

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：33708

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17187

研究課題名(和文) TLR4を標的とした18F標識DNAアプタマーによる神経炎症イメージング

研究課題名(英文) Development of DNA aptamer PET ligands targeting toll-like receptor 4

研究代表者

小縣 綾 (OGATA, Aya)

岐阜医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：10805857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、様々な神経変性疾患における神経炎症に関わる因子として、TLR4を低侵襲的に可視化するPETイメージングリガンドを開発することである。本研究では、TLR4を標的としたDNAアプタマーの脳移行性、ヌクレアーゼ耐性を蛍光標識体を用いて評価したところ、優れた脳移行性及びヌクレアーゼ耐性を有していることが示された。並行して、PET撮像を実施するラットの脳切片を免疫染色することで、TLR4がミクログリアやアストロサイトだけでなく、神経細胞にも発現していることが示唆された。また、18F及び11C標識体の前駆体合成が完了したため、今後標識化を実施する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々な神経変性疾患における神経炎症に関わる因子として、TLR4を低侵襲的に可視化するPETイメージングリガンドを開発研究を実施した。TLR4は脳内では主にグリア細胞膜表面に発現し、LPSなどが結合することで活性化・炎症性サイトカインを産生し、炎症反応を惹起する。アルツハイマー病患者の脳内においてもTLR4の発現量は増えている。TLR4を標的とするPETリガンドを開発し、TLR4の脳内密度や分布などの情報が得られるバイオマーカーとなりえれば、神経変性疾患における治療法の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a PET imaging ligand that visualizes TLR4 minimally invasively as a factor involved in neuroinflammation in various neurodegenerative diseases. In this study, we evaluated the brain permeability and nuclease resistance of DNA aptamers targeting TLR4 using fluorescently labeled DNA aptamers. As a result, it was shown that the DNA aptamer has a good brain permeability and nuclease resistance. In parallel, rat brain sections of the same strain as the rats undergoing PET imaging were immunostained. It was suggested that TLR4 is expressed not only in microglia and astrocytes but also in nerve cells. In addition, since the synthesis of precursors of 18F and 11C labeled substances has been completed, labeling will be carried out in the future.

研究分野：放射線科学

キーワード：PET TLR4 短寿命放射性核種

1. 研究開始当初の背景

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 やタウ蛋白、 シヌクレインなどのタンパクの異常凝集・蓄積が、不可逆的な神経障害を惹き起こす。その治療法は、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動薬剤のように、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。一方で、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は、アストロサイトやミクログリアの浸潤が認められ、神経炎症が神経変性疾患病理に関わると考えられている (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り、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)。

ポジトロン断層撮影 (PET) は ^{11}C や ^{18}F 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、バイオマーカーとして幅広く用いられている。神経炎症を標的とした創薬及び病態研究において、これら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として評価可能になれば、治療法開発効率の飛躍的な向上が見込める。

本研究では、アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患における創薬研究に役立てるため、様々な神経変性疾患において発現量が增大しており (Bsibsi, *et al.*, 2002)、ミクログリアの活性化やアミロイド の除去に関わるとされる toll-like receptor 4 (TLR4) を標的とした、神経炎症イメージングの開発を実施する。これまでに、TLR4 特異的に結合し、適した脳内移行性を有する PET リガンドは報告されていない。本研究は、TLR4 を特異的に認識し脳内移行性を有する DNA アプタマーを基に新たな ^{18}F 標識 PET リガンド開発を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳内においてミクログリアやアストロサイトに発現し、様々な神経変性疾患において神経炎症に関わるとされる TLR4 を可視化する PET リガンドを開発することで、神経変性疾患における創薬研究に役立てることである。

TLR はパターン認識受容体ファミリーであり、各々が免疫系において重要な役割を果たしている。そのひとつ、TLR4 は脳内では主にミクログリアやアストロサイト細胞膜表面に発現し、グラム陰性細菌壁の LPS などが結合することで活性化され、TNF- α や IL-6、IL-1 などの炎症性サイトカインを産生し、炎症反応を惹起する。実験的には加齢マウスにおいて、ミクログリア細胞膜上の TLR4 にリガンドが結合すると、ミクログリアが活性化されてアミロイド が減少することが報告されている (DiCarlo, *et al.*, 2001; Quinn, *et al.*, 2003; Herber, *et al.*, 2004; Malm, *et al.*, 2005)。それに加えて、アルツハイマー病患者脳内においても TLR4 の発現量は増えている (Bsibsi, *et al.*, 2002)。これら報告から、TLR4 を標的とする PET リガンドを開発し、TLR4 の脳内密度や分布などの情報が得られるバイオマーカーとなりえれば、神経変性疾患における創薬研究、病態研究に役立つことが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、脳内においてミクログリアやアストロサイトに発現し、炎症において重要な因子のひとつである TLR4 を標的とする ^{18}F 標識 DNA アプタマーを開発、小動物においてその有効

性を明らかにする。

(1) 蛍光標識体を用いた DNA アプタマーの脳移行性評価

蛍光標識を導入した DNA アプタマーをマウス (C57BL/6JmsSLc, 6 week, male) に尾静脈投与 (100 μ M, 100 μ L) し、1 時間後に脳を取り出し、サンプルチューブに 0.1 g 程度ずつ入れた。そして、RIPA buffer を加えホモジナイザーで懸濁液にし、ポリアクリル電気泳動 (SDS-PAGE) を実施することで脳内に存在する蛍光標識 DNA アプタマーの定量を試みた。加えて、DNA アプタマーのヌクレアーゼ耐性もウシ血清及び Nuclease Phosphodiesterase 1 を用いて、同じく SDS-PAGE で検証した。

(2) ラット脳内における TLR4 発現量の検証

PET 撮像を実施するラット脳切片 (健常ラット、LPS モデルラット) を用いた免疫染色によって、TLR4 の局在や発現量を検証した。また、TLR4 が発現する細胞種を検討するため、Iba1、NeuN、GFAP などの免疫染色も同時に実施した。

(3) ^{18}F 標識体の合成検討

DNA アプタマーの脳移行性について PET 撮像を用いて検証するため、 ^{18}F 標識体の合成に取り組んだ。 ^{18}F 標識体を合成後、Click 反応によって DNA アプタマーと結合させることで ^{18}F 標識 DNA アプタマーとする。

4. 研究成果

(1) 蛍光標識体を用いた DNA アプタマーの脳移行性評価

蛍光標識 DNA アプタマーを経静脈投与し、マウスにおける脳移行性を検証した。SDS-PAGE でバンドを検出できたため、脳サンプル中に蛍光標識 DNA アプタマーが存在することを確認できた。しかし、ゲル泳動する前に加熱処理したにも関わらず、想定した分子量の位置とは異なる位置にバンドは検出された。DNA アプタマーが分解されたことを考えて、ウシ血清や SVPD を用いてヌクレアーゼ耐性を検証したところ、1 時間以内の分解は認めなかった。そのため、本研究で使用した DNA アプタマーは T_m 値が 75-80 であることから、高い熱的安定性によって高次構造をとるため、想定した分子量の位置とは異なる位置にバンドは検出されたと考えられた。

DNA アプタマーは定量分析が困難であったため、TLR4 との結合親和性は低下するが分子量がより小さく、評価が容易なペプチドも PET リガンドの候補として検討をはじめた。

(2) ラット脳内における TLR4 発現量の検証

灌流固定したラット脳切片を用いて、TLR4 の発現や局在を確認するために免疫染色を実施した。その結果、TLR4 は GFAP や Iba1 よりも NeuN と共局在していたことから、アストロサイトやミクログリアだけでなく、ラット脳内においては神経細胞にも多く発現していることが示唆された。また、LPS を線条体に投与して作製した LPS モデルラットの脳切片でも免疫染色及びウエスタンブロットを実施したが、TLR4 の発現量の変化は認められなかった。そのため、今後はアルツハイマー病モデルラットなどで TLR4 発現量や局在を評価し、PET 撮像に適したモデルを選定する。

(3) ^{18}F 標識体の合成検討

当初、 ^{18}F 標識体を合成検討する予定であったが、 ^{18}F 自動合成機が使用できなくなったことから ^{11}C 標識体を中心に検討することとなった。そのため、標識前駆体はヒュスゲン環化するためにアジドを有し、 ^{18}F 標識、 ^{11}C 標識どちらも検討することができる低分子化合物を設計し、合成した。今後、合成した前駆体を用いて、標識化合成を実施していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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