

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670524

研究課題名(和文) シヌクレイン蛋白選択的PETプローブの探索研究

研究課題名(英文) Development of alpha-synuclein selective PET probe

研究代表者

岡村 信行 (OKAMURA, Nobuyuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40361076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：シヌクレイン蛋白の沈着物を非侵襲的に検出することは、パーキンソン病を正確に診断し、進行を評価するのに有用と考えられる。シヌクレイン蛋白に対する感度、選択性に優れたPETプローブを開発するため、我々は約160化合物のスクリーニングを実施し、シヌクレイン蛋白線維に対する親和性を有する複数の化合物を発見した。特に化合物Cはシヌクレイン蛋白線維への結合親和性が高く、パーキンソン病患者の中脳切片におけるレビー小体を選択的に結合した。本化合物はマウスへの静脈内投与によって、血液脳関門透過性が確認できたことから、シヌクレイン蛋白を検出するPETプローブの候補化合物であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Non-invasive detection of  $\alpha$ -synuclein deposits would be useful to diagnose Parkinson's diseases accurately as well as to track disease progression. In order to develop a sensitive and selective  $\alpha$ -synuclein PET probe, we screened around 160 compounds and found several compounds which show high binding affinity to  $\alpha$ -synuclein fibrils. Especially, compound C binds with high affinity to  $\alpha$ -synuclein fibrils. Autoradiographic analyses showed that this compound preferentially bound to Lewy bodies in the midbrain sections from patients with Parkinson's disease. Intravenous administration of this compound further demonstrated sufficient blood-brain barrier permeability in mice. These findings suggest that [ $^{18}$ F]compound C is a promising candidate for PET  $\alpha$ -synuclein imaging probes.

研究分野：薬理学

キーワード：シヌクレイン パーキンソン病 PET バイオマーカー

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は黒質のドパミン作動性神経細胞の変性・脱落を特徴とする疾患であり、病理組織学的には  $\alpha$  シヌクレイン蛋白を主要構成成分とするレビー小体の沈着を認める。 $\alpha$  シヌクレイン蛋白はその凝集の過程で毒性を獲得し、神経変性の要因となることから、 $\alpha$  シヌクレイン蛋白の蓄積や凝集過程の制御をめざした新たな治療薬開発が進められている。このような治療薬の有効性評価にあたっては、 $\alpha$  シヌクレイン蛋白の脳内蓄積量を高感度かつ正確にモニタリングできるバイオマーカーが必要とされる。

我々はアミロイド PET プローブ  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  を独自に開発し (Kudo et al. J Nucl Med 2007)、本プローブがアミロイド  $\beta$  蛋白に加えて  $\alpha$  シヌクレイン蛋白を検出する能力を有することを見出した (Fodero-Tavoletti et al. Eur J Pharmacol 2009)。 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  を用いて、 $\alpha$  シヌクレインノパチーの一疾患である多系統萎縮症の患者で、同蛋白の生体計測が可能であることをこれまでに報告した (Kikuchi et al. Brain 2010)。しかしながら本プローブのレビー小体検出感度は不足しており、新たな PET プローブの開発が望まれる。

### 2. 研究の目的

レビー小体を検出可能な新規 PET プローブの開発を目標として、プローブ候補化合物の結合親和性を評価し、さらに結合選択性に優れた新たなプローブ候補化合物の探索を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 合成蛋白線維を用いた *in vitro* 結合試験  
Thioflavin T あるいはその代替となる蛍光プローブ (独自開発) を用いて、試験化合物との結合阻害実験を行い、 $\alpha$  シヌクレイン蛋白に対して結合親和性が高い化合物を探索した。さらに Cpd.C を  $^{18}\text{F}$  で標識し、 $\alpha$  シヌクレイン線維に対する Kd 値を測定した。

#### (2) 病理組織染色

蛍光化合物について、パーキンソン病の患者脳でみられるレビー小体との結合の有無を蛍光顕微鏡により評価した。

#### (3) オートラジオグラフィーによる結合選択性の評価

パーキンソン病患者の脳標本を用いたオートラジオグラフィーを実施し、トレーサー濃度での化合物のレビー小体との結合性を評価した。

#### (4) 脳移行性の評価

正常マウスの尾静脈よりプローブ化合物を投与し、化合物の脳移行性について小動物用 PET で評価した。

### 4. 研究成果

(1) 合成蛋白線維を用いた *in vitro* 結合試験  
被検化合物と蛍光波長が重ならない  $\beta$  シート結合性化合物を用いて、競合結合試験により化合物の 50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) を求めた。約 160 化合物の  $\alpha$  シヌクレイン蛋白線維との結合親和性を評価した結果、 $\text{IC}_{50}$  が 250 nM を下回る化合物を複数確認した。これらの化合物の  $\alpha$  シヌクレイン蛋白線維との結合親和性は、BF-227 ( $\text{IC}_{50} = 547$  nM) を大きく上回った。

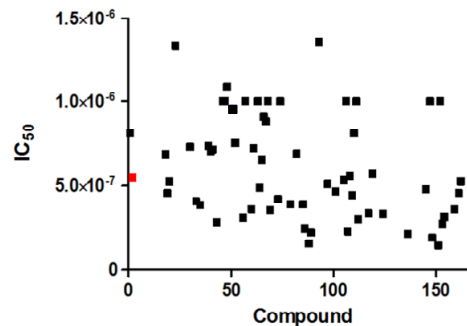


図 1: 競合結合試験で測定した 50% 結合阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) (赤点: BF-227 の  $\text{IC}_{50}$  値)

スクリーニングの結果、 $\alpha$  シヌクレイン蛋白線維への結合性を有すると考えられた Cpd.C を  $^{18}\text{F}$  で標識し、 $\alpha$  シヌクレイン蛋白線維との結合親和性を追加評価した。その結果、Cpd.C の Kd は 21.6 nM であり、過去に報告されているプローブ候補化合物を上回る値が得られた。

#### (2) 病理組織染色

上記スクリーニングにて  $\alpha$  シヌクレイン蛋白に対する結合親和性を示した化合物の中から、自家蛍光を有する化合物を用いて病理組織染色を実施した。レビー小体型認知症患者、多系統萎縮症患者の脳切片で染色を行った結果、レビー小体型認知症患者脳切片のレビー小体、多系統萎縮症の患者脳切片のグリア細胞質封入体が被検化合物 (Cpd.C) によって明瞭に染色された。

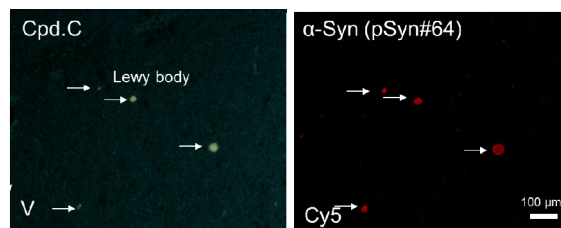


図 2: Cpd.C によるレビー小体型認知症患者脳切片の染色像 (矢印: レビー小体)

#### (3) オートラジオグラフィーによる結合選択性の評価

パーキンソン病患者の中脳切片を用いて

[<sup>18</sup>F]Cpd.C でオートラジオグラフィーを実施した。その結果、レビー小体が密に沈着する黒質付近において、プローブの特異的な結合像が確認された。

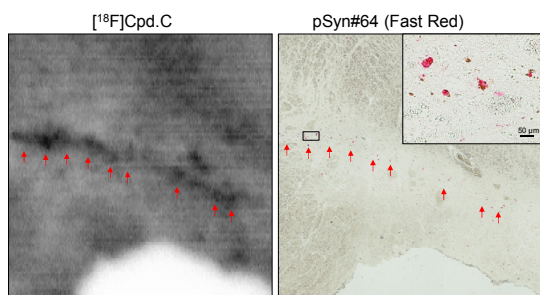


図3：[<sup>18</sup>F]Cpd.C によるパーキンソン病中脳切片のオートラジオグラフィー像（左）と  $\alpha$  シヌクレイン蛋白免疫染色像（右）

#### (4) 脳移行性の評価

[<sup>18</sup>F]Cpd.C の脳血液関門透過性を調べるため、正常マウスに静脈内投与したところ、図4に示すように投与2分後の段階で脳へのトレーサーの移行が観察された。

