

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20249055

研究課題名（和文）脳内神経変性疾患に対する再生医療・遺伝子治療効果判定に有用な放射性診断薬の開発

研究課題名（英文）Development of novel radiopharmaceuticals for diagnosis of cerebral neurodegeneration and functional recovery after intrastriatal grafts / gene therapy.

研究代表者

川井 恵一（KAWAI KEIICHI）

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：30204663

研究成果の概要(和文):再生医療効果判定への応用の観点から、パーキンソン病モデルラットの破壊側線条体に胎仔中脳ドーパミン神経細胞を移植した移植群を用いて、ドーパミン神経機能に関連する PET 製剤投与により解析した結果、個体差は大きかったものの、行動薬理試験および免疫染色による機能回復に一定の効果が得られた。さらに、薬物投与モデルラットを用いた神経機能変化の評価も実施し、疾患部位における神経機能に関連する機能性分子の遺伝子発現レベルを網羅的に解析するとともに、移植や薬物投与後の神経機能変化と比較検討した。

研究成果の概要(英文):As a result of analyzing by PET tracers relevant to function analysis of cerebral dopaminergic neuron using the transplant group which was transplanted the rat intrastriatal grafts of fetal ventral mesencephalon of a Parkinson's disease model rat aiming at the diagnostic application to the regeneration effect of medicine, the individual specificity in a transplant group was large, but the significant correlation was acquired between the functional recovery by the degree of methamphetamine-induced rotation test and immunity dyeing analysis. Furthermore, functional change of cerebral dopaminergic neuron in a psychiatry drug administration model rat was also evaluated, the gene expression level of the functional molecule relevant to the nervous function in the pathological part after a transplant or drug administration was analyzed comprehensively, and comparison examination was carried out with functional change of cerebral dopaminergic neuron.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
総計	25,500,000	7,650,000	33,150,000

研究分野:放射性薬品学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・放射線科学

キーワード:脳内神経変性疾患, 再生医療, 遺伝子治療, 治療効果判定, 放射性診断薬, PET 撮影, 遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

脳内神経変性疾患に関連した研究は近年盛んに行われている。特に黒質線条体系ドーパミン神経系に関して、PETによるパーキンソン病やそのモデル動物研究は過去に報告があるが、それらは既に発症を確認された個体に対するものに限られ、ドーパミン神経破壊処置後の急性期における脳内神経活性の経時的変化を報告したものはない。また、移植モデルの機能回復過程においても同様である。そこで、PETにより同一個体における神経機能の経時的変化を評価し、神経破壊・機能回復の程度、行動機能の障害等、他の神経科学的指標と多角的に比較検討することは、臨床におけるPET診断の適用にも重要なデータとなり得る。

加えて、脳内神経変性疾患の早期検出と治療効果判定法の確立が望まれている。また、それらの治療法として再生医療の検討が開始されている。これらの推進には、神経変性過程の早期に変化し発症に至る神経機能の先行指標を見出し、再生医療や遺伝子治療後の神経機能回復過程を最も鋭敏に反映する機能的指標を明らかにすることが重要である。申請者らは、これまでに疾患モデル動物における発症過程をドーパミン神経機能との関わりが深いPET製剤を用いて解析し、特に行動薬理試験では判定の困難な処置後早期から生じる一部の神経機能変化を検出し得ることを見出した(*Neurodegenerative Dis.*, **1**: 109-112 (2004)。また、処置後早期の急性期においても、線条体集積は、既にD2レセプターでは有意に増加し、ドーパミン動態は低下の傾向が認められ、これらの変化は、行動薬理試験による破壊判定に先駆けて確認された(*Neurosci. Lett.*, **389**: 30-34 (2005)。機能回復過程においても、同様の機能変化が認められるものの、個体差が大きく、画像化による個別評価の重要性が明らかとなった。

2. 研究の目的

再生医療のみならず遺伝子治療の実用化において、遺伝子導入後の神経機能回復過程を最も鋭敏に反映する機能的指標を明らかにすることが重要である。本研究では、脳内神経変性疾患モデル動物に対する再生医療及び遺伝子治療の効果判定を目的として、神経変性後の移植・遺伝子導入モデル動物において、神経機能診断薬を用いて同一個体における機能変化を評価し、行動薬理・免疫組織化学的評価と比較する等、病態発症及び機能回復との相関を明らかにする。さらにこれらの知見を基に、病態発症及び機能回復の指標となる神経細胞機能に選択的に親和性を有し、当該神経機能を画像化、定量解析し得る

新規放射性診断薬の開発を試みる。

3. 研究の方法

本研究では、上記の知見を基に、種々の脳内神経変性疾患モデル動物による発症過程に加え、近年注目を集めている再生医療及び遺伝子治療の効果判定を目的として、神経変性後の移植・遺伝子導入モデルにおいて、神経機能との関わりが深い放射性診断薬を用いて同一個体における機能変化を評価し、行動薬理・免疫組織化学的評価との比較等、病態発症及び機能回復との相関を明らかにする。また、機能性分子の発現量を確認するために、この機能回復過程での評価法として、汎用型マイクロアレイやリアルタイムPCRを用いた遺伝子発現レベルの変化の解析を実施する。

さらに、脳内神経変性疾患の病態発症・機能回復の早期診断を目的とし、神経機能変化を評価する放射性診断薬として、これまでも使用実績を有するドーパミンD1レセプターリガンド： ^{11}C -SCH23390やD2レセプターリガンド： ^{11}C -raclopride、ドーパミンの前駆物質 ^{18}F -6-fluoro-L-DOPA等のPET製剤投与により解析する。特に神経変性過程と脳内物質代謝との関連が注目されることから、脳内神経伝達物質の生合成原料となるアミノ酸はシナプス前終末機能診断薬として重要な候補化合物であると考えられる。中でも神経変性疾患との関わりが報告されているアミノ酸膜輸送機構や神経伝達機構測定に有用な新規標識アミノ酸誘導体を本研究に応用することにより、幅広く検討する。同時に、得られた知見を基に、病態発症及び機能回復の指標となり得る神経細胞機能に選択的に親和性を有し、当該神経機能を画像化、定量解析し得る新規放射性診断薬の開発を目指す。

4. 研究成果

本研究では、放射性診断薬を用いて神経変性モデル動物の発症過程及び再生医療モデルの機能回復過程における神経機能変化を評価し、発症・機能回復との相関を検討した。片側神経破壊パーキンソン病モデルラットの発症過程における脳内神経機能変化をD1、D2レセプターリガンド、ドーパミンの前駆物質等のPET製剤投与により解析した結果、メタンフェタミン誘起試験で確認された完全破壊ラットにおける線条体の無処置側/処置側集積比は、D2レセプターでは顕著に増加し、ドーパミン動態では逆に低下した。これらの変化は、発症期の行動薬理試験や免疫染色の結果とも相関しており、病態発症過程の先行指標になり得ると考えられた。また、行動薬理試験判定に先駆けて、処置後早期の急性期には既に、線条体集積は、D2レ

セプターでは有意に増加し、ドーパミン動態は低下の傾向が認められた。機能回復過程でも同様の機能変化が認められるものの、個体差が大きく、画像化による同一個体の経時的評価の重要性が示された。

これらのSPECTへの応用を目的に、申請者らが開発したアミノ酸膜輸送やドーパ脱炭酸酵素活性を反映する放射性ヨウ素標識アミノ酸誘導体を用いて評価したところ、アミノ酸膜輸送は発症期に低下するが、ドーパ脱炭酸酵素活性は急性期より低下する傾向が認められた。このように神経機能変化を指標としたパーキンソン病早期診断及び機能回復効果判定の可能性が示唆された。

そこで、本法の再生医療効果判定への応用の観点から、上記パーキンソン病モデルラットの破壊側線条体に胎仔中脳ドーパミン神経細胞を移植した移植群を用いて、回転運動の観察により移植による代償及び機能的亢進を評価した。特に、片側神経破壊パーキンソン病モデルラットにおける移植モデルの検討では、行動薬理試験による機能回復判定に伴った機能変化が確認された。ドーパミンレセプターリガンドやドーパミン生合成前駆物質誘導体等の種々PET製剤投与による解析の結果、移植群中の個体差は大きかったが、行動薬理試験および免疫染色による機能回復に一定の効果が得られた(*Synapse* **62**: 920-926, 2008)。

一方、精神神経疾患に対する患者個別の薬物療法への期待が高まっている。薬物療法の個別化に効果的なモニタリング法の開発には、薬物療法後の神経機能回復過程を最も鋭敏に反映する機能的指標を見い出すことが重要であることから、移植ラットの機能回復過程におけるドーパミン神経機能評価に加えて、薬物投与モデルラットにおける神経機能変化の評価も実施した(*Neurosci. Lett.*, **496**: 90-94, 2011)。さらに、移植や薬物投与後の機能性分子の遺伝子発現レベルを網羅的に解析し得る研究体制を構築するとともに、抗体を用いた免疫染色及びマイクロアレイによる遺伝子発現解析も終了した。

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 28 件)

① Fujita K., Sugiyama M., Akiyama Y., Hioki K., Kunishima M., Nishi K., Kobayashi M., Kawai K., Sasaki Y.: *N*-Isopropyl-*p*-iodoamphetamine Hydrochloride (IMP) is Predominantly Metabolized by CYP2C19. *Drug Metab. Dispos.*, in press, 2012 (reviewed).

- ② Kobayashi M., Mori T., Kiyono Y., Tiwari V., Maruyama R., Kawai K., Okazawa H.: Cerebral Oxygen Metabolism of Rats using Injectable ^{15}O -Oxygen with a Steady-state Method. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **32**: 33-40, 2012 (reviewed).
- ③ Kobayashi M., Mori T., Kiyono Y., Tsujikawa T., Maruyama R., Higaki Y., Shikano N., Nishii R., Kawai K., Kudo T., Okazawa H.: Appropriate Parameters of Ordered-Subset Expectation Maximization Algorithm on Measurement of Myocardial Blood Flow and Oxygen Consumption with ^{11}C -Acetate PET. *Nucl. Med. Commun.*, **33**: 130-138, 2012 (reviewed).
- ④ Nakanishi T., Fukushi A., Sato M., Yoshifuji M., Gose T., Shirasaka Y., Ohe K., Kobayashi M., Kawai K., Tamai I.: Functional Characterization of Apical Transporters Expressed in Rat Proximal Tubular Cells (PTCs) in Primary Culture. *Mol. Pharm.*, **8**: 2142-2150, 2011 (reviewed).
- ⑤ Okudaira H., Shikano N., Nishii R., Miyagi T., Yoshimoto M., Kobayashi M., Ohe K., Nakanishi T., Tamai I., Namiki M., Kawai K.: Putative Transport Mechanism and Intracellular Fate of Anti- ^{18}F -FACBC (Trans-1-amino-3- ^{18}F -fluorocyclobutanecarboxylic Acid) in Human Prostate Cancer. *J. Nucl. Med.*, **52**: 822-829, 2011 (reviewed).
- ⑥ Ebihara K., Ishida Y., Takeda R., Abe H., Matsuo H., Kawai K., Magata Y., Nishimori T.: Differential Expression of FosB, c-Fos, and Zif268 in Forebrain Regions after Acute or Chronic L-DOPA Treatment in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurosci. Lett.*, **496**: 90-94, 2011 (reviewed).
- ⑦ Kobayashi M., Kiyono Y., Maruyama R., Mori T., Kawai K., Okazawa H.: Development of an H_2^{15}O Steady-state Method Combining a Bolus and Slow Increasing Injection with a Multiprogramming Syringe Pump. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**: 527-534, 2011 (reviewed).
- ⑧ Kuga N., Shikano N., Takamura N., Nishii R., Yamasaki K., Kobayashi M., Nagamachi S., Tamura S., Kawai K.: Improvement of *N*-isopropyl-*p*- ^{123}I iodoamphetamine Cerebral Accumulation by Competitive Displacement of Serum Protein Binding with Amino-Acid Infusion. *J. Nucl. Med.*, **50**: 1378-1383, 2009 (reviewed).
- ⑨ Kawai K., Nishii R., Shikano N., Makino N., Kuga N., Yoshimoto M., Jinnouchi S., Nagamachi S., Tamura S., Takamura N.: Serum

Protein Binding Displacement: Theoretical Analysis using a Hypothetical Radio-pharmaceutical and Experimental Analysis with ^{123}I -*N*-isopropyl-*p*-iodoamphetamine. *Nucl. Med. Biol.*, **36**: 99–106, 2009 (reviewed).

- ⑩ Ishida Y., Kawai K., Magata Y., Ebihara K., Takeda R., Abe H., Yoshimoto M., Hashiguchi H., Odagiri K., Matsuo H., Nishimori T.: Differential Expression of Fos and Zif268 in the Nigrostriatal System after Methamphetamine Administration in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Synapse* **62**: 920–926, 2008 (reviewed).

[学会発表] (計 98 件)

- ① Fujita K., Sugiyama M., Akiyama Y., Yamada K., Kunishima M., Kobayashi M., Kawai K., Sasaki Y.: *N*-Isopropyl-*p*-iodoamphetamine Hydrochloride (IMP) is Predominantly Metabolized by CYP2C19. Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics 2012 Annual Meeting, Mar. 14, 2012 National Harbor, Maryland (U.S.A.).
- ② 川井恵一: 放射性医薬品の開発・体内動態制御と個別化医療. バイオセミナー“未来へのバイオ技術”月例会特別講演, 2011年12月5日, バイオインダストリー協会 (東京都).
- ③ Higashi T., Nishii R., Kagawa S., Kishibe Y., Takahashi M., Kobayashi M., Kawai K.: Usefulness of Double Tracer PET Study using [^{18}F]FDG and Amino Acid Radiotracer, [^{11}C]MeAIB, in the Diagnosis of Mediastinal Diseases. The Society of Nuclear Medicine 58th Annual Meeting, Jun. 4, 2011, San Antonio Convention Center (U.S.A.).
- ④ Kobayashi M., Mori T., Kiyono Y., Tiwari V.N., Maruyama R., Kawai K., Okazawa H.: Development of a New Steady-State Method using Injectable $^{15}\text{O}_2$ for Measurement of Oxygen Metabolism in The Rat Brain. The 10th International Conference on Quantification of Brain Function with PET (Brain11 & BrainPET11), May. 26, 2011, International Convention Centre of Barcelona (Spain).
- ⑤ 川井恵一: 薬物体内動態制御法と薬物療法の適正化を目指した個別化変動要因モニタリング法の開発. 第7回次世代医療システム産業化フォーラム2010, 2010年12月21日, 京都商工会議所(京都府).
- ⑥ 石田 康, 蛭原功介, 武田龍一郎, 安部博史, 松尾寿栄, 西森利数, 川井恵一, 間賀田泰寛: L-DOPA 慢性投与に伴う行動及び脳内転写調節因子発現の変化. 第32回日本生物学的精神医学会, 2010年10月7日, リーガロイヤルホテル小倉(福岡県).
- ⑦ Kobayashi M., Kagawa S., Nishii R., Takahashi F., Ohe K., Yoshimoto M., Shikano N., Higashi T., Nagamachi S., Kawai K.: Accumulation and Transport Mechanism of *Anti*-1-Amino-3-[^{18}F]fluorocyclobutane-1-carboxylic Acid in Representative Human Carcinomas. The Society of Nuclear Medicine 57th Annual Meeting, Jun. 5, 2010, Salt Palace Convention Center (U.S.A.).
- ⑧ 川井恵一: 放射性医薬品の体内動態制御とターゲティングコンフォーマティブ個別化医療. 第66回日本放射線技術学会総会学術大会教育講演, 2010年4月9日, パシフィコ横浜会議センター (神奈川県).
- ⑨ Kobayashi M., Tiwari V.N., Maruyama R., Kiyono Y., Kudo T., Tsujikawa T., Kawai K., Fujibayashi Y., Okazawa H.: Measurement of Cerebral Oxygen Metabolism of Rats using Injectable O-15 Oxygen and Steady-state Method. The Society of Nuclear Medicine 56th Annual Meeting, Jun. 13, 2009, Metro Toronto Convention Center (U.S.A.).
- ⑩ Kobayashi M., Araki H., Nishi K., Shikano N., Kiyono Y., Nishii R., Fujibayashi Y., Okazawa H., Kawai K.: Mechanism of Renal FDG Transcellular Transport and Cellular Accumulation using LLC-PK₁ Cells. The Society of Nuclear Medicine 56th Annual Meeting, Jun. 13, 2009, Metro Toronto Convention Center (U.S.A.).
- ⑪ Nishii R., Kagawa S., Higashi T., Kishibe Y., Iwasaki T., Uehara T., Kobayashi M., Nagamachi S., Arano Y., Kawai K.: Comparison of System A and System L Amino Acid Transports in Human Pancreas with C-11 MeAIB and C-11 MET PET Study. The Society of Nuclear Medicine 56th Annual Meeting, Jun. 13, 2009, Metro Toronto Convention Center (U.S.A.).
- ⑫ Ishida Y., Kawai K., Magata Y., Abe H., Takeda R., Ebihara K., Yoshimoto M., Mukai T., Saji H.: Alteration of Striatal [^{11}C]Raclopride and [^{18}F]FDOPA Uptake Precedes Development of Methamphetamine-induced Rotation in the Unilateral 6-Hydroxydopamine Lesioned Rats. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 16, 2008, Walter E. Washington Convention Center (U.S.A.).
- ⑬ Kobayashi M., Higaki Y., Kudo T., Kiyono Y., Tsujikawa T., Yoshii Y., Michibata Y., Sakai K., Watanabe M., Kawai K., Fujibayashi Y., Okazawa H.: Assessment of Emission-based Segmented Attenuation Correction Method

without Transmission Scan on Small Animal PET. World Molecular Imaging Congress 2008, Sep. 10, 2008, Nice-Acropolis Palais Des Congres (France).

[その他]

ホームページ等

金沢大学 研究紹介データベース:

http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran_ku/info.php?teacher_id=488

金沢大学医薬保健研究域保健学系 量子医療技術学講座 川井研究室:

<http://kawai.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川井 恵一 (KAWAI KEIICHI)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号:30204663

(2)研究分担者

石田 康 (ISHIDA YASUSHI)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号:20212897

間賀田 泰寛(MAGATA YASUHIRO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授

研究者番号:20209399

岡沢 秀彦 (OKAZAWA HIDEHIKO)

福井大学・高エネルギー医学研究センター・教授

研究者番号:50360813

天満 敬 (TENMA TAKASHI)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号:90378787

吉本 光喜 (YOSHIMOTO MITSUYOSHI)

国立がん研究センター研究所・発がんシステム研究分野・主任研究員

研究者番号:00345638

小林 正和 (KOBAYASHI MASATO)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号:30444235

(3)連携研究者

なし