

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750159

研究課題名(和文) フッ素MRIによるアルツハイマー病脳病変の統合的評価法の開発

研究課題名(英文) Development of fluorine-19 MRI probes to evaluate pathological features in Alzheimers disease

研究代表者

柳沢 大治郎 (Yanagisawa, Daijiro)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教

研究者番号：50581112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の早期診断には老人斑と神経原線維変化を対象とした非侵襲的画像診断法が有用である。本研究では、フッ素MRIを利用したアルツハイマー病画像診断法の実用化のための基礎研究を実施した。まず、フッ素MR信号を高感度に検出するための構造を解明した。この構造は適当なPEG鎖のリンカーにtrifluoroethoxy基を組み合わせたもので、基本骨格にベンゾオキサゾール基を導入することで老人斑画像化用のフッ素MRプローブ、Shiga-X22を見出した。さらに、高感度に検出するための構造はそのまま、基本骨格を改良することで、神経原線維変化に比較的選択的に結合するフッ素MRIプローブを合成した。

研究成果の概要(英文)：Fluorine-19 magnetic resonance imaging (19F MRI) could be a promising approach for imaging amyloid deposition in the brain. However, the required features of a 19F MRI probe for amyloid detection remain unclear. In the present study, we investigated a series of compounds as potent 19F probes that could prevent the reduction in MR signal when bound to amyloid plaques in the brain. We found that 6-(3',6',9',15',18',21'-hepta-oxa-23',23',23'-trifluorotricosanyloxy)-2-(4'-dimethylaminostyryl)benzoxazole (Shiga-X22), which has a trifluoroethoxy group with seven ethylene glycol groups in the PEG chain, showed significant 19F MR signals in the brains of APP^{swe}/PS1^{dE9} double-transgenic mice, but not wild-type mice. This suggested that Shiga-X22 could be a useful 19F MRI probe for amyloid detection. Furthermore, we synthesized new probes for neurofibrillary tangles, which has a trifluoroethoxy group with different number of ethylene glycol groups in the PEG chain.

研究分野：生体医工学・生体材料学

キーワード：アルツハイマー病 フッ素MRI 老人斑 神経原線維変化

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は認知症の半数以上を占める疾患であり、特徴的な病理学的所見は脳内での老人斑と神経原線維変化の形成である。老人斑は発症の10年以上前から出現し、その後に神経原線維変化が形成され、認知症状が出現するという経過をたどる。すなわち、早期診断には老人斑の検出が、発症予測には神経原線維変化の検出が重要視される。そこで近年、アルツハイマー病の病態解明と診断のために、脳内の老人斑と神経原線維変化を非侵襲的にイメージングする方法の研究が進められ、大きな期待が寄せられている。

アルツハイマー病脳病変の非侵襲的な評価法として、最も実用化に近いとされている技術は、陽電子断層撮影法(PET)を用いた老人斑の蓄積評価法である。しかし、今のところそれだけでアルツハイマー病を確実に診断するには至っていない。より確かな診断法を確立するには、アルツハイマー病の脳病変を老人斑だけではなく神経原線維変化を含めて総合的に評価する必要があると思われる。

MRIは有力な非侵襲的画像化技術である。その中でも申請者は次世代機能性MRIとして期待されている技術であるフッ素MRIに着目している。フッ素(^{19}F)は1)核磁気共鳴信号の感度が比較的高い、2)通常は生体内に存在しないため内因性バックグラウンドがない、3)安定同位体で放射性被曝の危険はない、4)天然存在率は100%であり安価という特徴を持つ。つまり、良質なフッ素標識プローブが開発されれば、フッ素MRIは生体内の特定のタンパク質などの異常を検出する技術として非常に魅力的である。

フッ素MRIを利用したアルツハイマー病脳病変の画像化技術は、2005年にHiguchiらによって世界で初めて報告された²。申請者らも高感度化を目指したプローブを独自に開発し(特許出願済:特願2009-45531)アルツハイマー病モデルマウスの老人斑の画像化に成功した。しかし、フッ素MRIによる画像化には高用量のプローブを要するため、安全性に不安がある。実用化のためには、感度を向上させることが必須である。

