

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年～2010年

課題番号：20591469

研究課題名(和文) 小動物PETによるげっ歯類を対象としたリガンド動態定量解析のための基盤技術開発

研究課題名(英文) Methodological development of quantitative tracer kinetic analysis in rodents using small animal PET.

研究代表者

関 千江(SEKI CHIE)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：40443080

研究成果の概要(和文)：

PETによる診断技術開発の為に遺伝子改変マウスを用いた基盤研究として、脳神経病態解明や治療を目的とした放射性薬剤(リガンド)の動脈血中濃度変化(入力関数)と共にPETデータ解析を行う生理学的パラメータの定量法の確立が必要である。本研究では採血量に限界があるアルツハイマー病モデルマウスを用いて入力関数測定方法の最適化を行い、老人斑蓄積評価リガンドの詳細な脳内動態の解析を行い蓄積定量評価に結び付けた。

研究成果の概要(英文)：

PET imaging using transgenic mice is one of the advantageous methods for the development of the diagnostic imaging technology of neurological disease. Quantitative analysis of radioligand using arterial input function (AIF) provides precise kinetics in the living organs but the measurement of AIF is difficult in mice. In the present study the measurement of AIF was optimized for kinetic analysis and applied to amyloid  $\beta$  plaque ligand for the evaluation of amyloid  $\beta$  deposition in Alzheimer's disease model mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線医学

キーワード：核医学(PETを含む)、脳・神経、アルツハイマー病、遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

現在わが国では非侵襲的な画像診断が可能なPETが臨床で普及しており、今後も様々なリガンドが開発され、病気の早期診断・治療経過の判定への応用が期待される。そのための基盤研究としてラットやマウスを用いた基礎研究は、倫理的にもコスト的な面に加え、疾患の基礎研究分野で病態解明・治療薬の研究開発のために、様々な遺伝子改変マウスが

神経変性疾患モデルとして用いられている背景から、小動物を対象としたPET研究は今後一層需要が高まるものと思われる。

リガンドの脳内動態は、目的とする生体分子密度や生理学的機能を反映することが期待される。目的の生理学的機能を反映した動態パラメータを求めるには、PET計測で得られる脳内のリガンド分布やその時間変化と、それと並行して動脈血中未代謝リガンド濃度

(入力関数)を計測し、解析を行う。例えば局所脳血流量や脳グルコース代謝率がそれに当たる。精神神経疾患の病態解明や疾患診断・治療評価に有用な PET 検査法の開発においては、特定の標的分子に結合するリガンドを利用した定量評価を前臨床段階で行う必要性が高まっている。

入力関数の実測では PET スキャン中に複数回にわたり血液・血漿中放射能濃度・未代謝物残存率を得るために動脈採血を行う。マウスのように可能な採血量に限られている小動物では必要最小限にとどめる工夫をする必要がある。従って出来る限り動物に負担を与えない少量の採血でも定量解析の信頼性を維持できるような、採血法や計測法の確立が必要になる。

更に、臨床においても動物実験においても採血を伴う検査は侵襲的であり、可能な限り省略することが望ましい。リガンドの標的分子への結合能の定量評価法として、脳内に標的分子が欠如する部位が存在する場合、その部位を参照領域とすることで、動脈血漿中放射能データなしでの定量法(参照領域法)があるが、近似的解析法のためその適用は入力関数を用いた解析法との整合性を確認し検証する必要がある。

## 2. 研究の目的

マウスを対象とした従来の PET 研究の多くはリガンドの体内分布の定性的な評価であった。そこで、この研究ではさらに前述のような PET による生体機能の定量的な検討を病態モデルマウスで実現することを目標とした。そのために病態モデルマウスでも対応しうる PET 計測と平行した動脈血採取および入力関数測定法を開発し、リガンド動態解析を行うことを目的とした。

具体的にはまず比較的血液量にゆとりがあるラットで入力関数測定のための採血回数を、動態解析結果への影響を及ぼさない時点の省略を検証した。

近年、アルツハイマー病の中心病理である老人斑(主にアミロイドβ(Aβ)蓄積)に集積するリガンドが有効な画像診断法として注目されている。<sup>11</sup>C]PIB は広く臨床研究に用いられている Aβ 蓄積リガンドの一つである。そこで、アルツハイマー病モデルマウスでの<sup>11</sup>C]PIB の脳内動態解析を行い、<sup>11</sup>C]PIB の脳内動態と Aβ 蓄積の関係を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) リガンド動態解析と定量パラメータ

