

長寿医療研究開発費 平成 26 年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

タウ凝集体イメージング PET プローブの開発（26-29）

主任研究者 滝川 修 国立長寿医療研究センター

認知症先進医療開発センター 治療薬探索研究部 リード分子探索研究室 室長

研究要旨

高齢化が急速に進む我が国では認知症患者が増加している。中でも認知症の大半を占めるアルツハイマー病（AD）の治療法が確立しておらず、一日も早い根本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βペプチド（Aβ）の産生抑制剤の開発が進められてきたが臨床試験で有効な薬剤は未だに得られていない。このような状況下、ADの神経細胞死に直結するとされるタウ凝集体を標的にした薬剤の開発が進められている。最近、我々は脳内のタウ凝集体蓄積の診断およびその凝集抑制剤の創薬に有用なタウ凝集体イメージング PET プローブのために、タウ凝集体の native な構造を保持した凍結 AD 脳小切片を使用した高速スクリーニングシステムの開発に成功した。本年度は本システムを使用して druggable 化合物のスクリーニングを開始し、正常脳切片に比較してタウ凝集体が蓄積した AD 脳小切片に高い親和性を示す 5 化合物を得た。これらの化合物はいずれも分子量が 500 以下であり、脂溶性を表す指標 cLogP が -1.26 から +3.52 と高い構造多様性を示した。これらの化合物のタウ凝集体への結合を質量イメージング法により検証するために、高解像度質量顕微鏡（島津 iMScope）の解析条件を検討した。

主任研究者

滝川 修 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター 治療薬探索研究部 リード分子探索研究室 室長

分担研究者

村山 繁雄 東京都健康長寿医療センター・神経内科・バイオリソースセンター・高齢者ブレインバンク（神経病理） 研究部長

濱田 哲暢 国立がん研究センター研究所 TR 総合支援グループ 臨床薬理部門 部門長

河合 昭好 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター 治療薬探索研究部・医薬化合物開発室

研究期間 平成 26 年 4 月 1 日 ～ 平成 27 年 3 月 31 日

## A. 研究目的

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。現在約 450 万人の認知症患者が 25 年後には 400 万人に倍増すると予想されており、その 60% 近くを占めるのがアルツハイマー病 (AD) である。認知症は医療費や介護費用に家族の負担を含めると毎年約 14.5 兆円と巨額の社会的コストを国民に強いている (平成 26 年度厚生労働省調査結果)。従って、その治療法の開発が喫緊の重要課題となっており、特に、根本治療薬の開発が強く求められている。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  $A\beta$  の産生を抑制する  $\beta$ -及び  $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤や神経毒性の本体とされる  $A\beta$  オリゴマー形成阻害剤や免疫療法が試みられてきたが、臨床試験で有効な薬剤は未だに得られておらず、アミロイド仮説は支持を失いつつある。このような状況から神経細胞死に直結するタウ凝集体を標的にした創薬が開始されている。タウ標的薬剤の開発にはタウ凝集体の蓄積量を調べる PET プローブが必要である。本研究では、druggable 化合物ライブラリーの 1 次スクリーニングを実施し、タウ凝集体に特異的に結合する PET プローブ用リード化合物の取得を目的とした。

## B. 研究方法

### 1次スクリーニング

平成 23-25 年度長寿医療研究開発費を使用して開発したタウ凝集体 PET プローブスクリーニング装置を使用した。本装置は凍結脳組織小切片作製ユニット、化合物添加洗浄ユニット、分子イメージング化合物結合評価ユニットから構成され、まず、凍結脳組織小切片作製ユニットを使用して、タウ凝集体が大量に蓄積した AD 脳とそのような蓄積が見られない対照脳から 2.4mm 角の凍結小切片 (厚さ  $10\mu\text{m}$ ) を大量に作製した。これらのタウ蓄積脳小切片と対照脳小切片のペアに化合物 ( $10\mu\text{M}$ ) を添加し、タウ凝集体が蓄積した組織片にのみ選択的に結合する化合物を、高速処理可能な MALDI-TOF 型質量分析イメージング装置 (島津 AXIMA Resonance) を使用して探索した (1 次スクリーニング)。化合物のイオン化促進にはナノ微粒子 (nano-PALDI 法) を使用した。1 次スクリーニングで得られた候補化合物について高解像度質量顕微鏡を使用して、タウ凝集体への特異的結合の検証を試みた (2 次スクリーニング)。

