

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09979

研究課題名(和文) 神経炎症を画像化する次世代PETリガンドの開発及び既存リガンドとの比較

研究課題名(英文) Development of next-generation PET ligand for neuroinflammation and comparison with current ligands

研究代表者

季 斌 (JI, BIN)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 脳機能イメージング研究部・主任研究員  
(任常)

研究者番号：80392223

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)：当研究所で開発した新規TSP0リガンド18F-FEBMPは高い脳移行性、ターゲットへの親和性を示し、霊長類マカクザルにおいて、その遅い脳内動態から、TSP0を鋭敏に検出することができなかったが、従来のリガンドである11C-PK11195、11C-Ac5216より高い感度でタウオパチーマウスモデル、キノリン酸傷害マーマセットモデルにおいて、活性化ミクログリアに発現誘導されたTSP0を検出できた。従って、齧歯類とマーマセットを用いる前臨床研究には18F-FEBMPが大きな威力を発揮できる。

研究成果の概要(英文)：18F-FEBMP, a novel PET ligand for neuroinflammation originally developed in QST, has more sensitively captured TSP0 expression in brains from tauopathy mouse and quinolone-induced neuroinflammation marmoset models, compared with two typical TSP0 ligands, 11C-PK11195 and 11C-Ac5216. This newly developed ligand has high brain uptake and affinity for TSP0. However, PET scans with it failed to detect TSP0 expression in normal macaque monkey brain likely due to slow washout rate. So, we have concluded that 18F-FEBMP is very useful for neuroinflammation imaging in preclinical studies. However, it is required for application in human subjects to optimized chemical structure for rapid washout from brain.

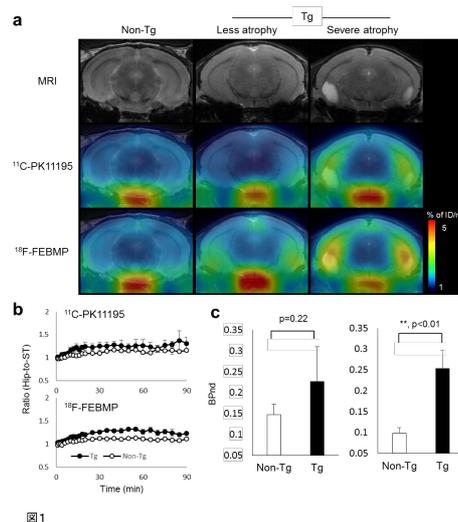
研究分野：核医学、神経病理学

キーワード：PET 神経炎症 Translocator Protein

- 研究開始当初の背景：脳内免疫細胞ミクログリアの過剰活性化により惹起される神経炎症とアルツハイマー型 (AD) 患者の特徴的な病理変化の形成・進行との密接な関連が強く示唆されてきたが、AD の発症や病理形成・進行における神経炎症の役割は未だ不明である。活性化ミクログリアに高発現する 18kDa Translocator Protein (TSP0) は神経炎症のバイオマーカーとして、そのポジトロン断層撮影 (PET) リガンドの開発が世界中の研究者によって行われてきた。しかし、AD 患者の死後脳 TSP0 の第一世代リガンドである  $^{11}\text{C}$ -PK11195 を用いた臨床研究では、AD 患者における  $^{11}\text{C}$ -PK11195 の脳内取り込みの上昇は必ず確認できるものではない。研究代表者が実施したオートラジオグラフィの結果でも、AD 患者の死後脳における  $^{11}\text{C}$ -PK11195 の結合の上昇が確認されなかった。これは  $^{11}\text{C}$ -PK11195 の比較的低い親和性と脳移行性に起因する可能性がある。そして、これらの欠点を克服した第二世代の TSP0 リガンドが開発されてきた。しかし、ヒト TSP0 の遺伝子座 (rs6971) の多型 (147 番目のアミノ酸アラニン (Ala) がトレオニン (Thr) に置換される) によって TSP0 リガンドの結合性が大きく影響されることは TSP0 リガンドを用いる神経炎症イメージングにとって大きな問題になっている。第二世代の TSP0 リガンド  $^{11}\text{C}$ -PBR28 は遺伝子型 Ala/Ala をもつヒトに結合するが、遺伝子型 Thr/Thr をもつヒトに殆ど結合しないから、このリガンドを用いて検証すると、遺伝子型 Ala/Ala と Thr/Thr をもつヒトはそれぞれ  $^{11}\text{C}$ -PBR28 が結合性を示す「High affinity binder」と示さない「Low affinity binder」として現れる。殆どの既知の第二世代 TSP0 リガンドは「Low affinity binder」への親和性が低くなるので、TSP0 rs6971 遺伝子多型の影響を受けずに、生体画像で鋭敏に TSP0 を検出できる次世代 PET リガンドの開発は極めて重要な課題である。当研究で開発した新規 TSP0 リガンド  $^{18}\text{F}$ -FEBMP はヒト死後脳サンプルで TSP0 遺伝子多型による影響を受けないことがこれまでの研究で明らかになった。
- 研究の目的：齧歯類、霊長類動物モデル、またはヒト死後脳サンプルを用いて、in vivo 及び in vitro の結合を調べ、 $^{18}\text{F}$ -FEBMP と既存リガンドとの比較を行うことで、in vivo 及び in vitro 実験における  $^{18}\text{F}$ -FEBMP を用いる TSP0 定量法の優位性を確立する。
- 研究の方法：(1) タウオパチーモデルにおける TSP0 生体イメージング：研究代

表者らが開発した新規リガンド  $^{18}\text{F}$ -FEBMP 及び第一世代 TSP0 リガンドの  $^{11}\text{C}$ -PK11195 及び第二世代 TSP0 リガンドの  $^{11}\text{C}$ -Ac5216 を用いて、6 カ月齢以降の PS19 における TSP0 の発現誘導を調べる。同時に MRI による脳容積測定を行い、神経細胞死に起因する脳萎縮の度合いを調べ、各 TSP0 リガンドを用いる生体イメージングは顕著な神経脱落に先立って、起こる TSP0 の発現誘導をどの段階で検出できるかを調べる。これらの生体イメージング測定を終えた動物の脳をサンプリングし、免疫染色と Western blot により、グリア細胞の活性化を調べ、生体イメージングで得られた知見との整合性を調べる。(2) AD 患者の死後脳組織を用いる検討：AD 患者及び健常者の死後脳組織を用いて、研究代表者が独自に開発した抗 TSP0 抗体を用いる免疫染色と Western blot により、実際の AD 患者脳では TSP0 蛋白発現量がどの程度増えたかを調べる。また、同じ組織を用いて、種々 TSP0 リガンド ( $^{18}\text{F}$ -FEBMP、 $^{11}\text{C}$ -Ac5216、 $^{11}\text{C}$ -PBR28、 $^{11}\text{C}$ -DAA1106、 $^{11}\text{C}$ -PK11195) を用いるオートラジオグラフィで、AD 患者脳における各リガンドの結合を調べ、TSP0 発現量と各リガンドの結合量との相関関係を調べる。(3) 霊長類を用いる検討：正常霊長類 (マモセット、マカクザル) 及び病態モデル (キノリン酸線条体注射マモセットモデル) の  $^{18}\text{F}$ -FEBMP-PET を行う。また、非標識 FEBMP の前投与により、ブロッキング実験をも行う。

#### 4. 研究成果：



(1) タウオパチーモデルにおける TSP0 生体イメージング：同じ 12 カ月齢の PS19 マウス個体を用いて、 $^{11}\text{C}$ -PK11195、 $^{18}\text{F}$ -FEBMP、MRI 脳形態画像を撮影したところ、顕著な脳萎縮を示したマウス個体において、 $^{11}\text{C}$ -PK11195、 $^{18}\text{F}$ -FEBMP のどちらを使っても萎縮した海馬

部に高い放射能の集積が認められたが、脳萎縮の程度が軽微の場合、 $^{11}\text{C}$ -PK11195 より  $^{18}\text{F}$ -FEBMP を用いる PET 撮影はより高い検出感度で神経炎症を検出できた(図 1-a)。正常マウス(Non-Tg)個体と PS19 マウス(Tg)個体各 3 匹のデータをまとめたものは図 1-b, c に示されている。さらに  $^{11}\text{C}$ -Ac5216 を用いて 9 カ月齢の PS19 マウスを用いて、同様な検討を行ったところ、同様な結果が得られた(Data not shown)。これの結果より  $^{18}\text{F}$ -FEBMP を用いた PET 撮影は  $^{11}\text{C}$ -PK11195、 $^{11}\text{C}$ -Ac5216 より鋭敏に神経炎症を検出することが示された。また、これらマウスの脳サンプルを免疫染色で調べたところ、TSPO は主にグリア細胞に発現誘導されたことが明らかになった(data not shown)。

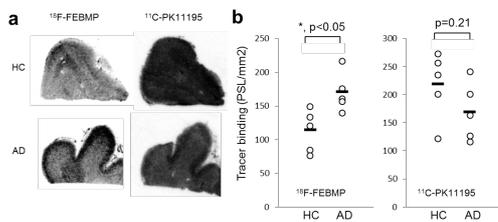


図2

(2)AD 患者の死後脳組織を用いる検討: In vitro オートラジオグラフィにより、AD 及び正常健常者の死後脳における  $^{11}\text{C}$ -PK11195 と  $^{18}\text{F}$ -FEBMP の結合を定量計測したところ、AD 患者の前頭前野の皮質部において  $^{11}\text{C}$ -PK11195 の結合量は健常者と同程度で、結合性の上昇が認められなかったが、 $^{18}\text{F}$ -FEBMP の結合は有意に上昇した(図 2)。また、二種類の抗 TSPO 抗体(独自抗体 NP157、市販品 C.A.)を用いたウェスタンブロット解析では、いずれの抗体を用いても、健常者に比べ、AD 患者脳内 TSPO 分子の発現量の上昇は有意に認められた(図 3-a-c)。さらに in vitro  $^{18}\text{F}$ -FEBMP 結合と TSPO 発現量の間有意な相関関係があるに対して、in vitro  $^{11}\text{C}$ -PK11195 結合と TSPO 発現量の間有意な相関関係が認められなかった(図 3-d, e)。さらに  $^{11}\text{C}$ -Ac5216、 $^{11}\text{C}$ -PBR28、 $^{11}\text{C}$ -DAA1106 を用いた同様な検討では、いずれのリガンドでも、AD 死後脳皮質部における結合の上昇が認められなかった(data not shown)。今回の検討では、使われた 10 個体の中に Thr 遺伝子座をもつ個体数は 6 個もあるため、遺伝子多型によるこれらのリガンドの結合性の低下が鋭敏な検出を妨げたと考えられる。以上のデータから、in vitro 結合の検討では、既存のリガンドより  $^{18}\text{F}$ -FEBMP は遺伝子多型の影響を受けずにヒト脳内 TSPO を鋭敏に検出することができる。

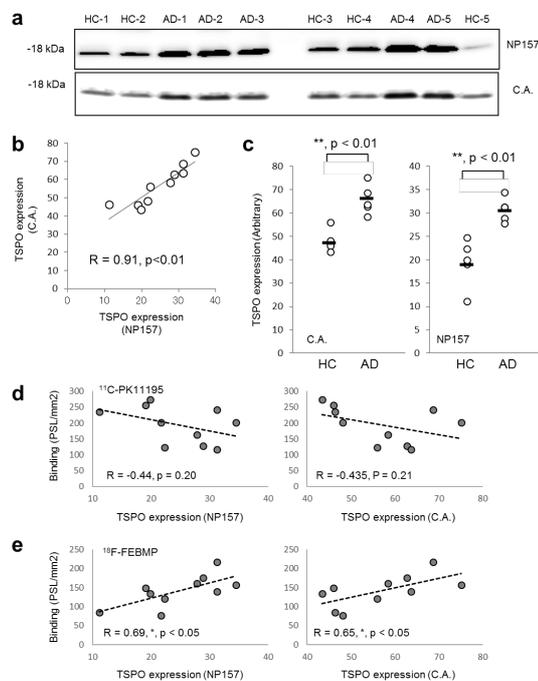


図3

(3)霊長類を用いる検討:  $^{18}\text{F}$ -FEBMP-PET 画像では、他の脳部位に比べ、正常マーマセットの後頭部、小脳に高い放射能の集積があり、未標識 FEBMP (1mg/kg, i.v.) の前投与により、これら放射能の集積が有意に低下したので、特異結合であることが確認された(data not shown)。また、左側線条体にキノリン酸脳内局所注入をした個体において、2 週間後、反対側に比べて注入部位に有意な  $^{18}\text{F}$ -FEBMP 集積の上昇が認められた(図 4-a)。さらに死後サンプルを用いた免疫染色では、注入部位に有意なミクログリア及びアストロサイトの活性化が認められ(data not shown)、 $^{18}\text{F}$ -FEBMP 集積と一致した結果が得られた。以上のことより、霊長類マーマセットにおいて  $^{18}\text{F}$ -FEBMP を用いる神経炎症の生体脳での検出が可能であることが示された。しかし、より大型の霊長類マカクザルにおいて、 $^{18}\text{F}$ -FEBMP の脳内動態が遅く、脳外へ washout の速度がマウス、マーマセットよりも遅く、90 分間の撮影時間内では脳内放射活性が上昇し続けた(図 4-b)。これまでの TSPO リガンドを用いたイメージング研究ではヒト脳におけるリガンドの動態は齧歯類よりもマカクザルに類似することが多いので、 $^{18}\text{F}$ -FEBMP を用いるヒトでの臨床研究には脳内動態を速めるように、FEBMP の化学構造を改良必要があると推測された。

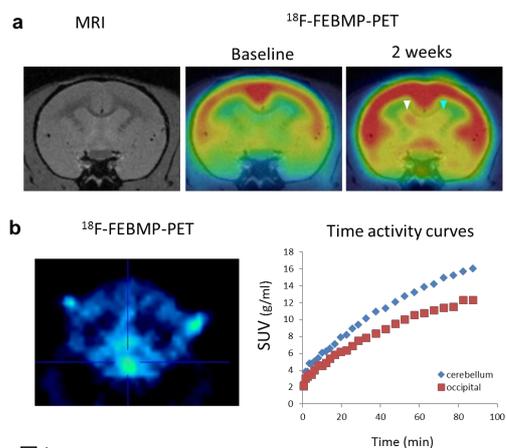


図4

## 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 7 件)

1. Ni R., Ji B., Ono M., Sahara N., Zhang M.R., Aoki I., Nordberg A., Suhara T., Higuchi M. (2018) Comparative in-vitro and in-vivo quantifications of pathological tau deposits and their association with neurodegeneration in tauopathy mouse models. *Journal of Nuclear Medicine*. In press.
2. Barron, A. M., Ji, B., Kito, S., Suhara, T., and Higuchi, M. (2018) Steroidogenic abnormalities in translocator protein knockout mice and significance in the aging male. *Biochem J* **475**, 75-85
3. Ishikawa A., Tokunaga M., Maeda J., Minamihisamatsu T., Shimojo M., Takuwa H., Ono M., Ni R., Hirano S., Kuwahara S., Ji B., Zhang M.R., Aoki Ichio, Suhara T., Higuchi M. (2018) In vivo visualization of tau accumulation, microglial activation and brain atrophy in a mouse model of

tauopathy rTg4510. *Journal of Alzheimer's Disease*. **61**,1037-52

4. Ono, M., Sahara, N., Kumata, K., Ji, B., Ni, R., Koga, S., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Yoshida, M., Hozumi, I., Yoshiyama, Y., van Swieten, J. C., Nordberg, A., Suhara, T., Zhang, M. R., and Higuchi, M. (2017) Distinct binding of PET ligands PBB3 and AV-1451 to tau fibril strains in neurodegenerative tauopathies. *Brain* **140**, 764-780
5. Barron, A. M., Tokunaga, M., Zhang, M. R., Ji, B., Suhara, T., and Higuchi, M. (2016) Assessment of neuroinflammation in a mouse model of obesity and beta-amyloidosis using PET. *J Neuroinflammation* **13**, 221
6. Tiwari, A. K., Ji, B., Yui, J., Fujinaga, M., Yamasaki, T., Xie, L., Luo, R., Shimoda, Y., Kumata, K., Zhang, Y., Hatori, A., Maeda, J., Higuchi, M., Wang, F., and Zhang, M. R. (2015) [18F]FEBMP: Positron Emission Tomography Imaging of TSPO in a Model of Neuroinflammation in Rats, and in vitro Autoradiograms of the Human Brain. *Theranostics* **5**, 961-969
7. Ji, B., Chen, C. J., Bando, K., Ashino, H., Shiraishi, H., Sano, H., Kasahara, H., Minamizawa, T., Yamada, K., Ono, M., Zhang, M. R., Seki, C., Farde, L., Suhara, T., and Higuchi, M. (2015) Distinct binding of amyloid imaging ligands to unique amyloid-beta deposited in the presubiculum of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* **135**, 859-866

[学会発表](計 4 件)

- (1) 季 斌. グリア TSP0 に選択的結合する PET リガンドを用いるアルツハイマー病関連神経炎症の検出. poster, 第36回日本認知症学会学術集会, 日本認知症学会, 2017-11-25
- (2) Ji B. Classification of Amyloid Imaging Ligands Based on Binding Characteristic in Presubiculum of Alzheimer 's Disease. ANMAF 2016, The Asian School of Nuclear Medicine , 2016
- (3) Ji B. Molecular Imaging for Diagnosis and Treatment in Dementia. 招待講演 The Second Global Conference of Chinese Professionals in , Chinese Society of Nuclear Medicine, 2016-10-28
- (4) Ji B. Critical role of microglia in pathogenesis of Alzheimer 's disease- Imaging-based study. 招待講演 第41回日本微小循環学会総会, 日本微小循環学会, 2016-09-23

## 6 . 研究組織

- (1)研究代表者：季 斌 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・脳機能イメージング研究部・主任研究員（任常）

研究者番号：80392223