

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02776

研究課題名（和文）神経変性疾患の創薬標的たるマイクログリア特異的発現分子のPETイメージングの開発

研究課題名（英文）PET imaging of microglia, a novel drug target for neurodegenerative diseases

研究代表者

木村 泰之（Kimura, Yasuyuki）

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・室長

研究者番号：20423171

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイクログリアに関連する2種類の分子（CSF1RとRIPK1）を標的としたPETリガンドの評価・開発として、それぞれの標的に対するシード化合物を元にしたPETリガンドの標識合成法の確立を行い、小動物においてそれらの有効性を評価した。その結果、CSF1Rを標的としたPETリガンド[11C]NCGG401は、マイクログリアイメージング用PETリガンドとして有用である可能性が示唆され、前臨床安全性評価も実施した。一方、RIPK1を標的としたPETリガンド[11C]GG502は十分な有効性を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、神経変性疾患における神経炎症の役割が詳細に明らかになるにつれて、脳内の神経炎症の中心的役割を果たすマイクログリアの機能異常が神経障害に直接的に関わっていると考えられるようになってきた。本研究では、近年創薬標的として有望とされる、マイクログリア特異的な分子を標的としたPETイメージングの開発を行った。この分子のイメージングによって、それぞれ、マイクログリアの数や状態への変化を反映した新たな情報が得られる可能性があり、病態評価から創薬バイオマーカーまでの応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：To evaluate and develop PET ligands targeting two microglia-related molecules (CSF1R and RIPK1), we synthesized two PET ligands based on seed compounds for each target, and evaluated their efficacy in small animals. [11C]NCGG401, a PET ligand targeting CSF1R, appeared to be useful as a PET ligand for microglial imaging, and then preclinical safety evaluation has been conducted. On the other hand, a RIPK1-targeting PET ligand [11C]GG502 did not show sufficient efficacy.

研究分野：脳神経核医学

キーワード：陽電子断層撮像 マイクログリア 神経炎症 アルツハイマー病 CSF1R PET

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経変性疾患の治療開発戦略

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、アミロイドβタンパクや過リン酸化タウタンパクなどの異常凝集・蓄積が、不可逆的な神経障害を惹き起こす。その治療は、アルツハイマー病におけるアセチルコリンエステラーゼ阻害薬や NMDA 受容体阻害薬、パーキンソン病におけるドーパミン作働性薬剤のように、対症療法が中心であり、根本治療薬の開発は成功していない。例えば、アルツハイマー病の主要病理である老人斑の構成成分であるアミロイドβタンパクを除去する目的で、アミロイドβ抗体の臨床試験が複数行われているが、本計画立案時点では十分な有効性を示せていない (Sevigny et al. 2016)。

アルツハイマー病の特徴的病理である老人斑や神経原線維変化周囲に、アストロサイトやマイクログリアの浸潤を認め、従来から神経炎症が神経障害に関わると考えられてきた (Heneka et al. 2015)。しかし、神経炎症には異常蓄積タンパクを除去する神経保護的役割と神経障害をきたす二面性があるため、単純に炎症を抑える薬剤では疾患の進行を抑えることに成功していない (Jaturapatporn et al. 2012)。近年、アルツハイマー病患者などをターゲットとした全ゲノム関連研究において、*TREM2* や *CD33* などのマイクログリアに特異的に発現する分子をコードする遺伝子異常が、疾患リスク因子として明らかになってきた (Guerreiro et al. 2013)。そのため、脳内の神経炎症の中心的役割を果たすマイクログリアの機能異常が、神経障害に直接的に関わっていることが示唆され、幅広い神経変性疾患に共通の新たな創薬ターゲットとして注目されている。

(2) PET を用いた神経炎症イメージングの問題点

ポジトロン断層撮影 (PET) は、¹¹C や ¹⁸F のようなポジトロン (陽電子) 放出核種で標識した薬物を生体内に投与し、標識薬物の生体内における動態を明らかにする方法である。標識薬物の生体内における動態を解析することで、ヒト生体内における特定の分子の分布や密度を低侵襲で評価できるため、創薬におけるバイオマーカーとして幅広く用いられている。例えば、上述のアミロイドβ抗体の臨床試験では、アミロイドβタンパクが蓄積している患者の選別や、アウトカムとしてのアミロイドβタンパクの変化量測定に、アミロイド PET イメージングが必須となっている (Sevigny et al. 2016)。したがって、マイクログリア機能を標的とした創薬において、マイクログリア機能に関わる分子を患者生体内で観察できるバイオマーカーが利用可能になれば、創薬効率の飛躍的な向上が見込める。

これまで、神経炎症の PET イメージングは、末梢性ベンゾジアゼピン受容体 (別名: translocator protein 18kDa, 以下、TSPO と略す) を標的として行われてきた。TSPO はミトコンドリア外膜に存在し、コレステロールの膜輸送に関連する受容体で、脳内では活性化したマイクログリアやアストロサイトに高発現している。TSPO を標的とした PET イメージングによって、アルツハイマー病やその前段階の軽度認知機能障害の患者で TSPO の上昇を認め、神経炎症の病態への関与が臨床的に明らかにされてきた (Fan et al. 2017)。

しかし、TSPO のイメージングを、マイクログリア機能を標的とした創薬に利用するには問題が多い。TSPO は、活性化したマイクログリアだけではなく、アストロサイトや血管内皮細胞、神経細胞にも発現するため特異度が低く、またそのイメージングは TSPO をコードする遺伝子の多型の影響を受けることが指摘されている (Owen et al. 2011)。さらに、TSPO イメージングによって検出される活性化されたマイクログリアは、神経保護的にも神経障害的にも振る舞う可能性が示唆されている (Owen et al. 2017)。したがって、本研究では、マイクログリア機能を標的とした創薬利用に向けて、よりマイクログリアに特異的な分子のイメージングの開発を行うことを目的とする。

(3) マイクログリア特異的な PET イメージングの開発

これまで、神経炎症を標的に PET イメージングリガンドの開発が盛んに行われ、TSPO イメージング PET リガンドの改良やアラキドン酸カスケードの構成要素などを標的としたリガンド開発がなされてきた。しかし、近年、神経変性疾患における神経炎症の役割が詳細に明らかになるにつれて、脳内の神経炎症の中心的役割を果たすマイクログリアの機能異常が神経障害に直接的に関わっていると考えられるようになってきた。したがって、これまでのような神経炎症を標的としたイメージングではなく、マイクログリア特異的な、創薬標的となる分子を可視化するイメージングの開発が必要と考えられる。

本研究では、近年創薬標的として有望とされる、マイクログリアに発現する 2 種類の分子 (colony-stimulating factor 1 receptor および receptor interacting protein 1 kinase、以下それぞれ、CSF1R と RIPK1 と略す) を標的とした。CSF1R は、マイクログリアの分化・生存に必須な分子であり、その阻害はマイクログリアの総数を減少させ、神経細胞障害を減少させる。RIPK1 は、細胞死を司る因子で、疾患関連マイクログリアに高発現し、その阻害は貪食能を変化させ、神経細胞障害を減少させる。これらの分子のイメージングによって、それぞれ、マイクログリアの数

や、疾患に関連する状態への変化を反映した新たな情報が得られる可能性があり、病態評価から創薬バイオマーカーまでの応用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マイクログリアに発現し、創薬標的として有望とされる二つの分子を可視化する新規 PET リガンドの評価・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である。

3. 研究の方法

本研究では、マイクログリアに発現する2種類の分子 (CSF1R と RIPK1) を標的とした PET リガンドの評価・開発として、それぞれの標的に対するシーズ化合物を元にした PET リガンドの標識合成法の確立を行い、小動物においてそれらの有効性を評価した。

(1) CSF1R イメージングリガンドの標識合成法の確立

CSF1R は、マイクログリアの分化に必須な分子である (Sawada et al. 1990)。脳内で CSF1R を発現しているのはマイクログリアのみである (Spangenberg et al. 2016)。また、アルツハイマー病患者脳において、CSF1R の発現が上昇していることが明らかになっている (Akiyama et al. 1994)。さらに、脳内移行性を認める低分子の CSF1R 阻害剤が報告されており、この薬剤の投与により脳内のマイクログリアが大幅に減少し、アルツハイマーモデルにおいて神経障害を抑制した (Spangenberg et al. 2016)。また、CSF1R 遺伝子異常により、白質障害を伴う若年性認知症をきたす (Rademakers et al. 2011)。以上より、CSF1R 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脳内マイクログリア密度を可視化できると考えられる。

本研究では、CSF1R 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 BLZ945 に、 ^{11}C 基を導入した新規放射性化合物 methyl-BLZ945 を、PET リガンド候補とした。市販の BLZ945 を前駆体とした合成条件を検討し最適な方法を検討した。

(2) RIPK1 イメージングリガンドの前駆体合成と標識合成法の確立

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低分子の RIPK1 阻害剤が報告されており、この薬剤の投与により、モデル動物において神経障害が抑制された。さらに近年、アルツハイマー病患者の脳内のマイクログリアには Homeostatic/Disease-associated/それらの中間状態の3状態が報告され (Harris et al. 2017)、この疾患関連マイクログリアに RIPK1 が特異的に高発現していることが明らかになった (Ofengeim et al. 2017)。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、疾患関連マイクログリアを可視化できると考えられる。

本研究では、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 GSK963 に、 ^{11}C 基を導入した新規放射性化合物 [^{11}C]GG502 を、PET リガンド候補とした。高速 C-メチル化反応を用いるために必要なキラル分離したホウ素化合物前駆体を合成し、ついで反応条件を検討し最適な方法を検討した。

(3) 前臨床有効性評価

それぞれの新規 PET リガンドの小動物における有効性評価は以下の検討を行った。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。マイクログリア密度や、疾患関連マイクログリアが増えている疾患モデルマウスを用いて、特異結合の程度、他分子との選択性、脳内・血漿中代謝、定量性の評価を行った。小動物において有効性が認められた場合は、安全性評価を実施した。

4. 研究成果

(1) CSF1R イメージングリガンドの標識合成法の確立

CSF1R イメージングリガンド $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ の標識化合成は DMSO/H₂O 溶媒中、塩基性条件下で、全て自動合成装置内で実施した (図 1)。リガンドのスペックとしては、収量 1 GBq、化学純度 90%、放射化学純度 99.8%以上の ^{11}C 標識体が安定して合成できた。

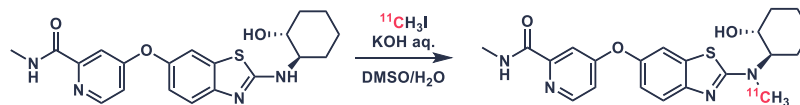


図 1 : BLZ945 から $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ の合成

(2) CSF1R イメージングリガンドの前臨床有効性評価

イソフルラン麻酔下においてラットに $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ を静脈内投与し、60 分間の PET 撮像を行った。ラット脳において全脳に放射能の取り込みが認められた。 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ 投与後、放射能は速やかにピークに達し、その取り込み (Standard Uptake Value : 以下、SUV) は 1.3 であった。その後、徐々に取り込みは低下した。また、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ の放射能の取り込みは非放射性 NCGG401 の前処置により変化しなかった。以上の結果、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ を用いたラット PET 撮像により、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ が脳内に取り込まれ、洗い出されることが明らかになったが、非放射性 NCGG401 の前投与による取り込みの変化を認めず、非放射性 NCGG401 の前投与によって、末梢臓器の CSF1R がブロッキングされる効果の影響により、脳への $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ の入力が増加し、特異結合を反映した取り込みの変化が観察されていないと考えられた。

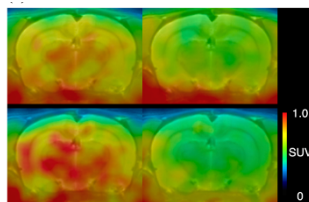


図 2 : $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ を投与したラットのベースライン (上) および非放射性 NCGG401 前投与時 (下) の PET イメージング (海馬レベル冠状断面像、1-10 分 (左) および 10-60 分 (右) 加算)

そこで、PET イメージング時に大腿動脈より繰り返し採血し、動脈血中の放射能濃度の経時変化と、血漿中放射能における未変化体由来の比率を測定し、動態解析により、ベースライン時と非放射性 NCGG401 前投与時の脳内 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ 結合量を測定した。予想通り、非放射性 NCGG401 前投与時に血漿中の放射能濃度は増加しており、さらに放射能における未変化体比率も増加していた。その結果、非放射性 NCGG401 前投与時の脳内 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ 結合量の低下を認め、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ の脳への特異結合の存在を確認した。

さらに、脳内に急性炎症をきたしたモデルとして、ピロカルピンを腹腔内投与し、痙攣重積による脳内炎症を誘発したモデルラットを作成し、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ を用いた PET 撮像を行った。その結果、脳画像として放射能の取り込みの変化は認められなかったが、上述と同様の定量解析によって、脳内 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ 結合量の増加が認められた。

イソフルラン麻酔下においてアカゲザルに $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ を静脈内投与し 120 分間の PET 撮像を行った。視床や大脳皮質において放射能の初期取り込みが高く、速やかに洗い出され、皮質と髄質で差を認めない均質な分布となった。放射能は投与 1 分でのピークに達し、その取り込み (SUV) は 2.4 と良好であった。その後、緩やかにシグナルの低下を認めた。一方、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ の放射能の取り込みは非放射性 NCGG401 の前処置により変化せず、洗い出しはやや遅くなった。

以上の結果、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ を用いたサル PET 撮像により、 $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ の脳への取り込みが良好であることが明らかになったが、非放射性 NCGG401 の前投与による取り込みの低下を認めず、ラットと同様に、非放射性 NCGG401 の前投与によって、末梢臓器の CSF1R がブロッキングされる効果の影響により、脳への $[^{11}\text{C}]\text{NCGG401}$ の入力が増加し、特異結合を反映した取り込みの低下が観察されていないと考えられた。

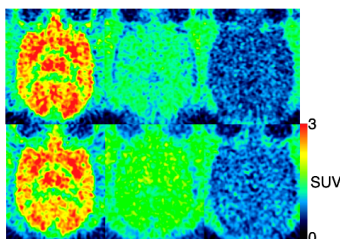


図3：[¹¹C]NCGG401を投与したアカゲザルでのベースライン（上）および非放射性 NCGG401 前投与時（下）の PET イメージングにおける水平断画像（0-10分（左）および 10-30分（中）、30-120分（右）加算）

(3) CSF1R イメージングリガンドの前臨床安全性評価

以上の結果より、[¹¹C]NCGG401 は標的分子への結合特異性を有し、マイクログリアイメージング用 PET リガンドとして有用である可能性が示唆された。

そこで、[¹¹C]NCGG401 の臨床的有用性を明らかにするマイクロドーズ臨床試験を行うための前臨床安全性評価を行った。

まず、有効成分 NCGG401 と [¹¹C]NCGG401 注射液の拡張型単回投与毒性試験を実施した。被験物質について、有効成分 NCGG401 の臨床試験における予定最大投与量は、投与時比放射能及びヒト投与放射能の規格値より見積った。無毒性量の 100 分の 1 の用量を臨床投与量とすることができることから、想定最大臨床総投与量の約 100 倍を試験投与量と設定した。また、[¹¹C]NCGG401 注射液のヒトへの最大投与量は注射剤の容量より見積り、想定最大臨床総投与量の約 100 倍を試験投与量と設定した。試験動物は安全性試験に広く用いられている SD ラットとし、それぞれに対照群をおいた 4 群について、被験物質もしくは媒体を投与した。全ての群の観察・検査・剖検は終了し、一般状態、血液化学検査、器官重量及び剖検所見について、投与翌日及び観察終了時検査において、雌雄いずれの群にも被験物質投与による変化はみられなかった。

また、[¹¹C]NCGG401 注射液を投与した時に被験者が受ける被曝線量を推定した。具体的には [¹¹C]NCGG401 注射液をマウスに尾静脈投与し、主要臓器における放射能をガンマカウンターで経時的に測定し、ヒトにおける経時的体内分布へと重量換算後に実効線量を推定した。その結果、一般的な ¹¹C 標識 PET リガンドと同程度の被曝線量であることを確認した。

(4) RIPK1 イメージングリガンドの前駆体合成と標識合成法の確立

RIPK1 イメージングリガンド [¹¹C]GG502 の標識化合成は、まずホウ素化合物前駆体を合成し、この前駆体と放射性ヨウ化メチルを用いた高速 C-メチル化反応を用いて行なった。(図 4)。リガンドのスペックとしては、収量 500 MBq、放射化学純度 99%以上の ¹¹C 標識体が安定して合成できた。

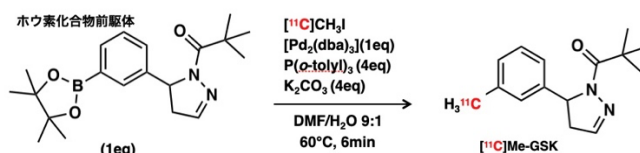


図4：ホウ素化合物前駆体から[¹¹C]GG502の合成

(5) RIPK1 イメージングリガンドの前臨床有効性評価

[¹¹C]GG502 はラットおよびサル PET で、良好な脳移行性を示したが、明らかなブロック効果は認めなかった (図 5)。また、急性炎症ラットにおける評価では明らかな変化を確認できなかった。[¹¹C]GG502 は RIPK1 を標的とした PET リガンドとして、十分な有効性を示さないと考えられた。

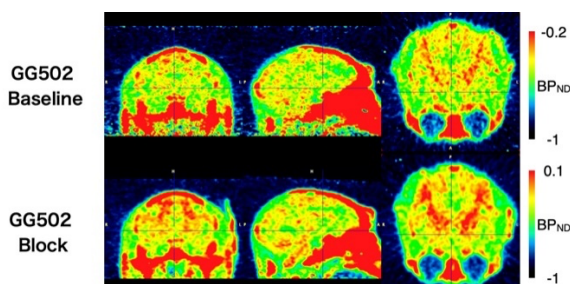


図5：[¹¹C]GG502を投与したアカゲザルでのベースライン（上）および非放射性 GG502 前投与時（下）の PET イメージング結合能画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kimura Y
2. 発表標題 PET Imaging in Drug Development for Neurodegenerative Diseases.
3. 学会等名 The 14th International Conference on Complex Medical and Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogata A, Kimura Y, Yamada T, Ichise M, Ikenuma H, Abe J, Koyama H, Suzuki M, Kato T, Ito K.
2. 発表標題 PET imaging of colony stimulating factor 1 receptor in rat brains.
3. 学会等名 Brain & Brain PET 2019, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小縣綾、木村泰之、山田貴史、市瀬正則、阿部潤一郎、池沼宏、古山浩子、鈴木正昭、加藤隆司、伊藤健吾
2. 発表標題 Colony stimulating factor 1 receptorを標的としたミクログリア特異的PETイメージングの開発
3. 学会等名 第59回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ogata A, Kimura Y, Yamada T, Bin Ji, Seki C, Ichise M, Abe J, Ikenuma H, Koyama H, Suzuki M, Kato T, Ito K
2. 発表標題 Development of PET imaging of Colony Stimulating Factor 1 Receptor Expressed on Microglia.
3. 学会等名 The XII International Symposium of Functional Neuroreceptor Mapping of the Living Brain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ogata A, Kimura Y, Yamada T, Bin Ji, Seki C, Ichise M, Abe J, Ikenuma H, Koyama H, Suzuki M, Kato T, Ito K
2. 発表標題 The evaluation of a novel PET ligand for colony stimulating factor 1 receptor in status epilepticus model rat brains.
3. 学会等名 Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小縣 綾 (Ogata Aya) (10805857)	岐阜医療科学大学・薬学部・助教 (33708)	
研究分担者	池沼 宏 (Ikenuma Hiroshi) (10751159)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・研究技術員 (83903)	
研究分担者	古山 浩子 (Koyama Hiroko) (50402160)	岐阜大学・工学部・准教授 (13701)	
研究分担者	季 斌 (Ji Bin) (80392223)	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) (82502)	
研究分担者	加藤 隆司 (Kato Takashi) (60242864)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・放射線診療部・部長 (83903)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 正昭 (Suzuki Masaaki) (90093046)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・研究員 (83903)	
研究分担者	鈴木 弘美 (Suzuki Hiromi) (30340269)	名古屋大学・環境医学研究所・助教 (13901)	
研究分担者	外山 宏 (Toyama Hiroshi) (90247643)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関