アルツハイマー病理を標的とした分子イメージングプローブの開発

岡村 信行¹⁾, 原田 龍一²⁾, 古本 祥三³⁾,
中村 正帆¹⁾, 谷内 一彦^{2,3)}, 工藤 幸司⁴⁾

要約: アルツハイマー病患者の脳内では、アミロイドβタンパク質が発症前から凝集・蓄積してシナプス機能障害の原因となるほか、タウタンパク質の蓄積を介して神経変性をもたらすと考えられている(アミロイド仮説)。本仮説が正しければ、アミロイドβタンパク質およびタウタンパク質の凝集・蓄積を阻止することでアルツハイマー病の進行を阻止できるはずである。アルツハイマー病の根本治療法を確立するためには、治療薬の開発だけでなく、上記タンパク質蓄積量を非侵襲的にモニタリングするためのバイオマーカーが必要となる。本目的において、タンパク質特異的PETプローブを用いた生体イメージングの果たす役割は大きい。アミロイドPETやタウPETにおいては、線維化タンパク質が形成するクロスβ構造に対する親和性を有する低分子化合物を生体用プローブとして使用する。アミロイドβタンパク質を標的としたプローブは既存の病理用染色剤をベースに開発されてきたが、他のミスフォールディングタンパク質を標的としたプローブを開発するためには、新たなシード化合物の探索が求められる。プローブ候補化合物の結合性を証明するには、疾患脳サンプルを用いたナノモル濃度域での結合親和性および選択性の評価が必要である。本稿では、筆者らがこれまで進めてきた分子イメージングプローブの開発研究を紹介し、プローブ開発における課題を考察する。

1. はじめに

アルツハイマー病(AD)患者数は世界的に増加傾向にあり、予防へ向けた対策が急務とされている。AD

治療薬としてコリンエステラーゼ阻害薬やNMDA受容体拮抗薬が使用されているが、疾患の進行そのものを止める根本治療薬は未だ実現していない。AD患者の脳内では、アミロイドβタンパク質(Aβ)の細胞外沈着物である老人斑、過剰リン酸化タウタンパク質の細胞内沈着物である神経原線維変化が特徴的病理像として観察される。ADにおける神経変性を抑止するには、病態に深く関与すると考えられる上記タンパク質の蓄積プロセスを制御する必要がある。過去の病理組織学的研究から、Aβの脳大皮質における広範な蓄積がADの最初期病変として観察されてきた。Aβの前駆タンパク質であるamyloid precursor protein (APP)の遺伝子に変異が生じると、Aβが過剰に産生され、家族性ADを発症する。健常脳においてAPPは主としてαセクレターゼによるプロセッシングを受けるため、Aβの過剰産生は生じない。ところがAD患者脳ではβセクレターゼとγセクレターゼによるプロセッシングが主体となり、Aβの産生量が上昇する。γセクレターゼを構成するプレセニリンの遺伝子に変異が生じた場合にもAβの過剰産生がみられ、家族性ADを発症する。こうした理由から、AβがAD発症の主犯と考える「アミロイド仮説」が広く支持されてきた。AβにはC末端の異なる分子種として、40アミノ酸残基からなるAβ1-40と42アミノ酸残基からなるAβ1-42が存在する。Aβ1-42はAβ1-40よりも凝集性が高く、シードを形成してAβ線維化を促進する。Aβが線維化する過程において、数個から数十個のAβが重合したオリゴマーが形成される。このAβオリゴマーはAβ線維よりも神経毒性が強く、シナプス障害の原因になると考えられて

キーワード: アルツハイマー病, アミロイドβタンパク質, タウタンパク質, PET, 分子イメージング

¹⁾ 東北医科薬科大学 医学部 薬理学教室 (〒981-8558 宮城県仙台市青葉区小松島 4-4-1)

²⁾ 東北大学大学院 医学系研究科 機能薬理学分野 (〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 2-1)

³⁾ 東北大学サイクロトロン RI センター (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

⁴⁾ 東北大学加齢医学研究所 (〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 4-1)

E-mail: nookamura@tohoku-mpu.ac.jp 原稿受領日: 2017 年 7 月 12 日, 依頼原稿

Title: Development of molecular imaging probe targeted at Alzheimer's disease pathology

Author: Nobuyuki Okamura, Ryuichi Harada, Shozo Furumoto, Tadahiko Nakamura, Kazuhiko Yanai, Yukitsuka Kudo

いる(1)。実際、AD 患者の脳組織から抽出した A β オリゴマーをラット脳内に注入すると、シナプス機能障害が生じることが確認されている。したがって A β モノマーに結合し、オリゴマー化を抑制する凝集阻害薬が開発されれば、AD 治療薬として期待できる。また A β を免疫学的機序によって脳内から排除する抗体や A β の産生を抑止する β セクレターゼの阻害薬も治療薬として期待され、臨床試験が進行中である。しかしながら初期の A β ワクチンの臨床試験では、A β の排除に成功したにもかかわらず認知症の進行阻止を実現できておらず(2)、抗 A β 薬の限界を指摘する声がある。別の解釈として、治療開始のタイミングの遅れが不十分な薬効の原因とも考えられるので、未発症高リスク者に抗 A β 薬を投与する予防的治療介入の効果が現在検証されている。その詳細な機序は不明であるが、A β の蓄積はタウタンパク質の大脳皮質への蓄積を促進する。タウタンパク質の細胞内蓄積はグリア細胞の活性化を通じて神経細胞死を導くため、タウタンパク質も有力な治療標的として位置付けられている。タウタンパク質も A β と同様、オリゴマー化がシナプス障害や神経細胞死に強く関与すると考えられることから、凝集阻害薬の探索や抗体薬の開発が進められている(3)。

AD の早期診断は容易ではなく、AD として臨床診断が下されても実際には A β 蓄積がみられない誤診例が少なくない。臨床症状のみに基づいた診断プロセスでは誤診が避けられないため、診断補助検査としてバイオマーカーが活用される。AD では発症前段階から A β の脳内蓄積が進むことが最近の PET 研究によって明らかにされている。したがって病初期段階からの予防的介入を図るには、脳内病変の存在を把握するためのバイオマーカーが不可欠となる。AD のバイオマーカーとしては、体液（血液や脳脊髄液）中の A β ・リン酸化タウ濃度測定、タンパク質特異的 PET プローブを用いたイメージングが挙げられる。脳脊髄液中 A β 濃度は脳内病理を反映するバイオマーカーとして広く活用されているが、腰椎穿刺が必要となるので健常人を対象としたスクリーニングには適さない。血液バイオマーカーは非侵襲的であり理想的なマーカーといえるが、脳内病変との対応関係が今のところ不明であり、他のマーカーとの併用が求められる。PET イメージングは体液バイオマーカーに比べると高コストではあるが、脳内病変を直接可視化し、その重症度を病変の空間分布も含めて定量的に計測できるという面で大きなメリットが存在する(4)。

