

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10387

研究課題名(和文) P2X7およびP2Y12受容体PETリガンドによるミクログリア機能の画像化

研究課題名(英文) Imaging of microglial functions by P2X7 and P2Y12 receptor PET ligands

研究代表者

前田 純 (Maeda, Jun)

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・主任研究員
(任常)

研究者番号：30415426

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)：脳内ミクログリア細胞機能の生体画像化を目的に、プリンP2X7受容体(R)リガンド[11C]JNJ42253432およびP2Y12Rリガンド[11C]AZD1283の標識合成を行い、小動物PETおよびオートラジオグラフィ(ARG)で結合特性評価を行った。[11C]JNJ42253432は小動物PETおよびARG共にコールド体による結合阻害は見られなかった。一方、[11C]AZD1283 PETでは脳内への移行性が低くP2Y12Rは検出できなかったが、ARGでは特異結合が確認できた。これら結果から[11C]AZD1283はin vitroのP2Y12R定量に有用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内の免疫および老廃物の搬出を司るミクログリア細胞は認知症および多発性硬化症の発症に重要な役割を果たしている。ミクログリア細胞に発現するプリン受容体は内在性のATP等の刺激によりミクログリア細胞の遊走、形状変化、貪食および炎症性サイトカインの放出を誘導する。このことからプリン受容体に結合する放射性化合物を開発することにより、脳機能の解明や神経炎症病態の解明につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to image the microglial functions, a purinergic P2X7 receptor (R) ligand [11C]JNJ42253432 and P2Y12R ligand [11C]AZD1283 were radiosynthesized, and the binding characterization of these ligands were determined by small animal PET and autoradiography. The binding of [11C]JNJ42253432 was unchanged by cold ligand in the PET and autoradiography studies. The [11C]AZD1283 was unable to detect P2Y12Rs by PET due to low brain permeability, while the P2Y12R specific bindings were confirmed by ARG. These results have suggested [11C]AZD1283 is beneficial for the quantitation of P2Y12R on the microglia.

研究分野：中枢神経薬理

キーワード：陽電子断層撮像法 プリン受容体 神経炎症 認知症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

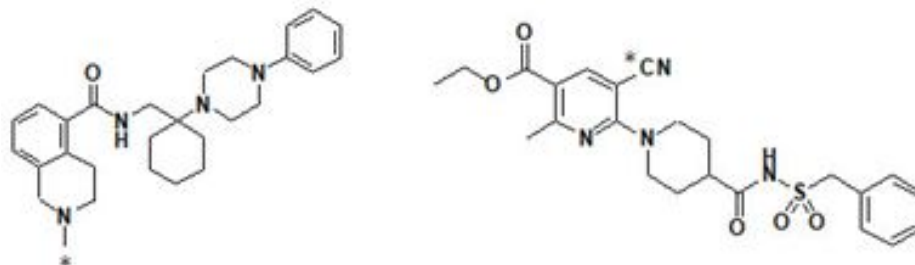
アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症などの神経変性疾患では、障害部位においてミクログリアが集積、増殖する。この際に恒常型ミクログリアは形状を変化して活性化ミクログリアとなる。活性化ミクログリアには神経障害的な M1 型、神経保護的な M2 型および機能不明の棹状型の 3 種類が知られているが、この変化に伴いミクログリアが発現するマーカータンパク質が著しく変化する。特にプリン体の ADP により作動する代謝調節型 P2Y₁₂ 受容体は恒常的ミクログリアに高レベルで発現し、ミクログリア遊走および突起の伸展に関与している。一方で M1 型ミクログリアでは P2Y₁₂ 受容体の膜状への発現が低下する。また ATP により開口するイオンチャネル型 P2X₇ 受容体はミクログリアからのサイトカイン放出に関与しており、M1 型のミクログリアに発現すると考えられた。従ってこれらの受容体に結合する低分子リガンドを開発し、これを用いた生体イメージングにより、活性化グリアの表現型の多様性、病態特異性、ステージ特異性および部位特異性を明らかにできる可能性があった。

