

令和元年6月14日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05228

研究課題名(和文) 標的医療用Aオリゴマー抗体をPETプローブ化した新規画像バイオマーカーの創出

研究課題名(英文) Development of a novel imaging biomarker of Abeta oligomers in the brain

研究代表者

松原 悦朗 (Matsubara, Etsuro)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70219468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：89Zr標識Aオリゴマー(A<sub>0</sub>)特異的抗体によるPET診断に向けて、キレート剤(DF0)標識による抗原性低下のない非標識抗体と同様の特異性を担保した放射標識抗体プローブ作成に成功した。残念ながらこの抗体プローブをもちいたインビボPETイメージングにより非侵襲的に検出することはできなかったが、摘出脳における放射能量定量とオートラジオグラフィーによる分布評価で、アルツハイマー病モデルマウスにおいて脳への移行性を確認した。以上の結果から、Aオリゴマーに対する放射標識抗体をもちいることで、脳内移行性やS/N比の改善などによる非侵襲的な生体イメージングによる検出の可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究は、超高齢化社会を迎え介護予防推進が急務の我が国の介護の社会的負担の軽減が期待され、“アルツハイマー病は予防を標的とした先制医療対象疾患である”との概念導入に貢献しうる。さらに本研究は現状では治療のない異常構造蛋白蓄積を伴う神経変性疾患にも普遍的な診断・治療として応用可能であり、神経変性疾患の全く新たな診断治療法開発に布石となる研究である。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study was to develop in vivo imaging biomarker for A oligomers (A<sub>0</sub>s) in the brain. Chelation of anti-A<sub>0</sub> gave 89Zr-labelling efficiencies of more than 80%, resulted in ideal probe with preserved specificity almost identical to unlabeled antibody. Unfortunately, we did not make A<sub>0</sub> oligomers accumulation in the brain visible in vivo, whereas both ex vivo autoradiography and biodistribution study unequivocally revealed that brain uptake of 89Zr-labelled anti-A<sub>0</sub> was significantly higher in APP-KI mice than in wild-type mice, indicating that the antibody can cross the blood-brain barrier. These findings indicated that further improvement of several factors (ex. BBB-penetrating activity, S/N ratio, and so on) is still necessary. However, 89Zr-labelled anti-A<sub>0</sub> might be a potential candidate for in vivo imaging of A<sub>0</sub> accumulation in the brain.

研究分野：神経内科学

キーワード：Aオリゴマー 抗体 PETイメージング 画像バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在、直接的にアミロイド PET (Pittsburg Compound-B(PiB)プローブ等による PET 検査)で生体脳に蓄積するアミロイド線維からなる老人斑の定量的マッピングが可能となり、家族性 AD 家系での検証から、PiB-PET で検出される老人斑蓄積は認知症の発症 15 年前から生じていることが明らかとされた。ADNI-1 研究において、軽度認知機能障害 (MCI) 患者の半数以上で PiB-PET が陽性となり、AD への移行率が高いことから、PiB-PET 陽性 MCI は AD 予備群と結論づけられた (MCI due to AD と命名)。一方、認知機能正常な高齢者でも PiB-PET 陽性例が存在し、こうした症例が MCI や AD へと進行するかが現在最大の関心事となっている。この PET 検査で AD 病理の発症が疑われるが、全く無症候もしくは症状が極めて軽微にとどまる段階を preclinical AD と定義し、この早期段階診断に焦点を絞った preclinical AD 研究が日本でも今年度から AMED 主導での開始が決定している。世界での AD の治療介入は二次予防へと大きくシフトし、欧米では既に家族性 AD 家系の未発症キャリアーや孤発性の preclinical AD 症例を対象に据えて抗体投与での発症予防介入研究が積極的に展開されている。しかし、preclinical AD 症例より早期病態 (preclinical AD の pre-stage) では PiB-PET は陰性な非アミロイド線維からなる瀰漫性老人斑脳内蓄積を特徴とし、現状でこうした治療介入対象からの見逃しは約 18%にものぼる。さらに、申請者等の検討からは、シナプス毒性を有し、AD の記憶障害発症分子基盤である非線維性 A $\beta$  オリゴマーは、細胞外での瀰漫性分布に加え、細胞内蓄積パターンを呈しており (Mol Neurodegener, 2011; Life Sci, 2013)、従来存在しないと考えられていた嗅内野皮質にも認知機能正常の状態から蓄積していることが明らかとなった (J Neurosci Res, 2011)。しかし、現行の PiB-PET 等では検出する術はなく、真の意味での予防治療介入が必要にもかかわらず、蚊帳の外の状態である。この弱点克服には Preclinical AD の pre-stage からの、脳内 A $\beta$  オリゴマーのリアルタイムな可視化が不可欠である。申請者は、前駆期から中等度の AD を対象として、この A $\beta$  オリゴマーを標的とした疾患修飾薬 (申請者の発明抗体をヒト化した KHK6640) による第 I 相臨床試験を欧州 5 カ国と日本において展開中である実績を有しており、この新規画像診断法開発による AD 二次予防牽引に大きな期待が寄せられている。

## 2. 研究の目的

A $\beta$  オリゴマーはシナプス毒性を持ち、アルツハイマー型認知症 (AD) における記憶障害発症分子基盤と考えられている。申請者は、前駆期から中等度の AD を対象として、この A $\beta$  オリゴマーを標的とした純国産疾患修飾薬 (申請者の発明抗体をヒト化した KHK6640) による第 I 相臨床試験を欧州 5 カ国と日本において展開中である実績を有す。本研究では世界に先駆けてこうした標的分子治療抗体をプローブ化して脳内 A $\beta$  オリゴマーをリアルタイムで可視化する新規画像バイオマーカーを創出する。診断と治療に同一効能薬剤を用いることで、現行の PET イメージングでは見逃されている真の予防介入が必要な AD リスク対象を漏れなく選別し、個別化標的医療へと進化・変貌させた AD の二次予防医療実現を目指す。

## 3. 研究の方法

2 種類の APP-KI マウス (NL-F/NL-F) および APP-KI マウス (NL-G-F/NL-G-F) マウスにおける 6H4 IgG の脳内移行性および、脳内での分布を PET および Autoradiography (ARG) で評価する。

### (1) 抗体の DPO 修飾

未標識 6H4 と 6E10 (モノマーとオリゴマーを同程度認識するコントロール抗体) に加え、DFO 標識 6H4 抗体の競合的 ELISA を施行し、標識抗体のオリゴマー特異性保持を検証した。

### (2) 抗体の Zr-89 標識

研究分担者らが確立した標識法に準じ、HPLC で 80%以上の純度を担保した標識抗体を使用した。

### (3) PET を用いたマウスにおける Zr-89 標識抗体の分布試験

尾静脈より標識抗体を投与後、6 日目に PET/CT 画像を撮影した。SUV = (放射能濃度 Bq/cc) / (投与量 Bq/体重 g) のごとく、PET 画像の画素値を SUV として算出。得られた PET/CT 画像をマウス輪郭にて位置合わせをし、CT 画像上に心臓、腫瘍に関心領域 (ROI) を設定し、肝臓、脾臓、腎臓、肺、筋肉、骨の ROI の SUV 値を記録した。

### (4) ARG による脳内分布の評価試験

PET 終了後に、心採血を行い、PBS と PBS/10%ホルマリンで還流固定後、肝臓、脾臓、腎臓、

肺、筋肉、を摘出し、重量測定と放射能測定を行った。脳は 1mm 厚にスライス後、ARG で露光し、イメージスキャナーで読み取りを行った。

#### 4. 研究成果

(1)抗体の DPO 修飾による抗原性の変化の検証：

<sup>89</sup>Zr 標識 A オリゴマー特異的フルボディー抗体による PET イメージング診断に向けて、キレート剤(DFO)の標識による抗原性変化を検証したところ、オリジナル抗体と同様の A オリゴマー抗原特異性を担保していることを確認した。

(2)PET イメージング：

2 種類の APP-KI マウス(NL-F/NL-F)および APP-KI マウス(NL-G-F/NL-G-F)マウス、またその野生型マウスを用いて、抗原性が保持された <sup>89</sup>Zr 標識放射標識抗体プローブを静注し、抗体投与 6 日後に脳内シグナルを検証したが、脳内シグナルに顕著な差が認められなかった。残念ながら、この抗体プローブをもちいた A オリゴマーの可視化の実験においては In Vivo PET イメージングにより非侵襲的に検出することはできなかった。

(3)生体内分布試験：

<sup>89</sup>Zr 標識 A オリゴマー特異的フルボディー抗体投与後、6 日目における血液と各臓器（肝臓、脾臓、腎臓、肺、筋肉、骨）の生体内分布を 2 系統のモデルマウスと野生型マウスで検証したところ、肝臓、脾臓、骨に集積が認められる傾向が観察された。肝臓は生理的集積であり、骨は代謝を受けた抗体より遊離した <sup>89</sup>Zr 集積の可能性が示唆された。脳集積に関しては、App<sup>NL-F/NL-F</sup> マウスおよび App<sup>NL-G-F/NL-G-F</sup> マウスにおいて、6H4-IgG を投与した 15 か月齢のマウスの脳集積の平均値が高値であった。コントロール抗体を投与した同モデル同月齢のマウスの脳集積の平均値より高く、6H4-IgG の性質として脳内への移行および保持がされていることが示唆された。

(4)脳における ARG:

全体の傾向として、6H4-IgG 投与群は、コントロール群に比べ放射エネルギーが多く認められ、抗体の脳内の分布としては、側脳室および第 3 脳室に分布をみとめた。側脳室に放射能が認められるスライスでは、脳室における強い放射能影響で、脳実質における抗体分布の詳細を評価できないが、Bregma 付近のスライスではその影響は少なく、特に、Bregma0 のスライスでは 6H4-IgG 投与群は、コントロール群と比較すると線条体に比べ、皮質への集積が顕著に認められた。

以上の結果から、A オリゴマーに対する放射標識抗体を用いることで、脳内移行性および脳内分布のトレーサー実験の有効性、ならびに投与量、シグナル/ノイズ比の改善などによる非侵襲的な生体イメージングによる検出の可能性を示すことができた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

(1)Ishibashi M, Kimura N, Aso Y, Matsubara E. Effects of white matter lesions on brain perfusion in patients with mild cognitive impairment. Clin Neurol Neurosurg. 168:7-11, 2018. 査読有

(2)Pappolla MA, Matsubara E, Vidal R, Pacheco-Quinto J, Poeggeler B, Zagorski M, Sambamurti K. Melatonin treatment enhances Aβ lymphatic clearance in a transgenic mouse model of amyloidosis. Curr Alzheimer Res. 15(7):637-642, 2018. 査読有

(3)Aso Y, Chikazawa R, Kimura Y, Kimura N, Matsubara E. Recurrent multiple cerebral infarctions related to the progression of adenomyosis: a case report. BMC Neurol. 18(1):119, 2018. 査読有

(4)Ishibashi M, Kimura N, Sumi K, Aso Y, Matsubara E. Comparison of brain perfusion patterns in dementia with Lewy bodies patients with or without cingulate island sign. Geriatr Gerontol Int. 2018, 19(3), 197-202. 査読有

(5)松原悦朗. A オリゴマーをターゲットとした治療法の開発. 神経治療学,2018, 35, 337-339. 査読無

(6)Kamiyama N, Soma R, Hidano S, Watanabe K, Umekita H, Fukuda C, Noguchi K, Gendo Y, Ozaki T, Sonoda A, Sachi N, Runtuwene LR, Miura Y, Matsubara E, Tajima S, Takasaki T, Eshita Y, Kobayashi T. Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. *Antiviral Res.* 146:1-11, 2017. 査読有

(7)Takemaru M, Kimura N, Abe Y, Goto M, Matsubara E. The evaluation of brain perfusion SPECT using an easy Z-score imaging system in the mild cognitive impairment subjects with brain amyloid- deposition. *Clin Neurol Neurosurg.* 160:111-115, 2017. 査読有

(8)Himeno T, Kuriyama M, Takemaru M, Kanaya Y, Shiga Y, Takeshima S, Takamatsu K, Shimoe Y, Fukushima T, Matsubara E. Vascular Risk Factors and Internal Jugular Venous Flow in Transient Global Amnesia: A Study of 165 Japanese Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 26(10):2272-2278, 2017. 査読有

(9)Abe Y, Kimura N, Takahashi R, Gotou M, Mizukami K, Uchida H, Matsubara E. Relationship between cytokine levels in the cerebrospinal fluid and 11C-Pittsburgh compound B retention in patients with mild cognitive impairment. *Geriatr Gerontol Int.* 17(11):1907-1913, 2017. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

(1)松原悦朗, 学術教育講演 4 アルツハイマー型認知症, 口頭, 第 37 回日本認知症学会, 2018/10/12, 札幌.

(2)松原悦朗, 共催シンポジウム 3 「アミロイド はどうしてたまるのか? アミロイド代謝とその治療的介入」 A オリゴマー代謝 抗体治療効果発現からの解析, 口頭, 第 34 回日本認知症予防学会総会, 2018/09/24, 東京.

(3)松原悦朗, 特別企画 老年医学的視点から先制医療を考える 2.AD の発症分子病態に関する最新知見と課題, 口頭, 2018/08/05, 大分.

(4)Nobuo Sanjo, Hiroya Kuwahara, Tetsuya Nagata, Yoichiro Nishida, Akiko Amano, Fumiko Furukawa, Kousei Hirata, Hiroyuki Maruoka, Makoto Nakakido, Kohei Tsumoto, Yasutaka Anraku, Kazunori Kataoka, Ichiro Aoki, Etsuro Matsubara, Takami Tomiyama, Takanori Yokota. Molecular imaging and treatment of Alzheimer 's disease by developing amyloid- oligomer antibodies that cross the blood-brain barrier. *Alzheimer Association International Conference.* July 22-26, 2018, USA.

(5)松原悦朗. シンポジウム 5 認知症・治療の展望. A オリゴマーをターゲットとした治療法の開発. 第 35 回日本神経治療学会総会, 2017/11/27, 大宮

(6)松原悦朗. ホットピックス3 認知症治療と地域連携. 第7回認知症予防学会学術集会 2017/9/20, 岡山

(7)松原悦朗. アルツハイマー型認知症の創薬最前線. 自験例を中心に. 第 68 回日本内科学会東海支部主催生涯教育研究会, 2017/6/11, 名古屋

(8)松原悦朗. 認知症治療開発の最前線. 自験例を中心に. 第 59 回日本内科学会九州支部主催生涯教育研究会, 2017/5/20, 沖縄

〔図書〕(計2件)

(1)松原悦朗. アルツハイマー病 認知症疾患 臨床医のための実践ガイド(原書第2版). 第 III 部 記憶障害、Alzheimer 病及び認知症の治療、第 15 章 記憶障害と Alzheimer 病、認知症の治療目標, pp142-pp143, 2017, 朝倉書店(小野賢二郎監修)

(2)木村成志、松原悦朗. 認知症疾患診療ガイドライン 2017 CQ6-3 Alzheimer 型認知症の画像所見の特徴は何か, pp142-143, 2017, 医学書院(日本神経学会監修)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究協力者氏名：松浦 栄次  
ローマ字氏名：MATSUURA, Eiji  
所属研究機関名：岡山大学  
部局名：中性子医療研究センター  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：20181688

(2)研究分担者

研究協力者氏名：佐々木 崇了  
ローマ字氏名：SASAKI, Takanori  
所属研究機関名：岡山大学  
部局名：医歯薬学総合研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：10461253

(3)研究分担者

研究協力者氏名：藪内 健一  
ローマ字氏名：Yabuuchi, Kenichi  
所属研究機関名：大分大学  
部局名：医学部医学科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：10763807

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。