

近赤外蛍光イメージングプローブを用いたアルツハイマー病早期診断法の開発

研究代表者：東北大学大学院医学系研究科機能薬理学分野 准教授 岡村信行

共同研究者：東北大学サイクロトロン RI センター 教授 古本祥三

東北大学加齢医学研究所 学振特別研究員 原田龍一

【まとめ】

アミロイドβ、タウタンパクの蛍光イメージング法を開発するため、両タンパクへの結合性を有する蛍光化合物の探索を行った。アルツハイマー病患者脳切片を用いて結合性を評価した結果、老人斑、神経原線維変化を明瞭に染色し、特徴的な蛍光スペクトルを示す化合物が複数見出された。化合物はアミロイドβ、タウタンパクへの高い結合親和性と高い脳血液関門透過性を示し、生体用プローブとしての適性を有すると考えられた。

1. 研究の目的

アルツハイマー病 (AD) は認知症の最大の原因疾患であり、老人斑と神経原線維変化の脳内沈着によって特徴づけられる。老人斑はアミロイドβタンパク (Aβ)、神経原線維変化は過剰リン酸化したタウタンパクをそれぞれ主要構成成分とする。両タンパクは発症前から脳内に蓄積し、神経変性の誘因になると考えられている。したがってその脳内蓄積量を把握することは AD の早期診断に有用であるほか、適切な治療タイミング、治療対象者の決定においても重要な役割を果たす。

近年、ポジトロン断層法 (PET) を用いて Aβ やタウの脳内分布を可視化できるようになった。しかしながら PET 検査は多額な費用が掛かり、また放射線被ばくも伴う

ため、スクリーニング検査には適さない。我々は、放射線の代わりに生体組織透過性を有する長波長の蛍光プローブを用いて、非侵襲的に Aβ やタウを検出できないかと考えている。蛍光プローブを用いたイメージングを生体で実現する上で、乗り越えねばならない大きな課題が二つ存在する。一つは生体透過性の高い近赤外領域の波長を有するプローブを開発すること、もう一つはプローブ投与量が最小限になるように検出感度を高めることである。これまでの検討で、アミロイド線維との結合親和性を有する蛍光プローブの多くは、結合した際に蛍光量が増大し、また蛍光波長がシフトすることを確認している。もしプローブがタウタンパク線維に結合した際にみられる特有の蛍光スペクトルを計測できれば、未結合のプローブが発する蛍光と区別できるため、検出感度の向上につながる可能性がある。そこで我々は、複数の蛍光スペクトルを個別に検出可能なイメージング装置を用いて、Aβ やタウを検出する新たな蛍光プローブの探索を行った。

2. 研究の方法

2-1 化合物の入手

研究室内で保有する化合物ライブラリーの中から約 80 化合物を選定し、試験化合物とした。Thioflavin-S は Sigma 社から、Nile red は Organica 社から、FDDNP は田辺

R&D サービス社から、また ^3H 標識 PiB は American Radiolabeled Chemicals 社からそれぞれ購入した。

2-2 染色性の評価

試験化合物の染色性の評価には、病理学的に AD と診断された患者の大脳皮質脳切片を使用した。各化合物を最終濃度 $100\ \mu\text{M}$ となるように 50%エタノールで溶解し、厚さ $6\ \mu\text{m}$ の脳切片に化合物溶液を滴下した。その 10 分後に水、50%エタノールで洗浄を行った後、蛍光顕微鏡（ニコン製 Eclipse 80i）による観察を行った。蛍光フィルターとして、UVフィルター（excitation, 365/10 nm; dichroic mirror, 400 nm; barrier filter, 400 nm）、V フィルター（excitation, 380–420 nm; dichroic mirror, 430 nm; barrier filter, 450 nm）、BV フィルター（excitation, 400–440 nm; dichroic mirror, 455 nm; barrier filter, 470 nm）、B フィルター（excitation, 450–490 nm; dichroic mirror, 505 nm; barrier filter, 520 nm）の 4 種類を使用した。また蛍光スペクトルの計測には、PerkinElmer 社製 Nuance FX を使用した。脳切片上における $\text{A}\beta$ 、タウの存在を確認するため、同一もしくは隣接切片において抗 $\text{A}\beta$ 抗体（6F/3D、Dako 社製）、抗タウ抗体（AT8、Innogenetics 社製）を用いて免疫組織染色を行った。

