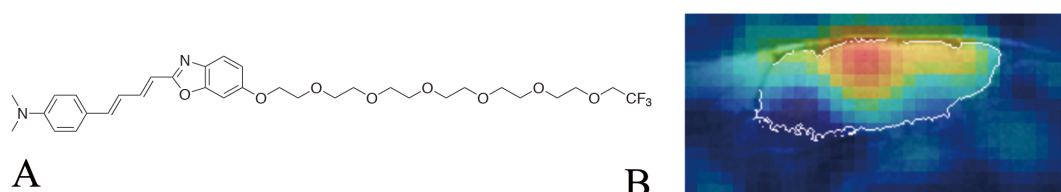


図 3. Shiga-X35 の構造 (A) と rTg4510 マウスに投与して撮影したフッ素 MR 画像 (B)。

4-3. レビー小体型認知症およびパーキンソン病でみられる α -シヌクレイン凝集体のフッ素 MR 画像化試薬

研究期間内に α -シヌクレイン凝集体に特異的に結合する化合物の発見、合成はできなかった。そこで、PET 画像法でパーキンソン病に用いられるフルオロドーパをラット尾静脈から投与して、フッ素 MR 画像法を試みた。その結果、黒質から線条体に投射するドパミン神経機能をフッ素画像法で検出することに成功し、国際学術誌に論文発表した (3)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- (1) Yanagisawa D, Hamezah HS, Durani LW, Taguchi H, Tooyama I: Study of tau pathology in male rTg4510 mice fed with a curcumin derivative Shiga-Y5. PLoS One. 13(12): e0208440, 2018 (doi: 10.1371/journal.pone.0208440)
- (2) Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H, Morikawa S, Kato T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I: Fluorine-19 magnetic resonance imaging probe for the detection of tau pathology in female rTg4510 mice. J Neurosci Res.96: 841-851, 2018 (doi: 10.1002/jnr.24188).
- (3) Yanagisawa D, Oda K, Inden M, Morikawa S, Inubushi T, Taniguchi T, Hijioka M, Kitamura Y, Tooyama I: Fluorodopa is a promising fluorine-19 MRI probe for evaluating striatal dopaminergic function in a rat model of Parkinson's disease. J Neurosci Res 95:1458-1494, 2017 (doi: 10.1002/jnr.23983).
- (4) Tooyama I, Yanagisawa D, Taguchi H, Kato T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Ibrahim NF, Inubushi T, Morikawa S: Amyloid imaging using fluorine-19 magnetic resonance imaging (19F-MRI). Ageing Research Reviews 30: 85-94, 2016 (doi: 10.1016/j.arr.2015.12.008)
- (5) Taguchi H, Yanagisawa D, Morikawa S, Hirao K, Shirai N, Tooyama I: Synthesis and Tautomerism of Curcumin Derivatives and Related Compounds. Australian Journal of Chemistry 68: 224-229, 2015 (doi: 10.1097/NEN.0b013e3181f4a90).
- (6) Yanagisawa D, Taguchi H, Morikawa S, Kato T, Hirao K, Shirai N, Tooyama I: Novel curcumin derivatives as potent inhibitors of amyloid β aggregation. Biochem Biophys Report 4: 357-368, 2015 (doi: 10.1016/j.bbrep.2015.10.009) .

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 遠山育夫、柳沢大治郎、田口弘康 : F-methyl-curcumin-1 (Shiga-Y5) はアルツハイマー病の画像診断や治療の候補化合物である 第 45 回日本脳科学会、2018 年
- (2) D Yanagisawa, H Taguchi, S Morikawa, I Tooyama : Fluorine-19 magnetic resonance imaging to detect tau pathology in rTg4510 mice. 第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議、2018 年
- (3) 柳沢大治郎、田口弘康、森川茂廣、遠山育夫 : フッ素 MRI によるタウ病変のイメージング 第 36 回日本認知症学会総会 2017 年
- (4) I Tooyama, D Yanagisawa, H Taguchi : Application of double MR imaging for analysis of multiple pathological proteins in the brain of transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 第 44 回日本脳科学会総会 2017 年
- (5) D Yanagisawa, NF Ibrahim, H Taguchi, S Morikawa, I Tooyama: In vivo detection of tau pathology by fluorine-19 MR imaging in a mouse model of tauopathy. 第 12 回日本分子イメージング学会 2017 年

- (6) D Yanagisawa, NF Ibrahim, H Taguchi, S Morikawa, I Tooyama : In vivo detection of tau pathology by fluorine-19 MR imaging in a mouse model of tauopathy. アルツハイマー病国際学会 2017 2017年
- (7) 柳沢大治郎、Nor Faizah Ibrahim、田口弘康、遠山育夫 : フッ素 MR 画像法による A β オリゴマーの検出。第 39 回神経科学大会 2016 年
- (8) I Tooyama, D Yanagisawa, H Taguchi, T Kato, K Hirao, N Shirai, Ti Sogabe, S Morikawa: Application of double MR imaging to detect amyloid oligomers in the brain of APP/PS1 transgenic model mice. アルツハイマー病国際学会 2016 2016 年
- (9) 柳沢大治郎、Nor Faeizah Ibrahim、田口弘康、森川茂廣、遠山育夫 : フッ素 MRI を利用した A β オリゴマーの画像化法の開発。第 10 回日本分子イメージング学会 2015 年
- (10) 柳沢大治郎、Nor Faeizah Ibrahim、Lina Wati Durani、Hamizah Shahirah Hamezah、田口弘康、遠山育夫: Effect of novel curcumin derivatives on amyloid aggregation and the cell toxicity. 第 38 回日本神経科学大会. 2015 年
- (11) I Tooyama, D Yanagisawa, H Taguchi, NF Ibrahim, LW Durani, HS Hamezah, K Hirao, N Shirai, T Sogabe, S Morikawa: Styrylbenzoxazole and curcumin derivatives that have preferred features of a fluorine-19 MRI probe for amyloid imaging. 国際分子イメージング学会 2015 2015 年
- (12) D Yanagisawa, H Taguchi, S Morikawa, K Hirao, N Shirai, I Tooyama: Effects of Novel Curcumin Derivative with C-4 Substituent on Cognitive Impairment and Amyloid Deposition in Appsw/PS1dE9 Mice. アルツハイマー病国際学会 2015 2015 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 神経難病の画像診断薬

発明者 : 遠山育夫、田口弘康ほか

権利者 : 滋賀医科大学、滋賀県、大塚製薬

種類 : 特許出願

番号 : 2017-046350

出願年 : 2017 年 3 月 10 日

国内外の別 : 国内および国外

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 遠山 育夫

ローマ字氏名 : Ikuo Tooyama

所属研究機関名 : 滋賀医科大学

部局名 : 神経難病研究センター

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 20207533

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 森川 茂廣

ローマ字氏名 : Shigehiro Morikawa