博士論文

アルツハイマー病の進行度把握のための α4β2 ニコチン性アセチルコリン受容体 非侵襲的画像評価法に関する研究

令和 2 年 3 月

松浦　有希

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

博士後期課程薬科学専攻

目次

参考論文……3
略語……4
要約……6
緒言……8

第 1 章　マウス脳内ニコチン受容体密度の非侵襲的評価法の開発
1.1 背景および目的……17
1.2 方法……23
1.3 結果……33
1.4 考察……52

第 2 章　アルツハイマー病モデルマウスにおける症状進行度を反映する
画像バイオマーカー標的としてのニコチン受容体の有用性の評価
2.1 背景および目的……58
2.2 方法……61
2.3 結果……69
2.4 考察……86

結語……92
引用文献……94
謝辞……104

参考論文

本研究の内容の一部は以下の論文で発表した。

1. Evaluation of the Relationship Between Cognitive Impairment, Glycometabolism, and Nicotinic Acetylcholine Receptor Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease.
Matsuura Y, Ueda M, Higaki Y, Sano K, Saji H, Enomoto S
Mol Imaging Biol, 21 (3), 519-528, 2019 (IF 3.341)

2. Noninvasive evaluation of nicotinic acetylcholine receptor availability in mouse brain using single-photon emission computed tomography with [^{123}I]5IA.
Matsuura Y, Ueda M, Higaki Y, Watanabe K, Habara S, Kamino S, Saji H, Enomoto S
Nucl Med Biol. 43 (6), 372-8, 2016 (IF 2.493)

略語

Aβ	Amyloid beta
ACh	Acetylcholine
AChE	Acetylcholine esterase
AD	Alzheimer's disease
APL	Allosteric potentiating ligand
APP	Amyloid precursor protein
ARG	Autoradiography
BSA	Bovine serum albumin
BPR	Binding potential ratio
CNS	Central nervous system
CSF	Cerebrospinal fluid
CT	Computed tomography
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DLB	Dementia with Lewy bodies
DNA	Deoxyribonucleic acid
FDG	2-deoxy-2[^{18}F]fluoro-D-glucopyranose
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Parkinson's disease
mRNA	Messenger ribonucleic acid
nAChR	Nicotinic acetylcholine receptor
NMDA	*N*-methyl-D-aspartic acid
MCI	Mild Cognitive Impairment
MRI	Magnetic resonance imaging
PET	Positron emission tomography
SD	Standard deviation
SPECT	Single-photon emission computed tomography
SUV	Standardized uptake value
TLC	Thin layer chromatography

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
ROI	Region of interest
VOI	Volume of interest
[$^{123/125}$I]5IA	5-[$^{123/125}$I]iodo-3-(2(*S*)-azetidinylmethoxy) pyridine

【塩基】

A adenine

C cytosine

G guanine

T thymine

要約

近年、高齢化社会の到来に伴い、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD)の罹患者数が著しく増加している。効率的に治療を推進するためにも、AD 病態の進行状況を正確に把握する手法の開発が強く望まれている。特に、AD 患者が占める 65 歳以上の割合が 95%を占めていることから、腰椎穿刺など侵襲的な検査は、感染症リスクの高さから、より侵襲性の低い診断技術の開発が望まれている。一方で、分子イメージング技術は、生体を傷つけることなく、体内での分子の挙動を画像化できる技術である。本研究では、核医学分子イメージング技術を用いて、AD 症状が把握できる手法の確立を目的とした。

中枢に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR、ニコチン受容体)は、記憶・学習・認知といった高次脳機能に関与[1-3]するだけでなく、抗不安作用や鎮痛作用[4]、神経保護作用[5, 6]など多様な作用発現が報告されている。nAChR には種々のサブタイプが存在するが、特に脳内においては α4β2 と α7 サブタイプが 90%以上を占めていると言われている[2, 7]。これらサブタイプの違いにより、司る機能が異なることが報告されている。α7 サブタイプは認知機能の中でも、特に記憶や学習に重要な働きを司る[2]。また、α4β2 サブタイプは認知機能の中でも、特に物体認識に重要な役割を担うだけでなく、注意力や情動にも関与すると報告されている[8]。

剖検脳を用いた免疫組織化学的検査では、AD 患者の新皮質や海馬領域の α4β2-nAChR 陽性細胞が減少していることが報告されており[9, 10]、先行研究の大多数は受容体減少を唱えている。このため高次脳機能に直接関与する nAChR を体外から画像化することは AD 症状進行度を反映した変化を捉えることが可能であると考えられる。しかし、AD 病態における認知機能低下を反映した画像バイオマーカーとしての脳内 nAChR の有用性を検討した報告は未だにない。また近年、ヒト患者と比べてより疾患状態を限定することが可能な種々の遺伝子改変マウスが開発されており、それら小動物を対象とした高感度核医学診断装置も利用可能となっている。そのため小動物において受容体密度の定量解析法を確立することは、nAChR の生理学的・病態学的機能を解明するためには重要であると考えられる。

そこで、第 1 章では、マウス脳 nAChR を標的にした Single-photon emission computed tomography (SPECT) イメージング法の確立を目的に、当研究グループが開発した α4β2-nAChR 結合性分子プローブである 5-[$^{123/125}$I]iodo-A-85380 ([$^{123/125}$I]5IA) 及び小動物用 SPECT を利用してマウス脳[^{123}I]5IA-SPECT イメージングの定量性評価を行った。まず、[^{123}I]5IA でマウス脳 SPECT 撮像を行い、得られた脳各部位の画像強度とそれぞれの部位に発現する α4β2-nAChR 密度との間に相関を認めたことから、[^{123}I]5IA-SPECT 画像が α4β2-nAChR 密度を反映していることが明らかとなった。さらに、nAChR の阻害剤前投与実験で放射能集積の低下を認めたことから、得られた[^{123}I]5IA-SPECT の画像強度は nAChRs に特異的であることが示された。さらに、コリンエステラーゼ阻害剤を前投与することでシナプス間隙に存在する内因性の ACh の量を変化させ、それにより生じる[^{123}I]5IA 放射能集積量の減少を、SPECT 撮像により検出することに成功した。以上の結果から、[^{123}I]5IA を用いて、マウス脳内の α4β2-nAChR の分布や内因性 ACh 量の変化を体外から非侵襲的に測定できる画像化法の開発に成功した。

さらに第 2 章では、AD 病態の症状進行度を反映した画像バイオマーカーとしての脳内 α4β2-nAChR の有用性を検討し、現在 AD の臨床診断基準に掲載されている脳糖代謝率測定プローブである 2-deoxy-2[^{18}F]fluoro-D-glucopyranose ([^{18}F]FDG)と比較した。ヒト AD 病態模倣マウスである APP/PS2 マウスにおける脳糖代謝率および α4β2-nAChR 密度の経時的変化を、認知障害発症前後で追跡評価した結果、脳糖代謝率は顕著な変化を認めなかった。その一方で、α4β2-nAChR 密度低下は認知障害発症と同時期に生じることを見出した。この結果は、AD 病態の症状進行度を反映した画像バイオマーカーとしての脳内 α4β2-nAChR の有用性を示唆するものであり、AD 病態における症状進行のメカニズム解明や AD 患者への治療介入の効率化につながる知見を提供するものと考えられる。

本研究は、AD 症状進行度を客観的に評価する手法の開発に、新たな知見を提供するものである。

緒言

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は、病理学的には神経原繊維変化とアミロイド β (Aβ) の沈着を特徴とする進行性の神経変性疾患の一つである[11]。症状が進行すると大脳皮質、海馬、前脳基底部で神経細胞死、シナプス減少、アセチルコリンの低下が生じる。主要な症状として、緩徐進行性の認知機能障害がある。その中でも最も中核的な症状は記憶障害であり、それに引き続き、見当識障害や遂行記憶障害、視空間機能障害と人格変化などの社会的認知機能の障害へと進行する。また、認知機能障害に加えて、意欲や感情の障害、幻想、幻覚、徘徊、興奮などの心理症状を呈することも多い[12]。

厚生労働省政策統括官付保健統計室の「患者調査」によると、1999 年の AD 患者の罹患者数は 2.9 万人であったのに対して、2014 年には 53.4 万人まで増加している (Fig.1、[13]を一部改変)。世界的に見ても、2015 年の認知症人口は 4,680 万人と推定されているが、2030 年までに 7,470 万人まで増加し、2050 年までには 1 億 3,150 万人に増加すると予測されている[14]。このように、我が国を含め世界規模で AD 罹患者数の増加が社会問題となっている。認知症の医療コストは全世界で 1 兆ドルを超えるとの試算がなされており[15]、医療経済的観点からも、早急に解決するべき疾患のひとつであると考えられている。

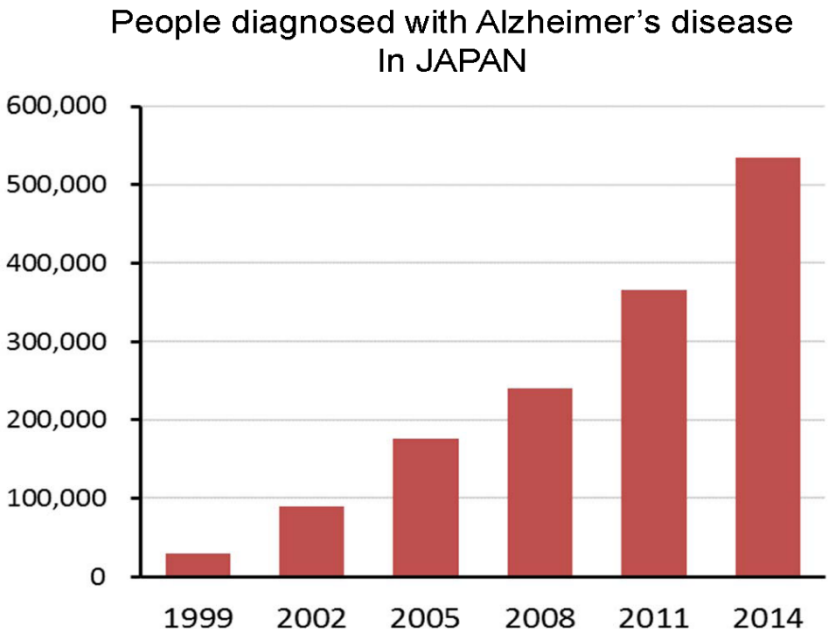


Fig. 1 Transition of predicted number of people diagnosed with AD in JAPAN.

現在、AD 患者の認知機能のスクリーニング検査としては、mini mental state examination (MMSE) や改訂長谷川式簡易知能検査 (HDS) など、患者に対して問診による質問形式での評価方法が主体となっている[16]。このため、HDS や MMSE などで得られた結果は、患者の精神状態や注意力、集中力に影響を受けるという問題点を抱えており、AD 病態を客観的・定量的に評価可能な診断方法は未だに確立されていない。近年の研究から、AD の前段階である軽度認知症 (Mild Cognitive Impairment : MCI) に対する治療は、早期段階の介入であるほど、その後の症状進行を緩やかに保ち、治療効果が高くなるとする報告[17]や、AD 症状進行に伴い、有効な治療薬が異なるとする報告[18]がなされている。このことからも、症状進行状態を正確に把握し、適切な治療介入を行えば、認知症の進行を遅らせることが期待される。このように、AD の認知症進行度把握の重要性が近年唱えられている。

一般的に AD 病態では、発症の 10～20 年ほど前よりアミロイド β (Aβ) の蓄積が始まり、次第に蓄積が顕著なものとなる。そして、それがシナプス障害や細胞傷害を引き起こし、脳の局所的な糖代謝能および血流低下が起こり、海馬や大脳皮質が萎縮するという病態の経過が明らかとなってきた (Fig. 2、[17]より一部改変)。Fig. 2 で示すように、Aβ 蓄積と認知機能の関連については、まず、脳内で Aβ 蓄積が始まり、蓄積量が増加するものの、認知機能の低下は認めない無症候状態の「preclinical」の時期がある。続いて、ゆるやかに認知機能が低下する「MCI」の時期を経て、最後に記憶障害が顕著となり、遂行記憶障害、視空間機能障害、人格変化などの社会的認知機能の障害へと進行する。

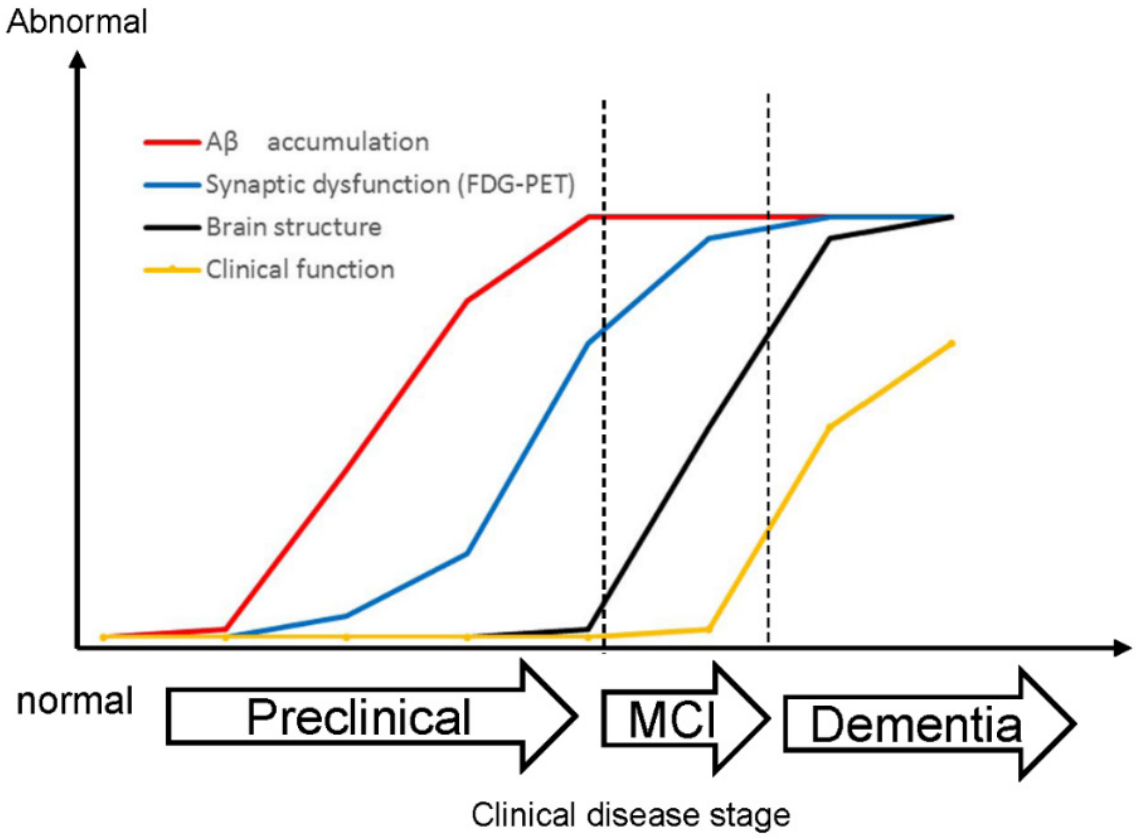


Fig. 2 Hypothetical model of dynamic biomarkers of the AD expanded to explicate the preclinical phase.

現在、上述した脳機能変化や病理学的特徴をもとに、AD の新診断基準が提案されている。米国 National Institute of Aging (NIA) と Alzheimer Association (AA) が合同で提案した、NIA/AA による AD の臨床診断基準が 2011 年に改訂された。それによると、AD 確定診断のためには、脳 Aβ 蓄積、または二次性神経変性や障害を示すバイオマーカーの使用が推奨されている。しかし現時点では、バイオマーカーの有用性評価やその使用に際した標準化が十分にはなされておらず、臨床研究や治験など、限られた場面で使用されるに留まっている。

現在提唱されている、具体的なバイオマーカーを Table 1 に示す。脳 Aβ 蓄積を示すバイオマーカーとしては、(a) 脳脊髄液 (CSF) 中の Aβ42 含有量測定[19] および (b) Aβ-PET イメージング[20]が挙げられ、また二次性神経変性や障害を示すバイオマーカーとしては (c) CSF 中のタウタンパク質含有量の測定[11, 21,

22]、(d) [^{18}F]FDG-PET[23]、(e) 脳萎縮を観察する MRI 撮像[24]が挙げられている。

Table 1 (a) および (c) で挙げた、CSF 中の Aβ42 およびタウタンパク質の存在量の変化は、認知機能低下に先んじて生じることが報告されており[25]、有用なバイオマーカーである。しかし、その際に行う腰椎穿刺は侵襲性が高いという問題点を有している。特に、AD 患者は 65 歳以上の罹患者割合が 95%を占めていることから、検査対象の患者は基本的に高齢であり、その後の感染症リスクが高いことが懸念されている[25]。そのため、侵襲性が低い検査手法の開発が求められている。

MRI (magnetic resonance imaging) は、核磁気共鳴現象を利用し、人体を構成する元素の原子核から磁気信号を得て、断層像を作成する画像法である。AD 患者では海馬あるいは内側側頭葉の萎縮が生じており、Table 1 (e) で示した MRI 撮像は、その萎縮を非侵襲的に捉える評価法である。健常高齢者と比較して、早期 AD 患者の 27%、MCI 患者の 3%で海馬の萎縮を認めるという報告がある[26]。しかし、学歴が高い場合、萎縮の程度と認知機能との間に乖離を生じることが問題視されている[27, 28]。さらに、海馬の萎縮には左右差が生じることもあり、画像解析法によっては結果が変わる可能性が指摘されている[26]。

Table 1 The major AD biomarkers

Biomarkers of brain Aβ protein deposition	reference
(a) Low CSF Aβ42	[19]
(b) Positive PET amyloid imaging	[20]
Biomarkers of downstream neuronal degeneration or injury	
(c) Elevated CSF tau	[11, 21, 22]
(d) Decreased [^{18}F]FDG-PET imaging	[23]
(e) Structural MRI	[26]

Abbreviation: PET; positron emission tomography, CSF; cerebrospinal fluid, MRI; magnetic resonance imaging

一方で、核医学分子イメージングとは、生体内に放射性同位体で標識した分

子プローブを投与し、その集積をポジトロン断層法 (positron emission tomography; PET) や単一光子放射断層撮影法 (single-photon emission computed tomography; SPECT) といった核医学診断装置を用いて体外から検出し、可視化する技術である。核医学分子イメージング技術は、非侵襲的かつ定量性が高いことから、高齢者が対象であっても繰り返し検査が可能である[29]。

AD 診断を目的に、これまでに様々な核医学診断薬の有用性が議論されてきた。それらの一つに、Table 1 (d) で示した、脳局所の糖代謝を評価することができる 2-deoxy-2[^{18}F]fluoro-D-glucopyranose ([^{18}F]FDG)がある。グルコースの 2 位の水酸基を ^{18}F で置換した[^{18}F]FDG は、まず、グルコースと同様にグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれる。その後、ヘキソキナーゼによりリン酸化を受けるが、グルコースと異なり、その後の代謝を受けず、リン酸化体として細胞内に滞留する。脳の神経細胞はエネルギー源としてブドウ糖を利用することから、脳細胞の活動が活発な部位は糖代謝能が高く、反対に糖代謝能が低下している部位は、神経細胞の機能低下や神経細胞脱落に伴う脳機能の低下が起こっていると考えられている[23]。実際に、症状が進行した AD 患者では、海馬領域を含む視床内側、後部帯状回で[^{18}F]FDG の集積が低下することが知られている。しかし、軽度認知障害 (MCI) における[^{18}F]FDG-PET 所見には議論が分かれている。つまり、MCI 患者では、大脳皮質で脳糖代謝が低下する報告[24]がある一方で、海馬領域以外ではわずかな変化しか認めないとの報告[30]もある。[^{18}F]FDG-PET は、臨床診断 (臨床検査、神経心理検査、MRI 検査) で AD と鑑別が困難な、前頭側頭型認知症との鑑別診断には非常に有用であるが、それ以外の AD の診断適応については、科学的エビデンスが不十分だとする考えが現在のところも主流となっている。

また一方で、Table 1 (b) で示した、AD 発症の原因物質の一つである不溶性 Aβ の蓄積を画像化する Aβ イメージング製剤の開発が精力的に行われており、AMYViD ([^{18}F]AV-45)[28] や[^{11}C]Pittsburgh compound B ([^{11}C]-PiB) [23] などを用いた、数多くの臨床研究も実施されている。しかし、認知機能が障害されていない健常高齢者においても、10-30%の割合で不溶性 Aβ の脳内蓄積が観察されるという報告[31]があり、健常高齢者における偽陽性が問題となっている。

この Aβ イメージング製剤の欠点を克服するためのイメージング標的として、

タウタンパク質がある。タウ病理像は、Aβ蓄積が生じてから5～10年後に生じると提唱されており、Aβ病理像よりも認知機能低下に対して、より相関すると報告されている[21]。近年、タウタンパク質を標的としたイメージングプローブの開発も精力的に行われており、[^{18}F]THK類似化合物[32-34]、[^{11}C]PBB3[35, 36]、[^{18}F]T807[37]、[^{18}F]T808[38]が臨床研究に進んでいる。しかしながら、それはまだ始まったばかりであり、現在は、有用性や問題点を評価できる知見の蓄積過程にある。

このように、非侵襲的な核医学分子イメージング技術を用いて、ADによる認知機能低下が生じる過程を追跡することは試みられている。しかし、[^{18}F]FDGではMCI患者における糖代謝能変化に個人差が大きいことが問題となっており、Aβイメージング製剤ではその偽陽性が問題であり、タウタンパク質イメージング製剤は有用性が示唆される報告例もあるものの、現段階では確定的な結論には至っていない段階にある。このように、その有用性が担保された放射性分子プローブ標的は、現在のところ確立されていない。

プローブを開発する上では、放射性核種の選択は重要な要素である。撮像原理の違いから、PETおよびSPECTで用いられる放射性核種は異なる (Table 2、[39]を一部改変)。PET装置は、放射性核種から放出された陽電子が、電子と結合して対消滅を起こすと同時に180度方向に2個放出される消滅光子を同時測定するのに対して、SPECT装置では、放射性核種から放出されるγ線を直接測定する。SPECT装置では、γ線の入射方向を一方向に制限するために、γ線検出器と被験者との間にコリメーターを設置している。このため、収集できるγ線数が制限され、ピンホールコリメーターの場合、通常、放出されたγ線の0.01%以下しか信号として検出できないと言われている。一方PETでは、2個の消滅光子の同時測定により、コリメーターを用いなくても放射線の入射方向を限定できるため、PETの方が高い感度と定量性を有している[40]。

一般的に、臨床使用されているPET核種は短寿命であり、これらの核種を製造するためにはサイクロトロンをPET装置に併設する必要がある。一方で、それらのPET核種と比較して、臨床使用されているSPECT核種は半減期が長く、企業供給が可能であるという特徴を有する。このため、2017年時点で、全国のSPECT装置の稼働台数は1301台であるのに対して、PET装置は484台に

留まっており[41]、その普及率には大きな差がある。前述の通り、SPECT の感度や定量性は PET に比べると劣る。しかしながら、MCI 患者に脳血流 SPECT を施行した 3 年間の追跡研究では、脳血流 SPECT が MCI から AD への進行を予測するための有意な因子であることが示された[42]。このように、SPECT を用いた臨床研究でも一定の成果が得られており、装置としての精度は担保されていることが示されている。分子イメージング技術は基礎から臨床への応用が可能であり、最終的な目標が臨床応用であることを考えると、SPECT の普及率の高さは、今後の発展に際して長所になると考えられる。

また近年、PET や SPECT といった核医学診断装置の空間分解能及び感度が向上したことにより[43]、そのような高解像度の撮像装置を用いて、小動物の小さな臓器まで鮮明に可視化することが可能になってきた。このような高感度小動物用撮像装置を用いて、遺伝子改変型 AD 病態模倣小動物を対象にして得られた基礎的な所見は、臨床へのトランスレーショナル研究に展開が可能である。

Table 2 Commonly used PET and SPECT radioisotopes in clinical settings

Isotope	Imaging device	Production method	Half-life
^{11}C	PET	Cyclotron	20.4 min
^{13}N	PET	Cyclotron	10 min
^{15}O	PET	Cyclotron	2.03 min
^{18}F	PET	Cyclotron	110 min
^{99m}Tc	SPECT	Generator	6.02 hours
^{123}I	SPECT	Accelerator	13.3 hours

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は、中枢および末梢神経系に発現が認められる膜貫通型イオンチャネルで、5 つのサブユニットで構成される。神経終末前領域の nAChR はノルアドレナリン、ドパミン、セロトニン、GABA といった神経伝達物質の調整に関わる。哺乳類の脳内に存在する nAChR は、主に α4β2 と α7 という 2 つのサブタイプである。ノックアウトマウスや選択的アゴニスト/アンタゴニストを投与する研究により、α7 サブタイプは認知

機能の中でも、特に記憶や学習に重要な働きを果たすことが報告されている[2]。また α4β2 サブタイプは、認知機能の中でも、特に物体認識に重要な役割を果たすだけでなく、注意力や情動にも関与すると報告されている[8]。中枢神経系 (CNS) における、このような機能を担うコリン作動性神経の脱落は、AD の徴候である。剖検脳を用いた免疫組織化学的検査では、新皮質や海馬領域の α4β2-nAChR 陽性細胞が減少していることが報告されており[9, 10]、先行研究の大多数は受容体減少を唱えている。AD は記憶障害、見当識障害、理解・判断力の低下、失認といった中核症状だけでなく、不眠や幻覚を含む周辺症状も呈することがある。このため、α4β2 と α7 の両サブタイプが、AD 症状進行に寄与していると考えられている[2]。

現在の日本では、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤が、初期～中程度の AD 患者に対する第一選択薬となっている[44]。また、AChE 阻害剤のひとつであるガランタミンは、nAChR のリガンド結合部位とは異なるアロステリック部位に結合し、リガンドが nAChR に結合した際に受容体の働きを増強させる APL (Allosteric potentiating ligand) 作用により、nAChR を積極的に調節すること[45]が知られている。このように、間接的または直接的に nAChR を標的とした治療薬が一定の有効性を認めていることから、nAChR が AD 病態の中核症状および周辺症状の進行に関して、重要な役割を担うことが示唆されている[3, 46]。このため、α4β2-および α7-nAChR の発現量の変化を追跡することができれば、AD 病態のそれぞれのサブタイプが担う症状の進行度を正確に反映しうるバイオマーカーになるのではないかと考えた。

そこで、AD モデルマウスにおける AD 症状進行度を把握することができる画像バイオマーカー標的としての nAChR の有用性の評価を行い、糖代謝能やグルタミン酸受容体の変化との比較を行った。また、この実験を遂行するにあたり、マウス脳 nAChR を標的にした SPECT イメージング法の確立を行った。これらの実験について、第 1 章および第 2 章にて詳述する。

第 1 章
マウス脳内ニコチン受容体密度の
非侵襲的評価法の開発

1.1 背景および目的

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は、神経原繊維変化とアミロイドβ (Aβ) の沈着、広範囲にわたる神経細胞の脱落により病理学的に特徴づけられる、進行性の神経変性疾患の一つである[11]。近年、高齢化社会の到来に伴い、日本を含む世界規模で AD の罹患者数が著しく増加している[13]。効率的な治療を推進するためにも、早期診断および認知機能低下の進行状況を正確に把握する手法の開発が望まれている。特に AD は、罹患者に占める 65 歳以上の割合が 95%以上を占めていることから、腰椎穿刺など侵襲的な検査は感染症リスクの高さから[25]、より侵襲性の低い診断技術の開発が望まれている。

一方で、核医学分子イメージング技術は、生体を傷つけることなく、体内での分子の挙動を画像化することを可能にした技術であり、長期に渡る生体内評価に適している[47]。生体に放射性分子プローブを投与し、ポジトロン断層法 (positron emission tomography; PET) や単一光子放射断層撮影法 (single-photon emission computed tomography; SPECT) により、その体内分布を体外から検出する。この技術は、非侵襲的かつ定量性が高いことから[29]、ごく微量の生体内分子の検出が可能という特徴を有している。

現在、臨床で使用されている PET 薬剤は、その製造にサイクロトロンや自動合成装置をはじめとする高度な設備投資が必要である。一方で、臨床使用されている SPECT 用放射性医薬品は企業供給が可能であり、物理的半減期が PET 薬剤と比較して長い。このため、日本の医療機関および研究機関における SPECT 装置は、PET 装置と比較して高い普及率を誇る[41]。核医学分子イメージング技術では、投与される放射性医薬品の化学量が極めて微量であるため、化合物に由来する薬理作用や副作用が発現する可能性はほとんどない。この概念のもとに実施されているマイクロドーズ臨床試験のように、拡張型単回投与毒性試験での安全性が担保されていれば、実験動物を対象に行った基礎研究からヒトへの臨床応用への橋渡し応用が可能である。本研究では、臨床応用に繋がる基礎的知見を得ることを最終的な目標としている。以上の背景より、臨床機としての SPECT 装置の普及率の高さは、臨床応用した際に有益な土台環境になると考

え、本研究では、SPECT 核種である ^{123}I を用いた検討を行った。

また、中枢に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR、ニコチン受容体) は、記憶・学習・認知といった高次脳機能に関与[1-3]するだけでなく、抗不安作用や鎮痛作用[4]、神経保護作用[5, 6]など、多様な作用発現を担うことが報告されている。nAChR には種々のサブタイプが存在するが、特に脳内においては、α4β2 と α7 サブタイプが 90%以上を占めていると言われている[2, 7]。