2-3 結合親和性の評価

化合物の結合親和性を評価するため、合成 $\text{A}\beta$ 線維、タウ線維を用いて結合アッセイを行った。濃度 $1\ \text{nM}$ の ^3H 標識 PiB（比放射能 $2960\ \text{GBq/mmol}$ ）を異なる濃度の化

合物溶液と混和し、 $\text{A}\beta$ 線維、タウ線維（濃度 $200\ \text{nM}$ ）との結合を競合させることによって結合阻害定数（ K_i ）を測定した。ヒト $\text{A}\beta_{42}$ ペプチドはペプチド研究所より、K18 Δ K280 タウタンパクは Life technologies 社よりそれぞれ購入した。 K_i 値の算出には、GraphPad Prism (Ver.5) を使用した。

2-4 脳血液関門透過性の評価

化合物は 5%エタノールおよび 5%の tween 80 を含む生理的食塩水で溶解し、ICR マウス（7 週齢、雄）の尾静脈から投与した。投与 2 分後および 30 分後に脳を摘出し、ホモジネートを遠心後、その上清中に含まれる化合物濃度を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定した。動物実験は学内の委員会の承認を得て実施した。

3. 研究の成果

3-1 染色性の評価

まず AD 患者の大脳皮質脳切片を用いて、試験化合物の染色性を評価した。その結果、複数の試験化合物で老人斑、神経原線維変化との結合像を確認することができた。図 1 に代表的な化合物である化合物 X による染色像を示す。老人斑のコアを中心に $\text{A}\beta$ 線維が緑色に染色され、一方、神経原線維変のタウは赤く染色された。化合物による染色部位（老人斑、神経原線維変化）における蛍光スペクトルを図 2A に示した。化合物 X は、 $\text{A}\beta$ 線維との結合部位における蛍光波長のピークが $510\ \text{nm}$ 、タウ線維との結合部位における蛍光波長のピークが $600\ \text{nm}$ であり、 $\text{A}\beta$ 、タウのそれぞれに結合し

た際の蛍光スペクトルに際立った違いがみられた。多蛍光スペクトルイメージング装置を用いることで、両タンパクの空間分布を区別可能であり、緑色のスペクトル成分を抽出することによって A β 線維が、また赤色のスペクトル成分を抽出することによってタウタンパク線維が、それぞれ選択的に描出された (図 1 B、C)。

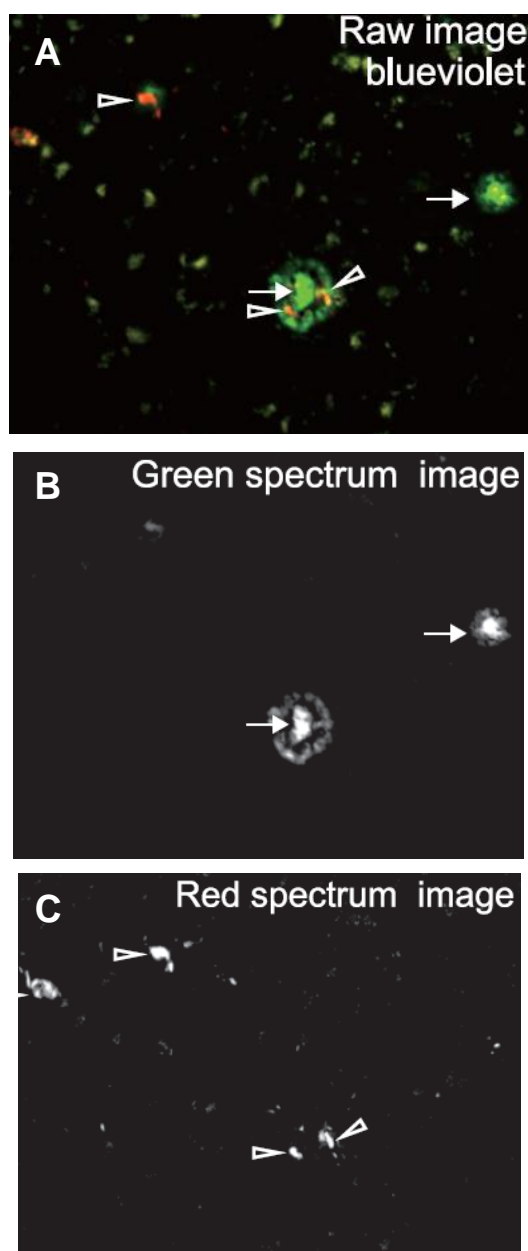


図 1 化合物 X によるアルツハイマー病脳切片染色像 (Bar = 50 μ m)

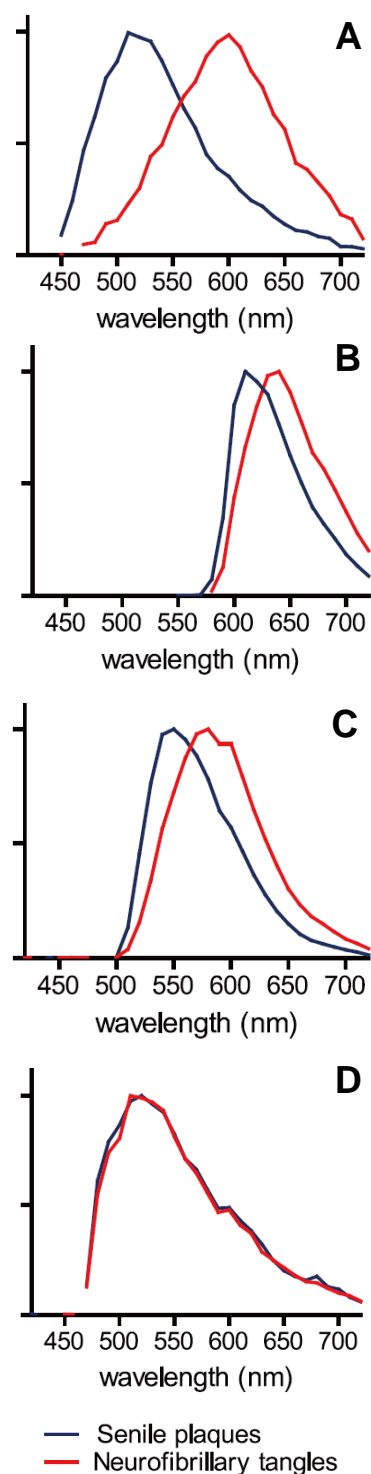


図 2 化合物 X (A)、Nile red (B)、FDDNP (C)、Thioflavin-S (D) の老人斑 (Senile plaques)、神経原線維変化 (Neurofibrillary tangles) との結合時の蛍光スペクトル

Nile red や FDDNP などの化合物でも老人斑、神経原線維変化のそれぞれに結合した際の蛍光スペクトルに違いがみられたが、化合物 X に比べるとその違いは軽微であった (図 2 B、C)。一方、代表的な病理染色剤として知られる Thioflavin-S では、両タンパクへの結合時の蛍光スペクトルに差が認められなかった (図 2 D)。

3-2 結合親和性の評価

試験化合物の A β 線維、タウ線維との結合親和性を、³H 標識 PiB との結合競合試験を行うことによって評価した。化合物 X は、A β 、タウタンパク線維との高い結合親和性 (K_i 値 10 nM 以下) を示し、アミロイド PET プローブとして使用されている PiB に匹敵する結合親和性を有していた。その他の複数の試験化合物においても同様の高い結合親和性が確認された。

3-3 脳血液関門透過性の評価

試験化合物の脳血液関門透過性を評価した結果、マウスへの静脈内投与 2 分後の脳移行量が 3 %ID/g 以上の化合物が複数見付き、生体用プローブとして十分な脳血液関門透過性を有すると考えられた。また投与 30 分後における脳内濃度はピーク時の 10%以下まで低下しており、正常組織からのクリアランスも良好と考えられた。

4. 今後の課題

今回検討した複数の試験化合物で、A β 、タウタンパクに結合した際の特徴的な蛍光スペクトルが観察された。蛍光スペクトルの違いによって両タンパクを明瞭に描き分けられることから、単一の蛍光プローブで

A β 、タウの特異的イメージングが実現できるのではないかとと思われる。結果に示した化合物 X は生体用蛍光プローブとしては波長が十分に長くないため、生体イメージングで両タンパクを検出することは困難であった。今後、本化合物の構造を改変することによって、近赤外光領域 (波長 700 nm 以上) の蛍光を発するプローブを開発する必要がある。近赤外光イメージングは検出装置の小型化や低コスト化が容易であり、また侵襲性も低いため、AD の新たなスクリーニング法として期待できる。本技術の早期実用化をめざして、今後も研究を進める予定である。

5. 研究成果の公表方法

本研究成果の一部は、山形ニューロサイエンス・医工学研究会 (2015 年 6 月、山形市) において発表した。これまで評価した化合物データをまとめて論文化する予定である。