

令和元年5月31日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19870

研究課題名(和文) グルタミン酸受容体を標的としたPETプローブの薬理的応用研究

研究課題名(英文) Pharmacological application study using PET probe targeting for glutamate receptors

研究代表者

山崎 友照 (Yamasaki, Tomoteru)

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 標識薬剤開発部・研究員(定常)

研究者番号：80627563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グルタミン酸受容体(主にmGluR1)を標的としたPETプローブの薬理的応用研究として、てんかんモデル及びグルタミン酸高濃度モデルを用いて、PETイメージングを行った。

てんかんラットを用いた研究では、グルタミン酸神経回路に沿って神経炎症が起こり、それに付随して、^[11C]ITDM (mGluR1のPETプローブ)の特異結合量が減少することを見出した。また、グルタミン酸高濃度モデルを用いた研究では、細胞外グルタミン酸の濃度に依存して^[11C]ITDMの特異結合量が増加することを示した。これらの結果は、mGluR1が神経毒性と神経保護の両側面に関与していることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、mGluR1が神経炎症時に発現量が減少すること、一方で、細胞外グルタミン酸濃度の上昇した場合には発現量が上昇することをPETイメージングにより明らかにした。これらの研究成果は、mGluR1が神経炎症または未病段階での細胞外グルタミン酸の上昇を検知できるバイオマーカーとして有用であることを示した。そのため、mGluR1を標的としたPETイメージングは、グルタミン酸神経毒性が関与する疾患の早期診断や治療薬開発に大きく貢献できると考えられ、今後の更なる研究への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, PET imaging for mGluR1 was conducted using animal model with epilepsy or chronic high glutamate release as a one of pharmacological applications.

In PET study with epilepsy model, it was found out that decline of specific bindings of ^[11C]ITDM, a selective PET probe for mGluR1, accompanied with neuroinflammation occurred on glutamatergic neural circuit. In case of PET study with chronic high glutamate release model, it was indicated that specific bindings of ^[11C]ITDM increased depending on basal glutamate concentrations.

These results suggest that the mGluR1 is involved in both of neuroexcitotoxicity and neuronal protection.

研究分野：核医学

キーワード：PET mGluR1 てんかん グルタミン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸が惹起する興奮性の神経伝達は、脳高次機能の発現に大きな役割を果たしている。反面、その強い興奮作用は、神経毒性を発揮することも知られている。グルタミン酸系神経伝達を介している数ある受容体の中でも、代謝型グルタミン酸受容体1 (mGluR1) は、Gq たんぱくと共役して機能する受容体で、小胞体の貯蔵カルシウムイオンの放出を促進するため、過剰な活性化は、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させ、その結果、様々なリン酸化酵素の活性化を誘導する。そのため、細胞内シグナル伝達の過剰な刺激がおこり、神経毒性が誘発される。このような背景から、mGluR1 は、神経毒性に起因する脳疾患の治療薬開発の標的分子として注目されている。

陽電子放出断層撮影法 (Positron emission tomography: PET) とは、¹⁸F や ¹¹C 等のガンマ線を放出する放射性同位元素で標識したプローブ (PET プローブ) を生体内に投与することで、特定の分子の動きや機能を生きたままの状態画像化できる先進の技術であり、様々な分子を標的としたイメージングが可能である。近年、我々の研究グループでは、mGluR1 に選択的に結合することの出来る PET プローブを多数開発し、mGluR1 が様々な疾患において重要な役割を果たしていることを PET イメージング研究により示してきた。しかしながら、グルタミン酸の神経毒性が起こる過程において、mGluR1 がどのような役割を果たしているのかは、十分に解明されていなかった。

2. 研究の目的

(1) グルタミン酸過剰放出による急性神経毒性のモデルとして、てんかん発作を誘導したラットを用いて、病的なグルタミン酸放出とそれに付随した神経炎症における mGluR1 の経時的変化を PET イメージングにより調査する。

(2) 神経毒性 (神経炎症) の起こらない程度 (未病) のグルタミン酸高濃度状態にしたモデル動物を用いて、mGluR1 の変化を PET イメージングによりモニタリングし、mGluR1 の神経保護に対する役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) てんかんモデル動物を用いた PET イメージング

急性のてんかん発作モデル (PISE モデル) は、リチウムクロライド (127 mg/kg) をあらかじめ腹腔内に投与されたラットに、ピロカルピンをてんかん発作が誘発されるまで腹腔内に投与し、作成した。発作開始から 60 分後にジアゼパムを投与し、発作を鎮静化した。鎮静後 1 日目のラットを急性期とし、1 週間後を亜急性期、3 週間後を慢性期とし、PET イメージングを行った。PET イメージングは、mGluR1 に選択的な PET プローブである [¹¹C]ITDM と神経の炎症マーカーである TSPO に選択的な PET プローブである [¹¹C]DAC を用いて、それぞれ行った。

(2) グルタミン酸神経毒性未病モデル動物を用いた PET イメージング

慢性的なグルタミン酸高濃度モデル動物を作成するために、ラットの腹腔内にシステイングルタミン酸アンチポーター賦活剤である N-アセチル-L-システイン (NAC) 溶液 (2 mg/mL) を注入した Alzet[®] 浸透圧ポンプ (Alz ポンプ) を留置し、12 mg/day の流速で NAC を 14 日間連続投与した。mGluR1 を標的とした PET イメージングは、[¹¹C]ITDM を用いて、Alzet[®] 浸透圧ポンプ移植の術後 1、3、7、10、14 日で行った。また、脳内のグルタミン酸濃度は、マイクロダイアリシス法を用いて、術前及び術後 1、7、10 日で測定した。

4. 研究成果

(1) てんかん発作に起因する神経炎症に付随した mGluR1 発現量の減少

PISE ラット脳内の PET イメージングの結果を図 1 及び図 2 に示す。mGluR1 に選択的な [¹¹C]ITDM を用いた PET イメージングでは、発作 1 日後 (SE1D: 急性期) の PISE ラットにおいて、小脳前部の特異結合量 (BP_{ND}) の一時的な減少を示したが、その後正常レベルにまで回復した。一方、視床や海馬の BP_{ND} は、急性期においては変化が見られなかったが、発作 1 週間後 (SE1W: 亜急性期) から低下が見られ始め、発作 3 週間後

(SE3W: 慢性期) で、さらに減少した (図 1)。

炎症マーカーである TSPO を標的とした [¹¹C]DAC を用いた PET イメージングでは、急性期においては、放射能集積が殆ど見られなかったが、亜急性期で、大脳皮質、海馬、視床、扁桃

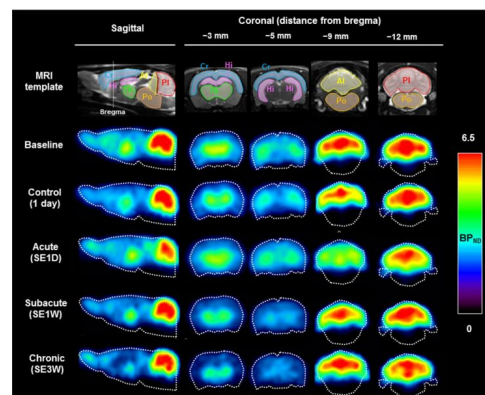


図 1. てんかん発作後のラット脳における mGluR1 ([¹¹C]ITDM) を標的とした PET イメージ。急性期: 発作後 1 日 (SE1D)、亜急性期: 発作後 1 週間 (SE1W)、慢性期: 発作後 3 週間 (SE3W)。Ci: 帯状回、Hi: 海馬、Th: 視床、Al: 小脳前部、Pl: 小脳後部。

において、比較的高い放射能集積が見られ、慢性期では、さらに高い放射能集積を示した(図2)。この結果から、神経炎症は、グルタミン酸神経回路に沿って、発作後1週間ごろから起こり始め、発作後3週間にかけて拡大することが示唆された。

最後に、mGluR1 に対する ^{11}C]ITDM の特異結合と、TSPO に対する ^{11}C]DAC の放射能集積の相関性を確かめたところ、図3に示すように、視床、線条体、海馬において、極めて高い相関($r > 0.9$)を示した。

本研究を通じて、てんかん発作は、グルタミン酸神経回路において、神経炎症を引き起こし、その結果、グルタミン酸神経上の mGluR1 の発現量を低下させることを明らかにした。

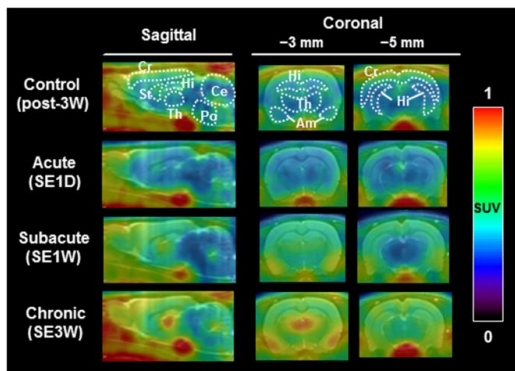


図2. てんかん発作後のラット脳におけるTSPO (^{11}C]DAC)を標的としたPETイメージ。急性期:発作後1日(SE1D)、亜急性期:発作後1週間(SE1W)、慢性期:発作後3週間(SE3W)。Cr:大脳皮質、St:線条体、Hi:海馬、Th:視床、Am:扁桃体、Po:橋。

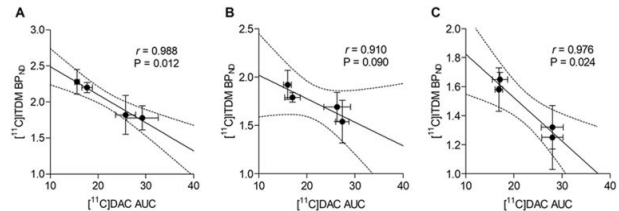


図3. ^{11}C]ITDM の特異結合指数 (BP_{ND}) と ^{11}C]DAC の放射能集積 (AUC: area under the curve) の相関。A: 視床、B: 線条体、C: 海馬。

(2) グルタミン酸過剰放出が誘導する mGluR1 発現量の増加

Alz ポンプ(生食群及び NAC 群)を移植したラット脳内の細胞外グルタミン酸濃度の推移を図4に示す。Alz ポンプ移植後1日目において、生食群、NAC 群共に、細胞外グルタミン酸濃度の上昇が見られたが、生食群においては、移植後7日目までに正常レベルに回復していた。このことにより、移植後1日目の一時的なグルタミン酸濃度の上昇は、Alz ポンプ移植の際の開腹手術部位周辺の術後痛が要因であると考えられた。一方で、NAC 群では、移植後7日目において、術後1日目よりも高いグルタミン酸濃度を示し、術後14日まで比較的高い濃度で維持されていた。これらの結果から、NAC の持続投与により、術後7日目あたりをピークに脳内は慢性的なグルタミン酸高濃度状態であることが示唆された。

次に、mGluR1 に選択的な ^{11}C]ITDM を用いたPETイメージングの結果を図5に示す。図4に示したマイクロダイアリシス法による脳内のグルタミン酸濃度の結果と同様に、 ^{11}C]ITDM の結合能 (BP_{ND}) においても、移植1日目で、生食群、NAC 群共に10~20%程度 BP_{ND} が上昇した。生食群において、これらの増加は、投与後3日目には正常値付近まで減少し、移植後14日目まで正常レベルを維持していた。一方で、NAC 群においては、生食群と同様に、移植後1日目の一過性の BP_{ND} 値の上昇を示した後、3日目において減少傾向を示したものの、7日目まで高い BP_{ND} 値が保持されていた。

最後に、マイクロダイアリシス法で得た脳内のグルタミン酸濃度と ^{11}C]ITDM-PET の BP_{ND} 値の相関を確認したところ、図6に示すように、比較的高い相関($r = 0.559$)を示した。この結果から、グルタミン酸の細胞外濃度が高くなると mGluR1 の発現量が上昇することが示唆された。このことは、mGluR1 の発現量の上昇がグルタミン酸神経毒性に深く関わっていることが推測され、また、mGluR1 の活性化は、副産物であるエンドカンナビノイドによる逆行性のシナプス抑制も惹起するため、神経保護の役割も担っていることも示唆された。

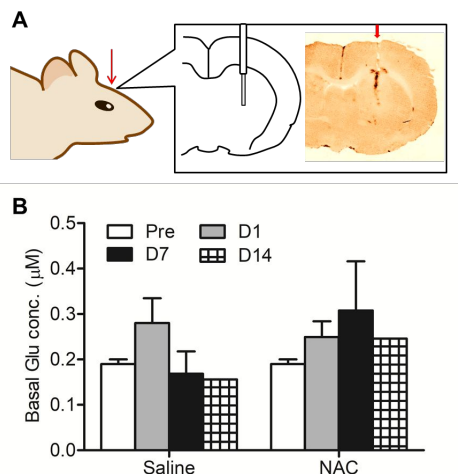


図4. マイクロダイアリシス法による脳内グルタミン酸濃度の測定。A: プローブの挿入位置(Bregma から-0.2mm) B: 細胞外グルタミン酸濃度

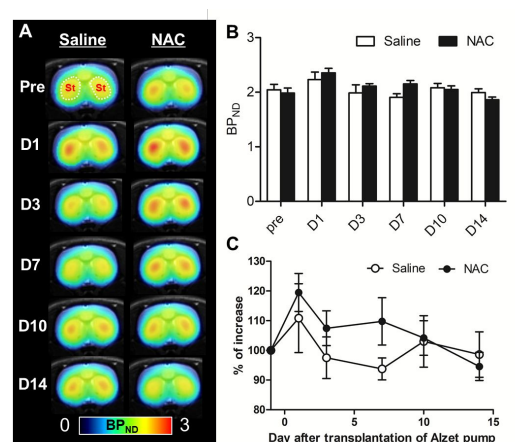


図5. Alz ポンプ移植ラット脳における ^{11}C]ITDM-PETイメージング。A: パラメトリックPETイメージ、B: 線条体における BP_{ND} 値、C: 生食群、NAC 群における BP_{ND} の上昇率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamasaki T, Mori W, Zhang Y, Hatori A, Fujinaga M, Wakizaka H, Kurihara Y, Wang L, Nengaki N, Ohya T, Liang SH, Zhang MR. First demonstration of in vivo mapping for regional brain monoacylglycerol lipase using PET with [¹¹C]SAR127303. *Neuroimage*, 査読有, Vol. 1, No. 176, 2018, pp. 313–320.

Yamasaki T, Fujinaga M, Mori W, Zhang Y, Wakizaka H, Nengaki N, Xie L, Hatori A, Zhang MR. In Vivo Monitoring for Regional Changes of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1 (mGluR1) in Pilocarpine-Induced Epileptic Rat Brain by Small-Animal PET. *Scientific Reports*, 査読有, Vol. 7, No. 1, 2017, pp. 14945.

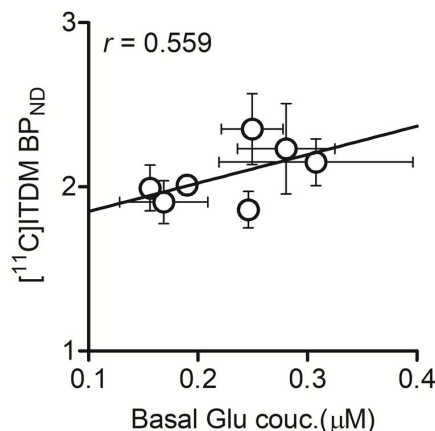


図 6. 細胞外グルタミン酸濃度と [¹¹C]ITDM の結合能 (BP_{ND}) の相関

〔学会発表〕(計 4 件)

山崎友照, 大矢智之, 森若菜, 張一鼎, 脇坂秀克, 小川政直, 張明榮. Quantitative analysis for fatty acid amide hydrolase (FAAH) using PET with [¹¹C]DFMC. 第 58 回日本核医学会学会学術総会, 2018-11-16, 沖縄.

Yamasaki T, Mori W, Zhang Y, Hatori A, Kurihara Y, Ogawa M, Nengaki N, Wakizaka H, Fujinaga M, Wang L, Liang H, Zhang MR. In vivo mapping for monoacylglycerol lipase activity using PET with [¹¹C]SAR127303. 12th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology. 2018-04-23, Melbourne, Australia.

山崎友照, 森若菜, 張一鼎, 脇坂秀克, 藤永雅之, 栗原雄祐, 念垣信樹, 張明榮. [¹¹C]SAR127303 を用いたモノアシルグリセロールリパーゼ (MAGL) PET 定量解析. 第 57 回日本核医学会学術総会, 2017-10-17, 横浜.

山崎友照, 由井讓二, 藤永雅之, 脇坂秀克, 森若菜, 下田陽子, 栗原雄祐, 張明榮. てんかんモデルラットにおける代謝型グルタミン酸受容体 1 を標的とした PET イメージング. 第 56 回日本核医学会学術総会, 2016-11-05, 名古屋.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。