

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15583

研究課題名(和文) 脳内RAGEイメージングプローブの開発：アミロイドPET偽陽性克服への挑戦

研究課題名(英文) Development of an imaging probe targeting receptor for advanced glycation end-products (RAGE): Challenge to overcoming false-positive results of amyloid PET

研究代表者

上田 真史 (UEDA, Masashi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40381967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳内RAGEに結合する放射性分子イメージングプローブの開発を目的とし、RAGEアンタゴニストであるFPS-ZM1の構造を改変し、これまで報告のなかったRAGE結合放射性ヨウ素標識プローブの開発に成功した。また、アルツハイマー病モデル遺伝子改変マウスを用いて、加齢に伴うRAGEおよびニコチン受容体発現変化について調べ、加齢とともにRAGE発現が増加すること、ニコチン受容体 4₂サブタイプが減少すること、7サブタイプは野生型マウスよりも発現量が多いものの加齢に依存した発現変化は認めないことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to develop an imaging probe targeting receptor for advanced glycation end-products (RAGE). A novel radioiodinated probe targeting RAGE was successfully synthesized. Age-related changes in expression level of RAGE and nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) were also examined in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. The present study revealed an increase in RAGE expression and decrease in alpha4beta2-nAChR expression according to aging. Expression level of alpha7-nAChRs did not change during aging, although it was higher in the transgenic mice compared to wild-type mice.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：放射性医薬品 生体分子イメージング アルツハイマー病 最終糖化産物受容体(RAGE)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は記憶・認知機能が低下する進行性の神経変性疾患であり、老人斑蓄積と神経原線維変化を特徴的な病理所見とする。近年、老人斑の構成成分であるアミロイドタンパク質(A β)に結合する放射性プローブを用いて、脳内のA β 蓄積量を非侵襲的に定量(アミロイドPET)することにより、アルツハイマー病の早期診断が試みられている。しかしながら、アミロイドPETの問題点として、健常高齢者にもプローブ蓄積が認められる偽陽性があり[1]、特異度の高い早期診断法開発が求められている。

一方、A β が脳内に発現する最終糖化産物受容体(RAGE)に結合することで炎症反応が惹起され、神経細胞死が誘導されることが報告されている。すなわち、A β 陽性かつRAGE陽性であれば、A β の神経毒性が発現して認知機能低下が生じるが、A β 陽性でもRAGE陰性であれば神経機能は維持されると考えられ、脳内RAGE発現をイメージングすることで、アミロイドPETの偽陽性を克服することに繋がると期待できる。しかしながら、脳内RAGEを標的とした放射性プローブは、研究開始当初には国内外を通じて開発されていなかった。

また研究代表者は、自身が開発したニコチン性アセチルコリン受容体(ニコチン受容体)イメージングプローブ ^{123}I -5IA[2]を用いて、アルツハイマー病モデル遺伝子改変マウスの認知機能低下と脳内ニコチン受容体 $\alpha 4\beta 2$ サブタイプの減少が相関することを見出している。RAGEが末梢性ニコチン受容体を不活化することは報告されている[3]が、サブタイプの異なる脳内ニコチン受容体にRAGEが及ぼす影響は、研究開始当初には全く明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、脳内RAGEに結合する放射性分子イメージングプローブの開発を目的とする。A β がRAGEに結合すると炎症が惹起され、神経細胞死が起こることから、RAGEはアルツハイマー病における認知症状発症に密接に関連している。RAGEイメージングプローブはA β の量ではなく、いわば質(毒性を発現するかどうか)を評価できるので、アミロイドPETの偽陽性問題を克服し、特異性の高い早期診断法が確立できると考えられる。また研究代表者は、脳内ニコチン受容体密度の低下が認知機能の低下と関連することを見出しており、RAGEがニコチン受容体に及ぼす影響を調べることも目的とする。

具体的には、血液脳関門を通過し、脳内RAGEに対して高い親和性を有するアンタゴニストであることが報告されたFPS-ZM1[4]を母体化合物に選択し、構造中の塩素をヨウ素で置換した化合物(図1)を設計し、その合成・放射標識を行った。また、アルツハイ

マー病モデル遺伝子改変マウスを用いて、RAGEとニコチン受容体の発現について調べた。

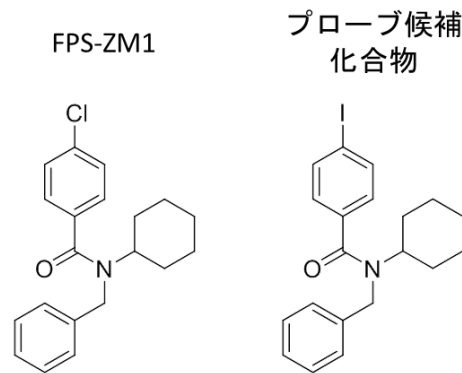


図1. 母体化合物とプローブ候補化合物の構造式

3. 研究の方法

(1) RAGEイメージングプローブの合成・標識

図2に示す合成スキームに従い、非放射性標品である化合物3および標識前駆体である化合物4の合成を行った。

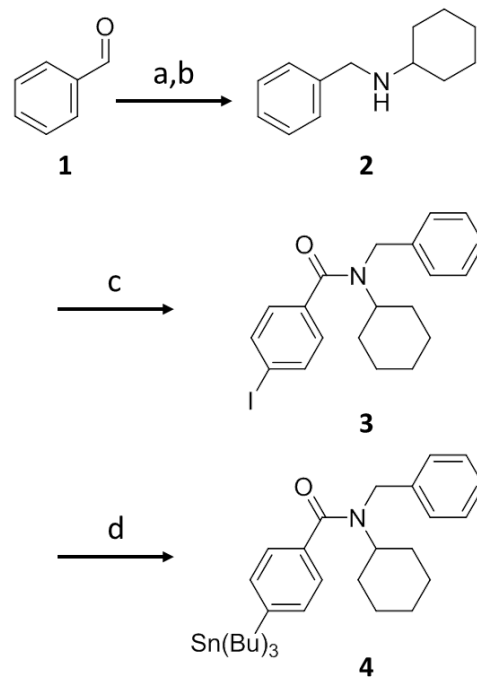


図2. 合成スキーム

(a) cyclohexylamine, MeOH, 50°C, 18 h; (b) NaBH₄, MeOH, 0°C rt, 4 h; (c) 4-iodobenzoyl chloride, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 18 h; (d) Sn₂(Bu)₆, Pd(0)(PPh₃)₄, toluene, reflux, 20 h

化合物2の合成

市販品であるベンズアルデヒドとシクロヘキシルアミンをメタノールに溶解させ、50°Cで18時間撹拌した。反応終了後、溶媒をろ過、減圧留去し、再度メタノールに溶解

させた。氷冷下、テトラヒドロホウ素酸ナトリウムを添加し、室温で4時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム溶液を加えて反応を終了させ、ジクロロメタンで抽出して硫酸ナトリウムで乾燥させた。

化合物3の合成

化合物2とトリエチルアミン、4-ヨードベンゾイルクロライドをジクロロメタンに溶解させ、室温で18時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、精製した。

化合物4の合成

化合物3をトルエンに溶解させ、ビス(トリブチルスズ)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウムを加えて攪拌後、20時間加熱還流した。反応終了後、溶媒を減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付した。化合物4を含む画分を回収後、プレパラティブ薄層クロマトグラフィでさらに精製した。

標識合成

化合物4をメタノールに溶解させ、酢酸酸性下、酸化剤と Na^{125}I を加えて室温で30分間反応させた。二亜硫酸ナトリウム水溶液を加えて反応を停止させた後、反応溶液をHPLCで精製した。

(2)アルツハイマー病モデル遺伝子改変マウスのRAGE発現評価

動物実験および組み換えDNA実験は、所属機関に設置された所管委員会に予め届け出た上で、承認されたプロトコルに従って実施した。

実験にはAPPマウスおよび野生型マウスを用いた。8および22ヶ月齢のAPPマウス、および同月齢の野生型マウスの脳におけるRAGE遺伝子、あるいはタンパク質発現を、RT-PCR法とウエスタンブロッティング法によりそれぞれ測定し、比較した。

(3)アルツハイマー病モデル遺伝子改変マウスのニコチン受容体発現評価

動物実験および組み換えDNA実験は、所属機関に設置された所管委員会に予め届け出た上で、承認されたプロトコルに従って実施した。

実験にはAPPマウスとPS2マウスを交配させることにより生まれたAPP/PS2マウス、および同腹仔として生まれた野生型マウスを用いた。2、12、16ヶ月齢のAPP/PS2マウス、および同月齢の野生型マウスの脳におけるニコチン受容体4サブタイプと7サブタイプの遺伝子あるいはタンパク質発現を、RT-PCR法とウエスタンブロッティング法によりそれぞれ測定し、比較した。

4. 研究成果

(1)RAGEイメージングプローブの合成・標識

ベンズアルデヒドとシクロヘキシルアミンを反応させることで対応するイミンを得、それを還元することで化合物2を粗収率96%で得た。化合物2と4-ヨードベンゾイルクロライドを反応させることで、化合物3を収率88%で得た。化合物3に対して、ヨウ素スズ交換反応を行うことで、化合物4を収率3%で得た。なお、化合物の構造は $^1\text{H-NMR}$ 、ESI-MSにて決定した。

また化合物4に対して、酸化剤存在下、スズ放射性ヨウ素交換反応を行うことで、 ^{125}I 標識を行った。HPLCによる保持時間の一致により、標識反応の進行を確認した。酸化剤の違いによる収率の差は認めなかった。

(2)アルツハイマー病モデル遺伝子改変マウスのRAGE発現評価

まずRAGEのmRNA発現を調べたところ、統計学的には有意でないものの、22ヶ月齢のAPPマウスで同月齢の野生型マウスより発現が増加する傾向を認めた。

続いてRAGEのタンパク質発現についても評価した。その結果を図3に示す。8ヶ月齢のAPPマウスでは、RAGEのタンパク質発現量は野生型マウスと差を認めなかった。一方で22ヶ月齢では、野生型マウスと比較して脳内RAGEのタンパク質発現は有意に増加した。

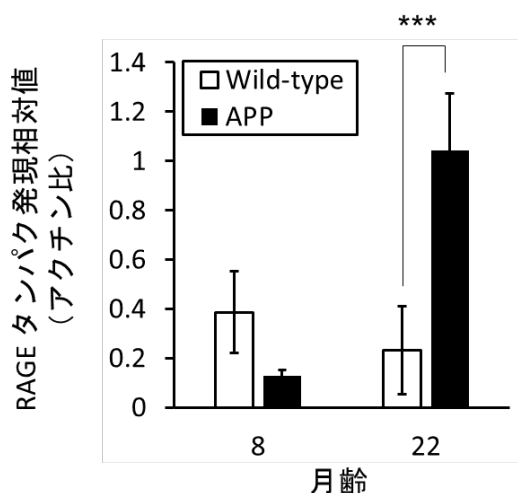


図3. APPマウスと野生型マウスにおけるRAGEタンパク質発現の加齢変化

(3)アルツハイマー病モデル遺伝子改変マウスのニコチン受容体発現評価

まず4、2、7それぞれのサブユニットのmRNA発現を調べたところ、4および2サブユニットに関しては、評価したすべての月齢で野生型と発現レベルは同等であった。7サブユニットに関しては、評価したすべての月齢で野生型よりも発現が1.3~2.5倍有意に高かった。すべてのサブユニッ

トの mRNA は APP/PS2 および野生型いずれにおいても、加齢による発現変化を認めなかった。

続いてそれぞれのサブユニットのタンパク質発現についても評価した。4 サブユニットの発現は野生型では2~16ヶ月齢で同等であったが、APP/PS2 では月齢とともに減少し、16ヶ月齢では野生型の0.8倍と有意に低下した。2 サブユニットの発現は APP/PS2 および野生型のすべての月齢で同レベルであり、加齢による発現変化も認めなかった。

7 サブユニットに関しては、2ヶ月齢では両マウスの間で発現に差を認めなかったものの、12および16ヶ月齢では野生型と比較して、APP/PS2 で有意に発現が増加した。加齢による発現変化は認めなかった。

本研究では、これまで報告例の無かった放射性ヨウ素標識 RAGE イメージングプローブの合成に成功した。しかしながら合成したプローブは脂溶性が高く、脳内 RAGE を特異的にイメージングするためには更なる構造変換が必要であることが明らかとなった。またアルツハイマー病モデル遺伝子改変マウスでは、加齢とともに RAGE 発現が増加することを見出した。さらに同モデルマウスで、ニコチン受容体 4 2 サブタイプは加齢とともに発現が低下する一方、7 サブタイプは野生型よりも発現が高く、加齢による変化も受けにくいことを明らかとした。

<引用文献>

Quigley H, Colloby SJ, O'Brien JT. PET imaging of brain amyloid in dementia: a review. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2011; 26(10): 991-9.

Ueda M. Development of Radiolabeled Molecular Imaging Probes for in Vivo Analysis of Biological Function. *Yakugaku Zasshi*. 2016; 136(4): 659-68.

Chandna AR, Nair M, Chang C, Pennington PR, Yamamoto Y, Mousseau DD, Campanucci VA. RAGE mediates the inactivation of nAChRs in sympathetic neurons under high glucose conditions. *Eur J Neurosci*. 2015; 41(3): 341-51.

Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, Love R, Perry S, Paquette N, Deane RJ, Thiyagarajan M, Zarcone T, Fritz G, Friedman AE, Miller BL, Zlokovic BV. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest*. 2012; 122(4): 1377-92.

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

上田真史 . 放射性分子プローブを利用した生体機能分析 . 日本薬学会第 138 年会 (招待講演) 2018 年 3 月 25-28 日、ANA クラウンプラザホテル金沢など (石川県金沢市).

松浦有希、上田真史、佐野紘平、佐治英郎、榎本秀一 . アルツハイマー病における認知機能低下の画像バイオマーカーとしてのニコチン/NMDA 受容体イメージングの可能性比較 . 第 55 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2016 年 11 月 5-6 日、就実大学 (岡山県岡山市).

松浦有希、上田真史、檜垣佑輔、佐野紘平、佐治英郎、榎本秀一 . アルツハイマー病の認知機能の画像バイオマーカー標的としての脳糖代謝およびニコチン受容体の有用性の解明 . 第 56 回日本核医学会学術総会、2016 年 11 月 3-5 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

〔その他〕

ホームページ等

<http://analyticalscience.pharm.okayama-u.ac.jp/>

アウトリーチ活動

2017 年度岡山大学オープンキャンパスの研究教育講演を担当し、研究成果の一部を照会した。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

上田 真史 (UEDA, Masashi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授
研究者番号 : 40381967

(2)研究協力者

松浦 有希 (MATSUURA, Yuki)