2. 研究の目的

本研究では、高感度にフッ素を検出するための良質なプローブの特性を解明することで、老人斑の検出感度を向上させる。さらに、これまでに培われたフッ素MR画像化技術を神経原線維変化の画像化技術に応用する。これらの研究を通じて、アルツハイマー病の超早期診断の実用化のための基盤となるデータを得る。

3. 研究の方法

(1)異なるPEG鎖長とフッ素置換基の構造を持つプローブ候補化合物を用いたMR画像化

試験

動物はAPP/PS1遺伝子改変マウス(APP/PS1マウス)を用いた。麻酔下のAPP/PS1マウスの尾静脈より、投与量200mg/kg、投与速度0.2mL/kg/minでプローブを投与した。マウスは投与終了から3時間経過後にペントバルビタール(200mg/kg)にて安楽死させた。自作のフッ素MR画像化用サーフェスコイルにマウスを固定して、7テスラ動物実験用MR装置で頭部におけるフッ素MR信号を測定した。

(2)Shiga-X22を用いたフッ素MRIによる脳内アミロイド蓄積の検出

動物はAPP/PS1遺伝子改変マウス(APP/PS1マウス)を用いた。麻酔下のAPP/PS1マウスの尾静脈より、投与量200mg/kg、投与速度0.2mL/kg/minでShiga-X22を投与した。マウスは投与終了から2, 3, 4, 6時間経過後にペントバルビタール(200mg/kg)にて安楽死させた。自作のフッ素MR画像化用サーフェスコイルにマウスを固定して、7テスラ動物実験用MR装置で頭部におけるフッ素MR信号を測定した。

生きたマウスでの解析では、Shiga-X22の投与終了直後にマウスをサーフェスコイルに固定して、7テスラ動物実験用MR装置で頭部におけるフッ素MR信号を測定した。測定中はペントバルビタールの腹腔内投与により麻酔を維持した。

(3)神経原線維変化用のフッ素MRIプローブのスクリーニング

新たに合成したプローブ候補化合物の神経原線維変化との結合性を、ヒトアルツハイマー病患者脳切片を用いて解析した。脱パラフィン後の切片を100 μM の化合物溶液を浸漬させた。結合性の評価は、神経原線維変化において化合物の蛍光が観察されるか否かを蛍光顕微鏡を用いて観察することにより評価した。

4. 研究成果

(1)異なるPEG鎖長とフッ素置換基の構造を持つプローブ候補化合物によるMRI画像化試験。

図1に合成した化合物の構造を示した。アミロイド結合部位としてのベンゾオキサゾール基とPEG鎖を共通の構造として持つ。そして、異なる長さのPEG鎖を挟んで、フッ素置換基としてtype Aはtrifluoromethyl基(フッ素原子3個)、type Bはhexafluoroisopropoxy基(フッ素原子6個)を、type Cは3',5'-bis(trifluoromethyl)benzylamino基(フッ素原子6個)を持つ。

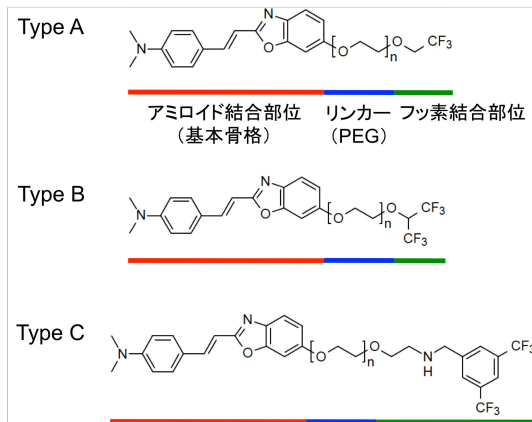


図 1 老人斑検出用の高感度プローブの構造

まず、マウスに投与するための投与液が調製できるか検討した。10% Tween80 または CremophorEL への溶解性を検討したところ、type B の化合物はすべて投与液の調製が困難であった。また、type A と type C においては PEG 鎖長が 3 以下のものでは投与液の調製が困難であった (表 1)。

