

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15538

研究課題名(和文) 神経変性プロセス可視化のためのPETプローブの開発

研究課題名(英文) Development of PET probes for visualization of neurodegenerative process

研究代表者

原田 龍一 (HARADA, RYUICHI)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60735455

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)：研究代表者らが開発したPETプローブ18F-THK-5351はタウ病変とアストログリオシス(=MAO-B)の両者を検出しており、タウ病変を選択的に検出することができない。ヒトにおける神経回路破綻機序の解明にはタウ病変とアストログリオシスを個別にかつ縦断的に追跡できる画像化技術が必要である。そこで本研究では18F-THK-5351をリード化合物として結合選択性を改良することでタウ病変、アストログリオシスをそれぞれ選択的に描出できるPETプローブを開発することを目的とした。化合物の合成とスクリーニングを実施し、薬物動態に優れるMAO-Bあるいはタウ病変に選択的なPETプローブの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タウ病変を非侵襲的に画像化することができればアルツハイマー病の診断や治療薬のサロゲートマーカーへの利用が期待できる。研究代表者らはこれまでにタウ病変を画像化する目的でPETプローブ18F-THK-5351を開発したが、オフターゲットの問題が発覚し、改良を余儀なくされた。本研究で改良した18F-SNFT-1はタウ病変に選択的であり、タウを標的とした治療薬のサロゲートマーカーとして有望であると考えられる。また、本研究で開発したMAO-B選択的なPETプローブ18F-SMBT-1によりアストログリオシスを選択的に描出することが可能となり、治療薬が神経炎症に与える影響の効果判定への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：18F-THK-5351 PET have limited biomarker for tau pathology in Alzheimer's disease because of off-target binding to monoamine oxidase-B, which is dominantly expressed in astrocytes. Selective imaging techniques to trace tau burden and astrogliosis selectively are required to elucidate neuronal circuit breakdown mechanisms in the humans. The aim of this study was to develop novel and selective PET probes for imaging tau pathology and MAO-B, respectively through compound optimization from 18F-THK-5351. We synthesized more than 200 compounds and screened against tau aggregates and MAO-B. Finally, we successfully discovered novel selective PET probes for imaging tau pathology and MAO-B that possess preferable pharmacokinetics.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射性医薬品 PET アストロサイト タウ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は不可逆的で進行性の神経変性疾患であり、最も頻度の高い認知症である。AD の神経病理学的所見は、神経細胞脱落、グリオシスに加えてアミロイド β から成る老人斑とタウ蛋白質から成る神経原線維変化である。陽電子断層撮影法 (Positron Emission Tomography) を用いたイメージング法の開発により、脳内に蓄積したアミロイドを画像化できるようになった。2013 年にタウの画像化が報告されはじめたが、PET 画像が真にタウ病理を反映しているのかの検証はまだ十分に検証されていない。また、現存のタウ PET はタウの病理では説明できない標的への結合 (オフターゲット結合) という問題を抱えている。我々はタウ画像化用の PET プローブとして ^{18}F -THK-5351 を開発し臨床応用したが、後にオフターゲット結合の標的がモノアミンオキシダーゼ B (MAO-B) であることを突き止めた。

MAO-B はアストロサイトのミトコンドリア外膜に発現しており、神経炎症のマーカーとして知られている。グリオシスは神経変性疾患において共通して認められる神経病理所見であり、タウの蓄積と神経炎症の因果関係を解明することは神経変性機構に関わる脳内生物学的基盤の構築においては重要である。しかし、これらを明らかにするためには非侵襲的にタウ病変、グリオシスをそれぞれ個別に生体イメージングにより描き分けるようにし、ヒトにおける縦断評価を可能にする必要がある。

2. 研究の目的

そこで本研究では、 ^{18}F -THK-5351 からの最適化によりタウ病理およびアストログリオシスをそれぞれ選択的に画像化する放射性薬剤 (PET プローブ) を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 競合結合実験によるスクリーニング

