

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。

まず本研究課題では、ミクログリアが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やタウタンパク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。

さらに、ミクログリアが恒常状態からアルツハイマー病などの疾患関連状態への移

行に関わる分子である Purinergic 2Y type 12 receptor (P2Y12R) を標的とした新規 PET リガンドとしての開発を行う。P2Y12R は、血小板の凝集と血栓形成に関わり、抗血栓薬の標的分子として知られるが、脳ではミクログリアにのみ発現し、ミクログリアの活性化に関わることが明らかになっている (Ma et al., 2022)。P2Y12R は恒常状態のミクログリアに高発現しており、アルツハイマー病患者脳で、神経傷害性の高い病変である神経突起斑周辺のみクログリアではその発現量が低下している (Maeda, 2021)。以上より、P2Y12R を標的とした PET イメージングにより、神経変性疾患患者におけるミクログリアの状態を可視化できると考えられる。

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) (R3-4)

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) (R5)

研究期間 令和3年4月1日～令和6年3月31日

#### 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。次に、【P2Y12R】免疫機能に関わる分子である P2Y12R 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。

### 【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 [<sup>11</sup>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なかった。そこで、近年開発された化合物 **22** (Yoshikawa et al. 2018) を <sup>11</sup>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 Å、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。

その後、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG511}$  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 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG511}$  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ーを行った。

#### 【P2Y<sub>12</sub>R を標的とした PET リガンドの開発】

P2Y<sub>12</sub>R については、すでに選定したリード化合物を元に設計した PET リガンドについて、標識合成法の確立を行い、小動物においてその有効性を評価した。

まず P2Y<sub>12</sub>R を標的とした低分子阻害剤である AZD1283 (Bach et al., 2013) を  $^{11}\text{C}$  で標識し、本研究で評価する PET リガンドとして計画した。AZD1283 は P2Y<sub>12</sub>R に高い親和性と選択性を有しているが、血液脳関門における P 糖タンパク質の基質となり脳移行性は低いことが明らかになっている。本研究で開発する $[^{11}\text{C}]\text{NCGG1201}$  では、AZD1283 のアミノ基にメチル基を付与することにより、P 糖タンパク質の基質性が低下し脳移行性が向上する可能性が見込まれた。 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG1201}$  の脳移行性を素早く評価するため、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG1201}$  の標識合成と製剤化の条件最適化を行う前に、少量の前駆体を購入し、少量の合成ができた時点でまずラットにおける脳移行性評価を行うこととした。

#### 【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。この 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。

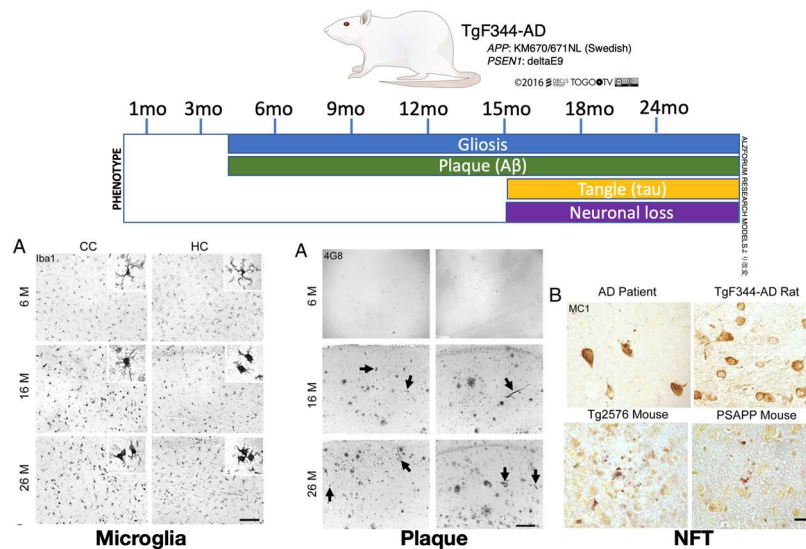


図1、TgF344-AD ラットにおけるアルツハイマー病関連病理とその出現時期

(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

#### 【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 ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) 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、 $^{11}\text{C}$  標識 PET リガンド [ $^{11}\text{C}$ ]**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/ $\mu\text{mol}$  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。

[ $^{11}\text{C}$ ]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。 [ $^{11}\text{C}$ ]NCGG511 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、右の線條体に LPS を局所投与した急性炎症モデルラットにおいて [ $^{11}\text{C}$ ]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

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、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG511}$  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ーを行った。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。

#### 【P2Y<sub>12</sub>R を標的とした PET リガンドの開発】

$[^{11}\text{C}]\text{NCGG1201}$  の合成収量が非常に少なかったため、通常投与量の 10 分の 1 量である約 1.8 MBq しか健常ラットに投与できなかったが、PET イメージングで脳移行性評価を行なった。その結果、全脳における放射能ピークは 1.1 SUV であり、元化合物である AZD1283 を  $^{11}\text{C}$  標識したもの (~0.4 SUV) よりは、はるかに脳移行性が高くなっていることが明らかになった (図 2)。

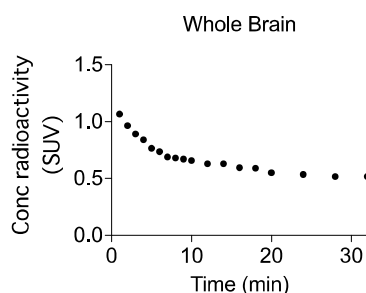


図 2、健常ラットにおける $[^{11}\text{C}]\text{NCGG1201}$  投与後の時間放射能曲線

#### 【経時的 PET イメージング】

アミロイドプラークの評価は、*in vivo* で TgF344-AD ラットのアミロイドプラークに対する結合性が認められた $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$  を用いた。 $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$  の特異結合を反映する分布容積比(DVR)は、TgF344-AD ラットの海馬や帯状回において、12 ヶ月齢以降の月齢で高値を示したが、視床では差を認めなかった (図 3)。

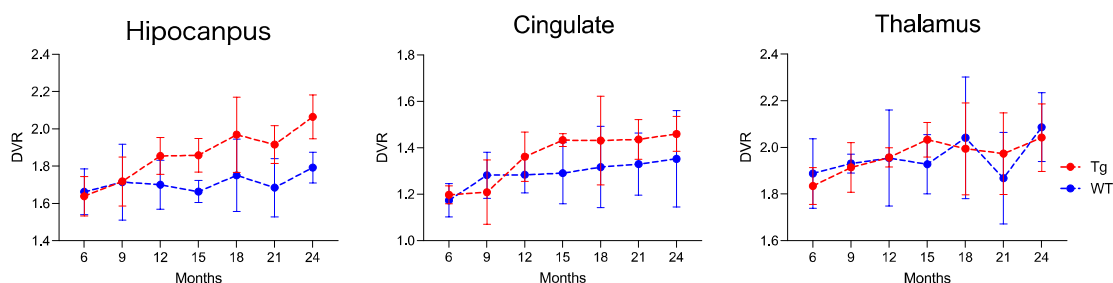


図 3、TgF344-AD ラットにおける $[^{11}\text{C}]\text{PiB}$  分布容積比 (DVR) の経時的変化

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。 $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$  の DVR は、海

馬や帯状回において、6-24ヶ月の全て月齢で、TgF344-AD ラットで高値を示したが、視床では12-15ヶ月でのみ高値を示した（図4）。

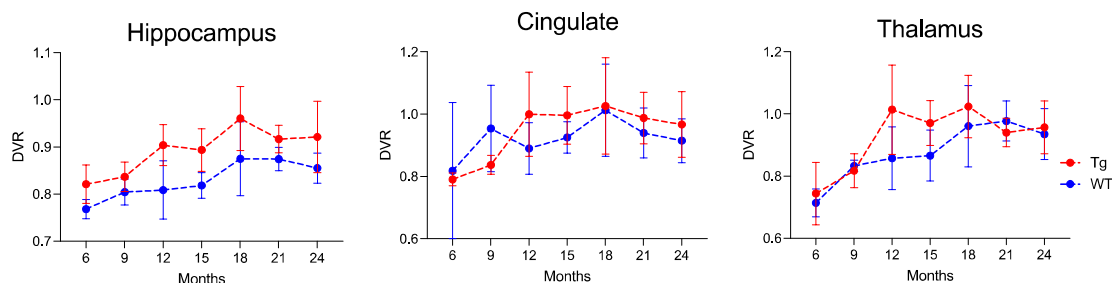


図4、TgF344-AD ラットにおける $[^{11}\text{C}]$ DPA713 分布容積比 (DVR) の経時的変化

また、各領域における $[^{11}\text{C}]$ DPA713 (TSPO) と $[^{11}\text{C}]$ 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。6-9ヶ月齢において、 $[^{11}\text{C}]$ DPA713 の DVR 比は海馬や基底核など限られた領域のみで高値であったが、12ヶ月齢において、幅広い領域で高値を示し、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5左）。 $[^{11}\text{C}]$ DPA713 の DVR 比が持続的に高値を示す領域では、 $[^{11}\text{C}]$ 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5右）。

