

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510322

研究課題名(和文) ヒト脳を使用したタウ蛋白凝集体イメージングプローブの新規探索システムの開発

研究課題名(英文) Novel Affinity Screening System of PET Probe for Tau aggregates using Human Brain Tissue Microsection

研究代表者

吉見 立也 (Yoshimi, Tatsuya)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・治療薬探索研究部・研究員

研究者番号：30277256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：今回、世界初のイメージング質量分析を用いた生体組織親和性化合物のスクリーニングシステムを開発し、それを用いてアルツハイマー病ヒト脳内のタウ凝集体に親和性をもつ数種の候補化合物を得た。このシステムでは多数のマイクロ切片チップを作成し、スクリーニングに使用する。また、上記候補化合物より、タウに直接結合するリード化合物を詳細解析により得られれば、タウを標的としたPET標識化合物および治療薬の創成に向けての第一歩となり、意義深い結果である。この新開発のスクリーニングシステムは薬物動態の研究、微小癌組織の標識化合物等の開発にも応用可能であり、本研究の結果は創薬及び医療の発展に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a novel screening system for affinity chemical compounds visualizing a pathogenic protein, Tau, aggregates in human brain. This system uses tiny stainless microchips to make a number of small frozen brain sections, and imaging mass spectrometry is used for affinity selection of the chemicals. We have screened several affinity chemical compounds which have high affinity to Tau accumulated brain of Alzheimer's disease patient. The system will be useful on drug screening and kinetics analyses. The result will make a contribution to drug discovery and diagnosis of Alzheimer's disease.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：イメージング質量分析 アルツハイマー病 タウ 創薬スクリーニング 薬物動態 PET化合物 神経変性疾患 ロボットシステム

### 1. 研究開始当初の背景

(1)これまでのアルツハイマー病(AD)の治療法の開発は「アミロイド仮説」に基づき、主に神経変性・脱落の原因物質とされるアミロイドペプチド(A $\beta$ )の産生抑制あるいは免疫力を利用した除去に注目して行われてきた。しかし、A $\beta$ の切り出しを行うセクレターゼの阻害をターゲットとした治療薬(Semagacestat, Tarenflurbil)やワクチン療法(治験名 AN-1792)など、いずれも臨床試験で効果が実証されず開発が中止となっている。これらの結果を踏まえ、ADのもう一つの病理学的特徴であるタウ蛋白代謝異常に注目が集まっている。

(2)タウ蛋白代謝異常とは、高度リン酸化されたタウ蛋白凝集体である神経原線維の神経細胞内の蓄積であり、これが神経細胞死の直接的な原因と考えられている。本蓄積はA $\beta$ の凝集体である老人斑の沈着から約10年遅れて生じ、ADの進行に伴い海馬傍回から大脳皮質へと次第に拡大する。しかし、最近タウ蛋白が重合したオリゴマー体に神経毒性が見出され、さらに樹状突起に存在するタウ蛋白がA $\beta$ の神経毒性の発現に関与していることも解明され、その重要性が再認識されている。従って、タウ蛋白の重合・凝集阻害剤や機能阻害剤がAD治療薬となる可能性があり、これらを標的にした創薬が開始されている。タウ蛋白を標的にした薬剤の開発(薬効評価)には、そのオリゴマー体や神経原線維(高リン酸化タウ蛋白凝集体)の蓄積を非侵襲/低侵襲的に分子イメージングするプローブが有用であるが、未だ臨床応用可能な化合物は開発されていない。

### 2. 研究の目的

高齢化が急速に進む我が国では認知症患者が急増している。なかでも、認知症の大半を占めるアルツハイマー病の治療法が確立しておらず、一日も早い治療薬の開発が待たれている。これまで「アミロイド仮説」に基づき神経変性の原因物質とされるアミロイドペプチドの産生抑制剤の開発や免疫療法の開発が進められてきたが、臨床試験で有効な薬剤や免疫療法は未だに開発されていない。このような状況にあって、ADの神経細胞死に直結するタウ蛋白代謝異常を標的にした薬剤や免疫療法の開発が最近開始されている。本研究では脳内のタウ蛋白代謝異常の診断及びその代謝異常抑制剤の創薬に必要なとされる画期的なスクリーニングシステムを開発する。

### 3. 研究の方法

本研究ではタウ蛋白凝集体に親和性の高いプローブを化合物ライブラリー及び新規ペプチドライブラリーから大規模にスクリーニングする画期的なシステムを開発する。本システムでは、生体内での存在状態に近いタウ蛋白凝集体に結合する化合物を得るため

に、右図のようにヒトAD脳凍結切片を使用し、さらに近年技術的進歩の著しい質量顕微鏡(MALDI-TOF/MS:マトリクス支援飛行時間型質量分析装置)を用いた分子イメージングにより当該凝集体に特異的に結合する化合物のスクリーニング法を開発する。加えて、従来の化合物ライブラリーにない構造多様性を担保するために分子生物学的に新規ペプチドライブラリーを大腸菌で作製する。

### 4. 研究成果

(1)本研究においては当センターの長寿医療研究開発費と併せて、下記に示すロボットスクリーニングシステムを完成した。本システムは凍結脳組織小切片作製ユニット(Fig.1,2) 化合物添加洗浄ユニット(当センター所有) 分子イメージング化合物結合評価ユニット(Fig.3,4)から構成される。