また、サブタイプの違いにより、司る機能が異なることが報告されている。α7 サブタイプは、認知機能の中でも特に記憶や学習に関与する[2]。また α4β2 サブタイプは、認知機能の中でも特に物体認識に重要な役割を果たすだけでなく、注意力や情動にも関与すると報告されている[8]。

AD は記憶障害、見当識障害、理解・判断力の低下、失認といった中核症状だけでなく、不眠・幻覚を含む周辺症状も呈することがある。このため、α4β2 と α7 の両サブタイプが AD 症状進行に寄与していることが推定される。実際に、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤であるドネペジルを投与することで、BPSD (興奮、不安、妄想、幻覚など) が有意に改善することが報告されている[44]。また、同じく AChE 阻害剤であるガランタミンは、nAChR のリガンド結合部位とは異なるアロステリック部位に結合し、リガンドが nAChR に結合した際に受容体の働きを増強させる APL (Allosteric potentiating ligand) 作用を有している。ガランタミンは、α4β2 および α7 の両サブタイプに対してこの APL 作用を有していることが報告されている[48]。プラセボ対照二重盲検法で実施された国内の臨床研究の結果、MMSE テストで評価された認知機能の悪化が、ガランタミンを 12 週間投与された群では有意に抑制されたことが報告されている[49]。このように、間接的また直接的に α4β2 および α7 の両サブタイプに対して作用する薬剤を投与することで、一定の治療効果が得られている。このことから、AD 症状の中核症状ならびに周辺症状に対して、α4β2-および α7-nAChR を介した作用が影響を与えていることが示唆される。以上の背景より、α4β2-および α7-nAChR の AD との関連性を解明することは、臨床診断や薬理学的観点からも求められている。

そこで、PET や SPECT を用いて α4β2-および α7-nAChR をインビボで可視化

するため、α4β2-および α7-nAChR 結合放射性分子プローブの開発がなされてきた。α7-nAChR に選択的に高く結合するプローブとして、放射性核種で標識された蛇毒の bungarotoxin があるが、毒性が高くインビトロでの利用に留まっていた。生体に投与可能な α7-nAChR 結合放射性分子プローブの一つとして、[^{11}C]CHIBA-1001 (4-methylphenyl 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate) が開発され、2009 年にヒト脳内 α7-nAChR のインビボイメージングが行われている[50]。ラット脳ホモジネートを用いて行われた、[^{125}I]α-bungarotoxin を放射性リガンドとする競合阻害実験の結果、CHIBA-1001 の IC_{50} 値は 45.8 nM であり、CHIBA-1001 は α7-nAChR に対して結合性を有することが示された。しかし、サルに対して α7-nAChR リガンドである SSR180711 を投与して行われたインビボ阻害実験では、大脳皮質で約 40%の阻害しか認められず[51]、ヒトでのイメージングは行われたものの、インビボでの特異的結合の低さに問題が残るプローブであった。またその後、[^{11}C](R)-MeQAA ([^{11}C](R)-2-methylamino-benzoic acid 1-aza-bicyclo[2.2.2]oct-3-yl ester)[52]が開発されたが、Nakaizumi *et al.* によると、[^{125}I]α-bungarotoxin で測定した(R)-MeQAA の α7-nAChR に対する結合阻害定数（Ki 値）は 41 nM であり、インビボで特異的に結合するには親和性が十分ではない値であった[52]。

α4β2-nAChR 結合放射性分子プローブとしては、2-[^{18}F]fluoro-3-[2(*S*)-azetidinylmethoxy]pyridine ([^{18}F]2FA)[53]、[^{18}F]nifene[54]、[^{18}F]AZAN[55]、[^{18}F]flubatine[56]、5-[^{123}I]iodo-3-[2(*S*)-azetidinylmethoxy]pyridine ([^{123}I]5IA, Fig.3) [57, 58]が報告されている。特に [^{123}I]5IA は、Saji *et al.*らが設計、合成を行った化合物で、*in vitro* 結合阻害実験の結果、α4β2-nAChR への結合親和性が非常に高いことが報告されている (Ki 値 0.37 nM)[58]。また、生体内での脱ヨウ素反応に対して安定であり、未変化体のみが脳血液関門を通過して脳内へ移行する。さらに、げっ歯類で評価した 5IA の NOEL (no observed effect level) は 1 μg/kg であり、ヒト SPECT 撮像の際に投与される[^{123}I]5IA の化学量は、比放射

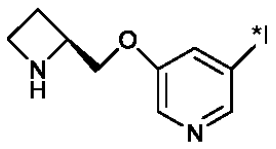


Fig. 3 Structure of [$^{123/125}$I]5IA (*=123/125)

能から最大でも 5 ng/kg と見積もられるため、撮像中の各種生理的パラメータに影響を及ぼさない可能性が報告されている[57]。このように、[^{123}I]5IA はプローブの有用性が確立されたプローブである。また、ヒト[59]や大型・中型実験動物[60]を対象に、その安全性も認められている。このため、[^{123}I]5IA-SPECT によりヒトを対象にした α4β2-nAChR のインビボイメージング研究にも応用されてきた。実際に AD[61]やパーキンソン病 (Parkinson disease; PD) [62]、喫煙者[63]などを対象に、α4β2-nAChR 活性の変化をインビボで観察した報告がある。

しかし、AD などの認知症は加齢とともに罹患率が増加する疾患であるため、患者は高齢者である場合が多く、複数の疾患を併発している場合が多い。AD 患者の脳内 nAChR 密度を測定し健常高齢者と比較した臨床研究の結果、AD 患者では nAChR 密度が低下しているとする報告[61, 64] がある一方で、nAChR の密度変化は生じていないとする報告[65]もある。これは喫煙歴を含む環境因子や併発した複数の疾患の除外項目の違いが異なる解釈に至った理由であると考えられる。このように、臨床研究の場合、環境因子や研究デザインにより、得られる結果が異なり、その解釈が困難となることがある。一方で、現在、ヒト疾患に関連する遺伝子を選択的に改変することで、その病態を反映させた数多くの遺伝子組み換え動物 (特にマウス) が開発されている[66]。このような遺伝子改変モデルマウスを用いて、生体内分子の評価を行うことで、改変遺伝子の影響をより選択的かつ精度高く追跡することが可能になる。さらに近年、PET や SPECT といった核医学診断装置の空間分解能及び感度が向上したことにより[43]、そのような高解像度の撮像装置を用いて、小動物の小さな臓器まで鮮明に可視化することが可能になってきた。核医学分子イメージング技術の長所の一つに非侵襲性があり、遺伝子改変型 AD 病態模倣マウスを用いて得られた知見を、臨床に繋げるトランスレーショナル研究に展開することが可能である。そのため、AD 病態模倣マウスにおいて、AD 症状進行度を客観的に評価できる画像バイオマーカーとしての nAChR の有用性を明らかにすることができれば、ヒト AD 病態においても、症状進行度の把握や治療介入の効率化に繋がる知見を得ることが期待できる。

そこでまず、本章では、マウス脳内に存在する α4β2-nAChR を標的としたインビボイメージング法の確立を目的として、α4β2-nAChR 密度を反映したイメージ

ング画像が得られる条件の検証を行った。核医学診断装置としては、PET と比べて高い普及率を誇り、放射性核種の企業供給が可能であることから、臨床応用に繋げる際に有益な土台環境が既に整っている SPECT[40]を選択した。そして α4β2-nAChR イメージングプローブとしては、SPECT 核種で標識された [^{123}I]5IA (Fig. 3) を用いた。

本章の目的、結果についての簡単なグラフィカルアブストラクトを Fig. 4 に示す。

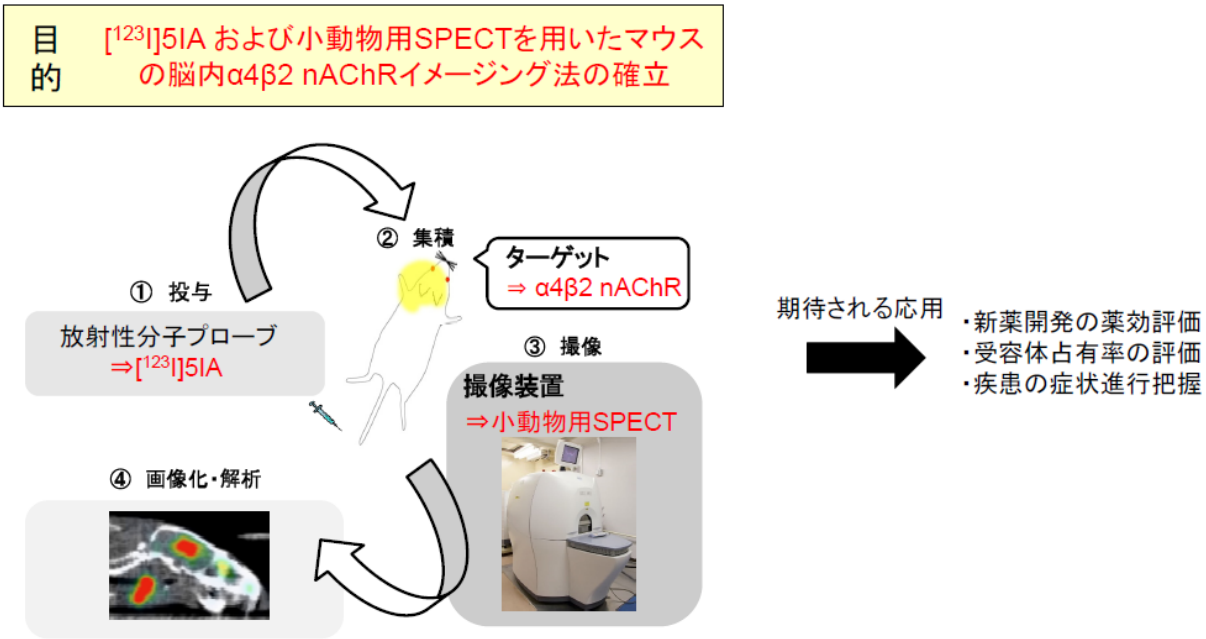


Fig. 4 Graphical abstract of this chapter.

まず、[^{123}I]5IA を用いてマウス脳の SPECT 撮像を行い、実際の脳内 α4β2-nAChR 密度を反映した画像が得られるのか検討を行った。そして、nAChR に結合するニコチンを投与したインビボ競合阻害実験により、[^{123}I]5IA の α4β2-nAChR への結合特異性を SPECT 撮像により評価した。さらに、コリンエステラーゼ阻害剤であるフィゾスチグミンを投与することで、シナプス間隙に存在する内因性の ACh の量を増加させ、それにより[^{123}I]5IA の集積に生じる変化を SPECT 撮像により評価した。最後に、AD モデルマウスである Tg2576 マウスの脳内で生じている α4β2-nAChR 密度変化を、SPECT 撮像で捉えられるか否かを検討した。Tg2576 マウスは、K670N および M671L 変異 (スウェーデン型変異) を含むヒト由来変異型アミロイド前駆体タンパク質を発現するよう遺伝子を改

変させている。この遺伝子改変により、11-13 ヶ月齢にて脳実質に Aβ プラークが過剰に形成されるが、タウの過リン酸化などは生じないことが報告されている。また、4-5 ヶ月齢で樹状スパインの消失が海馬 CA1 領域で生じ、12 ヶ月齢から 15 ヶ月齢で空間認識能力が低下する[67]。以上の報告より、Tg2576 マウスは、初期の AD 病態を反映するといわれており[68]、α4β2-nAChR 密度が上昇するといわれている[69]。このため、Tg2576 マウスの脳内で生じている α4β2-nAChR 密度変化を、SPECT 撮像で捉えられるか否かを検討するのには適したモデル動物であると判断し、本研究に用いた。

以上の内容について、本章で詳述する。

1.2 実験方法

試薬・機器

Na[^{123}I]I (11.1 GBq/mL) は富士フィルム RI ファーマより購入し、Na[^{125}I] (比放射能：162.8 TBq/mmol) は MP Biomedicals 社より購入した。[$^{123/125}$I]5IA の標識前駆体である 5-trimethylstannyl-3-[1-*tert*-butoxycarbonyl-2(*S*)-azetidinylmethoxy] pyridine は、ABX GmbH 社より購入したものを使用した。(-)ニコチンはナカライテクス社より購入し、L-[*N*-methyl-^{3}H]nicotine (80 Ci/mmol) は American Radiolabeled Chemicals 社の製品を使用した。その他の実験で利用した試薬は、すべて和光純薬株式会社およびナカライテスクより購入した特級試薬を使用した。

$^{123/125}$I の放射能測定には Aloka 社製キュリーメーター (IGC-7) 及び日立社製ガンマカウンター (AccuFLEXγ) を使用し、^{3}H の放射能は PerkinElmer 社製液体シンチレーションカウンター (Tris-Carb 2910TR) を用いて測定した。SPECT 撮像には、1 mm 径のマルチピンホールコリメータを装着した TriFoil Imaging 社製小動物用 SPECT/CT 装置 (Triumph SPECT2/CT) を使用した。核磁気共鳴画像 (Magnetic resonance imaging; MRI) 撮像には、4.7 T の Bruker BioSpin 社製 MRI 装置 (BioSpec) を使用した。SPECT/CT/MR イメージングデータの解析には、PMOD Technologies 社製の画像解析ソフト (PMOD ver. 2.7) を使用した。脳切片の作製は GMI 社製のミクロトーム (HM 505 E cryostat) を用いて行った。ARG 実験においては、富士フォトフィルム社製トリチウム用イメージングプレート (Fuji Imaging Plate BAS-TR) を用い、富士フィルム社製スキャナー (FLX-7000) により画像を読み込み、画像解析には富士フォトフィルム社製の画像解析ソフト (Multi Gauge ver. 3 software) を用いた。行動評価実験では撮影した動画を Stoelting 社製の解析ソフト ANY-maze software を用いて解析した。なお、全ての統計解析には、GraphPad 社製検定ソフト (Prism ver. 5) を使用した。

動物

動物実験はあらかじめ岡山大学の動物実験委員会および組み換え DNA 実験安全管理委員会に予め届けた上、承認された実験計画に従い遂行した (動物実

験計画書承認番号：OKU2014086 および OKU2015225、組換え DNA 実験計画書番号：G-0259)。雄性 C57BL/6 マウス (8－9 週齢、体重 25 g) は、日本クレア社より購入した。K670N および M671L 変異を含むヒト由来変異型アミロイド前駆体タンパク質遺伝子発現 (APP、Tg2576) マウスおよび同腹仔として生まれた野生型マウスは、Taconic 社より購入した。全ての飼育動物は適温、12 時間の暗明サイクルを含め常に適正な飼育環境下を維持し、水・エサを自由に摂取させて飼育した。

標識合成

[$^{123/125}$I]5IA の標識合成は Horti らの方法[70]に従い行った。トリメチルスズ前駆体 (1) エタノール溶液 (0.1 mg/10 μL) を Na[^{123}I]I (111 MBq) または Na[^{125}I]I (74 MBq) へ添加し、そこに 1.25%酢酸溶液 (300 μL) 及び 35.5 mM Chloramine T (50 μL) を加えた後、90°C で 30 分間加熱した。50 mM $Na_2S_2O_3$ 溶液 (50 μL) を添加することでスズ－放射性ヨウ素交換反応を終了させ、濃塩酸 (100 μL) を添加して 90°C にて 15 分間加熱することで、Boc 基を脱保護した。溶液を 6N 水酸化ナトリウム溶液 (500 μL) によりアルカリ性にした後、酢酸エチルで抽出し、溶媒を減圧留去後、残渣を移動相に溶解させ、HPLC 法 (カラム：InertSustin C18 [10 × 250 mm]、移動相：0.01 M 酢酸アンモニウム水溶液/メタノール/トルエチレンアミン ＝376/375/1、流速 3.0 mL/min、検出波長：254 nm、[$^{125/123}$I]5IA の保持時間：24 分) にて分離精製を行った。

生成物の放射化学的純度は、クロロホルム/メタノール/25%酢酸アンモニウム = 9/1/0.1 を展開溶媒とする TLC 法にて同定した (Rf = 0.47) 。

C57BL/6 マウスを用いた生体内分布実験

[^{125}I]5IA (150 kBq) を C57BL/6 マウス (n = 4) に尾静脈より投与し、投与 5 分、15 分、30 分、60 分後に屠殺した。採血後、脳各部位 (大脳皮質、海馬、小脳、視床、線条体) を速やかに取り出し、それぞれ質量と放射能集積量を測定した。結果は脳各部位に対して単位重量当たりの放射能集積量 (% injected dose per gram of tissue; %ID/g) を算出し評価した。

脳各部位を分けた手順は以下の通りである。まず、超純水で湿らせたろ紙上

に、頭蓋骨より取り出した脳を置き、嗅球をピンセットで切除した。続いて、小脳をピンセットで挟んで後部へ引っ張ることで、延髄からはがして回収した。さらに、ピンセットで中心溝より大脳皮質を左右に広げて外側部分をろ紙に貼り付け、内側に付着している海馬と線条体をそれぞれ回収した。その後、大脳皮質を切り取って回収し、最後に残った間脳・脳幹部から視床を切除して回収した。

キャリブレーション撮像

Na[^{123}I]I (11.1 GBq/mL) を 0、1.5、2.5、5 MBq / mL になるようにミリ Q 水で希釈し、1mL のプラスチックチューブに充填してファントムを作製した。ファントムを SPECT の撮影台に固定し、下記に示す 2 条件で SPECT 撮像を行った。

1 条件目：1 フレームが 10.6 分の SPECT 撮像

検出器を 22.5 度ごと段階的に回転させ、1 角度につき 40 秒間収集した (40 秒×16 角度＝10.6 分)。

2 条件目：1 フレームが 32 分の SPECT 撮像

検出器を 22.5 度ごと段階的に回転させ、1 角度につき 120 秒間収集した (120 秒×16 角度＝32 分)。

なお、検出するエネルギーウインドウは、^{123}I の光電ピークである 159 keV を中心に前後 20%の幅で設定した。撮像終了後に 3D-OS-EM 法を用いて画像再構成を行い、得られた SPECT/CT 画像をダイコム形式で出力し、画像解析に用いた。各撮像時間で生じる放射能の減衰補正をかけたファントムの放射能強度 (kBq/mL) と、SPECT 撮像により得られた画像強度 (cps/voxel) から検量線を作成した。得られた検量線の傾きをキャリブレーション値として以下の実験で使用した。

C57BL/6 マウスを用いた SPECT 撮像

[^{123}I]5IA (8.2－12.3 MBq) を C57BL/6 マウス (n = 5) に尾静脈より投与し、そ

の 5 分後から 1.5%イソフルラン麻酔下で 5 分間の CT 撮像を行い、10.6 分×4 フレームのダイナミック SPECT 撮像を行った。検出器を 22.5 度ごと段階的に回転させ、1 角度につき 40 秒間収集した (40 秒×16 角度＝10.6 分：1 フレーム)。検出するエネルギーウインドウは、^{123}I の光電ピークである 159 keV を中心に前後 20%の幅で設定した。撮像終了後に 3D-OS-EM 法を用いて画像再構成を行い、得られた SPECT/CT 画像をダイコム形式で出力し、画像解析に用いた。SPECT/CT 撮像後、マウスを飼育ケージに戻し、^{123}I が十分に減衰するまで 1 週間飼育を続けた。

MR 撮像

SPECT 撮像に用いたマウスに対して、前もって頭部の MR 撮像を行った。T2 TurboRARE 3D シーケンス (繰り返し時間：2000 ms、エコー時間：65ms、反復回数：2 回、撮像視野：18 × 15 × 10 mm、解像度：125 μm、スライス厚：1.0 mm) により、マウス全脳を撮像した。データはダイコム形式で出力し、画像解析に用いた。

SPECT 画像解析

得られた SPECT/CT 画像上の脳各部位へ正確に関心領域 (Volume of interest; VOI) を設定するために、MR 画像を CT 画像へ重ね合わせた。MR 画像上で皮質、視床、海馬、線条体、小脳に球状の関心領域を設定し、その位置情報を SPECT/CT 画像へと適用した。なお、脳各部位のそれぞれの大きさを考慮し、海馬に設定した関心領域の直径は 1.0 mm、それ以外の部位に設定した関心領域の直径は 1.6 mm とした。Fig. 5 は、関心領域を設定する際に参考にした脳アトラス図上に、SPECT 解析に使用した球状の関心領域と同じ半径の円を模式的に示した画像である。皮質領域は Fig. 5a の赤丸で示すように、ブレグマ ＋2.62 mm のスライス位置にある前頭連合野を中心に球体を設定した。線条体領域は Fig. 5b の赤丸で示すように、ブレグマ ＋ 0.145 mm のスライス位置にある尾状核被殻中心に球体を設定した。海馬領域は Fig. 5c の青丸で示すように、ブレグマ -2.055 mm のスライス位置にあるアンモン角第一領域 (CA1) と歯状回 (DG) 領域を含む領域に球体を設定した。海馬領域は Fig. 5c の赤丸で示すように、ブレ

グマ - 2.055 mm のスライス位置にある視床後核、視床前腹核、外側腹側核を含む領域に球体を設定した。小脳領域は Fig. 5d の赤丸で示すように、ブレグマ - 5.855 mm のスライス位置にある単小葉と小脳虫部を含む領域に球体を設定した。

得られた放射能集積値 (count/voxel) は、キャリブレーション値 0.016 を用いて、絶対的な放射能集積量 (kBq/cc) へ変換した。脳各部位への放射能集積量は、標準化取り込み率 (Standardized uptake values; SUV) により評価した。その算出方法を以下に記す。SUV = 関心領域中の放射能集積量 (kBq / cc) / (投与した放射能[kBq] / 体重[g]) ×100。

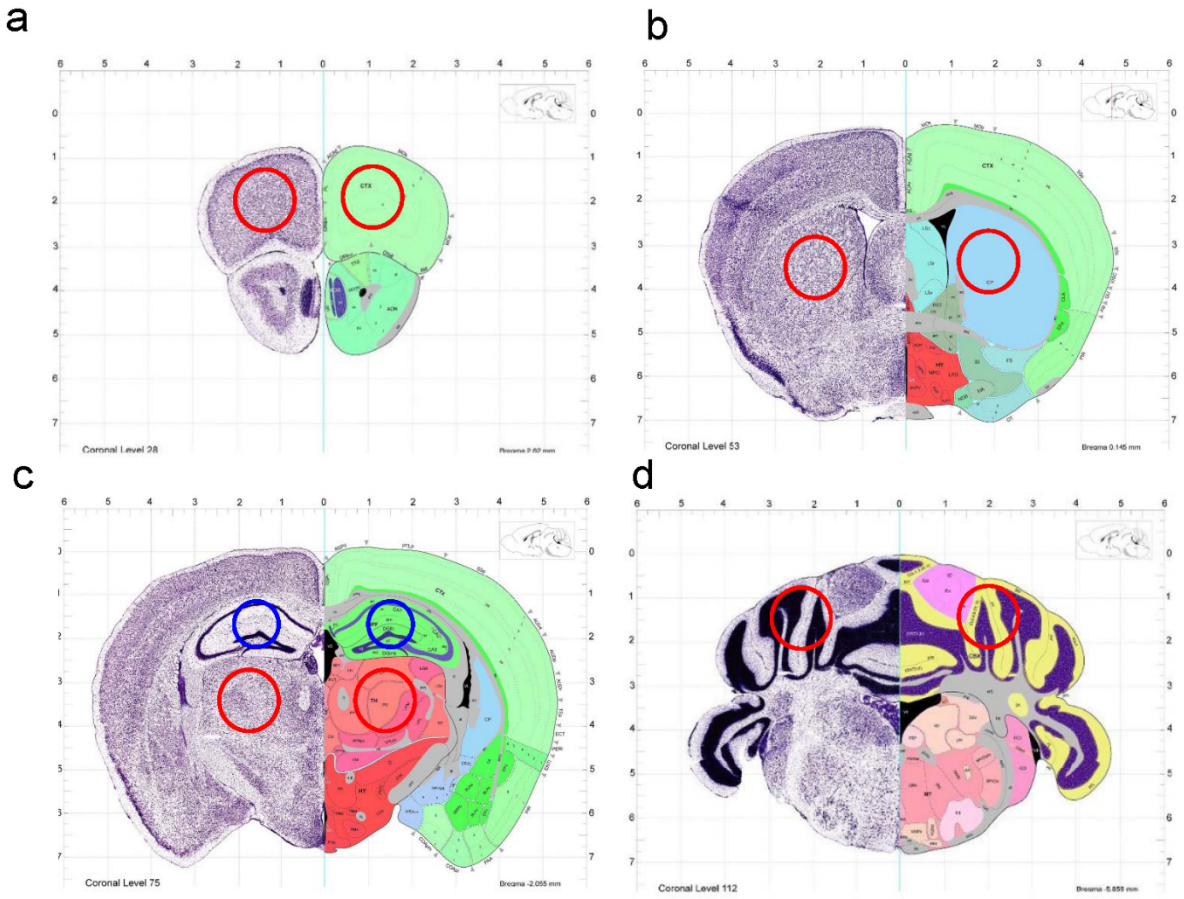


Fig. 5 The coronal brain slices of *Allen brain atlas* image with placement of VOIs.

<u>脳内ニコチン受容体密度のインビトロ定量解析</u>

SPECT 撮像の 7 日後に撮像に用いたマウスを屠殺し、脳を素早く摘出後、ドライアイスヘキサンバス (-75°C) にて凍結させた。そしてミクロトームを用いて厚さ 10 μm の凍結新鮮切片を作製した。

マウス脳切片への[^{3}H]ニコチンの結合量の測定は、Pauly らの方法[71]に従って行った。作製した凍結新鮮切片を 20 mM のクレブス・リンゲルヘペス緩衝液 (pH 7.4) 中、4°C で 30 分間プレインキュベートした後、4 nM の[^{3}H]ニコチンと 4°C で 90 分間インキュベートした。そして、ヘペス緩衝液を用いて 4°C で 3 分間 (1 分×3 回) 洗浄した。非特異的結合は、100 μM の (-)ニコチン存在下で[^{3}H]

ニコチンとインキュベートすることにより求めた。乾燥させた脳切片を、トリチウム用イメージングプレートに ^{3}H 標準線源とともに 20 時間暴露することで、オートラジオグラムを得た。

マウス脳アトラス[72]を参照しながら、得られたオートラジオグラム上の大脳皮質、視床、海馬、線条体、小脳部位に 2 つの円状の ROI を設定し、そこへ集積した放射能を定量した。スライス位置および ROI の設定位置は、Fig. 5 に示したものと同様である。

[^{3}H]ニコチンの結合量 (fmol/mg 組織重量) は、得られた脳各部位の放射能強度を、^{3}H 標準線源の放射能強度から作成した検量線にフィッテイングさせて算出した。[^{3}H]ニコチンの特異的結合は、脳各部位のリガンドの全結合量から非特異的結合を差し引くことで求めた。

<u>ニコチン負荷実験</u>

同一の C57BL/6 マウス (n = 4) に対して、 (-)ニコチン負荷前後で[^{123}I]5IA-SPECT 撮像を行った。実験のフローチャートを Fig. 6 に示す。まず、 (-)ニコチン負荷前のベースライン撮像として、生理食塩水 (100 μL) を皮下投与後、[^{123}I]5IA (9.3–12.6 MBq) をマウスの尾静脈より投与し、その 30 分後から 32 分間 SPECT 撮像を行い、続いて 5 分間の CT 撮像を行った。その 1 週間後、十分に放射能が減衰した後に、同一個体で (-)ニコチン負荷実験を行った。すなわち、(-)ニコチン (10 mg/kg) を皮下投与した 5 分後に[^{123}I]5IA (9.2–11.2 MBq) を尾静脈より投与し、その 30 分後から 32 分間 SPECT 撮像を行い、続いて 5 分間の CT 撮像を行った。すべての SPECT/CT 撮像は、1.5%のイソフルラン麻酔下で実施した。検出器を 22.5 度ごと段階的に回転させ、 1 角度につき 120 秒間収集した (120 秒×16 角度＝32 分: 1 フレーム) 。得られた放射能集積値 (count/voxel) は、キャリブレーション値 0.0453 を用いて、絶対的な放射能集積量 (kBq/cc) へ変換した。MR 撮像及び画像解析については、前述の方法で行った。

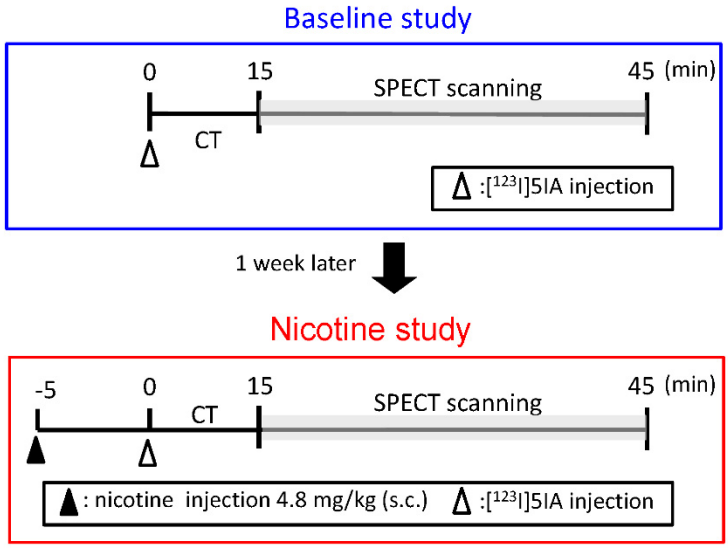


Fig. 6 Flow chart for experimental procedure in the nicotine treatment study

内因性 ACh 変化の追跡評価

まずは臓器摘出法により、フィゾスチグミン投与後の[^{125}I]5IA 脳内分布測定を行った。フィゾスチグミン生理食塩水溶液 (0.5 mg/kg、0.75 mg/kg) あるいは生理食塩水のみをマウスに腹腔内投与し、15 分後に尾静脈より[^{125}I]5IA (150 kBq) を投与した。[^{125}I]5IA 投与 30 分後にマウスを屠殺し、脳を摘出して脳各部位 (皮質、視床、海馬、線条体、小脳) に部位分けし、それぞれの重量および放射能を測定した。

次いで、C57BL/6 マウス (n = 4) に対して、フィゾスチグミン負荷前後で[^{123}I]5IA-SPECT 撮像を行った。実験のフローチャートを Fig.7 に示す。まず、フィゾスチグミン負荷前のベースライン撮像として、生理食塩水 (100 μL) を腹腔内投与後、[^{123}I]5IA (8.1－16.6 MBq) をマウスの尾静脈より投与し、その 30 分後から 32 分間 SPECT 撮像を行い、続いて 5 分間の CT 撮像を行った。その 1 週間後、十分に放射能が減衰した後に、同一個体でフィゾスチグミン負荷実験を行った。すなわち、フィゾスチグミン (0.75 mg/kg) を腹腔内投与した 15 分後に[^{123}I]5IA (9.2–11.2 MBq) を尾静脈より投与し、その 30 分後から 32 分間 SPECT 撮像を行い、続いて 5 分間の CT 撮像を行った。すべての SPECT/CT 撮像は、

1.5%のイソフルラン麻酔下で実施した。検出器を 22.5 度ごと段階的に回転させ、1 角度につき 120 秒間収集した (120 秒×16 角度＝32 分：1 フレーム)。得られた放射能集積値 (count/voxel) は、キャリブレーション値 0.0453 を用いて、絶対的な放射能集積量 (kBq/cc) へ変換した。MR 撮像及び画像解析については、前述の方法で行った。

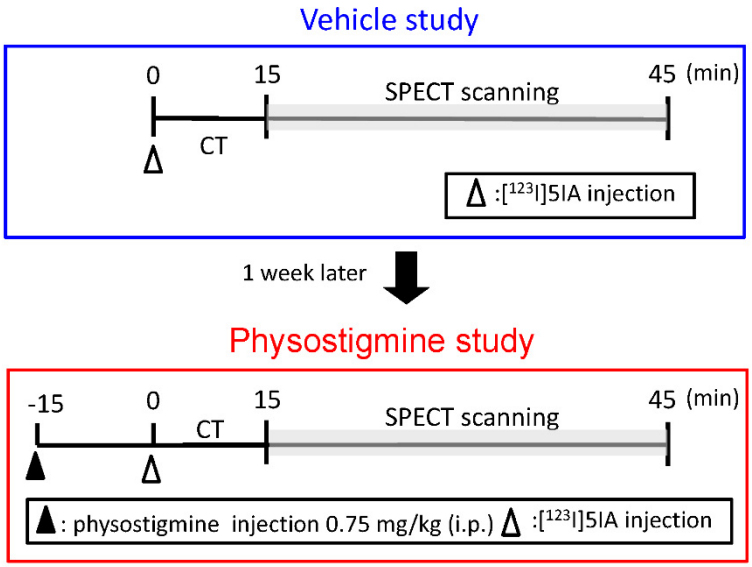


Fig. 7 Flow chart for experimental procedure in the physostigmine treatment study

Tg2576 マウスにおける新奇物体認識試験

Tg2576 マウス及びその同腹仔の野生型マウス (13 ヶ月齢、各群 n = 8) に対して、Oulès らの方法[73]を改変した新奇物体認識試験を行った。試験の実施中は、静粛な環境を維持した。まずは三日間にわたり、何も入れていない観察箱 (44×44 cm) の中で、一日 10 分間の環境馴化を行った。その翌日に、2 つの同一物体 (水を満たした 50 mL のコニカルチューブ) を入れた観察箱にマウスを入れ、10 分間 2 つの物体を探索させた (獲得試験) 。獲得試験の 24 時間後に、片方の物体を新奇物体 (ガラス製の褐色びん) に変更した環境下で、それぞれの物体に対するマウスの探索時間を 5 分間測定した (新奇物体試験)。獲得試験および新奇物体試験中のマウスの探索行動はビデオレコーダーを用いて撮像し、新奇物体及び旧知物体に対する探索時間を自動解析した。認知機能の指標となる新奇物体選択性 (Exploratory preference; EP 値) は下記の式を用いて算出した。

EP 値 (%) = 新奇物体への探索時間 / (新奇物体への探索時間 + 旧知物体への探索時間) × 100。

なお、獲得試験において物体に対する総探索行動時間が 8 秒以下のマウスは、解析より除外した (各群 1 匹ずつ除外)。

統計解析

相関関係は、全てピアソンの相関係数により評価した。また、ダイナミック SPECT 撮像と臓器摘出法における脳部位間の放射能集積量の比較、および、臓器摘出法によりフィゾスチグミン投与の影響を調べた実験では、一元配置分散分析及び Tukey 法の多重検定を用いて評価した。 (-)ニコチン負荷 SPECT 撮像とフィゾスチグミン負荷 SPECT 撮像では、Paired *t* 検定を用いて、薬物負荷前後の二群の比較を行った。その他の有意差検定には、Student の *t* 検定を利用した。*P* 値が 0.05 以下の際に有意差ありと判定し、データは平均±標準偏差 (SD) で表した。

1.3 結果

放射性ヨウ素標識 5IA の合成

[$^{123/125}$I]5IA の標識合成は Fig. 8 に示す方法に従って行った。すなわち、酸性条件下で (**1**) に酸化剤であるクロラミン T を作用させ、トリメチルスズ一放射性ヨウ素交換反応を行い (**2**)、その後脱保護反応を行ったところ、[^{123}I]5IA (**3**) および [^{125}I]5IA (**3**) を放射化学的収率 54%および 44%で得た。放射化学的純度はそれぞれ 96%以上、および 97%以上であった。合成開始から HPLC により精製を終えるまでに要した時間は 2.5 時間であった。

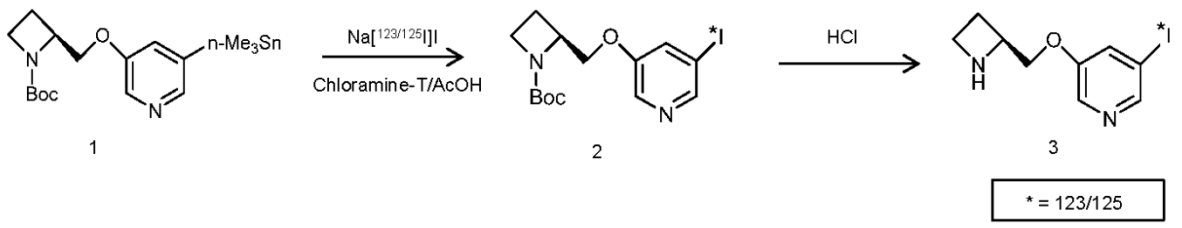


Fig. 8 Synthesis of [$^{123/125}$I]5IA

[^{125}I]5IA 投与後の脳内分布実験

[^{125}I]5IA をマウスに尾静脈より投与し、臓器摘出法により脳各部位への放射能集積を定量した。

脳各部位への[^{125}I]5IA の集積の経時的な変化を Fig. 9a に、さらに投与 30 分後における脳各部位の放射能集積を比較した結果を Fig. 9b に示す。投与 30 分後の[^{123}I]5IA の集積は、視床が最も高く、次いで線条体、海馬、大脳皮質と続き、小脳が最も低く、視床と他の脳領域で有意な差を認めた (視床 vs 皮質: $p < 0.005$、視床 vs 線条体、海馬、小脳: $p < 0.001$、Fig. 9b)。このように、α4β2-nAChR 高発現部位である視床領域に高い放射能集積を認め、集積した放射能は投与 60 分後でも滞留傾向にあった。

続いて、[^{125}I]5IA 投与 60 分後までの脳各部位への放射能集積量の対血液比を Table 3 に示す。脳血液比は良好な画像コントラストを得るための指標となる。

血液比が最も高かったのは投与 60 分後の視床（7.88）であり、投与 30 分後の視床（5.53）であった。小脳以外の脳部位では、経時的に血液比が増加し、投与 60 分後が最高値を示した。このことから、[$^{123/125}$I]5IA をマウスに投与した際には、検討したタイムポイントの中では、投与 60 分後に最も良好な画像コントラストが得られることが分かった。

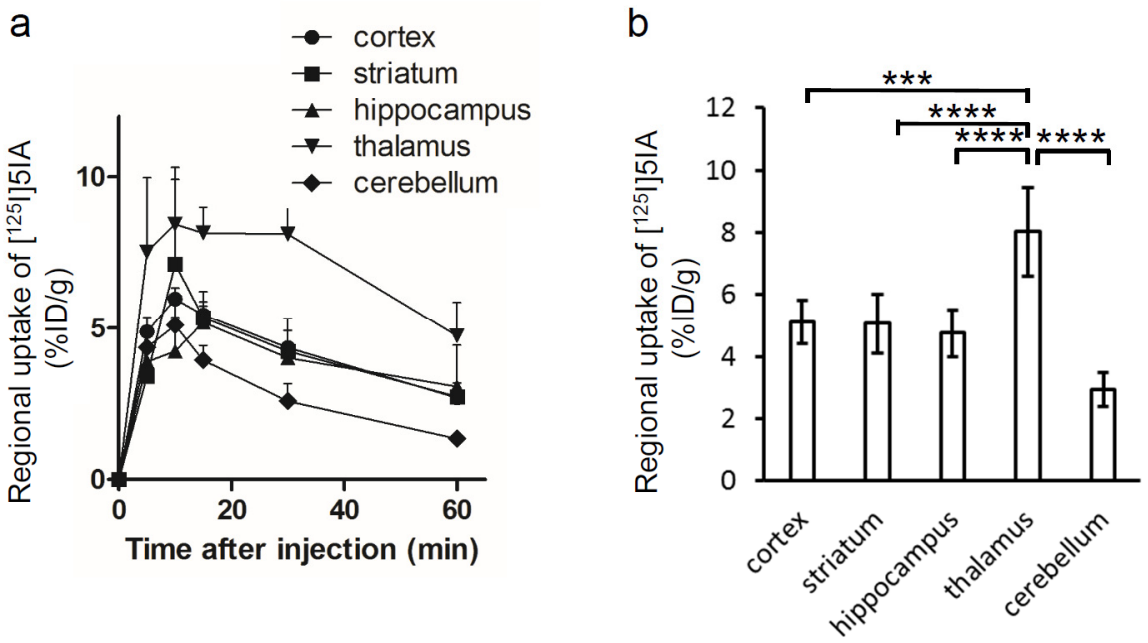


Fig. 9 Biodistribution after injection of [^{125}I]5IA

(a) Cerebral regional uptakes of [^{125}I]5IA (%ID/g) after intravenous administration as determined by the dissection method. Each point represents the mean ± SD for 4 mice. (b) Regional distribution of [^{125}I]5IA at 30min after injection extracted from Fig. 9 (a). Each bar represents an average of 4 mice and each error bar represents the SD (***P < 0.001 and ****P < 0.0001, vs. thalamus).

Table 3 Temporal changes in ratios of blood-to-brain regions

Brain regions	5	10	15	30	60
Hippocampus	0.58 ± 0.43	2.06 ± 0.88	2.65 ± 0.51	3.27 ± 0.39	4.68 ± 0.98
Cerebellum	0.65 ± 0.05	2.47 ± 0.13	2.01 ± 0.24	2.02 ± 0.28	1.90 ± 0.25
Cortex	0.73 ± 0.24	2.90 ± 0.18	2.77 ± 0.22	3.51 ± 0.35	3.84 ± 0.54
Thalamus	1.12 ± 1.22	4.10 ± 0.73	4.16 ± 0.43	5.53 ± 0.71	7.88 ± 2.02
Striatum	0.51 ± 0.42	3.47 ± 1.59	2.73 ± 0.19	3.49 ± 0.47	4.43 ± 0.86

Values are represented as the mean ± SD for four mice.

マウス頭部 MR 撮像

脳の解剖学的情報を得やすい MR 画像と SPECT/CT 画像を融合させることで、精度の高い画像解析を行うために、まず SPECT/CT 撮像に用いたマウスに対して、その数日前に頭部の MR 画像を撮像した。撮像した頭部の MR 画像の代表例を Fig. 10 に示す。T2 強調撮像では、水や脳脊髄液は水素原子が遠く離れているため、位相分散が遅くなり、高信号を呈して白く表示される。一方で、白質は灰白質より低信号を呈して黒く表示され、信号強度としては水・脳脊髄液＞灰白質＞白質の順番となる[74]。このような T2 強調撮像を行うことで、脳各部位 (皮質、視床、海馬、線条体、小脳) が形態的に判別可能となる。

また、Fig. 10 でのマウス脳 MR 画像 (coronal 断面) において、各脳領域を指定するスライス番号を下記に示す。なお、SPECT 解析で、関心領域として設定した球体の中心部のスライス位置 (ブレグマからの距離) も共に下記に示している。

皮質領域 (ブレグマ + 2.62 mm)：No. 3
線条体領域 (ブレグマ + 0.145 mm)：No. 9
海馬、視床領域 (ブレグマ - 2.055 mm)：No. 11
小脳領域 (ブレグマ - 5.855 mm)：No. 23

キャリブレーション値の算出

SPECT 撮像における絶対定量を可能にするために、本実験で使用した SPECT/CT 装置を用いて、ファントムの SPECT 撮像を行い、キャリブレーション値を算出した結果を Fig. 11 に示す。

1 フレームが 10.6 分の SPECT 撮像の場合は、キャリブレーション値が 0.016 となり (Fig. 11a)、1 フレームが 32 分の SPECT 撮像では、キャリブレーション値が 0.0453 となった (Fig. 11b)。また、各条件の SPECT 撮像により得られた検量線は、相関係数が 0.99 以上と良好な直線性を示した。さらに、本研究の解析で得られた SPECT 画像のシグナル強度は 1 フレームが 10.6 分の SPECT 撮像の場合は 1.82～38.6、 1 フレームが 32 分の SPECT 撮像では 0.99～62.0 であり、

直線性が担保された範囲内に収まっていた。これらの結果より、本実験で使用した SPECT 撮像装置で得られた画像強度から、放射能強度の定量値を算出できる妥当性が示された。得られたキャリブレーション値を用いて、Fig.12～17 および、Fig.26 の画像解析を行った。

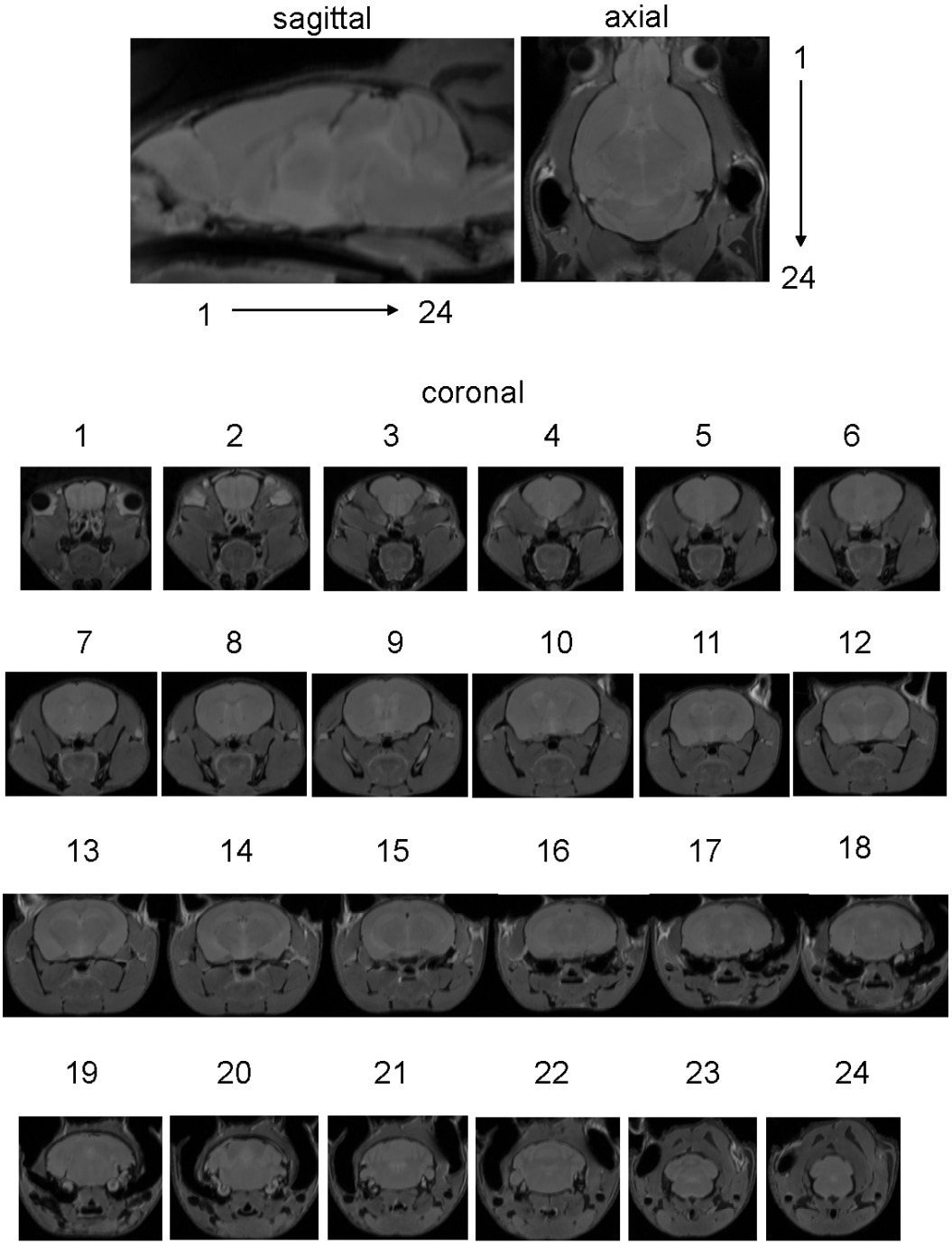


Fig. 10 MR imaging in each brain region

MR images were obtained several days before [^{123}I]5IA-SPECT imaging. Representative T2 weighted sagittal, axial and coronal images were shown.

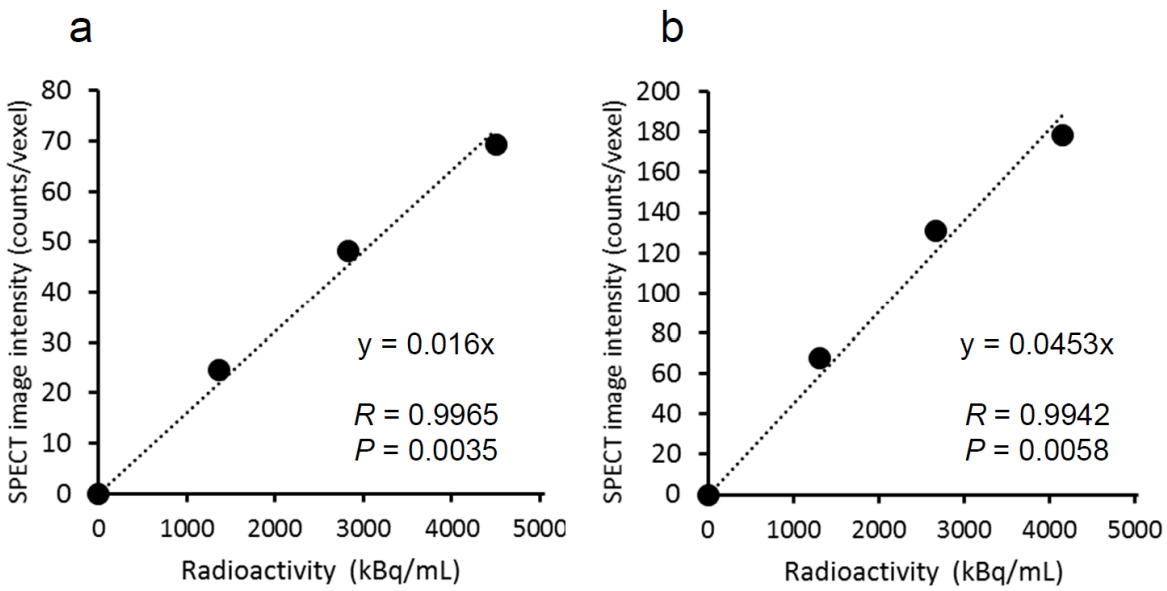


Fig. 11 Calibration curve for ^{123}I using small animal SPECT

X-axes represent radioactivity of phantoms filled with ^{123}I solution that were measured by γ-counter. Y-axes indicate SPECT image intensity that were acquired with (a) 40 s per projection and (b) 120 s per projection. The correlation coefficient (R) was (a) 0.9965 and (b) 0.9942, indicating a significant correlation between the two parameters (a: $P = 0.0035$ and b: $P = 0.0058$).

[^{123}I]5IA 投与後の SPECT/CT 撮像実験

[^{123}I]5IA をマウスに尾静脈より投与し、インビボ SPECT 撮像を行った。

[^{123}I]5IA 投与 33 分後に得た SPECT/CT 画像の sagittal/axial 断面、および coronal 断面の連続像を Fig. 12 に示す。脳領域においては、#10～12 付近に確認できる視床領域への[^{123}I]5IA 集積が顕著であり、ついで#8～9 付近に確認できる線条体、#3～4 付近に確認できる皮質に中程度の集積があり、#22～24 付近で確認できる小脳領域への集積は少ないことが確認できる。

続いて、投与 18、33、48、62 分後に得た SPECT/CT 画像および頭部 MR 画像を Fig. 13a に示す。Fig. 13a の画像上部は α4β2-nAChR 密度が高い視床領域を含むスライスを、画像下部は α4β2-nAChR 密度が低い小脳領域を含むスライスを示している。どちらのスライスにおいても、投与 18 分後では[^{123}I]5IA が脳全体に分布している様子が確認されたが、それ以降の[^{123}I]5IA の集積量やクリアランス速度は、視床と小脳で差を認めた。つまり、小脳領域への放射能集積は低く、33 分以降では経時的かつ速やかなクリアランスを認めた。一方で、視床領域には高い放射能集積を認め、集積した放射能は投与 62 分後でも滞留傾向にあった。

また、SPECT 画像と MR 画像を融合させることで正確に設定した関心領域中の放射能強度の経時変化を Fig. 13b に示す。[^{123}I]5IA の分布には局在性が認められ、視床への放射能集積量が最も高く、ついで線条体、海馬、大脳皮質と続き、小脳への集積が最も低かった (視床 vs 皮質: $P < 0.001$、視床 vs 線条体: $P < 0.05$、視床 vs 海馬: $P < 0.01$、視床 vs 小脳: $P < 0.0001$、Fig. 13c)。

なお、その順番は臓器摘出法により調べた脳内放射能分布 (Fig. 9) と一致した。視床を除いた 4 つの脳領域では、放射能強度は投与 18 分後に最大値を示し、その後経時的にクリアランスされた。一方、視床領域の放射能強度は、投与 33 分後まで増加し、その後滞留傾向を示しつつ徐々にクリアランスされた。この結果は脳内の nAChR の密度分布の違いに起因するものと考える。つまり α4β2-nAChR 密度が高い視床領域での[^{123}I]5IA 集積は、投与初期では脳血流依存的な分布を示すが、投与 30 分後から 60 分後までは一定量が nAChR へ結合し、放射能の滞留傾向を示したと考える。

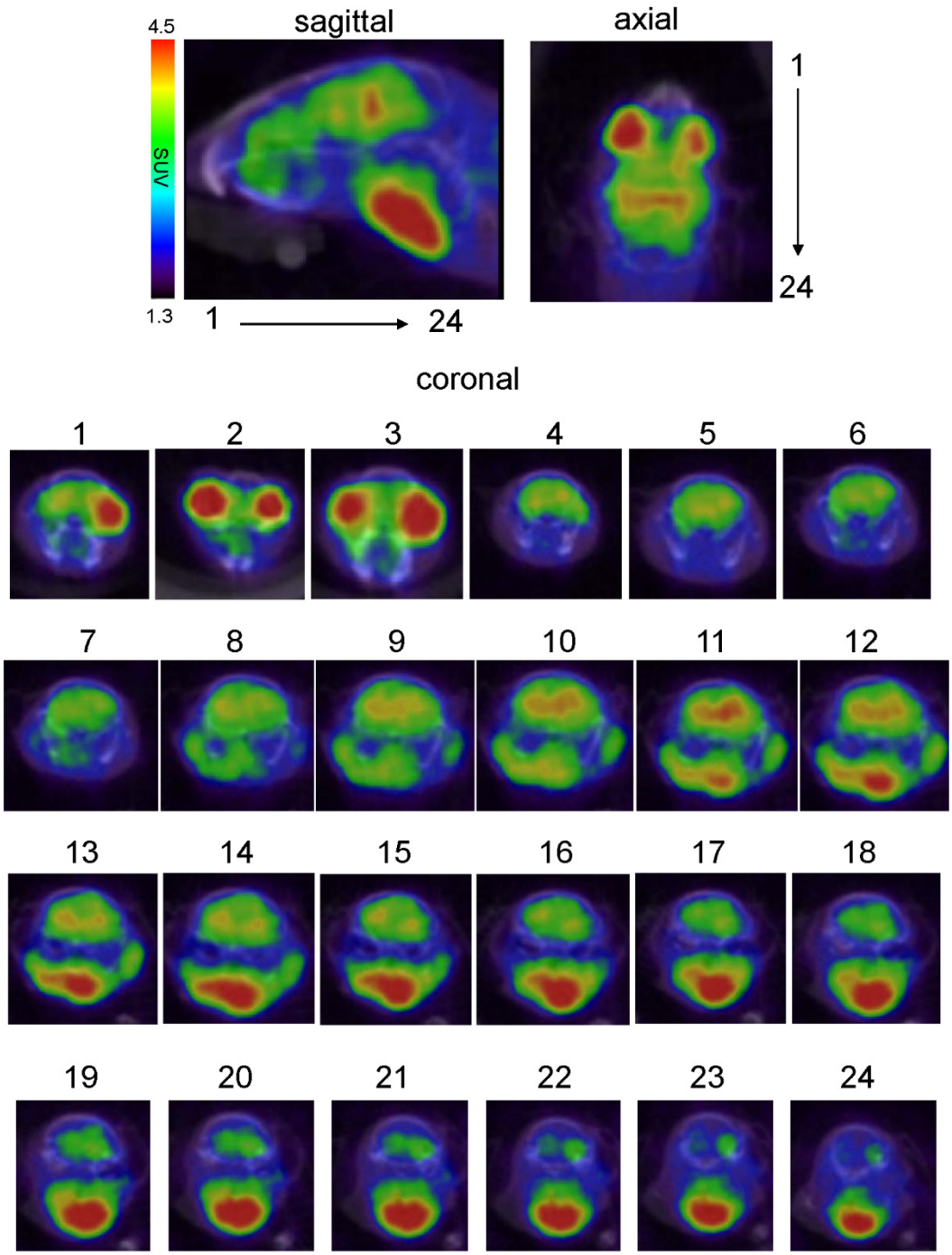


Fig. 12 SPECT imaging after injection of [^{123}I]5IA

Representative sagittal, axial and coronal SPECT/CT images obtained 33 min after injection of [^{123}I]5IA (27.3 MBq). The numbers from 1 to 24 were allocated to the serial coronal section images (slice interval; 3 mm).

