

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
(21-10)

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 (副部長)

研究要旨

アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患において、異常タンパクの蓄積やそのタンパクが神経細胞障害をきたす過程に、ミクログリアやアストロサイトなど脳内の免疫を担当する細胞の機能異常が、深く関わっていることが明らかになってきた。そこで、これらの免疫細胞の機能を標的とした治療法の開発が進みつつあるが、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、本研究課題では、①脳内の免疫機能に関わり、創薬標的として有望とされる分子を可視化する新規 PET リガンドの開発を行い、神経変性疾患の新規治療法開発に役立てることと、②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アルツハイマー病モデル動物において経時的に 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。

① RIPK1 を標的とした PET リガンドの開発

まず本研究課題では、ミクログリアの安静状態から疾患関連状態への移行と細胞死に関わる分子である receptor interacting protein 1 kinase (RIPK1) を標的とした新規 PET リガンドとしての開発を行う。RIPK1 は、プログラムされた細胞死であるネクロトーシスの制御因子である (Festjens et al. 2007)。RIPK1 はアルツハイマー病患者脳で上昇しており、アミロイドβやタウ蛋白の集積に伴う神経細胞障害に関わる (Caccamo et al. 2017)。脳内移行性を認める RIPK1 阻害剤の投与により、モデル動物において神経障害が抑制された。以上より、RIPK1 を標的とした創薬は有望であり、この分子の PET イメージングにより、神経変性疾患患者における神経障害の過程を可視化できると考えられる。

② 経時的 PET イメージング

また本研究課題では、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 イメージングを実施する。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い、それぞれの時間的・空間的な相互関係を明らかにする。

本研究において、ミクログリアの機能状態を反映する画像バイオマーカーを開発することや、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（副部長）

分担研究者

加藤 隆司 国立長寿医療研究センター 放射線診療部（部長）

境 崇行 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部（研究員）

A. 研究目的

本研究の目的は、①脳内の免疫機能に関わり、創薬標的として有望とされる分子を可視化する新規 PET リガンドの開発を行い、神経変性疾患の新規治療法開発に役立てることと、②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アルツハイマー病モデル動物において経時的に 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。

アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患において、異常タンパクの蓄積やそのタンパクが神経細胞障害をきたす過程に、ミクログリアやアストロサイトなど脳内の免疫を担当する細胞の機能異常が、深く関わっていることが明らかになってきた。そこで、これらの免疫細胞の機能を標的とした治療法の開発が進みつつあるが、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。

本研究では、脳内の自然免疫を標的とした新たな画像バイオマーカーの開発を行う点と、老化等で認められるようなミクログリア機能を変化させた状態での病態研究を、アルツハイマー病患者における臨床研究に応用しやすい PET イメージング研究で行うという点が特色である。

B. 研究方法

本研究課題では、【RIPK1】神経免疫機能に関わる分子である RIPK1 を標的とした PET リガンドの評価・開発を行う。また、【経時的 PET イメージング】薬理学的な青斑核変性処置を行ったアルツハイマー病モデルラットにおいて、経時的に繰り返し PET イメージングを実施し、得られる病理変化の時間的・空間的な相互関係を明らかにする。

① RIPK1 を標的とした PET リガンドの開発

これまでに、RIPK1 に高い親和性と選択性を有し、脳移行性を認める低分子化合物である GSK'963 (Berger et al. 2015) を元にした複数の PET リガンド [^{11}C]NCGG501-504 を合成し有効性評価を行ってきたが、ラット・サルにおいて十分な特異結合を認めず、GSK'963 を元にした化合物では、脳内密度の低い RIPK1 を画像化するのに十分な親和性を有していないと考えられた。そこで、近年開発された化合物 **22** (Yoshikawa et al. 2018) を ^{11}C で標識し、本研究で評価する PET リガンドとすることを計画した。この化合物は、RIPK1 との水素結合を GSK'963 より多くすることで、結合親和性が GSK'963 と比較して一桁高い化合物である。結合親和性が GSK'963 より高い化合物を用いることで、RIPK1 の脳内密度が低くても、画像化に十分な特異結合が認められる可能性が向上すると考えた。また、この化合物は、極性表面積を表す指標 PSA が $91.5 \text{ \AA}$ 、P 糖タンパク質との親和性を表す指標 ER が 0.6 と、物理化学的指標から、脳内移行性が優れていると考えられた。

② 経時的 PET イメージング

経時的 PET イメージングについては、モデル動物として TgF344-AD ラットを選択した。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 (Cohen et al. 2013) (図 1)。このモデル動物では、加齢とともにリン酸化タウ蛋白の蓄積を認め、神経原線維変化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。本動物は令和元年 11 月に本センターに導入済みであり、本研究に用いるために繁殖・飼育を行っており、最初に導入した個体が 24 ヶ月齢に達した。

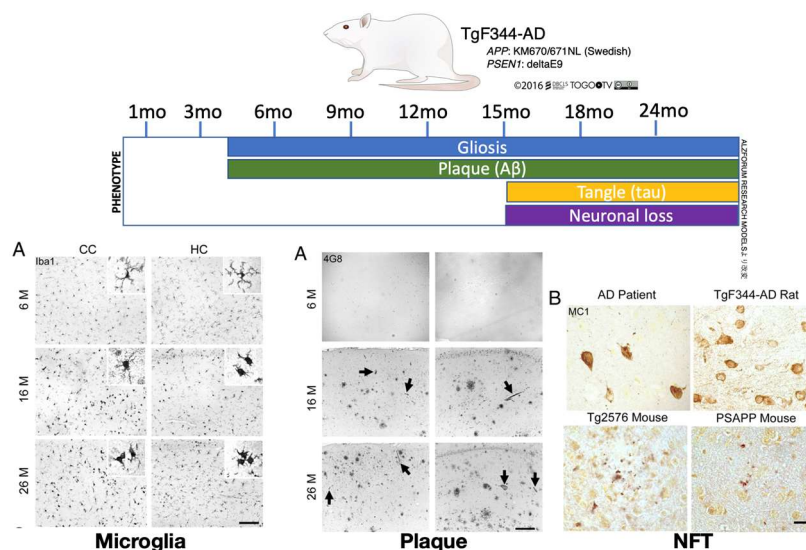


図 1、TgF344-AD ラットにおけるアルツハイマー病関連病理とその出現時期

現在、薬物投与を行わない TgF344-AD ラットおよび wild type において、6 ヶ月齢から 24 ヶ月齢まで複数の分子を標的とした PET イメージングを経時的に繰り返し実施中である。PET イメージングは 1 スキャンあたり 1-2 匹が実施可能で、 ^{18}F リガンド 1 合成あたり最大 6 匹、 ^{11}C リガンド 1 合成あたり最大 2 匹スキャンできるが、PET リガンド合成枠および飼育数の制限のため、各月齢のラットを少数ずつスキャンし、3 年かけて解析に必要な個体数（各群、各月齢、最低 3 匹）を確保していく。

（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く、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 RIPK1 を標的とした PET リガンドの開発

まず標識前駆体として、アミンおよびアルデヒドを出発物質とし、化合物 **22** の N-デスメチル体を合成した。次に、 $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ による標識前駆体 (Dm-GG511) への $^{11}\text{CH}_3$ 基の導入について、塩基、溶媒および温度などの最適な反応条件を検討した。Dm-GG511 の DMF 溶液中に塩基として炭酸セシウム (Cs_2CO_3) を加え、室温で 10 分間反応させる条件において反応が進行し、 ^{11}C 標識 PET リガンド [^{11}C]**22** (GG511) の合成、精製、及び製剤化に成功した。製剤は、放射化学純度 100%、化学純度~90%、収量~2 GBq、比放射能~190 GBq/ μmol であり、動物実験および臨床利用に必要な規格を満たす合成に成功した。

② 経時的 PET イメージング

アミロイド蓄積の評価は $[^{18}\text{F}]\text{flutemetamol}$ ／ $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ 、タウ蛋白蓄積の評価は $[^{18}\text{F}]\text{MK-6240}$ 、神経炎症の評価は、ミクログリアやアストロサイトに高発現する translocator protein 18kDa (TSPO)を標的とした $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$ で行っている。さらに、ノルアドレナリン神経の評価として、ノルアドレナリントランスポーターを標的とした $[^{11}\text{C}]\text{MRB}$ を用いている。例えば、24 ヶ月齢の TgF344-AD ラットおよび wild type では、アミロイド蓄積を反映する $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$ PET は、視床を中心に非特異的な集積が多いものの、海馬に明らかな集積の差を認めた (図 2)。また、タウ蛋白蓄積を反映する $[^{18}\text{F}]\text{MK-6240}$ PET や TSPO 密度を反映する $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$ PET、ノルアドレナリントランスポーター密度を反映する $[^{11}\text{C}]\text{MRB}$ PET は、TgF344-AD と wild type の間で集積の差を全脳的に認めた (図 2)。

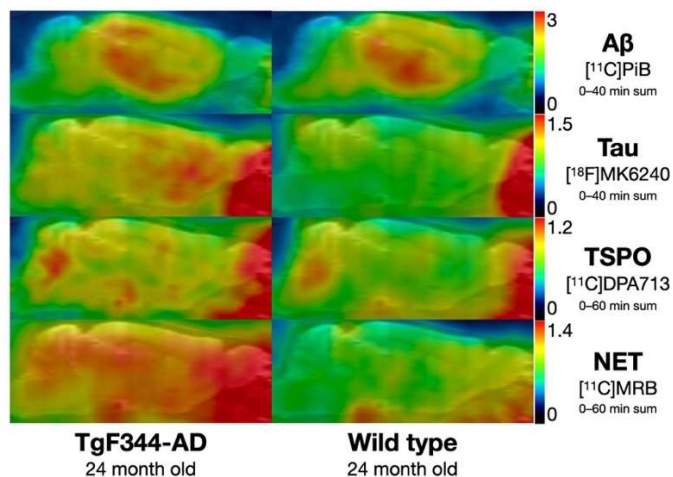


図 2、TgF344-AD と wild type ラット 24 ヶ月齢における PET イメージング

また、神経障害の評価は、糖代謝を反映する $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ で行う予定であったが、麻酔深度の影響を強く受け安定しなかったため、新たな PET リガンドとして $[^{11}\text{C}]\text{UCB-J}$ の長寿研における合成を確立し、動物実験利用を可能にした (図 3)。

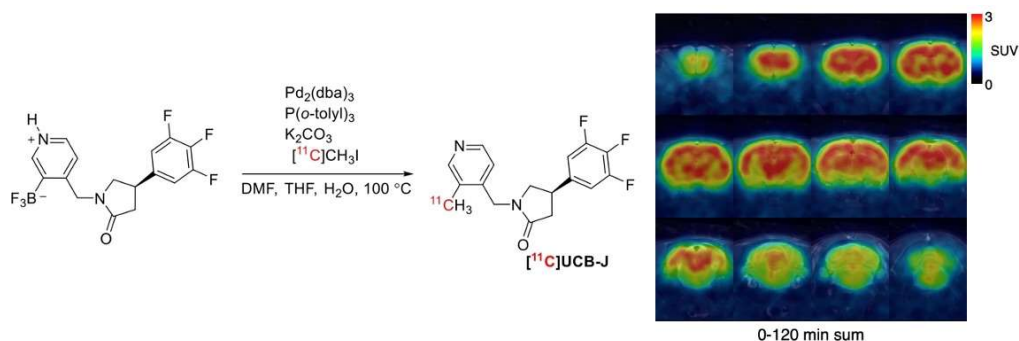


図 3、SV2A を標的とした PET リガンド $[^{11}\text{C}]\text{UCB-J}$ の標識合成と
健常ラットにおける PET イメージング

D. 考察と結論

RIPK1 を標的とした PET リガンドの開発について、有望な特性を有する新規の PET リガンド候補物質の合成に成功した。今後、RIPK1 を標的とした新規 PET リガンド GG511 の *in vitro* および小動物における有効性評価として以下の検討を行う予定である。まず、健康ラットに投与し、PET イメージングによる脳移行性を評価する。急性炎症モデルやアルツハイマー病モデル動物のような、ミクログリア密度や、疾患関連ミクログリアが増えている疾患モデル動物を用いて、特異結合の程度、他分子との選択性、脳内・血漿中代謝、定量性の評価を行う。また、オートラジオグラフィーや結合性試験、標的分子である RIPK1 の特異的抗体を用いる免疫染色を用いて、PET リガンドの細胞特異的な集積評価を行う。オートラジオグラフィーには、ミクログリアの活性化が認められるアルツハイマー病患者やてんかん患者の死後脳切片も用いる。この死後脳切片は、新潟大学病理学分野より提供されるものであり、その臨床研究計画は倫理委員会で承認され、既に受領済みである。In vitro 評価および小動物評価において有効性が認められた場合は、量子科学研究開発機構の協力を得てサルでの動態評価を行う。また、臨床試験にむけた安全性評価を行う。

経時的 PET イメージングについて、それぞれの PET イメージングについて、最適な定量方法を検討し、各月齢の PET データを集積の上、統合的な解析を行なっていく予定である。 [¹¹C]UCB-J は前シナプスにある synaptic vesicle protein SV2A を標的とした PET リガンドで、シナプス密度を反映することが明らかになっている (Nabulsi et al. 2016)。このリガンドの合成は難易度が高く、十分な収量を得るまで様々な工夫を必要としたが、最終的に臨床利用可能な程度の収量を得ることができた。製造バリデーションを実施し、短寿命放射性薬剤臨床利用委員会で承認されれば、臨床利用が可能となる。

加えて、神経障害による脳萎縮を経時的に評価するため、第一研究棟 1 階に設置されていて、これまでマウス脳しか撮像できなかった動物用 MRI でラット脳を撮像できるようにする、ボリウムコイルが本年度に納品された。このコイルは、マウス全身も撮像できるようにするため、他の研究においても汎用性が高いと考えられる。納品後、撮像条件の最適化を行い、来年度からは上述のラットにおける脳萎縮の評価を行う予定である。

今後、十分な画像データが得られた時点で、得られた画像を統合的に解析し、病理変化の時間的・空間的な相互関係を明らかにする。さらに、協力研究者の協力を得て、病理組織学的に PET イメージングの結果を検証する予定である。

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) Sakai T, Yamada T, Ikenuma H, Ogata A, Ichise M, Hattori S, Abe J, Suzuki M, Ito K, Kato T, Imamura S, Kimura Y. Development of novel PET ligands to image the Receptor Interacting Protein Kinase 1. NRM 2021 MAPPING NEURORECEPTORS AT WORK, 14 Dec 2021, online

2) Ikenuma H, Ogata A, Koyama H, Yamada T, Abe J, Ichise M, Kato T, Suzuki M, Ito K, Kimura Y. Development of a novel PET ligand for receptor-interacting protein kinase 1 in brain. NRM 2021 MAPPING NEURORECEPTORS AT WORK. 14 Dec 2021, online

3) 池沼 宏、古山浩子、小懸 綾、季斌、山田貴史、永井裕司、阿部潤一郎、市瀬正則、加藤隆司、鈴木正昭、木村泰之. RIPK1 を標的とした新規 PET リガンド開発の試みと有効性の評価. 第 61 回日本核医学会学術総会、2021 年 11 月 4-6 日、名古屋市

4) 境 崇行、服部沙織、小懸 綾、山田貴史、阿部潤一郎、池沼 宏、市瀬正則、鈴木正昭、加藤隆司、伊藤健吾、木村泰之. PET イメージングを用いたラット脳内 NET 密度測定と NE 濃度に関する研究. 第 61 回日本核医学会学術総会、2021 年 11 月 4-6 日、名古屋市

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