2. PET プローブに求められる特性

PET はきわめて高感度な計測法であり、治療薬の 1000 分の 1 以下に相当する微量の標識薬物の生体内分布を画像化することができる。プローブは静脈内投与されるため、脳内病変を画像化するためにはプローブの脳血液関門 (BBB) 透過性を確保する必要がある(5)。抗体やペプチドを標識して静脈内投与しても生体計測可能な脳内濃度まで到達させることは難しいため、標的分子との結合性を有する脂溶性の低分子化合物がプローブとして使用される。脂溶性が高すぎると非特異的タンパク質や白質組織への結合が増し、バックグラウンドシグナルの増強につながるため、適度な脂溶性 (Log P が 1~3 前後) をもつことが望ましい。PET プローブの標識には、半減期 20 分の ^{11}C 、あるいは半減期 110 分の ^{18}F がよく利用される。 ^{11}C はメチル基に導入できるためプローブ設計が容易であるが、 ^{18}F に比べて半減期が短いため、標識合成した施設内での使用に限定される。 ^{18}F 標識薬剤は検査のスループットを上げやすく、取得される画像の SN 比も優れているので、最近が開発初期段階から ^{18}F 標識化を念頭に置いてプローブ設計が行われることが多い。画像データの解析では、特異的結合の存在部位 (関心領域) と非存在部位 (参照領域) の比がプローブ集積量の指標として算出される。プローブが標的分子に結合した後、非結合プローブが速やかに排出され、関心領域と参照領域との集積比がなるべく早期 (少なくとも投与後 2 時間以内) に一定になることが理想である。In vivo での画像化にはプローブの結合性能が重要であることは言うまでもなく、標的に対する高い結合親和性 (K_D もしくは K_i が少なくとも 20 nM 以下であること) が求められる。高齢者では多様なミスフォールディング病変が脳内に混在することも珍しくないため、標的以外のタンパク質への親和性を低く抑える必要もある。プローブの生体内における安定性も重要な特性の一つである。標識化された代謝物が脳内に移行しないことが望ましいが、仮に代謝物が BBB 透過性を有する場合には、その代謝物が標的との結合性を有するか否かを確認する必要がある。

3. β シート結合化合物のスクリーニング

A β やタウ、 α シヌクレインによるミスフォールディング病変は、タンパク質の二次構造である β シート構造が積層したクロス β シート構造を形成するため、 β シートへの親和性が高い低分子化合物がプローブ候補となる。生体脳内に蓄積したミスフォールディングタ

ンパク質の三次元構造解析は進んでおらず、理論的にプローブ設計を進めることは現状では難しい。そこでβシートとの結合性が確認されている Congo red や Thioflavin-T などの化合物を基にして、これらの誘導体を最適化することでプローブ開発が試みられてきた。 $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ は Thioflavin-T の誘導体であり、アミロイド PET プローブとして現在広く臨床で使用されている。著者らは株式会社ビーエフ研究所（大阪府吹田市、現在は解散）在籍時から PET プローブ候補化合物の探索を進めてきた。最初は病理用染色剤や工業用染料として入手可能な化合物から評価を始め、βシートへの結合に関与する構造を少しずつ特定しながら新規化合物をデザインし、独自の化合物ライブラリーの構築を進めてきた。先に述べたように、プローブの結合性に関しては親和性、選択性の両面での評価が求められる。結合性を厳密に評価するためには化合物を放射性同位元素で標識した上で結合実験を行う必要があるが、スクリーニング段階ではこのような非効率的な手法は使えない。そこで蛍光化合物である Thioflavin-T との競合阻害の有無を確認することによって、試験化合物のβシートへの結合親和性を簡易的に評価してきた。自家蛍光をもつ試験化合物は Thioflavin-T と蛍光波長が被ることで評価が難しい場合もあるが、代わりに老人斑や神経原線維変化との結合性を顕微鏡下で直接観察することができる。蛍光顕微鏡下での観察には通常マイクロモル濃度の化合物溶液が必要であるため、PET

プローブとして使用する際に問題となるナノモル濃度域での結合性を厳密に評価することは難しい。しかしながら相対的な蛍光強度の違いから、各タンパク質線維に対する結合親和性の強弱を大まかに推測することはできる。

著者らが最初にヒット化合物として同定したのは、Acridine Orange の誘導体である BF-009 である（図 1）。BF-009 およびこれをフッ素化した BF-108 は AD 患者の老人斑を脳組織切片上で染色したことから、プローブ候補化合物と考えられた(6)。しかしながら BF-108 を ^{18}F 標識化して評価した結果、Aβ との結合親和性、BBB 透過性ともにプローブとして満足できるレベルには無かった。続いてスチリルベンゾオキサゾール誘導体の SA-450 をヒット化合物として同定した。本化合物は Thioflavin-T と同様に 4 級アミンの化合物であるため、3 級アミンに置換することで BBB 透過性の改善を図った。ポジトロン標識化した同誘導体 BF-168 および BF-227 は、APP トランスジェニックマウスへ静脈内投与することによって、脳内アミロイド斑を明瞭に描出した(7, 8)。BF-227 の臨床研究においても AD 患者の大脳皮質でプローブの高集積がみられ、AD 診断における有用性が確認された。しかしながら $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ などと比べると病変部のコントラストは不良であった。その後の解析の結果、BF-227 の AD 患者脳組織との親和性 ($K_D = 25 \text{ nM}$) (9) が PiB ($K_D = 2.5 \text{ nM}$) (10) に比べて相対的に低いことが原因と考えられた