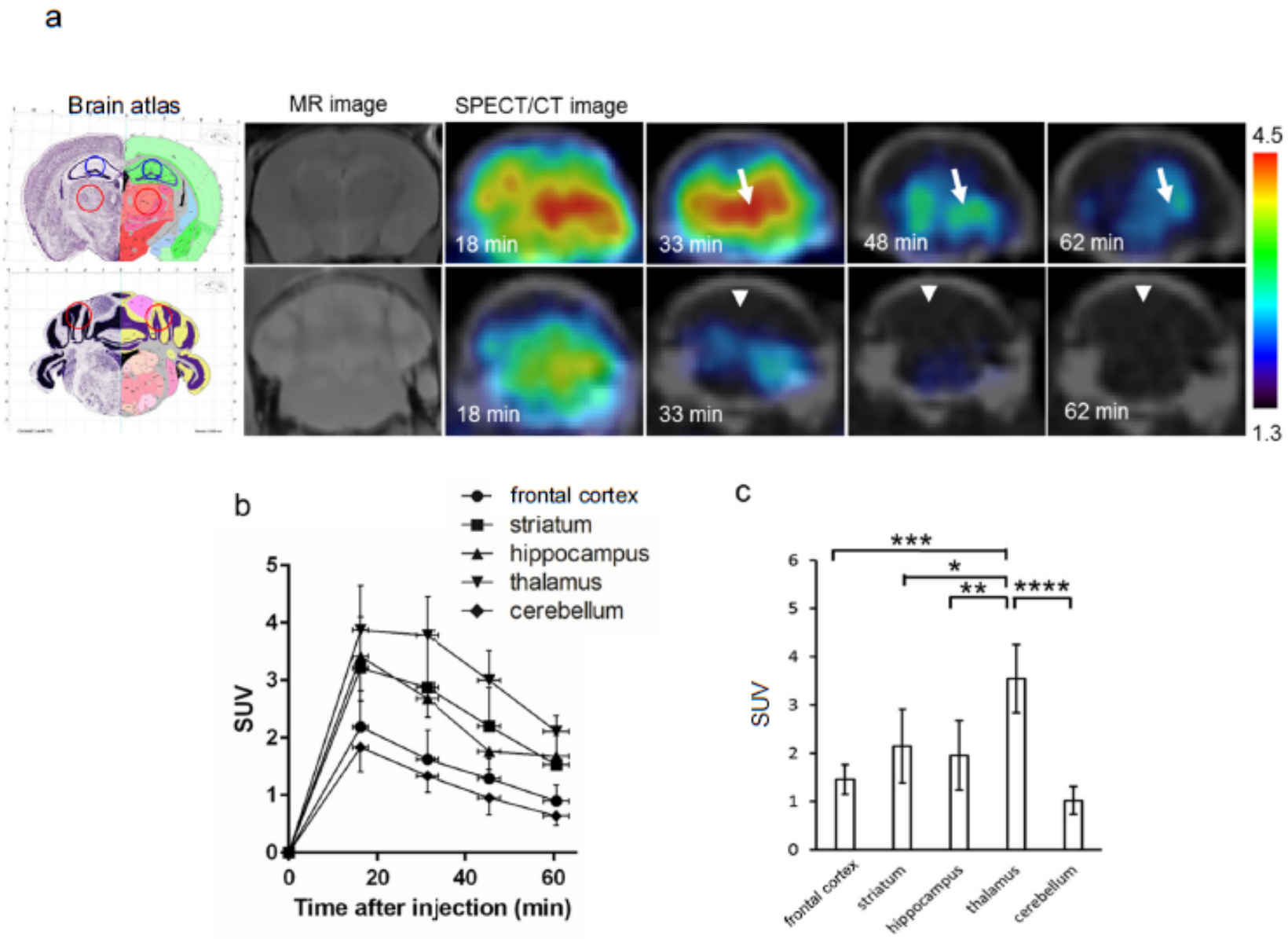

a
Brain atlas
MR image
SPECT/CT image
18 min
33 min
48 min
62 min
4.5
1.3
b
frontal cortex
striatum
hippocampus
thalamus
cerebellum
SUV
Time after injection (min)
c
SUV
frontal cortex
striatum
hippocampus
thalamus
cerebellum

Fig. 13 Dynamic SPECT imaging after injection of [$^{123/125}$I]5IA

(a) Representative MR and SPECT/CT images obtained 18, 33, 48, and 62 min after injection of [^{123}I]5IA (27.3 MBq). Upper and lower images show slices at the thalamic and cerebellar levels, respectively. Arrows indicate the thalamus and arrowheads indicate the cerebellum. The color bar indicates the level of radioactivity accumulation of [^{123}I]5IA (SUV). The mouse was maintained at1.5% isoflurane anesthesia throughout the scans. Leftmost images are coronal brain slices of *Allen brain atlas* image with placement of VOIs. (b) *In vivo* time-activity curves of [^{123}I]5IA-SPECT signal in the indicated brain regions. Each point represents the mean ± SD for 5 mice. (c) Regional distribution of [^{123}I]5IA at 30min after injection extracted from Fig. 13 (a). Each bar represents an average of 5 mice and each error bar represents the SD (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, and ****$P < 0.0001$, vs. thalamus).

[^{123}I]5IA-SPECT 解析結果と nAChR 密度の比較

SPECT 画像の定量解析結果と実際の α4β2-nAChR 密度の相関を調べる目的で、SPECT 撮像した同一個体の nAChR 密度を、[^{3}H]ニコチンを用いた ARG により測定した。なお、[^{123}I]5IA-SPECT 撮像からマウスの屠殺及び ARG 解析を行うまでの期間を 7 日間設けたのは、^{123}I (物理的半減期=13.2 時間) を十分に減衰させるためであり、放射能強度は計算上 1/(2^{12})まで減衰している。

良好な画像コントラストを得るための指標となる脳血液比は、Table 3 で示した通り、投与 30 分後及び 60 分後で高値を示した。このため、[^{3}H]ニコチンを用いて調べた α4β2-nAChR 密度と比較する SUV 値としては、投与 30 分後と 60 分後の値を用いた。マウス脳各部位において VOI 解析法により定量した SPECT 画像強度 (SUV) は、同一個体で測定した[^{3}H]ニコチン結合量と正の相関を認めた (30 min : Fig. 14a、R = 0.75、$P < 0.0001$ および 60 min: Fig. 14b、R = 0.55、$P < 0.005$)。

Pauly *et al.*によると、げっ歯類の小脳では、nAChR 発現が低いことが報告されており[71]、マウスで[^{123}I]5IA-SPECT を実施する際には、小脳領域を参照領域として利用することができると考えた。そこで、投与 30 分及び 60 分後の SPECT データを用いて算出した結合能比 (binding potential ratios; BPR = 標的部位の放射能強度/小脳領域の放射能強度) [75]を算出した。その結果、BPR もまた α4β2-nAChR 密度と正の相関を示した (30 min : Fig. 14c、R = 0.679、$P < 0.001$ および 60 min: Fig. 14d、R =0.45、$P < 0.01$)。

[^{3}H]ニコチン-ARG 実験 (Fig. 14a および b) の結果から、他の脳領域と比較して、視床領域は 2~2.5 倍程度と高い α4β2-nAChR 密度を有することを示した。このことより、[^{3}H]ニコチンを用いて調べた α4β2-nAChR 密度と SUV 値の両者における相関性を検討した場合、視床領域の結果が相関性に大きく影響を与えた可能性はある。しかし、実際に視床を除外して Fig. 14a と b のデータを用いて相関性を検討した場合は、[^{123}I]5IA をマウスに投与後 30 分と 60 分後の SUV 値とは正の相関を示した (30 分：R =0.618, $P < 0.01$、60 分：R =0.615, $P < 0.01$)。このことから、受容体密度が高い視床領域を含めた場合においても、除外した場合においても、SUV 値は実際の α4β2-nAChR 密度を反映していることが示された。

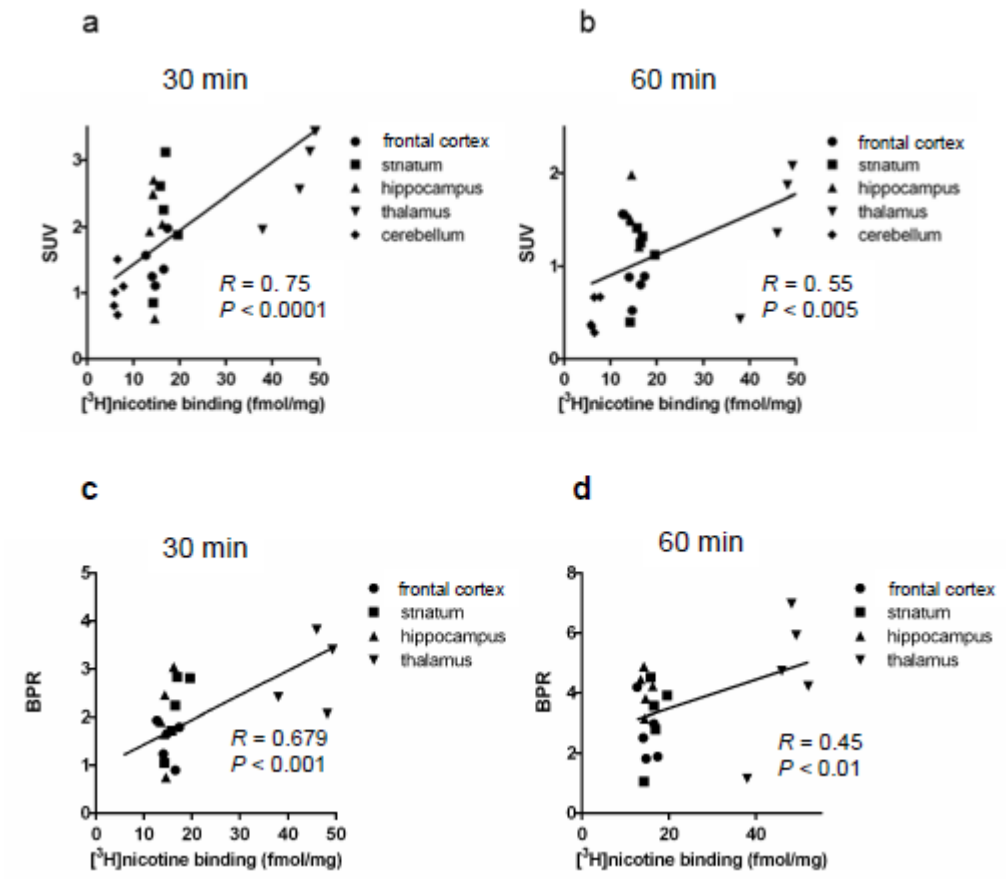


Fig. 14 Comparison of in vivo SPECT analysis with autoradiographic analysis of nAChR density determined in an identical mouse brain.

(a, b) Y-axes indicate SUVs in each brain region obtained (a) 30 min and (b) 60 min after injection of [^{123}I]5IA. X-axes represent α4β2-nAChR density as determined by [^{3}H]nicotine binding assay. The correlation coefficient (R) was (a) 0.75 and (b) 0.55 (n=5), indicating a significant correlation between the two parameters (a: $P < 0.0001$, and b: $P < 0.005$). (c, d) Y-axes indicate BPR in each brain region obtained (c) 30 min and (d) 60 min after injection of [^{123}I]5IA. X-axes represent α4β2-nAChR density as determined by [^{3}H]nicotine binding assay. The correlation coefficient (R) was (c) 0.679 and (d) 0.45 (n=5), indicating a significant correlation between the two parameters (c: $P < 0.001$ and d: $P < 0.01$).

(-)ニコチン負荷が[^{123}I]5IA-SPECT 撮像に与える影響

[^{123}I]5IA の nAChR に対する結合特異性を SPECT で評価する目的で、(-)ニコチンを負荷してインビボ競合阻害実験を行った。ベースライン撮像とニコチン負荷撮像で、[^{123}I]5IA 投与 60 分後に得られた視床領域の SPECT/CT 画像を Fig. 15a に示す。ベースライン撮像 (Fig. 15a、左図) では視床領域における画像上の SUV 値が 2 付近 (赤で示す領域) と高かった。それと比較して、(-) ニコチンを負荷することで、画像上の SUV 値が 1.5 程度まで下がった (黄色で示す領域、Fig. 15a、右図)。このことから、放射能集積が減少したことが示唆された。

各脳領域への放射能集積を定量した結果、視床領域では、(-)ニコチン負荷により放射能集積が 43%減少した (Fig. 15b、$P < 0.05$)。また、線条体、海馬、大脳皮質領域では、統計的に有意ではなかったものの、(-)ニコチン負荷により、それぞれ 31%、27%、23%減少した。一方で、小脳領域では(-)ニコチン負荷により放射能集積が 16%増加した。この変化は統計的には有意ではなく、小脳領域における放射能集積は(-)ニコチン負荷の阻害を受けないことが示唆された。

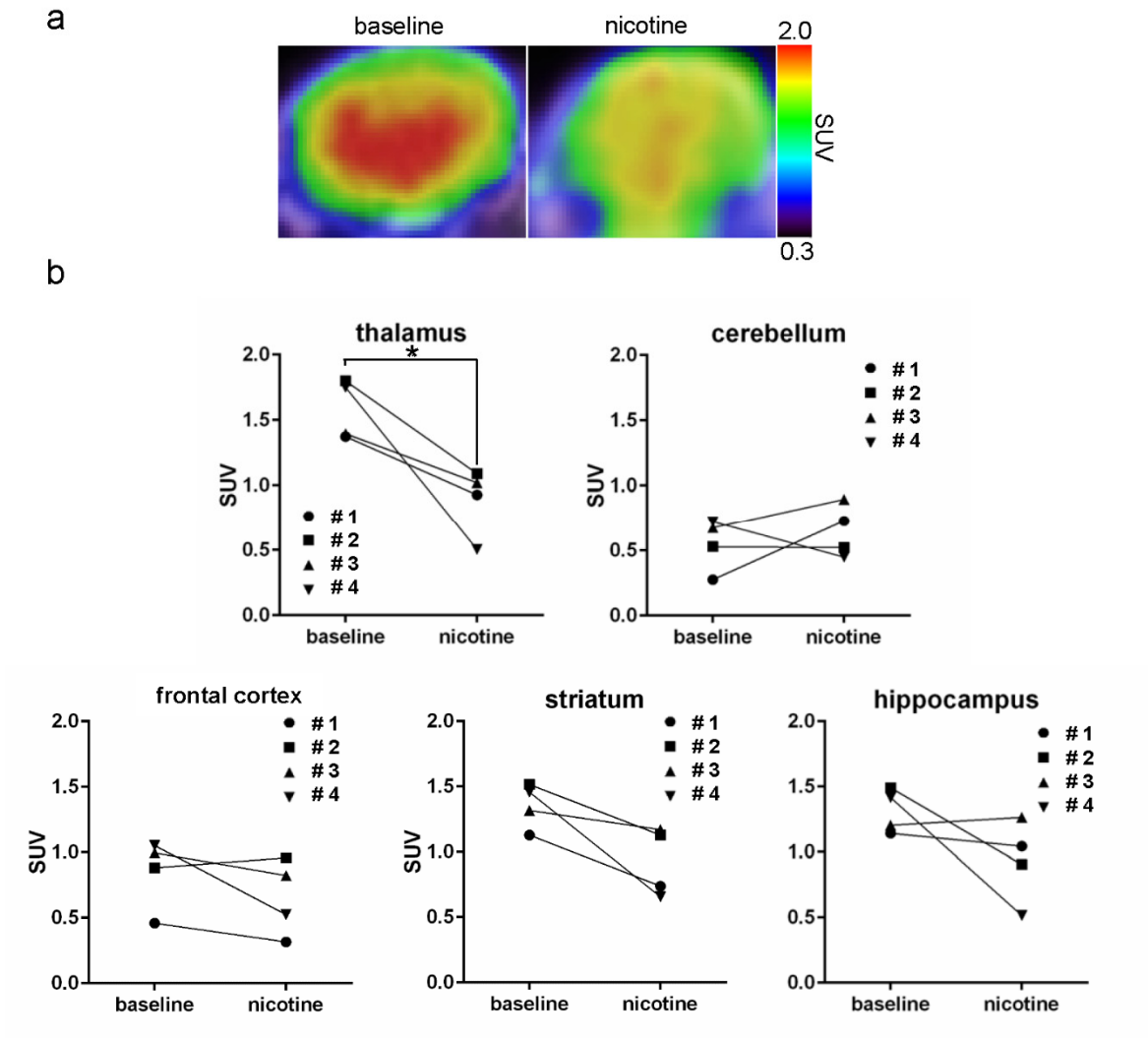


Fig. 15 Effect of nicotine pretreatment on [^{123}I]5IA SPECT images

(a) Representative SPECT/CT images at the thalamic level obtained 60 min after the injection of [^{123}I]5IA in the baseline study (*left*) and the (-)-nicotine pretreatment study (*right*). The colored bar indicates the level of radioactivity accumulation of [^{123}I]5IA (SUV). The mouse was maintained at 1.5% isoflurane anesthesia throughout the scans. (b) Effects of pretreatment with (-)-nicotine (10 mg/kg) on binding of [^{123}I]5IA in each brain region (n=4, individual identification number # 1 - 4). Y-axes indicate SUVs in the baseline and (-)-nicotine treatment studies in each brain region.

内因性 ACh 変化の追跡評価

フィゾスチグミンはコリンエステラーゼ阻害剤であり、その投与によってシナプス間隙に存在する ACh の分解が阻害され、結果として ACh 量が一時的に増加する。この内因性 ACh 量の変化を、[^{123}I]5IA-SPECT 撮像で評価できるかどうか検討した。

まず、マウスにフィゾスチグミンを投与した後の[^{125}I]5IA の集積量の変化を臓器摘出法により測定した。その結果を Fig. 16a に示す。線条体、海馬、視床の放射能集積は、フィゾスチグミン濃度依存的に減少した。特に、フィゾスチグミン (0.75 mg/kg) 投与により、線条体、海馬、視床はそれぞれ減少率が 27%、30%、43%と、統計的に有意に減少した (線条体と海馬: $p < 0.05$、視床: $p < 0.01$, Fig. 16a)。また、有意差はないものの、大脳皮質領域においてもフィゾスチグミンを投与した後の[^{125}I]5IA 放射能集積は、フィゾスチグミン濃度依存的に減少する傾向にあった。一方で、血中放射能は濃度依存的に増加し、フィゾスチグミンを 0.75 mg/kg の濃度で投与した際には、統計的に有意に増加した (Fig. 16a, $p < 0.05$)。また、小脳領域の放射能集積は、ビークル群、フィゾスチグミン 0.50 mg/kg 投与群、およびフィゾスチグミン 0.75 mg/kg 投与群でそれぞれ 3.00、3.48、および 2.95%ID/g と有意な変化を認めなかった。

続いて、0.75 mg/kg のフィゾスチグミンをマウスに投与し、投与前後で SPECT 画像強度を比較した結果を Fig. 16b に示す。ビークル投与撮像と比較して、フィゾスチグミン負荷撮像では、視床領域の放射能集積が有意に減少した (40%、$P < 0.05$)。また、皮質、線条体、海馬、小脳領域においては、統計的には有意ではなかったものの、フィゾスチグミン投与により放射能集積が低下する傾向を示した。

以上の実験より、フィゾスチグミン負荷により視床領域の放射能集積が有意に減少した結果が、臓器摘出法 (Fig. 16a) [^{125}I]5IA-SPECT 撮像 (Fig. 16b) で一致したことから、内因性 ACh 量の変化を[^{123}I]5IA-SPECT 技術により体外から非侵襲的な測定に成功した可能性を示唆した。

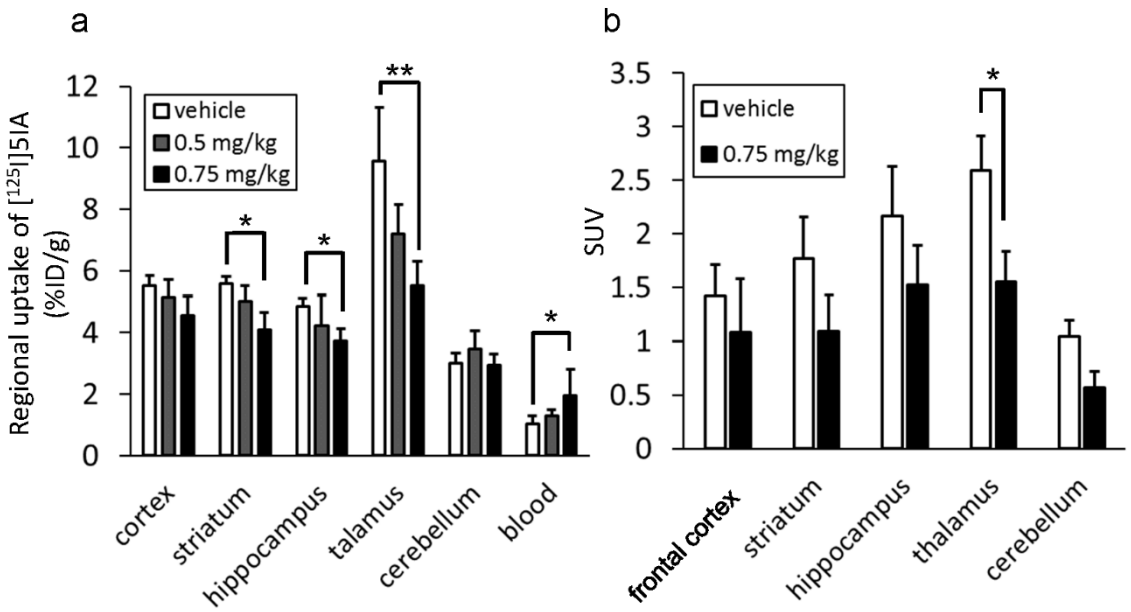


Fig. 16 The effect of pretreatment with physostigmine on [$^{123/125}$I]5IA accumulation

(a) The effect of different doses of physostigmine on [^{125}I]5IA accumulation in each brain region as determined by the evisceration method. Each column represents an average of 4 mice and each error bar represents SD (*P < 0.05, **P < 0.01 vs. vehicle). (b) The effect of physostigmine (0.75 mg/kg) on [^{123}I]5IA accumulation in each brain region determined by the VOI analysis. Each bar represents an average of 4 mice and each error bar represents the SD (*P < 0.05 vs. vehicle).

Tg2576 マウスにおける[^{123}I]5IA の集積と nAChR 密度との比較

病態モデル動物で生じる α4β2-nAChR 密度変化を[^{123}I]5IA-SPECT で評価できるか調べる目的で、AD モデルマウスである Tg2576 マウスとその野生型マウスを用いて SPECT 撮像と nAChR 密度測定を行い、両者を比較した。SPECT の解析結果を Fig.17a に示す。野生型マウスと比較して、Tg2576 マウスでは全体的に集積が高い傾向にあり、特に視床では野生型よりも 22%の集積増加を認めた ($P < 0.05$)。また、[^{3}H]ニコチンを用いて測定した nAChR 密度を Fig. 17b に示す。この結果でも、Tg2576 マウスの方が[^{3}H]ニコチン結合量が高い傾向を認め、特に視床の結合増加率は 28%であった ($P < 0.05$)。これらの結果は、Tg2576 マウス脳内に存在する nAChR の発現量増加に起因している可能性があり、その増加を[^{123}I]5IA-SPECT で非侵襲的に捉えることができることを示唆した。

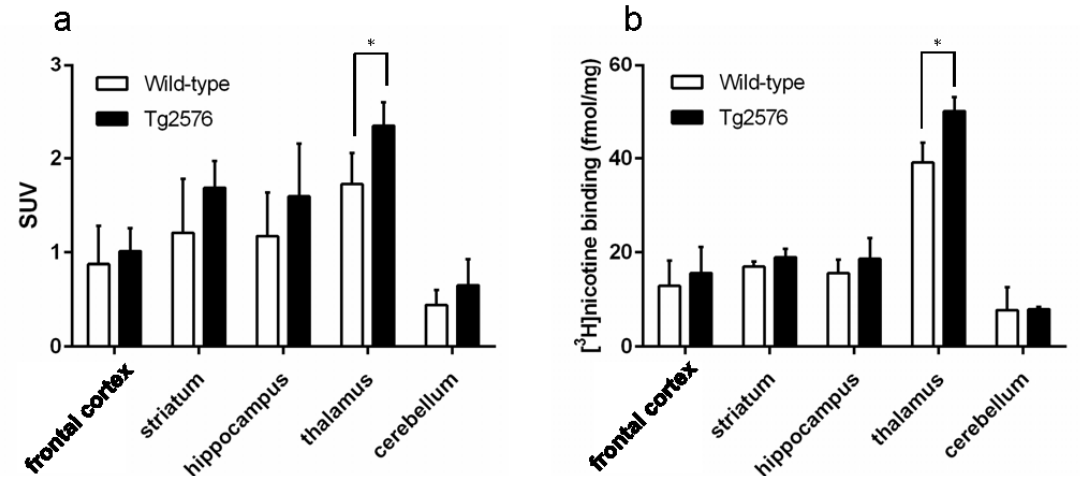


Fig. 17 Changes in [^{123}I]5IA binding and nAChR density in mouse model of Alzheimer's disease

(a) *In vivo* [^{123}I]5IA-SPECT signal in brain regions of Tg2576 and wild-type mice. Each column represents an average of 4–5 mice and each bar represents the SD ($P < 0.05$ vs. wild-type). (b) Quantitative values of [^{3}H]nicotine binding in each brain region of Tg2576 and wild-type mice 7 days after SPECT/CT imaging. Each column represents an average of 4-5 mice and each bar represents the SD ($P < 0.05$ vs. wild-type).

Tg2576 マウスにおける新奇物体認識試験

新奇物体認識試験は、実験動物の物体認識能力及び物体記憶能力を評価する試験法である。13 ヶ月齢の Tg2576 マウス及び同月齢の野生型マウスに対して新奇物体認識試験を行い、その結果より算出した EP 値 (認知機能の指標) を Fig. 18 に示す。野生型と比較して、Tg2576 マウスの認知機能に顕著な変化は認めなかった。この結果より、13 ヶ月齢の Tg2576 マウスは、物体認識能力は低下していないことが示唆され、AD 症状としては軽度認知症の前段階であると考えられる。

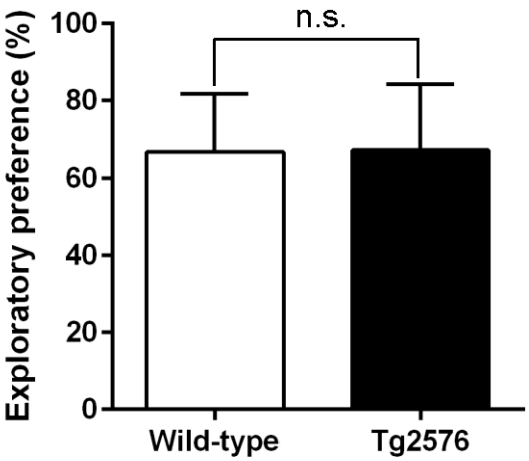


Fig. 18 Novel object recognition test in mouse model of Alzheimer's disease

No significant difference was observed between two groups. Each column represents an average of 7 mice and each bar represents the SD.

