

令和元年6月17日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19872

研究課題名(和文)オートファジー選択的基質p62の蓄積を生体内で画像化する分子プローブの開発

研究課題名(英文)Development of novel PET ligands for p62/SQSTM1

研究代表者

小野 麻衣子(Ono, Maiko)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 脳機能イメージング研究部・研究員(任常)

研究者番号：70595876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー選択的基質p62は、様々な神経変性疾患で形成される異常タンパク質凝集体と共同在するため、p62の蓄積を生体内で画像化できれば、神経変性疾患の疾患横断的病態マーカーが得られる。本研究では、ポジトロン断層撮影(PET)によりp62の蓄積を生体内で非侵襲的に画像化するPETプローブの開発を実施した。開発を行ったp62 PETプローブ候補化合物のうち2種において、分子間相互作用解析および培養細胞を用いた評価でp62への結合が確認された。うち1種の候補化合物では、神経変性疾患モデルマウスを用いた評価で異常タンパク質凝集体蓄積領域への集積が確認され、生体内でのp62への結合性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見いだされたp62 PETプローブ候補化合物は、p62の蓄積を生体内で画像化する分子イメージング技術の創製に寄与し得る。開発を行ったPETプローブはヒトでの応用が可能であり、様々な神経変性疾患の疾患横断的スクリーニングを可能にする新たなツールへの発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：p62/SQSTM1 is a substrate for selective autophagy, and colocalized with abnormal protein aggregates formed in the brain of various neurodegenerative disease. In vivo imaging technology for visualization of p62 accumulation in the living brain provide cross-pathological markers of neurodegenerative disease. In this study, we developed a novel positron emission tomography (PET) imaging ligands for p62. Two of our candidate compounds were confirmed to bind to p62 in biomolecular interaction analysis and a cultured cell-based assay, respectively. Further, one candidate showed accumulation at abnormal protein aggregates in the brain of neurodegenerative disease mouse model, suggesting that this candidate also binds to p62 in vivo. Further investigations of those candidate compounds found in this study will contribute to the creation of useful p62 PET imaging agents.

研究分野：神経科学

キーワード：ポジトロン断層撮影(PET) イメージング オートファジー p62 神経変性疾患 疾患マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

認知症の最大の原因疾患であるアルツハイマー病や、運動障害をもたらすパーキンソン病など多くの神経変性疾患では、初期症状が現れる前から特徴的な異常タンパク質凝集体が脳内に出現する。分子イメージングプローブを用いてこれらの特徴的な病変を生体内で画像化することで、神経変性疾患の発症前診断を可能にする試みが成されてきた。研究代表者らは近年、アルツハイマー病を含むタウオパチーで脳内に蓄積するタウタンパク質を、ポジトロン断層撮影 (PET) により生体内で画像化する PET プローブ PBB3 の開発に成功した (Maruyama, Ono et al., Neuron, 2013)。一方で、タウタンパク質以外のタンパク質を主成分とする病変を形成するパーキンソン病や多系統萎縮症、筋萎縮性側索硬化症や FTLD-U などの神経変性疾患を含めて、疾患横断的に異常タンパク質凝集体の形成を早期に、生体内で検出し得る有用な分子イメージングプローブは開発されていない。

オートファジー選択的基質 p62 は、様々な神経変性疾患脳において形成される異常タンパク質凝集体と共局在する (図 1)。タウタンパク質を主要な構成成分とする凝集体を形成するタウオパチーでは、アルツハイマー病やピック病、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症の特徴的病変に p62 が蓄積する。また、 α シヌクレインを主成分とする凝集体を形成する神経変性疾患ではパーキンソン病や多系統萎縮症のレビー小体や Glial cytoplasmic inclusion に、TDP-43 を主成分とする凝集体を形成する神経変性疾患では FTLD-U や筋萎縮性側索硬化症のユビキチン陽性および TDP-43 陽性封入体にも p62 が存在することが確認されている。このように p62 は、主要構成成分や凝集体形態の異なる多様な異常タンパク質凝集体に共通して存在しており、疾患横断的に異常タンパク質凝集体を検出する分子イメージングプローブのターゲットとなり得る。

