

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390287

研究課題名(和文) アルツハイマー病におけるアミロイド蛋白生成 セクレターゼ活性の生体画像法の開発

研究課題名(英文) In vivo imaging of the activity of gamma-secretase for amyloid production in Alzheimer's disease

研究代表者

尾内 康臣 (Ouchi, Yasuomi)

浜松医科大学・メディカルフォトリクス研究センター・教授

研究者番号：40436978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の脳内の アミロイド蓄積の程度が必ずしも認知活動と並行しないことが指摘されているため、アミロイド生成の上流にある セクレターゼの活性の生体画像化を試みた。その結果、セクレターゼ活性依存的に発生するように設計したMRIプローブはin vitro系ではうまくシグナルを発生したが、生体実験ではシグナルが得られず、より効率に細胞内移行を示し高シグナルを出すプローブが必要であると結論した。

研究成果の概要(英文)：Because it has been shown that the degree of beta-amyloid deposition in the Alzheimer's brain does not correlate with the deterioration of cognitive function, we aimed to examine the activity of gamma-secretase that regulates the production of beta-amyloid in vivo. The MRI probe that was designed to emit signals in high-magnetic field MRI worked in the in vitro setting failed to give enough NMR signals in the in vivo measurement, suggesting that a probe with a high permeability for cells and with a large signal-emitting power would be desirable.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：アルツハイマー病 ガンマセクレターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

我々は以前より脳疾患のミクログリア活性の *in vivo* 画像化を報告してきた (Ouchi et al, Ann Neurol 2005, Sekine et al, J Neurosci 2008)。最近、アルツハイマー病におけるミクログリア活性を調べると、初期アルツハイマー病患者では A 蓄積の上昇とミクログリア活性の亢進を認めるが、ミクログリア活性は A 蓄積程度と逆相関を示し、神経炎症は A 蓄積早期あるいはその生成期に出現する可能性が示唆された (Yokokura et al, Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2011)。このことから、アルツハイマー病の早期の病態を捉えるには A 蓄積の上流の event を捉えることが必要と考えられた。しかも近年、可溶性の A オリゴマーに神経細胞障害性が認められることに加え、免疫療法による老人斑の除去が認知機能障害を改善しないことが報じられ、沈着 A を標的とする診断治療法の開発戦略を見直す機運が高まっていた。申請者らは、最近、セクレターゼにより分解されることで蛍光を生じる蛍光スイッチングプローブを創製し、A の生成に与るセクレターゼの酵素活性を、生細胞で画像化する技術を編み出した (Ueki et al, Bull Japanese Soc Neurochem 2010)。そこで本研究では、これらの研究成果を踏まえ、AD の病態生理に与るセクレターゼの酵素活性を *in vivo* で解析するために、セクレターゼ賦活による APP 部位ペプチドの切断の結果 MRI シグナルを生じる新規機能プローブを作製し、それにより MRI でセクレターゼ酵素活性を画像化する技術を創成することを企図した。ミクログリア PET 画像を導入し、同一個体のセクレターゼ活性と神経炎症を捉えることで、セクレターゼ活性イメージングの意義がより明らかにできると考えた。本研究は、AD の根本治療に向け国内外で現在さかんに開発の進められているセクレターゼ阻害剤やセクレターゼモジュレーター等の効能評価や、セクレターゼを治療標的とした新規治療薬の開発に有用であると考えられた。

## 2. 研究の目的

初期アルツハイマー病 (AD) では、ミクログリア活性が上昇し、その程度はアミロイド蓄積よりも強いことを見出した。そこで、本研究では、アミロイド生成時に神経炎症が始まると予想され、その生成酵素であるセクレターゼを画像化して、活性化ミクログリアと合わせて、AD の超早期診断を実現する革新的な技術を創成すること目的とした。

## 3. 研究の方法

次の点に着目して研究と進めた。セクレターゼの APP 分解酵素活性の *in vitro* 研究、セクレターゼの酵素活性の *in vivo* 画像化、高磁場 MRI を用いた小動物研究、サルを用いた画像化である。

