

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 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590053

研究課題名（和文）プリン受容体PETリガンドによる脳内ミクログリアの機能的生体イメージング

研究課題名（英文）Functional bioimaging of brain microglia by purine receptor PET ligands

研究代表者

前田 純（MAEDA JUN）

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・主任研究員

研究者番号：30415426

研究成果の概要（和文）：

脳内ミクログリア細胞を陽電子断層撮像（PET）で画像化することを目的に、ミクログリア細胞に発現するプリン受容体、PET リガンドの開発および評価を行った。P2Y₁₂ 受容体リガンド [¹¹C]clopidogrel およびアデノシン A_{2a} 受容体リガンド [¹¹C]TMSX について評価を行ったが、いずれのリガンドも脳内ミクログリアの検出には至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

To visualize the microglial cells in the brain using positron emission tomography (PET), the development and preclinical evaluation of purinergic receptor PET ligands have been demonstrated. P2Y₁₂ receptor ligand [¹¹C]clopidogrel and adenosine A_{2a} ligand [¹¹C]TMSX have been investigated, however both ligands fail to detect the microglial cells in the brain.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2011 年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2012 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 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：薬学 物理系薬学

キーワード：陽電子撮像法、P2Y₁₂ 受容体、アデノシン A_{2a} 受容体、ミクログリア、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

(1) ミクログリア細胞は死細胞や老廃物の除去および神経栄養因子の放出という神経細胞に有益な役割を有する一方で、過剰な活性化は活性酸素種放出により正常神経細胞の障害死を引き起こす。このことからミクログリアを生体で画像化し、モニタリングすることはアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症などの神経炎症を伴う神経変性

疾患の病態や治療効果を把握する上で極めて重要である。

(2) 近年ミクログリアの障害部位への化学遊走、生理活性物質の放出および食食などの様々な過程において、細胞内外に豊富に存在するヌクレオチドおよびヌクレオシドの受容体が注目されている。特に P2Y₁₂ 受容体とアデノシン A_{2a} 受容体はそれぞれ分枝型およ

びアマーバ型のミクログリアにそれぞれ発現することが報告されていた。そこで本受容体の特異的なリガンドを開発すれば、ミクログリアの機能的モニタリングが可能であると予測した。

2. 研究の目的

アルツハイマー病およびパーキンソン病などの神経炎症で活性化するミクログリア細胞を生体で画像化することを目的に、ミクログリア細胞で発現するプリン受容体の P2Y₁₂ 受容体およびアデノシン A_{2a} 受容体のリガンドをボジロン標識し、アルツハイマー病モデル動物に投与して有効性を評価した。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色

アルツハイマー病モデルマウスおよび患者死後脳切片における P2Y₁₂ 受容体、アデノシン A_{2a} 受容体およびアデノシン A₃ 受容体の分布パターンについては作製した抗体にて各受容体分布の様態を蛍光顕微鏡で観察した。

(2) P2Y₁₂ 受容体、アデノシン A_{2a} 受容体オートラジオフィー (ARG)

P2Y₁₂ 受容体 ARG は P2Y₁₂ 受容体作動薬 2MeSADP 刺激による [³⁵S]GTP γ S 結合増加により行った。また、A_{2a} 受容体 ARG は A_{2a} リガンド [³H]ZM241385 により行った。ARG 作製には富士フィルム製 BAS5000 システムに実施した。

(3) PET 撮像

P2Y₁₂ 受容体リガンド [¹⁴C]clopidogrel および A_{2a} 受容体 [¹⁴C]TMSX は脱メチル体 [¹⁴C]CH₃I を反応させ自家合成を行った。合成した放射性製剤をタウオパチー型アルツハイマー病モデルマウス (Tau-Tg) および老人斑形成マウス (APP-Tg) に尾静脈投与し、投与後 90 分間小動物用 PET カメラ Focus220 で撮像を行った。

4. 研究成果

(1) 免疫染色

P2Y₁₂ 受容体抗体で免疫染色を行った結果、正常マウスの全脳において分枝状のミクログリア細胞が検出された。これに対し海馬の神経脱落が認められる Tau-Tg マウス海馬ではミクログリアマーカーである Iba-1 陽性の棘状ミクログリア細胞が多数増殖しているにも関わらず、P2Y₁₂ 陽性のミクログリア細胞は認められなかった。一方 APP-Tg マウスの老人斑周囲では P2Y₁₂ 陽性のミクログリアが増加していた。このことからミクログリアの形状・性状により P2Y₁₂ 受容体の密度は劇的に変動することが明らかとなり、細胞保護

的な役割を有するミクログリア細胞のマーカーとなりうると推察された。さらにアデノシン A_{2a} および A₃ 受容体の抗体も作製し、免疫染色を実施した。A_{2a} の抗体については受容体と相互作用が認められず、病態時の変動は確認できなかった。一方 A₃ 受容体については良好な抗体が得られたものの、脳内における分布はオリゴデンドロサイト、神経細胞が染色され、ミクログリア細胞の染色は確認できなかった。

(2) P2Y₁₂ 受容体、アデノシン A_{2a} 受容体 ARG

P2Y₁₂ 受容体作動薬 2MeSADP による [³⁵S]GTP γ S 結合をアルツハイマー病モデルマウスの切片で評価したところ、2MeSADP 刺激による [³⁵S]GTP γ S 結合は APP-Tg の皮質および海馬で野生型マウスと比べ増加しており、P2Y₁₂ 受容体免疫染色像と一致した結果が得られた。一方、Tau-Tg の海馬においても野生型マウスと比べ増加していた。タウオパチーモデルマウスの海馬では P2Y₁₂ 受容体のミクログリア免疫染色性が明らかに低下しており、結果に違いが認められた。2MeSADP は P2Y₁₂ 以外にも P2Y₁ および P2Y₁₃ に対しても作動性を示すことから、タウオパチー型モデルマウスの海馬ミクログリアでは P2Y₁₂ 受容体消失に伴い、他の受容体が発現すると推察された。アデノシン A_{2a} 受容体 ARG でも同様に [³H]ZM241385 結合は APP-Tg の老人斑周囲に結合が増加していた。一方で、Tau-Tg の海馬では結合が低下していたことから、アデノシン A_{2a} 受容体においても P2Y₁₂ 受容体と同様の変化を示すことが示唆された。

(3) PET 撮像

[¹⁴C]clopidogrel を Tau-Tg に尾静脈投与して PET 撮像したところ、投与直後脳内に高い移行性を示し、その後速やかに脳から排出された。Tau-Tg の脳内集積は野生型マウスより高く、免疫染色と逆の結果が得られた。Ex vivo ARG 法により脳内の集積をより精細に観測したところ、[¹⁴C]clopidogrel 集積は白質組織に認められた。本剤はプロドラッグであり、かつ P2Y₁₂ 受容体非可逆的な結合を示すことがすでに報告されている。従って脳内では [¹⁴C]clopidogrel は代謝を受けず未変化体のまま脳内から排泄され、P2Y₁₂ 受容体に結合していないと考察した。

アデノシン A_{2a} リガンド [¹⁴C]TMSX の PET を APP-Tg マウスでスキャンを行ったところ、[³H]ZM241385 結合と異なり、老人斑に対する結合は見られなかった。[¹⁴C]TMSX の ARG についても検証をおこなったが、PET の結果と同様の結果であった。従って APP-Tg で見られる老人斑周囲の [³H]ZM241385 結合増加はミクログリアの増加ではなく、老人斑に対する直

接的な結合と推察した。

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 11 件)

- ① Mori T, Maeda J, Shimada H, Higuchi M, Shinotoh H, Ueno S, Suhara T. Molecular imaging of dementia. *Psychogeriatrics*, 査読有, 2012, 12(2), 106-114, doi: 10.1111/j.1479-8301.2012.00409.x.
- ② Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Takano J, Suemoto T, Maeda J, Ji B, Ono M, Staufenbiel M, Suhara T, Saido TC. Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J*, 査読有, 2012, 26(3):1204-1217. doi: 10.1096/fj.11-187740.
- ③ Yamasaki T, Fujinaga M, Maeda J, Kawamura K, Yui J, Hatori A, Yoshida Y, Nagai Y, Tokunaga M, Higuchi M, Suhara T, Fukumura T, Zhang MR. Imaging for metabotropic glutamate receptor subtype 1 in rat and monkey brains using PET with [¹⁸F]FITM. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 査読有, 2012, 39(4), 632-641. doi: 10.1007/s00259-011-1995-6.
- ④ Higuchi M, Maeda J, Ji B, Tokunaga M, Zhang MR, Maruyama M, Ono M, Fukumura T, Suhara T. PET Applications in Animal Models of Neurodegenerative and Neuroinflammatory Disorders. *Curr Top Behav Neurosci*. 査読無, 2012, 11:45-64. doi: 10.1007/7854_2011_167.
- ⑤ Fujinaga M, Maeda J, Yui J, Hatori A, Yamasaki T, Kawamura K, Kumata K, Yoshida Y, Nagai Y, Higuchi M, Suhara T, Fukumura T, Zhang MR. Characterization of 1-(2-[¹⁸F]fluoro-3-pyridyl)-4-(2-isopropyl-1-oxo-isoindoline-5-yl)-5-methyl-1H-1,2,3-triazole, a PET ligand for imaging the metabotropic glutamate receptor type 1 in rat and monkey brains. *J Neurochem*. 査読有, 2012, 121(1), 115-24, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07348.x.
- ⑥ 樋口 真人, 季 斌, 前田 純, 丸山 将浩, 小野 麻衣子, 澤田 誠, 須原 哲也, アルツハイマー病とミクログリア 臨床神経, 査読無, 2011, 51:1031-1031

- ⑦ Sekine M, Maeda J, Shimada H, Nogami T, Arakawa R, Takano H, Higuchi M, Ito H, Okubo Y, Suhara T. Central nervous system drug evaluation using positron emission tomography. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 査読有, 2011, 9(1), 9-16. doi: 10.9758/cpn.2011.9.1.9.
- ⑧ Maeda J, Zhang MR, Okauchi T, Ji B, Ono M, Hattori S, Kumata K, Iwata N, Saido TC, Trojanowski JQ, Lee VM, Staufenbiel M, Tomiyama T, Mori H, Fukumura T, Suhara T, Higuchi M. In vivo positron emission tomographic imaging of glial responses to amyloid-beta and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders. *J Neurosci*. 査読有, 2011, 31(12), 4720-4730. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3076-10.2011.
- ⑨ Kawamura K, Maeda J, Hatori A, Okauchi T, Nagai Y, Higuchi M, Suhara T, Fukumura T, Zhang MR. In vivo and in vitro imaging of I₂ imidazoline receptors in the monkey brain. *Synapse*. 査読有, 2011, 65(5), 452-455. doi: 10.1002/syn.20897.
- ⑩ Lacivita E, De Giorgio P, Lee IT, Rodeheaver SI, Weiss BA, Fracasso C, Caccia S, Berardi F, Perrone R, Zhang MR, Maeda J, Higuchi M, Suhara T, Schetz JA, Leopoldo M. Design, synthesis, radiolabeling, and in vivo evaluation of carbon-11 labeled N-[2-[4-(3-cyanopyridin-2-yl)piperazin-1-yl]ethyl]-3-methoxybenzamide, a potential positron emission tomography tracer for the dopamine D4 receptors. *J Med Chem*. 査読有, 2010, 53(20), 7344-7355. doi: 10.1021/jm100925m.
- ⑪ Yu I, Inaji M, Maeda J, Okauchi T, Nariai T, Ohno K, Higuchi M, Suhara T. Glial cell-mediated deterioration and repair of the nervous system after traumatic brain injury in a rat model as assessed by positron emission tomography. *J Neurotrauma*. 査読有, 2010, 27(8), 1463-1475. doi: 10.1089/neu.2009.1196.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Jun Maeda, Masaki Tokunaga, Ming-Rong Zhang, Takeharu Minamihisamatsu, Toshimitsu Fukumura, Tsuyoshi Miyakawa, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi. Altered serotonin release and

serotonin 1A receptor density in CaMKII α -deficient mice assessed by a comparison of in vivo PET and in vitro autoradiographic data. Neuroreceptor Mapping 2012, 2012/8/8 (Baltimore, USA)

- ② Jun Maeda, PET Imaging of glial activation and neuroinflammation in dementia and other neurological disorders by translocator protein (TSPO) ligands. 14th Mind Brain Conference, 2012/2/15 (Hamamatsu)
- ③ 前田純, 小動物 PET による認知症モデルマウスのイメージング, 第 6 回分子イメージング学会、2011 年 5 月 27 日 (神戸)
- ④ Jun Maeda, Ming-Rong Zhang, Bin Ji, Takashi Okauchi, Toshimitsu Fukumura, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi. In vivo evaluation of a 18kDa translocator protein (TSPO/PBR) ligand [14 C]AC-5216 in Alzheimer's disease mouse models. World Molecular Imaging Congress 2010 2010/9/11 (Kyoto)

[図書] (計 2 件)

- ① 前田純, 先端医療技術研究所, 認知症モデルマウスのイメージング, PET journal 2011, No. 15 34-35
- ② 前田純, 須原哲也, 中山書店, 物質依存の神経画像-PET を用いた研究, 専門医のための精神科臨床リュミエール 26 巻 依存症・衝動制御障害の治療 2011, 38-47

[その他]

ホームページ等

<http://www.nirs.go.jp/seika/brain/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 純 (MAEDA JUN)

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・主任研究員

研究者番号 : 30415426