

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23390235

研究課題名(和文) タウオパチーの早期診断と発症機構制御を可能にするリガンドの創出

研究課題名(英文) Development of ligands for early diagnosis and mechanistic controls of tauopathies

研究代表者

樋口 真人 (Higuchi, Makoto)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究者番号：10373359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、様々な認知症の中核病理であるタウ病変を標的として、タウ凝集体を生体でポジトロン断層撮影(PET)により可視化するリガンド開発を実施した。その結果、新規PETプローブ $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$ の開発に成功し、アルツハイマー病および非アルツハイマー型認知症におけるタウ病変の画像化を、世界に先駆けて実現した。また、PBB3の誘導体から改良型プローブやタウ凝集阻害剤の開発にも着手し、有望な化合物が得られた。さらに、タウ病態において重要な役割を有する神経炎症マーカーや、炎症性ケモカインの作用増強をもたらす酵素を可視化するPETプローブとして、新規化合物を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：This project was aimed at developing potential diagnostic and therapeutic ligands for tau aggregates and other key molecules mechanistically implicated in the pathogenesis of Alzheimer's disease and allied tauopathies. A novel radioligand, $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$, was generated and applied to positron emission tomography (PET) of model mice and humans, providing the first demonstration of visualization of diverse tau lesions in living brains. ^{18}F -labeled PBB3 derivatives were also produced for wider availability, and were assessed by animal PET. PET probes for deleterious microgliosis and enzymes responsible for potentiation of proinflammatory chemokines were also developed, and enabled in vivo monitoring of crosstalk between tau pathologies and neuroinflammation. A subset of PBB3 analogs was shown to suppress self-assembly of tau, indicating the capability of these chemicals as therapeutic agents.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 生体分子 認知症 脳疾患研究 薬学 イメージング

1. 研究開始当初の背景

タウ蛋白の病的凝集は数多くの神経変性疾患(タウオパチー)の主要病理で、神経細胞死や症状発現へ密接に関わっている。代表者らはこれまで生体イメージングを基軸とした疾患モデル動物研究を通じて、タウ蛋白と他のアミロイド原性蛋白の相互作用による病理の加速、タウ病理と神経免疫反応の双方向の因果関係、同一の修飾酵素によるアミロイド原性蛋白および毒性サイトカインの安定化、の3事象がタウオパチー発症機構で中心的役割を担うことを見出してきた。従って、この事象の鍵を握る分子を生体で可視化し制御するリガンドを開発することで、タウ病態解明に向けた重要な知見が得られ、診断・治療に有用な薬剤が得られると見込まれる。

2. 研究の目的

タウオパチーネットワーク活性化で中心的役割を担う各種アミロイド原性分子により加速されるタウ蛋白凝集、タウ病理と神経免疫反応の相互促進、同一の修飾酵素によるアミロイド原性分子および毒性サイトカインの安定化に焦点を当て、これら3つのプロセスにおける主要分子に結合するリガンドを、アイソトープ標識し画像バイオマーカーとして、さらに阻害剤として開発を行い、モデルマウスを用いて評価する。これによりタウオパチーネットワークの解明、モニタリング技術の開発、治療につながる発症制御法を一体となった形で実現する。

3. 研究の方法

(1) タンパク凝集体リガンドの開発：シートリガンドとして知られている化合物のスクリーニングを通じて、アミロイドペプチド(A β)やタウ凝集体への選択性の高いリガンドの構造活性相関を明らかにする。それにもとづいて、脳移行性や脳内動態に優れた新規リガンドを開発し、放射性標識してポジトロン断層撮影(PET)プローブとしての有用性を検討する。さらに、得られたリガンドの誘導体ライブラリーを作製し、タウ凝集を阻害する活性を有する化合物を同定する。

(2) 神経免疫系リガンド：Translocator protein (TSPO)をはじめとする、神経炎症マーカー分子に着目し、これらの分子に対するリガンドを作製する。リガンドを放射性標識して、PETプローブとしての有用性を評価する。

(3) グルタミン酸環状化酵素(QC)のリガンド開発：QCやそのアイソザイムは、A β を修飾して毒性と凝集性・安定性を強める働きを有する。また、MCP-1などの炎症性ケモカインを修飾し、作用増強と安定化に関わる酵素でもある。そこでQCに特異的に結合することが知られているリガンドから出発し、化合物の2次ライブラリーを作製して、QCへの結

合性や脳移行性が高いリガンドを同定する。有望なリガンドは放射性標識して、PETプローブとしての有用性を評価する。

4. 研究成果

(1) タンパク凝集体リガンドの開発：シートリガンドのスクリーニングにおいて、特定の基本骨格長(15~16)の化合物が、アルツハイマー病や非アルツハイマー型認知症、ひいてはタウトランスジェニックマウスなどの様々なタウ病変に結合していることを見出した。そこで、代表的なA β 凝集体PETプローブであるPittsburgh Compound-B (PiB)の基本骨格(長さ約10)に、C=C二重結合リンカーを挿入して基本骨格長を伸ばし、約16となる化合物PBBを新規に作製した(特許取得)。脂溶性の異なる代表的な化合物として、PBB1~PBB5の5種類を比較したところ、脂溶性の高さとA β 凝集体への結合性が相関し、結果として脂溶性の低い化合物の方が、A β よりもタウの凝集体へ結合しやすいことが判明した。また、これらの化合物をポジトロン放出核種である¹¹Cで標識し、マウスPETによりインビボ動態を比較した。図1に示すように、タウトランスジェニックマウスのタウ病変を最も高いコントラストで画像化するのは、¹¹C]PBB3であることが示された。

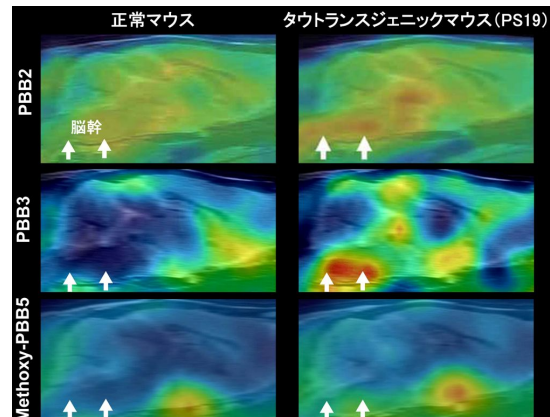


図1 モデルマウスPETによるPBB化合物の比較。矢印はタウ病変が多い脳幹部

¹¹C]PBB3をヒトに応用し、アルツハイマー病患者や前頭側頭葉変性症患者で、プローブの脳内集積を検出しえた(Neuron 2013)。また、プローブ集積量は、認知症の進行度とよく相関することや、タウの蓄積が局所の神経脱落と萎縮に関与していることが明らかになった。タウの蓄積部位の拡大は、A β の蓄積によって加速することも示唆された(図2)。¹¹C]PBB3はタウ病変への結合性が高い薬剤だが、生体に投与後、比較的速やかに代謝されることも判明した(J Nucl Med 2014)。そこで代謝産物を同定し、代謝部位を他の側鎖に置換することで、代謝的に安定な化合物が複数得られた。これらの化合物の幾つかは、¹¹Cよりも放射性半減期の長い¹⁸Fで標識され、より普及性の高いタウPETプローブとして、有用性が非臨床評価により確認された。

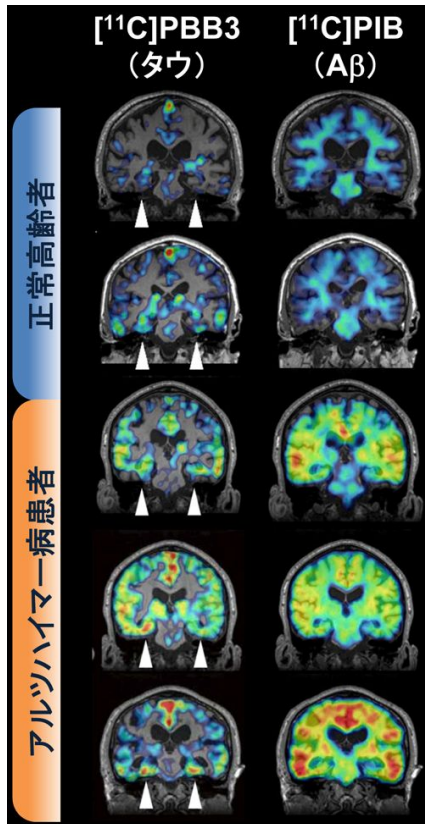


図 2 加齢に伴う海馬付近(矢頭)でのタウ蓄積と、A 病態出現に伴うタウ蓄積部位の進行性の拡大。

PBB 化合物の誘導体ライブラリーを作製し、試験管内で組換えタウタンパクの凝集を阻害する活性を評価したところ、強い阻害効果を有する化合物が複数見出された。これらの化合物が脳内のタウ凝集体に結合することを、アルツハイマー病患者およびタウトランスジェニックマウスモデルを用いた結合試験により確認した。