[方法] (1)はじめに、PS1 のセクレターゼ酵素活性による APP のプロセッシングを、NMR を用いて

*in vitro* で画像化するための分子プローブを創製し、セクレターゼ酵素活性を *in vivo* でイメージング技術を開発した。まず、家族性 AD 変異を持つ PS1 (PS1-A246E) を安定的に発現する Neuro2a 細胞株 (N2a/A246E 細胞) を用いて、APP のプロセッシングに関わる PS1 のセクレターゼ酵素活性依存的に生じる MRI シグナルを検出する新規の分子プローブを作成した。図 1 のように (Gd<sup>3+</sup>) と DOTA の錯体を付加し、また、C 末端に [19F] 標識した HIV (human immunodeficiency virus)-Tat タンパク質を結合した機能プローブを作製した。当該プローブでは、初め、<sup>19</sup>F の T2 緩和時間が Gd<sup>3+</sup> の paramagnetic effect により短縮してお MRI シグナルは減弱することになる。セクレターゼによりプローブが切断され Gd<sup>3+</sup> が遊離する結果、プローブ中の <sup>19</sup>F の T2 緩和時間が回復するために、NMR で検出可能な高 MRI シグナルを生じるという原理である。

(2) HIV-Tat タンパク質は PTD (protein transduction domain) 活性を持ち、プローブが細胞膜を透過するのに働く。培地にプローブを添加することで N2a/A246E 細胞に導入し、セクレターゼにより APP がプロセッシングされることで生じる MRI シグナルから、*in vitro* で NMR を用いてセクレターゼ酵素活性の画像化を試みた。ここで HIV (human immunodeficiency virus)-Tat タンパク質は PTD (protein transduction domain) 活性を持つので創製したプローブ (以下、APP-Tat と略) は細胞内に取り込ませることに働くことになる。

(3) サル脳を画像化できる改変 APP-Tat の作製を試みた。前年度までに創製した RVG プローブをカニクイザルに静脈投与し、マウスと同様にサル脳内のセクレターゼ酵素活性を測定することにより脳への移行程度を評価した。ここでは、RVG プローブにおいて、RVG の N 末側にユビキチンを挿入することで、細胞質送達後に脱ユビキチン酵素によりプローブから RVG が遊離し、プローブが細胞質内を拡散しやすくするための改変を行った。セクレターゼ酵素活性のもつ病態的意義について、我々のすでに報告している技術であるミクログリア活性と A 蓄積の画像化を同一個体で比較することを試みた。高磁場 MRI によるセクレターゼ酵素活性化を同一個体で調べた後、動物用 PET カメラ (CRLAIVIVO-PET) を用いて活性化ミクログリアのトレーサーである

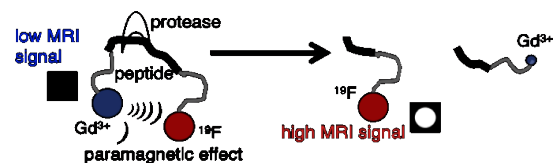


図 1

[<sup>11</sup>C]PK11195 を撮像し、ミクログリア活性を定量化することを試みた。定量化にはそれぞれのトレーサーの結合能を算出するためのコンパートメントモデルを適用して組織参照法を用いる。ただし、マウスの脳内イメージングは左右大脳半球をわけることが困難なために、大脳皮質領域での大きな変化を捉え

て比較研究する。さらに動物用 PET カメラ (SHR38000) を用いて、サルにおける  $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  による A 蓄積と  $[^{11}\text{C}]\text{DPA713}$  によるミクログリア活性の評価を行った。

