

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19785

研究課題名(和文) セクレターゼを標的とした新規核医学分子イメージングプローブの開発

研究課題名(英文) Development of novel probes for in vivo imaging of β -secretase activity in the brain

研究代表者

渡邊 裕之 (Watanabe, Hiroyuki)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：40710786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アルツハイマー病発症の最初期過程に上昇するセクレターゼ活性を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発を目的とし、セクレターゼ活性により切断されるペプチド配列および膜透過ペプチドを導入した $[^{125}\text{I}]\text{PSCP}$ を設計し、その有用性を検討した。その結果、インビトロにおいて $[^{125}\text{I}]\text{PSCP}$ はセクレターゼによって経時的に切断されることが示された。正常マウスにおける体内放射能分布実験において、膜透過ペプチド導入による脳移行性の改善が示唆された。以上より、 $[^{125}\text{I}]\text{PSCP}$ はセクレターゼ活性を標的とした核医学分子イメージングプローブとして基礎的性質を有することが示された。

研究成果の概要(英文)：The deposition of amyloid (A β) aggregates is the key neurodegenerative event of Alzheimer's disease (AD). The cleavage of amyloid precursor protein (APP) by β -secretase is the first step of A β formation. Therefore, in vivo imaging of β -secretase activity would be useful for the diagnosis of AD. The aim of this study is to develop novel probes for in vivo imaging of β -secretase activity in the brain. We designed and synthesized $[^{125}\text{I}]\text{PSCP}$ based on the strategy of metabolic trapping. In vitro cleavage assay, $[^{125}\text{I}]\text{PSCP}$ was cleaved by β -secretase in a time dependent manner. In order to evaluate brain uptake of $[^{125}\text{I}]\text{PSCP}$, in vivo biodistribution study using normal mice was performed. $[^{125}\text{I}]\text{PSCP}$ showed higher brain uptake compared with $[^{125}\text{I}]\text{SCP}$, which has no cell penetrating peptide. These results suggest that $[^{125}\text{I}]\text{PSCP}$ has a potential as a probe for imaging β -secretase activity in the brain.

研究分野：分子イメージング

キーワード：セクレターゼ アルツハイマー イメージング SPECT

1. 研究開始当初の背景

急速に進行する高齢化社会において、認知症患者の増加は大きな社会問題となっている。なかでもアルツハイマー病(AD)は、認知症の中で最も大きな割合を占めているものの、現在までに早期診断・治療に有効な手法が開発されていない、アンメットメディカルニーズの高い疾患のひとつとされている。ADは、軽度認知障害の段階で、記憶・認知機能の低下などの臨床症状や脳萎縮が認められはじめる。しかしながら、ADの脳内における特徴的病理学的変化である老人斑および神経原線維変化の蓄積は、認知機能が正常な段階から認められ、臨床症状が現れた時点では、ほぼ一定に達していることが知られている。なかでも老人斑の沈着は、AD発症過程の最も初期段階よりはじまり、疾患特異性が高い。そのため、老人斑の主構成成分であるβアミロイドタンパク質(Aβ)凝集体は、ADの治療・診断法の開発において重要な標的分子と考えられる。

ポジトロン断層撮像法(PET)もしくはシングルフォトン断層撮像法(SPECT)を用いて体内の標的分子を画像化する核医学分子イメージング法は、非侵襲的かつ高感度・高精度な診断法である。そのため、ADの早期診断を目的としてAβ凝集体を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発研究が行われ、そのうちいくつかは臨床において使用されている。しかしながら近年の研究において、脳内に沈着した老人斑を除去しても患者の臨床症状の改善が見られないことや、ADの臨床症状が現れた時点では老人斑の蓄積がほぼプラトーに達していることが報告されている。そのため、老人斑が沈着する以前、すなわちAβが凝集する初期過程においてADの診断・治療を行うことがその症状改善に有効であると考えられる。そこで、本研究ではAD脳内における病変を早期にとらえることができる核医学分子イメージングプローブの開発が必要であると考えた。

2. 研究の目的

老人斑の沈着は、アミロイド前駆タンパク質が、βおよびγセクレターゼによって凝集性および毒性の高いAβ(1-40)、Aβ(1-42)として切り出されることで始まる。正常な脳内においては、アミロイド前駆タンパク質は、αセクレターゼによって切断され、その後γセクレターゼによって切り出されるため、Aβ(1-40)およびAβ(1-42)の産生は少ない。しかしながら、AD患者脳内においては、αセクレターゼの活性が減少するとともに、βセクレターゼの発現および活性が上昇するため、Aβ(1-40)およびAβ(1-42)の産生が増加する。そのため、βセクレターゼは、ADの根本治療に有効な標的と考えられており、世界では治療薬の開発が盛んに行われ、そのいくつかは臨床試験が行われている。しかしながら、これらの臨床試験の多くにおいてAD治療に顕著な有効性

を示す結果が得られておらず、その一因として、βセクレターゼの発現および活性を生体内で評価する有効な手段がないため、治療薬を適切な時期に投与できていないことが挙げられる。βセクレターゼの活性を体外から非侵襲的かつ鋭敏に画像化できれば、ADの超早期診断のみならず、これらの治療薬の投与時期の決定やその治療効果判定を行う上でも非常に有効であると考えられることから、βセクレターゼ活性を生体内で検出できる新規核医学分子イメージングプローブを開発することとした。

3. 研究の方法

本研究では、βセクレターゼによって切断されたプローブが脳内に滞留する代謝捕捉の概念に基づいたプローブ設計を行う(Figure 1)。

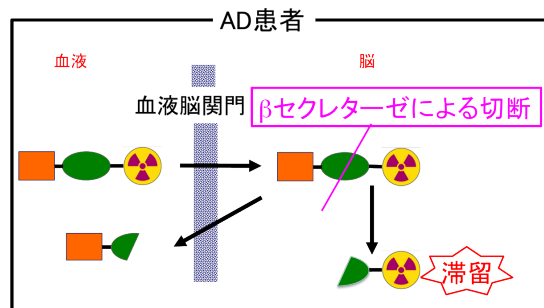


Figure 1. プローブ設計の概念図

このプローブの開発を行うにあたって、
 (a) 投与後早期に脳内へ移行すること
 (b) βセクレターゼによって迅速に切断されること
 (c) 切断されたプローブが脳内に滞留し、切断されなかったプローブは脳内から速やかにクリアランスされること
 が求められる。そのため、脳移行性向上ユニット、βセクレターゼ活性認識ユニット、放射性核種導入ユニットの3ユニットに分割して分子設計(Figure 2)を行い、以下に示す検討を実施した。

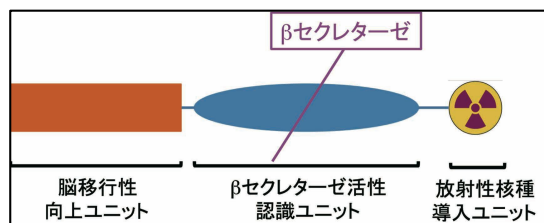


Figure 2. βセクレターゼを標的とした代謝捕捉型プローブの設計概念

1) 分子の設計・合成

脳移行性向上ユニットとしては、脳移行性および速やかな脳からの消失を示すことが

報告されている膜透過配列である Penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK)を、また、 β セクレターゼ活性認識ユニットとしては、 β セクレターゼによって L と D の間が切断される EVNLD AEF を、標識ユニットとしては位置選択的な標識のために、活性認識ユニットの C 末端に Cys 残基を導入し、放射性ヨウ素標識試薬として *N*-(*m*-iodophenyl)maleimide (IPM)を用いた ^{125}I PSCP を設計した。また比較対象として、脳移行性向上ユニットを有さない ^{125}I SCP をあわせて設計した。

これらの化合物は、スズ前駆体を用いたスズ-ヨウ素交換反応によって得た ^{125}I IPM のアセトニトリル溶液を、PBS に溶解した PSCP もしくは SCP と室温下 2 時間反応させ、逆相 HPLC を用いて精製することで得た。

2) インビトロにおける β セクレターゼ活性認識評価

^{125}I SCP もしくは ^{125}I PSCP (1 μCi , 10 μL)、 β セクレターゼ (5 U/mL, 10 μL)を 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5, 10 μL)に加えた。室温で 30 および 60 分間インキュベート後、2.5M sodium acetate buffer (10 μL)を加え酵素を失活させ、アッセイ溶液を逆相 HPLC を用いて分析することで、各時間におけるそれぞれのプローブの切断割合を算出した。

3) 脳内滞留性評価

市販の BBB キット(ファーマコセル社)を用いて検討を行った。具体的には、24 ウェルプレートとインサートでアストロサイト、ペリサイト、内皮細胞を培養した。培養液をアッセイバッファーに置換後、プレートウェル内(脳側)に ^{125}I 標識体(300000 cpm/well)を添加し 37°C で 30 分間インキュベートした。その後インサート内側(血管腔側)の溶液を回収し、放射能測定することで、脳実質から血液への化合物の透過性、すなわち脳内における滞留性を評価した。

4) 体内放射能分布実験

^{125}I SCP および ^{125}I PSCP を生理食塩水で希釈し、5 週齢の ddY 雄性マウス(1 群 5 匹)に 100 μL ずつ尾静脈より投与した。投与後 2, 10, 30, 60 および 120 分に屠殺、各臓器を摘出し重量と放射能を測定し、組織 1 g 当たりの投与量に対する割合 %ID/g (%injected dose/g)として算出した。

4. 研究成果

1) ^{125}I PSCP および ^{125}I SCP の合成

放射化学的収率 18%および 25%、放射化学的純度 99%以上で ^{125}I PSCP および ^{125}I SCP を得た。

2) インビトロにおける β セクレターゼ活性

認識評価

^{125}I PSCP および ^{125}I SCP は β セクレターゼ存在下において経時的に切断された一方 (Table 1)、 β セクレターゼ非存在下においては安定に存在した。 ^{125}I PSCP の切断割合は ^{125}I SCP に比べて低下したことから、脳移行性向上ユニットである penetratin の導入による立体障害の影響により、プローブが β セクレターゼによって切断されにくくなっていることが示唆された。

Table 1. ^{125}I PSCP および ^{125}I SCP の β セクレターゼによる切断割合

	30 min	60 min
^{125}I PSCP	32.3 \pm 7.9%	38.8 \pm 3.9%
^{125}I SCP	61.0 \pm 0.9%	76.0 \pm 0.6%

さらに β セクレターゼによる切断が当初の分子設計において想定した部位で行われているかの確認を行った。その結果、切断後に生じると予測される DAEEFGC-IPM の保持時間が、PSCP および SCP と β セクレターゼをインキュベートした後に新たに生じたピークと一致することが確認でき、予測した部位で β セクレターゼによる切断が行われていることが示唆された。

3) 脳内滞留性評価

切断後に生成する DAEEFGC- ^{125}I IPM の透過性を示す指標である Papp の値は 2.43 \pm 0.76 であった。一般的に高い透過性を示す化合物の値は 20 以上とされており、切断後の断片は、分子設計通り、脳内において滞留性をすることが示唆された。

4) 体内放射能分布実験

正常マウスを用いた体内放射能分布実験の結果、投与後の 2, 10, 30, 60 および 120 分のいずれにおいても、 ^{125}I PSCP は ^{125}I SCP に比べて有意に高い脳移行性を示した一方で脳からの経時的な消失も認められた (Figure 3)。正常マウスにおいては β セクレターゼ活性が認められるもののその活性は AD モデルマウスに比べ低いことが報告されていることから、AD モデルにおける脳内滞留性に関する検討が必要であることが示唆された。また、以上の結果より膜透過配列である penetratin を導入することにより脳移行性が改善していることが示された。

血液においては、 ^{125}I PSCP は ^{125}I SCP は各タイムポイントにおいて同程度の値を示した一方、肺、肝臓においては、 ^{125}I PSCP は ^{125}I SCP に比べて高い取り込みを示しており、この体内動態の改善も、脳移行性の向上につながる可能性が示唆された。

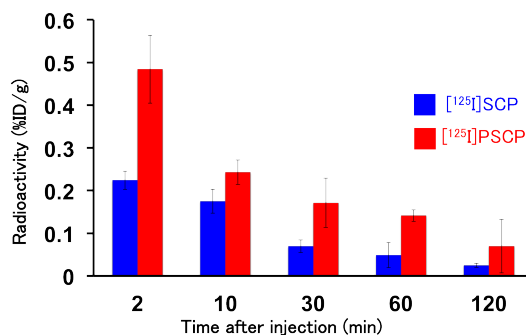


Figure 3. 正常マウスにおける脳内放射能挙動

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

川崎 梓、渡邊 裕之、小野 正博、佐治 英郎、脳βセクレターゼの酵素活性の核医学イメージングを目的とした新規 SPECT 用プローブの開発、第 56 回日本核医学会、2016 年 11 月 3 日～11 月 5 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

渡邊 裕之、川崎 梓、小野 正博、佐治 英郎、βセクレターゼの酵素活性を標的とした新規放射性ヨウ素標識プローブの開発、第 11 回日本分子イメージング学会、2016 年 5 月 28 日、29 日、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

渡邊 裕之、アルツハイマー病の早期診断および治療薬開発のための分子イメージングプローブの開発、第 136 年会日本薬学会、2016 年 3 月 27～29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

渡邊 裕之、アルツハイマー病の診断・治療のための核医学分子イメージングプローブの開発、第 28 回バイオメディカル分析化学シンポジウム、2015 年 8 月 21 日、22 日、長崎大学 (長崎県長崎市)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 裕之 (WATANABE HIROYUKI)
 京都大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：40710786

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし