

PET を用いたアルツハイマー病におけるミクログリア機能異常のイメージング
(20-3)

主任研究者 木村 泰之 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 (室長)

研究要旨

アルツハイマー病において、ミクログリアはその病態に、時期依存的に保護的にも増悪的にも関わっていることが、明らかになってきた。したがって、今後の治療戦略を立てるには、アルツハイマー病においてどの時期にどのようなミクログリアが役割を果たし、また機能異常を起こしているのか、明らかにする必要がある。しかし、臨床利用できる画像バイオマーカーの信頼性は十分ではない。また、ミクログリアの機能がノルアドレナリンによって調節され、ノルアドレナリン神経起始核の青斑核の変性が脳内ノルアドレナリン濃度低下を介して、ミクログリア機能異常をきたしているエビデンスが集まりつつあるが、この機能異常がアミロイドやタウの蓄積、神経変性といったアルツハイマー病の病態へ与える影響への総合的な理解は乏しい。

そこで、本研究では、アルツハイマー病の病態に深く関わるミクログリアの機能異常を PET イメージングで捉え、その病態解明を介して認知症の新規治療薬の開発に役立てることを目的とする。本研究課題では、①ミクログリアを特異的に標識する新規 PET リガンドの **first-in-human** 試験と、②ミクログリア機能異常を誘発したアルツハイマー病モデル動物における経時的 PET イメージングの二つの研究を並行して実施する。

本研究において、ミクログリア特異的なイメージングバイオマーカーを開発し、また老化等に伴うミクログリア機能異常の病態への影響を明らかにすることができれば、新たな薬剤開発や血液バイオマーカー開発の促進に大きく寄与する成果になると考えられる

主任研究者

木村 泰之 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 (室長)

分担研究者

小縣 綾 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 (特任研究員)

市瀬 正則 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 (特任研究員)

加藤 隆司 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 (室長)

飯島 浩一 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部（部長）

今村 真一 国立長寿医療研究センター 治療薬探索研究部（室長）

A. 研究目的

本研究の目的は、アルツハイマー病の病態に深く関わるミクログリアの機能異常を PET イメージングで捉え、その病態解明を介して認知症の新規治療薬の開発に役立てることである。

B. 研究方法

①ミクログリアを特異的に標識する新規 PET リガンドの first-in-human 試験

ミクログリアに特異的な分子として colony-stimulating factor 1 受容体を標的とした PET イメージングの臨床開発として、我々が開発した新規 PET 薬剤である [¹¹C]NCGG401 について前臨床安全性評価を実施した。

新規 PET リガンドの first-in-human 試験に向けて、[¹¹C]NCGG401 注射液の前臨床安全性評価を行った。[¹¹C]NCGG401 は、ミクログリアに特異的に発現する colony-stimulating factor 1 受容体を標的とした PET リガンドで、我々が開発し、ラット生体およびヒト脳組織切片においてその特異結合が確認されたものであるが、臨床的な有効性の評価が必要である。そこで、[¹¹C]NCGG401 のマイクロドーズ臨床試験を行うための前臨床安全性評価として、[¹¹C]NCGG401 注射液およびその有効成分 NCGG401 の拡張型単回投与毒性試験を、試験の信頼性が保証される GLP 施設であるボゾリサーチセンターにおいて実施した。

拡張型単回投与毒性試験の被験物質について、有効成分 NCGG401 の臨床試験における予定最大投与量は、投与時比放射能及びヒト投与放射能の規格値より 0.688 µg/kg と見積った。無毒性量の 100 分の 1 の用量を臨床投与量とすることができることから、想定最大臨床総投与量の約 100 倍の 70 µg/kg を試験投与量と設定した。また、[¹¹C]NCGG401 注射液のヒトへの最大投与量は 6 mL/60 kg と見積り、想定最大臨床総投与量の約 100 倍の 10 mL/kg を試験投与量と設定した。試験動物は安全性試験に広く用いられている SD ラットとし、それぞれに対照群をおいた 4 群について、2020 年 8 月 26 日に被験物質もしくは媒体を投与した。

また、[¹¹C]NCGG401 注射液を投与した時に被験者が受ける被曝線量を推定した。具体的には [¹¹C]NCGG401 注射液をマウスに尾静脈投与し、主要臓器における放射能をガンマカウンタで経時的に測定し、ヒトにおける経時的体内分布へと重量換算後に実効線量を推定した。

さらに、[¹¹C]NCGG401 注射液の製造について、プロセスバリデーションを行った。プロ

セスバリデーションとは、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ 注射液を臨床使用するにあたって、その製造手順、工程およびその他の製造管理、品質管理の方法が期待される結果を与えることを検証・文書化し、期待される品質の $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ 注射液を恒常的に製造できるようにするための試験である。

②ミクログリア機能異常を誘発したアルツハイマー病モデル動物における経時的 PET イメージング

アルツハイマー病モデルラットにおいて複数の時期に薬理学的に青斑核を変性させ、病態への影響を複数の PET イメージングで経時的に評価を行った。

まず、本研究に使用するモデル動物として、TgF344-AD ラットの繁殖、飼育を開始した。このモデルラットは、Fisher 344 をバックグラウンドに、Swedish 変異を含む human APP 遺伝子と deltaE9 変異を含む human PSEN1 遺伝子を発現し、加齢とともに皮質や海馬にアミロイドプラークが蓄積する。このモデル動物では、加齢とともにリン酸化タウの蓄積を認め、神経原線維変化 (NFT) 様の構造が認められる。ミクログリアおよびアストロサイトによるグリオシスも認められ、加齢とともに神経脱落が観察される。以上の性質より、アルツハイマー病に関連する病態の相互関係を経時的に PET イメージングで評価するモデル動物として、本研究において採用した。

次に、PET 薬剤を投与した動物は、放射性管理区域外で飼育することができないため、放射性管理区域内に比較的清浄な環境で長期飼育することを可能にする個別換気ケージを導入し、飼育環境を整えた。個別換気ケージとは、密閉されたケージそれぞれ個別に HEPA フィルターを通して給排気を行うシステムであり、清浄な飼育環境を維持することが可能である。さらに、個別換気ケージを導入するにあたって、放射性管理区域内飼育室の消毒および環境検査を行い、微生物学的清浄度が日本建築学会「実験動物施設の建設および設備」のガイドラインを満たしていることを確認した。また、ラットの飼育開始後、飼育ラックの排気ダストに設置したフィルターを定期的にサンプリングし PCR 検査する微生物モニタリングを開始し、清浄な飼育環境の維持体制を整えた。以上について実験動物管理委員会および動物実験倫理委員会にて審査を受け、TgF344-AD ラットに繰り返し PET 検査を行いつつ、最長 2 年間の飼育を可能とする許可を得た。

本研究では、複数の PET イメージングを用いて TgF344-AD ラットにおける病態の相互関係の評価を行う。ノルアドレナリン神経系の評価は、ノルアドレナリントランスポーターを標的とした PET リガンドである (S,S)- $[^{11}\text{C}]\text{methylreboxetine}$ (MRB) を用いて行うこととし、その当センターへの新規導入を行った。PET リガンドは、その標識核種の半減期が非常に短いため、臨床利用のためデリバリーされている一部のリガンドを除いて、実験を行う施設においてサイクロトロンと自動合成装置を用いた合成を都度行う必要がある。そこで、MRB の desmethyl 体を購入し、cold および hot 合成条件を検討し、一回の合成で 500-1300 MBq 程

度の $[^{11}\text{C}]\text{MRB}$ を動物実験用に提供することを可能とした。今後、製造工程のバリデーション後に短寿命放射性薬剤臨床利用委員会の審査で承認を得れば、臨床研究でノルアドレナリン神経の状態を観察するために使用することも可能である。

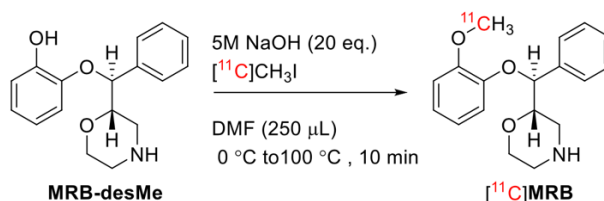


図 1、今回確立した $[^{11}\text{C}]\text{MRB}$ の当施設における合成スキーム

合成に成功した $[^{11}\text{C}]\text{MRB}$ を用いて、ノルアドレナリン神経系の状態を測定できるかを明らかにするため、健常ラットにノルアドレナリン神経の起始核である青斑核を傷害する薬剤を投与し、PET イメージングを実施した。青斑核の傷害は、ノルアドレナリン神経に比較的选择的に取り込まれる神経毒である N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP4)を用いて行った。健常な Fisher 344 ラットに、50 mg/kg もしくは 5 mg/kg の DSP4 を 1 週間毎に 2 回腹腔内投与し、1 週間後に $[^{11}\text{C}]\text{MRB}$ PET を実施して、脳内のノルアドレナリントランスポーター密度を測定した。DSP4 投与前に、選択的セロトニン再取り込み阻害薬であるフルオキセチン 10 mg/kg を腹腔内投与することで、セロトニン神経系を保護した。また、PET 終了後に脳を取り出し、脳内ノルアドレナリン濃度を HPLC と電気化学検出器を用いて測定した。

また、TgF344-AD ラットにおけるアミロイド蓄積の評価は $[^{18}\text{F}]\text{Flutemetamol}$ 、タウ蓄積の評価は $[^{18}\text{F}]\text{MK-6240}$ 、神経変性は $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 、ミクログリアの評価は、活性化ミクログリアとアストロサイトで高発現する translocator protein 18 kDa (TSPO)を標的とした $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$ と、上述の colony-stimulating factor 1 受容体を標的とした $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ を用いることとし、経時的な評価を開始した。 $[^{18}\text{F}]\text{MK-6240}$ は、加藤隆司 放射線診療部長が主任研究者である長寿医療研究開発費 研究課題 (30-3) において導入された第 2 世代タウ PET リガンドである。このリガンドは、ヒトにおいて、第 1 世代リガンドで問題となったオフターゲット結合が非常に少なく、アルツハイマー病におけるタウ蓄積の正確な評価が可能である。同研究課題において当センターにおける合成体制の構築が完了し、当センターの短寿命放射性薬剤臨床利用委員会の承認を得て、臨床研究への提供が開始され、同時に動物実験への提供も可能になった。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」や指針、ガイドラインに基づき、当センター動物実験取扱規定を遵守し、実施した。

C. 研究結果

1. 新規 PET 薬剤の前臨床安全性評価、製造法標準化

[¹¹C]NCGG401 注射液およびその有効成分 NCGG401 の拡張型単回投与毒性試験において、一般状態、血液化学検査、器官重量及び剖検所見について、投与翌日及び観察終了時検査において、雌雄いずれの群にも被験物質投与による変化はみられなかった。

また、[¹¹C]NCGG401 注射液を投与した時に被験者が受ける被曝線量を推定では、臓器線量は、ヒト成人男性及び女性において小腸（成人男性：9.99 μ Sv/MBq、成人女性：11.6 μ Sv/MBq）で最も高いことが確認された。実効線量は、ヒト成人男性で 4.0 μ Sv/MBq、女性で 4.8 μ Sv/MBq であると推定された。ヒトに[¹¹C]NCGG401 注射液を 370 MBq 投与した場合、実効線量はヒト成人男性で 1.5 mSv、成人女性で 1.8 mSv と推定され、一般的な ¹¹C 標識 PET リガンドと同程度の被曝線量であることを確認した。

さらに、プロセスバリデーションにおいて、3 回にわたって連続的に[¹¹C]NCGG401 注射液の合成に成功し、品質規格に適合することが確認できた。前臨床安全性試験の結果とプロセスバリデーションの結果を受けて、[¹¹C]NCGG401 注射液の製造および臨床利用について、2021 年 2 月 26 日に当センターの短寿命放射性薬剤臨床利用委員会の審査を受け、承認を得た。

2. 経時的な動物 PET イメージング評価体制の構築

健常ラットに、DSP4 を投与し、[¹¹C]MRB PET を実施したところ、DSP4 の用量依存的に脳内ノルアドレナリントランスポーター密度が低下していた（図 2）。また、[¹¹C]MRB PET の測定値と脳内ノルアドレナリン濃度が相関していることが明らかになった、DSP4 のノルアドレナリン神経傷害の効果と、それを[¹¹C]MRB PET によって評価できる可能性が確認できた。

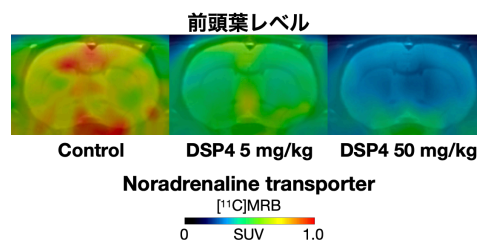


図 2、健常ラット DSP4 投与によるノルアドレナリン神経脱落の
ノルアドレナリントランスポーターPET イメージングによる検出

TgF344-AD ラットは導入間もないため、現時点での当施設における最高齢の 12 ヶ月齢お

よび 6 ヶ月齢の TgF344-AD ラットと wild type ラットにのみ、複数の PET リガンドを用いたイメージングを行うことができた。まず、6 ヶ月齢のオスに対し、アミロイドと TSPO の評価を行なったところ、TgF344-AD ラットに軽度のアミロイドの上昇を認めたが、TSPO に明らかな差は認めなかった（図 3）。

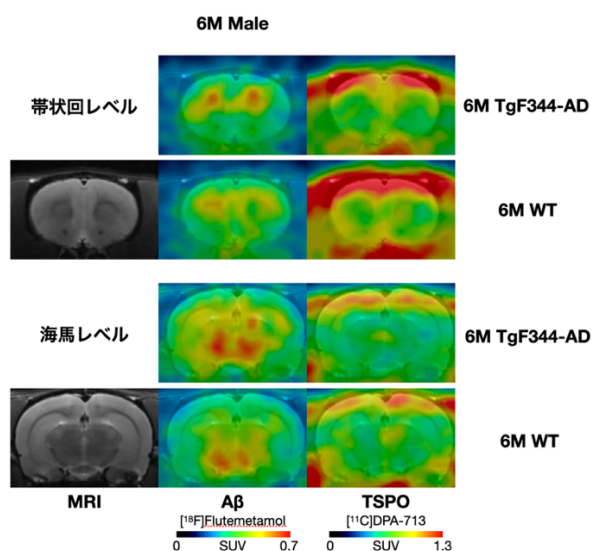


図 3、6 ヶ月齢の TgF344-AD/wild type ラット（オス）における PET イメージング

続いて、12 ヶ月齢のメスに対しては、TSPO および colony-stimulating factor 1 受容体の評価を行なった。結果、オスとは異なり、TgF344-AD ラットにおいて TSPO の軽度の上昇を認め、同様に colony-stimulating factor 1 受容体の軽度の上昇も認めた（図 4）。

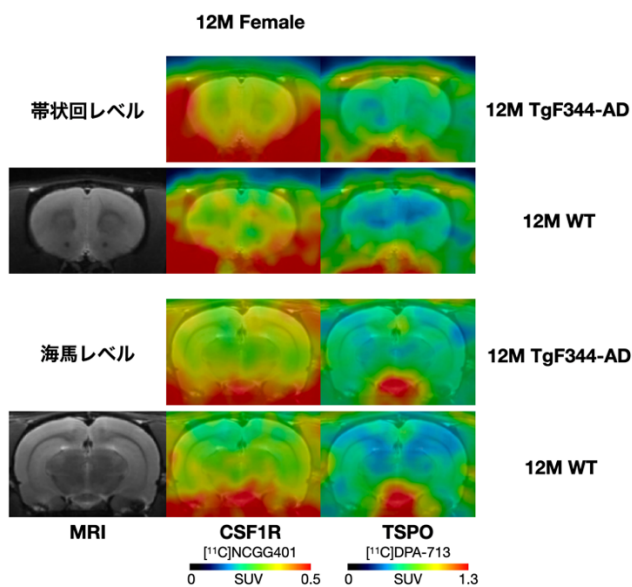


図 4、12 ヶ月齢の TgF344-AD/wild type ラット（メス）における PET イメージング

D. 考察と結論

ミクログリアに特異的な分子として colony-stimulating factor 1 受容体を標的とした PET イメージングとして、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ 注射液の前臨床安全性評価を行った。 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ 注射液およびその有効成分 NCGG401 の拡張型単回投与毒性試験では、予定投与量の 100 倍量で明らかな毒性を認めなかった。また、被曝線量は一般的な ^{11}C 標識 PET リガンドと同程度の被曝線量であった。以上より、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ 注射液の前臨床安全性に明らかな問題は認めず、短寿命放射性薬剤臨床利用委員会による製造および臨床使用に関する申請を行い、承認を得ることができた。今後、新規 PET 薬剤の first-in-human 試験の審査の経験が豊富な量子科学技術研究開発機構において認定臨床研究審査委員会の審査・承認を得て、医薬品の有効性・安全性を見るための特定臨床研究としてマイクロドーズ臨床試験を実施する予定である。

また、human APP 遺伝子と deltaE9 変異を含む human PSEN1 遺伝子を発現する遺伝子改変ラットの導入・繁殖および、継続的な PET イメージングを開始した。現時点では、病理が完成していない若年のデータのみであるが、PET イメージングによって、アミロイドの蓄積やミクログリアの活性化が観察できる可能性が示唆された。今後、各月齢の個体数の増加および、より高齢で、病変の進んだラットの画像が得られる予定である。さらに、ノルアドレナリン神経系の PET 評価法が確立したため、上述のラットモデルにおいて、薬理的に青斑核を傷害する事でミクログリア機能を変化させる実験を開始する。さらに、これらの病態の空間的・時間的な相互関係を明らかにしていく予定である。また、定期的に脳サンプリングを行い、分担研究者の協力を得て、それぞれの月齢における Western blotting や免疫染色により、それぞれの病理について PET イメージングの裏付けが可能と考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Kimura Y. PET Imaging in Drug Development for Neurodegenerative Diseases. The 14th International Conference on Complex Medical and Engineering (CME2020) Online, Aug 1–15, 2020.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし