

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670562

研究課題名(和文) 認知機能の画像バイオマーカーとしての脳内ニコチン受容体イメージングの意義評価

研究課題名(英文) Feasibility evaluation of central nicotinic acetylcholine receptors as an imaging biomarker of cognitive function

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：認知機能を客観的・定量的に評価可能な画像バイオマーカーとして、脳内ニコチン受容体イメージングの有効性を明らかにすることを目的に研究を実施した。これを達成するため、まずはニコチン受容体結合放射性プローブである<sup>123</sup>I-5IAを用いて、マウス脳ニコチン受容体のイメージング法を確立した。続いて、アルツハイマー病モデルマウスの認知機能の低下とニコチン受容体の減少が同じタイミングで起こることを見出し、その減少を<sup>123</sup>I-5IAを用いて画像で捉えることにも成功した。これらの成果は、認知機能の画像バイオマーカーとしてニコチン受容体イメージングの可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to investigate the feasibility of imaging central nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) as an objective and quantitative biomarker of cognitive function. It was demonstrated that a decrease in nAChR expression was correlated with cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. The decrease in nAChR expression was noninvasively detected with single-photon emission computed tomography using <sup>123</sup>I-5IA, an imaging probe that targets nAChRs. These findings indicate that nAChR could be a useful imaging biomarker of cognitive function.

研究分野：放射性医薬品学

キーワード：分子イメージング ニコチン性アセチルコリン受容体 アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は記憶・認知機能の低下を特徴とする進行性の神経変性疾患であり、症状の重篤度把握や治療薬開発のため、認知機能を客観的・定量的に評価可能なバイオマーカーの確立に期待が寄せられている。核医学分子イメージングは、生体機能を体外から非侵襲的・定量的に測定できる画像診断法であり、脳糖代謝能を反映する<sup>18</sup>F-FDGの集積が認知症状と相関したとの報告がなされ、認知機能の画像バイオマーカーとしての可能性が報告されていた。一方、我々はこれまでにニコチン受容体イメージングプローブである<sup>123</sup>I-5IAを開発し、動物およびヒトにおける正常時・疾患時のニコチン受容体の変化をインビボで解析し、その生理的意義について明らかとしてきた。<sup>123</sup>I-5IAを用いることで、アセチルコリン作動性神経を傷害して作製したアルツハイマー病モデル動物において、糖代謝能低下よりもニコチン受容体密度の低下が先に起こることも見出した。アルツハイマー病患者でもニコチン受容体密度の低下が報告されているが、その低下が認知機能と相関するかどうかは国内外を通じて検討されておらず、また、糖代謝とニコチン受容体密度のどちらが認知機能とより相関するかについても、明らかとはなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、認知機能を客観的・定量的に評価可能な画像バイオマーカーとして、脳内ニコチン受容体イメージングの有効性を明らかにすることを目的とする。ニコチン受容体の生理機能として、記憶・学習・認知などの高次脳機能に關与することが報告されており、アルツハイマー病患者ではニコチン受容体の発現量が減少することが報告されている。しかしながら、その減少の程度と認知機能との間に相関があるかどうかは検討されていない。認知機能を客観的・定量的に評価しうる画像バイオマーカーが確立できれば、症状の進行把握、治療の有効性評価、認知機能改善を目的とする薬物の薬効評価などが容易に行えるようになり、臨床・創薬分野に非常に大きな意義をもたらす。

## 3. 研究の方法

### (1)薬物および動物

<sup>123</sup>I/<sup>125</sup>I-5IAは *Nucl. Med. Biol.* 43(6): 372-8 (2016) に記載した方法により合成した。<sup>3</sup>H-ニコチン (80 Ci/mmol) と<sup>3</sup>H検量線は American Radiolabeled Chemicals 社より購入した。

実験動物は C57BL マウス (8 - 9 週齢) APP

マウスと PS2 マウスを交配して作出した二重遺伝子改変マウス (APP/PS2 マウス、6 - 16 ヶ月齢) および同腹仔として生まれた野生型マウス (6 - 16 ヶ月齢) を用いた。

