

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390349

研究課題名（和文） 超高磁場 MRI による脳アミロイドイメージングの開発

研究課題名（英文） Development of amyloid  $^{13}\text{C}$ -MR imaging of the brain at 7T

研究代表者

平井 俊範 (HIRAI TOSHINORI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：40274724

研究成果の概要（和文）：自然界に少ない炭素13をアミロイドプラークに結合する物質に組み込むことで、特異的な炭素13MRアミロイドイメージングが得られるのではないかと仮説で実験を行った。その結果、炭素13含有化合物の合成には成功したが、その溶解性が低かった。さまざまな工夫である程度溶解し、アルツハイマー病のトランスジェニックマウスに投与を行い、7T MRI 装置でマウス脳の炭素13MRI画像を取得した。そのMRI画像で脳内に炭素13化合物の存在が確認されたが、組織学的な検討と解離がみられた。今後更なる検討が必要と思われる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to explore the feasibility of carbon-13 ( $^{13}\text{C}$ ) magnetic resonance imaging ( $^{13}\text{C}$ -MRI) to depict  $^{13}\text{C}$ -labeled amyloid-binding materials in model mice for Alzheimer dementia at 7T. Although we succeeded in producing  $^{13}\text{C}$ -labeled amyloid-binding materials, water solubility of the materials was low. We tried to solve the materials. After administration of the materials to the model mice, C-13 MR imaging of the brain was performed. Although the area of high signal in the brain was observed, there were some discrepancies between the MR and histopathologic findings. Further investigation is needed to clarify the feasibility of  $^{13}\text{C}$ -MRI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	6,700,000	2,010,000	8,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：脳・神経、認知症、神経科学、MRI

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アミロイドイメージングは主に Positron Emission Tomography (PET) で行なわれているが、サイクロトロンが必要で施設が限られている。一方、MRI では最近 3T や 7T などの超高磁場装置が臨床に応用され、

S/N の向上やケミカルシフトの増加によりプロトン以外の核種における MR spectroscopy (MRS) の測定が可能になってきている。その核種としては炭素13 (C-13)、リン31 (P-31) などが知られており、これらの画像化による分子イメージングによる診断が期

待される。C-13 に関しては天然存在比が1%以下であり、C-13 置換化合物の投与により周囲との高いコントラストで標的構造の描出が可能と予想される。また C-13 などの安定同位体で合成した化合物は、核医学検査で使用される放射性同位体と異なり特殊な装置や機器がなくても長期保存が可能であること、放射性物質ではないため被曝がないこと、臨床用 MRI 装置でも画像化が期待できることが長所と思われる。

(2) 我々の教室では動物実験用 7T MRI 装置を用いて C-13 glucose 投与後のラット脳における C-13 chemical shift 画像の撮影に成功しており、動物を用いた方法論は確立している。また我々は glioma を移植したマウスに C-13 メチオニンを投与し、腫瘍に集積した C-13 メチオニンの超高磁場 MRI による画像取得にも成功している。最近、臨床用 3T MRI 装置で C-13 MRS が可能な頭部用コイルが開発され、人の脳におけるグルコース代謝を *in vivo* で観察することが可能になっている。今後超高磁場 MRI 装置による C-13 MR 画像の基礎的、臨床的研究が世界的に発展していくことが予想される。

(3) PET によるアミロイドイメージングはアルツハイマー病の早期診断に有用性が高いが、施設に限られているのが現状である。また、経済的にも高価な検査である。MRI では最近 3T や 7T などの超高磁場装置が臨床に応用されているが、C-13 MRS や C-13 MR 画像化が進めば、PET のようにアミロイドイメージングが可能ではないかと考えられる。最近アミロイド  $\beta$  ペプチドに特異的に結合し移行性が高い新規アミロイドイメージングプローブである「フラボン誘導体」が開発されたが、その化合物の MRI への応用は試みられていない。我々は glioma に集積した C-13 メチオニンの超高磁場 MRI による画像化に成功しているが、C-13 を組み込んだフラボン誘導体をアルツハイマー病のトランスジェニックマウスに投与することで、そのフラボン誘導体が脳アミロイド  $\beta$  ペプチドと結合し、超高磁場 MRI にて脳アミロイドを *in vivo* で画像化 (MRI によるアミロイドイメージング) することができるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病の脳アミロイド  $\beta$  ペプチドに特異的に結合する C-13 フラボン誘導体を合成し、アルツハイマー病のトランスジェニックマウスに投与することで、超高磁場 MRI を用い *in vivo* にて脳アミロイドの画像化を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) C-13 安定同位体をアミロイド  $\beta$  ペプチドに特異的に結合するフラボン誘導体に有機化学的手法で合成し、動物実験用 7T MRI 装置を用いてその合成した薬剤の MR スペクトル特性を確認する。

(2) C-13 安定同位体を有機合成した化合物の溶解性を調べ、溶解性が低い場合は様々な溶剤を用いて溶解を試行する。

(3) アルツハイマー病のトランスジェニックマウス (APP) に合成した C-13 フラボン誘導体を投与し、動物実験用 7T MRI 装置を用い形態画像と C-13 MR スペクトロスコピー、C-13 MR 画像を撮像する。その形態と機能を融合した画像を作成後、薬剤の局在や動態を画像解析する。

(4) 得られた動物標本を病理学的、免疫組織学的分析し脳アミロイドの局在や性状を評価する。7T MRI 装置で得られた画像データと比較検討する。

## 4. 研究成果

(1) 炭素 13 を組み込んだフラボン誘導体は比較的容易に合成できた。その合成した薬剤をブルッカー社の動物実験用 7T MRI 装置を使用し、MR スペクトルの取得、および C-13MR 画像化に成功した。

(2) 炭素 13 を組み込んだ化合物の静脈内投与に向けて 1 mg/mL 水溶液を調製した。しかし、その化合物は水に全く溶けなかった。種々の有機溶媒で溶解を試みたが、1 mg/mL では小野らの原報 (M. Ono et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 6802-6809, 2007) で用いているエタノールでもほとんど溶けなかった。Dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解したが、水を少量加えただけで析出してしまった。そこで、文献 (F. Hirayama and K. Uekama, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 36, 125-141, 1999) を参考に、難溶性医薬品の溶解剤として利用されているシクロデキストリン誘導体を用いることにした。種々のシクロデキストリン誘導体を比較したところ、40%(w/v) Sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE-CD) 水溶液を用いることで化合物を DMSO と同様に溶解できることを見出した。以下の実験には、SBE-CD で溶解した化合物を用いた。

(3) アルツハイマー病のトランスジェニックマウスの心臓から直接炭素 13 含有化合物溶液を注入し、その後、ブルッカー社の動物実験用 7T MRI 装置を使用し、マウスの脳に対してケミカルシフトイメージングによる炭素 13 MR スペクトロスコピーおよび炭

素 13 MRI 画像を約 12 時間かけて取得した。その結果、炭素 13 MR スペクトロスコピーにて脳内に局所的に炭素 13 のピークが明瞭に同定され、マウスの脳に炭素 13 の安定同位体を含む化合物が集積していることが明らかになった (図 1A)。

また、炭素 13 MRI 画像とプロトン強調画像の融合画像にて深部灰白質に強い信号上昇域が認められた (図 1B)。大脳皮質への明らかな集積はみられなかった。2 匹のマウスで 7T MR 撮像を行いほぼ同様の所見が観察された。

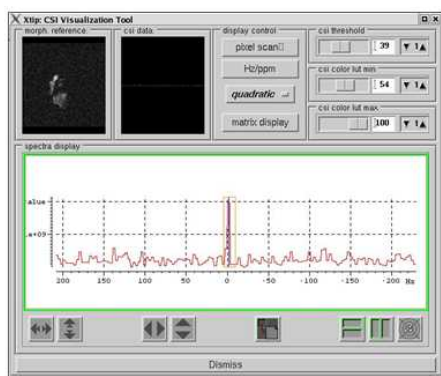


図1A マウス脳のC-13 MRスペクトロスコピー

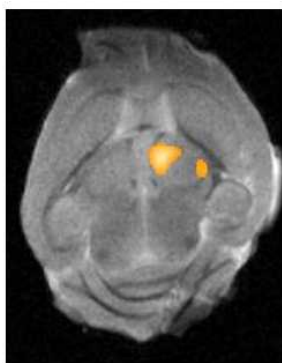


図1B マウス脳のプロトン画像とC-13 MR画像の融合画像

(4)アルツハイマー病モデルマウス APP23 のアミロイドβ蓄積の観察において、まず、MRI測定、撮像したAPP23マウス(25ヶ月齢、オス)の脳標本をショ糖溶液で置換した後、OCTコンパウンド(Sakura)に埋包し、クライオスタット(Leica)を用いて10μmの切片としスライドガラスに貼付けた。

脳切片を70%ギ酸で10分間処理した後、PBSで洗浄した。10%ヤギ血清、PBSで室温30分間インキュベートしてブロッキングした。これに、500倍希釈したビオチン標識抗Aβ単クローン抗体(clone 6E10, Covance社)を4°Cで16時間反応させた。PBSで洗浄後、200倍希釈したAlexaFluor 488-Streptavidin

(Molecular Probe社)を室温で1時間反応させた。封入後、蛍光顕微鏡(Olympus FSX-100)で観察した。大脳皮質部分を観察した結果、多数のドット状の蛍光が観察された(図2)。得られた標本にて深部灰白質にはドット状の蛍光の局在は認められなかった。

7T MRI装置で得られた画像データと免疫組織学的な評価で解離がみられた。その理由として、炭素13含有化合物はある程度溶解はできたものの、その濃度が低かった可能性がある。今後は炭素13含有化合物の溶解性を改善させる工夫などが必要と考えられた。

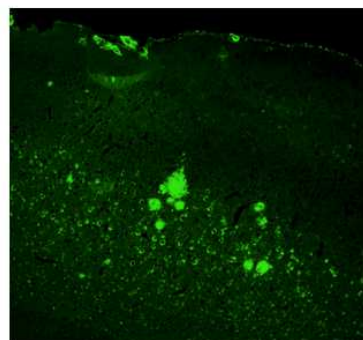


図2 マウス脳の抗Aβ抗体による蛍光染色

## 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)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

平井 俊範 (HIRAI TOSHINORI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：40274724

#### (2) 研究分担者

入口 紀男 (IRIGUCHI NORIO) (2009, 2010)  
熊本大学・総合情報基盤センター・教授  
研究者番号：00347006

國安 明彦 (KUNIYASU AKIHIKO)  
崇城大学・薬学部・教授  
研究者番号：90241348

池田 剛 (IKEDA TSUYOSHI)  
崇城大学・薬学部・教授  
研究者番号：80295138

山縣 和也 (YAMAGATA KAZUYA) (2009)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：70324770

寺沢 宏明 (TERASAWA HIROAKI) (2011)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：10300956

坂下 直実 (SAKASHITA NAOMI) (2009, 2010)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：90284752

菰原 義弘 (KOMOHARA YOSHIHIRO) (2011)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師  
研究者番号：40449921

(3) 連携研究者

荒木 令江 (ARAKI NORIE)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：80253722