1.4 考察

本章ではマウス脳における α4β2-nAChR の[^{123}I]5IA-SPECT インビボイメージング法の確立を行った。既存の α4β2-nAChR 結合放射性分子プローブである[^{123}I]5IA を投与してマウス脳の SPECT 撮像を行い、nAChR 密度を反映した画像が得られるか検討した (Fig. 14a および b)。次に、 (-)ニコチンを負荷してインビボ競合阻害実験を行うことで、[^{123}I]5IA の nAChR への結合特異性を SPECT 撮像により評価した (Fig. 15)。さらに、Tg2576 マウスにおける nAChR 密度変化を[^{123}I]5IA-SPECT 撮像により捉えることができるのか否かを検討した (Fig. 17)。

C57BL/6 マウスにおける[^{123}I]5IA-SPECT 撮像の結果、マウス脳内における nAChR 高密度部位である視床とそれ以外の領域で、明瞭なコントラストを示す画像が得られた (Fig. 13a)。マウスの脳は長径 2 cm 程度と小さく、脳各部位も近接していることから、それぞれの部位への放射能集積を正確に定量するためには、SPECT 画像へどのように VOI を設定するかが非常に重要な要素となる。小動物用 SPECT に付属されている CT では、マウス脳の細かな領域を同定することは不可能であるため、本研究では、脳の解剖学的情報を得やすい MR 画像と SPECT/CT 画像を融合させることで、精度の高い画像解析を行った。さらに、線源の体積が小さい場合、実際の放射線量よりも低く見積もってしまう核医学画像の特徴である部分容積効果の影響を排除するために、解剖学的にその領域に内接する大きさの球状 VOI を設定した。しかしながら、SPECT 撮像における空間分解能の限界から、海馬領域および線条体における SUV は過剰測定されている可能性がある。臓器摘出法で評価した[^{125}I]5IA の脳内分布では、海馬および線条体への放射能集積は、大脳皮質と同等であった (Fig. 9a)。しかしながら、SPECT 撮像で定量した海馬および線条体領域の SUV 値は大脳皮質のものよりも高く（Fig. 13b)、臓器摘出法との間に乖離を認めた。これは視床付近における高い放射能集積が、近傍組織である海馬と線条体領域の SUV 値に影響したことが原因だと考えられる。このような SPECT 機器における限界点はあるものの、[^{123}I]5IA-SPECT 画像上の脳各部位における放射能集積量 (SUV) は、同一個体で測定した nAChR 密度と有意な相関を認めた (Fig. 14a および b)。このことから、マウス脳の[^{123}I]5IA-SPECT 画像は、nAChR 密度を反映していることが示さ

れた。

nAChR に結合する (-)ニコチンの事前投与により、マウス脳内の[^{123}I]5IA 集積が顕著に阻害されたことから、[^{123}I]5IA の nAChR に対する結合特異性を SPECT 撮像により確認できた (Fig. 15)。Saji *et al.*が行った、[^{3}H]シチジンを使った競合阻害実験で得られた 5IA の Ki 値は 0.37 nM であったのに対して、 (-)ニコチンの Ki 値は 2.71 nM であった[58]。すなわち、(-)ニコチンの α4β2-nAChR に対する親和性は 5IA の約 1/7 であるが、(-)ニコチン負荷実験では、[^{123}I]5IA の 20,000 倍程度の量の (-)ニコチンを投与していることから、脳内での[^{123}I]5IA の結合を十分に阻害できる投与量であると考えられる。実際に、Saji *et al.*がラットに[^{125}I]5IA と(-)ニコチンを投与して行ったインビボ競合阻害実験では、[^{125}I]5IA 集積が、線条体領域および大脳皮質領域では 80%程度、視床領域では 90%程度が低下したことが報告されている[70]。本研究で行った[^{123}I]5IA-SPECT 撮像をもとに算出した (-)ニコチンによる[^{123}I]5IA 集積低下率は視床、線条体、海馬、大脳皮質領域では 43%、31%、27%、23%であり(Fig. 15)、前述の先行研究よりも少なかった。この一因としては、麻酔の影響が考えられる。麻酔下では血流が低下することから、覚醒下よりも放射性プローブの分布・排泄速度が緩やかになることが報告されている[76]。それゆえ、イソフルラン麻酔下で行った今回の SPECT 撮像では、脳からの[^{123}I]5IA のクリアランスが緩やかとなった結果、 (-)ニコチン負荷後の[^{123}I]5IA 集積量の減少率が、覚醒下で行われた Saji *et al.*の報告[70]よりも低くなったと考えられる。

本研究の限界としては、SPECT イメージングデータ (脳内放射能) と血中放射能を用いた、[^{123}I]5IA の速度論的解析を実施していない点がある。ヒトや大型動物を対象にした PET/SPECT 撮像の場合は、同時に採血を行うことで、トレーサーの速度論的解析を行うことが可能となり、トレーサーの分布容積 (Distribution volume) や結合能 (Binding potential) といった定量パラメータを算出することができる[60, 77]。しかし、マウスの場合、総血液循環量は 2 mL 程度と少ない。一般に総血液循環量の 20%を失うと虚血による生理機能不全になると言われており、マウスの場合 200 μL 程度の採血が限界である。このため、PET/SPECT 撮像中の経時的な採血は困難である。また、本研究では数分ごとの短い撮像スパンでの経時的な放射能集積変化を捉えることができていない。こ

れは、コリメーターと検出器が被検体の周囲を回転するのに最短で10分を要し、小動物用 SPECT 撮像装置を用いた解析における原理上の限界のためである。それを克服するための半定量的動態解析法のひとつとして、イメージング対象分子が発現していない領域を参照領域として利用する、無採血動態解析方法がある。Pauly *et al.*によると、げっ歯類の小脳では、nAChR 発現が低いことが報告されており[71]、実際に本研究で (-)ニコチンを前投与により、小脳領域における[^{123}I]5IA の集積は 16%増加したが、この変化は統計的には有意ではなく、小脳領域における放射能集積は(-)ニコチン負荷の阻害を受けないことが示唆された(Fig. 15)。そこで、マウスで[^{123}I]5IA-SPECT を実施する際には、小脳領域を参照領域として利用することができると考えた。他文献においても、ラット脳 nAChR の PET 撮像をした際に、小脳領域を参照領域に利用して、半定量パラメータである結合能比 (BPR) を算出している報告がある[78]。実際に、我々の SPECT 実験で算出した脳各部位における BPR も、SUV 同様、同一個体で測定した nAChR 密度と有意な相関を認めたことから (Fig. 14c および d)、BPR を用いることで SPECT 撮像における nAChR 密度の半定量解析の可能性を示した。

また本研究では、マウス脳内の α4β2-nAChR 密度を定量するために[^{3}H]ニコチンを使用した (Fig. 14a-d)。[^{3}H]ニコチンは α4β2-nAChR だけでなく、α3β2-および α3β4-nAChR にも結合する[79]。げっ歯類の視床、海馬、大脳皮質、線条体に発現する nAChR サブタイプの中で、α4β2-nAChR が 72%以上を占めることが報告されている[80]。このため、これらの領域では、[^{3}H]ニコチンの結合量は主に α4β2-nAChR 発現量を反映していると考えられる。しかし Perry *et al.* によれば、小脳領域に発現する nAChR の 51%は α4β2 サブタイプであるが、残り 49%は α3β4 サブタイプであるとされている。このため、小脳領域では α4β2-nAChR 密度が過剰評価されている可能性はある。しかし他領域と比較して、小脳領域に発現する nAChR 自体が少ないため、影響は大きくはないと考える。

フィゾスチグミンは、可逆的アセチルコリンエステラーゼ阻害薬の一種である。作用は強力であるが、生体内半減期が短く、末梢性の副作用が強いため、現在は臨床適用されていない。アセチルコリンエステラーゼ阻害薬は、シナプス間隙中の ACh がコリンと酢酸に加水分解されるのを阻害する。これにより、シナプス間隙に存在する ACh 濃度が上昇する。Gotti *et al.*はフィゾスチグ

ミン (0.5 μg/kg) をラットに腹腔内投与した際に、シナプス間隙中の ACh 濃度が投与 15 分後の時点で 130%増加することを報告している[81]。また Takada *et al.* は、ヒヒに対してフィゾスチグミン (2.0 μg/kg) を 5 μL/min で持続投与した際に、投与前と比較して皮質細胞外液中の ACh が 276%増加したことを報告している[82]。これらのように、フィゾスチグミン投与で ACh 濃度が増加することは示されているものの、本研究で用いた経路や濃度でフィゾスチグミンを投与した際に (Fig. 16)、シナプス間隙の ACh 濃度がどの程度増加するのかは不明である。Saji *et al.* によると、ラット粗シナプス膜画分を用いて評価した ACh の Ki 値は 41 nM であり、5IA の Ki 値は 0.4 nM であった[58]。このように nAChR への親和性が 5IA よりも低い ACh が、[^{123}I]5IA の nAChR への結合を阻害したかどうかは、シナプス間隙中の ACh 量を測定し、その濃度の ACh を用いたインビトロ競合阻害実験などで実証する必要がある。

Tg2576 マウスは K670N および M671L 変異を含むヒト由来変異型アミロイド前駆体タンパク質遺伝子を改変させ、アミロイド前駆タンパク質 (APP) の脳内存在量が増加したモデルである[68]。今回の研究では、Tg2576 マウスの視床領域での[^{3}H]nicotine の結合が増加した (Fig. 15b)。視床領域に発現する nAChR の 90%以上が α4β2 サブタイプであることから[83]、この[^{3}H]nicotine の結合量増加は α4β2-nAChR の発現量増加を反映したものである可能性が考えられ、その変化を SPECT/CT 撮像により捉えることに成功した。同一個体で測定した脳 nAChR 密度変化 (Fig. 15b) と、SPECT/CT 撮像により非侵襲的に得た信号強度変化 (Fig. 15a) が一致したことから、[^{123}I]5IA-SPECT は、Tg2576 マウスにおける受容体発現量の変化を捉えるのに十分な感度を有していることを示唆した。その一方で、Tg2576 マウスの視床領域での[^{3}H]ニコチンの結合量が増加した結果 (Fig. 15b) および[^{123}I]5IA-SPECT の画像強度が増加した結果 (Fig. 15a) とは相反して、AD 患者では nAChR 密度が低下していることが報告されている[61, 64] 。この乖離理由の一つとして、Tg2576 マウスで生じている病理変化が、AD 病態の中でも特に早期段階の病状である可能性が考えられる。例えば、Tg2576 マウス[67]と早期の AD 病態を示す患者[84]では糖代謝の亢進が認められる。その一方で、重度の AD 病態を示す患者では糖代謝能の低下が報告されている[85]。さらに今回の実験で用いた 13 ヶ月齢の Tg2576 マウスでは、新奇物体認識試験

で認知機能の低下は確認されず(Fig. 15)、Jacobsen *et al.*によると老人斑の形成も認められていない[86]。このため、α4β2-nAChR の発現量増加は早期の AD 病態を示す患者における病態進行の機能的役割を担っている可能性がある。今後、[^{123}I]5IA-SPECT 撮像はヒト疾患関連遺伝子を改変させた遺伝子組み換えマウスにおける α4β2-nAChR の発現量の変化をインビボで評価するための有力な方法のひとつになり得ることが示唆された。

本章の結果よりマウス脳における（Ⅰ）[^{123}I]5IA-SPECT の画像強度は α4β2-nAChR 密度を反映していること (Fig. 14a-d)、そして（Ⅱ）[^{123}I]5IA-SPECT の画像強度は α4β2-nAChR に特異的であること (Fig. 15)、さらに（Ⅲ）内因性 ACh 量の変化を[^{123}I]5IA-SPECT 技術により体外から非侵襲的に測定可能であること (Fig. 16) 、(Ⅳ) Tg2576 マウスにおける nAChR の発現量増加を、[^{123}I]5IA-SPECT で非侵襲的に捉えることができる可能性 (Fig. 17) を示した。これらの結果から、[^{123}I]5IA-SPECT イメージングにより、マウス脳内の nAChR の密度分布を体外から非侵襲的に測定できる可能性が示された。今後、様々な疾患モデルマウスを用いて、各疾患と nAChR の関係性を解明する研究への応用が期待される。本章で得た知見は、生理学的・病態学的機能を解明する技術の一つとして、臨床・創薬分野に貢献できると考えられる。

第 2 章

アルツハイマー病モデルマウスにおける症状進行度を反映する画像バイオマーカー標的としてのニコチン受容体の有用性の評価

2.1 背景・目的

緒言で述べたように、脳内に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR、ニコチン受容体) はα4β2とα7サブタイプがその大部分を占めている。α7サブタイプは、認知機能の中でも特に記憶や学習に重要な働きを司り[2]、ADの中核症状に主に関与する。α4β2サブタイプは、認知機能の中でも特に物体認識に重要な役割を担うだけでなく、注意力や情動関与し、ADの周辺症状に関連が深いと報告されている[8]。間接的または直接的にnAChRを標的とした治療薬が一定の有効性を認めていることから、nAChRがAD病態において中核症状や周辺症状に関して、重要な役割を担っていることが示唆される。このため、α4β2-およびα7-nAChRの生理機能や病態との関連を解明することが、臨床診断や薬理学的観点からも強く求められている。

AD患者のnAChR密度を測定した先行研究が複数実施されており、AD患者ではnAChR密度が低下しているとする報告[61, 64]がある一方で、nAChRの密度変化は生じていないとする報告[65]もある。剖検脳を用いた免疫組織化学的検査では、新皮質や海馬領域のα4β2-nAChR陽性細胞が減少していることが報告されており[9, 10]、先行研究の大多数は受容体減少を唱えている。しかし、その受容体減少が認知機能低下に伴い生じる現象なのかという、認知機能との相関性は未だに明らかとなっていない。そこで、同一個体での繰り返し評価や長期にわたる経時的変化の観察を可能にする核医学分子イメージング技術を用いて、認知機能発症前後におけるnAChRの機能変化・維持をインビボの状態で解析することができれば、症状重篤度の客観的把握や進行のメカニズムの解明につながる知見を得ることができると考えた。臨床研究の場合、環境因子や研究デザインにより、得られる結果が異なり、その解釈が困難となることがある。一方で、現在、ヒト疾患に関連する遺伝子を選択的に改変することで、その病態を反映させた数多くの遺伝子組み換え動物 (特にマウス) が開発されている[66]。このような遺伝子改変モデルマウスを用いて、生体内分子の評価を行うことで、改変遺伝子の影響をより選択的かつ精度高く追跡することが可能になる。

そのようなモデルマウスとして、本研究ではAPP/PS2マウスを使用した。こ

れは、K670N および M671L 変異を含むヒト由来変異型アミロイド前駆体タンパク質遺伝子発現（Tg2576, APP）マウスと、N141I 変異を含むヒト変異型プレセニリン発現（PS2）マウスを交配させて生まれた二重遺伝子改変マウスである。このマウスは、アミロイド斑の形成や認知機能低下といった AD 病態が、Tg2576 マウスよりも早く現れることが報告されている[87]。第 1 章で使用した 12 ヶ月齢の Tg2576 マウスでは、認知機能の低下を認めなかったが、APP/PS2 マウスは、12 ヶ月齢ではすでに認知機能の低下が生じることが報告されている[87]。このように、比較的早い月齢から経時的にアミロイド斑の蓄積が生じ、認知機能の低下を示すことから、APP/PS2 マウスは、AD 病態の症状進行に伴って生じる脳神経活動の変化を調べることを目的にしている本研究に適したモデルであると考えた。

そこで第 2 章では、AD の症状重篤度の客観的把握や病態解明に繋がる知見を得ることを目的として、α4β2-nAChR 結合放射性分子プローブである[$^{123/125}$I]5IA 及び神経活動の指標となる脳糖代謝率測定用プローブである[^{18}F]FDG を用い、ヒト AD 病態模倣マウスである APP/PS2 マウスの認知障害発症前後における、nAChR 発現量と脳糖代謝率の変化を追跡評価することを計画した。本章の目的、結果についての簡単なグラフィカルアブストラクトを Fig. 19 に示す。

[^{18}F]FDG はグルコースの 2 位の水酸基を陽電子放出核種である ^{18}F で置換したアナログ体であり、グルコースと同様に細胞内に取り込まれることから脳内糖代謝率を測定することができ、脳神経活動の活発さの指標となる[88]。これらの放射性分子プローブの検出方法としては、インビボ SPECT/PET 評価に応用する前段階として、より検出感度の高い ARG 解析を行い、APP/PS2 マウスにおける[^{18}F]FDG と[^{125}I]5IA の脳内分布の変化を経時的に評価した。さらに、同月齢の APP/PS2 マウスを用いて、ウエスタンブロッティングと RT-PCR を行い、α4β2- および α7-nAChR のタンパク質および mRNA の発現量を定量した。そして、第 1 章で確立した手法を用いて、APP/PS2 マウスと野生型マウスに対して[^{123}I]5IA-SPECT 撮像を行い、インビボの状態で[^{123}I]5IA の脳各部位での集積量を定量した。また、AD 病態における記憶障害に関与する受容体として、nAChR に加えて NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDAR) も報告されていることから[89]、NMDAR に結合する放射性リガンドである[^{3}H]MK-801 を用いたインビトロ ARG

実験も行った。

以上の内容について、本章にて詳述する。

目的

アルツハイマー病の症状進行を把握することができる
画像バイオマーカー標的としてのnAChRの有用性を評価

対象：ADモデルマウス (APP/PS2マウス)

APP/PS2マウス（月齢）	2	6	12	16
認知機能（新奇物体認識機能）	—	—	↓	↓
α4β2-nAChR密度	—	—	↓	↓
α7-nAChR密度	↑	↑	↑	↑
NMDAR密度	—	—	—	—
糖代謝能	—	—	—	↓（傾向）

AD病態を客観的に評価する手法の開発に有益な知見を提供

Fig. 19 Graphical abstract of this chapter.

Abbreviation: nAChR; Nicotinic acetylcholine receptor, NMDAR; *N*-methyl-D-aspartic acid receptor, AD; Alzheimer's disease

2.2 実験方法

試薬・機器

[^{125}I]5IA は、第 1 章に示す方法で合成した。チオフラビン S は SIGMA 社より購入した。放射能測定には、Aloka 社製キュリーメーター (IGC-3) を使用した。ARG 実験には、富士フォトフィルム社製イメージングプレート (Fuji Imaging Plate BAS-SR) を用い、富士フィルム社製スキャナー (BAS5000) により画像を読み込み、画像解析には富士フォトフィルム社製の画像解析ソフト (Multi Gauge ver. 3 software) を用いた。新奇物体認識試験は、第 2 章に示す方法で行った。[^{3}H]MK-801 は American Radiolabeled Chemicals 社より購入した。

抗 α4 nAChR 抗体 (sc-5591) 及び HRP 標識抗 β アクチン抗体 (sc-47778) は Santa Cruz Biotechnology 社より、HRP 標識ロバ抗ラビット抗体 (NA934) は GE ヘルスケア社より購入し、ウエスタンブロッティングに用いた。抽出タンパク質濃度は、Thermo Scientific Pierce Biotechnology 社の BCA タンパク質定量用試薬 (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) を用いて測定した。試料の泳動には、和光純薬社製のプレキャストゲル (スーパーセップ ™ エース) 及び和光純薬社製の電気泳動層 (イージーセパレーター™) を用い、ゲルから Millipore 社製のポリフッ化ビニリデン (Polyvinyliden fluoride; PVDF) メンブレンへの転写には、Bio Rad 社製のタンク式ブロッティング装置 (ミニトランスブロット®セル) を用いた。また、ブロッキング剤 (bløk - CH ノイズキャンセリング試薬) 及び HRP 化学発光液 (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate) は Millipore 社より購入した。Bio Rad 社の CCD カメラ内蔵化学発光撮像装置 (ChemiDoc™ MP) を用いて化学発光画像を読み込み、その画像解析にはアメリカ国立衛生研究所製の画像処理ソフトウエア (Image J) を用いた。

その他の実験で利用した試薬はすべて和光純薬株式会社およびナカライテスクより購入した特級試薬を使用した。なお、全てのデータは GraphPad 社製 検定ソフト (Prism ver. 5) を用いて統計解析を行った。

動物

動物実験は岡山大学及び京都大学の両大学において、動物実験委員会及び組み換えDNA実験安全管理委員会に予め届けて遂行した (動物実験計画書承認番号：OKU2014086、OKU2015225および2015-16、組換えDNA実験計画書番号：G-0259および120024)。各委員会での承認を得た上で、それぞれの大学の動物実験ガイドラインに従って遂行した。K670NおよびM671L変異を含むヒト由来変異型アミロイド前駆体タンパク質遺伝子発現 (APP、Tg2576) マウスは Taconic社より購入し、N141I 変異を含むヒト変異型プレセニリン発現 (PS2) マウスはオリエンタル酵母社から購入した。両者を交配して生まれた二重遺伝子改変マウス (APP/PS2マウス、2-16ヶ月齢) およびその同腹仔として生まれた野生型マウスを実験に使用した。全ての飼育動物は適温、12時間の暗明サイクルを含め常に適正な飼育環境下を維持し、水・エサを自由に摂取させて飼育した。

新奇物体認識試験による認知機能評価

2、6、12、16か月齢のAPP/PS2マウス (n＝9－21) 及び野生型マウス (n＝12－21) に対して、第1章に示す方法に従って新奇物体認識試験を行った。なお、獲得試験において物体に対する総探索行動時間が 8 秒以下のマウス (各群 1-9匹) は解析より除外し、評価を行った。

脳神経機能の定量的オートラジオグラフィ解析

2、6、12、16ヶ月齢のAPP/PS2マウス及び野生型マウス (各群 n＝4) の尾静脈より[^{125}I]5IA (700 kBq) および[^{18}F]FDG (23 Mq) の混合溶液を投与し、60分後に屠殺し、全脳を摘出した。摘出した脳を凍結させ、ミクロトームにより厚さ10 μmの凍結切片を作製し、^{18}F 標準線源とともにイメージングプレートに1時間暴露することで、[^{18}F]FDGのオートラジオグラムを得た。さらに、^{18}Fが減衰した24時間後に、再び脳切片を^{125}I標準線源とともにイメージングプレートへ20時間暴露することで、[^{125}I]5IAのオートラジオグラムを得た。

マウス脳アトラス[72]を参照しながら、得られたオートラジオグラム上の皮質、視床、海馬、線条体、小脳部位に2つの円状の関心領域を設定し、そこへ集積した放射能を定量した。

関心領域を設定する際に参考にした脳アトラス図上に、ROI 解析時に設定した円状の関心領域を模式的に重ねた画像を Fig. 20 に示す。

線条体領域への放射能集積は、ブレグマ ＋0.145 mm のスライス位置にある尾状核・被殻を中心に円状の関心領域を設定して測定した（Fig. 20a、赤丸）。さらに、ブレグマ - 2.055 mm のスライス位置にある、側頭葉の聴覚野に関心領域を設定（Fig. 20b、緑丸）して皮質領域への放射能集積を、アンモン角第一領域 (CA1) と歯状回 (DG) 領域を含む領域に関心領域を設定（Fig. 20b、青丸）して海馬への放射能集積を、視床後核、視床前腹核および外側腹側核を含む領域に関心領域を設定（Fig. 20b、赤丸）して視床への放射能集積を、それぞれ定量した。また小脳領域に対しては、ブレグマ - 5.855 mm のスライス位置にある単小葉と小脳虫部を含む領域に円状の関心領域を設定した（Fig. 20c、赤丸）。

[^{125}I]5IA および[^{18}F]FDG の結合量 (kBq) は、得られた脳各部位の放射能強度を、^{125}I 標準線源および ^{18}F 標準線源の放射能強度から作成した検量線にフィッテイングさせて算出した。結果は各マウスの体重で補正した放射能集積量 (%ID*BW) にて評価した。以下にその算出方法を記す。放射能集積量 (%ID*BW) = 関心領域中の放射能集積量 (kBq) / (放射能投与量[kBq] / 体重 [g]) ×100。

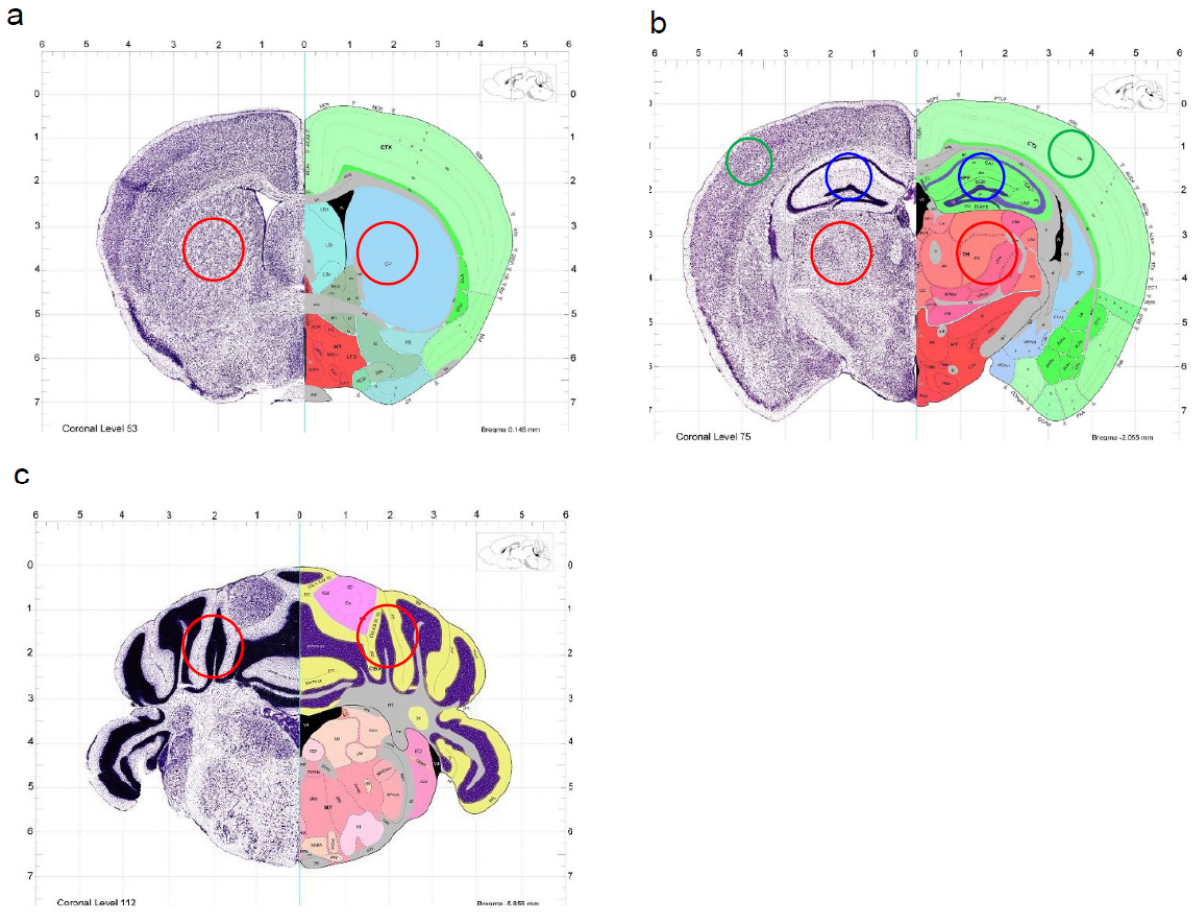


Fig. 20 The coronal brain slices of *Allen brain atlas* image with placement of ROIs.

老人斑アミロイドの組織学的観察

*脳神経機能の定量的オートラジオグラフィ解析*の際に作製した脳切片の隣接切片をチオフラビン S 溶液で染色して、老人斑アミロイドの観察を行った。すなわち、脳切片を 50%エタノール水溶液として調製した 500 μM チオフラビン S 溶液に 3 分間浸し、その後 50%エタノール水溶液にて 3 分間 (1 分×3 回) 洗浄し、乾燥させた標本を、GFP 用フィルターを装着した蛍光顕微鏡で観察した。海馬領域と大脳皮質領域の切片に対して、手動で長径 1.4 mm の円状の関心領域を設定し、染色面積を定量した。なお、解析に用いた海馬領域と大脳皮質領域はどちらもブレグマ - 2.055 mm の切片を用いた。Fig. 21 に、関心領域を設定する際に参考にした脳アトラス図上に、ROI 解析の際に使用した円状の関心領域を

模式的に重ねた画像を示す。Fig. 21 中の青丸は、海馬領域に設定した関心領域を示しており、アンモン角第一領域 (CA1) と歯状回 (DG) を含む。Fig. 21 中の緑丸は、大脳皮質領域として解析した関心領域を示しており、側頭葉の聴覚野を中心に含む。

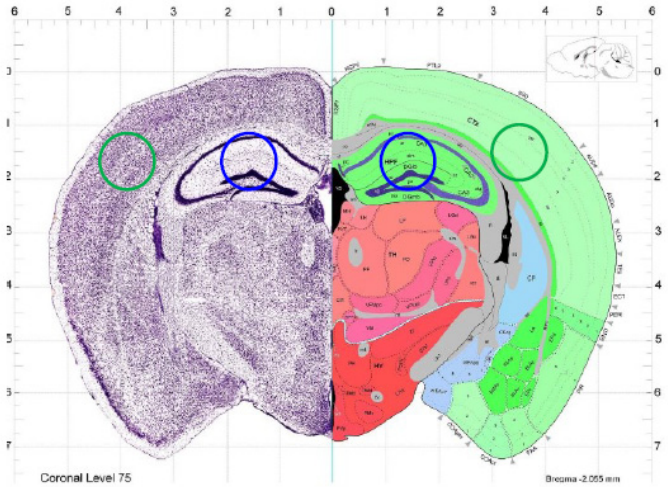


Fig. 21 The coronal brain slices of *Allen brain atlas* image with placement of VOIs.

<u>nAChR のウエスタンブロッティング解析</u>

2、12、16 ヶ月齢の APP/PS2 マウス及び野生型マウス (各群 n = 4) を屠殺後、脳を速やかに取り出し、皮質および視床を摘出した。摘出した脳組織を 1.5 mL プラスチックチューブに入れ、RIPA バッファー (1%Nonidet P-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、50 mM トリス塩酸緩衝液 [pH 7.5]、0.15M 塩化ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム[Sodium dodecyl sulfate; SDS]、1×プロテアーゼ阻害剤) を添加し、手動ホモジナイザーをその中で 60 回上下動させることでホモジナイズした。その後、30 分間 4 ˚C にて可溶化させ、4 ˚C 、15,000×*g* で 15 分間遠心分離し、その上清を採取した。得られた抽出物のタンパク質濃度は、牛血清アルブミンを標準試料として BCA タンパク質定量用試薬を用いて測定した。

総タンパク質量が 30 μg となるように調製した抽出物試料に Laemmli バッファー (5% 2-メルカプトエタノール、50 mM トリス塩酸緩衝液 [pH 6.8]、2%SDS、

8%グリセロール、0.01%ブロモフェノールブルー) を添加し、95 ˚C で 5 分間還元させた後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、PVDF メンブレンへ電気的に転写した。メンブレンを室温で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体溶液と 4 ˚C で一晩反応させた。TBS-T (0.15%Tween-20、20mM トリス塩酸緩衝液 [pH 7.5]、138 mM 塩化ナトリウム、2.7 mM KCl) で 30 分間 (5 分×6 回) 洗浄後、メンブレンは二次抗体溶液と室温で 1.5 時間反応させた。TBS-T で 30 分間 (5 分×6 回) 洗浄後、HRP 化学発光液と反応させ、CCD カメラ内蔵化学発光撮像装置にて検出した。翌日に同一のメンブレンを用いて、抗 β アクチン抗体の抗原抗体反応を行い、同様の方法で検出した。なお、抗体溶液は全てブロッキング剤を用いて希釈を行った。得られた各画像におけるバンドの発光強度を Image J software を用いて解析し、各 nAChR サブユニットの発光強度を、β アクチンの発光強度で除した相対定量値を用いて評価した。

使用した抗体とその希釈倍率は Table 4 の通りである。

Table 4 Resources of antibodies and details for applications

Target	catalog #	antibody origin	Source	Dilution
α4	sc-5591	rabbit	Santa Cruz	1:750
β2	sc-11372	rabbit	Santa Cruz	1:1000
α7	ab10096	rabbit	Abcam	1:500
β-actin	sc-47778	mouse	Santa Cruz	1:7500

The table shows the catalog number (#), antibody origin, source of antibody, and antibody dilution.

nAChR の RT-PCR 解析

2、6、12、16 ヶ月齢の APP/PS2 マウス及び野生型マウス (各群 n = 4) を屠殺後、脳を速やかに取り出し、皮質および視床を摘出した。Higashikawa *et al.*の方法[90]に従って、摘出した脳組織から TRIzol を用いて RNA を抽出し、さらに cDNA を合成した。PCR 産物の蛍光強度は Image J software を用いて解析し、そ

れぞれの nAChR サブユニットの mRNA 発現量は、β-actin の mRNA の発現量で標準化することで評価した。RT-PCR で用いたプライマーの配列情報は Table 5 の通りである。

Table 5 Primers used for the amplification of mouse nAChRs and β-actin

Gene	oligo sequence (5' → 3')	Product size (bp)	No
α4 nAChR	For CAGCTTCCAGTGTCAGACCA	230	NM_015730.5
	Rev ATGGCCACGTATTTCCAGTC		
β2 nAChR	For TGCTTTGTCAATCCTGCATC	199	NM_009602.4
	Rev TGGCAACGTATTTCCAATCC		
α7 nAChR	For TCTGATTCCGTGCCCTTGATAG	173	NM_007390.3
	Rev CGCAGAAACCATGCACACC		
β-actin	For CGGAACCGCTCATTGCC	300	NM_007393
	Rev ACCCACACT GTGCCATCTA		

The table shows the nucleotide sequences, size of the amplified fragments in base pairs (bp), and the accession numbers (No) obtained from the Gene database.