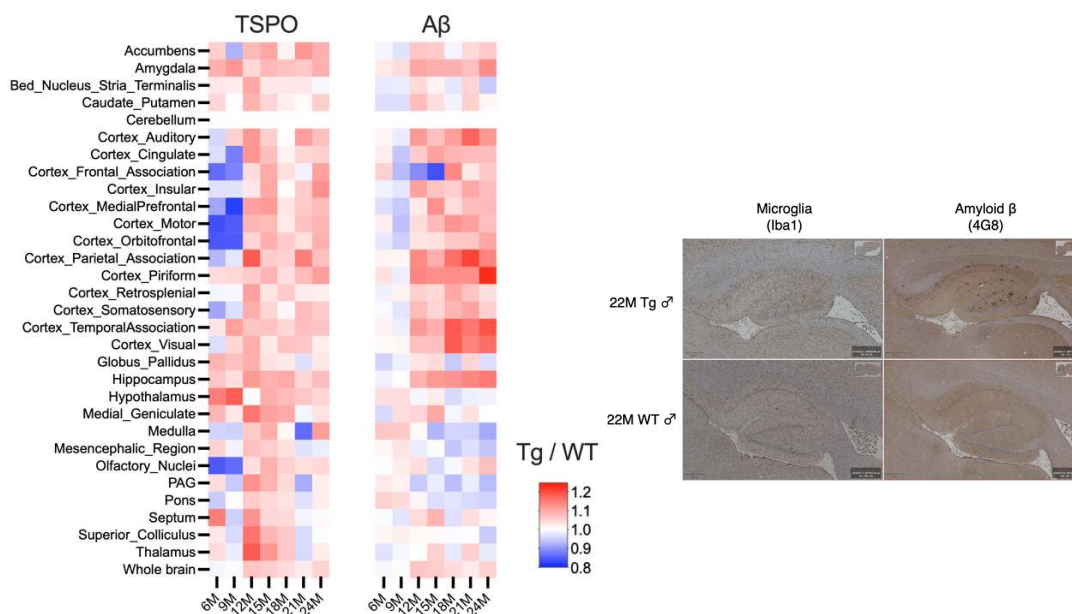


図5、各領域における $[^{11}\text{C}]$ DPA713 (TSPO) と $[^{11}\text{C}]$ PiB (アミロイドプラーク) の DVR の、TgF344-AD ラットと wild type の比の経時的な評価 (左) と 22ヶ月齢における脳切片の免疫染色 (海馬) (右)

動物用 MRI を用いて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 6)。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 画像撮像を行い、例数は少ないものの、脳容積の変化についてボクセル単位の比較検討 (voxel based morphometry, VBM) を予備的に行った。結果、脳室の周囲や小脳辺縁にいくつか低下部位を認めるものの、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。

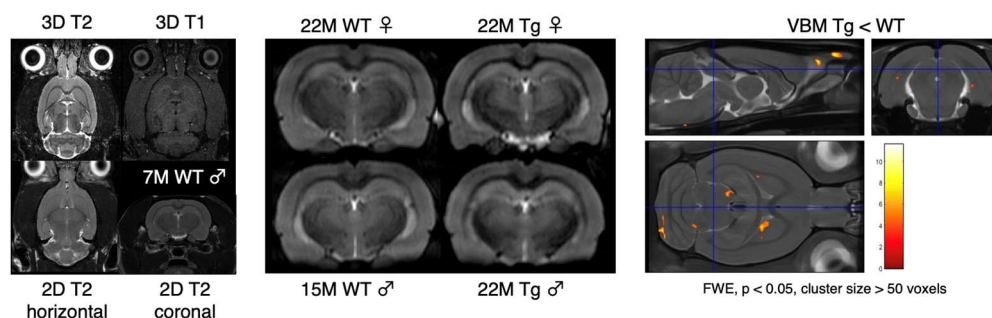


図 6、最適化されたラット脳 MRI 画像および TgF344-AD ラットの voxel based morphometry

#### 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。

P2Y12R を標的とした PET リガンドの開発について、現製剤化条件においては、合成後の濃縮過程で、ほとんどの放射能が消失しており、今後、エバポレーターによる濃縮を行わず、固相抽出を行うなど条件最適化が必要と考えられた。また、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG1201}$  の脳 P2Y12R イメージングの可能性が認められたため、今後、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG1201}$  の前駆体を十分な量合成し、標識合成および製剤化の条件最適化を行い、有効性を詳細に評価する。

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。

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。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

2021年度

なし

2022年度

なし

2023年度

1. Sakai T, Hattori S, Ogata A, Yamada T, Abe J, Ikenuma H, Ichise M, Suzuki M, Ito K, Kato T, Kimura Y. Noradrenaline transporter PET reflects neurotoxin-induced noradrenaline level decrease in the rat hippocampus. *EJNMMI Res.* 2023;13(1):82.
2. Ikenuma H, Ogata A, Koyama H, Ji B, Ishii H, Yamada T, Abe J, Seki C, Nagai Y, Ichise M, Minamimoto T, Higuchi M, Zhang MR, Kato T, Ito K, Suzuki M, Kimura Y. Synthesis and evaluation of a novel PET ligand, a GSK'963 analog, aiming at autoradiography and imaging of the receptor interacting protein kinase 1 in the brain. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2023;8:31.

##### 2. 学会発表

2021年度

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、小縣 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、小縣 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

2022年度

なし

2023年度

1. 服部沙織、池沼 宏、山田貴史、小縣 綾、濱嶋 恵、戸次雄一、阿部潤一郎、市瀬正則、伊藤健吾、加藤隆司、木村泰之. アルツハイマー病モデルラットにおけるアミロイドβとミクログリアの経時的 PET イメージング. 第 63 回日本核医学会学術総会、2023 年 11 月 18 日、大阪市

#### 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