(2) 神経免疫系リガンド: TSP0 陽性グリアの中でも、TSP0 陽性ミクログリアは神経細胞に攻撃的に作用し、TSP0 陽性アストロサイトは保護的に作用することが、代表者らの先行研究で判明していた。また、認知症モデルマウスの中でも、アミロイド前駆体タンパク (APP) トランスジェニックマウスでは TSP0 陽性アストロサイトが増加し、タウトランスジェニックマウスでは TSP0 陽性ミクログリアが増加することが示されていた。そこでこれらのマウスを用いて、新規化合物を含む各種 TSP0 プローブの結合性を調べた結果、アストロサイトの TSP0 に強く結合する化合物と、ミクログリアの TSP0 に強く結合する化合物が存在することが明らかになった(図 3)。ミクログリアの TSP0 に結合性が高いプローブの中で、新規化合物である FEBMP が、特に高いコントラストで標的を検出することが判明した。神経変性に関わる炎症性変化を可視化するプローブとして、FEBMP の詳細な特性評価を行い、臨床応用する準備を整えた。

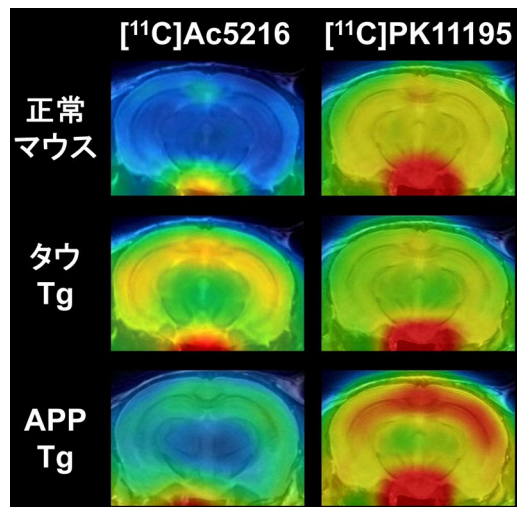


図 3 認知症モデルマウスに各種プローブを投与して得られた PET 画像の例

TSP0 以外の神経炎症プローブとして、cyclooxygenase-2 (cox-2) のリガンド開発を実施した。 $[^{11}\text{C}]$ celecoxib は脳移行性は高かったが、特異結合はほとんど観察できなかった。 $[^{11}\text{C}]$ rofecoxib はオートラジオグラフィーで特異的な結合が認められ、脳移行性も高かったが、インビボで十分なコントラストは得られなかった (Brain Res 2013)。しかしながら、一連の実験を通じてインビボで cox-2 を検出するのに必要なリガンドの親和性の目標値が判明した。この目標値を満たすリガンドとして、valdecoxib を選択し、特異結合をインビトロおよびエクソビボのオートラジオグラフィーで確認した。

(3) QC のリガンド開発: 過去の文献に基づき、QC リガンドとして PQ1 および PQ2 を作製した。PQ1 は特異結合が少なく、脳移行性も低いことから、PET プローブとしては不十分であった。PQ2 は親和性が高いことから、 ^{11}C で標識し、インビトロオートラジオグラフィーで評価したところ、十分な特異結合が得られた。しかしながらマウス PET では脳移行性が不十分であることが確認された。次いで特許化合物などを検索し、誘導体ライブラリーを作製してインビトロで評価したところ、親和性の高い化合物 PQ3 が得られた。同化合物を ^{11}C で標識し、PET で動態を解析した結果、中等度の脳移行性が確認された。また、非標識 PQ3 の負荷により脳内集積量が低下したことから、インビボでも PQ3 は標的分子を特異的に認識すると推測された(図 4)。

QC および QC のアイソザイムに対する抗体を作製し、脳切片の免疫染色を実施したところ、アルツハイマー病患者や APP およびタウトランスジェニックマウスの神経細胞ないしはグリア細胞で、これらの酵素が増加していることが判明した。また、PQ3 を APP トランスジェニックマウス脳切片のオートラジオグラフィーマウスに使用し、A 蓄積部位周囲でのプローブ結合を見出した(図 5)。従って、

QC プローブを用いた PET イメージングを、モデルマウスや患者に応用することで、病態の画像バイオマーカーが得られると考えられた。

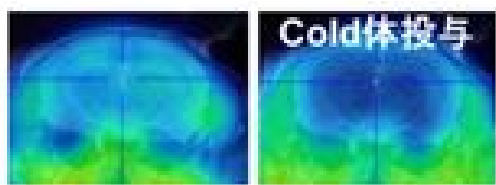


図 4 $[^{11}\text{C}]$ PQ3 投与後のマウス脳 PET 画像。右は非放射性 PQ3 を付加した際の画像。

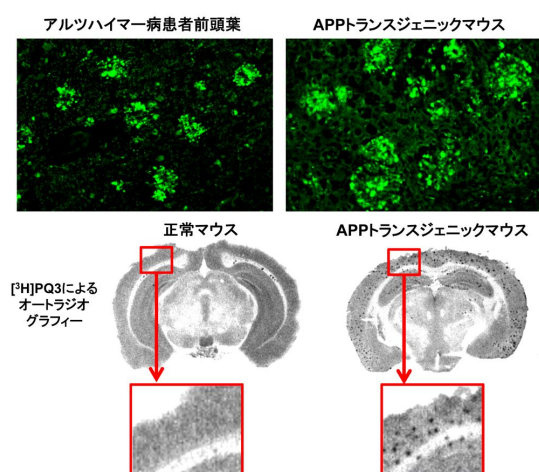


図 5 脳切片の QC 免疫染色像（上段）と、 $[^3\text{H}]$ PQ3 によるオートラジオグラフィー像。

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 56 件)

- 1) Kimura, Y., 他 7 名, Higuchi, M., Zhang, M. R., Suhara, T. (2016) A new method to quantify tau pathologies with ^{11}C -PBB3 PET using reference tissue voxels extracted from brain cortical gray matter. *EJNMMI Res.* 6: 24.
- 3) Kimura, Y., 他 12 名, Higuchi, M., Zhang, M. R., Suhara, T. (2016) $[^{11}\text{C}]$ TASP457, a novel PET ligand for histamine H3 receptors in human brain. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* Published online, DOI:10.1007/s00259-016-3332-6
- 4) Koga, K., Maeda, J., 他 11 名, Suhara, T., Higuchi, M. (2016) Development of TASP0410457 (TASP457), a novel dihydroquinolinone derivative as a PET radioligand for central histamine H3 receptors. *EJNMMI Res.* 6: 11.
- 5) Eldrige, M. A. G., 他 6 名, Higuchi, M., Minamimoto, T., Rishmond, B. J. (2016) Chemogenetic disconnection of monkey orbitofrontal and rhinal cortex reversibly disrupts reward value. *Nat. Neurosci.* 19: 37-39.
- 6) Oi, N. 他 5 名, Maeda, J., Minamimoto, T., Zhang, M. R., Suhara, T., Higuchi, M. (2015) Development of novel PET probes for central 2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionic acid (AMPA) receptors. *J. Med. Chem.* 58: 8444-8462.
- 9) Ji, B., 他 12 名, Suhara, T., Higuchi, M. (2015) Distinct binding of amyloid imaging ligands to unique amyloid-deposited in the presubiculum of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 135: 859-866.
- 10) Kimura, Y., 他 11 名, Suhara, T., Higuchi, M. (2015) PET quantification of tau pathology in human brain with ^{11}C -PBB3. *J. Nucl. Med.* 56: 1359-1365.
- 11) Tiwari, A., 他 10 名, Maeda, J., Higuchi, M., Wang, F., Zhang, M. R. (2015) $[^{18}\text{F}]$ FEBMP: Positron emission tomography imaging of TSP0 in a model of neuroinflammation in rats, and invitro autoradiograms of the human brain. *Theranostics* 5: 961-969.
- 12) Endo, T., 他 8 名, Suhara, T., Higuchi, M. (2015) Quantification of central substance P receptor occupancy by aprepitant using small animal positron emission tomography. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 18: 1-10.
- 14) Chen, C. J. 他 16 名, Suhara, T., Higuchi, M., Yamada, K., Ji, B. (2015) In vivo SPECT imaging of amyloid- β deposition with radioiodinated imidazo[1,2-a]pyridine derivative DRM106 in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Nucl. Med.* 56: 120-126.
- 15) Chen, C. J., 他 13 名, Higuchi, M., Suhara, T., Yamada, K., Ji, B. (2014) Synthesis and biological evaluation of novel radioiodinated imidazopyridine derivatives for amyloid- imaging in Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* 22: 4189-4197.
- 16) Hashimoto, H., 他 15 名, Suhara, T., Higuchi, M., Zhang, M. R. (2014) Radiosynthesis, photoisomerization, biodistribution, and metabolite analysis of ^{11}C -PBB3 as a clinically useful PET probe for imaging of tau pathology. *J. Nucl. Med.* 55: 1532-1538.
- 17) Hattori, S., 他 4 名, Suhara, T., Higuchi, M., Miyakawa, T. (2013) In vivo evaluation of cellular activity in CaMKII heterozygous knockout mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *Front. Integr. Neurosci.* 7: 76.