[^{3}H]MK-801 のインビトロオートラジオグラフィ

6、12、16 ヶ月齢の APP/PS2 マウス及び野生型マウス (各群 n = 3-4) に対して、1.5–3% イソフルラン麻酔下で PBS (pH 7.4) を経心的に灌流させて屠殺し、全脳を摘出した。摘出した脳をドライアイスヘキサンバス (-75°C) で凍結させ、ミクロトームにより厚さ 10 μm の凍結切片を作製した。

[^{3}H]MK-801 を用いた ARG 解析は Velardo らの方法[91]を改変して行った。つまり、脳切片を 5 mM Tris-HCl (pH7.5) 緩衝液でプレインキュベーションした後、10 nM [^{3}H]MK-801、10 μM glycine、10 μM L-glutamine を含む 5 mM Tris-HCl 緩衝液中 (pH7.5) で 120 分間 25°C でインキュベートした。その後、氷冷した 5 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) で 20 分間×3 回洗浄した。乾燥させた脳切片を、^{3}H 標準線源と共に BAS IP TR イメージングプレートに 24 時間曝露することで、オートラジオグラムを得た。非特異的結合は、200 μM の (+) MK-801 存在下で

[^{3}H]MK-801 とインキュベートすることにより求めた。マウス脳アトラス[72]を参照しながら、得られたオートラジオグラム上の皮質、視床、海馬、線条体、小脳部位に 2 つの円状の関心領域を設定し、そこへ集積した放射能を定量した。[^{3}H]MK-801 の結合量 (fmol/mg 組織重量) は、得られた脳各部位の放射能強度を、^{3}H 標準線源の放射能強度から作成した検量線にフィッテイングさせて算出した。[^{3}H]MK-801 の特異的結合は、脳各部位のリガンドの全結合量から非特異的結合を差し引くことで求めた。

なお、解析に用いた切片のスライス位置および ROI の位置は、Fig. 20 に示すものと同様に設置した。

SPECT/CT imaging

APP/PS2 と野生型マウス (n = 4–5) に対して、[^{123}I]5IA (4.6–7.6 MBq) を尾静脈より投与し、第 1 章の *MR 撮像*および *C57BL/6 マウスを用いた SPECT 撮像*の項で述べた方法で SPECT/CT および MR 撮像を行い、第 1 章の *SPECT 画像解析*の項で述べた画像解析手法を用いた。なお VOI 解析に用いた切片のスライス位置および ROI の位置は、Fig. 5 に示すものと同様に設置した。

統計解析

新奇物体認識試験、脳神経機能の定量的オートラジオグラフィ解析、生化学的解析について、それぞれの月齢における野生型マウスと APP/PS2 マウスの比較データは、正規分布に従うことを確認した上で、APP/PS2 マウス及び野生型マウスの二群間の有意差を、二元配置分散分析及び Bonferroni 法の多重検定を用いて評価した。また、新奇物体認識試験、脳神経機能の定量的オートラジオグラフィ解析、生化学的解析について、同一マウス種内での月齢間の比較は、二元配置分散分析及び Tukey 法の多重検定を用いて評価した。SPECT 解析と[^{3}H]MK-801 ARG 解析は、student の t 検定を用いて評価した。すべての検定法において P 値が 0.05 以下の際に有意差ありと判定し、データは平均±標準偏差 (SD) で表した。

2.3 結果

アミロイド斑の組織学的観察

各月齢の APP/PS2 マウスの脳切片に施したチオフラビン S 染色の結果を Fig. 22 に示す。チオフラビン S はβシート構造にインターカレートすることにより、Aβタンパク質凝集体を検出する試薬として汎用されている。

Fig. 22a に、頭頂葉領域の切片の蛍光染色画像を示す。2 ヶ月齢では老人斑プラークの存在はほぼ確認されなかったが、6 ヶ月齢では、頭頂葉部位に緑色蛍光で観察されるチオフラビン S の染色が確認された。さらに 12 ヶ月齢と 16 ヶ月齢では、2 及び 6 ヶ月齢と比較して、その蓄積が高くなった。

Fig. 22b には、頭頂葉領域および海馬領域において蛍光染色陽性部位の面積を定量し、その染色面積の和を ROI 面積で除した、染色面積の割合を示している。6 ヶ月齢マウスの頭頂葉および海馬領域の染色面積の割合は、統計的に有意ではないものの、2 ヶ月齢と比べて増加傾向にあった。さらに 12 ヶ月および 16 ヶ月齢マウスの染色面積の割合は、2 ヶ月齢と比べて統計的に有意に増加し (12 ヶ月齢の海馬：P <0.01、16 ヶ月齢の海馬と頭頂葉：P <0.0001、12 ヶ月齢の頭頂葉：P < 0.001、vs 2 ヶ月齢)、 6 ヶ月齢と比べても統計的に有意に増加した (12 ヶ月齢の海馬：P <0.05、 16 ヶ月齢の海馬、12 ヶ月齢および 16 ヶ月齢の頭頂葉：P <0.001、vs 6 ヶ月齢)。

APP/PS2 マウスにおける新奇物体認識試験

各月齢の APP/PS2 マウス及び同月齢の野生型マウスに対して新奇物体認識試験を行い、その結果より算出した EP 値（認知機能の指標）の経時変化を Fig. 23 に示す。APP/PS2 マウスでは、2～6 ヶ月齢では認知機能に変化は認めなかったものの、12 ヶ月齢では野生型と比較して認知機能が有意に低下し（P < 0.0001）、2 および 6 ヶ月齢の APP/PS2 マウスと比較しても有意に低下した（2 ヶ月齢: P < 0.01、6 ヶ月齢: P < 0.05）。そして 16 ヶ月齢においても、野生型と比較して、12 ヶ月齢と同程度の認知機能低下を認め (P < 0.01)、2 ヶ月齢の APP/PS2 マウスと比較しても有意に低下した (P < 0.01)。一方で野生型マウスでは、評価したすべての月齢を通じて、認知機能に顕著な変化を認めなかった。

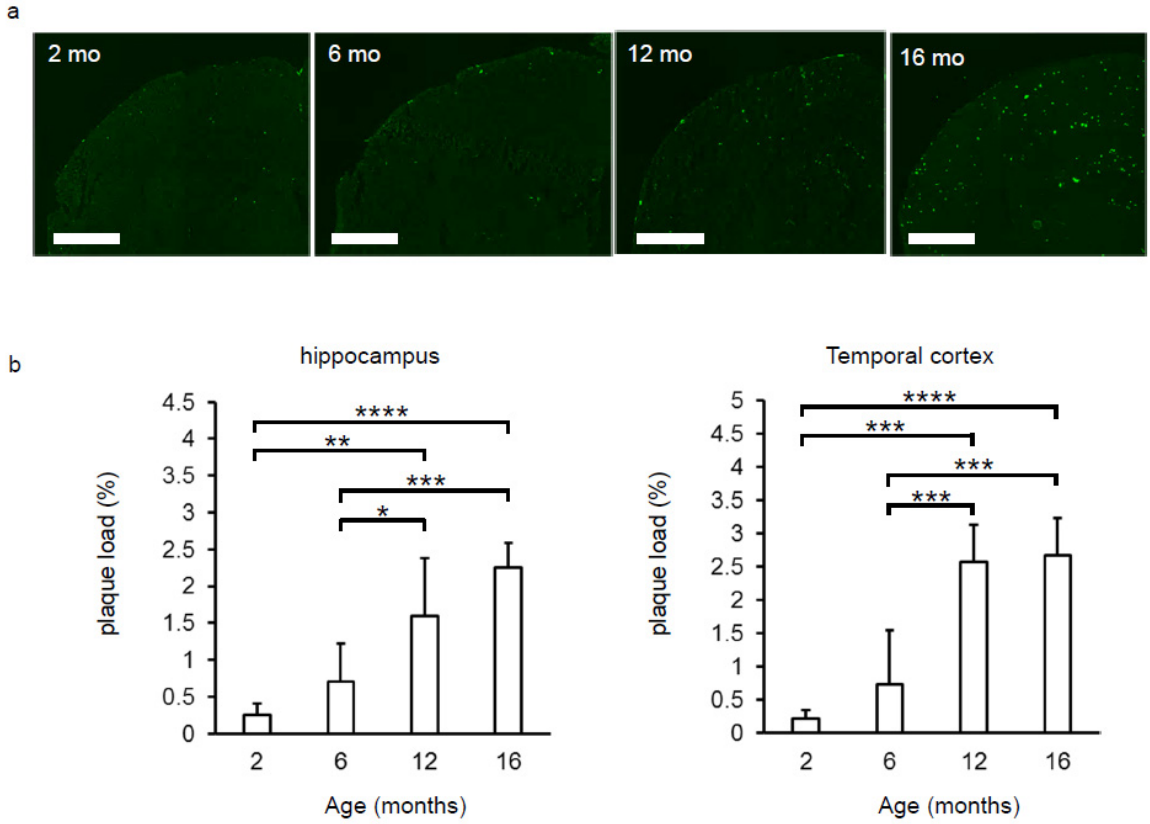


Fig. 22 Increased deposits of amyloid-β with aging in an APP/PS2 mouse brain. Brain sections (10 μm) at the level of the occipital cortex from APP/PS2 mice at 2, 6, 12, and 16 months of age were stained with thioflavin-S. (a) Representative fluorescence images and (b) summarized data of the Aβ accumulation at each age. Staining for amyloid deposits was detected at six months of age. After 12 months of age, the amyloid-β plaque loads in the hippocampus and cortex were significantly increased compared to 2 and 6 months of age (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ****$P < 0.0001$ between indicated groups). Each column represents an average of 4 mice, and each bar represents the SD. Scale bars = 1000 μm. mo, month.

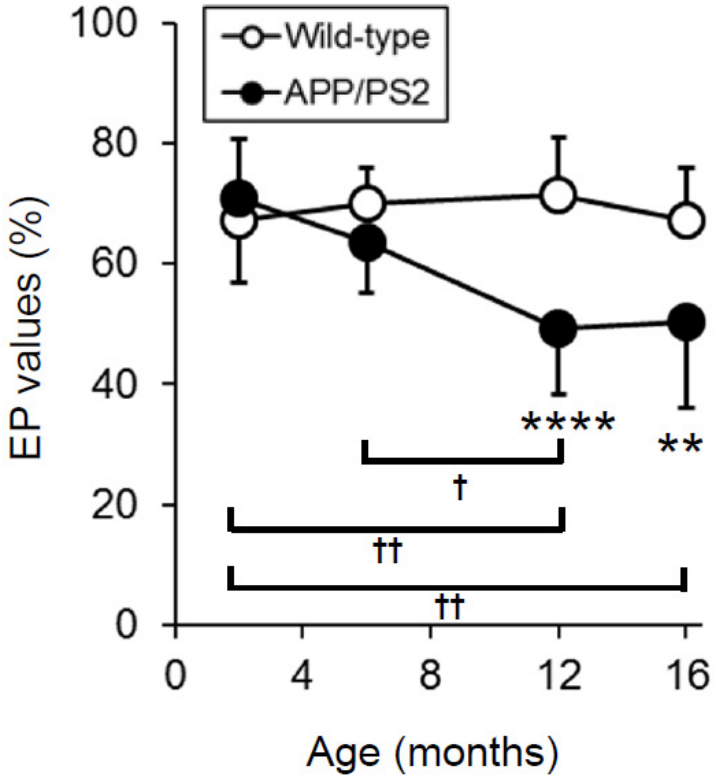


Fig. 23 Time-dependent changes in learning and memory abilities in APP/PS2 mice.

The NOR test was performed in APP/PS2 and wild-type mice at 2, 6, 12, and 16 months of age. APP/PS2 mice showed a lower cognitive ability at 12 months of age (****$P < 0.0001$ vs. wild-type mice) and at 16 months of age (**$P < 0.01$ vs. wild-type mice). Aged APP/PS2 mice also showed a significant decrease in cognitive ability compared to younger APP/PS2 mice ($^{\dagger}P < 0.05$, and $^{\dagger\dagger}P < 0.01$). Each point represents the average ± SD for 5–13 mice. EP, explore preference.

脳内糖代謝の定量的オートラジオグラフィ解析

APP/PS2 マウスおよび野生型マウスでの[^{18}F]FDG 集積の経時的変化を Fig. 24 に示す。2～6 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは、野生型マウスと比較して統計的に有意ではないものの、糖代謝能が高い傾向を示した。そして 12 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは、糖代謝能の増加傾向は解消されて野生型マウスと同程度となり、16 ヶ月齢の大脳皮質、海馬、視床領域においては、野生型マウスと比較して糖代謝能の抑制傾向を認めた。しかしこれらの変化は、統計学的には有意ではなかった。また、月齢の異なる APP/PS2 マウス間で糖代謝能を比較すると、16 ヶ月齢の大脳皮質領域においては、2 ヶ月齢よりも有意に糖代謝能の抑制を認めた ($P < 0.05$)。一方で、野生型マウスでは、評価したすべての月齢を通じて、脳各部位の糖代謝能に顕著な変化を認めなかった。

脳神経は 90%以上のエネルギー源をグルコースから供給することから、Fig. 24 で示した糖代謝の低下は、脳神経機能の低下を示唆する変化であると考える。

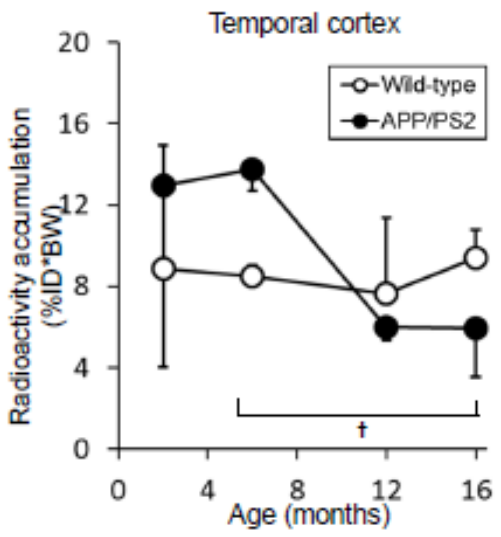
ニコチン受容体の定量的オートラジオグラフィ解析

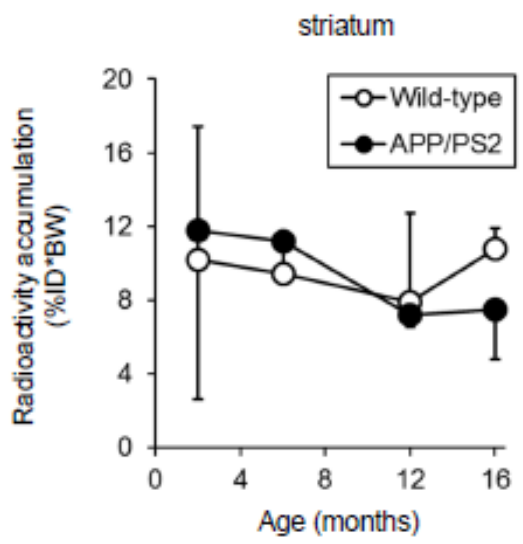
APP/PS2 マウスおよび野生型マウスでの[^{125}I]5IA 集積の経時的変化を Fig. 25 に示す。野生型マウスでは 2～16 ヶ月齢の期間を通じて、脳各部位の[^{125}I]5IA 集積に顕著な変化を認めなかった。また、野生型マウスの[^{125}I]5IA の脳内集積は視床で最も高く、次いで線条体、海馬、大脳皮質となり、小脳が最も低く、この分布は既報の α4β2-nAChRs 密度の順序[71]と一致した。

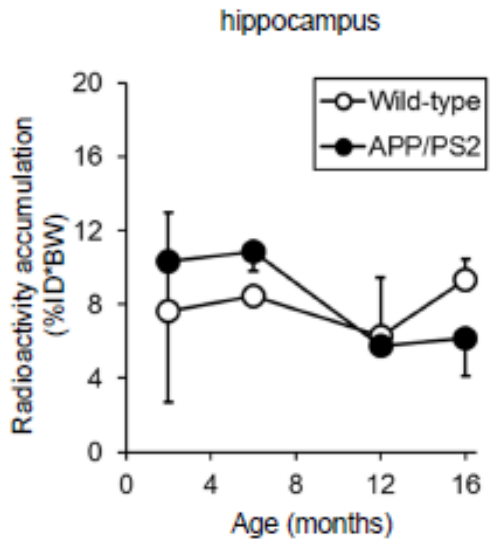
2 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは、脳のどの部位においても野生型マウスと比較して有意な変化を認めなかった。6 ヶ月齢では、APP/PS2 マウスの海馬領域で[^{125}I]5IA の集積が野生型マウスと比較して増加傾向を認めたものの、脳の他の部位では野生型マウスと差を認めなかった。12 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは、同月齢の野生型マウスと比較して、側頭葉、海馬、視床領域において[^{125}I]5IA の集積が有意に低下した ($P < 0.05$)。16 ヶ月齢では、小脳を除く全ての脳領域で[^{125}I]5IA の集積が低下した (線条体: $P < 0.05$, 側頭葉: $P < 0.01$, 海馬および視床: $P < 0.0005$)。一方で、小脳領域においては、すべての月齢で[^{125}I]5IA の集積は野生型と有意差を認めなかった。

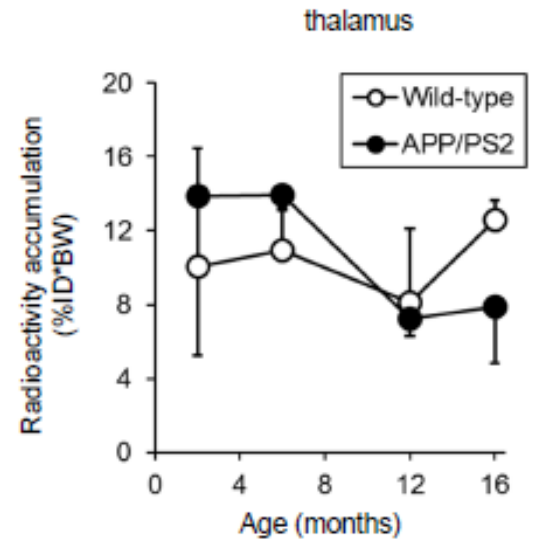
APP/PS2 マウス間で比較を行うと、側頭葉領域においては 12 および 16 ヶ月

齢では、2 ヶ月齢および 6 ヶ月齢よりも[^{125}I]5IA の集積が減少した(2 ヶ月齢：$P < 0.01$、6 ヶ月齢：$P < 0.0001$)。線条体領域においては 16 ヶ月齢では、2 ヶ月齢および 6 ヶ月齢よりも[^{125}I]5IA の集積が減少した ($P < 0.05$)。海馬領域においては 12 ヶ月齢および 16 ヶ月齢では、2 ヶ月齢 ($P < 0.01$) および 6 ヶ月齢よりも[^{125}I]5IA の集積が減少した (2 ヶ月齢：$P < 0.01$、6 ヶ月齢：$P < 0.001$)。視床領域においては、12 ヶ月齢では 6 ヶ月齢よりも[^{125}I]5IA の集積が減少し ($P < 0.05$)、16 ヶ月齢では 2 ヶ月齢および 6 ヶ月齢よりも[^{125}I]5IA の集積が減少した (2 ヶ月齢：$P < 0.01$、6 ヶ月齢：$P < 0.001$)。一方で、小脳領域においては、APP/PS2 マウス間のすべての月齢において、[^{125}I]5IA の集積は有意差を認めなかった。


Temporal cortex
Wild-type
APP/PS2
Radioactivity accumulation (%ID*BW)
Age (months)
†


striatum
Wild-type
APP/PS2
Radioactivity accumulation (%ID*BW)
Age (months)


hippocampus
Wild-type
APP/PS2
Radioactivity accumulation (%ID*BW)
Age (months)


thalamus
Wild-type
APP/PS2
Radioactivity accumulation (%ID*BW)
Age (months)

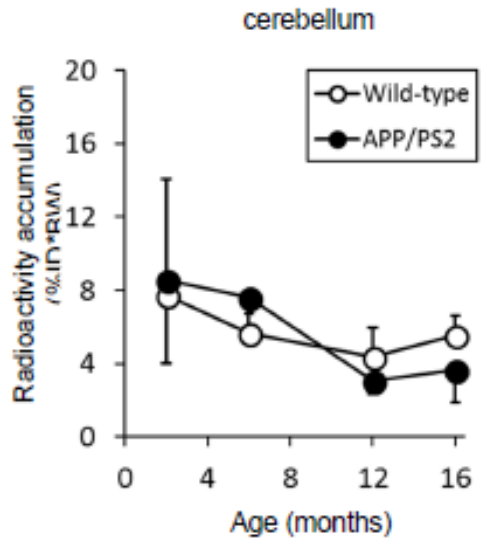

cerebellum
Wild-type
APP/PS2
Radioactivity accumulation
Age (months)

Fig. 24 Changes in [^{18}F]FDG distribution in the brains of APP/PS2 mice.

The y-axes indicate the accumulation of [^{18}F]FDG radioactivity in each brain region. No significant difference in glucose metabolism was observed in any brain region in APP/PS2 mice at 2, 6, 12, or 16 months of age as compared with in wild-type mice. APP/PS2 mice at 16 months of age showed a significant decrease in [^{18}F]FDG accumulation compared to APP/PS2 mice at 6 months of age ($^{\dagger}P < 0.05$) in the temporal cortex. Each point represents the average ± SD for 4–5 mice.

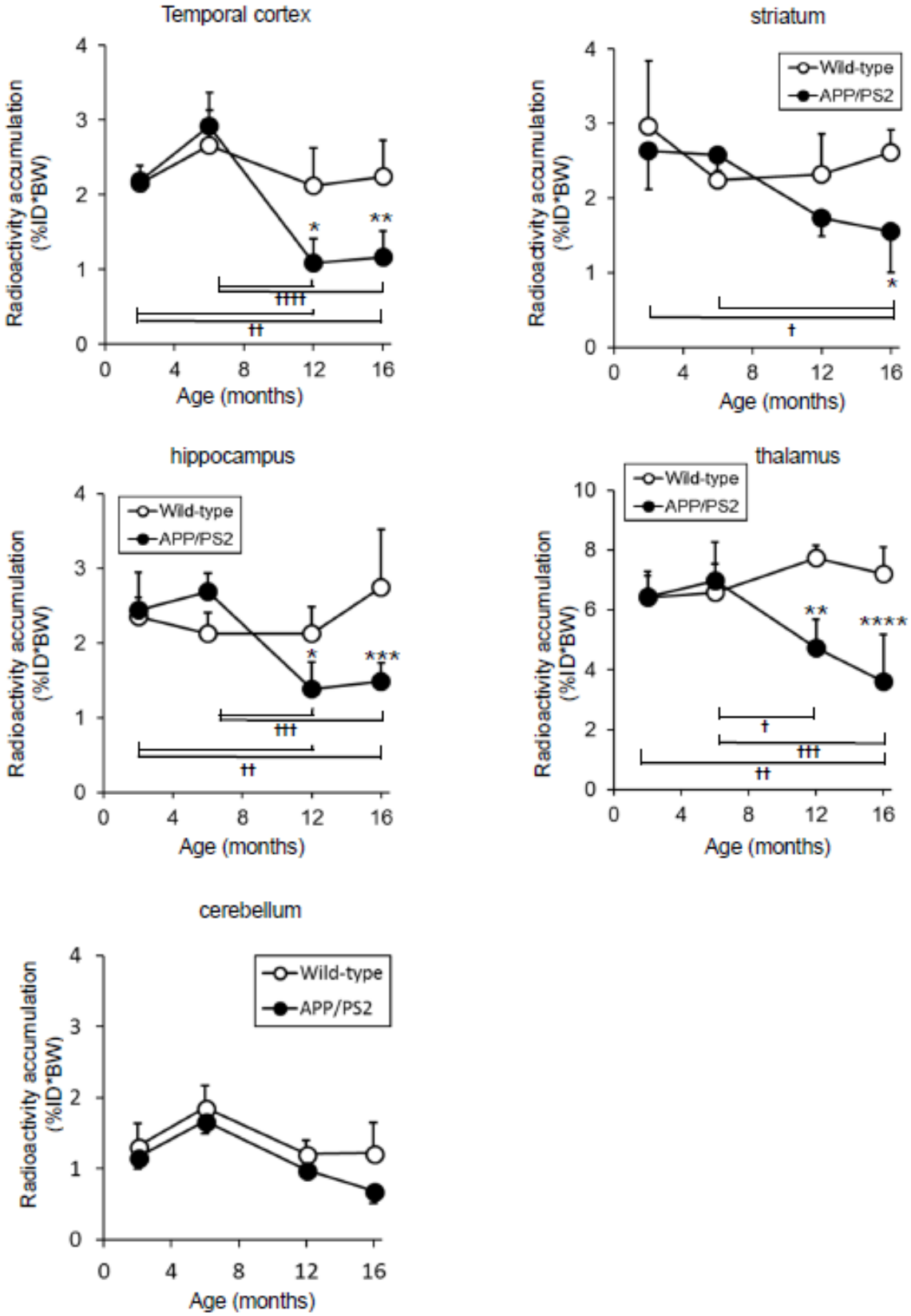

Temporal cortex
striatum
hippocampus
thalamus
cerebellum
Wild-type
APP/PS2
Radioactivity accumulation (%ID*BW)
Age (months)

Fig. 25 Changes in [^{125}I]5IA distribution in the brains of APP/PS2 mice.

The y-axes indicate radioactivity accumulation of [^{125}I]5IA in each brain region. Notably, the APP/PS2 mice have a significant reduction in [^{125}I]5IA accumulation in the temporal cortex, hippocampus, and thalamus at 12 months of age (*$P < 0.05$ vs. wild-type) and in all brain regions at 16 months of age (*$P < 0.05$ in the striatum, **$P < 0.01$ in the temporal cortex, and ***$P < 0.0005$ in the hippocampus and thalamus vs. wild-type). Aged APP/PS2 mice also showed a significant decrease in [^{125}I]5IA accumulation compared to younger APP/PS2 mice ($^{\dagger}P < 0.05$, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$, $^{\dagger\dagger\dagger}P < 0.0001$, $^{\dagger\dagger\dagger\dagger}P < 0.0001$) in the temporal cortex, hippocampus, striatum and thalamus. Each point represents the average ± SD for 4–5 mice.

APP/PS2 マウスのインビボ 5IA-SPECT イメージング

第 1 章で確立したマウスの脳内におけるインビボ[^{123}I]5IA-SPECT 技術を用いて、APP/PS2 マウス脳内で生じる nAChR の機能変化・維持をインビボの状態で測定することができるかを検証した。[^{123}I]5IA を 12 ヶ月齢の APP/PS2 マウスに尾静脈より投与し、インビボ SPECT 撮像を行った。投与 56 分後に得た SPECT/CT 画像と頭部 MR 画像を Fig. 26a に示す。上からそれぞれ、前頭葉、視床、および小脳領域を含むスライスを示している。野生型マウスにおける[^{123}I]5IA の画像強度は、既報の α4β2-nAChRs 密度と一致し、視床で最も高く、次いで海馬、線条体、前頭葉が高く、小脳が最も低かった。

また、SPECT 画像と MR 画像を融合させ、正確に設定した関心領域中に集積した放射能強度 SUV を Fig. 26b に示す。APP/PS2 マウスの視床 ($P < 0.05$) 、あるいは前頭葉と海馬 ($P < 0.01$) への放射能集積は、野生型マウスと比較して有意に低値を示した。一方で、小脳領域では有意な減少は認められなかった。これらの結果は、上述した ARG 実験で得られた結果と一致した。

この結果より、[^{123}I]5IA-SPECT 技術を用いて、APP/PS2 マウス脳内で生じる nAChR の機能変化・維持をインビボの状態で測定に成功した可能性を示唆した。

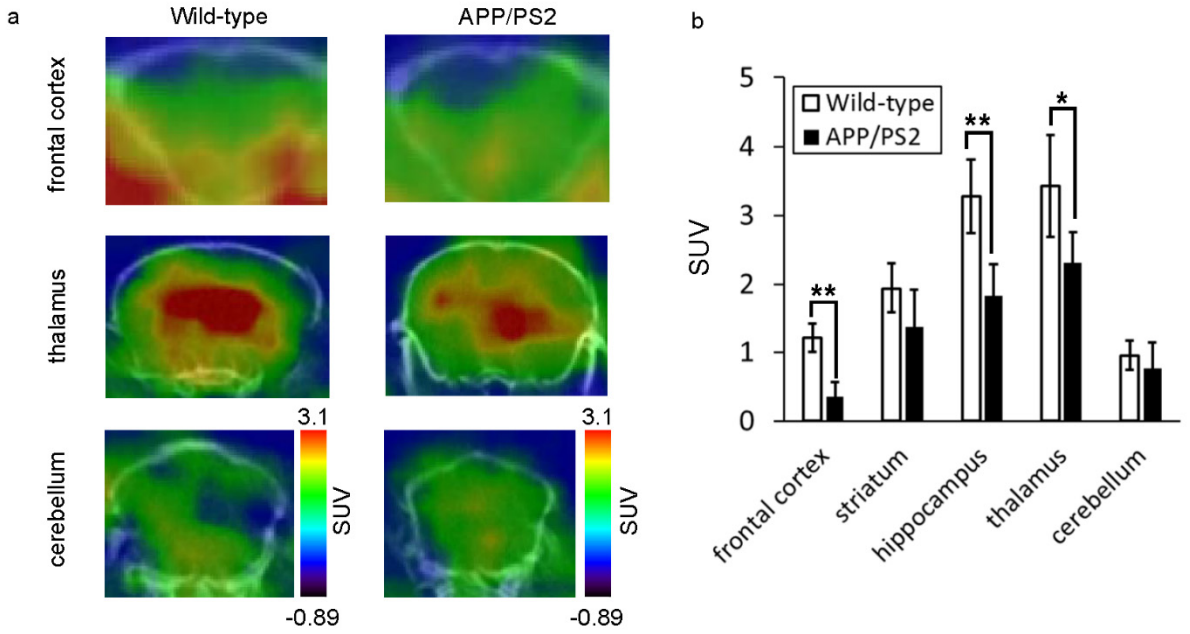


Fig. 26 *In vivo* [^{123}I]5IA-SPECT signal in the brains of APP/PS2 mice at 12 months of age

(a) Representative SPECT/CT images obtained 56 min after the injection of [^{123}I]5IA in the wild-type mice (*left*) and APP/PS2 mice (*right*) at 12 months of age. Images show slices at the frontal cortical, thalamic, and cerebellar levels, respectively. (b) The y-axes indicate SUVs in each brain region obtained 56 min after the injection of [^{123}I]5IA. A significant decrease is observed in the frontal cortex and hippocampus (**$P < 0.01$ vs. wild-type), and the thalamus (*$P < 0.05$ vs. wild-type). Each column represents an average of 4–5 mice, and each bar represents the SD. SUV, standardized uptake value.

nAChR のタンパク質発現量および mRNA の生化学的解析

ARG 実験および SPECT 撮像実験で認められた APP/PS2 マウスにおける [^{125}I]5IA 集積低下が、nAChR の発現低下に起因した結果かどうかを確かめるために、nAChR サブユニットのタンパク発現量をウエスタンブロット法で測定した。それぞれの月齢における、APP/PS2 マウス海馬領域の nAChR サブユニットタンパク質発現の経時変化を Fig. 27 に示す。野生型マウスの海馬領域では、2～16 ヶ月齢の期間を通じて、nAChR サブユニットタンパク質発現量に顕著な変化を認めなかった。一方、APP/PS2 マウスの α4 サブユニットタンパク質の発現は、2 ヶ月齢では野生型マウスと差を認めなかったが、12 ヶ月齢では低下傾向を示し、16 ヶ月齢では 30%の減少を認めた ($P < 0.01$)。また、APP/PS2 マウス間で比較を行うと、12 および 16 ヶ月齢では、2 ヶ月齢よりも α4 サブユニットタンパク質の発現が減少した(12 ヶ月齢：$P < 0.05$、16 ヶ月齢：$P < 0.01$)。

β2 サブユニットについては、2～16 ヶ月齢の期間を通じて、脳各部位での発現量に顕著な変化を認めなかった。α7 サブユニットについては、12 ヶ月齢と 16 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは、野生型マウスよりも発現量が有意に増加した ($P < 0.01$)。また、月齢の異なる APP/PS2 マウス間で比較を行うと、12 および 16 ヶ月齢では、2 ヶ月齢と比較して有意な発現増加を認めた(12 ヶ月齢: $P < 0.05$, 16 ヶ月齢: $P < 0.01$)。

さらに、マウス海馬領域の組織ホモジネートを用いて、RT-PCR により、nAChR サブユニットそれぞれの mRNA 量を測定した (Fig. 28)。α4 および β2 サ

ブユニットについては、2〜16 ヶ月齢の期間を通じて、脳各部位の mRNA 発現量に顕著な変化を認めなかった。一方、α7 サブユニットについては、評価した全ての月齢のマウスにおいて、野生型マウスよりも APP/PS2 マウスの方が、mRNA 発現が増加していることが明らかとなった (2 ヶ月齢: $P < 0.05$、6 ヶ月齢: $P < 0.01$, 12 および 16 ヶ月齢: $P < 0.0001$)。なお、APP/PS2 マウス間で比較を行うと、6 および 12 ヶ月齢では、2 ヶ月齢よりも mRNA 発現が減少し($P < 0.001$)、反対に 16 ヶ月齢では、2 ヶ月齢よりも mRNA 発現が増加していた ($P < 0.001$)。また、野生型マウス間でも月齢に依存した有意な発現変化が認められた。一方で、2 ヶ月齢の野生型マウスと比較して、6 ヶ月齢および 12 ヶ月齢の野生型マウスの発現量は減少しており (6 ヶ月齢：$P < 0.01$ 、12 ヶ月齢：$P < 0.0001$)、16 ヶ月齢の野生型マウスは 2 ヶ月齢の野生型マウスよりも発現量が増加していた ($P < 0.0001$)。

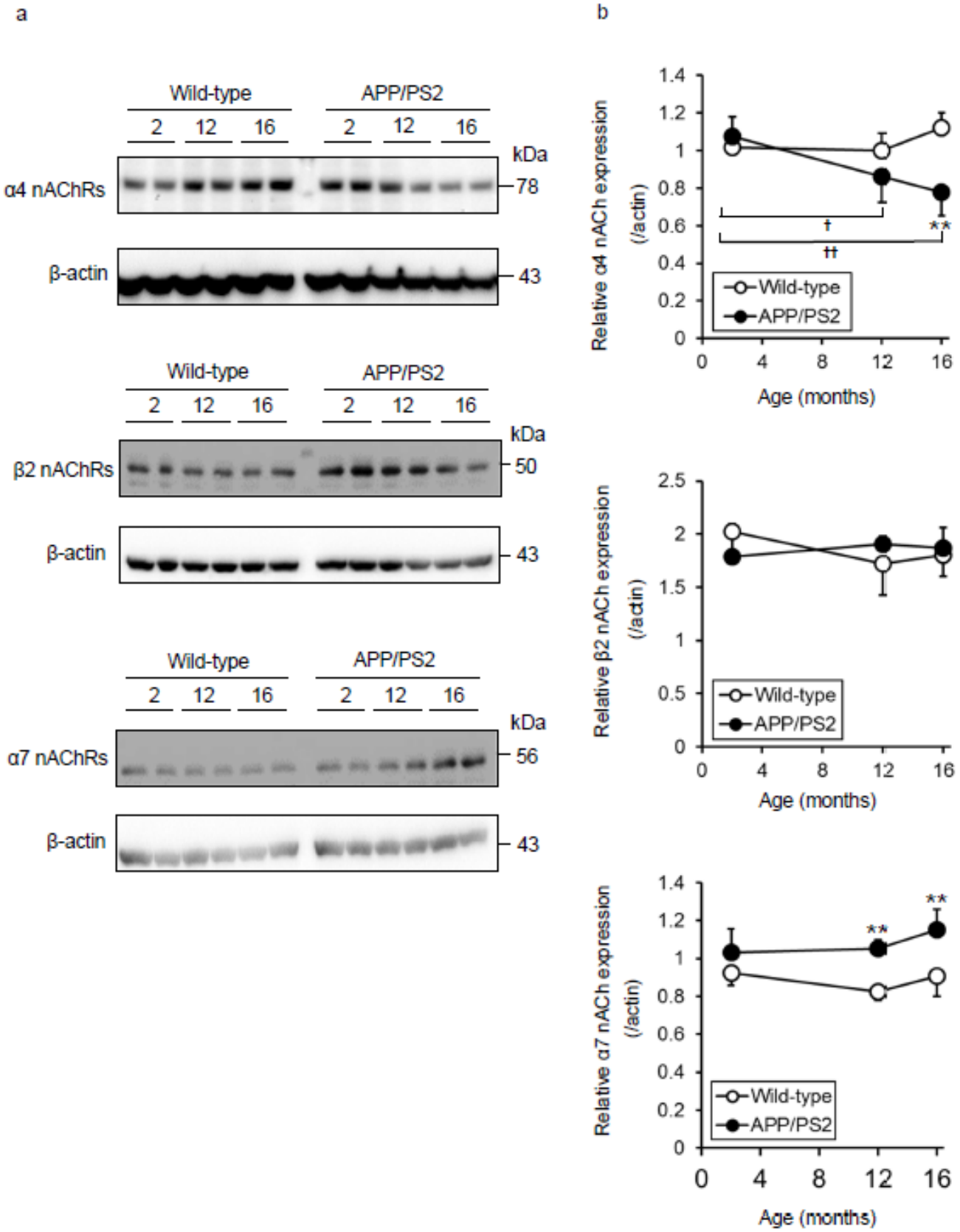

a
b
Wild-type
APP/PS2
2
12
16
kDa
α4 nAChRs
78
β-actin
43
β2 nAChRs
50
α7 nAChRs
56
Relative α4 nACh expression (/actin)
Relative β2 nACh expression (/actin)
Relative α7 nACh expression (/actin)
Age (months)
Wild-type
APP/PS2
†
††
**

Fig. 27 nAChRs protein levels in the hippocampus of APP/PS2 mice.

The relative quantification of protein levels of α4, α7, and β2 nAChRs in the hippocampus of APP/PS2 mice at 2–16 months of age was measured by Western blotting. (a) Representative immunoblots and (b) summarized data of Western blot analyses in the hippocampus of APP/PS2 mice. A significant decrease in α4 nAChRs levels was observed at 16 months of age (**$P < 0.01$ vs. wild-type) and a significant increase in α7 nAChRs was observed at 12 and 16 months of age (**$P < 0.01$ at 12 and 16 months of age vs. wild-type). Aged APP/PS2 mice also showed a significant decrease in α4 nAChRs compared to younger APP/PS2 mice ($^{\dagger}P < 0.05$, and $^{\dagger\dagger}P < 0.01$). Values are expressed relative to β-actin, and each point represents the average ± SD for 4 mice.

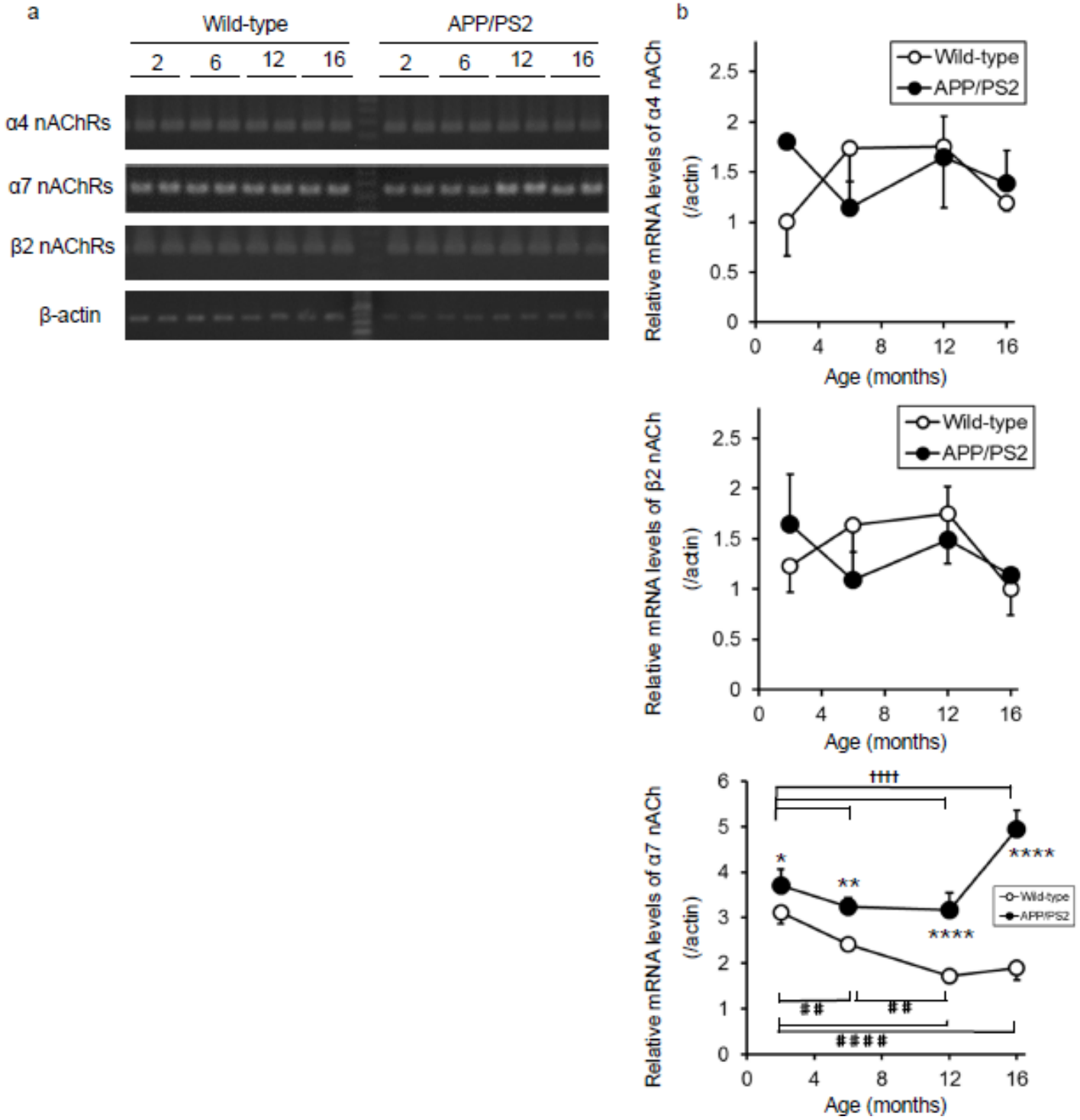

a
Wild-type
APP/PS2
2
6
12
16
α4 nAChRs
α7 nAChRs
β2 nAChRs
β-actin
b
Relative mRNA levels of α4 nACh (/actin)
Wild-type
APP/PS2
Age (months)
Relative mRNA levels of β2 nACh (/actin)
Relative mRNA levels of α7 nACh (/actin)
††††
*
**
****
##
####

Fig. 28 Level of mRNA expression of nAChRs in the hippocampus of APP/PS2 mice

Relative quantification of mRNA levels of α4, α7, and β2 nAChRs in the hippocampus of APP/PS2 mice at 2–16 months of age is measured by RT-PCR. (a) Representative gel images and (b) summarized data of RT-PCR analyses in the hippocampus of APP/PS2 mice. Significant increase in α7 nAChR levels is observed at 2, 6, 12, and 16 months of age (*$P < 0.05$ at 2 months of age, **$P < 0.01$ at 6 months of age, ****$P < 0.0001$ at 12 and 16 months of age vs. wild-type). Values are expressed relative to β-actin and each point represents the average ± SD for 4 mice. Aged Wild-type mice showed a significant decrease in α7 nAChRs compared to younger Wild-type mice ($^{\#\#}P < 0.01$,and $^{\#\#\#\#}P < 0.0001$). 6- and 12-months-old APP/PS2 mice showed a significant decrease in α7 nAChRs compared to 2-months-old Wild-type mice (††††$P < 0.0001$) and 16-months-old APP/PS2 micce showed a significant increase in α7 nAChRs compared to 2-months-old Wild-type mice (††††$P < 0.0001$).

[^{3}H]MK-801 のインビトロオートラジオグラフィ

AD 病態において、nAChR 以外に記憶障害に関与するとされる受容体として、グルタミン酸受容体のサブタイプである NMDA 受容体が報告されている[89]。このため、本研究でも NMDA 受容体に特異的に結合する放射性リガンドである[^{3}H]MK-801 を用いて、APP/PS2 マウスの脳各部位での NMDA 受容体発現量を測定した。APP/PS2 マウスおよび野生型マウス脳各部位における、[^{3}H]MK-801 結合量の経時的変化を Fig. 29 に示す。野生型マウスおよび APP/PS2 マウスの両群において、2～16 ヶ月齢の期間を通じて差を認めなかった。この結果は、2～16 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは NMDA 受容体密度変化が生じていないことを示唆する。

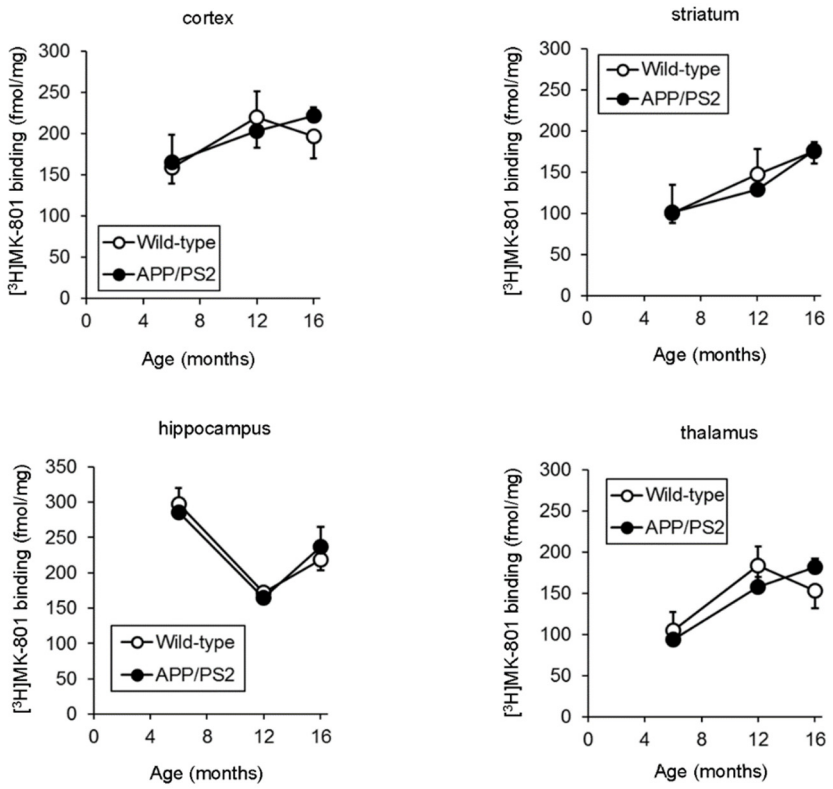


Fig. 29 Changes in [^{3}H]MK-801 distribution in brains of APP/PS2 mice

No significant difference in [^{3}H]MK-801 binding was observed in any brain region in APP/PS2 mice at 6, 12, or 16 months of age compared with wild-type mice. Each point represents an average of 3–4 mice, and each bar represents the SD.

2.4 考察

本章では、AD 症状進行度を反映した画像バイオマーカーとしての脳内 nAChR の有用性を評価することを目的として、nAChR 結合放射性分子プローブである [$^{123/125}$I]5IA、及び脳神経活動の指標となる脳糖代謝率を測定できるプローブである [^{18}F]FDG を用い、ヒト AD 病態模倣マウスである APP/PS2 マウスの認知障害発症前後で、nAChR 発現量と脳糖代謝率を評価した。そして同月齢の APP/PS2 マウスにおいて、nAChR を構成する各サブユニット（α4、β2、および α7）の発現量をウエスタンブロット法により定量した。また、[^{3}H]MK-801 を用いたインビトロ ARG 実験により NMDA 受容体発現量を測定した。

Table 6 Profile comparison of this chapter

APP/PS2（m.o.）	Figure NO.	2	6	12	16
deposits of amyloid-β	Fig. 22	―	↑*	↑	↑
NOR test	Fig. 23	―	―	↓	↓
α4β2-nAChR density	Fig. 25-28	―	―	↓	↓
α7-nAChR density	Fig. 27, 28	↑	↑	↑	↑
NMDAR density	Fig. 29	―	―	―	―
glycometabolism	Fig. 24	―	―	―	↓*

Abbreviation: mo; month, NOR; The novel object recognition test, NMDAR; *N*-methyl-D-aspartic acid receptor, *; tendency.

Table 6 に本章で得られた実験結果を APP/PS2 マウスの月齢ごとに簡単にまとめた。12 ヶ月齢以降の APP/PS2 マウスの皮質、海馬、視床において、[$^{123/125}$I]5IA の集積が野生型マウスよりも低下することを見出した (Fig. 25 および Fig. 26)。この月齢は、APP/PS2 マウスでアミロイド斑蓄積が顕著となり (Fig. 22)、初めて認知機能低下を認めた (Fig. 23) 月齢と一致する。また、これらの結果は、ウエスタンブロッティングの結果 (Fig. 27) とも一致した。このことから、実際に α4β2-nAChR 発現低下を反映した放射能集積低下である可能性を明らかとした。一方で、α7–nAChR および NMDAR の発現量 (Fig. 27 および Fig. 28) と認知機

能低下 (Fig. 23) との間では、時期の一致を認めなかった。また月齢の異なる APP/PS2 マウス間で糖代謝能を比較した際には、6 ヶ月齢に比べて、16 ヶ月齢の APP/PS2 マウスの頭頂葉領域で有意な低下を認めた (Fig. 24)。しかし、16 ヶ月齢の APP/PS2 はすでに認知機能が低下しており、認知機能低下との間では、時期の一致を認めなかった。

本研究で AD 症状進行度を評価することが可能な画像バイオマーカーとして α4β2-nAChR の有用性を評価した理由は、nAChR が認知機能において重要な役割を果たすことが報告されているためである。脳内に存在する nAChR の大部分は α4β2 及び α7 サブユニットが占めており、nAChR を介して発現する作用にはそれらのサブタイプの関与が大きいと考えられている。一方、AD 病態において記憶障害に関与するとされる受容体は、nAChR だけでなくグルタミン酸受容体も報告されている。このため、本研究でもグルタミン酸受容体のサブタイプである NMDA 受容体に特異的に結合する放射性リガンドである[^{3}H]MK-801 を用いて、APP/PS2 マウスの脳各部位での NMDA 受容体発現量を測定した。その結果、APP/PS2 マウスと野生型マウスの間に有意な差は認められなかった。このことから、NMDAR 密度よりも α4β2-nAChR 密度の方が、アミロイドーシスによる症状進行度を反映する画像バイオマーカーとしてより有用であると考えられた。

APP/PS2 マウスは、K670N および M671L 変異を含むヒト由来変異型アミロイド前駆体タンパク質遺伝子（Tg2576, APP）マウスと、N141I 変異を含むヒト変異型プレセニリン（PS2）マウスを交配させて生まれた二重遺伝子改変マウスである。このマウスは、Tg2576 マウスよりもアミロイド斑の形成や認知機能低下といった AD 病態が早く現れることが報告されている[87]。本研究で行ったチオフラビン S による組織学的観察より、6 ヶ月齢の APP/PS2 マウスで初めてアミロイド斑を認め、12 ヶ月齢では蓄積がさらに顕著となることが分かった (Fig. 22)。また新奇物体認識試験により、認知機能は 2～6 ヶ月齢では維持され、12 ヶ月齢にて有意に低下することが明らかとなった (Fig. 23)。APP/PS2 マウスの認知機能をモリス水迷路で評価した先行研究では、4～6 ヶ月齢で認知機能低下が報告されており[87]、それと比較すると、本研究で認知機能低下を認めた時期は

遅い。しかしながら、AD 病態模倣マウスである PDAPP マウスや Tg2576 マウスにおいても、モリス水迷路で認知機能低下を認めた時期の方が、新奇物体認識試験で低下を認めた時期よりも 1～13 ヶ月早いとする報告がある[68]。一般的にモリス水迷路は、頭頂葉が主にその活動を担う空間学習・空間記憶能力を測定しており、新奇物体認識試験は側頭葉が主にその活動を担う記憶学習や視覚的認知機能を測定していると言われている[92]。このように、その行動を司る脳領域が異なることが、行動評価系により認知機能の低下を認めた月齢に差が生じた理由であると考察できる。今後、APP/PS2 マウスの認知機能の測定にあたっては、作業記憶や不安様行動などを評価する複数の行動薬理学評価を追加することで、より詳細にマウスの AD 病態を捉えることが可能になると考えられる。

APP/PS2 マウスにおける[^{18}F]FDG と[^{125}I]5IA を用いた定量的二重 ARG 実験の結果、2～6 ヶ月齢の APP/PS2 マウスにおいて、野生型マウスと比較して糖代謝能の亢進が認められた (Fig. 24)。APP/PS1 マウスを用いた[^{18}F]FDG-PET[93]や[^{14}C]-2-deoxy-D-glucose を用いた ARG 実験[94]においても、本研究と同様に、6 ヶ月齢でコントロール群と比較して有意な糖代謝能の増加が報告されている。糖代謝能の増加傾向が確認された 2 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは、アミロイド斑の形成が認められず、アミロイド斑の蓄積が顕著であった 12 ヶ月齢では糖代謝能亢進が解消されていることから、アミロイド斑の蓄積過程と糖代謝能亢進時期の間に乖離があることが明らかとなった。AD 病態模倣マウスである APP/PS1 マウスにおいては、神経細胞のカルシウムシグナルの増加[95]やアストロサイトの過剰活動[96]が、アミロイド斑形成部位に近接した領域で生じていることが報告されている。このため、[^{18}F]FDG の集積亢進は、アミロイド斑沈着部位の周囲で生じている脳神経機能の過剰活動が原因ではないと考えられる。アミロイド斑蓄積と糖代謝能亢進時期の乖離の原因の一つとして考えられるのは、オリゴマーやモノマーといった可溶性アミロイドβ（Aβ）の存在である。Aβオリゴマーはシナプスの機能形態を変化させることがわかっており[97]、それらが脳内糖代謝の亢進へと導いた可能性がある。実際に、老人斑の形成は認めないものの、Aβオリゴマー含有量が顕著に高い AD 患者では、糖代謝亢進が報告されている[98]。また、5 ヶ月齢の APP/PS2 マウスにおいて、細胞外に存在する

可溶性 Aβ の増加が報告されており[87]、本研究で糖代謝亢進傾向を認めた月齢と近いことから、この仮説は有力である可能性が考えられる。今後、APP/PS2 マウスにおける糖代謝亢進に関わるメカニズム解明のためには、老人斑蓄積過程だけでなく細胞内外における Aβ オリゴマーの存在量を測定するなど、より詳細な検討が必要であると考えられる。

nAChR は認知・記憶といった高次脳機能への関与が報告されていることから、AD 病態で減少する nAChR の発現量を定量することは、AD 症状進行度把握のバイオマーカーとして鋭敏に AD 病態を評価することが可能であると考えられる。本研究では、12 ヶ月齢の APP/PS2 マウスで、野生型マウスと比べて[$^{123/125}$I]5IA の集積が有意に低下したことから (Fig. 25 および Fig. 26)、nAChR 密度の低下が示唆された。この結果は、[^{123}I]5IA-SPECT 撮像で AD 患者の脳内 α4β2-nAChR のインビボ解析を行い、放射能集積の顕著な減少を報告[61, 64]した先行研究と一致する。12 ヶ月齢では皮質領域におけるアミロイド斑蓄積が顕著であり、その神経毒性により、nAChR 密度低下が誘発された可能性が考えられる。さらに、12 ヶ月齢の APP/PS2 マウスで認知機能低下が初めて確認されたことから (Fig. 23)、AD 症状進行度を反映する画像バイオマーカー標的として、nAChR の有用性が示唆された。一方で、α4 サブユニットに対するウエスタンブロッティング解析では、16 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは野生型よりも有意なタンパク発現量低下を認めたが、12 ヶ月齢の時点では統計学的に有意な発現低下を認めなかった。これは、ARG 解析の感度と比べて、ウエスタンブロッティング法による目的タンパク質の定量感度が劣ることが、結果の乖離の一因であると考えられる。また APP/PS2 マウスのどの月齢においても、mRNA レベルでは α4 サブユニットの発現変化を認めなかった。タンパク質と mRNA の発現レベルで乖離が生じた原因としては、翻訳の過程、翻訳後修飾や受容体のターンオーバーなどにより、nAChR タンパクの発現に変化が生じた可能性が考えられる[8]。

