

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

昨年度までに開発された<sup>[11C]</sup>NCGG511 の前臨床評価を行なった。まず、健常ラットに投与し、PET イメージングによる脳移行性を評価した。次に、右の線条体に LPS を局所投与した急性炎症モデルラットにおいて<sup>[11C]</sup>NCGG511 の PET イメージングを行った。さらに、健常ラット、急性炎症モデルラット、健常人、アルツハイマー病患者、てんかん重積患者の新鮮凍結脳切片のオートラジオグラフィーを行った。

### 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。

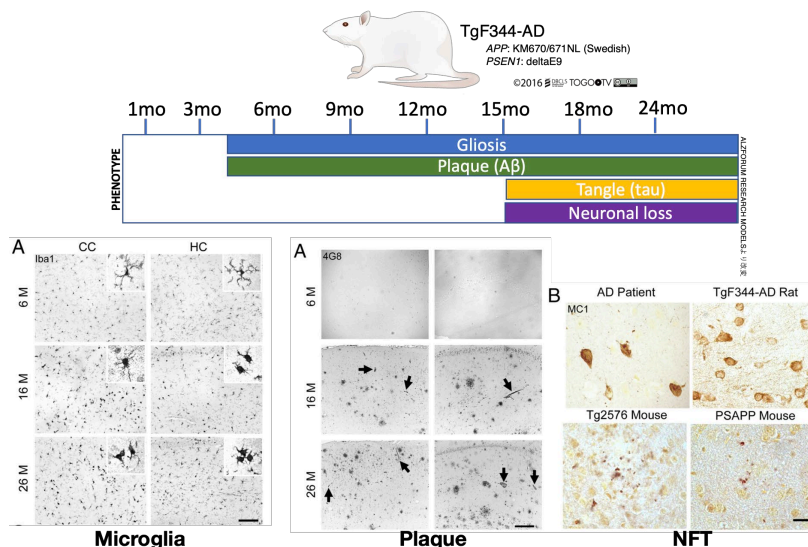


図 1、TgF344-AD ラットにおけるアルツハイマー病関連病理とその出現時期

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、<sup>18</sup>F リガンド 1 合成あたり最大 6 匹、<sup>11</sup>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

[<sup>11</sup>C]NCGG511 を健常ラットに投与し、PET イメージングによる脳移行性を評価した。<sup>[<sup>11</sup>C]NCGG511</sup> を投与後、放射能濃度は速やかピークに達し、その濃度は SUV 1.2 程度と良好であった。非放射性の GG511 を前投与したところ、放射能濃度の変化は軽度であり、健常ラットにおける特異結合は小さいと考えられた。

次に、右の線条体に LPS を局所投与した急性炎症モデルラットにおいて [<sup>11</sup>C]NCGG511 の PET イメージングを行った。このモデルラットは western blotting において、RIPK1 密度が軽度上昇していることが明らかになっている。しかし、PET イメージングでは、 [<sup>11</sup>C]NCGG511 取り込みの明確な上昇は認めなかった。

さらに、健常ラット、急性炎症モデルラット、健常者、アルツハイマー病患者、てんかん重積患者の新鮮凍結脳切片のオートラジオグラフィを行った。結果、どの切片においても明らかな特異結合を認めなかった。

### ② 経時的 PET イメージング

アミロイドプラークの評価は、臨床で用いられているアミロイドイメージング用 PET 薬剤である [<sup>18</sup>F]flutemetamol を利用することで、本研究のための薬剤合成が不要となり、効率よく研究が進められる予定であったが、 [<sup>18</sup>F]flutemetamol は TgF344-AD ラットのアミロイド病変を感度よく検出することができなかった。そこで、 [<sup>18</sup>F]flutemetamol に加えて、他のアミロイドイメージング用 PET 薬剤である [<sup>11</sup>C]PiB で、このラットの PET イメージングを行った。アミロイドプラークが十分に蓄積している 20 ヶ月齢の TgF344-AD ラットにおいて、 [<sup>11</sup>C]PiB を用いた PET イメージングでは集積の増加を認めた。

これまで得られた結果の予備的な解析では [<sup>11</sup>C]PiB の特異結合を反映する分布容積比 (DVR) は、海馬など複数の領域において、12-24 ヶ月の全て月齢で、TgF344-AD ラットで高値を示した (図 2)。

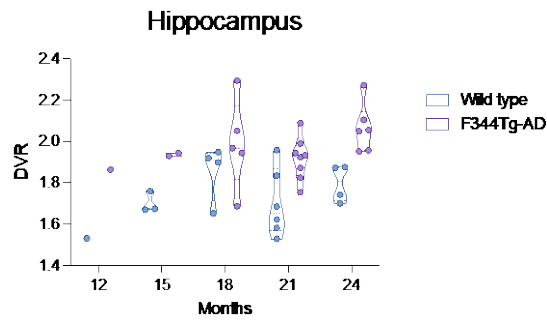


図2、TgF344-AD ラットにおける $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$  分布容積比 (DVR) の経時的変化

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 $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$ で行った。これまで得られた結果の予備的な解析では $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$  の DVR も、海馬など複数の領域において、12-24 ヶ月の全て月齢で、TgF344-AD ラットで高値を示したが、12 ヶ月齢に比べて18 ヶ月齢以降で wild type との差が小さくなる傾向を示した (図3)。

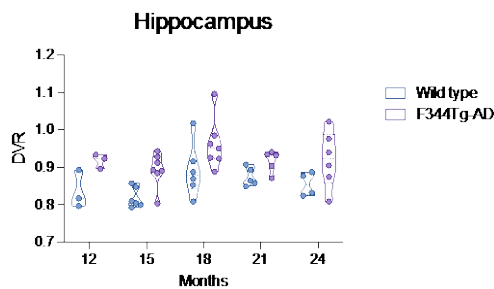


図3、TgF344-AD ラットにおける $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$  分布容積比 (DVR) の経時的変化

また、各領域における $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$  (TSPO) と $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$  (アミロイドプラーク) の DVR の、TgF344-AD ラットと wild type の比を経時的に評価した。12 ヶ月齢において、 $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$  の DVR 比は幅広い領域で高値を示したが、18 ヶ月齢以降はそのまま高値を示す領域と低値を示す領域が認められた(図4左)。 $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$  の DVR 比が持続的に高値を示す領域では、 $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$  の DVR 比が高値である傾向を認めた。また、22 ヶ月齢の脳切片の免疫染色においても、ミクログリアのマーカーである Iba1 が、アミロイドプラークを認める領域で高値であることが示された (図4右)。

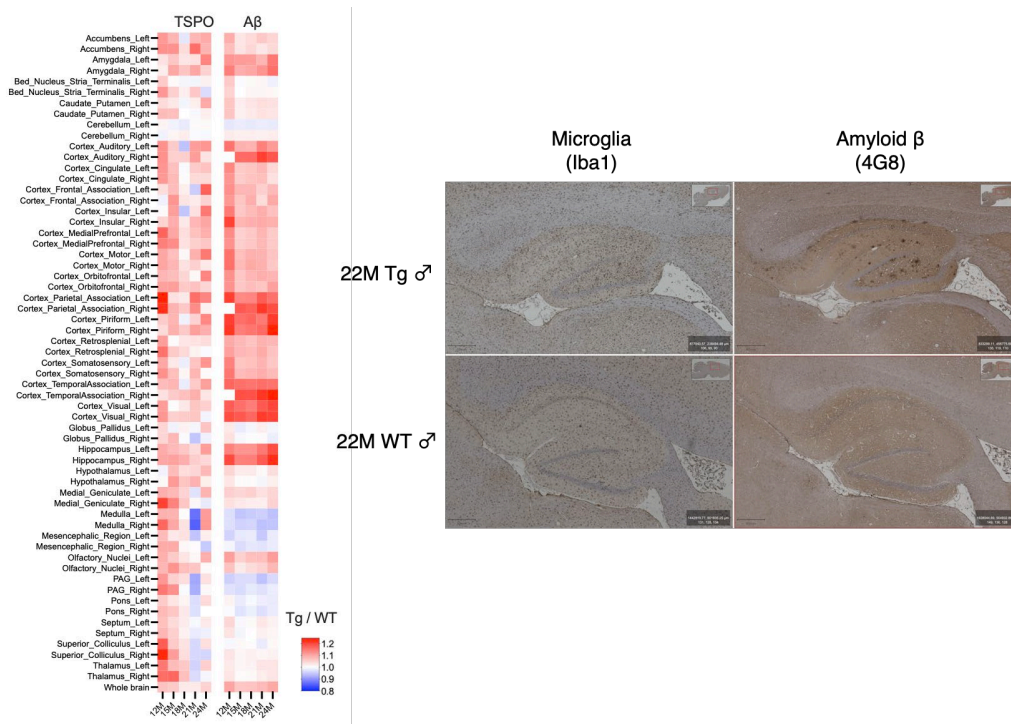


図 4、各領域における $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$  (TSPO) と $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$  (アミロイドプラーク) の DVR の、TgF344-AD ラットと wild type の比の経時的な評価 (左) と 22 ヶ月齢における脳切片の免疫染色 (海馬) (右)

加えて、神経障害による脳萎縮を経時的に評価するため、動物用 MRI 撮像条件の最適化をおこなった。脳の容積を評価するための 3D T2, T1 画像および、より鮮明に観察が可能な 2D T2 画像 (水平断、冠状断) について、この装置なりの安定した画質が得られるパラメーターを決定した (図 5)。次に、22 ヶ月齢の TgF344-AD ラット、オスメスそれぞれ 1 匹と、22 ヶ月齢 wild type ラットメス、15 ヶ月齢 wild type ラットオスの 3D T2 画像撮像を行ったが明確な脳萎縮は検出されなかった。

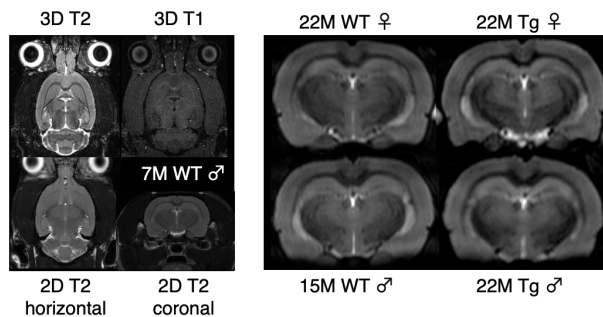


図 5、最適化された TgF344-AD ラット脳 MRI 画像

#### 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、ラット生体およびヒト脳切片で評価を行ったが、良好な脳移行性を認めるものの明らかな特異結合を認めなかった。その原因として、脳内 RIPK1 密度が極めて低い可能性と、生体内で ATP による競合阻害で特異結合が認められない可能性が考えられた。特に脳内 RIPK1 密度は、齧歯類で 0.045 ppm、ヒトで 0.013 ppm と報告されており、ヒトにおけるミクログリアイメージングの標的分子として知られる TSPO の脳内密度が 21.3 ppm であることと比較して極めて低い (Wang, M. et al. *Proteomics*, 2015)。今後、RIPK1 を標的としたより親和性の高い化合物を探索する一方で、より脳内密度が高くミクログリア機能を反映しうる標的分子も探索する。

経時的 PET イメージングについて、今回の検討において、経時的なアミロイドプラークの蓄積とミクログリアの活性化を可視化し評価することができた。アミロイドプラークが蓄積する領域では、ミクログリアが持続的に活性化している可能性が考えられた。今後さらに若年のラットの撮像を行い、ミクログリア活性化とアミロイドプラーク蓄積の時間的・空間的な相互関係を明らかにする。

また、神経障害による脳萎縮を経時的に評価するため、動物用 MRI の最適化を行い、ラット脳容積の評価をおこなった。結果、明確な脳萎縮は検出されず、TgF344-AD ラットにおける脳萎縮はごく軽度であると推測された。今回確立した解析手順を用いて、今後、例数を増やし、性別や月齢の条件を整えた詳細な検討を行う予定である。

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

なし

#### 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