

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22594

研究課題名(和文) PETによる成体脳神経新生動態解析系の創出

研究課題名(英文) Establish of PET imaging system for analysis of adult neurogenesis

研究代表者

佐藤 康二 (Sato, Kohji)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：80235340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：成体脳神経新生は、近年、その障害が、うつ病や統合失調症などの精神疾患の病態生理に与ることが示唆されており、早期診断への有用性に鑑み、その動態を *in vivo* で画像化する技術の開発が俟たれていたが、これまでに神経幹細胞の動態を *in vivo* で描出するためのPETなどの技術はなかった。ここでは、神経幹細胞上の受容体様膜タンパク質CD133に特異的に結合する化合物による成体脳神経新生のPETイメージング技術を創出した。また、うつ病モデルマウスにて同トレーサーによるPETイメージングを実施し、その神経幹細胞障害を *in vivo* でリアルタイムに観察、定量的に評価することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、精神神経疾患の脳病態と、成体脳神経新生動態の連関の詳細は不明であった。しかし最近、症状の進行や併発する痴呆症の病因に、成体脳における神経新生が関与していると考えられるようになった。こうした経緯を踏まえ、精神神経疾患における成体脳神経新生動態を探る機運が高まり、*in vivo* で成体脳神経新生をイメージングする技術の開発が俟たれていた。精神神経疾患において神経新生動態を *in vivo* で観察することにより、疾患の病態と成体脳神経新生動態の連関を緻密に解析することができると共に、精神神経疾患の治療に向けた新規の神経幹細胞を標的とする幹細胞治療の開発のための基礎的な知見が得られると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The involvement of adult neurogenesis in the pathophysiology of psychiatric disorders such as major depression and schizophrenia has recently reported. The necessity of technology for *in vivo* imaging of adult neurogenesis in the brain is deeply recognized in early diagnosis of those kinds of incurable mental diseases, however, the technology has not established to date. In this study, PET imaging system based on newly synthesized chemical compound and its derivative PET trace, which specifically binds to CD133, expressing on the cellular membrane of neural stem cell, was established. By this PET imaging system, the dynamism of adult neurogenesis in the brain of major depression model mouse was clearly visualized in the living animal.

研究分野：神経科学

キーワード：成体脳神経新生 精神疾患 PET

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

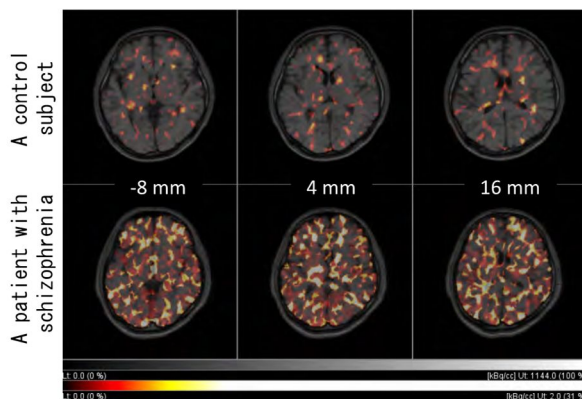
## 1. 研究開始当初の背景

20 世紀を通じて、ヒトを含む哺乳動物の中樞神経系では、成体に成長した後にも新たにニューロンを生じる NSC が存することが明らかにされた。NSC は自己複製能と、ニューロンとグリアに分化する多分化能とを保持する幹細胞であり、成体脳では主に SVZ と SGZ に局在する。'90 年代にカナダの Samuel Weiss 博士らにより epidermal growth factor (EGF) や basic fibroblast growth factor (bFGF) の存在下に NSC が *in vitro* で培養できることが示されたのを契機に、NSC の分化や自己複製に関わる転写因子群や細胞内情報伝達系が相次いで同定され、また、NSC 特異的マーカーとして中間径線維 nestin や RNA 結合蛋白質 Musashi-1、膜糖蛋白質 Prominin-1 等が見出されたことにより、免疫組織化学を用いた形態学的解析も盛んに行われるようになった。これまでに神経新生に関わる種々の遺伝子を欠損する knockout mouse が作成され、また、shRNA や各種遺伝子を SVZ や SGZ に transfect することにより遺伝子の knockdown や過剰発現を行なうことで NSC の分化や増殖への影響が検討されてきたが、いずれの研究においても脳を剖出して、SVZ や SGZ における nestin 等の NSC 特異的マーカー陽性細胞を定量的に解析することで、その時々の NSC 及び神経新生の状況を類推せざるを得ず、*in vivo* において非侵襲的に NSC の動態をイメージングできる技術の開発が俟たれていた。最近、標識した NSC を脳内に移植した後に MRI により、その位置を追跡する類いの研究が国内外で行われるようになったが、元来脳に存する NSC の動態並びに神経新生を *in vivo* で解析する試みとしては本研究が世界で初めてのものである。申請者らは、これまでに世界に先駆け摂食障害患者で脳内ミクログリアの炎症性の活性化を PET で描出するのに成功している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトでの PET (positron emission tomography) イメージングの実現を見据え、成体脳神経新生 (adult neurogenesis) の動態を *in vivo* でリアルタイムに画像化するための PET トレーサーを創製し、これまでに成体脳神経新生の障害が報告されているパーキンソン病、アルツハイマー病、統合失調症、うつ病などの種々の精神神経疾患の早期診断技術、並びに、神経幹細胞 (neural stem cell, 以下 NSC と略) を治療標的とする根治療法を創出することである。成体脳神経新生は、社会圧、環境ストレスへの脆弱性から、脳神経系の病態の初段階で障害を来す初期イベントであると考えられ、その障害動態の解析系は、特にこれまで診断マーカーが見出されていなかった統合失調症やうつ病などの精神疾患の早期診断の他、NSC を治療標的としたそれら疾患の治療薬創製にも有用である。

ここでは、まず、申請者らが CD133 結合能により独自の受容体様タンパク質結合化合物ライブラリーから FCS を用いスクリーニングした複数の CD133 高親和性化合物について、*in vitro* 血液脳関門モデルの血管内皮細胞培養系を調製し、その血液脳関門透過性を評価する。次に、 $[^{11}\text{C}]$  ポジトロン標識を施し、それをラット及びコモンマウスに注射投与した後に PET カメラで、脳内移行性や脳クリアランスなどの化合物分子特性を評価、解析する。ここでは、また、それら PET トレーサー候補化合物の神経毒性を、行動学的解析、MRI と脳スライスでの形態学的解析、脳脊髄液解析などにより評価し、薬剤安全性を検討する。一方、ラットと霊長類での薬物動態の差異にも着目し、PET トレーサー濃度の至適化、長期投与の影響評価を実施する。研究期間の後半では、カニクイザル、アカゲザルなどのマカクサ



The slice positions from the AC-PC line are indicated in mm.

図1 脳内活性化ミクログリアのPETイメージング  
(上段: 健常者、下段: 統合失調症患者)

ルでの PET による薬物動態解析、神経毒性試験などを行い、将来のヒトでの臨床応用への可能性を検討する。申請者らは、長年、浜松ホトニクス PET 健診センターにてアルツハイマー病、統合失調症などの精神神経疾患患者の脳病態を PET で画像化し、アセチルコリン、ドパミン、セロトニンなどの神経伝達物質や脳内炎症に掛かるミクログリアなどの脳内動態と病態の連関の解析に当たって来た (Suzuki et al., JAMA Psychiatry, 図 1)。そして、初発未治療の統合失調症患者では、病態初段階より脳内ミクログリアが活性化していることなどを世界に先駆け報告した。申請者らが所属する浜松医科大学には、ポジトロン標識化合物の合成が可能なサイクロトロンと PET カメラを併設したわが国有数の PET イメージング施設が整備されており、専門技術職員の支援を受け適宜ヒトの脳内分子及び細胞動態を解析することが可能である。また、最近、申請者らは、成体脳神経新生を PET により *in vivo* で画像化することができるトランスジェニック・ラットを創製し、それから ALS、うつ病などの精神神経疾患病態モデルを作出し、脳内 NSC 動態を定量的に解析することで、成体脳神経新生障害とそれら疾患の病態生理の連関を解析する一方、成体脳神経新生障害の回復に機能する薬剤の探索を、PET イメージングを併用しながら、申請者ら独自の NSC への細胞増殖因子活性を持つ医薬候補化合物ライブラリーにて行い、血液脳関門を透過する複数の医薬リード化合物を同定した (Ueki et al., *in submission*)。

### 3. 研究の方法

ここでは、まず、申請者らが CD133 結合能により独自の受容体様タンパク質結合化合物ライブラリーから FCS を用いスクリーニングした複数の CD133 高親和性化合物について、*in vitro* 血液脳関門モデルの血管内皮細胞培養系を調製し、その血液脳関門透過性を評価した。次に、 $[^{11}\text{C}]$  ポジトロン標識を施し、それをラット及びコモンマーモセットに注射投与した後に PET カメラで、脳内移行性や脳クリアランスなどの化合物分子特性を評価、解析した。ここでは、また、それら PET トレーサー候補化合物の神経毒性を、行動学的解析、MRI と脳スライスでの形態学的解析、脳脊髄液解析などにより評価し、薬剤安全性を検討した。一方、ラットと霊長類での薬物動態の差異にも着目し、PET トレーサー濃度の最適化、長期投与の影響評価を実施した。研究期間の後半では、カニクイザル、アカゲザルなどのマカクサルでの PET による薬物動態解析、神経毒性試験などを行い、将来のヒトでの臨床応用への可能性を検討した。

研究期間の後半では、次に、ラットとコモンマーモセットで母子分離や妊娠後期での母体への poly I:C 投与による自閉症や統合失調症などの精神神経疾患病態モデルを作製した。ここではノベルティ試験やプレパルス抑制試験などの行動学的解析を行い、精神症状を定量的に評価した。また、併せて、MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) の腹腔反復投与によるラットとコモンマーモセットのパーキンソン病病態モデルを作製した。これら病態モデル動物に申請者らによる  $[^{11}\text{C}]$ CD133 PET トレーサーを注射投与し、PET カメラを用い脳内 NSC 動態を *in vivo* で画像化した。そして経時的な成体脳神経新生障害の推移を観察し、その精神神経疾患病態生理との連関を解析した。

研究期間の終わりには、申請者らが NSC への細胞増殖因子活性、神経細胞分化誘導因子活性などを指標に NSC 培養系でスクリーニングした成体脳神経新生賦活剤で、*in vitro* 血液脳関門モデルにおける透過性評価を行い、PET イメージングへの応用適正を確認したものを、上述した精神神経疾患病態モデルに投与するとともに、 $[^{11}\text{C}]$ CD133 PET トレーサーでの成体脳神経新生動態の PET イメージングを行い、その動態と精神神経症状改善効果との連関を精査した。

### 4. 研究成果

FCS (fluorescence correlation spectroscopy) を用いて NSC の細胞膜上に発現する受容体様膜貫通型タンパク質 CD133 への特異的結合化合物を見出し、それより PET トレーサー・リード化合物を創製した。当該化合物は、血液脳関門透過性を持つ他、脳取り込みクリアランスなどでの優

れた PET トレーサー特性を呈することが確認され、その<sup>11</sup>C]ポジトロン標識化合物は高い S/N 比で、成体脳神経新生動態の PET イメージングを行うことができた。本研究では、将来のヒトでの統合失調症の早期診断などへの臨床応用を見据え、マーモセットやマカクサルなどの精神神経疾患病態モデルにて PET イメージングを行い、成体脳神経新生障害と病態との関連を見出した他、NSC を治療標的とする難治疾患の根治療法の創出に取り掛かった。

これまでに神経新生に関わる種々の遺伝子を欠損する knockout mouse が作成され、また、shRNA や各種遺伝子を SVZ や SGZ に transfect することにより遺伝子の knockdown や過剰発現を行なうことで NSC の分化や増殖への影響が検討されてきたが、いずれの研究においても脳を剖出して、SVZ や SGZ における nestin 等の NSC 特異的マーカー陽性細胞を定量的に解析することで、その時々 NSC 及び神経新生の状況を類推せざるを得ず、*in vivo*において非侵襲的に NSC の動態をイメージングできる技術の開発が俟たれていた。最近、*in vitro*において標識した NSC を脳内に移植した後に magnetic resonance imaging (MRI) により、その位置を追跡する類いの研究が国内外で行われるようになったが、元来脳に存する NSC の動態並びに神経新生を *in vivo*で解析する試みとしては、本研究が世界で初めてのものである。これまで、パーキンソン病やハンチントン病等の神経変性疾患、並びに脳血管障害の病態と、成体脳に存する NSC との関わりの詳細は不明であった。しかし最近、パーキンソン病の患者の剖検脳の解析から、罹患脳では SVZ の NSC が著明に減少していることが確認され、症状の進行や併発する痴呆症の病因に、成体脳における神経新生が関与していると考えられるようになった。こうした経緯を踏まえ、神経内科疾患における NSC の動態を探る機運が高まり、*in vivo*で NSC をイメージングする技術の開発が大いに俟たれていた。精神神経疾患、殊に症状が緩徐に進行する神経変性疾患において経時的に NSC 或いは神経新生の動態を *in vivo*で観察することにより、疾患の病態と NSC との関わりを緻密に解析できると共に、神経内科疾患の治療に向けた新規の NSC をターゲットとする幹細胞治療の開発のための基礎的な知見が得られると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Asada-Utsugi Megumi, Uemura Kengo, Ayaki Takashi, T. Uemura Maiko, Minamiyama Sumio, Hikiami Ryota, Morimura Toshifumi, Shodai Akemi, Ueki Takatoshi, Takahashi Ryosuke, Kinoshita Ayae, Urushitani Makoto	4. 巻 5
2. 論文標題 Failure of DNA double-strand break repair by tau mediates Alzheimer's disease pathology in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03312-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Monai Hiromu, Koketsu Shinnosuke, Shinohara Yoshiaki, Ueki Takatoshi, Kusk Peter, Hauglund Natalie L., Samson Andrew J., Nedergaard Maiken, Hirase Hajime	4. 巻 11
2. 論文標題 Adrenergic inhibition facilitates normalization of extracellular potassium after cortical spreading depolarization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87609-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Koichi, Morimoto Hiroyuki, Ohgidani Masahiro, Ueki Takatoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Modulation of inflammatory responses by fractalkine signaling in microglia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0252118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0252118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Koichi, Morimoto Hiroyuki, Ueki Takatoshi	4. 巻 31
2. 論文標題 Modulation of microglial activity by salt load and SGK1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 571 ~ 577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001449	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 Inoue Koichi, Xiong Zhi-Gang, Ueki Takatoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 The TRPM7 Channel in the Nervous and Cardiovascular Systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Protein & Peptide Science	6. 最初と最後の頁 985 ~ 992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389203721666200605170938	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 扇谷昌宏、井上浩一、佐久間英輔、植木孝俊
2. 発表標題 急性ストレスによって海馬ミクログリアから産生されるTNF- $\alpha$ はワーキングメモリを障害する -形態変化を伴わないミクログリアの活性化-
3. 学会等名 第125回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2020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	植木 孝俊  (Ueki Takatoshi)  (60317328)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	

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		
デンマーク	Copenhagen University		