10% Tween80 または CremophorEL に溶解した化合物を APP/PS1 マウスに投与してフッ素 MRI による画像化試験を実施した (表 1)。得られた画像における信号の強さおよび APP/PS1 マウスと野生型マウスとの強度差を比較した結果、Shiga-X22 が最も良い成績を示した。以下は、Shiga-X22 を用いて詳細な解析を実施した。

Type	Name	Length of PEG (n)	Molecular weight	ClogP	溶解性	MRI
A a single trifluoromethyl group (3 fluorine atoms)	SX26	3	494.50	4.39	X	
	SX29	5	582.61	4.08	Δ	+
	SX31	6	626.66	3.93	Δ	++
	SX22	7	670.71	3.77	○	++
	SX32	8	714.77	3.62	○	死亡
	SX23	9	758.82	3.46	○	死亡
	SX30	11	846.92	3.15	○	-
B hexafluoroisopropoxy derivatives (6 fluorine atoms)	SX27	2	518.45	5.51	X	
	SX24	6	694.66	4.89	X	
	SX25	8	782.76	4.58	X	
C 3',5'-bis(trifluoromethyl)benzylamino derivatives (6 fluorine atoms)	SX16	3	681.66	6.61	X	
	SX17	4	725.72	6.46	○	±
	SX15	5	769.77	6.30	○	+

表 1. MR 画像化試験の結果まとめ

(2) Shiga-X22 を用いたフッ素 MRI による脳内アミロイド蓄積の検出

Shiga-X22 投与終了後 2, 3, 4, 6 時間で安楽死させたマウスの MR 信号を解析した。Shiga-X22 投与 2 時間後では APP/PS1 マウスと野生型マウスとともに強い信号が観察され、両者の間で差は認められなかった。投与 3 時間後では矢状断および水平断の画像で APP/PS1 マウスでは野生型マウスに比べ強い信号が検出された (図 2 と 3)。投与 4 時間後では矢状断の画像では APP/PS1 マウスで強い信号が検出されたが、水平断では差は認められず、投与 6 時間後ではいずれの画像で

も顕著な信号は認められなかった。

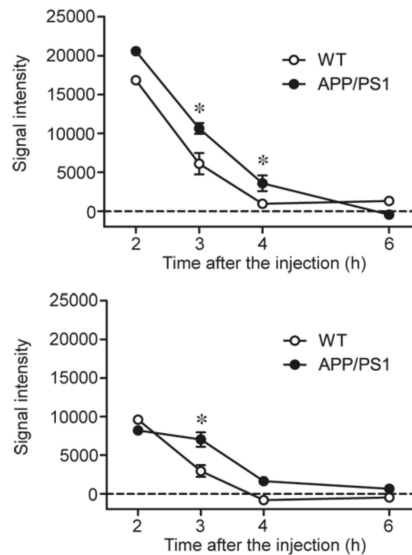


図 2. 矢状断 (上) と水平断 (下) におけるフッ素 MR 画像の信号強度の変化

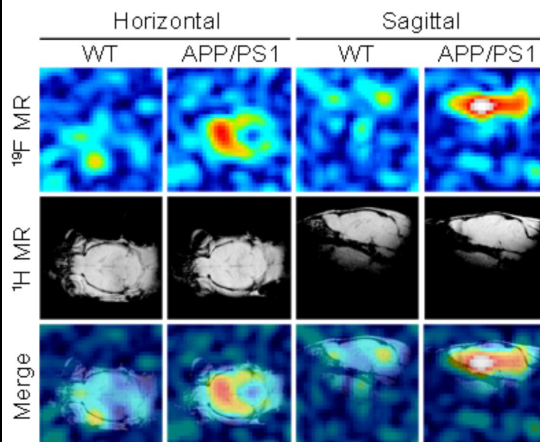


図 3. Shiga-X22 投与 3 時間後に安楽死させたマウスのフッ素 MR 画像

次に、生きたマウスにおける Shiga-X22 による MR 画像化試験を実施した。まず頭部におけるフッ素 NMR 信号を比較した。投与直後は野生型マウスと APP/PS1 マウスともに高いピークが検出された (図 4)。野生型マウスではピークは速やかに消失し、投与 3 時間以降では信号はほとんど検出できなかった。一方、APP/PS1 マウスでは投与 3 時間以降でもピークは検出され、8 時間経過時点でも残存していた。