- 23) Maruyama, M., Shimada, H., Suhara, T., Shinotoh, H., Ji, B., Maeda, J., 他 18 名, Higuchi, M. (2013) Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron* 79: 1094-1108.
- 24) Ji, B., 他 9 名, Suhara, T., Higuchi, M. (2013) Assessment of radioligands for PET imaging of cyclooxygenase-2 in an ischemic neuronal injury model. *Brain Res.* 1533: 152-162.
- 25) Oi, N., 他 7 名, Suhara, T., Higuchi, M. (2013) Synthesis and evaluation of novel radioligands for positron emission tomography imaging of the orexin-2 receptor. *J. Med. Chem.* 56:6371-6385.
- 26) Kanekiyo, K., 他 3 名, Maeda, J., Higuchi, M., Kizuka, Y., Korekane, H., Matsuo, I., Honke, K., Taniguchi, N. (2013) Loss of branched O-mannosyl glycans in astrocytes accelerates remyelination. *J. Neurosci.* 33: 10037-010047.
- 28) Takao, K., 他 10 名, Maeda, J., 他 8 名, Higuchi, M., Usuda, N., Suhara, T., Nishi, A., Matsumoto, M., Ishii, S., Miyakawa, T. (2013) Deficiency of Schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38: 1409-1425.
- 29) Iwata, N., 他 5 名, Higuchi, M., Staufenbiel, M., Muramatsu, S., Saido, T. C. (2013) Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice. *Sci. Rep.* 3: 1472.
- 30) Yamada, M., 他 10 名, Higuchi, M., Suhara, T. (2013) Superiority illusion arises from resting-state brain networks modulated by dopamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110:4363-4367.
- 31) Harada, R., 他 4 名, Higuchi, M., Yoshikawa, T., Arai, H., Iwata, R., Kudo, Y., Yanai, K. (2013) Comparison of the binding characteristics of [¹⁸F]THK-523 and other amyloid imaging tracers to Alzheimer's disease pathology. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 40: 125-132.
- 33) Saijo, T., Maeda, J., 他 7 名, Suhara, T., Higuchi, M. (2012) Presynaptic selectivity of a ligand for serotonin 1A receptors revealed by in vivo PET assays of rat brain. *PLoS ONE* 7: e42589.
- 35) Kobayashi, K., Haneda, E., Higuchi, M., Suhara, T., Suzuki, H. (2012) Chronic fluoxetine selectively upregulates dopamine D1-like receptors in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 37: 1500-1508.
- 37) Yasuno, F., Kosaka, J., Ota, M., Higuchi, M., 他 6 名, Suhara, T. (2012) Increased binding of peripheral benzodiazepine receptor in mild cognitive impairment-dementia converter measured by positron emission tomography with [¹¹C]DAA1106. *Psychiatry Res.* 203: 67-74.
- 38) Higuchi, M., 他 4 名, Maeda, J., Ji, B., Ono, M., Staufenbiel, M., Suhara, T., Saido, T. C. (2012) Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J.* 26: 1204-1217.
- 40) Yamasaki, T., Fujinaga, M., Maeda, J., 他 6 名, Higuchi, M., Suhara, T., Fukumura, T., Zhang, M. R. (2012) Imaging for metabotropic glutamate receptor subtype 1 in rat and monkey brains using PET with [¹⁸F]FITM. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39: 632-641.
- 41) Fujinaga, M., Maeda, J., 他 7 名, Higuchi, M., Suhara, T., Fukumura, T., Zhang, M. R. (2012) Characterization of 1-(2-[¹⁸F]fluoro-3-pyridyl)-4-(2-isopropyl-1-oxoisindoline-5-yl)-5-methyl-1H-1,2,3-triazole, a PET ligand for imaging the metabotropic glutamate receptor type 1 in rat and monkey brains. *J. Neurochem.* 121: 115-124.
- 42) Takeuchi, H., Iba, M., Inoue, H., Higuchi, M., 他 4 名, Miyakawa, T., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., Takahashi, R. (2011) P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. *PLoS ONE* 6: e21050.
- 43) Maeda, J., 他 14 名, Suhara, T., Higuchi, M. (2011) In vivo positron emission tomographic imaging of glial responses to amyloid- β and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders. *J. Neurosci.* 31: 4720-4730.
- [学会発表](計 13 件)
- 1) Higuchi M., “Conformational heterogeneity of tau lesions captured by PET and its clinical significance”, 14th Athens/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy, March 9-12, 2016.
- 2) Higuchi M., “Imaging tau: lessons learned relevant to alpha-synuclein imaging”, Workshop on In vivo molecular imaging of alpha-synuclein, Stockholm,

Sweden, December 18, 2015.

- 3) Higuchi M, "New Neuroimaging Tools For FTD Syndromes And Their Clinical Application", Asia pacific FTD & MND Meeting, Sydney, Australia, October 8-9, 2015.
- 4) Higuchi M, "Tracking tau pathogenesis in living brains", 9th International Congress of the Asian Society Against Dementia, Kumamoto, Kumamoto, September 14-16, 2015.
- 5) Higuchi M, "Novel proteinopathy based tracers for diagnosis" (Plenary Lecture), 19th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, San Diego, USA, June 14-18, 2015.
- 6) Higuchi M, "Translational Molecular Imaging of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders", Seminar at Neurocentrum Ulm, Ulm, Germany, December 8, 2014.
- 7) Higuchi M, "Imaging distinct strains of tau fibrils in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders", Brain Conference 2014, Seoul, Korea, November 7, 2014.
- 8) Higuchi M, "Imaging diverse tau fibril strains in tauopathies", 9th International Conference on Frontotemporal Dementias, Vancouver, Canada, October 23-25, 2014.
- 9) Higuchi M, "Tau PET imaging in animal models and humans", Alzheimer's Association International Conference 2014, Copenhagen, Denmark, July 12-17, 2014.
- 10) Higuchi M, "Visualization of reciprocal links between inflammation and neurodegenerative pathogenesis in Alzheimer's disease", International Symposium on Inflammation and Disease, Taipei, Taiwan, September 8-9, 2011.

〔図書〕(計3件)

- 1) 佐原成彦、樋口真人 (2015) タウ PET イメージングによる認知症研究の新展開、認知症の脳画像診断 早期検出と鑑別をめざして、西村恒彦・他編、メジカルビュー社 pp162-167
- 2) 樋口真人 (2014) 毒性因子の伝達機構を標的とした脳内環境の分子イメージング、高橋良輔・他編、メディカルドゥ社 pp170-177
- 3) 丹羽文俊、島田斉、樋口真人、須原哲也 (2014) 新しい画像診断 - アミロイド・タウイメージング -、最新医学別冊 新しい診断と治療の ABC 82/神経 3 アルツハイマー型認知症 改訂第2版、田平武編、最新医学社 pp109-118

〔産業財産権〕
出願状況(計2件)

名称: H3 受容体の放射性標識リガンド
発明者: 船越竹雄、古閑一実、大道満里、中村年男、須原哲也、福村利光、破入正行、樋口真人、前田純
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2012-194480
出願年月日: 2012年9月4日
国内外の別: 国内特許出願

名称: [¹¹C] and [¹⁸F] Labeled 1,3-Diphenyl-5-(pyrimidin-2-yl)-pyridin-2(1H)-one Derivatives and Their Use For Imaging of The AMPA Receptor
発明者: 大井紀人、山本昇、鈴木成教、中谷陽介、須原哲也、張明栄、福村利光、樋口真人、南本敬史、前田純、徳永正希、永井裕司
権利者: 同上
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/060233
出願年月日: 2014年2月4日
国内外の別: 国際特許出願

取得状況(計1件)

名称: 脳内に蓄積したタウタンパク質をイメージングするための新規化合物
発明者: 樋口真人、須原哲也、丸山将浩、張明栄、島田斉
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 第 5422782 号
取得年月日: 2013年11月29日
国内外の別: 国内特許

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.nirs.go.jp/rd/bfi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 真人 (HIGUCHI, Makoto)
放射線医学総合研究所・分子イメージング
研究センター・チームリーダー
研究者番号: 10373359

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし