様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 １６ 日現在

機関番号：１４２０２
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2010～2013
課題番号：２２３００１５３

研究課題名（和文）１９Ｆ－ＭＲＩによるアミロイドイメージング法の開発

研究課題名（英文）Development of amyloid imaging using fluorine-MRI

研究代表者
遠山　育夫（Tooyama, Ikuo）

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授

研究者番号：２０２０７５３３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,500,000円、（間接経費）　4,050,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、アルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウスを用いて、フッ素MR画像法を用いたアミロイドイメージング法を開発することである。まず我々は、クルクミンを基本骨格とするフッ素MR画像診断候補薬であるShiga-Y系化合物を新規合成し、それらがベータアミロイドペプチド（Aβ）凝集体やAβオリゴマーに結合することを明らかにした。このうち、Shiga-Y5(FMeC1)が、脳内で最も強くフッ素NMR信号を出した。そこで、Shiga-Y5をアルツハイマー病遺伝子改変モデルマウスの尾静脈から投与して、7テスラMR画像装置で測定したところ、50分の測定でＭＲによるアミロイドイメージングに成功した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop amyloid imaging using 19F MRI. We have developed a novel 19F-containing curcumin derivative (named FMeC1 or Shiga-Y5) as a potential 19F MRI probe for amyloid imaging. When Tg2576 mice, a transgenic mouse model of Alzheimer's disease, at 20-22 months of age were peripherally injected with FMeC1, dose-dependent increasing in the level of 19F signal was observed in 19F MR spectra obtained from the whole head. 19F MR image showed remarkable levels of 19F signal in the brain of Tg2576 mice after the injection of FMeC1 at a dose of 200 mg/kg. There are no significant 19F signals in the brain of FMeC1-injected wild-type mice. Histological analysis of FMeC1-injected Tg2576 mouse brain showed strong fluorescence signal for FMeC1, and most of this signal was co-localized with beta-amyloid peptide-immunoreactivity. These results suggest the potential benefit of 19F MRI with FMeC1 for amyloid imaging.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：神経科学　アルツハイマー病　核磁気共鳴画像　分子イメージング　画像診断

１．研究開始当初の背景

現在、わが国には約470万人の認知症患者が存在し、高齢化社会の進展により、その数は今後、急速に増大していくと推測されている。認知症の約60%がアルツハイマー病とされ、**アルツハイマー病の診断法・治療法の開発は、我が国における重要な課題**である。これまでアルツハイマー病の原因は不明で治療法もなかったが、近年、分子遺伝学をはじめとする学問の進歩により、ワクチン療法やベータセクレターゼ阻害薬など、アルツハイマー病の根本治療法が開発されようとしている。これら治療法を生かすためには、**早期に確実に病気を診断する診断技術**が強く求められている。なかでも核磁気共鳴画像法(MRI)は、ヒトにやさしい低侵襲的な医療として、市民の期待も高い。病院に普及しているMR画像装置は1-3テスラのものが一般的であるが、研究分野ではここ数年の間に急速に高磁場化が進んでおり、7-11テスラの動物実験用MR画像装置が導入されている。

高磁場MR装置を用いると、従来のプロトンMR画像のみならず、フッ素や炭素などのMR画像化が可能になる。なかでもフッ素MR画像法は、比較的感度が高く、フッ素原子が体内にほとんど存在しないため、フッ素原子を含む良質の診断薬を合成できれば、感度よくMR画像化することができる。^{18}Fはすでに PET試薬として広く用いられており、放射性同位元素^{18}Fの代わりに安定同位元素^{19}Fを用いることにより、PETに代わる安全な次世代の分子イメージング法となる可能性がある。我々も独自に**フッ素MR画像法のための診断薬の開発を行っており、 2007年、2009年にアルツハイマー病の新規フッ素画像診断薬を開発して特許出願した（特願2007-513521、特願2009-45705）**。これらの試薬（Shiga-X, Shiga-Yと略す）は、従来の試薬（FSB）の10倍以上の強い信号を出す。とくに最近開発したクルクミン系試薬（Shiga-Y）はケト・ノール互変異性を持ち、アルツハイマー病モデルマウスに投与すると老人斑に結合後、強いフッ素NMR信号を出すことが明らかになった。

２．研究の目的

本研究の目的は、**アルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウスを用いて、７テスラMR画像装置でアルツハイマー病のMR画像診断法（アミロイドイメージング）を開発すること**である。

３．研究の方法

（１）化合物の改良

現在のところ、ケト・エノール互変性をもち、アミロイドイメージングに最も適している化合物は、Shiga-Y5 である。Shiga-Y5 を本研究の基本的化合物とし、１分子あたりのフッ素原子を増加させるなどの改良を加えた。また、ベンザオキサゾールを基本骨格にもつ Shiga-X 系化合物の改良も行った。化合物の合成は、研究分担者の田口弘康特任教授が担当した。

（２）測定方法の開発

現在大量に所有している Shiga-Y5 を利用して、フッ素 MR 画像を感度よく得るための測定方法を検討した。これは、犬伏俊郎教授の指導のもと、遠山と大学院生が担当した。

（３）装置の改良

フッ素 NMR 信号を感度よく検出するための装置を作製する必要がある。これまでの検討から、市販の測定コイルではフッ素原子の測定感度が低いことが判明している。そこで、フッ素MR画像用の専用コイルの作製を試みた。また、フッ素 MR 画像法では、微量なフッ素信号を検出するため、装置の接着剤などに含まれる微量のフッ素成分も大きなノイズとなる。コンデンサーを含め測定装置の改良も行った。これは、連携研究者の犬伏俊郎

教授の指導のもと遠山と大学院生が担当した。

（４）アルツハイマー病遺伝子改変モデルマウスを用いたアミロイドイメージング

Shiga-Y 系化合物をアルツハイマー病の遺伝子組換えマウスおよび Wild マウスに投与して、フッ素 MR 画像法によるアミロイドイメージングに挑戦した。50 mg/kg-200 mg/kg の Shiga-Y 系化合物を 15 分から 40 分ほどかけてマウスの尾静脈から投与し、ＭＲ画像化を試みた。測定後は脳組織を摘出し、半分は凍結の上、後で高速液体クロマトグラフィーを用いて Shiga-Y 系化合物の濃度を測定した。残りの半分の脳は、４％パラホルムアルデヒドを含む固定液で固定後、Aß 抗体を用いた免疫組織化学法と化合物の持つ蛍光を利用し、化合物の脳内分布を確認した。

４．研究成果

（１）化合物の改良

クルクミンを基本骨格とし、フッ素原子を有する 79 種類の化合物を合成した（図１）。

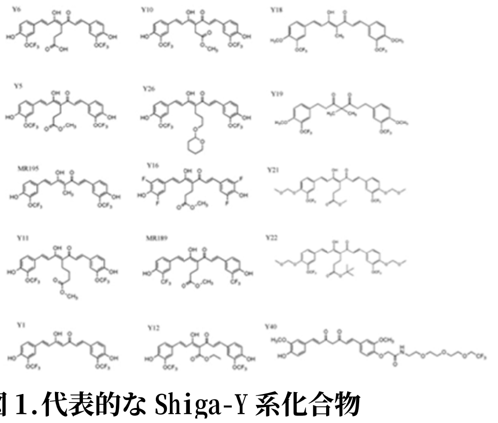

図１.代表的な Shiga-Y 系化合物

なかでも、Shiga-Y5 は先行薬の 10 倍以上の強いフッ素 NMR 信号を出し、アルツハイマー病の老人斑に結合することが判明した（1,2,3,4)。加えて、アルツハイマー病の原因タンパクの中でも神経毒性の強いベータアミロイドペプチドオリゴマーとも結合するという優れた性質を有することがわかった（1)。この結合のメカニズムは、Shiga-Y5 のもつケト・エノール互変異性に由来し、アミロイド凝集体が存在するとケト型からエノール型に変化して、凝集体に結合することを明らかにした(3)。

（２） および（３）測定法と装置の改良

フッ素MR画像法に適した低バックグランドなMR測定装置の開発と高感度な測定方法の開発を行った。MR 測定装置の開発と高感度な測定方法の開発を行った。その結果、既製のコイルを用いて少量のフッ素化合物の NMR 信号検出を試みたところ、バックグランドの大きなノイズピークのために信号の検出が困難であった。独自に作成したコンデンサーを用いて、フッ素 NMR 信号検出コイルを作り直した結果、本妨害ピークを除去することができ、少量のフッ素信号の検出も可能となった。

（４）アルツハイマー病遺伝子改変モデルマウスを用いたアミロイドイメージング

Shiga-Y5 をアルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウスの尾静脈から投与して、7 テスラ MR 画像装置によるアミロイドイメージングに挑戦した。アルツハイマー病の遺伝子改変モデルマウスとして、16-24 ヶ月齢の Tg2576 マウスおよび Wild マウスを用いた。麻酔下に、マウスの尾静脈から 50 ㎎/kg, 100 ㎎/kg, 200 ㎎/kg の Shiga-Y5 を投与した。投与後、マウスを麻酔下に動物実験用７テスラ MR 画像装置に入れ､10 分のシングルパルス測定と 50 分の画像化測定を投与後６時間まで繰り返した。６時間後、マウスを安楽死させて脳を摘出し､脳内での Shiga-Y5 の分布を組織化学的に検索するとともに老人斑の分布と比較した。その結果、Tg2576 マウスおよび Wild マウスともに投与直後に脳領域にフッ素信号を認め、Wild マウスでは速やか

にフッ素信号が消失したが、Tg2576 マウスではフッ素信号は脳領域に留まっていた。投与後４時間のフッ素脳画像で、Tg2576 マウス脳で老人斑の多い脳領域に一致してフッ素画像が得られた(2,3,4)。フッ素画像の強さは投与量依存的であった（図２）。Wild マウスではフッ素画像は得られなかった。本研究の結果は、７テスラの高磁場 MR 装置を用いれば、Shiga-Y5 により、50 分の測定で MR による Tg2576 マウスのアミロイドイメージングができることを示している(2，3，4)。同様に Shiga-X 系化合物でもアミロイドイメージングに成功した（7)。

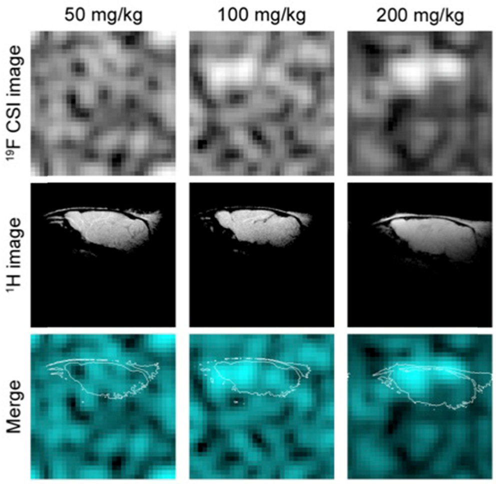

図２．Tg2576 マウス脳のアミロイドイメージング

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　８件）

1) Kitanishi T, Aimi Y, Kitano H, Suzuki M, Kimura H, Saito A, Shimizu T, Tooyama I: Distinct localization of peripheral and central types of choline acetyltransferase in the rat cochlea. Acta Histochem Cytochem. 46:145-152, 2013. doi: 10.1267/ahc.13021.（査読有り）
2) 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. J Alzheimer's Dis 39: 617-631, 2014. doi: 10.3233/JAD-131025.（査読有り）
3) Makino S, Umemoto T, Yamada H, Yezdimer EM, Tooyama I: In Vivo Detection of Copper Ions by Magnetic Resonance Imaging Using a Prion-Based Contrast Agent. Appl Biochem Biotechnol. 168: 504-518, 2012. doi: 10.1007/s12010-012-9792-7.（査読有り）
4) Kameshima N, Nanjou T, Fukuhara T, Yanagisawa D, Tooyama I: Correlation of Aβ deposition in the nasal cavity with the formation of senile plaques in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. Neurosci Lett 513: 166-169, 2012. doi: 10.1016/j.neulet.2012.02.026.（査読有り）
5) 遠山育夫: アルツハイマー病診断のための新規ＭＲ造影剤の開発　神戸医師会報２月号: 51-57，2011．(査読無し)
6) 遠山育夫，田口弘康、柳沢大治郎：核磁気共鳴画像によるアミロイドイメージング用トレーサー鳥取医療 4: 68-74，2011．(査読有り)
7)Yanagisawa D, Amatsubo T, Morikawa S, Taguchi H, Urushitania M, Shirai N, Hirao K, Shiino A, Inubushid T, Tooyama I: In vivo detection of amyloid b deposition using 19F magnetic resonance imaging with a 19F-containing curcumin derivative in a mouse model of Alzheimer's disease. Neuroscience 184: 120-127. 2011. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.071.（査読有り）
8) Yanagisawa H, Taguchi H, Yamamoto A, Shirai N, Hirao K, Tooyama I: Curcuminoid binds to amyloid β (1-42) oligomer and fibrilJ Alzheimer Dis 24 (supple 2): 33-42, 2011.doi: 10.3233/JAD-2011-102100.（査読あり）

〔学会発表〕（計　９件）

1) Yanagisawa D, Taguchi H, Morikawa S, Inubushi T, Ibrahim NF, Hirao K, Shirai N, Sogabe T, Tooyama I: Preferred features of a fluorine-19 MRI probe for amyloid detection in the brain. 第 15 回国際アルツハイマー病会議 (AAIC2013) 2013 年 7 月 13 日～18 日 米国ボストン市
2) Yanagisawa D, Morikawa S, Taguchi H, Shiino A, Inubushi T, Ibrahim NF, Tooyama I: 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）第 36 回日本神経科学会学術大会（Neuro2013）2013 年６月 20 日～23 日、京都
3) Tooyama I: A novel 19F MRI probe for detecting amyloid plaques in Alzheiemr's disease. The 5th Harbin International Neurosugery Conference 2012 年７月 13 日～日、中国、ハルピン（招待講演）
4) 遠山育夫：クルクミン骨格をもつ高磁場 MRI 用アミロイドイメージング試薬の検討 第 53 回日本神経学会総会　2012 年５月 22

日～25 日　東京
5) 柳沢大治郎、森川茂廣、田口弘康、椎野顕彦、犬伏俊郎、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の検出. 第 34 回日本神経科学会学術大会（Neuro2011） 2011 年 9 月 14 日～17 日横浜市
6) 遠山育夫: アルツハイマー病とクルクミン　第 5 回認知症サプリメント研究会 2011 年 9 月 10 日　東京（招待講演）
7)Yanagisawa D, Shirai N, Amatsubo, T,Taguchi H, Hirao K, Urushitani M, Morikawa S, Inubushi T, Wada Y, Wada K, Yamamoto A, Tooyama I: Curcumin binding activity to ß-amyloid oligomer. 第 13 回国際アルツハイマー病会議（ICAD2011）2011 年 7 月 16 日～21 日 フランス　パリ市
8) 遠山育夫、柳沢大治郎、田口弘康: クルクミンのケトエノール互変異性とアミロイド親和性を利用したアルツハイマー病診断薬の検討　第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月 18 日～20 日 名古屋市
9) Ynagisawa D, Shirai N, Amatsubo T, Taguchi H, Hirao K, Urushitani M, Morikawa S, Inubushi T, Wada Y, Wada K, Yamamoto A, Tooyama I: Binding form of curcumin derivatives to ß-amyloid aggregates. 第 12 回国際アルツハイマー病会議（ICAD2010）2010 年 7 月 10 日～15 日 米国ホノルル市

〔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 2013-001948
出願年月日：平成 25 年 1 月 9 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：特願 2013-202531
出願年月日：平成 25 年 9 月 27 日
国内外の別：国内

〔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
遠山　育夫（TOOYAMA Ikuo）
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授
研究者番号：２０２０７５３３

(2)研究分担者
田口　弘康（TAGUCHI Hiroyasu）
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・特任教授
研究者番号：９０１０２９１２

(3)連携研究者
犬伏　俊郎（INUBUSHI Toshiro）
滋賀医科大学・MR 医学総合研究センター・教授
研究者番号：２０２１３１４２