本研究ではリガンドの生体組織との親和性の指標となる全分布容積  $V_T$  の算出を行った。解析法は、コンパートメントモデル解析(代表的な 2-tissue コンパートメントモデル, 以下 2-tissue model, 図 1)と代表的なグラフ

解析法の Logan plot (Logan J et. al., 1990)を用いた。コンパートメントモデルでの  $V_T$  は動態パラメータ  $K_1-k_4$  を非線形最小二乗法で求め、 $V_T=(K_1/k_2)(1+k_3/k_4)$  で算出した。

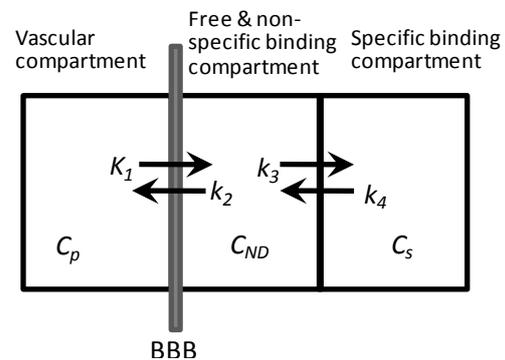


図 1 2-tissue コンパートメントモデル

(2) ラット脳内でのドーパミン D2 受容体リガンド<sup>11</sup>C]raclopride の脳内分布容積 ( $V_T$ ) 算出に必要な採血時点の検討

PET 撮像では一般的にリガンドを静脈内へボラス投与行うため、入力関数は図 2 のような急峻なピーク後、穏やかな減少を辿る。この変化のフェーズを 18 時点で測定して得た入力関数から A:ピーク、B:急速なクリアランス、C:遅いクリアランスの間引き、各 3 時点を省略し、全測定時点で作製した入力関数を基に算出された脳関心領域の  $V_T$  と、各フェーズの省略により作製した入力関数で算出された  $V_T$  を比較しどの程度影響するか評価した。

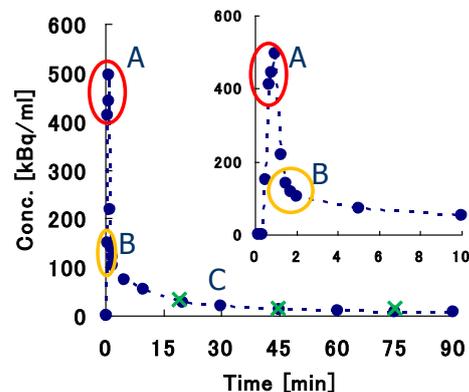


図 2 ラット<sup>11</sup>C]raclopride の入力関数

対象は雄性 Sprague-Dawley ラットで、リガンドはドーパミン D2 受容体リガンド<sup>11</sup>C]raclopride を用いた。PET 撮像は microPET focus 220 (Siemens Medical Solutions) で<sup>11</sup>C]raclopride (37MBq) 投与後 90 分間の撮像を行い併行して大腿動脈から採血した。採血は 18 時点で 1 回 60-100  $\mu$ L, そのうち 4 時点で薄層クロマトグラフィー法に

よる代謝物分析を兼ねて 200  $\mu$ L 採血を行った。

脳の関心領域としては、D2 受容体が豊富な線条体と、D2 受容体が無い小脳とした。18 時点で構成された入力関数と、各フェーズ 3 時点省いた入力関数で、算出された  $V_T$  値の相対変動を求めた。

(3) 若年健常マウスおよびアルツハイマー病モデルマウスを用いた [ $^{14}$ C]PIB の脳内動態解析

アルツハイマー病動物モデルの一つであるアミロイド前駆体蛋白遺伝子改変 (APP-Tg) マウス脳内での A $\beta$  蓄積リガンド [ $^{14}$ C]PIB の動態を前項の結果に準じ、PET 撮像と並行してリガンド投与後 3 分までは 20-30 秒ごと、その後は 10-30 分間隔で 60 分間、計 12-14 時点で動脈採血を行い入力関数を用いて詳細に解析した。

#### ① PET 実験

対象は APP-Tg マウスと同系統の野生型 C57BL/6J マウス (若年群 9-10 週齢, n=5; 高齢群 24-26 ヶ月齢 n=4) と脳内 A $\beta$  蓄積を持つ高齢 APP-Tg マウス (24-26 ヶ月齢 n=4) とした。実験はすべてイソフルラン 1.5-2%麻酔下で行った。動脈血採血のためポリエチレン製チューブ (外径 0.3mm, 内径 0.18mm) を大腿動脈に挿入した。PET は前項と同様に microPET focus 220 を用いた。 [ $^{14}$ C]PIB (15-67 MBq, 最大液量 200  $\mu$ L) は尾静脈より 1 分間かけて投与した。PET 撮像と動脈採血は投与後 60 分間行った。採血は放射能濃度測定のみ (4-6 回) 約 10  $\mu$ L、8 時点の代謝物分析を兼ねた時点で約 20  $\mu$ L とした。

#### ② 血漿中リガンド濃度測定

入力関数は血漿中未代謝 [ $^{14}$ C]PIB 濃度として、マイクロピペットによる血漿容積定量 (2-5  $\mu$ L) とオートウエルカンマカウンターによる放射能測定から血漿中放射能濃度を求め、それに radio-HPLC による未変化体残存率から線形内挿した値を乗じて決定した。

#### ③ データ解析

PET 画像の関心領域は T2 強調 MRI 画像との重ね合わせにより小脳、海馬、視床、大脳新皮質、線条体に置いた。各組織の時間放射能曲線 (TAC) と入力関数からコンパートメントモデル解析 (2-tissue model) とグラフ法にて  $V_T$  を求めた。

APP-Tg マウスでは、海馬や新皮質に多く A $\beta$  蓄積が見られるものの、多くの孤発性アルツハイマー病と同様小脳には蓄積しないことが分かっている。その場合関心領域と小脳の  $V_T$  比 (DVR) を直接 PET 撮像で得られる各 TAC を用い非侵襲的な定量法である参照領域法の適

用が動物に負担をかけないためにも大変有効である。その方法の一つである、Simplified reference tissue model 法 (SRTM, Lammertsma AA et al, 1996) による DVR と、入力関数を用いた解析法で求めた DVR の整合性から参照領域法の適用可能性を検討した。

#### ④ 脳内代謝物分析

[ $^{14}$ C]PIB の脳内への血漿中代謝物の移行を検討した。PET 撮像とほぼ同週 (月) 齢別で野生型 C57BL/6J マウス (若年群、高齢群) APP-Tg マウス 各 n=3 を対象とした。約 37MBq の [ $^{14}$ C]PIB を尾静脈より投与し、約 30 分後に左心室より採血、生理食塩水で還流し、脳を摘出・ホモジネート後、radio-HPLC により分析を行なった。

また、脳内での [ $^{14}$ C]PIB の代謝の有無を調べるため、若年マウスの脳をリン酸バッファーでホモジネート調整を行い [ $^{14}$ C]PIB 添加後 37°C で 60 分間インキュベートし、ホモジネートを radio-HPLC で分析した。

#### 4. 研究成果

(1) ラット脳内でのドーパミン D2 受容体リガンド [ $^{14}$ C]raclopride の脳内分布容積 ( $V_T$ ) 算出に必要な採血時点の検討

解析対象となるラット線条体 (striatum) と小脳 (cerebellum) の TAC を図 3 に示した。

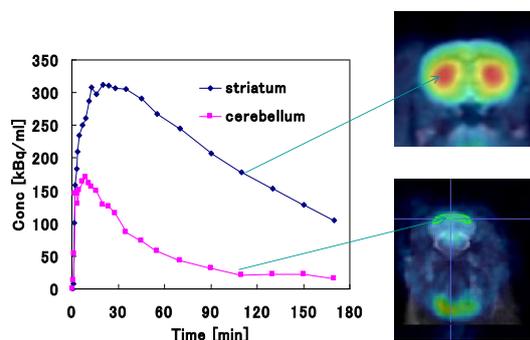


図 3 [ $^{14}$ C]raclopride の脳内濃度変化

また、各解析法で求めた  $V_T$  値は線条体で 9.74 mL/cm $^3$  (コンパートメントモデル解析), 9.24 mL/cm $^3$  (Logan plot)、小脳で 2.07 mL/cm $^3$  (コンパートメントモデル解析), 2.08 mL/cm $^3$  (Logan plot) であった。採血の 3 フェーズ各 3 時点での省略による  $V_T$  値の相対的な変動を図 4 に示した。

図中の Kinetic はコンパートメントモデル解析法、LGA はグラフ法を表す。

このことから、入力関数ピーク直後の早いクリアランスのフェーズを逃すと特に速い動態の小脳の  $V_T$  値は Logan plot 法で過小評価されやすいことが判明した。従って、採血時点を減らす場合には、ピーク後の早いクリアランスまでは比較的頻回に、その後は時間間

隔を空けることで、 $V_T$  の定量への誤差を抑えることができると考えられた。

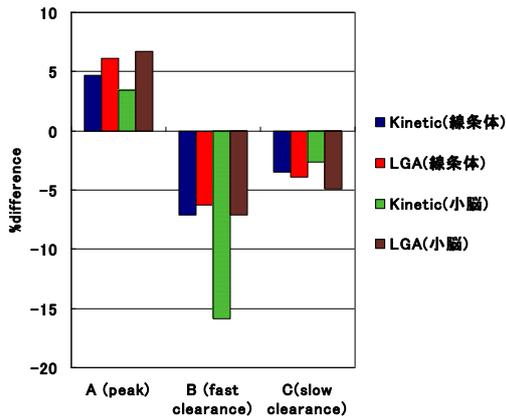


図 4 採血時点省略による各解析法での  $V_T$  値の変動

(2) 若年健常マウスおよびアルツハイマー病モデルマウスを用いたアミロイド  $\beta$  リガンド  $[^{11}C]$ PIB の脳内動態

① マウス脳内の  $[^{11}C]$ PIB 動態

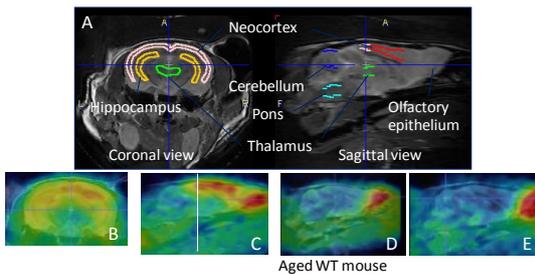


図 5 T2 強調画像上の関心領域 (A) と PET30-60 分平均画像 (B-E)

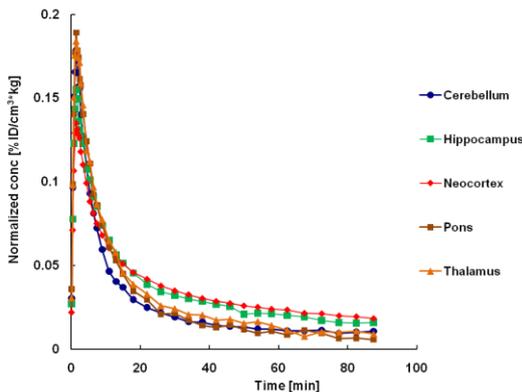


図 6 APP-Tg マウス (26 ヶ月齢) の脳内各領域の時間放射能曲線

図 5 に MRI 画像と関心領域 (ROI) と典型的な APP-Tg, 高齢野生型マウスと若年野生型マウスの PET 画像を示した。APP-Tg で、 $A\beta$  が蓄積する大脳新皮質や海馬に  $[^{11}C]$ PIB の高い集積が認められた。また、図 6 に APP-Tg

マウスにおける各 ROI の典型的な TAC を示した。 $A\beta$  が蓄積する大脳新皮質や海馬では  $[^{11}C]$ PIB は残留し、他の領域より放射能濃度が高くなった。投与された  $[^{11}C]$ PIB は速やかに代謝され、血漿中での  $[^{11}C]$ PIB の未変化体残存率の推移は図 7 (右上) となった。APP-Tg マウスを含めた高齢マウスの方が若年マウスより有意に代謝が速やかであった。さらに、血漿中放射能濃度 (図中の Total  $^{11}C$ ) に未変化体残存率を乗じ血漿中  $[^{11}C]$ PIB 濃度 (入力関数) を求めた。

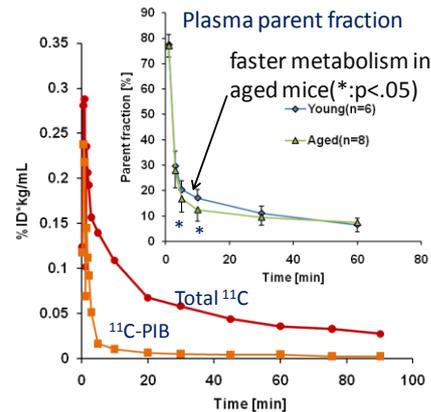


図 7 血漿中未変化体残存率 (右上) と放射能濃度

APP-Tg マウスでの  $A\beta$  蓄積が著しい新皮質 (Neocortex, NC) と  $A\beta$  蓄積が無い小脳 (cerebellum, CB) の TAC でコンパートメントモデル解析でモデル曲線をフィッティングした結果を図 8 に示した。 $A\beta$  蓄積が無い小脳でも 2-tissue model の方が 1-tissue model よりよく動態を表すことから、 $A\beta$  蓄積の有無に関わらず、2-tissue model で  $V_T$  を算出することが適切であると判断した。

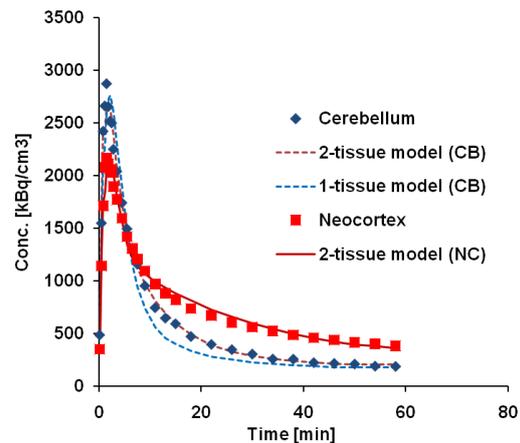


図 8 APP-Tg マウス脳内の  $[^{11}C]$ PIB 動態のコンパートメントモデル解析

② 動態パラメータの算出と脳内代謝物の移

行

算出された  $V_T$  値は Logan plot でもほぼ同様の値で、図 9 に示した (図中のエラーバーは 1 s. d.)。高齢マウス (Aged WT、APP-Tg) の  $V_T$  は若年マウス (Young WT) と比較すると、 $A\beta$  蓄積に関わらずどの領域でも有意に大きな値となった。

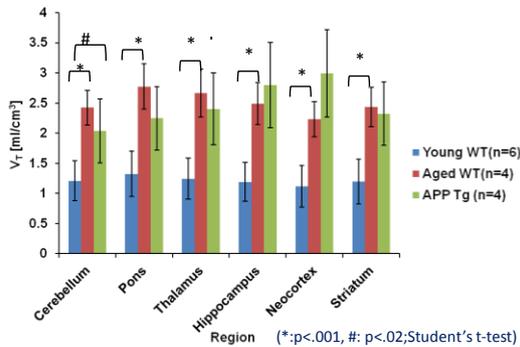


図 9 脳内関心領域での平均  $V_T$  値

$[^{11}C]$ PIB の血漿中代謝物の割合が速やかに増加すること、入力関数は未変化  $[^{11}C]$ PIB としているため、血漿中代謝物の脳内移行があれば、見かけの  $V_T$  は代謝の速い高齢マウスでより大きく算出されることが考えられたため行った結果、 $[^{11}C]$ PIB 投与 30 分後に摘出した脳では、若年マウス、高齢野生型マウス、APP-Tg マウス (各 n=3) で未変化体残存率はそれぞれ 72-79%、84-87%、93-94%であった。また、脳ホモジネート内では  $[^{11}C]$ PIB の代謝は見られなかったことから脳内代謝物は血漿から移行したものと間考えられた。従って高齢マウスほど代謝物の移行は少なく、特に APP-Tg ではほとんど脳内への代謝物の移行は無いと思われた。

$[^{11}C]$ PIB の脳内動態を図 1 のコンパートメントモデルにあてはめると、比較的速い動態を持つ非特異結合コンパートメントの分布容積は  $K_1/k_2$  で表され、特異結合コンパートメントの分布容積は  $k_3/k_4$  で表される。

図 10 に若年マウス (Young WT)、高齢野生型マウス (Aged WT)、APP-Tg マウスの  $K_1/k_2$  比を示した (エラーバーは片側 1 s. d.、CB: 小脳、Pons: 橋、Thal: 視床、Hipp: 海馬、NC: 大脳新皮質、CPu: 線条体)。  $V_T$  と同様 (図 9)、若年マウスの  $K_1/k_2$  は高齢マウスより低い傾向にあり、非特異結合成分に月齢の違いがあることが示唆された。また、 $A\beta$  蓄積を反映すると思われる  $k_3/k_4$  比については、図 11 のようになった。 $A\beta$  蓄積が無い小脳でも、 $A\beta$  蓄積を持つ APP-Tg マウスの大脳新皮質と同程度であるが、APP-Tg マウスと高齢野生型マウスの海馬、大脳新皮質を比較すると APP-Tg の方が若干高い傾向にあることから、 $k_3/k_4$  は  $A\beta$  蓄積を反映しているものの、 $A\beta$

蓄積以外の同程度の結合定数を持つ非特異結合部位がかなり  $[^{11}C]$ PIB の動態に寄与していることが示唆された。

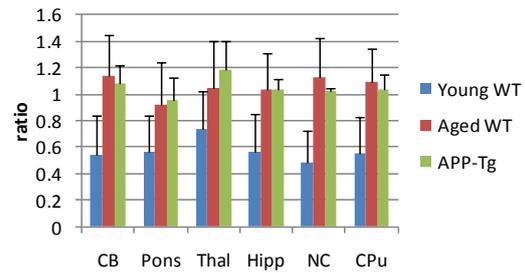


図 10 脳内各領域の  $K_1/k_2$  比

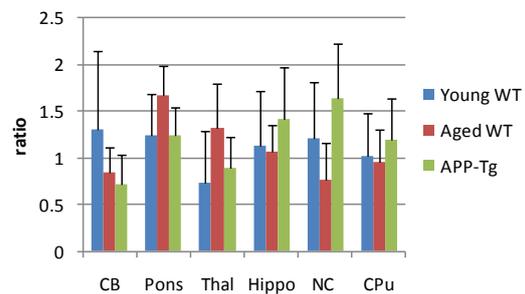


図 11 脳内各領域の  $k_3/k_4$  比

### ③ DVR の参照領域法による定量

Logan plot で求めた  $V_T$  から小脳を参照領域とした DVR を図 12 に示した。コンパートメントモデル解析でもほぼ同じ結果となった。 $A\beta$  蓄積が無い野生型マウスの脳各領域ではほぼ 1 で、 $A\beta$  蓄積が顕著な APP-Tg の海馬、大脳新皮質で有意に高くなり、DVR による  $A\beta$  蓄積の評価が有用であることが示された。

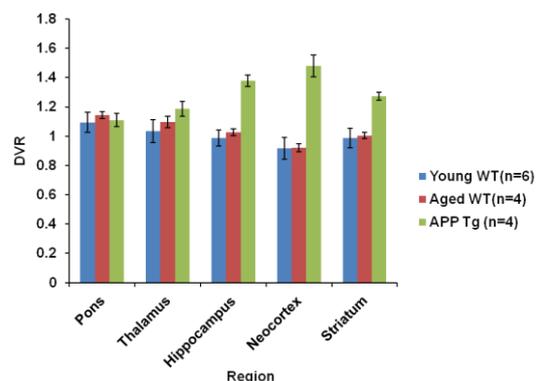


図 12 脳内 DVR 値 (Logan plot)

APP-Tg マウスの海馬、大脳新皮質の DVR を小脳を参照領域とした SRTM 法で求め、Logan plot による DVR と比較すると図 13 のようになった。SRTM で求めた DVR は Logan plot で得られた DVR とよく相関し、SRTM による DVR 算出で  $A\beta$  蓄積が評価可能なことが示された。

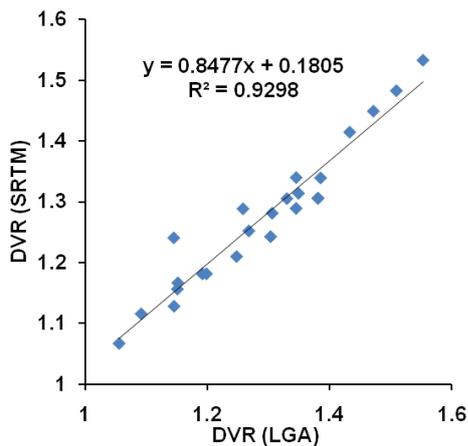


図 13 SRTM の DVR と Logan plot (LGA) の DVR との整合性

④ まとめ

以上のことから、体の小さいマウスでも、入力関数測定のための動脈採血の回数を、定量解析での誤差を抑えたタイミングを守ることによって削減し、リガンドの動態解析を行うことが出来た。この方法は高齢の病態マウスでも可能で、ここでは脳内の  $A\beta$  蓄積と、 $[^{11}C]PIB$  の動態の関係が明らかとなった。また、脳内への血漿中代謝物の移行性の検討なども含め、マウスによる前臨床 PET はリガンド開発に有用であると思われる。

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)

[学会発表] (計 5 件)

① C. Seki, M. Higuchi, M. Tokunaga, S. Hattori, M. Shidahara, R. Nakao, T. Okauchi, J. Maeda, Y. Kimura, I. Kanno, T. Suhara. Quantitative evaluation of  $^{11}C$ -PIB binding in amyloid precursor protein transgenic mouse brains. The 8th International Symposium on Functional Neuroreceptor Mapping of the Living Brain (NRM2010), July 22-24, 2010, the Glasgow Hilton Hotel, Glasgow, UK.

② C. Seki, M. Tokunaga, S. Hattori, M. Shidahara, R. Nakao, T. Okauchi, J. Maeda, M. Higuchi, Y. Kimura, T. Suhara. Quantitative evaluation of  $^{11}C$ -PIB binding in amyloid precursor protein transgenic mouse brains. Annual Meeting of Society for Neuroscience 2009, Oct 17-22, 2009, McCormick Place, Chicago, Illinois, USA.

③ 関千江、徳永正希、服部聡子、志田原美保、

中尾隆士、岡内隆、前田純、樋口真人、木村裕一、須原哲也「アミロイド前駆体蛋白遺伝子導入マウスにおける  $^{11}C$ -PIB 脳内結合の定量」第 49 回日本核医学会学術総会、2009 年 10 月 1-3 日、旭川市民文化会館・旭川グランドホテル、旭川市。

④ 関千江 「小動物定量 PET 撮影の実際」第 48 回日本核医学会学術総会 シンポジウム 2 「小動物の定量イメージングに向けてー実際の運用と現状ー」2008 年 10 月 25 日(土)、幕張メッセ、千葉市

⑤ C. Seki, M. Tokunaga, S. Hattori, M. Shidahara, R. Nakao, J. Maeda, H. Toyama, T. Irie, M. Higuchi, T. Suhara, I. Kanno, Y. Kimura. Quantification of  $^{11}C$ -PIB kinetics in mouse brain using metabolite-corrected arterial input function. Neuroreceptor Mapping 2008., July 17-19, 2008, Omni Penn Hotel, Pittsburgh, PA., USA

[図書] (計 1 件)

① 関千江 「マウスを対象とした PET リガンド定量動態解析に関する研究」平成 21 年度国際医療福祉大学大学院医療福祉研究科学位論文 2010 年 3 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 千江 (SEKI CHIE)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：4 0 4 4 3 0 8 0

(2) 連携研究者

樋口 真人 (HIGUCHI MAKOTO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究者番号：1 0 3 7 3 3 5 9

木村 裕一 (KIMURA YUICHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究者番号：6 0 2 0 5 0 0 2