公開

研 究 終 了 報 告 書

「補体活性化の画像化によるニューロン貪食のインビボ評価」

研究期間: 2021 年 10 月～2024 年 3 月
研 究 者: 鈴木 千恵

1. 研究のねらい

種々の精神神経疾患の病態に神経炎症が関与すると考えられているが、神経炎症を作用特異的にインビボ評価する方法は確立されておらず、アルツハイマー型認知症（AD）などの精神神経疾患の病態解明研究や治療薬開発の障壁の一つとなっている。多くのモデル動物を用いた分子レベルでの解析により、様々な精神神経疾患の病態促進・抑制の双方に活性化ミクログリアによる神経炎症の制御が関与することが想定されている。一方で、ヒトの病態における神経炎症は、活性化ミクログリアに高発現する translocator protein（TSPO）を標的としたポジトロン断層法（PET）により評価可能であるが、TSPO を過剰発現する活性化ミクログリアが多様な作用を有することから、TSPO を標的とした PET 画像が示す生理学的意味は不明確であり、精神神経疾患における神経炎症の役割は未解明な部分が多い。

本研究では、多様なミクログリアの作用のうち AD モデル動物において発症初期に観察され AD 発症の一因となる可能性が示されているミクログリアによるニューロン貪食作用に着目し、ニューロン貪食作用に特異的なインビボ評価法の開発を目指す。ミクログリアは、ニューロン細胞表面に沈着した補体活性化産物を認識しニューロンを貪食する。実際に AD モデル動物では老人斑形成前の発症初期に補体 C3 活性化を介したニューロン貪食作用が認められ、ヒト AD 患者剖検脳においても老人斑に補体活性化産物の一つである補体 C3d の沈着が認められることから、ニューロン貪食作用の特異的評価法の標的分子として補体 C3d が適切であると考え、ニューロン貪食作用に特異的な指標となる補体 C3d 特異的 PET プローブの開発を目指す。本研究で開発を目指すインビボ評価法はミクログリアの特定の作用の非侵襲的な空間評価が可能なため、他の評価法と組み合わせ繰り返し実施することで補体活性化を介したニューロン貪食作用と他の精神神経疾患関連病態との関係性の時間的・空間的評価を可能とする。さらに本法は将来的に臨床応用が可能なため動物実験と臨床病態の溝を埋めることで関連する研究を大きく推進し、現在有効な治療法の存在しない AD を含む精神神経疾患の治療法開発への貢献等、精神神経疾患の診断・治療法開発の推進を促し、人々の健康増進や社会的問題の解消を目指す。

2. 研究成果

（1）概要

ニューロン貪食作用を特異的に評価可能なインビボ評価法として、ミクログリアによるニューロン貪食作用の引き金となる脳内における補体活性化を検出可能な陽電子放出断層撮影法（PET）プローブの開発を目的に研究を実施した。

補体活性化を検出する PET プローブの標的分子として、補体活性化産物の一つで補体活性化部位の細胞表面に沈着する補体 C3d フラグメントを選択した。放射標識が容易で補体 C3d への高い親和性を有する PET プローブ候補化合物を探索する目的で、既報の補体 C3d

公開

親和性化合物を基に種々の置換基を有する 13 種類の PET プローブ候補化合物の非放射性標識体を合成した。PET プローブ候補化合物の補体 C3d への親和性および脂溶性を評価し、2Me を PET プローブの候補化合物に選択した。

PET プローブ候補化合物 2Me は放射標識に適した置換基を有さないため、カルボニル炭素のポジトロン放出核種である ^{11}C による放射標識を試みた。ベンジルアジド誘導体および 2 級アミン誘導体にサイクロトロンで製造した ^{11}C 標識二酸化炭素（[^{11}C]CO_2）をジメチルフェニルフォスフィン存在下で反応させることで、^{11}C 標識 2Me（[^{11}C]2Me）の生成が認められ、HPLC による精製を経て[^{11}C]2Me を短時間に再現性良く、高収率にかつ高純度に得られる放射標識法を確立した。[^{11}C]2Me のインビトロにおける性質を評価したところ、正常ラットの血漿中で安定に存在した。血漿タンパクへの結合率も低値であり、血漿中に存在する補体 C3 やその他の補体成分との結合は無視できると推定された。