競合結合実験によるスクリーニングは MAO-B とタウに関して一次スクリーニングを実施し、そのヒット化合物に関して MAO-A、アミロイドに関して二次スクリーニングを実施した。MAO-A と MAO-B に関して組換えタンパク質を使用し、アミロイド、タウに関してはアルツハイマー病患者のホモジネートを使用した。ヒト脳試料を用いた実験に関しては東北大学医学系研究科の倫理委員会の承認を得て実施した。

(2) オートラジオグラフィー

$^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$ 反応により、 ^{18}F を製造し、 ^{18}F 標識化合物を合成した。HPLC で分取後、固相抽出によりエタノール溶液として調製した。オートラジオグラフィー用の薬液はエタノール濃度が 0.1% 以下になるように希釈して用いた。クリオスタットで薄切したヒト脳切片に対して 370 kBq/mL の ^{18}F 標識化合物を反応させた。PBS, 1% BSA と PBS でそれぞれ洗浄して乾燥させた後に、イメージングプレートに接触させた。FLA-9500 (GE healthcare) でイメージングプレート进行スキャンすることでオートラジオグラフィー画像を得た。隣接切片を用いて各種免疫染色を行い、オートラジオグラフィー画像との比較を行った。

(3) ^{18}F 標識化合物を用いた体内動態評価

^{18}F 標識化合物のエタノール含有量を 0.1% になるように生理食塩水で希釈し、740 kBq/マウスで静脈内投与した。投与 2 分、10 分、30 分、60 分、120 分後にマウスを解剖し、各臓器を摘出した。回収した臓器は γ カウンターにより放射能を計測し、各臓器への放射性薬剤の取り込みを %ID/g として計算した。また、7.4 MBq/マウスで ^{18}F 標識化合物を静脈内投与し、Clarvivo PET (Shimadzu) を用いた 60 分間のダイナミック撮影を行った。動物実験に関しては東北大学・環境安全委員会動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1) 競合結合実験によるスクリーニング

競合結合実験によるスクリーニングの結果、MAO-B に選択的かつ高親和性な化合物群とタウに選択的かつ高親和性な化合物群を同定した。なお、二次スクリーニングにおいて MAO-A、アミロイドに対して結合しないことを確認し、またレセプターパネルスクリーンにおいても特定の標的への結合は確認されなかったことから、高い特異性を有していると言える。

(2) ^{18}F 標識化合物を用いたオートラジオグラフィー

上記のスクリーニング結果を踏まえ、 ^{18}F 標識化合物の前駆体を合成し、 ^{18}F 標識化合物を得た。それらを用いて AD 脳標本を用いた In vitro オートラジオグラフィーを行った。その結果、 ^{18}F -THK-5351 は MAO-B 阻害薬存在下においてその結合は減少し、タウ病変への結合性が残ったのに対し、 ^{18}F 化合物 2 (^{18}F -SMBT-1) の結合分布は MAO-B の免疫染色と一致し、その結合は MAO-B 選択的な阻害薬で完全に消失したことからヒト脳組織においても選択的かつ特異的に結合していると言える (図 1)。

また、 ^{18}F -化合物 3、 ^{18}F -化合物 4 (^{18}F -SNFT-1) は、 ^{18}F -THK-5351、 ^{18}F -SMBT-1、アミロイド PET 薬剤 ^{18}F -Florbetaben の結合分布とは異なり白質領域にはほとんど集積がみられず、AD 脳切片においてラミナ - 状の集積を示し、結合分布はタウの免疫染色とよく一致した (図 1)。

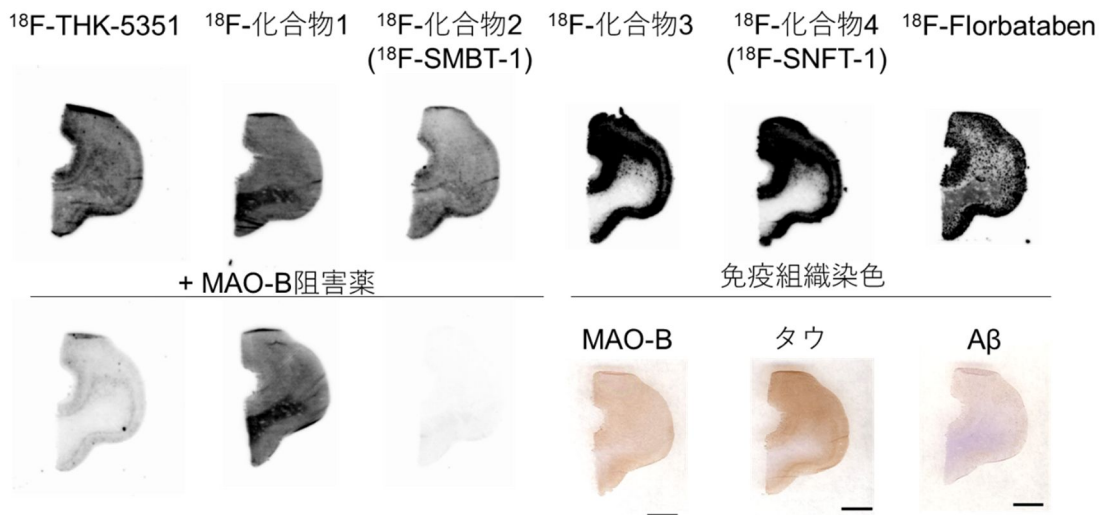


図1. アルツハイマー病患者脳標本に対する各種化合物の *In vitro* オートラジオグラフィ

(3) ^{18}F 標識化合物を用いた体内動態評価

^{18}F 標識化合物を用いた正常マウスにおける体内動態評価の結果、 ^{18}F -SMBT-1、 ^{18}F -SNFT-1 とともに投与 2 分後には高い脳への移行性を示し、その後速やかな消失が確認された。また、フッ素標識 PET トレーサーでしばしば問題になる脱フッ素による骨への集積も認められなかった。さらに代謝解析の結果、極性の高い代謝物が末梢で生成され、それは脳へは移行しないことを確認した。以上のことから、両化合物は共に優れた薬物動態を示すことが明らかとなった。また、小動物 PET の結果、 ^{18}F THK-5562 は正常マウスにおいて高い脳移行性と速やかなクリアランスが確認された (図 2) 。また、脳近傍の組織への集積も低く、ヒトにおいてもコントラストの優れた PET 画像が期待できる。

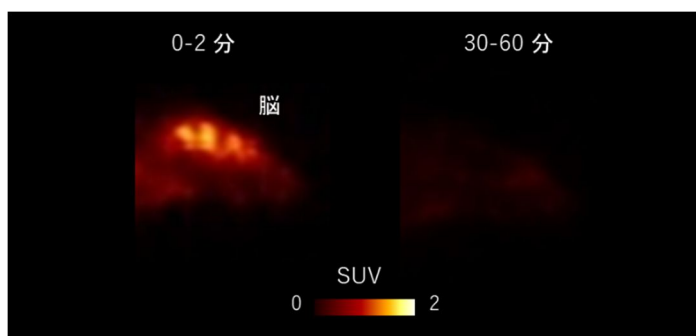


図2. 正常マウスにおける ^{18}F -SNFT-1 PET画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 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.	4. 巻 6
2. 論文標題 Neuroimaging-pathological correlations of [18F]THK5351 PET in progressive supranuclear palsy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-018-0556-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yanai A, Harada R, Iwata R, Yoshikawa T, Ishikawa Y, Furumoto S, Ishida T, Yanai K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Site-Specific Labeling of F-18 Proteins Using a Supplemented Cell-Free Protein Synthesis System and O-2-[18F]Fluoroethyl-L-Tyrosine: [18F]FET-HER2 Affibody Molecule.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Imaging Biol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11307-018-1266-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Harada R, Okamura N, Furumoto S, Yanai K.	4. 巻 585
2. 論文標題 Imaging Protein Misfolding in the Brain Using β -Sheet Ligands.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Neurosci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2018.00585.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoi T, Watanabe H, Yamaguchi H, Bagarinao E, Masuda M, Imai K, Ogura A, Ohdake R, Kawabata K, Hara K, Riku Y, Ishigaki S, Katsuno M, Miyao S, Kato K, Naganawa S, Harada R, Okamura N, Yanai K, Yoshida M, Sobue G.	4. 巻 10
2. 論文標題 Involvement of the Precuneus/Posterior Cingulate Cortex Is Significant for the Development of Alzheimer's Disease: A PET (THK5351, PiB) and Resting fMRI Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Aging Neurosci.	6. 最初と最後の頁 304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnagi.2018.00304.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Togo T, Toyohara J, Harada R, Furumoto S, Okamura N, Kudo Y, Takahashi-Fujigasaki J, Murayama S, Ishii K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Characterization of the binding of tau imaging ligands to melanin-containing cells: putative off-target-binding site.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Nucl Med.	6. 最初と最後の頁 375-382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12149-019-01344-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ezura M, Kikuchi A, Ishiki A, Okamura N, Hasegawa T, Harada R, Watanuki S, Funaki Y, Hiraoka K, Baba T, Sugeno N, Oshima R, Yoshida S, Kobayashi J, Kobayashi M, Tano O, Nakashima I, Mugikura S, Iwata R, Taki Y, Furukawa K, Arai H, Furumoto S, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y, Takeda A, Aoki M	4. 巻 26
2. 論文標題 Longitudinal changes in 18 F-THK5351 positron emission tomography in corticobasal syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Neurol.	6. 最初と最後の頁 1205-1211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ene.13966. Epub 2019 May 11.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada R, Hayakawa Y, Ezura M, Lerdsirisuk P, Du Y, Ishikawa Y, Iwata R, Shidahara M, Ishiki A, Kikuchi A, Arai H, Kudo Y, Yanai K, Furumoto S, Okamura N	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 18F-SMBT-1: A Selective and Reversible Positron-Emission Tomography Tracer for Monoamine Oxidase-B Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nucl Med	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ryuichi Harada
2. 発表標題 Pathological correlates of 18F-THK-5351 PET in tauopathies
3. 学会等名 Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田龍一
2. 発表標題 アンバーコドンを用いた無細胞蛋白質合成法による新規18F標識蛋白質合成法の開発
3. 学会等名 第58回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田龍一
2. 発表標題 フェルラ酸誘導体によるミスフォールディング蛋白質の凝集抑制
3. 学会等名 第69回日本薬理学会北部会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuichi Harada
2. 発表標題 Development of selective tau and MAO-B PET through compound optimization of [18F]THK-5351
3. 学会等名 World Congress of Pharmacology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuichi Harada
2. 発表標題 Discovery of [18F]SMBT-1: a novel selective MAO-B PET tracer for imaging astroglialosis
3. 学会等名 Human Amyloid Imaging 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田龍一
2. 発表標題 Radiolabeled proteins for the development of biopharmaceuticals
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田龍一
2. 発表標題 アストロサイトのPETイメージング
3. 学会等名 PETサマーセミナー2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田龍一
2. 発表標題 アストロサイトのPETトレーサー
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Harada
2. 発表標題 Preclinical characterization of [[18F]THK-5562, a novel tau PET tracer with little off-target binding.
3. 学会等名 Human Amyloid Imaging 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 モノアミンオキシダーゼBイメージングプローブ	発明者 原田龍一、古本祥三、工藤幸司、岡村信行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-148863	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 タウを画像化する新規化合物	発明者 原田龍一、古本祥三、工藤幸司、他2名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-240189	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----