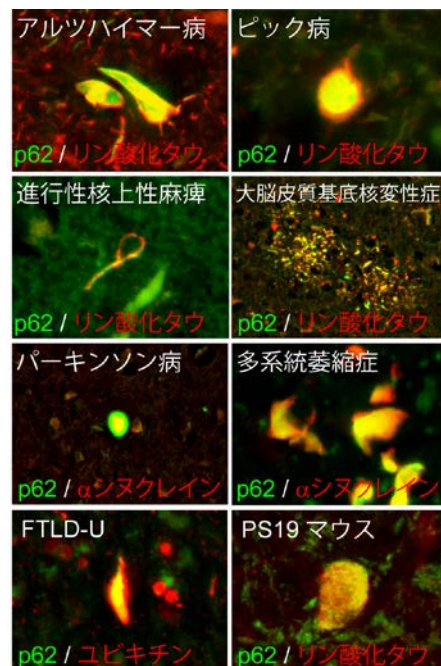


図 1：神経変性疾患患者剖検脳およびタウオパチーモデルマウス (PS19) 脳の異常タンパク質凝集体 (赤) と p62 (緑) の共染色画像

2. 研究の目的

以下の 3 つのステップにより、新規 p62 PET プローブの開発を行う。(1) p62 PET プローブ候補化合物群の構築、(2) 生体外評価系を用いた候補化合物の p62 結合性の検証、(3) モデルマウスを用いた候補化合物の生体内での p62 結合性の評価。これにより、神経変性疾患の疾患横断的スクリーニングを可能にするツールとして、p62 の蓄積を生体内で画像化する分子イメージングプローブの創製につなげる。

3. 研究の方法

(1) p62 PET プローブ候補化合物群の構築

p62 への結合性が予想される既知の化合物を基本構造として複数の誘導体を合成し、候補化合物群を構築する。候補化合物はポジトロン核種を用いてアイソトープ標識する。

(2) 生体外評価系を用いた候補化合物の p62 結合性の検証

分子間相互作用解析により、p62 への良好な結合性を有する候補化合物のスクリーニングを行う。p62 への結合性が示された候補化合物について、培養細胞を用いた p62 阻害効果の検証を行い、p62 と候補化合物の結合性を確認する。さらに、神経変性疾患患者剖検脳および神経変性疾患モデルマウス脳切片を用いて、アイソトープ標識候補化合物の異常タンパク質凝集体への結合を検証する。

(3) モデルマウスを用いた候補化合物の生体内での p62 結合性の評価

神経変性疾患モデルマウスを含む、マウスを対象とした PET イメージングおよびエキソビオオートラジオグラフィにより、候補化合物の動態および生体内での p62 結合性を評価する。

4. 研究成果

(1) p62 PET プローブ候補化合物群の構築

p62 阻害作用が報告されていることから p62 への結合が予想される既知の低分子化合物 (W02013022919A1) の構造をもとに、構成元素や側鎖を変更することで、10 種の新規 p62 PET プローブ候補化合物を合成した。そのうち 3 種の候補化合物において、アイソトープ標識前駆体の合成、およびポジトロン核種 [^{11}C] を用いた標識に成功した。

(2) 生体外評価系を用いた候補化合物の p62 結合性の検証

①分子間相互作用解析による結合性評価

p62 への良好な結合性を有する候補化合物のスクリーニングを分子間相互作用解析により実施した結果、10種の候補化合物のうち2種（p62i-1、p62i-3）において、既知化合物を上回る親和性での p62 への結合が確認された。

②培養細胞を用いた p62 阻害効果の検証

培養細胞で p62 を阻害すると、多層膜構造のオートファゴソームが形成されることが報告されている (Nihira et al., Cancer Sci, 2014)。候補化合物の p62 結合性を神経系培養細胞 Neuro2a を用いて検証した。p62i-1 を添加した Neuro2a では多層膜構造のオートファゴソームの形成が電子顕微鏡を用いた解析で確認され (図2)、候補化合物 p62i-1 の p62 との相互作用が培養細胞を用いた評価においても支持された。

