

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293263

研究課題名(和文)アルツハイマー病における神経新生と神経炎症発症起点の生体画像を用いた病態研究

研究課題名(英文) In vivo imaging study for the timing of neurogenesis and neuroinflammation altered in Alzheimer's disease

研究代表者

尾内 康臣 (Yasuomi, Ouchi)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：40436978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：AD脳における新生ニューロンと活性化ミクログリアのクロストークの関係を検証するために、ミクログリアの活性化にかかわる分子群を調べ、AD類似モデル動物(SAMP8マウスと[11C]PIB陽性自然発症認知症マカクサル)を用いて検討した。SAMP8マウスでは、NestinプロモーターLAT4システムと[18F]dFMTを用いることで、神経新生のイメージングが可能だったが、シグナルは小さく、ex vivoの死後脳イメージングが必要だった。in vivo画像化ではCB2Rリガンドを用いると可能だったが、認知症モデルでの神経新生とミクログリア活性を同一個体での観察に改良プローブが必要であることが分かった

研究成果の概要(英文)：We examined molecules that relate to microglial activation and investigated a linkage between neurogenesis and neuroinflammation using AD-like animal models (SAMP8 mice and naturally-developed demented macaque confirmed by [11C]PIB for amyloid pathology) by developing methods with which we were able to quantify the amount of neurogenesis and determine the types of microglial activation: protective or inflammatory.

With the SAMP8 mice, a combination of Nestin promoter LAT4 system and [18F]dFMT enabled to illustrate the neurogenesis but the signal was small and ex vivo postmortem brain imaging was found to be necessary. Using a CB2R ligand permitted to depict microglial activation, but we found a more sensitive probe and method system necessary for examining these two phenomena in vivo in a living single animal.

研究分野：神経画像学

キーワード：アルツハイマー病 神経新生 ミクログリア活性

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の治療薬として A β ワクチンや セクレターゼ阻害薬などが開発され多くが中止ないし軌道修正を余儀なくされている。世界的に行われている AD 画像研究は従って発病していない preclinical AD という“正常人”をターゲットとするようになり、AD 発症後の病態より未病時の病態解明や介入が重要であるという認識が高まっている。その病態に関係するのが A β 生成に伴う脳内環境の変化、特にミクログリアを中心とする神経炎症の発現と持続と神経新生の出現が注目されていた。

我々はこれまで、脳変性疾患における脳内ミクログリア活性の *in vivo* での上昇を報告してきた。特に初期 AD において不溶性 A β 蓄積を反映する [11C]PIB の集積度とミクログリア活性を反映する [11C]PK11195 の集積は逆相関し、より早期の可溶性 A β 出現時の神経炎症の病態把握が重要であることを報告した。このことは老齢マカクサルを用いた検討でも同様であった。ヒト AD 脳においては A β や APP が ERK や MAPK を介しミクログリアを活性化し様々なサイトカインやケモカインを放出させ炎症が持続するとされ、CX3CR1 受容体を介する fractalkine(FKN)シグナル系や GDNF などのミクログリアの持つ神経保護因子は炎症の抑制に重要な働きをしているとされる。従って、A β 生成前あるいは生成早期の状態では保護的ミクログリア活性化が生じていると推測されている。

AD 脳の海馬で Ki67 染色が増加していることが報告されてから AD の神経新生の研究が進んだが、未だ結論が出ていない。最近、老化促進 (弧発型後期発症 AD 様) モデルマウス SAMP8 の *in vitro* 研究で、神経幹細胞が分泌型 A β 1-42 や PI3K シグナルがトリガーとなり増加することが示された。神経前駆細胞 (NPC) 分泌因子や CD200, CX3CL1, CD47 や CD55 などの蛋白はミクログリア活性化を制御しているため、神経新生とミクログリアのクロストークは重要である。また神経新生は学習や記憶などの認知機能にも関与することから、A β 病理に絡むこの両者の反応は病態把握だけでなく、予防・治療で重要な問題となっている。申請者らは、マウスにおいて nestin-LAT システムを用いた神経新生の *in vivo* 画像化の技術を確認しているため、今後中型大型動物に応用することが可能だった。

本研究では、AD 脳における新生ニューロンと活性化ミクログリアのクロストークの関係を検証するために、まずミクログリアの活性化にかかわる分子群を探索するとともに、弧発型後期発症 AD 類似モデルの SAMP8 マウスおよび自然発症老齢マカクサルを用

いて、脳内ミクログリアと神経新生の病態的関連性を明らかにすることを計画した。

2. 研究の目的

アルツハイマー病 (AD) の脳内でミクログリア活性が上昇し、その活性の強さはアミロイド蛋白 (A β) の蓄積程度と逆相関があることを報告した。最近、弧発性 AD モデルマウス (SAMP8) で A β 出現前に神経新生が促進され、ミクログリア活性の保護性刺激が神経新生を促すことが報告された。すなわち、AD 発症後の A β 標的療法だけでなく、AD の予防や進行抑制に A β 発現に伴う神経新生の促進と活性化ミクログリアへの介入が重要であると考えられた。本研究では、A β 産生に伴う脳内神経新生とミクログリア活性の相互的病態の *in vivo* メージング技術を確立し、SAMP8 マウスや自然発症老齢マカクサルを用いて予防・治療薬の開発を行うこととした。

3. 研究の方法

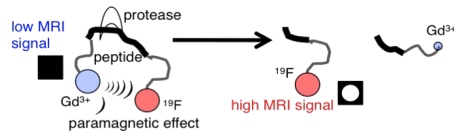
本研究計画では A β 生成時におけるミクログリア活性化と神経新生の発現の画像化をめざしているため、老化促進モデルマウスと自然発症老齢サルを用いて、まず、ミクログリアの静止状態から活性化するメカニズムについて、MRI シグナルを発生する分子プローブの *in vitro* およびモデル動物に応用した *in vivo* 研究を遂行し、小動物モデルとサルモデルを用いた神経幹細胞発現の *in vivo* 研究を経年的に実施した。

我々は、すでに生細胞で セクレターゼや caspase-3/-7 等のプロテアーゼ様酵素の活性を画像化するための蛍光イメージング技術を確立済みであり、本研究では、そのプローブを改変し、NMR で生細胞において検出することができる MRI プローブを作製する。次に、それを至適化し、ミクログリア活性化・神経新生の病態発生に関する二重イメージングを行ってその有用性を調べた。

4. 研究成果

26 年度

caspase-3/-7 等のプロテアーゼ様酵素の活性を培養生細胞にて蛍光イメージングもしくは NMR で定量解析することができる申請者ら独自の分子動態解析技術を基に、タンパク質プロセッシングを *in vivo* で観察できる MRI を創出した。これにより、モデルマウスの脳内で FKN 産生の変化を経時的に追うことが可能となる。すなわち、理想的には、動物を殺すことなく、ミクログリア活性化のタイミングを知ることができるようになり、生体イメージングに応用できると期待された。



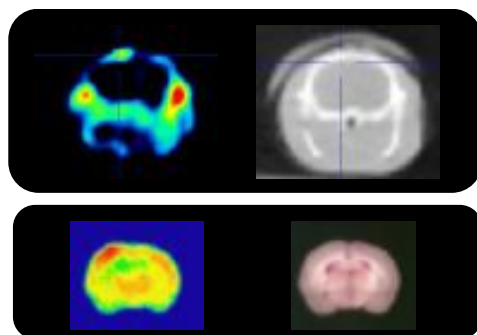
FKN プロセッシングの MRI イメージングの原理

MRI プローブの ^{19}F は他端にある常磁性体である Gd^{3+} の paramagnetic relaxation の影響により、T2 緩和時間の短縮で信号が減弱するが、FNK が ADAM10 によってプロセッシングを受け、可溶性 FNK 産生に伴い Gd^{3+} が単離され MRI 信号が回復することを利用して、in vivo で画像化することができる。

病態脳における可溶性 FNK 産生の低下は、ミクログリア活性化に先だって生じることが報告されていたので、SAMP8 マウスにて、上記 MRI による可溶性 FNK 産生 in vivo イメージングを併せて行い、その超早期 SAMP8 マウスの脳組織から、レーザーマイクロダイセクション法(LMD 法)によりニューロンとミクログリアを採取し、それら細胞での遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析することを試みた。MR シグナルは軽度でイメージングに耐える信号には至らなかった。また、SAMP8 のミクログリアとニューロン分離後の DNA マイクロアレイ解析ではニューロングリアの分離が不十分だったため、その後の受容体結合蛋白や免疫沈降でのデータ収集が困難だった。

27 年度

Nestin プロモーター-LAT4 遺伝子システムを応用して、神経幹細胞特異的に LAT4 を発現するノックインマウス(nes-LAT4 マウス)を作成を試みたが、満足いくノックインマウスは困難だったため、SAMP8 効果促進モデルマウスを導入してイメージングを行った。図 2 は dFMT を用いて撮像したものだが、神経幹細胞のイメージングが可能であることを示した。また、汎用 PET トレーサー ^{18}F]dFMT を培地に添加し神経幹細胞を標識するイメージャー撮像も行った。SAMP8 マウス脳に脳定位装置を用いて海



[^{18}F]dFMT のラット脳イメージング

馬歯状回及び脳室下帯に、レンチウイルス粒子を感染させ、神経幹細胞を ^{18}F]FMT で特異的に標識して、PET により in vivo

で神経新生を定量的に解析できるようにした。

28 年度

これまで nestin プロモーター-LAT4 遺伝子システムを応用して、神経幹細胞特異的に LAT4 を発現するノックインマウス(nes-LAT4 マウス)を作成して、動物用 PET を用いて神経幹細胞のイメージングが可能であることを示したが、SAMP8 老化促進モデルマウスでこの手法を試した。その際 nestin プロモーターの下流にアミノ酸トランスポーター-LAT4 遺伝子を配置したレンチウイルス粒子を感染させ、神経管細胞を [^{18}F]FMT で標識して、神経新生の定量解析を試みたが、十分な信号が得られず、神経幹細胞のイメージングは困難だった。一方で、保護性ミクログリア活性に着目した検討から、SAMP8 マウスをミクログリアの cannabinoid receptor type 2 (CB2) を標的とする [^{11}C]NE40 トレーサーを用いた検討を行った結果、わずかながら [^{11}C]NE40 結合が見られることが確かめられた。補足として TSPO トレーサーである [^{11}C](R)PK11195 を用いるとより [^{11}C]NE40 結合よりも強い結合が見られるものもあった。この [^{11}C]NE40 トレーサー方法を用いてミクログリアイメージングを AD 類似老齢サルで検討すると、 [^{11}C]PIB で A 陽性の強い個体ほど [^{11}C]NE40 活動が高い傾向があることが分かったが、個体数が少ないために結論的なことは言及できなかった。ITAM-Syk 情報伝達系をターゲットとしたプローブは個体画像化では困難だったが、本トレーサーで保護性側面が見られると期待された。

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 12 件)

Shimizu Y, Yamamoto S, Fukumoto D, Ohba H, Kakiuchi T, Nishiyama S, Yoshikawa E, Tsukada H, Okada H, Ouchi Y. Loud noise exposure during activity and neurogenesis in the living rat brain: a preliminary study. J Neurol Neurophysiol 5:6,2014

Ito K, Fukuyama H, Senda M, Ishii K, Maeda K, Yamamoto Y, Ouchi Y, Ishii K, Okumura A, Fujiwara K, Kato T, Arahata Y, Washimi Y, Mitsuyama Y, Meguro K, Ikeda M. Prediction of Outcomes in Mild Cognitive Impairment by Using ^{18}F -FDG-PET: A Multicenter Study. J Alzheimers Dis. 45(2):543-52,2015

Sabri O, Sabbagh MN, Seibyl J, Barthel

H, Akatsu H, Ouchi Y, Senda K, Murayama S, Ishii K, Takao M, Beach TG, Rowe CC, Leverenz JB, Ghetti B, Ironside JW, Catafau AM, Stephens AW, Mueller A, Koglin N, Hoffmann A, Roth K, Reininger C, Schulz-Schaeffer WJ; Florbetaben Phase 3 Study Group. Florbetaben PET imaging to detect amyloid plaques in Alzheimer disease: Phase 3 study. *Alzheimers Dement.* Aug;11(8):964-74,2015

Ouchi Y. [PET imaging of $\alpha 7$ nicotinic receptor]. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* May;145(5):266-7,2015

Terada T, Kakimoto A, Yoshikawa E, Kono S, Bunai T, Hosoi Y, Sakao-Suzuki M, Konishi T, Miyajima H, Ouchi Y. The Possible Link between GABAergic Dysfunction and Cognitive Decline in a Patient with Idiopathic Hypoparathyroidism. *Intern Med.* 54(17): 2245-50,2015

Kakimoto A, Ito S, Okada H, Nishizawa S, Minoshima S, Ouchi Y. Age-related gender-specific changes in the brain metabolism and morphology. *J Nucl Med.* 57(2):221-5, 2016

Oboshi Y, Kikuchi M, Terada T, Yoshikawa E, Bunai T, Ouchi Y. Alterations in phase-related prefrontal activation during cognitive tasks and nicotinic $\alpha 4\beta 2$ receptor availability in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 53,817-830,2016

Terada T, Yokokura M, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Kono S, Konishi T, Miyajima H, Hashizume T, Ouchi Y. Extrastriatal spreading of microglial activation in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann Nucl Med.* 30,579-587,2016

Fujitsuka N, Asakawa A, Morinaga A, Amitani MS, Amitani H, Katsuura G, Sawada Y, Sudo Y, Uezono Y, Mochiki E, Sakata I, Sakai T, Hanazaki K, Yada T, Yakabi K, Sakuma E, Ueki T, Niijima A, Nakagawa K, Okubo N, Takeda H, Asaka M, Inui A. Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1. *Mol Psychiatry.* 21:1613-1623 (2016)

Inoue K, Sakuma E, Morimoto H, Asai H, Koide Y, Leng T, Wada I, Xiong ZG, Ueki T. Serum- and glucocorticoid-inducible kinases in microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* 478:53-59 (2016)

Inoue K, Leng T, Yang T, Zeng Z, Ueki T, Xiong ZG. Role of serum- and

glucocorticoid-inducible kinases in stroke. *J Neurochem.* 138:354-361 (2016)

Yokokura M, Terada T, Bunai T, Nakaizumi K, Takebayashi K, Iwata Y, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Suzuki K, Mori N, Ouchi Y. Depiction of microglial activation in aging and dementia: Positron emission tomography with [^{11}C]DPA713 versus [^{11}C](R)PK11195. *J Cereb Blood Flow Metab.* 37(3):877-889, 2017.

〔学会発表〕(計4件)

Yasuomi Ouchi. Microgliosis PET in brain disorders. 14th International College of Geriatric Psycho-neuropharmacology 平成 26 年 10 月 (Tsukuba)

Yasuomi Ouchi. Imaging of A β -linked brain milieu disruption. International Symposium on Alzheimer's Disease Prevention Strategy 平成 27 年 6 月 27 日 (Tokyo)

Yasuomi Ouchi. In vivo depiction of A β -linked inflammatory and neurochemical abnormalities in the human brain. 14 回 International conference: Peace through Mind/Brain Science 平成 28 年 2 月 24 日 (Hamamatsu)

Ouchi Y, Terada T, Nakaizumi K, Yoshikawa E, Kakimoto A, Isobe T, Bunai T, Magata Y. Alterations in brain $\alpha 7$ nicotinic receptors and amyloid deposition in Alzheimer's disease. 22 回 Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping 平成 28 年 6 月 (Geneva)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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 (Yasuomi Ouchi)
浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・生体機能イメージング研究室・教授
研究者番号：40436978

(2) 分担研究者

植木孝俊 (Takatoshi Ueki)
名古屋市立大学・統合解剖学分野・教授
研究者番号：60317328

寺田達弘 (Tatsuhiko Terada)
浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・生体機能イメージング研究室・特任研究員
研究者番号：80550178

間賀田泰寛 (Yasuhiro Magata)
浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・分子病態イメージング研究室・教授
研究者番号：20209399