さらに、1 時間毎にフッ素 MR を測定し、得られた画像を比較した。フッ素 NMR 信号と同様に、Shiga-X22 投与直後は野生型マウスと APP/PS1 マウスともに頭部に強いフッ素 MR 信号が検出された (図 5)。フッ素 MR 信号は野生型マウスでは速やかに消失していったが、APP/PS1 マウスでは投与 2-3 時間以降でも頭部に強いフッ素 MR 信号が検出さ

れた。

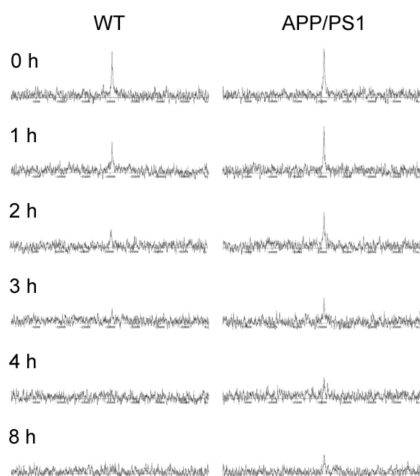


図 4. 頭部におけるフッ素 NMR 信号の比較

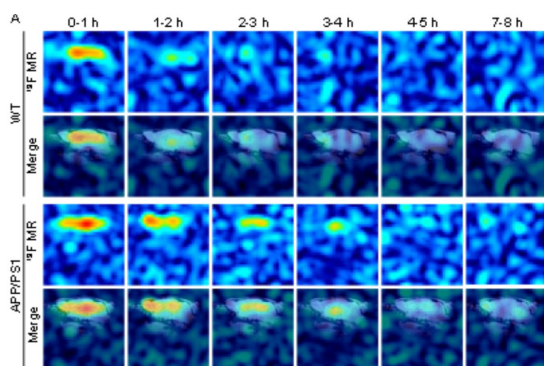


図 5. フッ素 MR 画像の時間経過による変化

(3) 新規フッ素 MRI プローブの神経原線維変化への結合性の解析

神経原線維変化用のプローブ候補として Shiga-T3, 4, 5, 6, 7, 8 を合成した。ヒトアルツハイマー病患者脳切片における神経原線維変化との結合性を解析したところ、いずれの化合物も神経原線維変化において蛍光が観察された。Shiga-T4, 6, 8 については老人斑においても蛍光が観察されたが、Shiga-T3, 5, 7 は神経原線維変化に比較的選択的な結合を示した。

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 4 件)

- (1) 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) (査読あり) DOI: 10.1071/CH14464
- (2) McClure R, Yanagisawa D, Stec D,

Koktysh D, Xhillari D, Jaeger R, Chekmenev E, Tooyama I, Gore JC, Pham W. Inhalable curcumin: offering the potential for translation to imaging and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 44, 283-295 (2015) (査読あり) DOI: 10.3233/JAD-140798

- (3) Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H, Morikawa S, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I. Curcumin derivative with the substitution at C-4 position, but not curcumin, is effective against amyloid pathology in APP/PS1 mice. *Neurobiology of Aging*, 36, 201-210 (2015) (査読あり) DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.041
- (4) Yanagisawa D, Taguchi H, Ibrahim NF, Morikawa S, Shiino A, Inubushi T, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I. Preferred features of a fluorine-19 MRI probe for amyloid detection in the brain. *Journal of Alzheimer's Disease*, 39, 617–31 (2014) (査読あり) DOI: 10.3233/JAD-131025

[学会発表](計 11 件)

- (1) Daijiro Yanagisawa, Hiroyasu Taguchi, Ikuo Tooyama. Shiga-Y5 is a potential diagnostic and therapeutic agent for Alzheimer's disease. 新学術領域脳内環境—恒常性維持機構とその破綻—第 2 回若手研究者によるシンポジウム、広島大学 広仁会館 (広島県・広島市) 2015 年 1 月 8 日
- (2) Daijiro Yanagisawa. Amyloid detection using fluorine-19 MRI in the transgenic mouse model of AD. 18th MNRC International Symposium, 滋賀医科大学 (滋賀県・大津市) 2014 年 11 月 25 日.
- (3) 柳沢大治郎: 高磁場 MR 装置を利用したアルツハイマー病画像診断法の開発. 2014 年度創薬科学フロンティアシンポジウム、京都薬科大学 (京都府・京都市) 2014 年 11 月 23 日
- (4) Daijiro Yanagisawa, Hiroyasu Taguchi, Nor Faeizah Ibrahim, Lina Wati Durani, Shigehiro Morikawa, Koichi Hirao, Nobuaki Shirai, Takayuki Sogabe, Ikuo Tooyama. Novel curcumin derivative with C-4 substituent inhibits amyloid pathology in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice (135.23). Society for Neuroscience's 44th Annual Meeting, ワシントン DC (アメリカ合衆国) 2014 年 11 月 16 日.
- (5) 柳沢大治郎、遠山育夫、Nor Faeizah Ibrahim、田口弘康: クルクミン誘導体による A β 凝集抑制効果と A β による細胞障害軽減効果の解析. 第 11 回認知症サブリ

- メント研究会、AP 品川（東京都）2014年10月4日
- (6) 柳沢大治郎、Nor Faeizah Ibrahim、田口弘康、遠山育夫：アルツハイマー病治療効果を示す新規クルクミン誘導体の開発（O2-I-4-1）第37回日本神経科学大会、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）2014年9月12日
- (7) 柳沢大治郎、田口弘康、森川茂廣、椎野顯彦、犬伏俊郎、遠山育夫：高磁場 MR装置を利用したフッ素 MRI アミロイドイメージングのための styrylbenzoxazole 誘導体の開発（O-18）第9回日本分子イメージング学会学術集会、千里ライフサイエンスセンター（大阪府・豊中市）2014年5月23日
- (8) 柳沢大治郎、Nor Faeizah Ibrahim、Lina Wati Durani、田口弘康、遠山育夫：アルツハイマー病遺伝子改変マウスにおける新規クルクミン誘導体の治療効果の解析（73）第33回日本認知症学会、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）2014年11月29-30日
- (9) 柳沢大治郎、田口弘康、森川茂廣、椎野顯彦、犬伏俊郎、遠山育夫：高磁場 MR装置を利用したフッ素 MRI アミロイドイメージングのための styrylbenzoxazole 誘導体の開発（P-77）第9回日本分子イメージング学会学術集会、千里ライフサイエンスセンター（大阪府・豊中市）2014年5月22日
- (10) Daijiro Yanagisawa, Hiroyasu Taguchi, Shigehiro Morikawa, Akihiko Shiino, Toshiro Inubushi, Nor Faeizah Ibrahim, Koichi Hirao, Nobuaki Shirai, Takayuki Sogabe, Ikuo Tooyama. Required features of a fluorine-19 MRI probe for amyloid detection in the brain (P1-260). Alzheimer's Association 2013 International Conference on Alzheimer's Disease, ボストン（アメリカ合衆国）2013年7月14日.
- (11) 柳沢大治郎、田口弘康、森川茂廣、椎野顯彦、犬伏俊郎、Ibrahim Nor Faeizah、遠山育夫：アルツハイマー病画像診断を目的とした 19F MRI による脳内アミロイド斑の検出（その2）（P3-1-204）第36回日本神経科学大会、国立京都国際会館（京都府・京都市）2013年6月20-23日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：神経難病の MR 画像診断薬
発明者：遠山育夫、田口弘康、柳沢大治郎
権利者：滋賀医科大学
種類：特許出願
番号：特願 2013-202531

出願年月日：平成 25 年 9 月 27 日

国内外の別：国内

名称：神経難病の MR 画像診断薬
発明者：遠山育夫、田口弘康、柳沢大治郎
権利者：滋賀医科大学
種類：特許出願
番号：PCT/JP2014/50005
出願年月日：平成 26 年 1 月 6 日
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ等
<http://ben.shiga-med.ac.jp/~hqmnran/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳沢 大治郎（Yanagisawa Daijiro）
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・助教
研究者番号：50581112