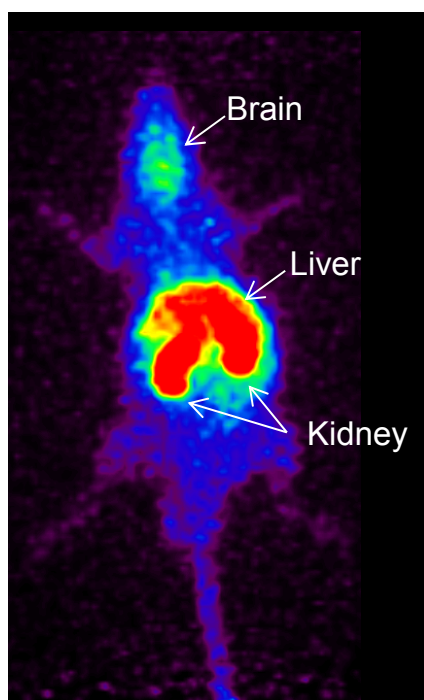


図4：[<sup>18</sup>F]Cpd.C を静脈内投与2分後のマウスPET画像

以上の結果から、ライブラリー化合物の中から  $\alpha$  シヌクレイン蛋白線維に対して結合親和性に優れた化合物 (Cpd.C) を見出すことができた。Cpd.C は  $\alpha$  シヌクレイン蛋白への結合性と脳血液関門透過性を兼ね備えており、 $\alpha$  シヌクレイン蛋白を生体画像化するためのPETプローブの有力候補であると考えられた。今後、 $\alpha$  シヌクレイン蛋白が自然沈着するトランスジェニック動物を用いて、in vivo での蛋白検出性能を評価し、良好な結果が得ら

れば、ヒトでの探索的臨床研究を行いたいと考えている。

$\alpha$  シヌクレイン蛋白を選択的に検出するPETプローブを実用化できれば、同蛋白の蓄積と神経変性、臨床症候との関係を個々の症例で詳細に検討することができ、パーキンソン病やレビー小体型認知症の病態理解に大いに役立つであろう。また同蛋白を標的とした治療と連動することで、神経変性の軽微な発症前段階で病変を見出し、予防的治療に導くこともできる。今後の研究が進展することに期待したい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- 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, Inami A, Yoshikawa T, Tago T, Funaki Y, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y. [<sup>18</sup>F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 査読有 2015; 42: 1052-1061. DOI: 10.1007/s00259-015-3035-4
- ② Okamura N, Harada R, Furumoto S, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Tau PET imaging in Alzheimer's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 査読有 2014; 14: 500. DOI: 10.1007/s11910-014-0500-6
- ③ Okamura N, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Harada R, Yates P, Pejoska S, Kudo Y, Masters CL, Yanai K, Rowe CC, Villemagne VL. Noninvasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using <sup>18</sup>F-THK5105 PET. *Brain*. 査読有 2014; 137: 1762-1771. DOI: 10.1093/brain/awu064
- ④ Villemagne VL, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Hodges J, Harada R, Yates P, Piguet O, Pejoska S, Doré 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*. 査読有 2014; 41: 816-826. DOI: 10.1007/s00259-013-2681-7.
- ⑤ Kaneta T, Okamura N, Arai A, Takanami K, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Takahashi S, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Analysis of early phase [<sup>11</sup>C]BF-227 PET, and its application for anatomical standardization of late-phase images for 3D-SSP analysis. *Jpn J Radiol*. 査読有 2014; 32: 138-144.

- DOI: 10.1007/s11604-013-0276-7.
- ⑥ 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*. 査読有 2014; 57: 18-24. DOI: 10.1002/jlcr.3133.
- ⑦ Harada R, Okamura N, Furumoto S, Yoshikawa T, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Use of a benzimidazole derivative BF-188 in fluorescence multispectral imaging for selective visualization of tau protein fibrils in the Alzheimer's disease brain. *Mol Imaging Biol*. 査読有 2014; 16: 19-27. DOI: 10.1007/s11307-013-0667-2.
- ⑧ Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Yoshikawa T, Fodero-Tavoletti M, Mulligan RS, Villemagne VL, Akatsu H, Yamamoto T, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y. Novel <sup>18</sup>F-labeled arylquinoline derivatives for non-invasive imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *J Nucl Med*. 査読有 2013; 54: 1420-1427. DOI: 10.2967/jnumed.112.117341.
- ⑨ 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 <sup>18</sup>F-Labeled BF-227 Derivative as a Potential Radioligand for Imaging Dense Amyloid Plaques by Positron Emission Tomography. *Mol Imaging Biol*. 査読有 2013; 15: 497-506. DOI: 10.1007/s11307-012-0608-5.
- ⑩ Maruyama M, Shimada H, Suhara T, Shinotoh H, Ji B, Maeda J, Zhang MR, Trojanowski JQ, Lee VM, Ono M, Masamoto K, Takano H, Sahara N, Iwata N, Okamura N, Furumoto S, Kudo Y, Chang Q, Saïdo TC, Takashima A, Lewis J, Jang MK, Aoki I, Ito H, Higuchi M. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron* 査読有 2013; 79: 1094-1108. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.07.037.
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Okamura N. Recent experiences with THK compounds. ADPD Imaging Symposium 2015, March 17, 2015, Nice, France
- ② Okamura N. Tau and Amyloid Imaging. Outlook for the Future. EANM 2014, October 21, 2014, Gothenburg, Sweden
- ③ Okamura N. Tau-Imaging. Results of First-in Human Studies. EANM 2014 Pre-Congress Symposium 6: TAU and Amyloid: From Neuropathology to Neuroimaging, October 18, 2014, Gothenburg, Sweden
- ④ Okamura N. Imaging neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease using novel tau PET tracer. 14th ICGP & 19th JSNP Joint Congress, 2014 年 10 月 3 日、つくば、つくば国際会議場
- ⑤ Okamura N. Advances in Tau PET. SNMMI 2014 Annual Meeting, June 8, 2014, St. Louis, USA
- ⑥ 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 <sup>18</sup>F-THK-5105 and <sup>18</sup>F-THK5117. 第 88 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 21 日 仙台、仙台国際センター
- ⑦ Okamura N. Tau PET imaging in Alzheimer's disease using novel 2-phenylquinoline derivatives. The Fifteenth Conference of Peace through Mind Brain Science, 2014 年 2 月 19 日 浜松、ホテルクラウンパレス浜松
- ⑧ Okamura N, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Ishiki A, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Masters CL, Arai H, Rowe CC, Villemagne VL, Kudo Y. PET imaging of tau deposits in Alzheimer's disease patients using <sup>18</sup>F-THK5105 and <sup>18</sup>F-THK5117. Human Amyloid Imaging 2014, January 16, 2014, Miami, USA
- ⑨ Okamura N, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y. PET imaging of tau pathology in patients with Alzheimer's disease using <sup>18</sup>F-THK5117. Clinical Trials on Alzheimer's Disease (CtaD) 2013, November 14, 2013, San Diego, USA
- ⑩ Okamura N. Imaging tau pathology in Alzheimer's disease using <sup>18</sup>F-THK5105 and <sup>18</sup>F-THK5117 PET. ADNI PPSB meeting, October 26, 2013, Washington DC, USA
- ⑪ Okamura N. Imaging prion and other misfolded protein deposits using PET. Asia Pacific Prion Symposium (APPS), 2013 年 7 月 21 日、長崎、ハウステンボス
- ⑫ Okamura N, Furumoto S, Harada R, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Masters CL, Yanai K, Kudo Y, Rowe CC, Villemagne VL. In vivo detection of tau protein deposits in Alzheimer's disease using <sup>18</sup>F-labeled 2-phenylquinoline derivatives. Alzheimer's Association International Conference 2013, July 13-17, 2013, Boston, USA
- ⑬ Okamura N, Furumoto S, Harada R, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Masters CL, Yanai K, Kudo Y, Rowe CC, Villemagne VL. PET tau imaging in

Alzheimer's disease using novel <sup>18</sup>F-labeled  
2-phenylquinoline derivatives. SNMMI  
Annual Meeting, June 11, 2013, Vancouver,  
Canada

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡村 信行 (OKAMURA, Nobuyuki)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40361076