2. 研究の目的

アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患で活性化するミクログリアの機能的表現型(攻撃型、防御型など)を生体内でモニタリングすることを目的とする。ミクログリア細胞表面に発現する P2X₇ 受容体ならびに P2Y₁₂ 受容体を、ポジトロン断層撮像(PET)で画像化するための放射性リガンドを開発し、各種神経変性疾患動物モデルに適用することで有用性およびヒトへの応用の可能性を検討する。

3. 研究の方法

P2X₇ 受容体拮抗薬 JNJ42253432 および P2Y₁₂ 受容体拮抗薬 AZD1283 の前駆体を合成し、ポジトロン標識合成法の検討を行った。ポジトロン標識した JNJ42253432 (図 1 左) および AZD1283 (図 1 右) を、認知症モデルマウスを含む神経傷害モデル動物の尾静脈から投与を行い、神経炎症部位で標識薬剤の集積に変化が認められるか否かを小動物用陽電子断層撮像(PET)カメラにて検討する。次にオートラジオグラフィー(ARG)法にてこれらのリガンドの結合の有無を確認し、さらに神経障害モデルの脳切片において受容体結合の変化を評価する。これらの画像所見の検証目的に、スキャンを終えた動物の脳組織を摘出し、それぞれの受容体に特異的な抗体を用いた免疫組織化学染色を実施する。



(図 1) [¹¹C]JNJ42253432 (左) および [¹¹C]AZD1283 (右) の構造式 (*は標識箇所)。

4. 研究成果

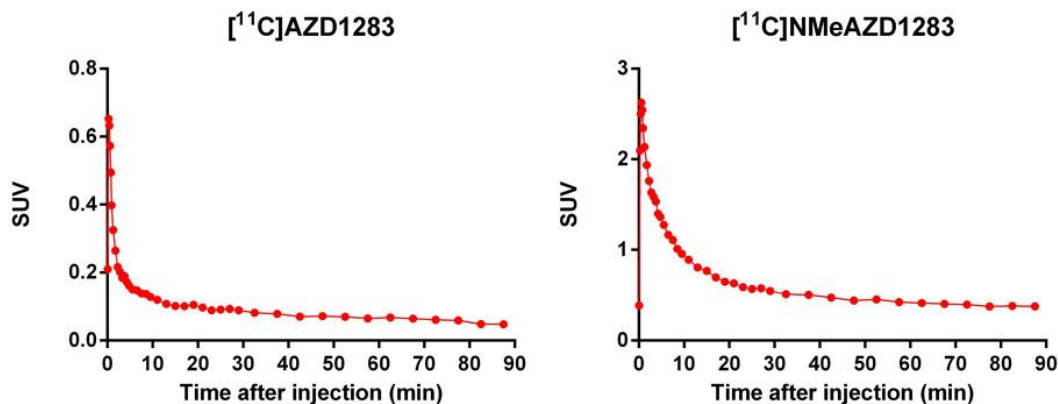
(1) P2X₇ 受容体リガンド [¹¹C]JNJ42253432 の動態特性評価

SD 系雄性ラットを対象にピロカルピン誘発てんかんモデルおよび大腸菌由来リポポリ多糖(LPS)線条体片測注入モデルを作製し、イソフルラン麻酔下 [¹¹C]JNJ42253432 を尾静脈投与し小動物 PET で頭部の撮像を 90 分行った。 [¹¹C]JNJ42253432 は脳内への移行が認められ、ピロカルピンてんかんモデルの扁桃核および LPS を注入した線条体における集積の増加が認められた。 P2X₇ 受容体抗体による免疫染色を行ったところ、ピロカルピンてんかんモデルの扁桃核および LPS 注入部位で P2X₇ 受容体の発現が増加していた。また、ミクログリア細胞のマーカー Iba-1 抗体、アストロサイトのマーカーの GFAP および神経核のマーカーの NeuN と P2X₇ 受容体抗体との共染色をおこなったところ、ピロカルピンてんかんおよび LPS 注入モデル双方で P2X₇ 受容体がミクログリア特異的に増加していることが確認された。一方ピロカルピンてんかんモデルにおける [¹¹C]JNJ42253432 の PET スキャンで、cold 体 1 mg/kg を撮像開始後 20 分に静脈投与したところ集積は阻害されずむしろ増加した。アカゲザルを対象とした PET スキャンにおいても cold 体の阻害は確認できず、 [¹¹C]JNJ42253432 が P2X₇ 受容体に特異的に結合する証拠は得られなかった。