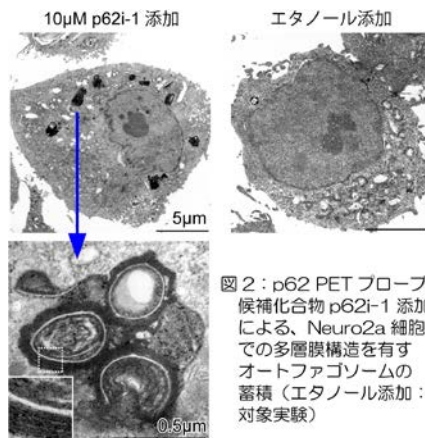


図2：p62 PETプローブ候補化合物 p62i-1 添加による、Neuro2a 細胞での多層膜構造を有すオートファゴソームの蓄積 (エタノール添加：対象実験)

③神経変性疾患患者剖検脳および神経変性疾患モデルマウス脳切片を用いた結合性評価

p62 は様々な神経変性疾患脳において形成される異常タンパク質凝集体と共局在するのみならず、ヒトタウ突然変異を導入したタウオパチーモデルマウスである PS19 マウス脳で形成されるリン酸化タウ凝集体にも共局在することを確認している (図1)。アルツハイマー病患者剖検脳および PS19 マウス脳切片の異常タンパク質凝集体への、ポジトロン核種¹¹C標識 p62i-1、および p62i-3 の結合をインビトロのオートラジオグラフィーで評価したところ、¹¹C p62i-1 は脂溶性の高さから十分なコントラストで特異結合を検出するに至らなかったが、¹¹C p62i-3 はアルツハイマー病患者剖検脳の異常タンパク質凝集体蓄積部位への結合が示唆された。

(3)モデルマウスを用いた候補化合物の生体内での p62 結合性の評価

タウオパチーモデルマウス PS19 を対象とした PET イメージングにより¹¹C p62i-1 および¹¹C p62i-3 のインビボ動態を比較した結果、¹¹C p62i-1 は¹¹C p62i-3 よりも高い適度な脳移行性を示した (図3) が、脳内動態の遅さを一因として、異常タンパク質凝集体蓄積領域への¹¹C p62i-1 の有意な集積を高くコントラストで検出するには至らなかった。

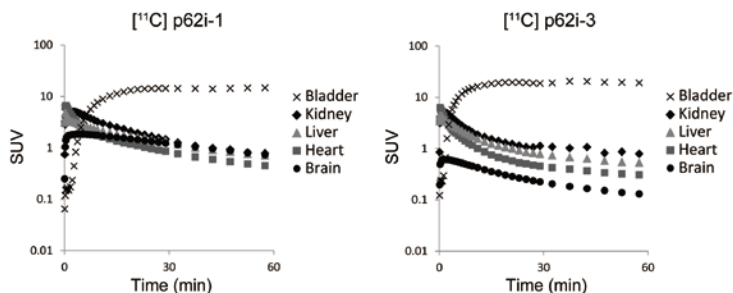


図3：タウオパチーモデルマウス PS19 に¹¹C p62i-1 および¹¹C p62i-3 を投与した後の各臓器へのプローブ分布の経時変化

その一方で、PS19 マウスおよび、PS19 マウスと p62 ノックアウトマウスの掛け合わせマウスを対象としたエキソビボオートラジオグラフィーにより¹¹C p62i-1 および¹¹C p62i-3 の異常タンパク質凝集体蓄積領域への集積を精査した結果、¹¹C p62i-1 の生体内での p62 結合性が示唆された (図4、矢頭)。

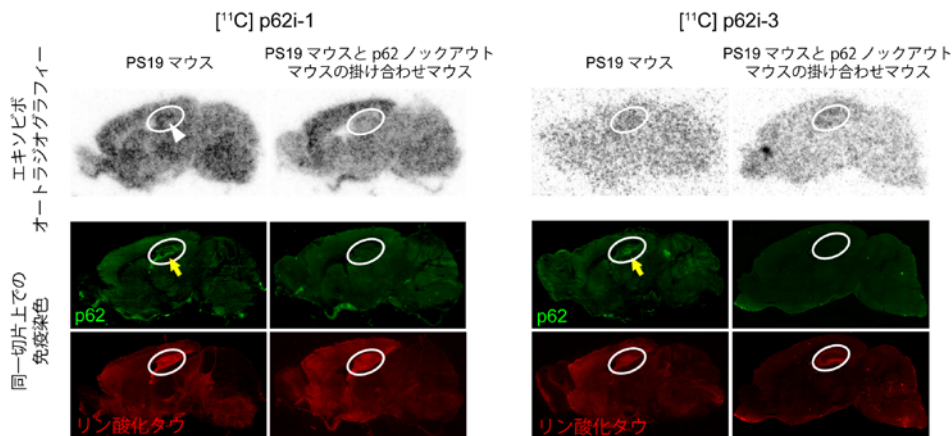


図4：タウオパチーモデルマウス PS19 および、PS19 と p62 ノックアウトマウスの掛け合わせマウスに¹¹C p62i-1 および¹¹C p62i-3 を投与した後の、各脳領域へのプローブ分布を示すエキソビボオートラジオグラフィー像 (上段) と、同一切片での p62 (中段) と異常タンパク質凝集体 (リン酸化タウ、下段) の共染色画像。白丸は異常タンパク質凝集体が多い海馬領域。矢印は異常タンパク質凝集体と共局在する p62。

今後さらなる特性評価の必要があるものの、本結果は新規 p62 PET プローブ候補化合物 p62i-1 が生体内での p62 への結合性を有することを示唆し、p62i-1 は p62 の蓄積を生体内で画像化する分子イメージングプローブの更なる開発段階において有力なリード化合物となる可能性が高いと期待できる。

<引用文献>

- ① Masahiro Maruyama, Hitoshi Shimada, Tetsuya Suhara, Hitoshi Shinotoh, Bin Ji, Jun Maeda, Ming-Rong Zhang, John Q. Trojanowski, Virginia M.-Y. Lee, Maiko Ono, Kazuto Masamoto, Harumasa Takano, Naruhiko Sahara, Nobuhisa Iwata, Nobuyuki Okamura, Shozo Furumoto, Yukitsuka Kudo, Qing Chang, Takaomi C. Saido, Akihiko Takashima, Jada Lewis, Ming-Kuei Jang, Ichio Aoki, Hiroshi Ito and Makoto Higuchi, Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls, *Neuron*, Vol. 79, 2013, 1094-1108
- ② Xiang-qun XIE, Garson David ROODMAN, Kyaw-Zeyar MYINT, Noriyoshi Kurihara, P62-zz chemical inhibitor, W02013022919A1, 2013-02-14
- ③ Kaito Nihira, Yasuhiro Miki, Katsuhiko Ono, Takashi Suzuki, Hironobu Sasano, An inhibition of p62/SQSTM1 caused autophagic cell death of several human carcinoma cells, *Cancer Science*, Vol. 105, 2014, 568-575

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Hitoshi Shinotoh, Hitoshi Shimada, Yasumasa Kokubo, Kenji Tagai, Fumitoshi Niwa, Soichiro Kitamura, Hironobu Endo, Maiko Ono, Yasuyuki Kimura, Shigeki Hirano, Maya Mimuro, Masanori Ichise, Naruhiko Sahara, Ming-Rong Zhang, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi, Tau imaging detects distinctive distribution of tau pathology in ALS/PDC on the Kii Peninsula, *Neurology*, 査読有, Vol. 92, 2019, e136-e147
DOI: 10.1212/WNL.0000000000006736.
- ② Ruiqing Ni, Bin Ji, Maiko Ono, Naruhiko Sahara, Ming-Rong Zhang, Ichio Aoki, Agneta Nordberg, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi, Comparative in-vitro and in-vivo quantifications of pathological tau deposits and their association with neurodegeneration in tauopathy mouse models, *The Journal of Nuclear Medicine*, 査読有, Vol. 59, 2018, 960-966
DOI: 10.2967/jnumed.117.201632.
- ③ Ai Ishikawa, Masaki Tokunaga, Jun Maeda, Takeharu Minamihisamatsu, Masafumi Shimojo, Hiroyuki Takuwa, Maiko Ono, Ruiqing Ni, Shigeki Hirano, Satoshi Kuwabara, Bin Ji, Ming-Rong Zhang, Ichio Aoki, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi, Naruhiko Sahara, In vivo visualization of tau accumulation, microglial activation and brain atrophy in a mouse model of tauopathy rTg4510, *Journal of Alzheimer's Disease*, 査読有, Vol. 61, 2018, 1037-1052
DOI: 10.3233/JAD-170509.
- ④ Naruhiko Sahara, Masafumi Shimojo, Maiko Ono, Hiroyuki Takuwa, Makoto Higuchi, Marcelo Febo, Tetsuya Suhara, In vivo tau imaging for a diagnostic platform of tauopathy using the rTg4510 mouse line, *Frontiers in Neurology*, 査読有, Vol. 8, 2017, 663
DOI: 10.3389/fneur.2017.00663
- ⑤ Keisuke Takahata, Yasuyuki Kimura, Chie Seki, Masaki Tokunaga, Masanori Ichise,

Kazunori Kawamura, Maiko Ono, Soichiro Kitamura, Manabu Kubota, Sho Moriguchi, Tatsuya Ishii, Yuhei Takado, Fumitoshi Niwa, Hironobu Endo, Tomohisa Nagashima, Yoko Ikoma, Ming-Rong Zhang, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi、A human PET study of [11C]HMS011, a potential radioligand for AMPA receptors、EJNMMI Res、査読有、Vol. 7、2017、90
DOI: 10.1186/s13550-017-0313-0

⑥ Maiko Ono, Naruhiko Sahara, Katsushi Kumata, Bin Ji, Ruiqing Ni, Shunsuke Koga, Dennis W Dickson, John Q Trojanowski, Virginia M-Y Lee, Mari Yoshida, Isao Hozumi, Yasumasa Yoshiyama, John C van Swieten, Agneta Nordberg, Tetsuya Suhara, Ming-Rong Zhang, Makoto Higuchi、Distinct binding of two PET ligands, PBB3 and AV-1451, to tau fibril strains in neurodegenerative tauopathies、Brain、査読有、Vol. 140、2017、764-780
DOI: 10.1093/brain/aww339.

⑦ Shunsuke Koga, Maiko Ono, Naruhiko Sahara, Makoto Higuchi, Dennis W. Dickson、Fluorescence and autoradiographic evaluation of tau PET ligand PBB3 to α -synuclein pathology、Movement Disorders、査読有、Vol. 32、2017、884-892
DOI: 10.1002/mds.27013.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 小野麻衣子、認知症疾患のタウ病理とイメージング、第 37 回日本認知症学会学術集会、2018
- ② 小野麻衣子、タウから見たアルツハイマー病の診断から治療の可能性、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
- ③ Maiko Ono, Hitoshi Shimada, Soichiro Kitamura, Kenji Tagai, Manabu Kubota, Hiroyuki Takuwa, Paul Tempest, Ming-Kuei Jang, John Seibyl, Olivier Barret, David Alagille, Kenneth Marek, Naruhiko Sahara, Tetsuya Suhara, Ming-Rong Zhang, and Makoto Higuchi、Development of a tau PET ligand, [¹⁸F]PM-PBB3、AAT-AD/PD Focus Meeting 2018、2018
- ④ Maiko Ono, Soichiro Kitamura, Hitoshi Shimada, Naruhiko Sahara, Hiroyuki Takuwa, Yasumasa Yoshiyama, Trajanowski John, Lee Virginia, Tetsuya Suhara, Ming-Rong Zhang, Ming-Kuei Jang, Tamagnan Gilles, Marek Kenneth, Makoto Higuchi、Development of novel tau PET tracers, [18F]AM-PBB3 and [18F]PM-PBB3、11th Human Amyloid Imaging、2017

[図書] (計 1 件)

- ① 小野 麻衣子 他、中外医学社、Clinical Neuroscience、2018、37 巻 1 号

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.nirs.qst.go.jp/seika/brain/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。