

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04247

研究課題名(和文)アルツハイマー病における病因物質と保護性神経炎症・神経生存の生体画像化と治療戦略

研究課題名(英文) In vivo imaging for pathological substance and neuroinflammation/neuroactivity and therapeutic strategy in Alzheimer's disease

研究代表者

尾内 康臣 (Ouchi, Yasuomi)

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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の病因物質とM2神経炎症と神経細胞の生存やシナプス密度を可視化する新しいin vivo画像化技術を確立するために、FKNのMRIシグナルを発生する分子プローブおよびCB2をターゲットにしたRIプローブを用いた画像化を試みた。MRIシグナルに関してはよりシグナルが小さすぎプローブの細胞内移行に問題がありより高磁場MRIが必要だった。CB2プローブではM2標的in vivo画像化が実現でき、早期ADモデル(SAMP8およびSAMP10)を用いてM1活性の前にM2活性が上昇することが分かった。その活性を持続する治療薬開発がAD進行の抑制に効果があると結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。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。そのため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、ADモデルマウスでM2系ミクログリア活性の活性化とA β の関与がわかり、AD治療ターゲットを異常蛋白以外にも視点を向ける重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We tried to develop an imaging method using a molecular probe which produced an MRI signal for FKN and a radioisotope (RI) probe for CB2, in order to establish a new in vivo imaging technique to visualize pathological substances and M2-type neuroinflammation along with neuronal survival and synapse density in the living brain of Alzheimer's disease (AD). The MRI signal was found to be too small possibly because the degree of the probe entering into the cell was insufficient, which might require much higher magnetic field MRI machine. In contrast, the RI probe successfully allowed imaging of M2-type cell by targeting CB2 receptor in vivo. The activation of M2 like neuroinflammation was shown to precede M1 activation at an early stage of AD model (senescence-accelerated mouse prone 10, the line of mice generating amyloid and neuronal loss). The result provided a therapeutic contention that persisting M2 activity might be a beneficial in tempering the progression of AD

研究分野：脳神経画像学

キーワード：アルツハイマー病 脳神経画像

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) の根絶に向けた取り組みが世界的規模でなされており、AD の病因物質である A β や tau を標的とした治療薬が開発されているが、未だ多くが中止ないし軌道修正を余儀なくされている。ヒト脳の病態を客観的に描出する AD 画像研究は A β と tau の可視化が可能となり、治療薬の客観的指標が得られるようになったが、可視化された病因物質は十分重合が進んだフィブリル化した状態を主に画像化しているため、今後改良も望まれている。現在は“正常な人”をターゲットとする未病時の病態解明や治療介入が重要であるとされ、早期の AD 病態を解明する病態イメージングの重要性すなわち、A β や tau がもたらす脳内環境の変化、M1M2 系の神経炎症、神経細胞の生存や新生を可視化する技術の確立が切望されていた。

これまで我々は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が、主に M1 系を可視化する技術を用いてきた。特に初期 AD において [11C]PIB や [11C]PBB3 を用いて A β や tau を画像化し、その時の脳内ミクログリア活性について第 1 世代トレーサー [11C]PK11195 や第 2 世代 [11C]DPA713 を用いて M1 系神経炎症と病因物質の関係を示してきた。一方でミクログリア活性機能を別な角度から捉える試みとして、アミロイド集積が軽微な老齡マカクサルで M2 系に近いと報告されているミクログリア M2 の画像化も行ったが、より特異的には、fractalkine (FKN) シグナル系を計ることがよいという報告された。FKN は炎症の抑制に働き保護性作用に関係していることから FKN シグナル画像化を通して M2 系活性を捉えられる。M2 を捉える手法は他に CB2 の活性を可視化することで可能であることが報告されていた。そこで M2 刺激によるミクログリア保護作用の活性化と病因物質の蓄積状況と神経細胞の生存、神経シナプス密度の減弱等の関連を *in vivo* で明らかにすることは、ヒトを対象にする新しい治療戦略につながり重要であると考えた。

そこで、M2 系画像化に関してモデルマウスで CB2 リガンドを用いた *in vivo* 画像化や 19F-NMR シグナルを用いた *in vivo* 画像化の基礎的技術を有していたため、これを実証することが試された。当時は、AD 脳の病態について M2 を中心とする神経炎症に着目し、A β や tau など蓄積する異常タンパクの出現と神経細胞の生存と新生の関連性を *in vivo* 状態で調べた研究はなく、そのため、統合的に単一の同一個体の病態とその推移を調べることは不可能だった。したがって、これらを実現する新しい *in vivo* イメージング技術の確立は重要で、M2 ミクログリアとの AD 脳内環境の病態的関連性を明らかにし、A β 標的とは異なる治療薬を創出することが期待される基盤研究となると考えられた。

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* イメージング技術を確立し、SAMP8 マウスや自然発症老齡 AD マカクサルを用いて治療薬の開発の評価系を作出することを目的とした。

3. 研究の方法

本計画では M2 神経炎症に関連する AD 病因物質の発現とニューロン・シナプス活性との関係を画像的に評価することを目指すため、AD モデルマウスを用いて以下の研究を計画した。

(1) FKN の MRI シグナルを発生する分子プローブおよび CB2 をターゲットにした RI プローブを用いた M2 標的 *in vivo* 画像化、(2) AD モデルマウスとサルを用いた M2 連関脳内環境変化とニューロン・シナプス活性の *in vivo* 画像化、(3) 創薬評価の研究を実施することを試みた。

我々はこれまで caspase-3/-7 等のプロテアーゼ様酵素の活性を画像化する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、FKN 系を評価する MRI プローブを作製するとともに、CB2 に特異的に結合する RI プローブを合成する。そこで M2 系画像を確立した後、病因物質、ニューロン・シナプス活性の *in vivo* 画像と比較検証を行った。

4. 研究成果

2017 (平成 29) 年度

まず SAMP8 の自然発症老齡促進マウスを用いて検討を始めたが、[11C]PIB で検討したところ SAMP8 では A β 集積が見られず対象マウスを SAMP8 から SAMP10 に変更して検討することになった。A β 陽性 SAMP10 マウスを用いて、申請者ら MRI プローブを用いた脳内分子動態解析技術を使って解析を試みたが脳内のシグナルは得られなかった。これは MRI プローブの脳内移行が不十分であったためと考えられる。MG2 細胞から M2 細胞に誘導したセルラインを作成し、18F-FDG の RI プローブを用いた検討を行った結果、M2 は M1 よりもエネルギー消費が少ないことがわかっ

た。また、RI プローブである CB2 系画像化評価系で解析し、M2 ミクログリア優位を反映することがわかった。

In vivo 系における実験として、本年度では次年度に向けた予備実験をおこなった。SAMP10 AD 類似マウスにおいて、CB2 特異的結合の示す RI トレーサ ([¹¹C]NE40) の実験を行い、M2 神経炎症の評価を行った。 [¹¹C]NE40 を尾静脈より投与後 60 分のダイナミック撮像を行い、simplified reference tissue model (SRTM) を用いて小脳を参照とする結合能 (BPND) 画像を作成することがわかった。病因物質との比較のため、 [¹¹C]PIB を用いて A 蓄積の画像化を行った。トレーサーに関して静注後ダイナミック撮像を施行して、SRTM と小脳を参照とする BPND 画像を作成して、両者の関係を調べることが可能となり、次年度に集中的に行うことになった。

2018 (平成 30) 年度

AD のモデル動物として A 陽性 SAMP10 マウスを用いた。この SAMP10 はアミロイド出現と神経変性による脳萎縮を特徴とするマウスである。前年と同様に MRI プローブを用いた脳内分子動態解析技術を使って改良したが十分な脳内からのシグナルは得られず、MRI プローブの脳内移行にやはり問題があることがわかった。そのため、BBB を透過することが分かっている RI 手法を用いて検討した。MG2 細胞から M2 細胞に誘導したセルラインを作成し、18F-FDG の RI プローブを用いた前年度の結果では M2 は M1 よりもブドウ糖消費が少ないことが示されたが、電子顕微鏡で観察すると M2 誘導した細胞は swelling をおこし、cristae の数が増えていること、M1 誘導したときには fragmentation が生じていることがわかった。RI プローブである CB2 系画像化評価系で解析し、M2 ミクログリア優位を反映することがわかった。

SAMP10 AD モデルマウスにおいて、CB2 特異的結合の示す RI トレーサ ([¹¹C]NE40) で M2 神経炎症の評価について、 [¹¹C]PIB を用いて A 蓄積の評価についてそれぞれ結合能画像を作成して画像的に検討した。いずれもトレーサーに関して静注後ダイナミック撮像を施行して、SRTM と小脳を参照とする BPND 画像を作成した。

図 1 に示したように M2 型優位のミクログリア活性は 15 週 SAMP10 に見られることがわかった。M1 系ミクログリア活性を反映する PK11195 と比較すると、5 週 SAMP10 マウスよりも 15 週 SAMP10 マウスの方が M2 系を反映する [¹¹C]NE40 の結合が定量的にも高いことが示された(図 2)これらの成果を論文としてまとめ投稿することができた(最終の出版許可は 2019 年度)。

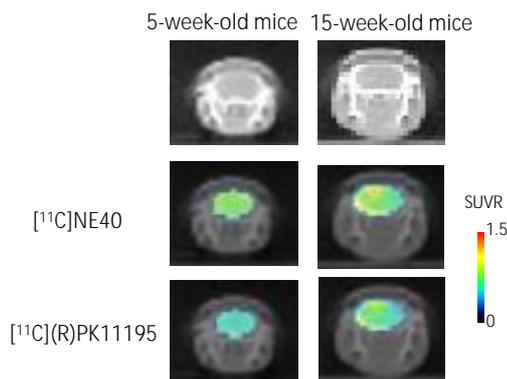


図1 RIプローブを用いた画像化(SAMP10マウス)

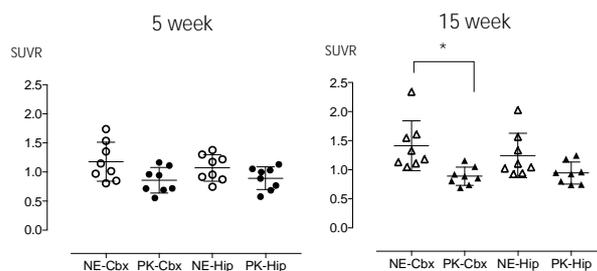


図2

2019 (平成 31) 年度

以前予備的検討として、MC-1 に特異的に結合する [¹¹C]BCPP-FE を用いて神経細胞活性を評価できることを確認した。本年度研究では、マウスの尾静脈からトレーサー静注後のダイナミック撮像を行い、2 コンパートメントモデルを応用し、推定動脈 input カーブから得られた分布容積画像 (Vt)あるいは標準化取り込み (SUV) 画像を作成する。ミトコンドリア活性を測定する際に ATP 合成では MC-1 は律速段階酵素に当たり、その活性を調べることで電子伝達系機能すなわちミトコンドリア活性を評価ができる。M2 神経炎症における MC-1 活性も調べて、神経生存と M2 神経炎症との関係を検討した。その結果、M2 活性下ではミトコンドリア活性の上昇があり神経生存にプラスに働くことが考えられた。本研究は検討数も少ないため次の研究計画に盛り込む予定である。

アミロイド陽性である 20 歳以上の老齢サル (ヒトでは 80-90 歳相当) を用いてミクログリア活性の検討を行う計画であったが、2019 年の国内初のサルによる B ウイルス感染例の報告のため、その感染症対策として B ウイルス抗体陽性のサルが使用不能になった。生憎検査予定していた老齢サルは全て B ウイルス抗体陽性のため、若年サルに切り替えての検討を計画した。先にアミロイドトレーサーで脳内のアミロイド蓄積を調べた結果、アミロイド陰性だったため、サルの AD 実験はできなくなった。今後は B ウイルス陰性でできるだけ高齢のサルを飼育して、アミロイド画像で確認することが必要となった。このことより、AD モデル動物はマウスで実験が優先され、最終年度では従ってマウスを用いた成果のみが報告できた。

本事業により、今回の研究で得られたミクログリア活性の in vivo 評価系を用いて病態の経時的变化や治療薬の効果を調べることができると期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakaizumi K, Ouchi Y, Terada T, Yoshikawa E, Kakimoto A, Isobe T, Bunai T, Yokokura Y, Suzuki K, Magata Y	4. 巻 61
2. 論文標題 In vivo depiction of 7 nicotinic receptor loss for cognitive decline in Alzheimer's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Alzheimers Dis	6. 最初と最後の頁 1355-1365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-170591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bunai T, Terada T, Kono S, Yokokura M, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Miyajima H, Ouchi Y	4. 巻 385
2. 論文標題 Neuroinflammation following disease modifying therapy in multiple sclerosis A pilot positron emission tomography study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurol Sci	6. 最初と最後の頁 30-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jns.2017.12.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omata K, Ito S, Takata Y, Ouchi Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Similar neural correlates of planning and execution to inhibit continuing actions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Neurosci	6. 最初と最後の頁 951-960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2018.01024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fukai M, Bunai T, Hirose T, Kikuchi M, Ito S, Minabe Y, Ouchi Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Endogenous dopamine release under transcranial direct-current stimulation governs enhanced attention: a study with positron emission tomography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transl Psychiatry	6. 最初と最後の頁 115-125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-019-0443-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi, M, Takahashi T, Hirose T, Oboshi Y, Yoshikawa E, Minabe Y, Ouchi Y	4. 巻 11
2. 論文標題 The lateral occipito-temporal cortex is involved in the mental manipulation of body part imagery	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Front Hum Neurosci	6. 最初と最後の頁 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnhum.2017.00181	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirose T, Kikuchi M, Ouchi Y, Takahashi T, Yoshimura Y, Kosaka H, Furutani N, Hiraishi H, Fukai M, Yokokura M, Yoshikawa E, Bunai T, Minabe Y	4. 巻 10
2. 論文標題 A pilot study of serotonergic modulation after long-term administration of oxytocin in autism spectrum disorder	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Autism Res	6. 最初と最後の頁 821-828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/aur.1761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukai M, Hirose T, Kikuchi M, Ouchi Y, Takahashi T, Yoshimura Y, Miyagishi Y, Kosaka H, Yokokura M, Yoshikawa E, Bunai T, Minabe Y	4. 巻 267
2. 論文標題 Oxytocin effects on emotional response to others' faces via serotonin system in autism: A pilot study. Psychiatry Res	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Psychiatry Res	6. 最初と最後の頁 45-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psychres.2017.06.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsudaira T, Omote Y, Terada T, Kondo A, Obi T, Ouchi Y, Inoue Y	4. 巻 264
2. 論文標題 Reversible amygdala enlargement: a longitudinal observation of a patient with elderly onset temporal lobe epilepsy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurol	6. 最初と最後の頁 2487-2490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-017-8649-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ouchi Y	4. 巻 16
2. 論文標題 Imaging neuroinflammation to monitor α -synucleinopathy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lancet Neurol	6. 最初と最後の頁 763-764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S1474-4422(17)30244-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bunai T, Kakimoto A, Yoshikawa E, Terada T, Ouchi Y.	4. 巻 62
2. 論文標題 Biopathological significance of early-phase amyloid imaging in the spectrum of Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Alzheimers Dis	6. 最初と最後の頁 529-538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-181188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terada T, Yokokura M, Obi T, Bunai T, Yoshikawa E, Ando I, Shimada H, Suhara T, Higuchi M, Ouchi Y.	4. 巻 266
2. 論文標題 In vivo direct relation of tau pathology with neuroinflammation in early Alzheimer's disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurol.	6. 最初と最後の頁 2186-2196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00415-019-09400-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokokura M, Terada T, Bunai T, Nakaizumi K, Kato Y, Yoshikawa Futatsubashi M, Suzuki K, Yamasue H, Ouchi Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Alterations in serotonin transporter and body image-related cognition in anorexia nervosa.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroimage Clinical	6. 最初と最後の頁 101928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1016/j.nicl.2019.101928	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi S, Iga Y, Nakamura M, Takizawa C, Fukumoto D, Kakiuchi T, Nishiyama S, Ohba H, Tsukada H, Sato K, Ouchi Y	4. 巻 16
2. 論文標題 Upregulation of cannabinoid receptor type 2, but not TSPO, in senescence-accelerated neuroinflammation in mice: a positron emission tomography study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neuroinflamm	6. 最初と最後の頁 208-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-019-1604-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Yasuomi Ouchi, Tatsuhiro Terada, Kyoko Nakaizumi, Etsuji Yoshikawa, Tomoyasu Bunai, Yasuhiro Magata
2. 発表標題 Clinicopathophysiology of $\alpha 7$ nicotinic receptor in Meynert cholinergic regions in aging and dementia
3. 学会等名 第24回Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takao Nozaki, Kenji Sugiyama, Tetsuya Asakawa, Hiroki Namba, Masamichi Yokokura, Tetsuhiro Terada, Yasuomi Ouchi
2. 発表標題 The increase of dopamine transporter density in the ventral striatum and its correlation with motor improvement in patients with Parkinson's disease after subthalamic nucleus deep brain stimulation
3. 学会等名 European Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ouchi Y, Fukumoto D, Kakiuchi T, Nishiyama S, Yamamoto S, Ohba H, Hosoya T, Tsukada H
2. 発表標題 Differences in TSPO and cannabinoid receptor CB2 binding at an early stage in poststroke neuroinflammation in living rats.
3. 学会等名 第18回Brain/BrianPET (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuomi Ouchi, Tatsuhiro Terada, Masami Futatsubashi, Bunai Tomoyasu, Masamichi Yokokura, Etsuji Yoshikawa, Hideo Tsukada.a
2. 発表標題 In vivo imaging of mitochondrial complex CM-1 in the human brain.
3. 学会等名 第23回Annual Meeting of the Organization for Human Brain Mapping (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ouchi Y
2. 発表標題 Yasuomi Ouchi. In vivo depiction of neuroinflammation on the cholinergic system and cognition in humans.
3. 学会等名 第13回 Internatioinal symposium of geriatricis and gerontology. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuomi Ouchi.
2. 発表標題 In vivo imaging of neuroinflammation associated with misfolded proteins in Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 29回International Society for Cerebral Blood Flow and Metabolism (ISCBFM) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	横倉 正倫 (Yokokura Masamichi) (00529399)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武内 智康 (Bunai Tomoyasu) (20754188)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・特任助教 (13802)	
研究分担者	和久田 智靖 (Wakuta Tomoyasu) (80444355)	浜松医科大学・医学部附属病院・講師 (13802)	