(2) P2Y₁₂ 受容体リガンド [¹¹C]AZD1283 結合特性評価

SD ラットを対象に麻酔下 [¹¹C]AZD1283 を尾静脈投与し、頭部を小動物 PET で撮像したところ脳への移行性は非常に低かった(図 2 左)。従って in vivo において [¹¹C]AZD1283 により脳内 P2Y₁₂ 受容体を画像化することは困難と考えられた。一方脳切片を用いた in vitro ARG 法では P2Y₁₂

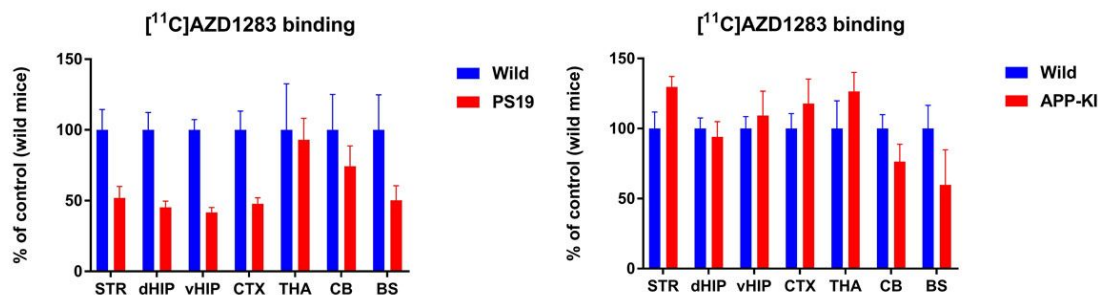
受容体への特異結合が確認され、脳移行性を向上すれば in vivo における P2Y12 受容体の画像化が可能と考えられた。そこで AZD1283 の 2 級アミンに ^{11}C CH₃ を導入した ^{11}C N-methyl-AZD1283 を合成し、 ^{11}C AZD1283 と同様の評価を行った。 ^{11}C N-methyl-AZD1283 は in vivo における脳内への移行性に改善が見られたものの (図 2 右) in vitro ARG では特異的な結合が確認できなかった。



(図 2) ^{11}C AZD1283 および ^{11}C N-methyl-AZD1283 の全脳における時間-放射能曲線

(3) 認知症モデルマウスの P2Y12 受容体密度の測定

P2Y12 受容体への特異結合が認められた ^{11}C AZD1283 を用い、数種類の認知症モデルマウスの脳切片を対象に P2Y12 受容体密度がどのように変化するか ARG 法にて評価を行った。家族性前頭側頭型認知症由来変異タウ遺伝子を組み込んだ PS19 マウス (11 月齢) では海馬の萎縮および脳幹における神経原繊維変化が認められるが、両部位の P2Y12 受容体密度は野生型に比べ有意に低下していた (図 3)。また、萎縮の見られない線条体および大脳皮質においても P2Y12 受容体密度は低下が見られたが、病理がないとされる小脳では密度に差は認められなかった (図 3)。一方、マウス アミロイド遺伝子を家族性アルツハイマー病由来変異アミロイド前駆タンパク (APP) 遺伝子に置き換えた APP ノックイン (APP-KI) マウス (13 月齢) では野生型マウスと比べいずれの部位において P2Y12 受容体密度に変化は見られなかった。APP-KI マウスでは成熟したアミロイドプラークが見られないため、同様の変異アミロイド遺伝子を組み込んだ APP23 マウス (>20 月齢) で定量するとプラーク周囲に P2Y12 受容体の増加が確認された。アルツハイマー病患者の死後脳では P2Y12 受容体の低下が認められるが、上記の結果から神経細胞内へのタウ蓄積およびそれに伴う細胞死が P2Y12 受容体の低下の引き金となっており、アミロイドの蓄積はミクログリア細胞の細胞障害性転換を誘発していないと考察した。