### 凍結 AD 脳組織の収集

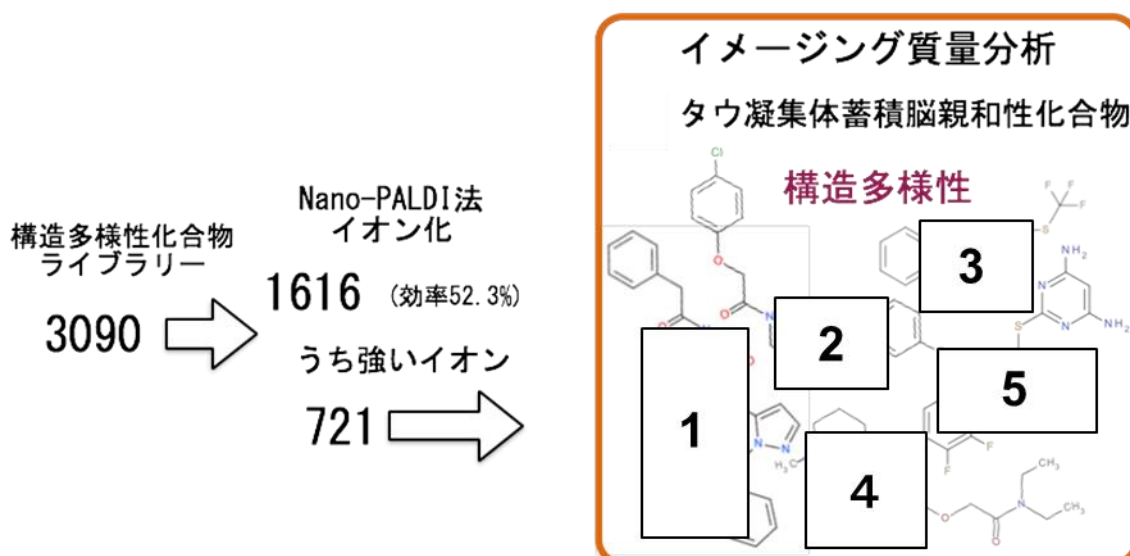
PET プローブの開発に必要な病理学的にタウ病変 (タウ凝集体の沈着陽性) のある凍結剖検脳の収集を継続した。

(倫理面への配慮)

剖検脳試料を使用した研究については国立長寿医療研究センター、国立がん研究センターおよび東京都健康長寿医療センターにおける倫理委員会の承認を得て実施した。

### C. 研究結果

これまでに 3,090 種類の druggable 化合物の中から、イオン化率が高い 721 化合物のイメージング質量分析スクリーニング(1次スクリーニング)を行い、タウ凝集体蓄積脳に高い親和性を示す 5 種類の化合物を得た(下図)。これら化合物は分子量 241 から 448、脂溶性を表す指標 cLogP が-1.26 から+3.52 の構造多様性を示す化合物であった。5 候補化合物のタウ凝集体への特異的結合を検証するため高解像度質量顕微鏡(島津 iMScope、国立がんセンター所有)を使用して解析条件を検討した。iMScope は 1 次スクリーニングで使用した AXIMA Resonance とはイオン化のレーザー出力や検出装置が異なるため、タウ凝集体に結合するとされる陽性コントロール(PBB3)を使用してイメージング質量分析の条件を確立した。



### D. 考察と結論

我々が開発したヒトの AD 脳組織小切片を使用するタウ凝集体 PET プローブスクリーニング装置が十分に 1 次スクリーニングにおいて機能し、PET 化合物の創生に有効な基盤技術となることが判明した。今後はさらに 1 次スクリーニングを継続して候補化合物を多数取得し、さらに質量顕微鏡を使用した 2 次スクリーニングへと進め、リード化合物を得る。

### E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanizaki, Y., Kobayashi, A., Toujima, S., Shiro, M., Mizoguchi, M., Mabuchi, Y., Yagi, S., Minami, S., Takikawa, O., Ino, K.: Indoleamine 2,3-dioxygenase promotes peritoneal metastasis of ovarian cancer via inducing immunosuppressive environment. *Cancer Sci.* 2014; 105:966-973 .
2. Hasegawa, H., Liu L., Tooyama I., Murayama S., Nishimura M.: The FAM3 superfamily member ILEI ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by destabilizing the penultimate amyloid-beta precursor. *Nat Commun* 2014; 5: 3917.
3. Hasegawa, M., Watanabe S., Kondo H., Akiyama H., Mann, D. M., Saito Y., Murayama S.: 3R and 4R tau isoforms in paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2014; 127: 303-305.
4. Ishibashi, K., Ishiwata K., Toyohara J., Murayama S., Ishii K.: Regional analysis of striatal and cortical amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 2014; 40: 2701-2706.
5. Ito, S., Takao, M., Hatsuta, H., Kanemaru, K., Arai, T., Saito, Y., Fukayama, M., Murayama, S.: Alpha-synuclein immunohistochemistry of gastrointestinal and biliary surgical specimens for diagnosis of Lewy body disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 1714-1723.
6. Iwata, A., Nagata, K., Hatsuta, H., Takuma, H., Bundo, M., Iwamoto, K., Tamaoka, A., Murayama, S., Saido, T., Tsuji S.: Altered CpG methylation in sporadic Alzheimer's disease is associated with APP and MAPT dysregulation. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 648-656.
7. Matsumoto, H., Sengoku, R., Saito, Y., Kakuta, Y., Murayama, S., Imafuku I.: Sudden death in Parkinson's disease: a retrospective autopsy study. *J Neurol Sci* 2014; 343: 149-152.
8. Miyashita, A., et al. Lack of genetic association between TREM2 and late-onset Alzheimer's disease in a Japanese population. *J Alzheimers Dis* 2014; 41(4): 1031-1038.
9. Nagao, S., Yokota, O., Ikeda, C., Takeda, N., Ishizu, H., Kuroda, S., Sudo, K., Terada, S., Murayama, S., Uchitomi, Y.: Argyrophilic grain disease as a neurodegenerative substrate in late-onset schizophrenia and delusional disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2014; 264: 317-331.
10. Oikawa, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Suzuki, A., Yanagisawa, K.: Influence of APOE genotype and the presence of Alzheimer's pathology on synaptic membrane lipids of human brains. *J Neurosci Res* 2014; 92: 641-650.
11. Qina, T., Sanjo, N., Hizume, M., Higuma, M., Tomita, M., Atarashi, R., Satoh, K.,

- Nozaki, I., Hamaguchi, T., Nakamura, Y., Kobayashi, A., Kitamoto, T., Murayama, S., Murai, H., Yamada M., Mizusawa, H.: Clinical features of genetic Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation in the prion protein gene. *BMJ Open* 2014; 4: e004968.
12. Saito, Y., Miyasaka, T., Hatsuta, H., Takahashi-Niki, K., Hayashi, K., Mita, Y., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Ariga, H., Hamakubo, T., Yoshida, Y., Niki, E., Murayama, S., Ihara, Y., Noguchi, N.: Immunostaining of oxidized DJ-1 in human and mouse brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014; 73: 714-728.
13. Sakurai, K., Tokumaru, A.M., Nakatsuka, T., Murayama, S., Hasebe, S., Imabayashi, E., Kanemaru, K., Takao, M., Hatsuta, H., Ishii, K., Saito, Y., Shibamoto, Y., Matsukawa, N., Chikui, E., Terada, H.: Imaging spectrum of sporadic cerebral amyloid angiopathy: multifaceted features of a single pathological condition. *Insights Imaging* 2014; 5: 375-385
14. Yamada, M., Tanaka, M., Takagi, M., Kobayashi, S., Taguchi, Y., Takashima, S., Tanaka, K., Touge, T., Hatsuta, H., Murayama, S., Hayashi, Y., Kaneko, M., Ishiura, H., Mitsui, J., Atsuta, N., Sobue, G., Shimozawa, N., Inuzuka, T., Tsuji, S., Hozumi, I. Evaluation of SLC20A2 mutations that cause idiopathic basal ganglia calcification in Japan. *Neurology* 2014; 82: 705-712.
15. Xie, C., Miyasaka T., Yoshimura S., Hatsuta H., Yoshina S., Kage-Nakadai E., Mitani S., Murayama, S., Ihara Y.: The homologous carboxyl-terminal domains of microtubule-associated protein 2 and TAU induce neuronal dysfunction and have differential fates in the evolution of neurofibrillary tangles. 2014; *PLoS One* 9: e89796
16. Araki, K., Nakano, Y., Kobayashi, A., Matsudaira, T., Sugiura, A., Takao, M., Kitamoto, T., Murayama, S., Obi, T.: Extensive cortical spongiform changes with cerebellar small amyloid plaques: the clinicopathological case of MV2K+C subtype in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology* 2014; 34: 541-546.
17. Kizuka, Y., Kitazume, S., Fujinawa, R., Saito, T., Iwata, N., Saido, T.C., Nakano, M., Yamaguchi, Y., Hashimoto, Y., Staufenbiel, M., Hatsuta, H., Murayama, S., Manya, H., Endo, T., Taniguchi, N.: An aberrant sugar modification of BACE1 blocks its lysosomal targeting in Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine* 2015; 7: 175- 189.
18. Kuninaka, N., Kawaguchi, M., Ogawa, M., Sato, A., Arima, K., Murayama, S., Saito, Y.: Simplification of the modified Gallyas method. *Neuropathology* 2015; 35 :10-15.
19. Oikawa, N., Matsubara, T., Fukuda, R., Yasumori, H., Hatsuta, H., Murayama, S., Sato, T., Suzuki, A., Yanagisawa, K.: Imbalance in Fatty-Acid-chain length of gangliosides triggers Alzheimer amyloid deposition in the precuneus. *PLoS One* 2015: 10:e0121356
20. Tagawa, K., Homma, H., Saito, A., Fujita, K., Chen, X., Imoto, S., Oka, T., Ito, H.,

Motoki, K., Yoshida, C., Hatsuta H., Murayama, S., Iwatsubo T., Miyano, S., Okazawa H.: Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet* 2015; 24: 540- 558.

21. Sabri, O., Sabbagh, M.N., Seibyl, J., Barthel, H., Akatsu, H., Ouchi, Y., Senda, K., Murayama, S., Ishii, K., Takao, M., Beach, T.G., Rowe, C.C., Leverenz, N.B., Ghetti, B., Ironside, J.W., Catafau, A.M., Stephens, A.W., Mueller, A., Koglin, N., Hoffmann, A., Roth, K., Reininger, C., Schulz-Schaeffer, W.J., for the Florbetaben Phase 3 Study Group:  $^{18}\text{F}$ -florbetaben PET imaging of amyloid plaques to detect Alzheimer disease: results from a multicenter histopathological Study. *Alzheimer & Dementia* 2015 (in press).

22. Hatsuta, H., Takao, M., Ishii, K., Ishiwata, K., Saito, Y., Kanemaru, K., Arai, T., Sahara, T., Shimada H, Shinotoh H, Tamaoka A, Murayama, S.: Amyloid beta Accumulation Assessed with  $^{11}\text{C}$ -Pittsburgh Compound B PET and Postmortem Neuropathology. *Curr Alzheimer Res* (in press)

23. Koabayashi, A., Matsuura, Y., Iwaki, T., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Takahashi, H., Murayam, S., Takao, M., Kato, S., Yamada, M., Kohri, S., Kitamoto, T.: Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease MM1+2C and MM1 Are Identical in Transmission Properties. *Brain Pathology* 2015 (in press)

24. Mitsui, J. et al., Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. *Ann Clin Transl Neurol* 2015; 2 :417- 426.

25. Shioya, A., Saito, Y., Arima, K., Kakuta, Y., Yuzuriha, T., Tanaka, N., Murayama, S., Tamaoka, A.: Neurodegenerative changes in patients with clinical history of bipolar disorders. *Neuropathology* (in press)

26. 滝川 修 トリプトファン代謝異常の病態生理学的意義：がんとアルツハイマー病を中心として、アミノ酸研究、8(1), 25-34, 2014.

## 2. 学会発表

1. Kayano M, Hirayama A, Washimi Y, Bundo M, Sakurai T, Tokuda H, Soga T, Niida S, Takikawa O. Blood biomarkers for Alzheimer's disease revealed by capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS)-based metabolomics. Tenth Annual International Conference of the Metabolomics Society, June 25, 2014, Tsuruoka, Japan.

2. Mikawa R, Okuno A, Takayanagi A, Okada K, Yoshimi T, Takikawa O. Characterization of Amyloid- $\beta$  Degrading Activity in Human Serum.

日本基礎老化学会第37回大会、平成26年6月26日、東浦

3. 滝川修、吉見立也（フォーラムオーガナイザー）：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 18 日、京都
4. 三河隆太、奥野海良人、高柳亜紀子、吉見立也、滝川修、ヒト血清中のアミロイドβ分解活性の同定、第 87 回日本生化学会大会、平成 26 年 10 月 18 日、京都
  5. Okuno A, Yoshimi T, Okumura K, Sawada K, Takikawa O.  
Development of High-speed and Super Sensitive Device for Detection of Amyloid-β Peptide Using an Ion Image Sensor.  
IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science(MHS) 2014, November 10-12, 2014, Nagoya.
  6. 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、メディカルジャパン 2015 大阪内アカデミックフォーラム、平成 27 年 2 月 4~6 日、大阪
  7. Izumi, Y., Sumikura, H., Fujita, K., Kamada, M., Shimatani, Y., Miyamoto, R., Koizumi, H., Miyazaki, Y., Hatsuta, H., Nodera, H., Nishida, Y., Murayama, S., Kaji, R.: Autopsy-proven amyotrophic lateral sclerosis coexisted with Parkinson disease: A novel association of TDP-43 proteinopathy and α-synucleinopathy. The 66th AAN Annual Meeting. April 26-May 3, 2014, Philadelphia, PA, USA
  8. Sabbagh, M., Seibyl, J., Stephens, A., Barthel, H., Ishii, K., Takao, M., Akatsu, H., Murayama, S., Christopher, Rowe., Ana, Catafau., Walter, Schulz-Schaeffer., Sabri, O.: A negative florbetaben PET scan reliably excludes amyloid pathology as confirmed by histopathology in a large Phase 3 trial. The 66th AAN Annual Meeting. April 26-May 3, 2014, Philadelphia, PA, USA
  9. Takao, M., Murayama, S., Sumikura, H., Nogami, A., Uchino, A., Nakano, Y., Hatsuta, H., Obata, M., Hirose, N.: Neuropathologic Analysis of 59 Centenarian Brains. The 90th Annual Meeting of the American Association of Neuropathologists. June 12-15 2014, Portland, OR, USA
  10. Satake, W., Ando, Y., Tomiyama, H., Kashihara, K., Mochizuki, H., Murayama, S., Takeda, A., Hasegawa, K., Tsuji, S., Yamamoto, M., Murata, M., Hattori, N., Toda, T.: Exome sequencing of Parkinson's disease in order to identify genetic variants with high disease-risk. 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. June 8-12, 2014, Stockholm Sweden
  11. Sengoku, R., Sumikura, H., Takao, M., Hatsuta, H., Nogami, A., Uchino, A., Saito, Y., Murayama, S.: Clinicopathological characteristics of pure type Lewy body disease with dementia (Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies). 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. June 8-12, 2014, Stockholm Sweden
  12. Miyamoto, R., Takeuchi, T., Sumikura, H., Fujita, K., Mure, H., Morigaki, R., Goto, S., Murayama, S., Izumi, Y., Kaji, R.: An autopsy case of predominant generalized

- dystonia in a patient with cerebellar atrophy. 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. June 8-12, 2014, Stockholm Sweden
13. Sanjo, N., Higuma, M., Hizume, M., Furukawa, F., Nakamura, Y., Kitamoto, T., Hamaguchi, T., Morikawa, F., Aoki, M., Tanaka, F., Nishizawa, M., Takeda, M., Inuzuka, T., Sato, K., Murai, H., Murayama, S., Satoh, K., Harada, M., Uyama, N., Fujita, K., Saito, N., Takumi, I., Tsukamoto, T., Yamada, M., Mizusawa, H.: Human prion diseases in Japan: a prospective surveillance from 1999. Asian Pacific Prion Symposium 2014 in Jeju. July 6-7, 2014, Jeju Korea
14. Takatsuki, H., Satoh, K., Atarashi, R., Sano, K., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Takao, M., Mihara, B., Murayama, S., Nishida, N.: Wide distribution of seeding activity in sporadic CJD patients. Asian Pacific Prion Symposium 2014 in Jeju. July 6-7, 2014, Jeju Korea
15. Stephens, A., Barthel, H., Ishii, K., Takao, M., Akatsu, H., Murayama, S., Rowe, C., Koglin, N., Catafau, A., Schulz-Schaeffer, W., Sabbagh, M., Sabri, O., Seibyl, J.: A negative florbetaben PET scan reliably excludes amyloid pathology as confirmed by histopathology. Alzheimer's Association International Conference 2014. July 12-17, 2014, Copenhagen, Denmark.
16. Kitazume, S., Kizuka, Y., Fujinawa, R., Saito, T., Iwata, N., Saido, T., Nakano, M., Yamaguchi, Y., Hashimoto, Y., Staufenbiel, M., Hatsuta, H., Murayama, S., Many, H., Endo, T., Taniguchi, N.: Glycosylation regulates degradation of BACE1 in lysosome. Alzheimer's Association International Conference 2014. July 12-17, 2014, Copenhagen, Denmark.
17. Kanemaru, K., Kanemaru, A., Murayama, S.: Assessment of CSF  $\alpha$ -synuclein levels distinguishes dementia with Lewy bodies from Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference 2014. July 12-17, 2014, Copenhagen, Denmark.
18. Murayama, S., Saito, Y. And the members of the Brain Bank Committee, the Japanese Society of Neuropathology: the Brain Bank Committee, the Japanese Society of Neuropathology: 18<sup>th</sup> International Congress of Neuropathology 2014. September 14-18, 2014, Rio de Janeiro, Brazil
19. Uchino, A., Takao, M., Saito, Y., Sumikura, H., Nakano, Y., Hatsuta, H., Nishiyama, K., Murayama, S.: Incidence of TDP-43 proteinopathy in aging human brain. 18<sup>th</sup> International Congress of Neuropathology 2014. September 14-18, 2014, Rio de Janeiro, Brazil
20. 濱田哲暢：フォーラム 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－創薬研究開発におけるイメージング質量分析への期待，第 87 回日本生化学会大会，2014.10.18，京都



G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

発明者：滝川修、奥野海良人、吉見立也、澤田和明、奥村弘一

発明の名称：化学・物理現象検出方法及びその装置

出願日：平成 26 年 5 月 28 日

出願番号：PCT/JP2014/064177

出願人：独立行政法人国立長寿医療研究センター・国立大学法人豊橋技術科学大学

発明者：滝川修、吉見立也、田中耕一、川畑慎一郎

発明の名称：微小生体組織片の作製装置の作製方法及び化合物のスクリーニング方法

出願日：平成 26 年 10 月 17 日

出願番号：特願 2014-212627

出願人：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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし