

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08139

研究課題名（和文）ミクログリアおよびその活動を画像化するPETトレーサーの開発

研究課題名（英文）Development of PET tracers for the imaging of microglial cells and their activities

研究代表者

加藤 孝一（KATO, KOICHI）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 ラジオアイソトープ管理室・室長

研究者番号：50382198

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では活性化ミクログリアの活動と、それに伴う神経構造の変化を画像化することが、神経変性疾患の進行・悪化の分子基盤の解明に寄与すると考え、ミクログリアに高発現するプリン受容体 P2X7R、およびミクログリアの活動により変化する髄鞘化に対するPETトレーサーの開発を行った。P2X7Rトレーサーの候補化合物に設計したピログルタミン酸アミド誘導体は、受容体への阻害活性を示さず目的を達成することが出来なかった。髄鞘化トレーサーとして設計したトリアゾール化合物は、髄鞘への特異性を評価することはできなかったが、アミロイド β への結合親和性を示すものが見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱髄により神経変性疾患が進行・悪化するため、髄鞘をPETで直接イメージすることは疾患の病理情報を提供し、鑑別診断を補助するものになる。Click2はアミロイド β に親和性を持たず、脂溶性と平面性を維持する化合物であるため、今後、髄鞘への特異性を確認していき、新しいPETトレーサー開発につなげる。また、Click1を含むいくつかのトリアゾール化合物はアミロイド β に結合する新しい基本骨格である。トリアゾール類は機能収束型の構造変換を行いやすい構造であり、今後、新奇な化学構造を持つアミロイド β イメージングトレーサーとして、ADの早期診断に資するバイオマーカーの開発研究へと展開することになった。

研究成果の概要（英文）：The PET imaging of morphological activation of microglia and regarding neuroanatomical changes provide pathological information to discriminate neurodegenerative diseases. Ionotropic purine receptor P2X7 are highly expressed in the activated microglial cells and pyroglutamic benzamides are known as the inhibitor of hP2X7R. In this study, pyroglutamic phenethylamides were synthesized for the PET tracers imaging P2X7R but these analogs did not show significant inhibitory effects for the P2X7R. There were 17 aminophenyl triazoles synthesized in this study and binding affinities for the amyloid proteins including basic myelin proteins, β -amyloid, phosphorylated tau of those analogs were investigated. We found several triazoles showed high affinity for the β -amyloid.

研究分野：放射線科学

キーワード：PET ミクログリア プリン受容体 ミエリン アミロイド

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において免疫応答の役割を担うミクログリアは、脳を守る神経保護性の働きをする一方で神経障害性の慢性的な炎症等を引き起こす作用を示すため、精神疾患、神経変性疾患等の病態に関与することが示唆されている。このようなミクログリアの免疫応答は、感染や脳損傷時にアメーバ状に変化した活性化型ミクログリアによってもたらされる。

活性化型ミクログリアに特異的に高発現する分子・構造情報を PET 等により非侵襲的に画像化すれば、脳内に生じた疾患に関連する所見が得られ、画像診断、治療効果の鑑別等が可能になる。また、ミクログリアの免疫応答により生じた神経およびその周辺の構造変化、タンパク質の変性を画像で捉えられれば、神経変性疾患等の病態の進行を経時的に把握することができる。

2. 研究の目的

研究代表者は活性化ミクログリアそのものと、その活動による神経周辺の構造の経時変化を多面的に画像化することができれば、その情報をもとにして神経変性疾患等が進行・悪化する分子基盤の解明に貢献すると考えている。また、PET は非侵襲的な手法であり、トレーサー分子の種類によって様々な分子・構造を標的にできることから、本研究課題の達成に最適な画像化法と言える。

本研究では活性化ミクログリアを画像化する新しい分子標的としてプリン受容体の P2X₇ 受容体を挙げ、また、活性化ミクログリアの活動により構造が変化する対象として軸索上のミエリンを標的とし、それぞれに特異的な新規 PET トレーサーを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ピログルタミン酸ベンジルアミド構造を基本骨格とする構造変換により P2X₇ の新規トレーサーの探索を行う。GSK 社はピログルタミン酸ベンジルアミド二化合物 (PGAA1 および PGAA2) の開発における構造活性相関から、P2X₇ への親和性に対して芳香環上のオルト位のクロロ基の重要性を記述していた。この報告から、研究代表者らはオルト置換基の立体的な影響による芳香環の空間的な配置、および芳香環上の電子密度への影響に注目し、この二点を中心に構造変換をすることで最適なトレーサーを造り出すことができるのではないかと考えた。そこで本研究では、ベンジル位のアルキル基の立体配置、芳香環上の置換基効果の構造活性相関を調べ、P2X₇ 受容体に対するピログルタミン酸アミド誘導体の最適化を行う。