(図 3) PS19 マウスおよび APP-KI マウスの P2Y12 受容体密度変化

(4) ^{18}F JNJ64413739 の結合特性評価

P2X7 受容体リガンド ^{18}F JNJ64413739 を認知症モデルマウス rTg4510 マウスに投与し、小動物 PET にて集積の確認を行った。 ^{18}F JNJ64413739 は脳内への移行が低く、cold を前投与しても集積に変化は見られなかった。JNJ64413739 はヒト P2X7 受容体に比べマウス P2X7 受容体では親和性が低いとされ、種差による親和性の差が原因と考えられた。

< 引用文献 >

Haynes SE, Hoollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D, Nat Neurosci 9(12)、2006、1512-1519

Csölle C, Sperlagh B, J Neuroimmunol、219、2010、38-46

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naruhiko Sahara, Jun Maeda, Ai Ishikawa, Masaki Tokunaga, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi	4. 巻 64
2. 論文標題 Microglial Activation During Pathogenesis of Tauopathy in rTg4510 Mice: Implications for the Early Diagnosis of Tauopathy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 S353-S359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-179933	査読の有無 無
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 Ishikawa Ai, Tokunaga Masaki, Maeda Jun, Minamihisamatsu Takeharu, Shimojo Masafumi, Takuwa Hiroyuki, Ono Maiko, Ni Ruiqing, Hirano Shigeki, Kuwabara Satoshi, Ji Bin, Zhang Ming-Rong, Aoki Ichio, Suhara Tetsuya, Higuchi Makoto, Sahara Naruhiko	4. 巻 61
2. 論文標題 In Vivo Visualization of Tau Accumulation, Microglial Activation, and Brain Atrophy in a Mouse Model of Tauopathy rTg4510	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1037-1052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-170509	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 Masafumi Shimojo, Hiroyuki Takuwa, Yuhei Takado, Masaki Tokunaga, Satoshi Tsukamoto, Keiichiro Minatohara, Maiko Ono, Chie Seki, Jun Maeda, Takuya Urushihata, Takeharu Minamihisamatsu, Ichio Aoki, Kazunori Kawamura, Ming-Rong Zhang, Tetsuya Suhara, Naruhiko Sahara, Makoto Higuchi	4. 巻 40
2. 論文標題 Selective disruption of inhibitory synapses leading to neuronal hyperexcitability at an early stage of tau pathogenesis in a mouse model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3491-3501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2880-19.2020	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐原 成彦, 田桑 弘之, 高堂 裕平, 漆畑 拓弥, 下條 雅文, 高橋 真奈美, 小野 麻衣子, 木村 妙子, 関 千江, 前田 純, 季 斌, 富田 裕, 張 明栄, 須原 哲也, 樋口 真人
2. 発表標題 Microglia engulfment of tangle-bearing neurons in a living tauopathy model
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川 愛、徳永 正希、田桑 弘之、前田 純、平野 成樹、桑原 聡、須原 哲也、樋口 真人、佐原 成彦
2. 発表標題 モデルマウスにおけるタウ病態と炎症の経時PETおよび画像病理相關解析
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naruhiko Sahara , Jun Maeda , Ai Ishikawa , Maiko Ono , Hiroyuki Takuwa , Masafumi Shimojo , Takeharu Minamihisamatsu , Masaki Tokunaga , Shoko Uchida , Izumi Matsumoto , Ming-Rong Zhang , Tetsuya Suhara , Makoto Higuchi
2. 発表標題 Visualization of microglial response to tau-induced neurodegeneration in a model of tauopathy
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naruhiko Sahara , Jun Maeda , Takeharu Minamihisamatsu , Masafumi Shimojo , Maiko Ono , Keiichiro Minatohara , Hiroyuki Takuwa , Yuhei Takado , Bin Ji , Ming-Rong Zhang , Makoto Higuchi
2. 発表標題 Distinct microglial response against Alzheimer ' s pathologies characterized by P2Y12 receptor
3. 学会等名 Society for Neuroscience Annual meeting 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 前田 純、樋口 真人、須原 哲也	4. 発行年 2017年
2. 出版社 星和書店	5. 総ページ数 8
3. 書名 臨床精神薬理 第20巻9号 特集 向精神薬の多剤規制と減量・離脱の実際	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.nirs.qst.go.jp/seika/brain/index.html>
<http://www.nirs.qst.go.jp/seika/brain/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----