図 1 βシート結合プローブの化学構造式

ため、以後のプロープ開発においては患者脳組織との K_D 値もしくは K_i 値が 10 nM 以下であることを目標に研究を進めた。

β シート結合プロープは様々なミスフォールディング病変を検出する潜在力を有する。実際、BF-227 は α シヌクレインタンパク質線維にも結合し (9), α シヌクレイノパチーの一つである多系統萎縮症の患者脳で高集積を示すことが確認されている (11)。BF-227 は多系統萎縮症におけるグリア細胞質封入体には高い親和性を示すが、パーキンソン病やレビー小体型認知症でみられるレビー小体の検出感度は高くない。著者らがスクリーニングによって見出した化合物の多くは自家蛍光を有しており、 β シートとの結合時に蛍光強度が増強する性質がある。BF-188 は AD 脳切片上において老人斑や神経原線維変化に結合するほか、レビー小体も明瞭に染色するので、多様な β シート病変への結合性を有する化合物と考えられる。ベンズイミダゾール誘導体 (BF-126, BF-188) はまた、神経原線維変化との結合時に蛍光波長が高波長側へシフトする特性がある (図 2) (12)。イミダゾール環がタウタンパク質線維との特異な結合様式の形成に関与していると考えられる。励起波長を調整することによってタウタンパク質を他のタンパク質と区別して検出することができるが、本手法を生体イメージングに応用するには蛍光を長波長化する必要がある。700 nm 以上の近赤外領域の励起・蛍光波長を有する β シート結合化合物は、*in vivo* イメージングへの応用が期待できる (13)。AD の動物モデルである APP トランスジェニックマウスに近赤外蛍光プロープを静脈内投与することによって、脳内

に沈着したアミロイド斑との結合を反映した蛍光シグナルを観察することができる。

4. タウ PET プロープの開発

アミロイド PET プロープのスクリーニング中、神経原線維変化の染色性に優れた化合物群としてベンズイミダゾール誘導体とキノリン誘導体が偶然見出された (14)。著者らはキノリン誘導体 BF-170 を基にタウプロープの開発をこれまで進めてきた。BF-170 の ^{18}F 標識体である ^{18}F THK-523 は AD 脳切片上で明瞭にタウ病変を描出したほか、タウタンパク質が自然蓄積するトランスジェニックマウスの脳内でもプロープの高集積像が観察された (15)。しかしながらタウタンパク質に対する結合親和性や BBB 透過性が不十分であったため、結合親和性の向上と体内動態の改善をめざしてプロープの最適化を進めた。 ^{18}F THK-5105 や ^{18}F THK-5117 は ^{18}F THK-523 よりもタウタンパク質線維との結合親和性が高く、また ^{18}F THK-5117 は正常脳組織からのクリアランスも速やかであった (16)。2012 年以降、 ^{18}F THK-5105 と ^{18}F THK-5117 の臨床評価を実施し (17, 18), AD 患者のタウ病理好発部位である側頭葉下部におけるプロープ集積上昇を確認することができた。 ^{18}F THK-5105 や ^{18}F THK-5117 は ^{18}F 標識アミロイド PET プロープと同様に白質ミエリン線維との結合が目立つことが欠点であるため、 ^{18}F THK-5117 のベンゼン環をピリジン環に置換した ^{18}F THK-5351 も開発した (19)。 ^{18}F THK-5351 は他のプロープと同様、AD 患者の側頭葉において高集積を示すほか、皮質基底核症候群や進行性核上性麻痺などのタウオバ

図 2 ベンズイミダゾール誘導体 BF-126, BF-188 を用いたアルツハイマー病患者 (AD), レヴィ小体型認知症患者 (DLB) 脳切片の染色像 (左) と BF-188 の蛍光スペクトル (右)

神経原線維変化 (タウタンパク質) への結合時に、プロープの蛍光波長が長波長側へ移動する。(文献 12 より改変)

チー疾患の診断にも有用であった(20, 21). しかしながらモノアミン酸化酵素(MAO-B)への off-target binding が存在することが判明した(22). MAO-B はアストロサイトのミトコンドリア外膜に多く局在するため, AD 患者大脳皮質における THK-5351 集積は, タウ病理像および同部位で活性化されたアストログリアの増生を併せて反映していると考えられる. したがって THK-5351 は純粋なタウバイオマーカーとしては活用できないが, 非特異的な神経炎症の検出やモニタリングに寄与する可能性がある. 現在, タウおよびアストログリオシスを個別に検出できるよう, 新規プローブの開発を進めている.

5. おわりに

AD 疾患修飾薬の臨床治験において, 治療対象者のスクリーニング目的で PET イメージングが活用されている. 本手法の導入によって, 神経変性の進んでいない病初期から介入をはかり, 治療効果を最大限に引き出すことが期待されている. 同時に標的分子に対する作用を直接モニタリングすることで, 治療効果を客観的に見極めることも可能となる. 同様の予防的治療戦略が AD 以外の多様なミスフォールディング病でも想定されており, 個々の疾患に最適化させたプローブ開発を今後進める必要がある. これまでの研究で見出されたプローブのタウタンパク質や MAO-B への結合

性はセレンディピティの産物であり, 理論的なプローブ開発は実践できていない. ミスフォールディングタンパク質の 3 次元構造の解明が進むことで, 新たな標的タンパク質への選択的結合性を有するプローブ開発が加速するのではないかと期待している.

著者の利益相反: 岡村信行, 古本祥三, 工藤幸司(クリノ株式会社).

文 献

- 1) Murakami K. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014;78:1293-1305.
- 2) Holmes C, et al. *Lancet.* 2008;372:216-223.
- 3) Soeda Y, et al. *Nat Commun.* 2015;6:10216.
- 4) Okamura N, et al. *Expert Opin Med Diagn.* 2009;3:705-716.
- 5) Furumoto S, et al. *Curr Top Med Chem.* 2007;7:1773-1789.
- 6) Suemoto T, et al. *Neurosci Res.* 2004;48:65-74.
- 7) Okamura N, et al. *J Neurosci.* 2004;24:2535-2541.
- 8) Kudo Y, et al. *J Nucl Med.* 2007;48:553-561.
- 9) Fodero-Tavoletti MT, et al. *Eur J Pharmacol.* 2009;617:54-58.
- 10) Klunk WE, et al. *J Neurosci.* 2005;25:10598-10606.
- 11) Kikuchi A, et al. *Brain.* 2010;133:1772-1778.
- 12) Harada R, et al. *Mol Imaging Biol.* 2014;16:19-27.
- 13) Okamura N, et al. *J Alzheimers Dis.* 2011;23:37-48.
- 14) Okamura N, et al. *J Neurosci.* 2005;25:10857-10862.
- 15) Fodero-Tavoletti MT, et al. *Brain.* 2011;134:1089-1100.
- 16) Okamura N, et al. *J Nucl Med.* 2013;54:1420-1427.
- 17) Okamura N, et al. *Brain.* 2014;137:1762-1771.
- 18) Harada R, et al. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015;42:1052-1061.
- 19) Harada R, et al. *J Nucl Med.* 2016;57:208-214.
- 20) Kikuchi A, et al. *Neurology.* 2016;87:2309-2316.
- 21) Ishiki A, et al. *Eur J Neurol.* 2017;24:130-136.
- 22) Ng KP, et al. *Alzheimers Res Ther.* 2017;9:25.