#### 4. 研究成果

〔結果〕 (1) 家族性 AD 変異を持つ

PS1 (PS1-A246E) を安定的に発現する Neuro2a 細胞株 (N2a/A246E 細胞) において、PS1 の セクレターゼ酵素活性による APP のプロセッシングを NMR で検出することをねらい、新規の分子機能プローブを作製した。即ち、APP の 切断部位ペプチド (GGVVIATV) の N 末端に、ランタノイド金属イオン ( $\text{Gd}^{3+}$ ) と DOTA の錯体を付加し、また、C 末端に  $[^{19}\text{F}]$  標識した HIV-Tat タンパク質を結合することで、 $[^{19}\text{F}]$  NMR の T2 緩和時間を  $\text{Gd}^{3+}$  による paramagnetic effect により短縮して、プローブの  $[^{19}\text{F}]$  NMR シグナルが減弱されるものを作製した。APP-Tat プローブは セクレターゼによるプロセッシングを受け、 $[\text{Gd}^{3+}]\text{DOTA}$  を遊離するために、 $[^{19}\text{F}]$  MRI シグナルが NMR で検出できる程度までに増強されると考えられた。

(2) 培地に APP-Tat プローブを添加することで N2a/A246E 細胞に導入し、セクレターゼにより APP がプロセッシングされることで生じる NMR シグナルから、in vitro で NMR を用いて セクレターゼ酵素活性を定量的に評価した。次に、セクレターゼ酵素活性を定量解析するための NMR 機能プローブを培養生細胞に適用し、In-cell NMR 技術による セクレターゼ酵素活性の生細胞での画像化を行った (図 2)。

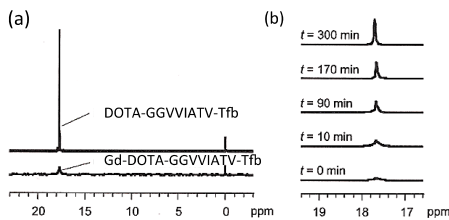


図2 (a) DOTA-GGVVIATV-Tfb (1 mM)とGd-DOTA-GGVVIATV-Tfbの  $^{19}\text{F}$  NMR スペクトラム。トリフルオロ酢酸ナトリウムを添加し、内部コントロールとした (0 ppm)。 (b)  $\gamma$ セクレターゼによるGd-GGVVIATV-Tfbの経時的  $^{19}\text{F}$  NMRスペクトラムの変化。

(3) サル脳を画像化できる改変 APP-Tat を試みて MRI 画像を施行したが、プローブの脳内移行が十分でなく、十分なシグナルが得られなかった。この結果が用いられた動物 (自然発症認知症サル) の脳内でアミロイド集積がなかったことに起因したかどうかについて調べる目的で、PET 画像でサル脳を確認した。その結果、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$  によるアミロイドとミクログリア活性を試みてアミロイドの脳内集積がみられ、軽度ミクログリア活性が生じていることが示された (図 3)。

(4) [考察] 本研究の セクレターゼの APP 分解酵素活性を評価できる in vitro 研究では、実際に Neuro2a 細胞株を用いて セクレターゼの酵素活性 APP のプロセッシングを評価できるプローブを設計することができた。その後、そのプローブを用い

た in vivo 画像化を試みて、細胞内に取り込ませるためのプローブ (APP-Tat) を作成してサル脳で確かめたが、脳内移行がうまく行かず十分な MRI シグ

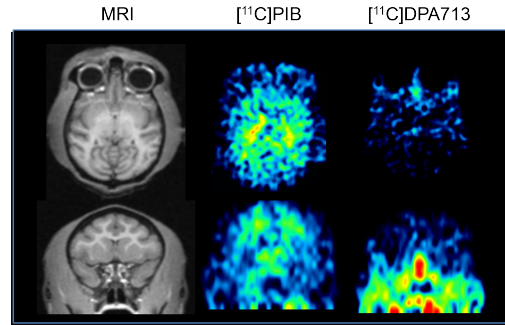


図 3 自然発症認知症マカザルの PET 画像

ナルを得られなかった。自然発症認知症サルではアミロイド沈着は示されているため、NMR シグナル強度不足が今回の画像を妨げたことと推察された。このことを踏まえ、より効率に脳内移行と APP プロセッシングを受けた後のシグナル増強を得られるプローブを設計する必要があると考察された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 10 件)

- Yokokura M, 他 9 人, Ueki T, Ouchi Y. In vivo changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38(2):343-51, 2011  
doi: 10.1007/s00259-010-1612-0
- Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, 他 15 人 Reduced acetylcholinesterase activity in the fusiform gyrus in adults with autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry*.2011 68:306-13.  
doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.4
- Kikuchi M, 他 10 人, Ueki T, Ouchi Y. Effects of brain amyloid deposition and reduced glucose metabolism on the default mode of brain function in normal aging. *J Neurosci*. 2011 31(31):11193-9  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2535-11.2011
- Kakimoto A, Kamekawa Y, 他 5 人 Ouchi Y. New computer-aided diagnosis of dementia using positron emission tomography: brain regional sensitivity-mapping method. *PLoS One*.2011;6(9):e25033.  
doi: 10.1371/journal.pone.0025033
- Ouchi Y, Kikuchi M. A review of the default mode network in aging and dementia based on molecular imaging. *Rev Neurosci*. 2012 23(3):263-8  
doi: 10.1515/revneuro-2012-0029
- Oboshi Y, Ouchi Y, Yagi S, 他 7 人. In vivo

mesolimbic D2/3 receptor binding predicts posttherapeutic clinical responses in restless legs syndrome: a positron emission tomography study. J Cereb Blood Flow Metab. 2012, 32(4):654-62

doi: 10.1038/jcbfm.2011.201

Terada T, Kono S, Ouchi Y, 他 4 人  
H. SPG3A-linked hereditary spastic paraplegia associated with cerebral glucose hypometabolism. Ann Nucl Med. 2013, 27(3):303-8

doi: 10.1007/s12149-012-0673-5

Nozaki T, 他 8 人、Ouchi Y. Effect of subthalamic nucleus stimulation during exercise on the mesolimbocortical dopaminergic region in Parkinson's disease: A positron Emission Tomography Study. J Cereb Blood Flow Metab. 2013,33:415-421

doi: 10.1038/jcbfm.2012.183

Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, 他 11 人.  
Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. JAMA Psychiatry. 2013 Jan;70(1):49-58

doi: 10.1001/jamapsychiatry.2013.272

Okada H, Ouchi Y, Ueki T, 他 10 人. Alterations in  $\alpha 2$  nicotinic receptors in cognitive decline in Alzheimer's etiology. Brain. 2013 Oct;136(Pt 10):3004-17

doi: 10.1093/brain/awt195

#### 〔学会発表〕(計 5 件)

植木孝俊. NG2 細胞の CD44 を分子標的とする分子イメージング技術の創出と、その多発性硬化症治療への応用. 第 53 回日本神経学会学術大会 平成 24 年 5 月 24 日 (東京)

植木孝俊. NMR による多発性硬化症治療標的分子の生細胞内動態解析技術の創出. 第 54 回日本神経学会学術大会 平成 25 年 5 月 31 日 (東京)

植木孝俊. ミクログリアを治療標的とした神経変性疾患治療戦略の構築. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会シンポジウム 平成 26 年 3 月 29 日 (下野)

Yokokura M, Ouchi Y, 他 4 人. In vivo imaging of neuroinflammation using a new PET tracer [ $^{11}\text{C}$ ]-DPA713. 第 36 回日本神経科学大会 平成 25 年 6 月 21 日 (京都)

Ouchi Y, Terada T, Ueki T, 他 7 人. Effect of amyloid deposition on  $\alpha 2$  nicotinic cholinergic system in Alzheimer's disease. 第 36 回日本神経科学大会 平成 25 年 6 月 22 日 (京都)

#### 〔図書〕(計 0 件)

#### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

#### 取得状況 (計 0 件)

#### 〔その他〕

#### ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

尾内 康臣 (OUCHI, Yasuomi)

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: 40436978

##### (2) 研究分担者

植木 孝俊 (UEKI, Takatoshi)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60317328

小川 美香子 (OGAWA, Mikako)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・准教授

研究者番号: 20342351

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: 20209339

##### (3) 連携研究者

なし