

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12772

研究課題名（和文）新規PETプローブによる生体神経路トレーサー技術

研究課題名（英文）In vivo neural projection mapping technology with a novel PET ligand

研究代表者

南本 敬史（Minamimoto, Takafumi）

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 脳機能イメージング研究部・チームリーダー（定常）

研究者番号：50506813

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）：本研究の成果は2つある。(1)サル脳にウイルスベクターを用いて発現させた抑制性人工受容体hM4Diを11C-CLZをプローブとしたPET測定で可視化することに成功し、人工受容体の脳内での発現を生きた状態でモニターする技術を確立した。(2)新規に開発したPETプローブにより、サル脳内に発現させたhM4Diの検出感度が上昇するとともに、神経細胞軸索終末でのhM4Di発現が画像化できた。このPETプローブを用いた生体神経路トレーサー技術の開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This research aimed at establishing two technologies, in vivo monitoring of gene expression in the brain and noninvasive neural projection mapping technology. Using PET with 11C-clozapine, we succeeded in visualizing the inhibitory DREADD, hM4Di expressed in the putamen of monkeys. To improve the sensitivity of DREADD-PET imaging, we developed a new ligand, a carbon-11-labeled derivative of DREADD agonists. As seen with 11C-clozapine, PET imaging localized an increased uptake of the new ligand at the putative hM4Di-expressing site. Compared with 11C-clozapine, the signal-to-noise ratio was largely improved. Besides the injection site in the putamen, an increased uptake was also found in its projection areas, i.e., the globus pallidus and the substantia nigra, presumably reflecting hM4Di expression at the axon terminal. These results indicate that the new PET ligand provides a high DREADD selectivity, and thus enables noninvasive neural projection mapping.

研究分野：神経科学

キーワード：イメージング PET サル 化学遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

私たちの豊かな思考は1千億を超える神経細胞が複雑に絡み合った脳神経ネットワークによって支えられている。その思考を生み出す仕組みの理解や精神・神経疾患の病態を探究するためには、複雑な神経ネットワークの中から特定の神経路をターゲットにし、その状態と機能を照らし合わせる必要がある。実際ヒトの高次な思考の動物モデルとなりうるニホンザルなどを用いた霊長類研究において、近年のウイルスベクター法の発展により特定神経路の介入・解析が可能となってきた。この手法は特定の神経連絡を高い精度で抽出し、その機能を検証する有効な技術であるが、遺伝子導入の成否と遺伝子が発現していた経路について、すべての解析が終了した後の(1~数ヶ月を要する)組織学的検証に委ねられているのが現状である。これを動物が生きた状態で確認することができれば、技術の信頼性の向上に加え、個体毎の詳しい神経路とその機能の検証実験の積み重ねが可能となり、かつハイスループットで実施が可能となる。

化学的遺伝学的な神経活動操作法の一つ DREADDs(Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) は人工変異を加えた受容体を導入した神経細胞の活動を、選択的薬物の末梢投与により遠隔操作する技術である。DREADD 選択的アゴニストである酸化クロザピン(CNO)やその周辺化合物を元に合成した PET プローブを開発し、サル脳にウイルスベクターを用いて発現させた人工受容体を PET イメージングにより可視化することで、局在した DREADD 受容体の発現を正確かつ鋭敏に可視化する方法が開発できれば、遺伝子導入の成否を確認できるだけでなく、特定神経回路の生体可視化とその制御まで可能性が開かれる。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1)DREADD 受容体用 PET プローブを開発することで DREADD 受容体発現を捉え、かつ遺伝子発現のレポートを可能とする遺伝子発現イメージング技術の開発を行なう。(2)また DREADD は神経細胞軸索終末にも発現することが知られているため、PET プローブを高機能化することにより精度よく神経細胞特異的に発現させた遺伝子を可視化することによる生体神経路トレーサー技術の開発につなげる。

本研究により、行動課題を訓練済みのサルにおいても、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法を組み合わせることのリスクが回避できるようになり、より複雑な神経活動記録法等を組み合わせたアプローチが実用化できる。また、これら動物が生きた状態で、ターゲットとする神経細胞の投射先を特定できることが可能となるなど、これまでになく新しいツールを提供する。

### 3. 研究の方法

人工受容体 DREADD に高い親和性をもち、かつ脳内移行性の高い特徴をもつ化合物を割り出し、PET による評価を実施することで、DREADD の発現を鋭敏に捉える新規 DREADD-PET プローブを開発する。

#### (1) 遺伝子発現イメージング技術の開発

DREADD 高発現遺伝子改変マウスと局所 DREADD 発現サルを対象とした PET イメージングにより DREADD 高親和性 PET プローブのための候補化合物のスクリーニングとその評価を行う。

#### (2) 生体神経路トレーサー技術の開発

PET プローブを高精度化することにより、DREADD 発現神経細胞の軸索終末における DREADD 発現が検出できるかを検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子発現イメージング技術の開発

マウス脳内遺伝子発現イメージング  
抑制性人工受容体 hM4Di を前脳に発現させた遺伝子改変マウス(DREADD-Tg)を対象に  $^{11}\text{C}$ -CNO 及び  $^{11}\text{C}$ -Clozapine (CLZ) を PET リガンドとした PET 計測を行った。Tg 群において野生型マウスと比較して高い脳内でのリガンドの集積が確認された(Ji ら 2016)、齧歯類においては  $^{11}\text{C}$ -CNO 及び  $^{11}\text{C}$ -Clozapine (CLZ) が有望な遺伝子発現 PET プローブとなることが確認された。

#### サル脳内遺伝子発現イメージング

2頭のカニクイザルを用い、神経細胞特異的に抑制性人工受容体 hM4Di を発現させるレンチウイルスベクターを被殻に局所注入した。 $^{11}\text{C}$ -Clozapine (CLZ) を PET プローブとして用いた PET 測定を行い、被殻に発現させた DREADD 領域において、高いリガンドの取り込みが認められた。リガンドの集積が2割以上高まった部位と組織標本で確認した DREADD の発現部位とがよく対応していたことから、 $^{11}\text{C}$ -CLZ を用いた PET により DREADD の発現が非侵襲で画像化できることが確認できた(図1.Nagai ら 2016)。

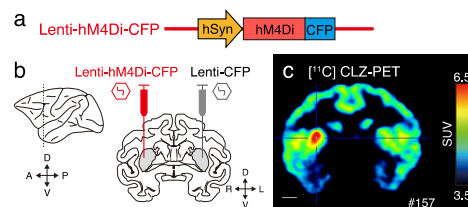


図1.  $^{11}\text{C}$ -CLZ による PET を用いたサル脳内 DREADD 発現生体可視化。(Nagai et al., 2016より改変)

#### (2) 生体神経路トレーサー技術の開発

人工受容体の検出感度と検出精度を向上することを狙い、DREADD に親和性の高い CLZ の類似化合物ライブラリー(Chen ら 2015)から

化合物 X を候補と考え、PET 薬剤を合成し、サル脳における人工受容体 DREDD 発現の可視化を試みた。サルの被殻に発現させた hM4Di 領域において、新 PET 薬剤 ( $^{11}\text{C}$ -X) の高い集積が認められた。この脳内への取り込みは  $^{11}\text{C}$ -CLZ より約 10% 増加する一方で、hM4Di を発現しない皮質下領域での集積は約 30% 低下したことから、CLZ と比較して S/N 比が向上したことが明らかとなった (図 2)。さらにコントロール側と比較して、被殻の投射先である淡蒼球や黒質での集積が上昇したことから、軸索終末での hM4Di 発現についても検出できることが示唆された。

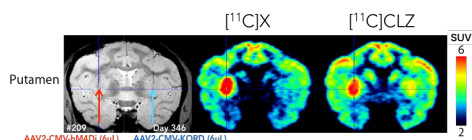


図 2. サル被殻 DREDD 発現部位及びコントロール部位における DREDD-PET リガンド  $^{11}\text{C}$ -X と  $^{11}\text{C}$ -CLZ の取り込みの比較。

今後さらなる特性評価の必要があるものの、本結果は新 PET 薬剤  $^{11}\text{C}$ -X が人工受容体への高い選択性を有し、サル生体脳における DREDD 発現を鋭敏に捉えうる PET プローブであることを示し、PET による生体神経路トレーサー技術に利用可能性が高いと期待できる。

#### <引用文献>

Chen et al., The first structure-activity relationship studies for designer receptors exclusively activated by designer drugs. *ACS Chem Neurosci.* 6, 476-484, 2015.

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 2 件)

Nagai Y, Kikuchi E, Lerchner W, Inoue KI, Ji B, Eldridge MAG, Kaneko H, Kimura Y, Oh-Nishi A, Hori Y, Kato Y, Hirabayashi T, Fujimoto A, Kumata K, Zhang MR, Aoki I, Suhara T, Higuchi M, Takada M, Richmond BJ, Minamimoto T\*. PET imaging-guided chemogenetic silencing reveals a critical role of primate rostromedial caudate in reward evaluation. *Nat Commun.* 7: 13605 (2016)

Ji B, Kaneko H, Minamimoto T, Inoue H, Takeuchi H, Kumata K, Zhang MR, Aoki I, Seki C, Ono M, Tokunaga M, Tsukamoto S, Tanabe K, Shin RM, Minamihisamatsu T, Kito S, Richmond BJ, Suhara T, Higuchi M. DREDD-expressing neurons in living brain and their application to implantation of iPSC-derived

neuroprogenitors.

*J Neurosci.* 36(45):11544-11558 (2016)

##### [学会発表](計 6 件)

Minamimoto T. PET imaging-guided chemogenetic modification of reward-related circuits in monkeys. BRAIN2017 Symposium on "Neuronal Modulation and In Vivo Imaging - Tools to Dissect the Living Brain" Berlin 2017.4.1 (2017)

南本敬史. 化学遺伝学イメージングによるサル脳科学研究の展開 平成 28 年度京都大学霊長類研究所共同利用研究会 霊長類研究所 2017.3.17-18 (2017)

Minamimoto T. PET imaging-guided chemogenetic manipulation of primate neural circuits *Non-human Primates Chemogenetic Workshop, National Institutes of Health, Bethesda* 2016. 12. 1 (2016)

南本敬史. PET イメージングと化学遺伝学的手法の融合によるサル脳科学研究の展開 平成 27 年度 京都大学霊長類研究所共同利用研究会「霊長類脳科学の新しい展開とゲノム科学との融合」京都大学 霊長類研究所 2016.3.11 (2016)

南本敬史. 脳につくった「鍵穴」をみる ナショナルバイオリソースプロジェクト「ニホンザル」第 12 回公開シンポジウム「第 4 期に向かうニホンザルバイオリソース～成果と展望～」東京 2015.12.11 (2015)

Minamimoto T. PET imaging of DREDDs in monkeys. What is needed to harness chemogenetics for the treatment of human brain disorders? The Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory 2015. 10.4-7 (2015)

##### [その他]

システム神経回路研究チーム HP  
[http://www.nirs.qst.go.jp/seika/brain/team/system\\_09.html](http://www.nirs.qst.go.jp/seika/brain/team/system_09.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

南本 敬史 (Minamimoto, Takafumi)  
量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・脳機能イメージング研究部・チームリーダー

研究者番号：50506813

(3)連携研究者

永井 裕司 (NAGAI, Yuji)

量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・脳機能イメージング研究部・研究員

研究者番号：20415409

季 斌 (JI, Bin)

量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・脳機能イメージング研究部・主任研究員

研究者番号：80392223

(4)研究協力者

菊池 瑛理佳 (KIKUCHI, Erika)