凍結脳組織小切片作製ユニット(Fig.2)で2.4 mm角の組織小切片を大量に作成し、ロボットハンド専用プログラムにより専用の96穴プレートに移し、化合物添加洗浄ユニットにて、大規模スクリーニング用の専用プログラムを開発し化合物の添加を行った。



Fig.1 ロボットハンドシステム全景

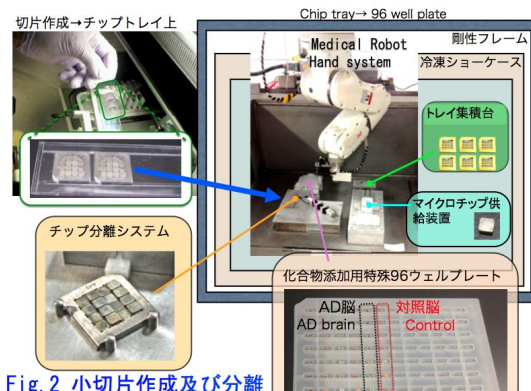


Fig.2 小切片作成及び分離

化合物結合評価ユニット(Fig.3)にてタウ蛋白凝集体に特異的に結合する化合物をイメージング質量分析法により選択した。化合物の選択は、質量分析装置付属のイメージ

ング機能にてタウ蛋白質が蓄積した AD 脳と正常脳のイメージ画像を生成した。



Fig. 3 脳組織小切片への化合物添加及びイメージング

AD 親和性化合物の選択は、Fig.4 右下に示すように左右の検出強度の比較により行い、結果として 3090 の創薬準備化合物ライブラリー中より、候補化合物 5 種を得た (Fig.5)。

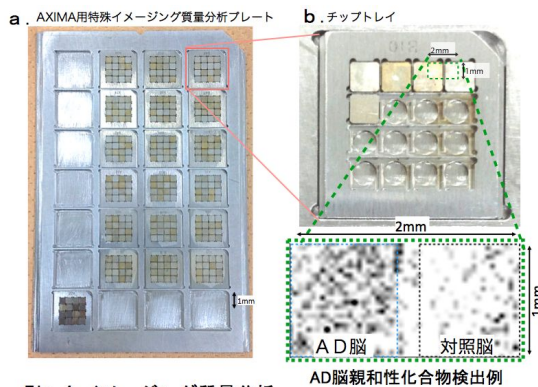


Fig. 4 イメージング質量分析

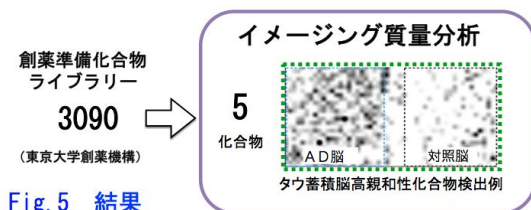


Fig. 5 結果

今回、世界初のイメージング質量分析を用いた生体組織親和性化合物のスクリーニングシステムを開発し、それを用いてアルツハイマー病ヒト脳内のタウ凝集体に親和性をもつ数種の候補化合物を得た。このシステムでは多数のマイクロ切片チップを作成し、スクリーニングに使用する。また、上記候補化合物より、タウに直接結合するリード化合物を詳細解析により得られれば、タウを標的とした PET 標識化合物および治療薬の創成に向けての第一歩となり、意義深い結果である。この新開発のスクリーニングシステムは薬物動態の研究、微小癌組織の標識化合物等の開発にも応用可能であり、本研究の結果は創薬及び医療の発展に寄与できると考えられる。

## 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 1 件)

Lu, M., Williamson, N., Boschetti, C., Ellis, T., Yoshimi, T., Tunnacliffe, A. Expression-level dependent perturbation of cell proteostasis and nuclear morphology by aggregation-prone polyglutamine proteins. *Biotechnology & Bioengineering* Vol. 112. DOI: 10.1002/bit.25606 (in press) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

吉見立也、イメージング質量分析法によるタウ凝集体 PET 化合物スクリーニング、イメージング質量分析の最前線：創薬と生命科学への応用、第 87 回生化学会大会フォーラム 4F04、2014 年 10 月 15～18 日、京都(招待講演)

滝川修、吉見立也、田中耕一、川畑慎一郎、凍結組織切片のイメージング質量分析による病原蛋白 PET 診断薬開発システム Screening System of PET Probes for Pathogenic Protein Aggregates in Frozen Tissue Sections Using Imaging Mass Spectrometry、メディカルジャパン 2015 大阪、アカデミックフォーラム A-4、2015 年 2 月 4～6 日、インテックス大阪

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：微小生体組織片の作製装置、作製方法、及び化合物のスクリーニング方法

発明者：滝川修、吉見立也、田中耕一、川畑慎一郎

権利者：独立行政法人国立長寿医療研究センター、株式会社島津製作所

種類：特許

番号：特願 2014-212627

出願年月日：平成 26 年 10 月 17 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 1 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.ncgg.go.jp/department/lrs/lead01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉見立也 (Tatsuya Yoshimi)  
国立長寿医療研究センター・治療薬探索研究部・研究員  
研究者番号：30277256

(2) 研究分担者

滝川修 (Osamu Takikawa)  
国立長寿医療研究センター・治療薬探索研究部・室長  
研究者番号：70163342

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：