一方、α7-nAChR については、タンパクおよび mRNA レベルの両方で、野生型に比べて APP/PS2 マウスの方が高発現していた (Fig. 27 および Fig. 28)。進行した AD 患者脳内では、α7-nAChR の発現量が低下することが報告されている[52]。一方で、近年開発されたインビボ結合特異性の高い α7-nAChR 結合放射性分子プローブ（[^{18}F]ASEM）を用いた臨床研究により、MCI 患者においては、プロー

ブの脳内集積量が健常高齢者よりも有意に上昇することが報告され[99]、本研究の APP/PS2 マウスで得られた知見と同様、α7-nAChR の発現量が増加している可能性が示されている。別の先行研究では、PC-12 細胞に 5 μM と高濃度の $A\beta_{1-42}$ を処置した際に、α7-nAChR の発現が増加することが報告されている[100]。また、6-7 ヶ月齢の APP/PS2 マウスの脳内に含まれる可溶性 $A\beta_{1-42}$ の量は、一般的な AD 患者よりも高いことが報告されている[87]ことから、本研究で認められた APP/PS2 マウスの α7-nAChR 発現亢進は、高濃度 $A\beta_{1-42}$ による発現誘導に基づく可能性が考えられる。さらに α7-nAChR は、コリン作動性の抗炎症作用を介して、サイトカイン合成を阻害するという重要な役割を担っている[101]。APP/PS2 の脳内においては、α7-nAChR が発現増加することで、$A\beta_{1-42}$ 毒性に拮抗する神経保護的な役割を果たしている可能性も考えられる。APP/PS2 マウス脳内における α4β2-nAChR の密度低下と α7-nAChR の発現増加というサブタイプ間における乖離の原因を追究することは、今後も非常に重要な研究課題であると考えられる。本章では α7-nAChR の発現量変化に関して、海馬以外の領域 (大脳皮質、線条体、視床、小脳) においては、解析を行っていない。海馬以外の領域においても、同様に経時的な α7-nAChR の発現量を評価することで、第 1 章の Fig. 17 の結果と比較し、モデル動物間 (Tg2576 と APP/PS2 の間) でのフェノタイプの違いによる結果の考察を行い、さらに議論を発展させることができると考える。

第 2 章では、第 1 章で確立したマウスの脳内におけるインビボ[^{123}I]5IA-SPECT 技術を用いて、APP/PS2 マウス脳内で生じる nAChR の機能変化・維持をインビボの状態で測定することに成功した。このため、[^{123}I]5IA-SPECT 技術を用いることで、マウス脳内に生じている AD 病態の進行度を客観的に把握することが可能になると考えられる。この技術は、同一個体での繰り返し評価や長期にわたる経時的な変化の観察も可能にすることから、創薬分野における治療薬の効果予測への活用が期待される。放射性プローブは一般的に投与される物質量が極めて少なく、プローブ自体の薬効が発現することはない。また放射線の検出感度の高さから、動物実験での投与放射能の 5～10 倍程度を投与すれば、ヒトでの画像化も可能であることが多い。このように、基礎分野から臨床分野へのトランスレーショナルリサーチを展開しやすいことが放射性分子イメージング研究の特徴である。nAChR 密度の画像が AD 患者の認知機能を客観的に評価で

きる画像バイオマーカーとなれば、症状の進行把握や治療介入の効率化につながると期待される。

本章の結果より APP/PS2 マウスは（Ⅰ）12 ヶ月齢でアミロイド斑蓄積が顕著となり認知機能の低下が確認され、その症状は 16 ヶ月齢に置いても維持されたこと (Fig. 22 および Fig. 23)、（Ⅱ）6 ヶ月齢で糖代謝能の増加傾向が認められ、その後 12 ヶ月齢で解消され、16 ヶ月齢になると糖代謝能の抑制傾向を示したこと (Fig. 24)、（Ⅲ）12 ヶ月齢で nAChR 密度が顕著に低下し、16 ヶ月齢においてもその低下を維持したこと (Fig. 25)、を明らかにした。さらに（Ⅳ）実際に [^{123}I]5IA-SPECT 技術を用いて 12 ヶ月齢の APP/PS2 マウスの nAChR 密度の低下を観察すること (Fig. 26) に成功した。また一方で α7 nAChR、NMDAR、糖代謝能においては認知機能と関連した変化を認めなかったことから、脳内の α4β2-nAChR の減少は AD 症状進行度を反映する画像バイオマーカーとして有用であることが示唆された。

結語

本研究では、脳内ニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）結合放射性分子プローブ[^{123}I]5IA を用いてマウス脳 α4β2-nAChR 密度の非侵襲的評価法の開発を行うとともに、AD 症状進行度を定量的に評価可能な画像バイオマーカーとしての nAChR の有用性を評価した。その成果として、以下に述べる知見を得た。

第 1 章

[^{123}I]5IA を用いてマウス脳 SPECT 撮像を行い、投与 30 分後および 60 分後の SPECT 画像から得られた画像強度 (SUV 値) と同一個体で測定した nAChR 密度との間に正の相関を認めたことから、SPECT 画像は nAChR 密度を反映していることを明らかとした。さらに、(-)ニコチン負荷が[^{123}I]5IA の脳への集積に及ぼす影響を調べ、(-)ニコチン負荷により視床領域の[^{123}I]5IA の集積低下を認め、線条体、海馬、大脳皮質領域においても[^{123}I]5IA 集積低下傾向を示した。このことから、[^{123}I]5IA の nAChR に対する結合特異性を SPECT で非侵襲的に評価することに成功した可能性がある。さらに[^{123}I]5IA-SPECT は、Tg2576 マウスにおける nAChR 発現量増加を捉えるのに十分な感度を有していることを示唆した。これらの結果から、[^{123}I]5IA–SPECT イメージングにより、マウス脳内の nAChR の密度分布を体外から非侵襲的に測定することが可能であることを示した。

第 2 章

ヒト AD 病態模倣マウスとして APP/PS2 マウスを用いて、当該マウスの脳神経活動および nAChR 密度の経時的変化を認知障害発症前後で追跡評価した。新奇物体認識試験を行った結果 APP/PS2 マウスでは 12 ヶ月齢で有意に認知機能が低下し、16 ヶ月齢でもその低下が維持された。そして 2～6 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは、野生型マウスと比較して糖代謝が亢進したが、12 ヶ月齢では野生型マウスと同程度まで亢進が解消し、16 ヶ月齢では抑制傾向であった。一方で 12 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは、野生型マウスと比較して[^{125}I]5IA の集積が有意に低下し、16 ヶ月齢においてもその低下傾向を維持した。また、nAChR のタンパク発現量を評価したウエスタンブロット解析からも、16 ヶ月齢の APP/PS2 マウスでは野生型マウ

スと比較して、タンパク発現の有意な低下を認めた。ARG 実験で[^{125}I]5IA の集積が有意に低下した月齢と認知機能低下が初めて確認された月齢が一致したことから、nAChR 密度の低下と認知障害との関連性が示唆された。さらに 12 ヶ月齢の APP/PS2 マウスで[^{123}I]5IA-SPECT を施行し、nAChR 密度をインビボの状態で評価したところ、ARG の解析結果と同様に海馬における[^{123}I]5IA の集積低下を認めた。これらの結果から、AD 症状進行度を反映した画像バイオマーカーとしての脳内 nAChR の有用性を示唆した。

以上の結果は、AD 症状進行度を客観的に評価する手法の開発に有益な知見を提供するものであり、今後 AD 病態の進行把握や治療介入の効率化につながると期待される。

今後の展望としては、まず、他のモデル動物への応用が期待される。本研究で用いた APP/PS2 マウスは、ヒト由来変異型アミロイド前駆体タンパク質遺伝子を、マウス脳内で過剰発現させたモデルであった。一方で近年、マウスアミロイド前駆体タンパク質遺伝子の一部をヒト由来変異型に置換することで、ヒト AD における脳内病理変化をより模倣したモデルマウスが開発されている。このようなマウスに対して、本研究で確立した[^{123}I]5IA–SPECT 撮像法を適用することで、ヒト AD 病態により近い状態で生じている α4β2-nAChR の変化を評価でき、臨床研究で結果に影響を与え得る外的要因を排除した鋭敏な評価が可能となると考えられる。

また、本研究で得られた成果を今後臨床研究へ応用する場合には、AD 病態の進行に伴ってヒトで生じている α4β2-nAChR の変化を、SPECT イメージングにより、同一被検者で追跡するような縦断研究につながると期待できる。さらに最近、α7-nAChR イメージングプローブの First-in-Human 研究が実施され、ヒト α7-nAChR を非侵襲的に評価できる下地も整ってきた。α4β2-、および α7-nAChR の変化を同時に解析することで、nAChR の関与する認知機能の変化を包括的に把握することができると考える。

引用文献

1. Levin, E.D. and B.B. Simon, *Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals.* Psychopharmacology, 1998. **138**(3-4): p. 217-230.
2. Bertrand, D. and A.V. Terry, *The wonderland of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.* Biochemical Pharmacology, 2018. **151**: p. 214-225.
3. Terry, A.V. and P.M. Callahan, *Nicotinic Acetylcholine Receptor Ligands, Cognitive Function, and Preclinical Approaches to Drug Discovery.* Nicotine & Tobacco Research, 2019. **21**(3): p. 383-394.
4. Ueda, M., et al., *Nicotinic acetylcholine receptors expressed in the ventralposterolateral thalamic nucleus play an important role in anti-allodynic effects.* British Journal of Pharmacology, 2010. **159**(6): p. 1201-1210.
5. Dani, J.A. and D. Bertrand, *Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system.* Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2007. **47**: p. 699-729.
6. Ueda, M., et al., *5-Iodo-A-85380, a specific ligand for alpha A beta 2 nicotinic acetylcholine receptors, prevents glutamate neurotoxicity in rat cortical cultured neurons.* Brain Research, 2008. **1199**: p. 46-52.
7. Alkondon, M. and E.X. Albuquerque, *Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 and alpha 4 beta 2 subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus.* Journal of Neurophysiology, 2001. **86**(6): p. 3043-3055.
8. Schliebs, R. and T. Arendt, *The cholinergic system in aging and neuronal degeneration.* Behavioural Brain Research, 2011. **221**(2): p. 555-563.
9. Guan, Z.Z., et al., *Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease.* Journal of Neurochemistry, 2000. **74**(1): p. 237-243.
10. Perry, E.K., et al., *ALTERATION IN NICOTINE BINDING-SITES IN PARKINSONS-DISEASE, LEWY BODY DEMENTIA AND ALZHEIMERS-DISEASE - POSSIBLE INDEX OF EARLY NEUROPATHOLOGY.* Neuroscience,

1995. **64**(2): p. 385-395.

11. DeTure, M.A. and D.W. Dickson, *The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease.* Molecular Neurodegeneration, 2019. **14**(1): p. 18.
12. Dubois, B., et al., *Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria.* Lancet Neurology, 2007. **6**(8): p. 734-746.
13. *https://www.mhlw.go.jp/wp/hakusyo/kousei/16/backdata/01-01-01-15.html.*
14. Martin Prince, A.W., Maëlenn Guerchet, Gemma-Claire Ali, Yu-Tzu Wu, Matthew Prina, *World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia.* The Global Impact of Dementia. Vol. 1-82. 2015.
15. Rizzi, L., I. Rosset, and M. Roriz-Cruz, *Global Epidemiology of Dementia: Alzheimer's and Vascular Types.* Biomed Research International, 2014.
16. Tsoi, K.K.F., et al., *Cognitive Tests to Detect Dementia A Systematic Review and Meta-analysis.* Jama Internal Medicine, 2015. **175**(9): p. 1450-1458.
17. Sperling, R.A., et al., *Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease.* Alzheimers Dement, 2011. **7**(3): p. 280-92.
18. Di Santo, S.G., et al., *A meta-analysis of the efficacy of donepezil, rivastigmine, galantamine, and memantine in relation to severity of Alzheimer's disease.* J Alzheimers Dis, 2013. **35**(2): p. 349-61.
19. Chetelat, G., et al., *Relationship between Atrophy and beta-Amyloid Deposition in Alzheimer Disease.* Annals of Neurology, 2010. **67**(3): p. 317-324.
20. Jack, C.R., et al., *C-II PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimers disease and amnestic mild cognitive impairment.* Brain, 2008. **131**: p. 665-680.
21. Barrio, J.R., et al., *Amyloid and tau imaging, neuronal losses and function in mild cognitive impairment.* Journal of Nutrition Health & Aging, 2008. **12**(1): p. 61S-65S.
22. Mattsson, N., et al., *Comparing F-18-AV-1451 with CSF t-tau and p-tau for*

diagnosis of Alzheimer disease. Neurology, 2018. **90**(5): p. E388-+.

23. Cohen, A.D. and W.E. Klunk, *Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET.* Neurobiol Dis, 2014. **72 Pt A**: p. 117-22.
24. De Santi, S., et al., *Hippocampal formation glucose metabolism and volume losses in MCI and AD.* Neurobiol Aging, 2001. **22**(4): p. 529-39.
25. Hansson, O., et al., *Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study.* Lancet Neurology, 2006. **5**(3): p. 228-234.
26. Sarica, A., et al., *MRI Asymmetry Index of Hippocampal Subfields Increases Through the Continuum From the Mild Cognitive Impairment to the Alzheimer's Disease.* Front Neurosci, 2018. **12**: p. 576.
27. Walter, S., et al., *Neuropsychological Test Performance and MRI Markers of Dementia Risk: Reducing Education Bias.* Alzheimer Dis Assoc Disord, 2019. **33**(3): p. 179-185.
28. Wada, M., et al., *Effect of Education on Alzheimer's Disease-Related Neuroimaging Biomarkers in Healthy Controls, and Participants with Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Cross-Sectional Study.* J Alzheimers Dis, 2018. **63**(2): p. 861-869.
29. Ichise, M., J.H. Meyer, and Y. Yonekura, *An introduction to PET and SPECT neuroreceptor quantification models.* Journal of Nuclear Medicine, 2001. **42**(5): p. 755-763.
30. Herholz, K., et al., *Impairment of neocortical metabolism predicts progression in Alzheimer's disease.* Dement Geriatr Cogn Disord, 1999. **10**(6): p. 494-504.
31. Akamatsu, G., et al., *Voxel-based statistical analysis and quantification of amyloid PET in the Japanese Alzheimer's disease neuroimaging initiative (J-ADNI) multi-center study.* EJNMMI Res, 2019. **9**(1): p. 91.
32. Betthauser, T.J., et al., *Characterization of the radiosynthesis and purification of [(18)F]THK-5351, a PET ligand for neurofibrillary tau.* Appl Radiat Isot, 2017. **130**: p. 230-237.
33. Betthauser, T.J., et al., *In Vivo Comparison of Tau Radioligands (18)F-THK-*

5351 and (18)F-THK-5317. J Nucl Med, 2017. **58**(6): p. 996-1002.

34. Ishiki, A., et al., *Longitudinal Assessment of Tau Pathology in Patients with Alzheimer's Disease Using [18F]THK-5117 Positron Emission Tomography.* PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0140311.
35. Chiotis, K., et al., *Dual tracer tau PET imaging reveals different molecular targets for (11)C-THK5351 and (11)C-PBB3 in the Alzheimer brain.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2018. **45**(9): p. 1605-1617.
36. Terada, T., et al., *In vivo direct relation of tau pathology with neuroinflammation in early Alzheimer's disease.* J Neurol, 2019. **266**(9): p. 2186-2196.
37. Shcherbinin, S., et al., *Kinetics of the Tau PET Tracer 18F-AV-1451 (T807) in Subjects with Normal Cognitive Function, Mild Cognitive Impairment, and Alzheimer Disease.* J Nucl Med, 2016. **57**(10): p. 1535-1542.
38. Zhang, W., et al., *A highly selective and specific PET tracer for imaging of tau pathologies.* J Alzheimers Dis, 2012. **31**(3): p. 601-12.
39. Van Dort, M.E., A. Rehemtulla, and B.D. Ross, *PET and SPECT imaging of tumor biology: New approaches towards oncology drug discovery and development.* Current Computer-Aided Drug Design, 2008. **4**(1): p. 46-53.
40. Slomka, P.J., et al., *Advances in SPECT and PET Hardware.* Progress in Cardiovascular Diseases, 2015. **57**(6): p. 566-578.
41. Japan, S.o.S.o.N.M.P.i., RADIOISOTOPES, 2018. **67**: p. 339–387.
42. Ito, K., et al., *Prediction of outcomes in MCI with (123)I-IMP-CBF SPECT: a multicenter prospective cohort study.* Ann Nucl Med, 2013. **27**(10): p. 898-906.
43. Golestani, R., et al., *Small-animal SPECT and SPECT/CT: application in cardiovascular research.* European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2010. **37**(9): p. 1766-1777.
44. Chen, R., et al., *Treatment effects between monotherapy of donepezil versus combination with memantine for Alzheimer disease: A metaanalysis.* Plos One, 2017. **12**(8).
45. Maelicke, A., et al., *Allosteric sensitization of nicotinic receptors by*

galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. Biological Psychiatry, 2001. **49**(3): p. 279-288.

46. Levin, E.D., *Nicotinic receptor subtypes and cognitive function.* Journal of Neurobiology, 2002. **53**(4): p. 633-640.
47. McConathy, J. and Y.I. Sheline, *Imaging biomarkers associated with cognitive decline: a review.* Biol Psychiatry, 2015. **77**(8): p. 685-92.
48. Inden, M., et al., *alpha 4 nicotinic acetylcholine receptor modulated by galantamine on nigrostriatal terminals regulates dopamine receptor-mediated rotational behavior.* Neurochemistry International, 2016. **94**: p. 74-81.
49. Nakano, Y., et al., *Long-Term Efficacy of Galantamine in Alzheimer's Disease: The Okayama Galantamine Study (OGS).* J Alzheimers Dis, 2015. **47**(3): p. 609-17.
50. Toyohara, J., et al., *Preclinical and the first clinical studies on [11C]CHIBA-1001 for mapping alpha7 nicotinic receptors by positron emission tomography.* Ann Nucl Med, 2009. **23**(3): p. 301-9.
51. Hashimoto, K., et al., *[11C]CHIBA-1001 as a novel PET ligand for alpha7 nicotinic receptors in the brain: a PET study in conscious monkeys.* PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3231.
52. Nakaizumi, K., et al., *In vivo Depiction of alpha7 Nicotinic Receptor Loss for Cognitive Decline in Alzheimer's Disease.* J Alzheimers Dis, 2018. **61**(4): p. 1355-1365.
53. Kimes, A.S., et al., *Quantification of nicotinic acetylcholine receptors in the human brain with PET: Bolus plus infusion administration of 2- F-18 F-A85380.* Neuroimage, 2008. **39**(2): p. 717-727.
54. Pichika, R., et al., *Nicotinic alpha 4 beta 2 receptor imaging agents - Part II. Synthesis and biological evaluation of 2- F-18 fluoro-3- 2-((S)-3-pyrrolinyl)methoxy pyridine (F-18-nifene) in rodents and imaging by PET in nonhuman primate.* Nuclear Medicine and Biology, 2006. **33**(3): p. 295-304.
55. Wong, D.F., et al., *PET Imaging of High-Affinity alpha 4 beta 2 Nicotinic Acetylcholine Receptors in Humans with F-18-AZAN, a Radioligand with*

Optimal Brain Kinetics. Journal of Nuclear Medicine, 2013. **54**(8): p. 1308-1314.

56. Sabri, O., et al., *First-in-human PET quantification study of cerebral alpha 4 beta 2*nicotinic acetylcholine receptors using the novel specific radioligand (-)- F-18 Flubatine.* Neuroimage, 2015. **118**: p. 199-208.
57. Ueda, M., et al., *5- I-123 iodo-A-85380: assessment of pharmacological safety, radiation dosimetry and SPECT imaging of brain nicotinic receptors in healthy human subjects.* Annals of Nuclear Medicine, 2004. **18**(4): p. 337-344.
58. Saji, H., et al., *Evaluation of radioiodinated 5-iodo-3-(2(S)-azetidinylmethoxy)pyridine as a ligand for SPECT investigations of brain nicotinic acetylcholine receptors.* Annals of Nuclear Medicine, 2002. **16**(3): p. 189-200.
59. Mamede, M., et al., *Quantification of human nicotinic acetylcholine receptors with 123I-5IA SPECT.* Journal of Nuclear Medicine, 2004. **45**(9): p. 1458-1470.
60. Fujita, M., et al., *Measurement of alpha(4)beta(2) nicotinic acetylcholine receptors with I-123 5-I-A-85380 SPECT.* Journal of Nuclear Medicine, 2000. **41**(9): p. 1552-1560.
61. Colloby, S.J., et al., *A spatial covariance (123)I-5IA-85380 SPECT study of alpha4beta2 nicotinic receptors in Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging, 2016. **47**: p. 83-90.
62. Oishi, N., et al., *Quantification of nicotinic acetylcholine receptors in Parkinson disease With I-123-5IA SPECT.* Movement Disorders, 2006. **21**: p. S568-S568.
63. Wuellner, U., et al., *Smoking upregulates alpha 4 beta(2)* nicotinic acetylcholine receptors in the human brain.* Neuroscience Letters, 2008. **430**(1): p. 34-37.
64. Sabri, O., et al., *Cognitive correlates of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in mild Alzheimer's dementia.* Brain, 2018. **141**(6): p. 1840-1854.
65. Mitsis, E.M., et al., *I-123-5-IA-85380 SPECT Imaging of Nicotinic Receptors in Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment.* Journal of Nuclear

Medicine, 2009. **50**(9): p. 1455-1463.

66. Shultz, L.D., F. Ishikawa, and D.L. Greiner, *Humanized mice in translational biomedical research.* Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(2): p. 118-130.
67. Luo, F., et al., *Characterization of 7- and 19-month-old Tg2576 mice using multimodal in vivo imaging: limitations as a translatable model of Alzheimer's disease.* Neurobiology of Aging, 2012. **33**(5): p. 933-944.
68. Webster, S.J., et al., *Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models.* 2014
69. Webster, S.J., et al., *Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models.* Front Genet, 2014. **5**: p. 88.
70. Horti, A.G., et al., *Radiosynthesis and preliminary evaluation of 5- I-123/125 iodo3-(2(S)-azetidinylmethoxy)pyridine: A radioligand for nicotinic acetylcholine receptors.* Nuclear Medicine and Biology, 1999. **26**(2): p. 175-182.
71. Pauly, J.R., et al., *Chronic nicotine and mecamylamine treatment increase brain nicotinic receptor binding without changing alpha 4 or beta 2 mRNA levels.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1996. **278**(1): p. 361-369.
72. George Paxinos and K.B.J. Franklin, *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition*. 2012.
73. Oules, B., et al., *Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid-beta Load and Memory Impairments in Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease.* Journal of Neuroscience, 2012. **32**(34): p. 11820-11834.
74. Denic, A., et al., *MRI in Rodent Models of Brain Disorders.* Neurotherapeutics, 2011. **8**(1): p. 3-18.
75. Logan, J., et al., *Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data.* Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1996. **16**(5): p. 834-840.

76. Baba, J.S., et al., *Molecular Imaging of Conscious, Unrestrained Mice with AwakeSPECT.* Journal of Nuclear Medicine, 2013. **54**(6): p. 969-976.

77. Price, J.C., *Principles of tracer kinetic analysis.* Neuroimaging Clinics of North America, 2003. **13**(4): p. 689-+.

78. Bieszczad, K.M., et al., *Nicotinic acetylcholine receptors in rat forebrain that bind 18F-nifene: Relating PET imaging, autoradiography, and behavior.* Synapse, 2012. **66**(5): p. 418-434.

79. Jensen, A.A., et al., *Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations.* Journal of Medicinal Chemistry, 2005. **48**(15): p. 4705-4745.

80. Perry, D.C., et al., *Measuring nicotinic receptors with characteristics of alpha 4 beta 2, alpha 3 beta 2 and alpha 3 beta 4 subtypes in rat tissues by autoradiography.* Journal of Neurochemistry, 2002. **82**(3): p. 468-481.

81. Gotti, C., M. Zoli, and F. Clementi, *Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance.* Trends in Pharmacological Sciences, 2006. **27**(9): p. 482-491.

82. Tsukada, H., et al., *Age-related impairment of coupling mechanism between neuronal activation and functional cerebral blood flow response was restored by cholinesterase inhibition: PET study with microdialysis in the awake monkey brain.* Brain Research, 2000. **857**(1-2): p. 158-164.

83. Mousavi, M. and A. Nordberg, *Expression of the alpha7, alpha4 and alpha3 nicotinic receptor subtype in the brain and adrenal medulla of transgenic mice carrying genes coding for human AChE and beta-amyloid.* Int J Dev Neurosci, 2006. **24**(4): p. 269-73.

84. Cohen, A.D., et al., *Basal Cerebral Metabolism May Modulate the Cognitive Effects of A beta in Mild Cognitive Impairment: An Example of Brain Reserve.* Journal of Neuroscience, 2009. **29**(47): p. 14770-14778.

85. Choo, I.H., et al., *Topographic patterns of brain functional impairment progression according to clinical severity staging in 116 Alzheimer disease patients: FDG-PET study.* Alzheimer Disease & Associated Disorders, 2007.

21(2): p. 77-84.

86. Jacobsen, J.S., et al., *Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(13): p. 5161-5166.

87. Toda, T., et al., *Presenilin-2 Mutation Causes Early Amyloid Accumulation and Memory Impairment in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease.* Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011.

88. Pauwels, E.K.J., et al., *Positron-emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose Part I. Biochemical uptake mechanism and its implication for clinical studies.* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2000. **126**(10): p. 549-559.

89. Gonzalez, J., et al., *NMDARs in neurological diseases: a potential therapeutic target.* Int J Neurosci, 2015. **125**(5): p. 315-27.

90. Higashikawa, K., et al., *64Cu-DOTA-anti-CTLA-4 mAb enabled PET visualization of CTLA-4 on the T-cell infiltrating tumor tissues.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e109866.

91. Velardo, M.J., V.J. Simpson, and N.R. Zahniser, *Differences in NMDA receptor antagonist-induced locomotor activity and H-3 MK-801 binding sites in short-sleep and long-sleep mice.* Alcoholism-Clinical and Experimental Research, 1998. **22**(7): p. 1509-1515.

92. Society, T.J.P., *Practice behavioral pharmacology*. 2010.

93. Poisnel, G., et al., *Increased regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 model of Alzheimer's disease.* Neurobiology of Aging, 2012. **33**(9): p. 1995-2005.

94. Toyama, H., et al., *Absolute quantification of regional cerebral glucose utilization in mice by F-18 FDG small animal PET scanning and 2- C-14 DG autoradiography.* Journal of Nuclear Medicine, 2003. **44**(5): p. 214P-214P.

95. Busche, M.A., et al., *Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease.* Science, 2008. **321**(5896): p. 1686-1689.

96. Kuchibhotla, K.V., et al., *Synchronous Hyperactivity and Intercellular Calcium*

Waves in Astrocytes in Alzheimer Mice. Science, 2009. **323**(5918): p. 1211-1215.

97. Selkoe, D.J., *Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior.* Behavioural Brain Research, 2008. **192**(1): p. 106-113.

98. Shimada, H., et al., *Clinical Course of Patients with Familial Early-Onset Alzheimer's Disease Potentially Lacking Senile Plaques Bearing the E693 Delta Mutation in Amyloid Precursor Protein.* Dementia and Geriatric Cognitive Disorders, 2011. **32**(1): p. 45-54.

99. Coughlin, J.M., et al., *High availability of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in brains of individuals with mild cognitive impairment: A pilot study using (18)F-ASEM PET.* J Nucl Med, 2019.

100. Jin, Y., et al., *Amyloid-beta peptide increases cell surface localization of alpha 7 ACh receptor to protect neurons from amyloid beta-induced damage.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015. **468**(1-2): p. 157-160.

101. Wang, H., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 subunit is an essential regulator of inflammation.* Nature, 2003. **421**(6921): p. 384-388.

謝辞

本研究の終わりに際し、本研究遂行において、全面的に懇切なるご指導とご鞭撻を頂きました、本学医歯薬学総合研究科　上田真史教授に心より深く感謝致します。

また、研究室配属当初、御懇意なるご指導を賜りました、榎本秀一博士に衷心より感謝の意を表します。

そして本研究全般にわたり有益なご助言、ご指導を頂きました京都大学大学院薬学研究科　佐治英郎特任教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に遂行に当たりご協力賜りました、神戸薬科大学薬品物理化学研究室佐野紘平講師、日本メジフィジックス株式会社　檜垣佑輔博士、イーピーエス株式会社　羽原彰吾修士には謹んで御礼申し上げます。また、本研究の全般にわたり多くの御指導、御助言を頂きました、愛知学院大学薬学部　神野伸一郎教授、ならびに渡邊恵子技術職員に心より感謝致します。

また、本研究を遂行した博士後期課程の３年間にわたり日本薬学会の長井記念薬学研究奨励支援事業の援助を受けました (N－165702)。ここに謝意を表します。

本論文の審査および改訂にあたり、懇切なるご指導を賜りました、本学医歯薬学総合研究科の薬効解析学分野　上原孝教授、生体物理化学分野　須藤雄気教授、生物薬剤学分野　檜垣和孝教授に深く感謝いたします。

そして、日常の討論を通じて多くの知識や示唆を頂いた本学医歯薬学総合研究科生体機能解析分野の方々、さらには、私の研究活動を支えて下さった多くの方々に感謝の気持ちと御礼を申し上げ、謝辞といたします。

2020 年 3 月　松浦　有希