本研究では、P2X₇ 受容体を発現した細胞に対するカルシウム蛍光アッセイによって阻害活性を測定し、活性が最適化された新規化合物を ¹¹C で標識する。続いて、標識体は上記と同様に脳炎モデルラットに対して PET を撮像してトレーサーとしての評価を行い、新規トレーサーを開発する。

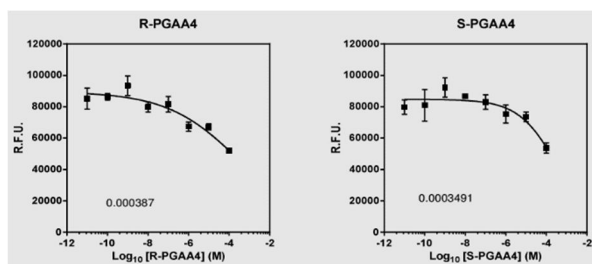
既存のトレーサーの中で最も特異的かつ定量的にミエリン化を画像化するものとして報告されている MeDAS は標識合成直後の分析において 10% 程度の放射性分解物を検出し、PET 画像も EAE モデルと Sham の間でミエリンの変化に有意差を認めなかった。応募者は MeDAS の放射線分解物が PET 画像の定量性に影響していると考え、MeDAS の安定化を試みることにした。具体的には、MeDAS のオレフィン部位を環状化合物に組み込むことで安定化を図る。環状化合物としては Sharpless らにより開発された Click Chemistry を利用することで簡便に合成できるトリアゾールを選択した。また、先行研究からミエリントレーサーにはジアミン構造を持つことが有望であることから、本研究では、アジドアニリンおよびアルキニルアニリン化合

物の組み合わせにより、ミエリンに特異的な化合物の最適化を行う。

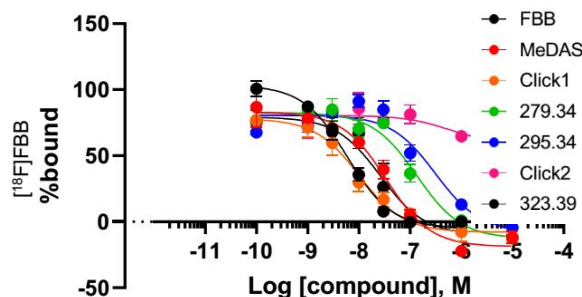
ミエリンへの特異性は MeDAS の UV 吸収を利用してアッセイを行うこととし、ショ糖の濃度勾配を用いて塩基性ミエリンタンパク質が高濃度になったホモジネートに対する阻害活性により検討し、続いて最適化した新規化合物を ^{11}C で標識する。 ^{11}C 標識体は、EAE モデルラットに対して PET を撮像しトレーサーとしての評価を行う。

4. 研究成果

ベンジル位のアルキル置換基としてメチル基の導入したピログルタミン酸フェネチルアミド化合物を設計した。フェニル基上の置換基効果を調べるため、*m*-CF₃置換体を PGAA3、無置換体を PGAA4 として合成し、カルシウム蛍光アッセイにより、P2X₇ に対する阻害活性を調べた。その結果、PGAA3 はアンタゴニストとして知られている PGAA1、および PGAA2 と比較すると活性は弱いものの、P2X₇ に対する阻害能を示すことが分かった。また無置換の PGAA4 は阻害活性を示さなかったことから、フェネチルアミド誘導体においてもフェニル基上の置換基効果が認められた。これらの結果をもとに、2,4-Cl および 2-Cl-3-CF₃ 誘導体の PGAA5 および PGAA6 を合成した。これらの誘導体は現在阻害活性を調べているところである。



Click1、Click2 およびその類縁体のミエリンへの結合活性は手法の確立が出来なかった。一方、それぞれのオフターゲットへの親和性を調べる目的で、アミロイド およびリン酸化tau への結合阻害実験を行った。その結果、Click1 はアミロイド に対して結合親和性を示すことが明らかになった。ビスア



ミノフェニルtriaゾールはアミロイド に結合を示す新しい分子骨格であり、今後新たなアミロイド PET トレーサーとして開発する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Shintani Y, Kato K, Kawami M, Takano M, Kumamoto T	4. 巻 69
2. 論文標題 Direct N1-selective alkylation of hydantoins using potassium bases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull	6. 最初と最後の頁 407-411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c20-00857	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	熊本 卓哉 (KUMAMOTO TAKUYA) (50292678)	広島大学・医系科学研究科(薬)・教授 (15401)	
研究分担者	原田 龍一 (HATADA RYUICHI) (60735455)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------