

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08240

研究課題名(和文) グルタミン酸神経毒性における分子間相互作用の探索的PETイメージング研究

研究課題名(英文) PET study for molecular interactions in glutamate excitotoxicity

研究代表者

山崎 友照 (Yamasaki, Tomoteru)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 先進核医学基盤研究部・主任研究員

研究者番号：80627563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、グルタミン酸の過剰放出に起因する神経毒性は、神経変性疾患の病態と深い関連性が示唆されている。本研究では、グルタミン酸受容体やそれを制御するエンドカンナビノイドシステム(eCS)の分子間相互作用をPETイメージングにより明らかにするために、脂肪酸アミド分解酵素(FAAH)に特異的に結合を有するPETイメージングプローブ([¹¹C]DFMC)の簡便な定量法の確立とAMPA受容体調節性たんぱく質であるTARP-g8に選択的な新規PETプローブである[¹¹C]TARP-2105の非侵襲的な定量法の検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間全体を通じて、グルタミン酸受容体やエンドカンナビノイドシステム(eCS)の分子間相互作用を明らかにするためのPETイメージング研究に資する有用なPETリガンドの非侵襲的かつ簡便な定量法の確立に成功した。これにより、病態におけるこれら分子の挙動を明らかにすることによって、神経変性疾患などに対する新しい治療法の開発や機序解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, it is suggested that neuroexcitotoxicity caused by excessive glutamate release was involved in central nervous system disorders. In this research, to understand molecular interactions between glutamate receptors and endocannabinoid system regulating glutamatergic neuronal transmission, noninvasive quantifications of fatty acid amide hydrolase (FAAH) and transmembrane AMPA receptor regulatory protein gamma-8 (TARP-g8) were performed by PET assessments using [¹¹C]DFMC for FAAH and [¹¹C]TARP-2105 for TARP-g8.

研究分野：核医学

キーワード：PET AMPA TARP FAAH MAGL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸が惹起する興奮性の神経伝達は、シナプス可塑性を介して脳の高次機能の発現に関わっている。反面、その強い興奮作用は、神経毒性を発揮することも知られている。この神経毒性は、グルタミン酸受容体の活性化に伴う Ca^{2+} の細胞内濃度の上昇が、様々なリン酸化酵素の活性化を促し、その結果、細胞内のシグナル伝達が過剰に刺激されることにより引き起こされる。

内在性カンナビノイド (2-AG や AEA) によって惹起される逆行性の神経抑制をおこなう機構として知られるエンドカンナビノイドシステム (eCS) は、カンナビノイド受容体を介してグルタミン酸の過剰な放出を抑制する。また、過度な抑制に傾かないように、シナプス間隙の内在性カンナビノイドの濃度も、これらに特異的な酵素であるモノアシルグリセロールリパーゼ (MAGL) 及び脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) によって分解され、調節されている。

このように、グルタミン酸神経は eCS により絶妙に興奮と抑制のバランスが制御されている。

2. 研究の目的

上述のように、グルタミン酸神経の興奮と抑制は受容体や酵素などの分子が複雑に機能し、バランスを保っているが、外的要因によりこれらのバランスに不均衡が生じ、グルタミン酸神経が過剰に興奮刺激側に傾いてしまうと、これを鎮静化するための eCS における FAAH や MAGL の過剰な活性化を招き、結果として、ミクログリアが活性化され、神経炎症を引き起こす。このような背景から、グルタミン酸受容体や FAAH 及び MAGL の経時的な変化を PET イメージングにより客観的且つ定量的に観察することが出来れば、神経炎症に起因する様々な疾患の病態解明や治療薬の開発等に大きく貢献することができると考えられる。そこで本研究では、グルタミン酸神経毒性における分子間相互作用を明らかにするために、申請者らが開発したイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 (AMPA) や FAAH に特異的な PET プローブを用いてこれらの分子を定量的に追跡できる手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) [^{11}C]DFMC を用いた FAAH の非侵襲的定量法の開発

脳内の FAAH の密度変化を定量的且つ非侵襲的に推定するために、本研究では、FAAH に対して特異的な結合が確認されている [^{11}C]DFMC (Shimoda et al. Bioorg Med Chem. 2016) を用いて定量法の確立を目指した。はじめに、ラットを用いて [^{11}C]DFMC の採血 PET を行い、脳内動態のパラメータ解析を行った。 [^{11}C]DFMC は、FAAH に対して不可逆的結合方式をとるため、パトラックプロット法により、放射能の定量的な取り込み量を表す K_i 値を算出した。次に、特異結合の少ない脊髄を参照領域として K_i 値 (以降 K^{REF}) を推定し、推定精度を確かめるために、test-retest 試験を行った。最後に、 K^{REF} 値から算出した calculated k_3 値を用いて、FAAH の特異的な阻害剤である URB597 の用量 - 反応試験を行い効果用量 (ED_{50}) を推定した。

(2) [^{11}C]TARP-2105 を用いた TARP-g8 の非侵襲的定量法の開発

近年、申請者らは AMPA 受容体調節性タンパク質の一つである TARP-g8 に特異的に結合する PET プローブ [^{11}C]TARP-2105 の開発に成功した (Yu et al. J Med Chem. 2022)。TARP-g8 は、AMPA 受容体の機能の多様性の発現に関与しているため、PET イメージングにより定量的に

TARP-g8 の発現量の変化を測定することは、様々な病態と AMPA 受容体の機能変化の関連性を明らかにすることに寄与する。そこで、本研究では、TARP-g8 の非侵襲的な定量法を確立するために、TARP-g8 への結合能 (BP_{ND}) を推定するための適切な参照領域及び参照領域法の検証を行った。最後に、 BP_{ND} 値の推定精度を確かめるために、test-retest 試験を行った。

4. 研究成果

(1) $[^{11}C]$ DFMC を用いた FAAH の非侵襲的な定量法の開発

(1-1) $[^{11}C]$ DFMC の脳内動態パラメータの解析

図 1 に、採血 PET より得られた血漿の $[^{11}C]$ DFMC の入力関数 (A) とラット脳の PET 画像及び脳関心領域における時間放射能曲線 (TAC) (B) を示す。 $[^{11}C]$ DFMC は、生体内で比較的緩やかに代謝され、血漿中において、投与後 15 分で 70% 以上が未変化体として存在し、投与後 90 分でも 30% 以上が未変化体のままであった。ラット脳の放射能集積は投与後すぐに高い取り込みを示し、その後、90 分まで緩やかな上昇を示した。この挙動から、 $[^{11}C]$ DFMC は脳内へ移行した後、FAAH と不可逆的に結合し、少なくとも 90 分は乖離しないことが示唆された。血漿中の入力関数 (図 1A) を用いた irreversible two-tissue compartment (2TCMi) モデル解析の結果、FAAH の最も豊富な領域である帯状回で、 k_3 は 0.18 min^{-1} を示し、実質的な取り込み量の指標である K_i 値は $0.21 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$ であった。

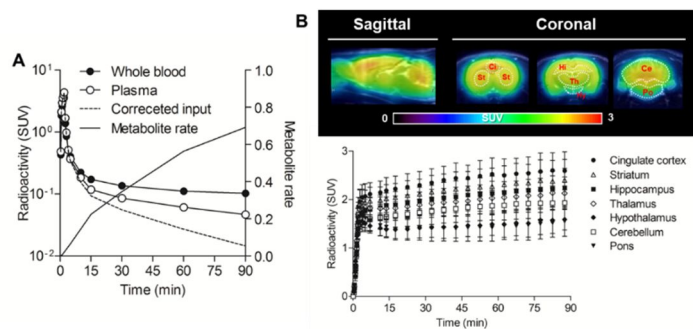


図 1. 代謝物補正された $[^{11}C]$ DFMC の血漿中の入力関数 (A) と脳関心領域における PET 画像及び時間放射能曲線 (B)。Ci: cingulate cortex, St: striatum, Hi: hippocampus, Th: thalamus, Hy: hypothalamus, Ce: cerebellum, Po: pons.

(1-2) 非侵襲的に K_i (K^{REF}) 値を推定するための参照領域の選定

図 2 に、FAAH の選択的な阻害剤である URB597 を前投与 (3 mg/kg) されたラット脳の PET 画像 (A) と TAC (B) を示す (対象は非投与群)。URB597 を前投与された個体の帯状回では、投与直後から緩やかに放射能が脳から排出され、対象のコントロール群と比較して、十分に放射能集積を減少させた。一方で、脊髄の放射能集積は、コントロール群で帯状回の半分程度と、元々低かったが、URB597 の前投与による、放射能集積の減少は見られなかった。脊髄には FAAH が生物学的にも分布していないことから、脊髄を参照領域として、非侵襲的に K^{REF} 値を推定することとした。

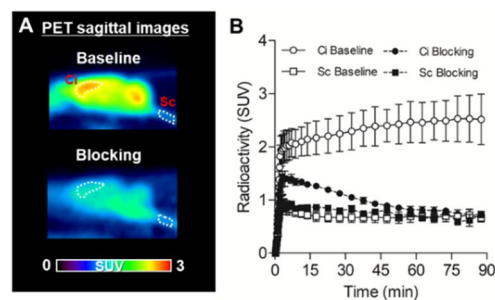


図 2. コントロール及び URB597 を前投与 (3 mg/kg) されたラット脳の $[^{11}C]$ DFMC-PET 画像 (A) と TAC (B)。Ci: 帯状回, Sc: 脊髄。

(1-3) K^{REF} 値を用いた URB597 の用量 - 反応試験

脊髄を参照領域として推定した K^{REF} 値と血漿の入力関数から推定した K_i 値の相関分析を行ったところ、回帰直線の傾きは 0.075 で切片は -0.004 であった。また、 K^{REF} と K_i の相関係数 (r) は 0.981 であり、非常に強い正の相関があることが示された。この時、傾きは K^{REF}/K_i であるこ

とから, FAAH への結合量を反映している k_3 は, 以下の式で表すことが出来る。

$$K_i = \frac{K_1 k_3}{k_2 + k_3} \quad (1)$$

$$Slope = \frac{K^{REF}}{K_i} \quad (2)$$

$$k_3 = \frac{K^{REF} k_2}{slope \times K_1 - K^{REF}} \quad (3)$$

図 3 に, URB597 の用量 - 反応試験における $[^{11}\text{C}]\text{DFMC}$ の PET 画像 (A) と式 3 により算出された calculated k_3 を FAAH の活性の指標とした URB597 の用量 - 反応曲線 (B) を示す。ラット脳内の放射能集積は URB597 の投与量依存的に脳全域で減少した。また, 参照領域法で推定した K^{REF} 値から算出した Calculated k_3 の用量反応曲線では, 低用量で, 値にばらつきがみられたものの, URB597 の半数効果用量 (EC_{50}) は, $66.4 \mu\text{g}/\text{kg}$ であると推定された。この値は, 報告されている URB597 のインビトロの IC_{50} 値に近い値であった。

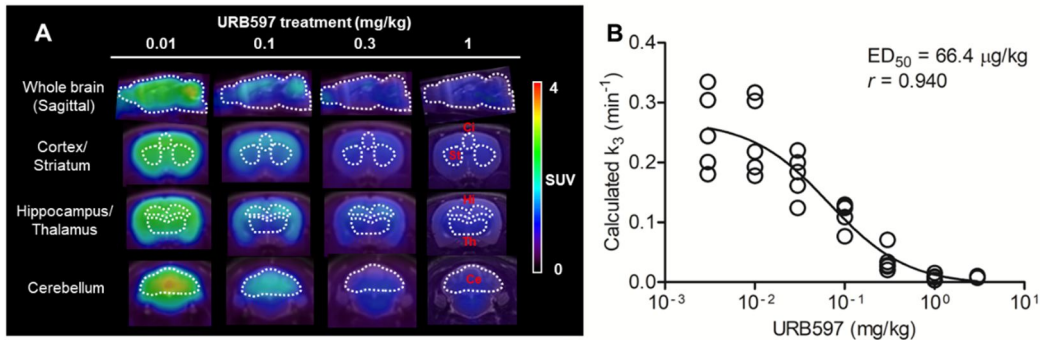


図 3. $[^{11}\text{C}]\text{DFMC}$ -PET による URB597 の効果用量測定。A : URB597 (0.01, 0.1, 0.3 or 1 mg/kg) を前投与されたラット脳の PET 平均画像 (0-90 分) B : 実測した K^{REF} 値から算出した calculated k_3 を用いた URB597 の用量 反応曲線。Ci : 帯状回, St : 線条体, Hi : 海馬, Th : 視床, Ce : 小脳。

(2) $[^{11}\text{C}]\text{TARP-2105}$ を用いた TARP-g8 の非侵襲的定量法の開発

(2-1) $[^{11}\text{C}]\text{TARP-2105}$ のコンパートメントモデル PET 動態解析

図 4 に, 可逆的結合タイプの PET リガンドのためのコンパートメントモデル(A), $[^{11}\text{C}]\text{TARP-2105}$ の血中放射能及び代謝物補正後の血漿の入力関数 (B), ラット脳における $[^{11}\text{C}]\text{TARP-2105}$ の PET 平均画像 (0-60 分)(C) 及び脳関心領域における TAC (D) を示す。 $[^{11}\text{C}]\text{TARP-2105}$ は, 生体内で比較的速やかに代謝され, 血漿中において, 投与後 30 分で 80%程度が代謝物となり, 投与後 60 分では 10%程度が未変化体であった。脳内の放射能集積は, TARP-g8 の発現量が最も豊富な領域である海馬で最も高く, 発現量が少ない, 視床, 橋, 小脳では低かった。 $[^{11}\text{C}]\text{TARP-2105}$ の脳内放射能集積は, 投与後すぐにピークに達

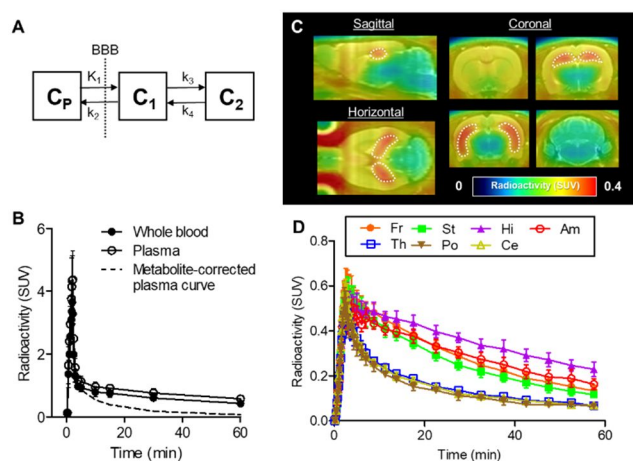


図 4. Two-tissue compartment model の概念図 (A), $[^{11}\text{C}]\text{TARP-2105}$ の血漿中の入力関数 (B), $[^{11}\text{C}]\text{TARP-2105}$ のラット脳における PET 画像 (C) 及び脳関心領域における TAC (D)。 C_P : 血漿中のフリーな状態, C_1 : 脳内のフリーな状態 + 非特異結合状態, C_2 : 結合状態, K_1 : 流入速度, k_2 : 流出速度, k_3 : 結合速度, k_4 : 乖離速度, Fr: 前頭葉, St: 線条体, Hi: 海馬, Am: 扁桃体, Th: 視床, Po: 橋, Ce: 小脳。

し、その後緩やかに脳外へ排出された。

[¹¹C]TARP-2105 は、TARP-g8 に対して可逆的な結合様式を持つことから、図 4A に示す two-tissue compartment model (2TCM) により、詳細な脳内のパラメータ解析を行った。その結果、 $K_1 \sim k_4$ の速度パラメータから成る複合パラメータである分布容積 $V_T (= (K_1/k_2) * (1+k_3/k_4))$ は、海馬 (1.4 mL/cm³) で最も高く、次いで扁桃体 (1.0 mL/cm³)、前頭葉 (0.9 mL/cm³)、線条体 (0.8 mL/cm³) の順で得られた。一方で、TARP-g8 の低発現領域である視床、橋、小脳では、0.5 mL/cm³ 程度であった。

(2 - 2) 非侵襲的に [¹¹C]TARP-2105 の結合能 (binding potential, BP_{ND}) を推定するための一般的な参照領域法の比較

TARP-g8 は、視床、橋、小脳で殆ど発現していない (Tomita et al. J Cell Biol. 2003) ことから、これらの領域の TAC を血漿の入力関数の代わりに用いて BP_{ND} を推定し、適切な参照領域を決定した。

各参照領域の TAC を用いて得られた BP_{ND} 値と血漿の入力関数を用いて得られた DVR - 1 (≈ BP_{ND}) 値を比較したところ、小脳を参照領域として得られた BP_{ND} 値が、採血法と最も高い相関 (R² = 0.945) を示した。この結果から、 [¹¹C]TARP-2105-PET では、参照領域として小脳を用いることが最適であることが示された。

次に、一般的な参照領域法である SRTM (simplified reference tissue model; Lammertsma et al. Neuroimage. 1996)、MRTM0 (Ichise's multilinear reference tissue; Ichise et al. J Nucl Med. 1996)、Logan Ref (Logan graphical reference tissue model; Logan et al. J Cereb Blood Flow Metab. 1996) 及び ratio method (Arakawa et al. J Nucl Med. 2008) を比較した。図 5 に、脳の関心領域 (前頭葉、海馬、線条体及び扁桃体) における採血法により推定された DVR - 1 値と小脳を参照領域として各モデルより得た BP_{ND} 値との相関を示す。SRTM、MRTM 及び Logan Ref 法では、BP_{ND} が 1 付近にあるときの誤差は小さいが、1.5 以上である場合は、過小評価される傾向にあることが示された。一方で、最も簡便な方法である Ratio method は、多少ばらつきがみられたものの、回帰直線の傾きが 0.9 以上を示した。

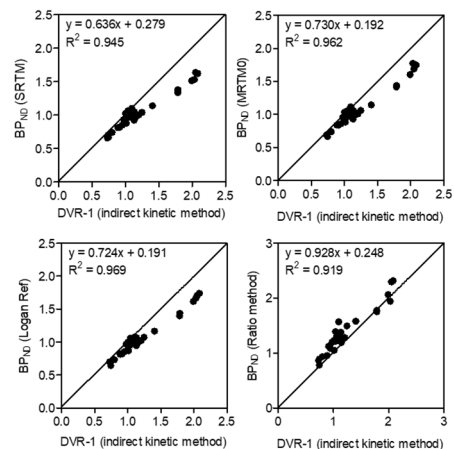


図 5. 一般的な参照領域法 (A: SRTM, B: MRTM0, C: Logan Ref, D: Ratio method) で得られた BP_{ND} と採血法により得られた DVR - 1 の比較

(2 - 4) [¹¹C]TARP-2105-PET における BP_{ND} 推定の test-retest 試験

各参照領域法で得られた BP_{ND} 値の test-retest 試験の結果、脳の関心領域の中でも、前頭葉で最も再現性が高く、誤差は 5.8~8.5% であった。一方で、線条体の BP_{ND} 値は高いばらつきを示し、誤差は 14.8~18.3% であった。参照領域法の中でも、SRTM 法の ICC が最も高く (0.96)、%variability も最も低かったことから、 [¹¹C]TARP-2105-PET において SRTM 法が最も高い再現性を示す参照領域法であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamasaki Tomoteru, Ohya Tomoyuki, Mori Wakana, Zhang Yiding, Wakizaka Hidekatsu, Nengaki Nobuki, Fujinaga Masayuki, Kikuchi Tatsuya, Zhang Ming-Rong	4. 巻 373
2. 論文標題 Development of an In Vivo Method to Estimate Effective Drug Doses and Quantify Fatty Acid Amide Hydrolase in Rodent Brain using Positron Emission Tomography Tracer N-(3,4-dimethylisoxazol-5-yl)piperazine-4-[4-(2-fluoro-4-[11C]methylphenyl)thiazol-2-yl]-1-carboxamide ([11C]DFMC)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 353 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.119.263772	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki Tomoteru, Ishii Hideki, Hiraishi Atsuto, Kumata Katsushi, Wakizaka Hidekatsu, Zhang Yiding, Kurihara Yusuke, Ogawa Masanao, Nengaki Nobuki, Chen Jiahui, Li Yinlong, Liang Steven, Zhang Ming-Rong	4. 巻 43
2. 論文標題 Small-animal PET study for noninvasive quantification of transmembrane AMPA receptor regulatory protein -8 (TARP -8) in the brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	6. 最初と最後の頁 893 ~ 904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0271678X231152025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山崎 友照、平石 惇人、森 若菜、大久保 崇之、栗原 雄祐、念垣 信樹、張 明栄
2. 発表標題 モノアシルグリセロールリパーゼを標的としたPETプローブを用いた脳内pHイメージング法の開発
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 友照、岡田 真希、森 若菜、張 一鼎、脇坂 秀克、小川 政直、藤永 雅之、張 明栄
2. 発表標題 Small-animal PET study: excess glutamate release upregulates mGluR1 availability
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 山崎 友照、石井 英樹、平石 惇人、栗原 雄祐、念垣 信樹、張 明栄
2. 発表標題 新規11C標識PETリガンドを用いたTARP- 8の非侵襲的脳内分布測定
3. 学会等名 第62回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoteru Yamasaki, Wakana Mori, Ohkubo Takayuki, Atsuto Hiraishi, Yusuke Kurihara, Nobuki Nengaki, Ming-Rong Zhang.
2. 発表標題 Demonstration of intracellular pH-weighting PET imaging using a new-type PET probe responsible for monoacylglycerol lipase activity in the brain
3. 学会等名 International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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	森 若菜 (Mori Wakana) (30835442)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 先進核医学基盤研究部・研究員 (82502)	
研究分担者	藤永 雅之 (Fujinaga Masayuki) (70623726)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究所 先進核医学基盤研究部・主任研究員 (82502)	

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
---------	---------