なお動物実験および遺伝子組み換え実験は、それぞれの所属機関に設置された所管委員会にあらかじめ届け出た上で、承認されたプロトコルに従って実施した。

### (2)C57BL マウスの<sup>123</sup>I-5IA SPECT 撮像実験

まず、画像解析時のテンプレートとするため、Bruker BioSpin 社製 BioSpec (4.7 T) を使用して MR 撮像を行った。T2 TurboRARE 3D シーケンス (繰り返し時間: 2000 ミリ秒、エコー時間: 65 ミリ秒) により C57BL マウス全脳を撮像した。

次に、1 mm 径のマルチピンホールコリメータを装着した TriFoil Imaging 社製 FX-3000 を使用して SPECT/CT 撮像を行った。C57BL マウス尾静脈より<sup>123</sup>I-5IA (8.2 - 12.3 MBq) を投与し、その 5 分後から 1.5% イソフルラン麻酔下で 4 分間 CT 撮像を行い、その後 SPECT 撮像 (10 分間×4 フレーム) を行った。撮像終了後のマウスは飼育ケージに戻し、<sup>123</sup>I が十分に減衰するまで 1 週間飼育した。

それぞれ撮像終了後に画像再構成を行い、得られた MR 画像および SPECT/CT 画像を dicom 形式で出力して画像解析に用いた。解析には PMOD Technologies 社製の PMOD ver. 3 を使用した。dicom 形式の MR 撮像データおよび SPECT/CT 撮像データを読み込み、頭蓋骨を参照して MR 画像と CT 画像の重ね合わせを行った。MR 画像上で大脳皮質、線条体、視床、小脳に半径 0.8 mm の球を、海馬に半径 0.5 mm の球を関心領域として設定し、その位置情報を SPECT 画像に適用することで、関心領域に集積した放射能を定量した。

### (3)脳ニコチン受容体密度のインビトロ定量解析

SPECT 撮像に用いたマウスを撮像終了から 1 週間後に安楽死させ、脳を摘出してマイクロトームにより厚さ 10 μm の凍結新鮮切片を作製した。それを 20 mM のヘパス緩衝液 (pH 7.4) 中、4 nM の<sup>3</sup>H-ニコチンと 4°C で 90 分間インキュベートし、その後氷冷した緩衝液で洗浄した。非特異的結合は 100 μM の (-) ニコチン存在下でインキュベートすることにより求めた。乾燥させた脳切片を、<sup>3</sup>H 検量線とともにイメージングプレートに 20 時間曝露してオートラジオグラムを得た。皮質、線条体、海馬、視床、小脳に関心領域を設定し、集積した放射能を定量した。

### (4)アミロイド斑の組織学的評価

APP/PS2 マウスおよび野生型マウスのアミロイド斑蓄積をチオフラビン S 染色により評価した。厚さ 10 μm の凍結切片を 500 μM チオフラビン S 溶液 (50% エタノール水溶液) に 3 分間浸し、洗浄することでアミロイド斑

に対する染色を行った。染色後の標本は乾燥させ、蛍光顕微鏡で観察した。

#### (5) 認知機能の行動薬理的評価

APP/PS2 マウスおよび野生型マウスの認知機能を新奇物体認識試験により評価した。まず、何も入っていない観察箱 (44×44 cm) にマウスを入れ、環境馴化を3日間行った(1日あたり10分間)。翌日、2つの同一物体を設置した観察箱にマウスを入れ、それぞれの物体に対する探索時間を10分間測定した。さらに翌日、片方の物体を新奇物体に変更した観察箱にマウスを入れ、それぞれの物体に対する探索時間を5分間測定した。マウスの行動はビデオレコーダーを用いて撮像し、新奇物体及び旧知物体に対する探索時間を自動解析した。認知機能の指標となる新規物体選択性 (Exploratory preference; EP 値) は下記の式を用いて算出した。EP 値 (%) = 新規物体への探索時間 / (新規物体への探索時間 + 旧知物体への探索時間) × 100。

#### (6) 脳糖代謝およびニコチン受容体密度の二重オートラジオグラフィ解析

APP/PS2 マウスあるいは野生型マウスの尾静脈より、<sup>18</sup>F-FDG (23 MBq) と <sup>125</sup>I-5IA (700 kBq) の混合溶液を投与し、60分後に屠殺して全脳を摘出した。摘出した脳を凍結させ、ミクロトームにより厚さ 10 μm の凍結切片を作製し、イメージングプレートに1時間曝露して <sup>18</sup>F-FDG のオートラジオグラムを得た。続いて、<sup>18</sup>F が減衰した 24 時間後に同じ脳切片を再びイメージングプレートに 20 時間曝露することで、<sup>125</sup>I-5IA のオートラジオグラムを得た。得られたオートラジオグラムの皮質に関心領域を設定し、集積した放射能をそれぞれ定量した。

#### (7) APP/PS2 マウスおよび野生型マウスの SPECT 撮像

(2) と同様の方法で、APP/PS2 マウスおよび野生型マウスに対して <sup>123</sup>I-5IA SPECT 撮像を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) <sup>123</sup>I-5IA SPECT 撮像の定性・定量評価

視床および小脳レベルにおける C57BL マウスの MR 画像、および <sup>123</sup>I-5IA 投与 33 分後に得られた SPECT/CT 画像を図 1 に示す。ニコチン受容体高発現部位である視床 (矢印) に高い放射能集積を認める一方、ニコチン受容体低発現部位である小脳にはほとんど集積を認めず、受容体分布に一致した画像が得られた。これがニコチン受容体密度を反映した画像であるかを調べるため、<sup>123</sup>I の減衰後に脳切片を作製し、<sup>3</sup>H-ニコチンを用いてニコチン受容体密度を測定することで、SPECT 画像関心領域中の <sup>123</sup>I-5IA 集積とそれに対応する

部位のニコチン受容体密度を同一個体で直接比較した。その結果、両者の間には有意な正の相関 (相関係数 0.55、P < 0.005) を認め、<sup>123</sup>I-5IA を投与して得られたマウス SPECT 画像がニコチン受容体密度を反映したものであることを見出した。さらに、小脳比とニコチン受容体密度との相関を調べたところ、両者の間にも有意な正の相関 (相関係数 0.45、P < 0.01) を認めた。5 匹の平均データであり、今後さらに例数を追加して検討を重ねる必要は残されているものの、<sup>123</sup>I-5IA を用いてニコチン受容体密度の半定量解析の可能性も示された。

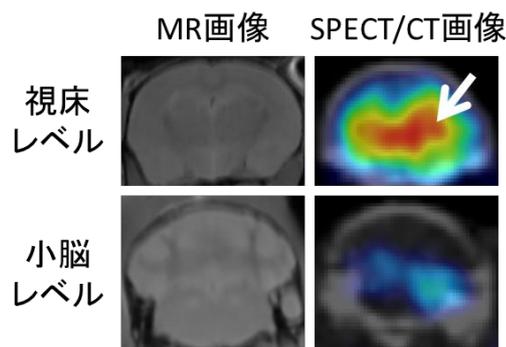


図 1. C57BL マウスの脳 MR および SPECT/CT 画像

#### (2) アミロイド斑の組織学的評価

6 - 16 ヶ月齢の APP/PS2 マウスのチオフラビン S 染色結果を図 2 に示す。6 ヶ月齢の皮質領域にわずかに蓄積を認め、12 ヶ月齢ではそれが顕著となった。16 ヶ月齢では数は増加しないものの、サイズが大きくなった。一方、データは示さないものの、野生型マウスではどの月齢でも染色を認めなかった。

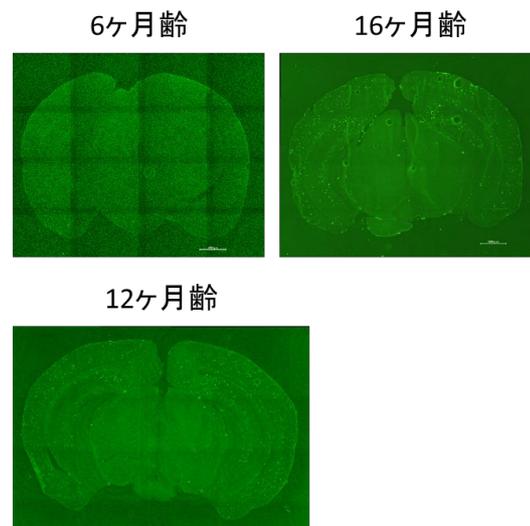


図 2. APP/PS2 マウス脳切片のチオフラビン S 染色画像

(3) APP/PS2 および野生型マウスの認知機能

6 - 16 ヶ月齢の APP/PS2 マウスおよび野生型マウスの新奇物体認識能力を図 3 に示す。縦軸の EP 値は認知機能の指標であり、値が大きいほど認知機能が正常であることを表している。野生型では、検討したすべての月齢において EP 値は約 70%であった。APP/PS2 マウスでは、アミロイド斑の蓄積が始まった 6 ヶ月齢では野生型マウスと差を認めなかったものの、蓄積が顕著となる 12、16 ヶ月齢では野生型マウスと比較して、有意な EP 値の低下を認めた。

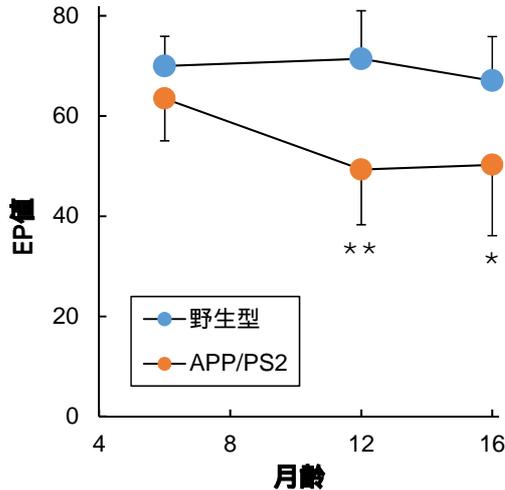


図 3 .APP/PS2 マウスおよび野生型マウスの新奇物体認識能力

(4) APP/PS2 および野生型マウスの糖代謝

6 - 16 ヶ月齢の APP/PS2 マウスおよび野生型マウスにおける  $^{18}\text{F}$ -FDG 集積を図 4 に示す。野生型マウスと比較して、6 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは  $^{18}\text{F}$ -FDG の集積亢進を認めたものの、それ以降の月齢では有意な差を認めなかった。この集積の経時変化は、図 3 で示した

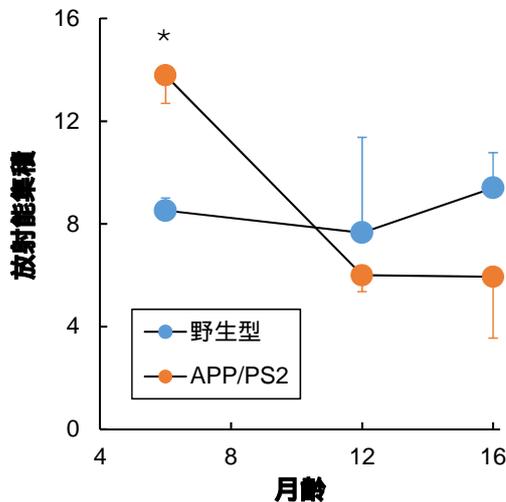


図 4 .APP/PS2 マウスおよび野生型マウス皮質領域に対する  $^{18}\text{F}$ -FDG 集積

認知機能の経時変化とは一致しなかった。6 ヶ月齢はアミロイド斑の蓄積が始まった月齢であることから、脳内に炎症が起きている可能性が考えられ、それにより  $^{18}\text{F}$ -FDG 集積が亢進したものと考えられた。

(5) APP/PS2 および野生型マウスのニコチン受容体密度

6 - 16 ヶ月齢の APP/PS2 マウスおよび野生型マウスにおける  $^{125}\text{I}$ -5IA 集積を図 5 に示す。APP/PS2 マウスの認知機能が正常に保たれていた 6 ヶ月齢では、野生型マウスとの間に集積差を認めなかったものの、認知機能が低下した 12、16 ヶ月齢においては、 $^{125}\text{I}$ -5IA の集積も有意に低下した。このように、 $^{125}\text{I}$ -5IA 集積、すなわちニコチン受容体密度が認知機能の低下と同様の変化パターンを示すことが明らかとなった。

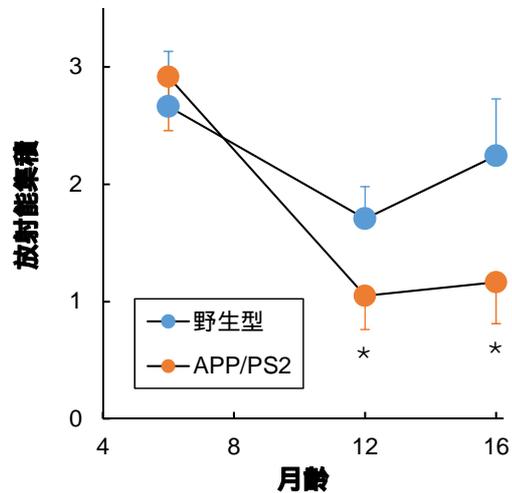


図 5 .APP/PS2 マウスおよび野生型マウス皮質領域に対する  $^{125}\text{I}$ -5IA 集積

(6) APP/PS2 および野生型マウスの  $^{123}\text{I}$ -5IA SPECT 撮像

12 ヶ月齢の APP/PS2 マウスおよび野生型マウスに  $^{123}\text{I}$ -5IA を投与して 60 分後に得られた SPECT 画像を図 6 に示す。矢印はニコチン受容体高発現部位である視床を示しているが、野生型に比べて APP/PS2 マウスでは集積が

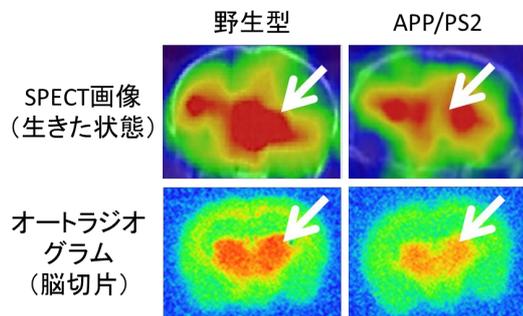


図 6 . APP/PS2 マウスおよび野生型マウスの  $^{123}\text{I}$ -5IA SPECT 画像と  $^{125}\text{I}$ -5IA オートラジオグラム

低いことが SPECT 画像とオートラジオグラムの両方で認められた。すなわち、APP/PS2 マウス脳内で生じているニコチン受容体密度の低下を生きたままの状態では非侵襲的に捉えることに成功した。

認知機能が低下したタイミングでニコチン受容体密度も低下した一方、<sup>18</sup>F-FDG の集積変化と認知機能低下の間には相関を認めなかったことから、ニコチン受容体イメージングが認知機能の画像バイオマーカーとして利用できる可能性が示された。

#### 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2件)

Matsuura Y, Ueda M, Higaki Y, Watanebe K, Habara S, Kamino S, Saji H, Enomoto S. Noninvasive evaluation of nicotinic acetylcholine receptor availability in mouse brain using single-photon emission computed tomography with [<sup>123</sup>I]5IA. *Nucl. Med. Biol.* 43(6): 372-8 (2016). (査読有) DOI: 10.1016/j.nucmedbio.2016.02.007

上田真史. 生体機能のインビボ解析のための放射性分子イメージングプローブの開発研究. *薬学雑誌*. 136(4): 659-668 (2016). (査読有) DOI: 10.1248/yakushi.15-00279

[学会発表](計3件)

松浦有希、上田真史、檜垣佑輔、渡辺恵子、神野伸一郎、佐治英郎、榎本秀一. [<sup>123</sup>I]5IA を用いたマウス脳ニコチン性アセチルコリン受容体 SPECT イメージングの定量性評価. 第10回日本分子イメージング学会総会・学術集会、2015年5月20-21日、タワーホール船堀(東京都江戸川区).

Matsuura Y, Ueda M, Higaki Y, Watanabe K, Habara S, Kamino S, Saji H, Enomoto S. Small animal SPECT imaging of mouse central 4 2 nicotinic acetylcholine receptors by using [<sup>123</sup>I]5IA. The World Molecular Imaging Society 2014, September 17-20, 2014, Seoul (Korea).

松浦有希、上田真史、檜垣佑輔、渡辺恵子、

羽原彰吾、神野伸一郎、佐治英郎、榎本秀一. ニコチン受容体結合放射性薬剤 [<sup>123</sup>I]5IA を用いたマウス脳 SPECT イメージング評価. 第12回次世代を担う若手のためのフィジカル・フォーラム (PPF2014)、平成26年7月14-15日、箱根高原ホテル(神奈川県箱根町).

[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

岡山大学公開講座「現代の薬学(第27回)」(2015年7月5日開催)にて、本研究成果の一部を紹介

#### 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) 研究分担者

檜垣 佑輔 (HIGAKI, Yusuke)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教  
研究者番号: 50598133

(3) 研究協力者

松浦 有希 (MATSUURA, Yuki)

佐野 紘平 (SANNO, Kohei)

佐治 英郎 (SAJI, Hideo)