

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09904

研究課題名(和文) 神経保護性ミクログリア特異的PETイメージング剤の開発

研究課題名(英文) Development of PET probes targeting P2X7 receptor for imaging neuroinflammation

研究代表者

宿里 充穂 (SHUKURI, Miho)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20525571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ミクログリアの機能調節に関わる分子としてP2X7受容体に着目してPETプローブ開発を行った。

ピログルタミン酸骨格をリード化合物とする¹¹C標識PGAA類(3種類)についてLPS誘発神経炎症モデル動物を用いた評価を行った結果、いずれも神経炎症部位に高集積が確認され、神経炎症イメージングプローブとしての可能性が示された。しかし、脳移行性が低いことや特異結合成分が明らかとならなかったことなど、改良すべき課題が明らかとなった。

今後は、P2X7受容体のイメージング標的としての意義を明らかにするとともに、改良型P2X7受容体特異的PETプローブの開発が重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was the development of PET probes targeting P2X7 purinoreceptor (P2X7R) for imaging neuroinflammation.

In this study, we synthesized ¹¹C labeled pyroglutamic acid amide derivatives (¹¹C-PGAAs) and performed PET studies by using rats treated with intrastriatal injection of lipopolysacchalaide (LPS). The increased radioactivities of ¹¹C-PGAAs were shown in the LPS treated hemisphere. Kinetic analysis of PET data revealed that the uptake values of ¹¹C-PGAAs in the brain were not so high. In immunohistochemical studies, we found the activated microglia expressing increment of P2X7R in the brain regions where ¹¹C-PGAAs showed high radioactivity. These results suggest the possibility of P2X7R as an imaging target specific to activated microglia during neuroinflammatory processes.

Although further studies to improve brain uptake are required, ¹¹C-PGAAs showed some adequate properties for imaging P2X7R in neuroinflammation with PET.

研究分野：放射薬品学

キーワード：PET ミクログリア P2X7受容体

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病、パーキンソン病や多発性硬化症といった種々の神経変性疾患において、ミクログリアの活性化に起因する神経炎症反応のコントロールは診断・治療のターゲットとして高い注目を集めている。しかし、活性化ミクログリアは二種類の相反する性質を有し、損傷して機能不全を起こした細胞をさらに攻撃して排除する『傷害性』と、修復を促すなど傷害から細胞を保護する役割の『保護性』の働きをそれぞれ示すことから、ミクログリアの性質に沿った制御が重要であると考えられる。そこで、ミクログリアをターゲットとした診断・治療においては、神経障害性ミクログリアと神経保護性ミクログリアを弁別し、各種神経疾患における役割を正しく理解することが必須となる。

ATP 感受性プリン受容体のサブタイプである P2X7 受容体は、ミクログリアの活性化の制御に重要な役割を果たすと考えられている。ミクログリアと神経細胞の共培養系では、P2X7 受容体アゴニストである BzATP により活性化されたミクログリアは神経細胞をグルタミン酸毒性から保護することが報告されており、P2X7 受容体が神経保護作用に関与することが示唆されている (Suzuki T et al., *J Neurosci.* 2004)。また、多発性硬化症や筋萎縮性側索硬化症といった神経変性疾患のモデル動物においては、P2X7 受容体の阻害により症状が増悪するという報告もある (Sharp AJ. et al., *J Neuroinflammation.* 2008., Apolloni S. et al., *Dis Model Mech.* 2014)。これらの知見を踏まえ、我々は P2X7 受容体が神経保護性の M2 ミクログリアのマーカーとなり得るのではないかという着想に至った。

P2X7 受容体に特異的結合を示す薬剤としては既にいくつかのアゴニスト、アンタゴニストが報告されており、その中でも ^{11}C 標識合成の構造的観点、および P2X7 受容体に対する選択性の高さ、中枢移行型 PET プロープの開発において考慮すべき血液脳関門透過性といった性質を鑑みた結果、Pyroglutamic acid amide (PGAA) 骨格 (Guile SD et al., *J Med Chem.* 2009) をリード化合物として、PET プロープ開発を進めることとした。

2. 研究の目的

P2X7 受容体イメージング用 PET プロープの開発を本研究の目的とする。同時に、神経炎症における P2X7 受容体発現の変化とミクログリアとの関係を明らかにし、神経変性疾患の診断応用に向け、診断標的としての P2X7 受容体に関する基礎的知見を得る。

3. 研究の方法

(1) PET プロープ合成: P2X7 受容体アンタゴニストとして報告されている PGAA 骨格を

有する化合物群を ^{11}C 標識化することを第一選択とし、3 種類の化合物 (^{11}C -PGAA1, ^{11}C -PGAA2, ^{11}C -PGAA3) について標識合成を行った。

(2) PET イメージング実験: PET プロープの評価系として、リポポリサッカライド (LPS) を片側線条体内に微量注入して誘発する神経炎症モデルラットを用い、PET 撮像実験を実施した。特異的集積に関しては、非標識化合物の同時投与による検証を行った。

(3) 免疫組織化学実験: 脳組織切片を用いた免疫染色法により、ミクログリア、アストロサイトと神経細胞それぞれにおける P2X7 受容体の発現について確認し、ミクログリアの細胞表面抗原の発現や神経細胞障害の程度などと併せて、PET 画像より得られる情報がどのような細胞変化を反映しているかについて総合的な評価を行った。

4. 研究成果

(1) P2X7 受容体イメージング用 PET プロープの開発

PGAA をリード化合物とする 3 種類の ^{11}C 標識 PET プロープの標識合成を行った結果、比放射能および放射化学的純度は十分な量が得られた。尚、各化合物の P2X7 受容体に対する親和性については、ヒト P2X7 受容体高発現細胞を用いて Calcium 5 dye の流入量を指標とした P2X7 受容体阻害活性測定試験を実施した結果、 IC_{50} for PGAA1=95.7 nM, PGAA2=7.70 nM, PGAA3=17.2 μM であることを確認している。

次に、LPS 注入 3 日後の神経炎症モデルラットを用いた PET 撮像実験を実施した結果、 ^{11}C -PGAA1、 ^{11}C -PGAA2、 ^{11}C -PGAA3 の 3 種類すべてがラットの脳内炎症部位に高い集積を示すことがわかった (図 1)。 ^{11}C -PGAA1 の炎症部位への集積について、LPS 注入後の経時変化を確認したところ、1 日目で若干の集積亢進が認められ、3 日目で最も高い値を示すことがわかった。この時の血流量は、コントロール側と比較して LPS 注入側でも変化しなかったことから、これら PET プロープの集積は炎症に対する特異結合によるものと考えられたが、非標識体の同時投与では、脳集積の変化が認められず、特異結合成分を明らかにするには至らなかった。また、動態解析の結果、時間放射能曲線からは、いずれの PET プロープについても脳移行性が著しく低いことが明らかとなった。

そこで、脳移行性および結合親和性の改良を目指し、新規化合物 (PGAA4) の合成を進めることとした。PGAA4 に関して、P2X7 受容体阻害活性の評価を行った結果、 IC_{50} for PGAA4 > 300 μM と明らかな P2X7 受容体阻害効果を確認することはできなかった。

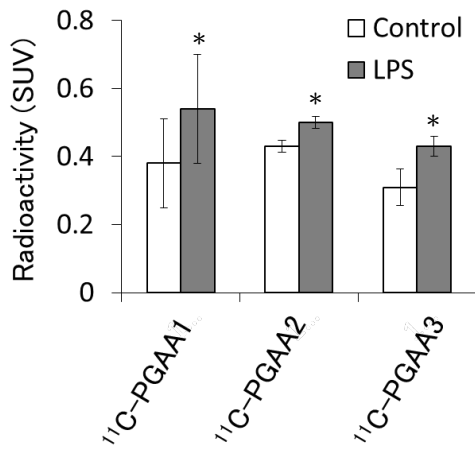


図 1. LPS 注入 3 日後のラット脳への ¹¹C 標識 PGAA 類の集積値
各 PET プローブをラット尾静脈内投与 5 分後から 45 分後の PET 加算平均画像の解析結果。尚、関心領域はコントロール側線条体 (Control) および LPS 注入側線条体 (LPS) に設定した。Average \pm SD (n=5), * p<0.001 Control vs. LPS

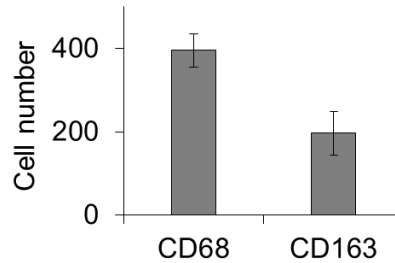
(2) 神経炎症部位における P2X7 受容体の発現変化

LPS 注入 3 日後のラット脳切片を用いて P2X7 受容体と活性化ミクログリアのマーカーである OX42 との二重免疫染色を実施した。その結果、P2X7 受容体は、コントロール側線条体ではほとんど発現しなかったが、LPS 注入側線条体では発現が確認され、特に注入部の周辺に多いことが確認された。OX-42 陽性ミクログリアも同様に、LPS 側で増加しており、P2X7 受容体と共局在することが明らかとなった。一方、GFAP 陽性アストロサイトでは LPS による変化を認めず、P2X7 受容体と共局在する細胞も存在しなかった。NeuN 陽性神経細胞では LPS 注入部位周辺に若干の減少が確認され、P2X7 受容体を発現する細胞も存在することが明らかとなった。次に、P2X7 受容体を発現するミクログリアの性質について検討を進めることとし、M1 型ミクログリアのマーカーとして CD68、M2 型ミクログリアのマーカーとして CD163 の免疫組織化学染色を行った。CD68 陽性細胞と CD163 陽性細胞は、ともに LPS 注入側線条体で増加することが確認されたが、細胞数としては CD68 陽性細胞の方が多かった (図 2)。また、P2X7 受容体の発現は、CD68 陽性細胞と CD163 陽性細胞の両方に確認されたが、共発現する細胞の定量結果では、P2X7R/CD163 共発現細胞の方が、P2X7R/CD68 共発現細胞の数を上回ることが明らかとなった。

アルツハイマー病やパーキンソン病モデル動物を用いた最近の研究では、P2X7 受容体の阻害は神経保護効果を示すとの報告 (Chen X et al., *Neuroscience*. 2014., Wang XH et al., *Mol Med Rep*. 2017.) があること

から、P2X7 受容体は疾患形成において障害性の M1 型ミクログリアの制御に関与するとの見方もあるが、本研究の結果からは M1 型ミクログリアと M2 型ミクログリア双方への関与が示唆された。

A)



B)

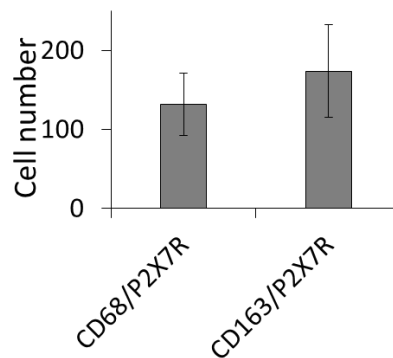


図 2. LPS 注入 3 日後のラット線条体における CD68 および CD163 陽性細胞と P2X7 受容体発現 (免疫染色の定量結果)

- A) CD68 陽性細胞と CD163 陽性細胞の細胞数の定量結果 Average \pm SD (n=3)
B) P2X7 受容体と CD68, CD163 それぞれが共発現する細胞の定量結果 Average \pm SD (n=3)

<総括>

本研究では、PGAA 骨格を有する PET プローブが神経炎症部位への高集積を示したことから、神経炎症イメージングプローブとしての可能性が示唆された。しかし、さらなる応用にむけて必要な条件 (脳内移行性や結合親和性) を満たす PET プローブを創生するには至らなかった。P2X7 受容体の発現に関する検討の結果、LPS 注入による神経炎症では活性化ミクログリアの増加とともに P2X7 受容体の発現が増加することが明らかとなった。以上の結果から、P2X7 受容体はミクログリアのイメージング標的として有用である可能性が示唆された。本研究では、P2X7 受容体が M1 型と M2 型の両方のミクログリアに発現することが示されたことにより、P2X7 受容体が神経傷害性、神経保護性にどのように関与するかについて特定することはできなかったが、これまでの報告を踏まえると疾患形成のプロセスにおいてその反応性は異なる可能性が大きいと考えら

れる。今後は、阻害剤などによるさらなる検討を加え、P2X7 受容体のイメージング標的としての意義を明らかにすると同時に、引き続き、優れた P2X7 受容体特異的 PET プローブの開発を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Shukuri M, Mawatari A, Ohno M, Suzuki M, Doi H, Watanabe Y, Onoe H. Detection of Cyclooxygenase-1 in Activated Microglia During Amyloid Plaque Progression: PET Studies in Alzheimer's Disease Model Mice. *J Nucl Med.* 57(2):291-296, 2016. 査読有り
2. 宿里充穂, 加藤孝一, 花川隆. 多発性硬化症の PET 診断. *PET journal.* 31: 32-34, 2015. 査読無し

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Shukuri M, Kato K, Kumamoto T, Ihara N, Hanakawa T. Development of a PET probe targeting P2X7 receptor for imaging neuroinflammation. *Neuroscience 2016.* (San Diego, USA), November 12-16, 2016.
2. 熊本卓哉、堤田真梨、藤井愛子、片川和明、宿里充穂、伊原尚樹、加藤孝一、花川隆. P2X7 受容体アンタゴニスト活性をもつ PET プローブの合成研究. 第 70 回記念有機合成化学協会関東支部シンポジウム (新潟), 11 月 21-22 日, 2015.
3. Kato K, Shukuri M, Kumamoto T, Ihara N, Funasaka M, Hanakawa T. Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled pyroglutamic acid amide derivatives for the imaging of glial cells by PET. *The 21st International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences.* (Columbia, USA), May 26-31, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宿里 充穂 (SHUKURI, Miho) 昭和薬科大学, 薬学部, 助教
研究者番号: 20525571

(2) 研究分担者

加藤 孝一 (KATO, Koichi) 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター, 脳病態統合イメージングセンター, 室長
研究者番号: 50382198