

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670538

研究課題名(和文)精神疾患の創薬に貢献する保護・傷害型ミクログリア活性のin vivo画像法の開発

研究課題名(英文)Development of in vivo imaging of protective and detrimental microglial activities for treating mental disorders

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまでのin vivo研究での知見は主に神経傷害型ミクログリアを観察することが多く、神経保護性に関するミクログリア活性は不明であった。活性化ミクログリアのタイプとそれら疾患の病態と関連も不明であり、脳内ミクログリア活性の画像的動態モニタリングが待たれていた。我々は、ミクログリア活性の動態評価をin vivoでMRIとPETにより行うことのできる評価系、すなわち、MRIを用いたfractalkine産生依存性MRプローブの作製とPETと用いた活性化ミクログリアCB2R受容体リガンドのin vivo二重生体画像法を開発し評価した。いずれの画像法もより選択性のあるプローブ改良が望まれた。

研究成果の概要(英文)：The previous in vivo studies on microglial activity mainly described the features of inflammatory microglial activation, which did not allow detection of which was contributory to neuroinflammation in diseases, protective or inflammatory microglia. So, a new method that could monitor microglial activation using imaging technique was longed for to elucidate the contribution of microglial activation in diseases. We tried to develop a new monitoring system by MRI and PET about dynamic aspects of microglial activation, namely, development of a MR probe that depended on the amount of fractalkine produced and a PET CB2R ligand imaging for activated microglia. Although an MR probe was not satisfactory, the CB2R probe was able to depict some level of microglial activation. However, a more sensitive probe was expected for illustration of two types of activated microglia.

研究分野：神経画像学

キーワード：ミクログリア活性

1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病を代表とする脳変性疾患だけでなく、自閉症や統合失調症等の精神疾患でミクログリア活性の上昇が報告され、特定の神経伝達物質を狙ったものだけでなく、神経炎症をそれら疾患の基本病態生理に与る治療標的と考えられるようになってきた。ミクログリア活性には神経保護作用と神経傷害作用のデュアル機能があることが知られているが、これまでの *in vivo* 研究での知見は主に神経傷害型ミクログリアを観察することが多く、神経保護性に関するミクログリア活性は不明であった。また、その活性化ミクログリアのタイプとそれら疾患の病態と関連も不明であり、脳内のミクログリア活性の動態をモニターしながら医薬の薬効評価を行ったりすることのできる動物を用いた評価系はこれまでになかった。したがって、それら疾患様の症状を呈する動物より脳を剖出し、ミクログリアへの特異的抗体による免疫組織化学等で形態・機能学的解析を行い、活性化の程度が表現系(症状)に及ぼす影響や、医薬のミクログリアに作用する薬効を評価することで行われてきた。そのため、認知行動異常の症状等を追いながら、同一個体で経時的にミクログリア活性の動態を *in vivo* でモニタリングすることができる動物評価系の創出が俟たれていたところであった。申請者は、これまでに傷害性ミクログリア活性化に伴ってミトコンドリア外膜に発現する TSPO 蛋白に結合する PET トレーサー(^{11}C]PK11195 や ^{11}C]DPA713)を用いて *in vivo* で活性化ミクログリアをモデルサルや精神神経疾患患者で描出してきた。また、最近、活性化ミクログリアに発現する $\alpha 7$ ニコチン受容体プローブを用いて、サル脳とヒト脳での $\alpha 7$ 受容体発現を画像化することに成功した。さらに、ミクログリア活性化する直前から産生される可溶性 fractalkine の *in vivo* 蛍光イメージング技術を会得している。

本研究では、初め、成体脳内のミクログリア活性のデュアル作用を *in vivo* で画像化する技術の創出を行い、次に、成体脳内でのミクログリア活性の動態を、MRI と PET により可視化するデュアル *in vivo* 撮像法をうつ病や統合失調症等のモデル動物に応用し、疾患の病態とミクログリア活性化の起点との関連を検討した。終わりに、本研究では、サル病態モデル動物において *in vivo* で解析することにより、治療標的とした創薬を企図するまでを行った。

2. 研究の目的

認知症などの脳変性疾患だけでなく、精神神経疾患で脳内のミクログリア活性が生じていることが *in vivo* で報告され、ミクログリア活性化はうつ病や統合失調症等の精神疾患の治療標的の一つと考えられている。しかし、これまで、ミクログリア活性化の起点を *in vivo*

in vivo で可視化する技術はなく、精神疾患における神経炎症に対する創薬を考える上で、生体での動物評価系の創出が俟たれていた。本研究では、うつ病や統合失調症等の精神疾患の病態脳でのミクログリア活性の動態評価を *in vivo* で MRI と PET により行うことのできる、新規評価系を開発し、うつ病や統合失調症等の精神疾患のための新規薬剤開発に役立てることを目的とした。

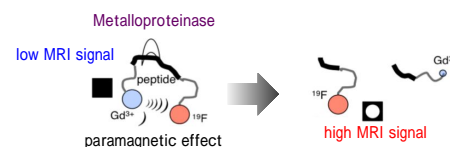
3. 研究の方法

本研究では、MRI を用いた fractalkine 産生依存性 MR プローブの作製と PET と用いた活性化ミクログリア CB2 受容体リガンドの *in vivo* 二重生体画像法を開発し、モデル動物に応用することでミクログリアのデュアル機能を解明し、創薬に貢献するシステムを創出する。まず、ニューロン・ミクログリア 相 関 に 関 連 す る fractalkine-CX3CR1 情報伝達系において、ADAM10/17 の活性によって切断される可溶性 fractalkine を検出するプローブを作成し、MR で検出する *in vitro* 実験を行い、プローブの作製・至適化後はじめはラット脳でそれを観察した。次に、CB2R 結合トレーサーを用いて PET で神経保護性作用を持つミクログリア活性を調べた。うつ病加齢サルモデルを用いてサル脳でのミクログリアの保護性機能を観察することで、fractalkine 系の今後の治療的視点から評価系を模索した。

4. 研究成果

26 年度

可溶性 fractalkine 生成依存的にシグナルを生じる MRI プローブを作製し、ラット生体脳へ応用することでミクログリア活性起点における *in vivo* 画像法を確立した。我々はすでに酵素依存的に MR シグナルを発生させる蛍光プローブ技術を獲得しているため、それを fractalkine 切断過程の反応に応用させた。初めに、metalloprotenase(ADAM10/17) の酵素活性による fractalkine のプロセッ

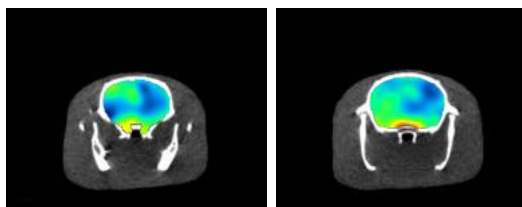


ングを、NMR を用いて *in vitro* で画像化するための分子プローブを創製し、fractalkine 切断反応を *in vivo* でイメージング技術を開発した。その際まず、*in vitro* での培養細胞を用いて、fractalkine のプロセッシングに関わる ADAM10/17 酵素活性依存的に生じる MRI シグナルを検出する新規の分子プローブを作製を試みた。当該プローブでは、初め、¹⁹F の T2 緩和時間が Gd³⁺ の paramagnetic

effectにより短縮してMRIシグナルは減弱しているが、ADAM10/17によりプローブが切断され Gd^{3+} が遊離する結果、プローブ中の ^{19}F のT2緩和時間が回復するために、NMRで検出可能な高MRIシグナルを生じることを利用した。培地にプローブを添加することで培養細胞に導入し、ADAM10/17によりfractalkineが可溶性fractalkineにプロセッシングされることで生じるMRIシグナルが得られると予想されたが、信号は弱かった。

27年度

この技術を応用し、ラットの脳内ミクログリア活性化をMRIを用いてin vivo画像化を試みたが、作成したMRIプローブの改変MRプローブを作成したが、in vivo画像化は可能だったが不十分だった。このためCB2Rに対してアンタゴニスト的に結合する $[^{11}C]NE40$ を用いて画像化をこなった結果



$[^{11}C]NE40$ のラット脳における決意増

良好な画像化が得られた。

28年度

ラットで確立したMRIプローブを用いたミクログリア活性化起点的のin vivoイメージング技術について、より精神疾患患者への応用の可能性を検討するために、うつ病加齢モデルを用いてfractalkine切断程度をモニタリングできるか試みた。ここでは、よりプローブの脳内移行性を改善するために、RVGによる改変MRプローブの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した易移行性改変MRプローブを作製し確かめたが、MRプローブの移行性は小さかった。そのため、 $[^{11}C]NE40$ とPETカメラを用いて保護性活性化ミクログリアの定量的評価を行った。うつ病加齢モデルで撮像したが、 $[^{11}C]NE40$ で画像化はできたが、明らかな上昇や特徴的描出は見られなかった。やはり、よりはっきりした保護性ミクログリアの画像評価系を作出することが望ましいと思われた。本手法を改良することで、精神神経疾患の初段階における神経病変であるミクログリアの毒性転化を指標とする超早期診断の技術基盤の構築が可能と期待された。

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 [¹¹C]DPA713 versus [¹¹C](R)PK11195. J Cereb Blood Flow Metab. 37(3):877-889, 2017.

〔学会発表〕(計3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 Aβ-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 Aβ-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)

〔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