

令和元年6月4日現在

機関番号：31305  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2016～2018  
課題番号：16K15570  
研究課題名(和文)コンフォメーション特異的PETプローブの探索

研究課題名(英文) Search of conformation-specific PET probe

## 研究代表者

岡村 信行 (OKAMURA, Nobuyuki)

東北医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：40361076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミスフォールディング蛋白の蓄積を生体でモニタリングするためのPETプローブを開発するため、所有するライブラリー化合物の結合性と薬物動態を評価し、レビー小体を明瞭に染色可能な新規化合物群を見出した。候補化合物の一つ(化合物365)はマウスにおいて優れた脳血液関門透過性を示した。ヒト脳組織切片を用いてオートラジオグラフィーを実施した結果、シヌクレインが高密度に沈着する脳切片において<sup>18</sup>F標識化合物の強い結合を認めたが、シヌクレイン選択的プローブとしては結合選択性が不十分であった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

プローブが実用化され、パーキンソン病などのミスフォールディングの脳内蓄積を生体で非侵襲的に計測できれば、多様な神経変性疾患の早期診断のためのスクリーニング法となる。また新たな治療評価系としても活用でき新規治療薬開発と連動させることによって疾患の撲滅へ向けた第一歩となる。

研究成果の概要(英文)：To develop a PET probe for in vivo monitoring of misfolded protein accumulation, we tested the binding and pharmacokinetic properties of our library compounds and found a series of novel compound that can clearly stain Lewy bodies. A candidate compound (Cpd.365) showed excellent blood-brain barrier permeability in mice. Autoradiography using postmortem human brain samples showed strong binding of <sup>18</sup>F-labeled compound to  $\alpha$ -synuclein rich brain sections, although the binding selectivity of this compound was insufficient for selective  $\alpha$ -synuclein probe.

研究分野：薬理学

キーワード：分子イメージング シヌクレイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病、パーキンソン病、前頭側頭葉変性症、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病などの多くの神経変性疾患の脳内では、遺伝子異常などによってミスフォールディングを起こしやすい異常タンパク質が産生され、神経細胞やグリア細胞等に蓄積する。このようなミスフォールディング病変の形成は神経変性、脳機能障害の誘因になると考えられ、創薬の標的に位置付けられている。

(2) アミロイド 蛋白やタウ蛋白を検出する PET プローブは既に実用化されているが、シヌクレイン、TDP-43、ポリグルタミンなどのタンパク質によって構成されたミスフォールディング病変を選択的に検出可能な PET プローブは未だ実用化されていない。これらの蛋白の脳内蓄積量とその空間分布を個別に計測できれば、様々な神経変性疾患の早期診断・鑑別診断の精度を飛躍的に向上させることが可能となる。さらにミスフォールディング病変の脳内蓄積量を指標とした新しい薬効評価系として、新規薬剤の開発や臨床治験にも応用できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、シヌクレイン、TDP-43、ポリグルタミンなどの多様なタンパク質ミスフォールディング病変を個別に検出可能な新しい PET プローブ化合物の開発をめざした。申請者が保有する化合物ライブラリーの中から、シヌクレイン、TDP-43、ポリグルタミンなどのミスフォールディング病変への結合親和性、選択性、体内動態に優れたリード化合物の探索を行った。

### 3. 研究の方法

(1) シヌクレイン蛋白線維、アミロイド 蛋白線維との結合性が確認されている化合物 BF-180 の <sup>125</sup>I 標識体を合成し、研究室内で保有するライブラリー化合物のシヌクレイン蛋白線維に対する結合親和性を結合阻害実験によって評価した。

(2) 被検化合物の自己蛍光を利用して、パーキンソン病、レビー小体型認知症、前頭側頭葉変性症等の脳切片に被検化合物溶液 (100 μM) を滴下し、ミスフォールディング蛋白病変に対する被検化合物の結合の有無を蛍光顕微鏡下で評価した。

(3) 被検化合物の <sup>18</sup>F 標識体を用いて、健常人および AD 患者の前頭葉脳切片、レビー小体型認知症 (DLB) 患者の帯状回、扁桃体脳切片においてオートラジオグラフィ実験を実施し、化合物のミスフォールディング蛋白病変への結合性を評価した。

(4) 被検化合物の <sup>18</sup>F 標識体を正常 (ICR) マウスの尾静脈から静脈内投与し、投与 2 分、10 分、30 分、60 分および 120 分後に採血および臓器の摘出を行い、化合物の体内動態を計測した。

### 4. 研究成果

(1) 被検化合物のシヌクレイン蛋白線維との結合親和性を評価するため、化合物 BF-180 の <sup>125</sup>I 標識体を合成し、被検化合物との結合競合試験によって結合阻害率を算出した。その結果、計 16 化合物が 60% 以上の結合阻害率を示し、シヌクレイン蛋白線維との結合性を有することが示唆された。

(2) 上記結合実験で高い結合阻害率を示した化合物を中心に、パーキンソン病、レビー小体型認知症、前頭側頭葉変性症、アルツハイマー病の各脳病理組織標本を用いて、化合物自身が発する蛍光を利用して、その結合性を蛍光顕微鏡下で評価した。その結果、図 1 に示すようにパーキンソン病患者の脳切片においてレビー小体を明瞭に染色する新規化合物を複数見出した。化合物による染色像は抗リン酸化 -シヌクレインモノクローナル抗体による免疫染色像と一致していた。一方、前頭側頭葉変性症患者の TDP-43 病変への結合性を示すプローブ候補化合物を見出すことはできなかった。

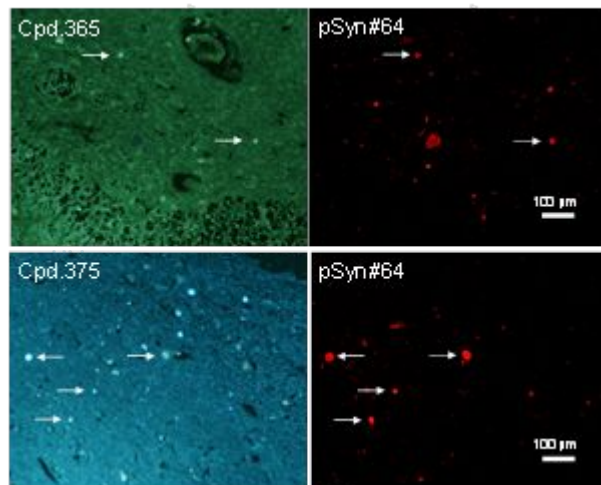


図 1 化合物 365, 375 によるパーキンソン病脳切片レビー小体の染色像 (左) と シヌクレイン免疫染色像 (右)

(3) 蛍光顕微鏡にてレビー小体の染色像が認められ、また上記結合阻害実験において 100%の結合阻害率を示した化合物 Cpd.365 の  $^{18}\text{F}$  標識体を合成して、in vitro オートラジオグラフィーによってナノモル濃度域におけるミスフォールディング病変との結合性を評価した。その結果、レビー小体型認知症患者の扁桃体および帯状回脳切片においてプローブの強い結合が観察された(図2)。これらの脳領域においてはレビー小体の形成を高度に認めたことから、同化合物がナノモル濃度域でレビー小体と結合していると考えられた。しかしながらアルツハイマー病患者前頭葉脳切片では、アミロイド PET プローブ PiB 陽性の老人斑との結合が観察された。また健康人前頭葉脳切片において、白質のミエリン線維との結合を示唆するシグナルも併せて確認されたことから、シヌクレイン PET プローブとしては結合選択性が不十分であると考えられた。

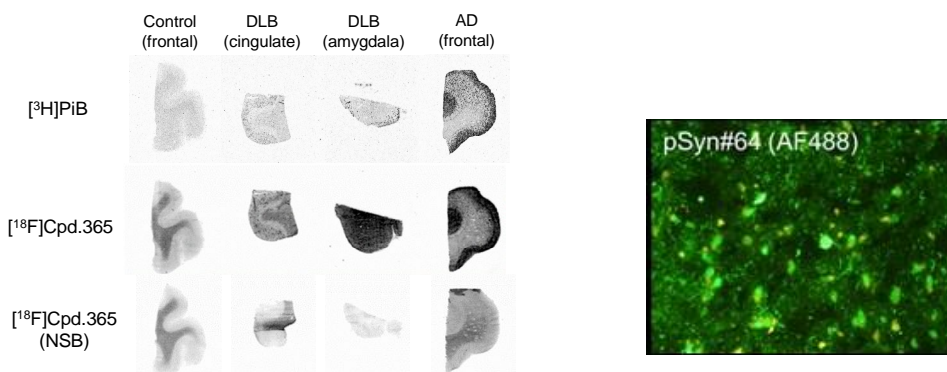


図2  $[^{18}\text{F}]$ Cpd.365、 $[^3\text{H}]$ PiB を用いたオートラジオグラフィー像(左)およびレビー小体型認知症患者扁桃体(amygdala)脳切片におけるシヌクレイン免疫染色像(右)

(4) Cpd.365 の  $^{18}\text{F}$  標識体を正常(ICR)マウスの尾静脈より静脈内投与し、投与2分、10分、30分、60分、120分後の脳内、血中、骨中の放射能濃度を計測した。その結果、Cpd.365 は投与2分後に3 %ID/gを上回る優れた脳内移行性を示し、その後のクリアランスはきわめて良好であった。Cpd.365 の  $^{18}\text{F}$  標識体は脱フッ素によると思われる軽微な骨集積がみられたものの、これまでに実用化されているアミロイド PET プローブやタウ PET プローブと同等の脳内動態を示したことから、生体用プローブとして実用的なレベルにあると考えられた。

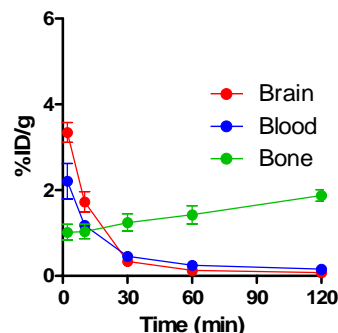


図3  $[^{18}\text{F}]$ Cpd.365 投与後の体内動態

(5) 以上で示したようにレビー小体への高い結合親和性および脳移行性が示唆される新規プローブ候補化合物を見出すことができたものの、シヌクレイン PET プローブとしては結合選択性が不十分であるため、その実用化を断念した。今後、ヒット化合物の最適化を進め、生体用プローブとしての実用化をめざしたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Ishiki A, Harada R, Kai H, Sato N, Totsune T, Tomita N, Watanuki S, Hiraoka K, Ishikawa Y, Funaki Y, Iwata R, Furumoto S, Tashiro M, Sasano H, Kitamoto T, Kudo Y, Yanai K, Furukawa K, Okamura N, Arai H, Neuroimaging-pathological correlations of  $[^{18}\text{F}]$ THK5351 PET in progressive supranuclear palsy, Acta Neuropathol Commun, 査読有、6 巻、2018、53  
DOI:10.1186/s40478-018-0556-7

Harada R, Ishiki A, Kai H, Sato N, Furukawa K, Furumoto S, Tago T, Tomita N, Watanuki S, Hiraoka K, Ishikawa Y, Funaki Y, Nakamura T, Yoshikawa T, Iwata R, Tashiro M, Sasano H, Kitamoto T, Yanai K, Arai H, Kudo Y, Okamura N, Correlations of  $^{18}\text{F}$ -THK5351 PET with post-mortem burden of tau and astrogliosis in Alzheimer's disease, J Nucl Med, 査読有、59 巻、2018、671-674  
DOI:10.2967/jnumed.117.197426

岡村信行、原田龍一、古本祥三、中村正帆、谷内一彦、工藤幸司、アルツハイマー病理を標的とした分子イメージングプローブの開発、日本薬理学雑誌、査読有、150 巻、2017、172-176

〔学会発表〕(計3件)

Okamura N、Toward the development of novel imaging agents for protein misfolding diseases、2018 International Conference on Neurodegenerative Disorders, CGMH、2018年  
岡村信行、原田龍一、Development of PET tracers for imaging amyloid, tau and gliosis、第58回日本核医学会学術集会、2018年  
Okamura N、Novel tracer development and potential application for movement disorders、3<sup>rd</sup> Taiwan International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders、2017年

〔図書〕(計1件)

Okamura N. Neuroimaging Diagnosis for Alzheimer's Disease and Other Dementias. Springer、2017、279

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。