脳内の病変部位に補体 C3d が沈着する自己血注入脳出血モデルラットに[^{11}C]2Me を静脈内投与し、投与 20 分後に脳を摘出し脳内の放射能分布を評価したところ、病変部位に対側と比較して高い放射能の集積が認められ、その集積は過剰の非放射性 2Me の前処置により低下し、病変部位に[^{11}C]2Me が補体 C3d 特異的に集積することが示された。一方で、PET を用いたインビボ評価により算出した脳内の病変部位への[^{11}C]2Me の集積は SUV 0.11 $\pm$ 0.03 で、過剰の非放射性 2Me の前処置により有意に低下したものの、集積の絶対量が少なく PET での画像化は困難であった。以上の結果より、[^{11}C]2Me の C3d 沈着部位への集積性向上が求められるものの、適切な PET プローブを用いることで脳内における補体活性化を評価できる可能性が示された。

（2）詳細

種々の精神神経疾患の病態に神経炎症が関与すると考えられているが、神経炎症に関わるミクログリアの多様な作用のうちニューロン貪食作用をインビボ評価可能な方法は確立されておらず、精神神経疾患の病態解明研究や治療薬開発の障壁の一つとなっている。本研究では、ニューロン貪食作用を特異的に評価可能なインビボ評価法として、ミクログリアによるニューロン貪食作用の引き金となる脳内における補体活性化を検出可能な陽電子放出断層撮影法（PET）プローブの開発を目的に研究を実施し、以下の成果を得た。

①補体活性化を検出可能な PET プローブの設計

補体活性化を検出する PET プローブの標的分子として、補体活性化産物の一つで補体活性化部位の細胞表面に沈着する補体 C3d フラグメントを選択した。放射標識が容易で補体 C3d への高い親和性を有する PET プローブ候補化合物を探索する目的で、既報の補体 C3d 親和性化合物を基にメトキシ基、ジメチルアミノ基、フルオロ基もしくはメチル基を有する 13 種類の PET プローブ候補化合物を設計し、非放射性標識体の合成を試みた。研究開始当初立案した合成条件では上記候補化合物群の合成・単離は困難であったが、種々の反応条件を検討することで、当該化合物を比較的高収率に得られる方法を確立し、13 種類の PET プローブ候補化合物の非標識体を得た。次いで、補体 C3d への親和性評価法を確立し、確立した親和性評価法により各 PET プローブ候補化合物の補体 C3d への親和性評価を評価したところ、母体化合物である 2Me のみが補体 C3d 親和性を示した。さらに、脂溶性の指標であるリン酸

公開

緩衝液（pH 7.4）- オクタノール分配係数（$LogD_{7.4}$）を測定し、2Me を含む 13 種類すべての候補化合物が中枢移行に適した脂溶性（2.55 ± 0.01）を有することを確認した。以上の結果から、優れた中枢移行性と補体 C3d 親和性を有すると期待される 2Me を PET プローブの候補化合物に選択した。

②PET プローブ候補化合物（[^{11}C]2Me）の放射標識法の確立

PET プローブ候補化合物 2Me は放射標識に適した置換基を有さないため、カルボニル炭素のポジトロン放出核種である ^{11}C による放射標識を試みた。ベンジルアジド誘導体および 2 級アミン誘導体にサイクロトロンで製造した ^{11}C 標識二酸化炭素（[^{11}C]CO_2）をジメチルフェニルフォスフィン存在下で反応させることで、^{11}C 標識 2Me（[^{11}C]2Me）の生成が認められ、HPLC による精製を経て[^{11}C]2Me を短時間に再現性良く、高収率にかつ高純度に得られる放射標識法を確立した。本標識法は多様な構造のウレア結合をもつ化合物の標識合成に応用可能であると期待された。

③補体 C3d 標的 PET プローブとしての有用性評価

[^{11}C]2Me のインビトロにおける性質を評価したところ、正常ラットの血漿中で安定に存在した。血漿タンパクへの結合率も低値であり、血漿中に存在する補体 C3 やその他の補体成分との結合はほとんどないと推定された。

正常ラットに静脈内投与したところ、[^{11}C]2Me はインビボでも血漿中で安定に存在した。PET 撮像を施行したところ、静脈内に投与された[^{11}C]2Me は、投与直後に正常脳へ取り込まれその後速やかに排出されたことから、中枢を標的とする PET プローブに必要な基礎的性質を有することが示された。脳内の病変部位に補体 C3d が沈着する自己血注入脳出血モデルラットを作製し、同様に PET 撮像によるインビボ評価を施行したところ、[^{11}C]2Me の集積は SUV 0.11 ± 0.03 で、過剰の非放射性 2Me の前処置により有意に低下したことから補体 C3d 特異的集積であることが示されたものの、絶対的な集積量が少なくPET での画像化は困難であった。一方で、[^{11}C]2Me の静脈内投与 20 分後に脳を摘出、切片を作製し、脳内の放射能分布を PET より高感度かつ高分解能なエクスビボ オートラジオグラフィー法により解析したところ、病変部位に対側と比較して高い放射能の集積が認められた。エクスビ ボオートラジオグラフィー法により評価した病変部位への[^{11}C]2Me 集積もインビボ評価と同様に過剰の非放射性 2Me の前処置により低下し、病変部位に[^{11}C]2Me が補体 C3d 特異的に集積することが示された。これらの結果は、ラットより脳の大きな動物では[^{11}C]2Me により補体 C3d が沈着した補体活性化部位をインビボイメージングできる可能性を示している。一方で、C3d 低密度領域のインビボイメージングや、齧歯類モデル動物とヒト病態の解析を同一の評価法で実施するトランスレーショナル研究の実現には、[^{11}C]2Me の構造最適化による脳移行性や補体 C3d 親和性の向上が求められた。

研究は概ね計画通りに遂行できたが、研究開始当初期待していたプローブ設計の段階で母体化合物の誘導体化による補体 C3d 親和性の向上が達成できなかったために齧歯類におけるインビボでの脳内補体活性化部位の画像化には至らなかった。一方で、本研究の成果により[^{11}C]2Me の C3d 沈着部位への集積性向上は求められるものの、適切な PET プローブを用

公開

いることで脳内における補体活性化を評価できる可能性が示され、イメージングプローブ開発研究に有用な知見が得られたとともに、PET プローブ候補化合物のインビトロにおける補体 C3d 親和性評価法やイメージング実験に用いるモデル動物の確立等、研究をより効率的に遂行するための基盤を確立することができた。

3. 今後の展開

本研究の成果により得られた脳内における補体活性化を検出可能な PET プローブ開発研究に有用や知見や研究基盤を発展させ、[^{11}C]2Me の構造最適化により補体 C3d 沈着部位への集積性を向上し、より高感度な脳内補体活性化のインビボ評価法の確立を目指す（2～3 年以内)。さらに、確立した脳内補体活性化のインビボ評価法やその他の解析法を用いて、種々の病態モデル動物における補体活性化を伴うミクログリアによる貪食作用と精神神経疾患の病態や貪食以外の神経炎症作用との関係性を解明し、本インビボ評価法の有用性を検証する。げっ歯類病態モデル動物を用いた検討で有用性が示されれば、臨床応用に向け霊長類動物を用いたイメージング実験や PET プローブの安全性試験を実施し、臨床研究における精神神経疾患病態解明や新規診断治療法開発への応用を目指す。

4. 自己評価

研究実施体制や研究費執行を含め研究は概ね計画通りに遂行したが、本研究期間内には研究開始当初に設定した研究目的である「ニューロン貪食作用に特異的評価法を目的とした脳内における補体活性化のインビボ評価法」の実用化には至らなかった。これは、研究開始当初期待していたプローブ設計の段階で母体化合物の誘導体化により補体 C3d 親和性が向上しなかったためであり、さらなるプローブの構造最適化の必要性が示された。一方で、本研究を通じて適切な PET プローブを用いることで脳内における補体活性化を評価できる可能性が示されるなど、本目的を達成するために有用な知見や研究基盤が得られ、今後本研究の成果を展開することで将来的に科学技術及び社会・経済の発展に貢献可能であると考える。また、ACT-X 研究では研究総括及び領域アドバイザーからの多角的なご助言・ご指導をいただき研究者としての個の確立の基盤となったほか、多様な研究背景を有する研究者との交流を通じた異分野の研究者との情報交換や相互触発、ネットワーク形成を実現でき、今後の研究を大きく推進・発展させるものと期待される。

5. 主な研究成果リスト

（1）代表的な論文（原著論文）発表

研究期間累積件数：0件

（2）特許出願

研究期間全出願件数：0 件（特許公開前のものも含む）

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

学会発表：1 件

Chie Suzuki, Kimie Kobayashi, Yasuhiro Magata

公開

Radiosynthesis and preliminary evaluation of a novel PET probe for neuronal complement C3 activation imaging

25th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, 2023 年 5 月 26 日