

vations indicated that approximately 10% of the Iba1-positive cells that accumulated on the axotomized side thus originated from circulating monocytic cells and that the CS deficiency significantly suppressed the recruitment of these monocytic cells.

We also examined recruitment of T lymphocytes in the facial motor nuclei 14 and 50 days after axotomy. In wild-type mice, CD3-positive T lymphocytes were detected to infiltrate the axotomized side (Fig. 4C,E). The mean number of CD3-positive cells per section 14 and 50 days after axotomy was approximately 4 and 12 cells/section, respectively. Fifty days after axotomy, the aggregated microglia were frequently surrounded by infiltrated CD3-positive T lymphocytes (Fig. 3E, arrow). In contrast, no CD3-positive cells were detected in the facial motor nuclei following axotomy (Fig. 4D,F).

We next examined the expression of MHC II because interactions with T lymphocytes are required for the induction of MHC II in antigen-presenting cells. As shown in Figure 4G, immunoreactivity for MHC II was observed in microglia-like cells as well as in perivascular-like cells in the facial motor nuclei of wild-type mice 14 days after axotomy. In contrast, only MHC II-positive perivascular-like cells were observed on the axotomized side of CS<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4H).

### Differential Axotomy-Induced Changes in CS, CB, and CysC Levels in CS<sup>-/-</sup> and Wild-Type Mice

We next measured the levels of CS, CB, and CysC, an endogenous cysteine protease inhibitor, at both the mRNA and protein levels in the facial motor nuclei of mice from both groups after axotomy. In wild-type mice, the mean levels of CS mRNA and CS protein (28-kDa active form) in the facial motor nucleus significantly increased after axotomy (Fig. 5A,B,E). Immunoblot analysis showed that under reducing conditions, using a CB-specific antibody, there were two mature forms of CB: a 29-kDa single-chain species and a 26-kDa heavy-chain species. Mean levels of CB mRNA and CB protein (29-kDa single-chain form) in the facial motor nuclei of wild-type mice were not significantly changed after axotomy, whereas those of CS<sup>-/-</sup> mice significantly increased after axotomy (Fig. 5A,C,F). In contrast, mean levels of CysC mRNA and CysC protein (14 kDa) in the facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> mice were significantly smaller than those of wild-type mice. After axotomy, mean levels of CysC mRNA and CysC protein (14 kDa) in the facial motor nuclei of mice in both groups significantly increased (Fig. 5A,D,G).

### Localization of CS, CB, and CysC in the Facial Motor Nucleus after Facial Nerve Transection

Indirect immunofluorescent staining was used to further elucidate how cellular localization of CS, CB, and CysC increased after axotomy. It was found that CS localized in activated microglia that spread on the surfaces of injured motoneurons in wild-type mice (Fig. 6A). In contrast, immunoreactivity for CS was barely detectable in

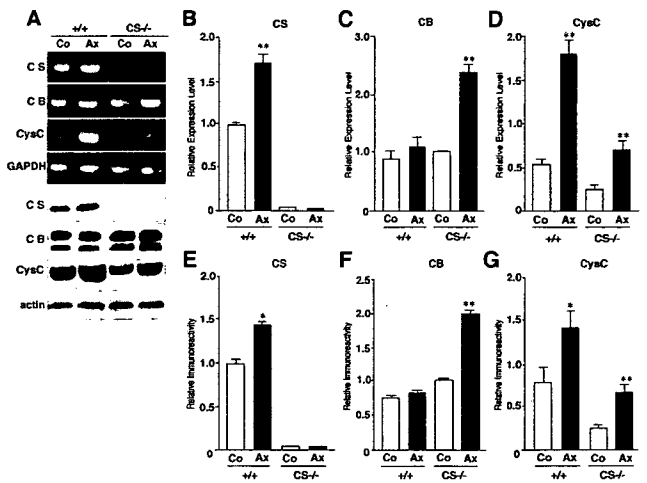


Fig. 5. Changes in CS, CB, and CysC levels in facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> and wild-type mice 7 days after axotomy. **A:** Immunoblot and RT-PCR analyses of CS, CB, and CysC on control (Co) and axotomized (Ax) sides of facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> and wild-type mice. **B:** Mean relative mRNA expression of CS, determined using expression of GAPDH as an internal control, on Co and Ax sides (open and solid columns, respectively) of facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> and wild-type mice. **C:** Mean relative mRNA expression of CB, determined using expression of GAPDH as an internal control, on Co and Ax sides (open and solid columns, respectively) of facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> and wild-type mice. **D:** Mean relative mRNA expression of CysC, determined using expression of GAPDH as an internal control, on Co and Ax sides (open and solid columns, respectively) of facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> and wild-type mice. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD of three experiments (\*\*significantly different from the value in Co at  $P < 0.01$ ). **E:** Mean level of CS protein, determined using expression of actin as an internal control, on Co and Ax sides (open and solid columns, respectively) of facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> and wild-type mice. **F:** Mean level of CB protein, determined using expression of actin as an internal control, on Co and Ax sides (open and solid columns, respectively) of facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> and wild-type mice. **G:** Mean level of CysC protein, determined using expression of actin as an internal control, on Co and Ax sides (open and solid columns, respectively) of facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> and wild-type mice. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD of three experiments (\* $P < 0.05$  versus value in Co, \*\* $P < 0.01$  versus value in Co).

the axotomized facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> mice (Fig. 6B). In contrast, intense immunoreactivity for CB was observed in the facial motoneurons but not in the perineuronal microglia of wild-type mice (Fig. 6C). Interestingly, the immunoreactivity for CB markedly increased in activated microglia abutting injured motoneurons in CS<sup>-/-</sup> mice (Fig. 6D). In contrast, immunoreactivity for CysC increased in activated microglia on the axotomized side of facial motor nuclei from both groups (Fig. 6E,F).

### Decrease in Facial Motoneuron Survival following Axotomy in CS<sup>-/-</sup> Mice

Finally, we examined the effects of CS deficiency on axotomy-induced facial motoneuron death. On days

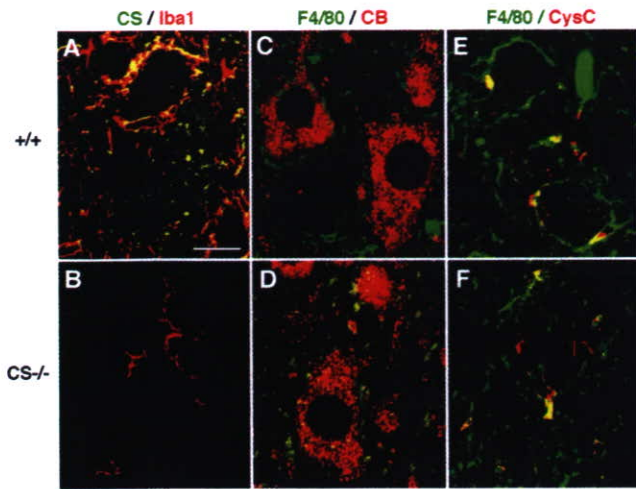


Fig. 6. Localization of CS, CB, and CysC in activated microglia that adhered to injured facial motoneurons 7 days after axotomy. **A:** Immunofluorescent CLSM image of CS (green). Scale bar = 25  $\mu$ m. **B:** Immunofluorescent CLSM image of Iba1 (red). **C:** CLSM image of F4/80 (green). **D:** CLSM image of CB (red). Immunoreactivity to CB was observed in microglia abutting the facial motoneurons of CS-/- mice but not in the perineuronal microglia of wild-type mice. **E:** CLSM image of F4/80 (green). **F:** CLSM image of CysC (red). Immunoreactivity to CysC was observed in microglia of both groups.

4, 7, 30, and 50 after axotomy, we counted the ChAT-positive facial motoneurons on both the control and axotomized sides of the facial motor nuclei from the mice in both groups. As shown in Figure 7, the difference between the two groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ) 30 and 50 days after axotomy. The mean percentage of ChAT-positive facial motoneurons that survived in wild-type mice 30 days after axotomy was  $79.9\% \pm 2.3\%$  ( $2,123 \pm 65$  cells on the control side,  $1,697 \pm 42$  cells on the axotomized side), and the mean percentage that survived 50 days after axotomy was  $69.7\% \pm 2.2\%$  ( $2,204 \pm 61$  cells on the control side,  $1,536 \pm 44$  cells on the axotomized side). The mean percentage of ChAT-positive facial motoneurons in CS-/- mice 30 days after axotomy was  $60.7\% \pm 3.3\%$  ( $1,917 \pm 46$  cells on the control side,  $1,164 \pm 39$  cells on the axotomized side), and the mean percentage that survived 50 days after axotomy was  $59.7\% \pm 2.6\%$  ( $2,315 \pm 43$  cells on the control side,  $1,382 \pm 50$  cells on the axotomized side).

## DISCUSSION

### Impairment of Migration and Transmigration of Activated Microglia and Monocytic Cells in CS-/- Mice

Following axotomy, microglia can become activated and therefore come into direct contact with injured motoneurons and begin to proliferate without turning into phagocytes (Ravich et al., 1999; Moran and Graeber, 2004). There is increasing evidence that the recruitment of monocytic cells through the cerebral vasculature and

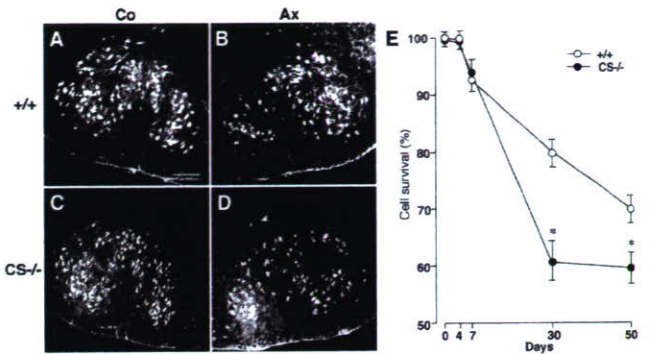


Fig. 7. Decrease in facial motoneuron survival following axotomy in CS-/- mice. **A:** Immunofluorescent CLSM image of ChAT-positive facial motoneurons on control (Co) side of wild-type mice. Scale bar = 150  $\mu$ m. **B:** Immunofluorescent CLSM image of ChAT-positive facial motoneurons on axotomized (Ax) side of wild-type mice. **C:** Immunofluorescent CLSM image of ChAT-positive facial motoneurons on Co side of CS-/- mice. **D:** Immunofluorescent CLSM image of ChAT-positive facial motoneurons on Ax side of CS-/- mice. **E:** Mean cell survival ratio of ChAT-positive facial motoneurons 4, 7, 30, and 50 days after axotomy in CS-/- and wild-type mice. Each column and bar represents the mean  $\pm$  SD of four experiments (\*significant difference between the 2 groups at  $P < 0.05$ ). Five serial sections (30  $\mu$ m thick) stained with anti-ChAT antibody were prepared from each group. CLSM images of ChAT-positive facial motoneurons in each section were taken as a stack at 1- $\mu$ m step size along the z direction with a 20 $\times$  objective. The number of ChAT-immunoreactive cells in the facial motor nucleus of each section was determined, and the values of all the serial sections of an entire facial motor nucleus were summed.

the leptomeninges also contributes to the increased number of microglia (Priller et al., 2001; Bechmann et al., 2005). In the present study, we found that cellular responses of microglia to facial nerve axotomy were markedly impaired in CS-/- mice. The mean number of activated microglia that accumulated on the axotomized side of facial motor nuclei of CS-/- mice was significantly smaller than that on the axotomized side of facial motor nuclei of wild-type mice. Furthermore, the activated microglia that accumulated on the axotomized side of facial motor nuclei of CS-/- mice exhibited some characteristics similar to those of phagocytic cells.

These observations show that the expression profiles of CB and CysC on the axotomized side of facial nuclei of CS-/- mice were quite different from those of wild-type mice. After axotomy, CB increased as the mature forms of activated microglia accumulated in the facial motor nuclei of CS-/- mice, but not in wild-type mice. CysC also significantly increased in activated microglia accumulated in the facial motor nuclei of both groups following axotomy. However, the expression of CysC on both sides of the facial motor nuclei of CS-/- mice was significantly smaller than that in wild-type mice. CB is known to increase in stimulated peripheral macrophages and phagocytic microglia in the CNS. More recently, CB has been demonstrated to be a major neurotoxic molecule released from activated microglia (Kingham and Pocock,

2001; Gan et al., 2004). Although the increased CB in activated microglia of CS<sup>-/-</sup> mice could compensate for some roles of CS, it may endow them with both phagocytic and neurotoxic capabilities.

In the present study, intrasplenic injection of CFDA and the invasion assay showed that the recruitment and transmigratory abilities of monocytic cells of CS<sup>-/-</sup> mice were significantly impaired. These results are consistent with the finding that CS degrades major components of the basement membrane of the cerebral vasculature and the leptomeninges including type IV and type V collagens, fibronectin, laminin, vitronectin, and heparan sulfate proteoglycans (Rao et al., 2003). CS has been reported to degrade ECM macromolecules in the brain parenchyma and basement membrane such as proteoglycans, laminin, collagens, elastin, and chondroitin sulfate proteoglycan, even at a neutral pH (Petanceska et al., 1996; Liuzzo et al., 1999). Thus, the impaired migration and recruitment of microglia/monocytic cells are considered mainly responsible for the significant reduction in the mean number of activated microglia accumulated on the axotomized side of the facial motor nuclei of CS<sup>-/-</sup> mice.

#### **Impairment of Axotomy-Induced Microglial Spreading on Surfaces of Axotomized Facial Motoneurons in CS<sup>-/-</sup> Mice**

There was a marked difference between two groups in the morphology of activated microglia that adhered to injured facial motoneurons. In wild-type mice, activated microglia spread on the surfaces of injured motoneurons. In contrast, CS<sup>-/-</sup> microglia failed to spread on injured motoneurons and stayed with the relatively large cell bodies. CS deficiency can reasonably be considered responsible for the different morphological changes in activated microglia in CS<sup>-/-</sup> mice after axotomy because CS can degrade molecules that influence the adhesion properties of microglia.

Perineuronal nets, typically consisting of a chondroitin sulfate proteoglycan complex with hyaluronan and tenascin glycoprotein, are the most conspicuous feature of a specialized neuronal microenvironment. Angelov et al. (1998) reported that TNR in the perineuronal net of motoneurons becomes down-regulated after a peripheral-nerve axotomy. They further showed TNR to be an anti-adhesive for microglia. Thus, down-regulation of TNR may make axotomized motoneurons accessible to the stable adhesion of activated microglia, leading to their spreading on the neuronal surface. More recently, a quantitative analysis of vibrissal movement revealed that TNR deficiency promoted functional recovery after a facial nerve axotomy (Guntinas-Lichius et al., 2005). It is likely that down-regulation of TNR and the subsequent adhesion of activated microglia on neuronal surfaces are therefore necessary for the survival and axonal regeneration of axotomized facial motoneurons. In the present study, the amount of TNR in the facial nuclei of CS<sup>-/-</sup> mice 7 days after axotomy was significantly larger than that in

wild-type mice. Axotomy-induced down-regulation of TNR can result from proteolytic degradation by CS secreted from activated microglia. Therefore, insufficient degradation of TNR can reasonably be considered to prevent microglia from spreading on the surfaces of injured motoneurons in CS<sup>-/-</sup> mice. Additional experiments are needed to further clarify the proteolytic profiles of CS to TNR and other perineuronal nets.

#### **Increase in Axotomy-Induced Motoneuron Death in CS<sup>-/-</sup> Mice**

The rate of neuronal death after a peripheral-nerve axotomy varies significantly between species. In adult rats, the rate of motoneuron death after axotomy is very low, whereas in adult mice, it is relatively high (Ravich et al., 1998; Kiryu-Seo et al., 2005). DBA mice were used in the present study, which showed that a deficiency of CS significantly decreased motoneuron viability in late post-axotomy stages. There are two possible reasons for this decreased neuronal viability in CS<sup>-/-</sup> mice after axotomy.

One possible explanation is that there is impaired microglial response to axotomy, as CS is known to be exclusively expressed in cells with a monocytic lineage, which include microglia but not neurons. However, there is increasing evidence that microglia do not affect neuronal survival and axonal regeneration. In mouse models deficient in interleukin-6 or macrophage colony-stimulating factor, there was a reduction in the number of microglia during the early response to facial nerve axotomy, but this did not influence the degeneration of facial motoneurons (Galiano et al., 2001; Kalla et al., 2001). To ablate the proliferating microglia, Gowing et al. (2006) recently generated transgenic mice that express a mutant form of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase driven by the myeloid-specific CD11b promoter. They showed that specific ablation of proliferating microglia in these transgenic mice could be achieved by the administration of ganciclovir. Using this system, they found that the elimination of proliferating microglia after axotomy did not influence the degeneration of motoneurons after a hypoglossal nerve axotomy.

In contrast, T lymphocytes have been reported to infiltrate into the facial motor nucleus during the early response to a facial nerve axotomy (Galiano et al., 2001; Kalla et al., 2001). Furthermore, the recruited T lymphocytes have been demonstrated to prevent axotomy-induced motoneuron death (Serpe et al., 1999; Byram et al., 2004). Through interactions with T lymphocytes, antigen-presenting cells including microglia are cross-activated. In the present study, we could detect infiltrated CD3-positive T lymphocytes in the facial motor nuclei of wild-type mice but not in those of CS<sup>-/-</sup> mice following axotomy. CS may also play a role in recruitment of T lymphocytes to the brain parenchyma.

We have previously reported that microglia used CS for the degradation of the invariant chain (Ii) into class II-associated Ii peptide (CLIP; Nishioku et al., 2002; Naka-

nishi, 2003). CS deficiency can reasonably be considered to prevent removal of CLIP from the antigen-binding cleft of MHC II, thus inhibiting antigen presentation to CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. The expression of MHC II markedly decreased on the axotomized side of the facial motor nuclei of CS-/- mice. Therefore, defective interactions with T lymphocytes may account for the reduced expression of MHC in CS-/- mice after axotomy. However, it was reported that MHC II-positive cells were almost completely limited to perivascular macrophages in a facial axotomy model (Liu et al., 2005). Additional experiments are necessary to elucidate the contribution of defective interaction with T lymphocytes to impaired microglial responses in CS-/- mice after axotomy.

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Sandra Ferry (Kyushu University) for providing us with valuable advice in conducting this study.

#### REFERENCES

- Angelov DN, Walther M, Streppel M, Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Probstmeier R, Pesheva P. 1998. Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induce downregulation of the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection. *J Neurosci* 18:6218–6229.
- Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simburger E, Naf-tolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. 2005. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J* 19:647–649.
- Blinzinger K, Kreutzberg GW. 1968. Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells. *Z Zellforsch* 85:145–157.
- Bromme D, Bonneau PR, Lachance P, Wiederanders B, Krischke H, Peters C, Thomas DY, Storer AC, Vernet T. 1993. Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* 268:4832–4838.
- Bromme D, Steinert A, Friebe S, Fittkau S, Wiederanders B, Kirschke H. 1989. The specificity of bovine spleen cathepsin S. *Biochem J* 264:475–481.
- Byram SC, Carson MJ, DeBoy CA, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ. 2004. CD4-positive T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation. *J Neurosci* 24:4333–4339.
- Fujita H, Tanaka J, Toku K, Tateishi N, Suzuki Y, Matsuda S, Sakanaka M, Maeda N. 1996. Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphological study. *Glia* 18:269–281.
- Galiano M, Liu ZQ, Kalla R, Bohatschek M, Koppius A, Gschwendtner A, Xu S, Werner A, Kloss CUA, Jones LL, Bluethmann H, Raivich G. 2001. Interleukin-6 (IL6) and cellular responses to facial nerve injury: effects on lymphocyte recruitment, early microglial activation and axonal outgrowth in IL6-deficient mice. *Eur J Neurosci* 14:327–341.
- Gan L, Ye S, Chu A, Anton K, Yi S, Vincent VA, von Schack D, Chin D, Murray J, Lohr S, Patten L, Gonzalez-Zulueta M, Nikolich K, Urfer R. 2004. Identification of cathepsin B as a mediator of neuronal death induced by A $\beta$ -activated microglial cells using a functional genomics approach. *J Biol Chem* 279:205565–205572.
- Gowing G, Vallières L, Julien JP. 2006. Mouse model for ablation of proliferating microglia in acute CNS injuries. *Glia* 53:331–337.
- Guntinas-Lichius O, Angelov DN, Morellini F, Lenzen M, Skouras E, Schachner M, Irintchev A. 2005. Opposite impact of tenascin-C and tenascin-R deficiency in mice on the functional outcome of facial nerve repair. *Eur J Neurosci* 22:2171–2179.
- Jinno S, Aika Y, Fukuda T, Kosaka T. 1998. Quantitative analysis of GABAergic neurons in the mouse hippocampus, with optical dissector using confocal laser scanning microscope. *Brain Res* 814:33–70.
- Kalla R, Liu Z, Xu S, Koppius A, Imai Y, Kloss CUA, Kohsaka S, Gschwendtner A, Moller JS, Werner A, Raivich G. 2001. Microglia and early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J Comp Neurol* 436:182–201.
- Kingham PJ, Pocock JM. 2001. Microglial secreted cathepsin B induces neuronal apoptosis. *J Neurochem* 76:1475–1484.
- Kiryu-Seo S, Hirayama T, Kato R, Kiyama H. 2005. Noxa is a critical mediator of p53-dependent motor neuron death after nerve injury in adult mouse. *J Neurosci* 25:1442–1447.
- Liu ZQ, Bohatschek M, Pfeffer K, Bluethmann H, Raivich G. 2005. Major histocompatibility complex (MHC2+) perivascular macrophages in the axotomized facial motor nucleus are regulated by receptors for interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) and tumor necrosis factor (TNF). *Neuroscience* 131:283–292.
- Liuzzo JP, Petanceska S, Moscatelli D, Devi LA. 1999. Inflammatory mediators regulate cathepsin S in macrophages and microglia: a role in attenuating heparan sulfate interactions. *Mol Med* 5:320–333.
- Miyake T, Gahara Y, Nakayama M, Yamada H, Uewabe K, Kitamura T. 1996. Up-regulation of cystatin C by microglia in the rat facial nucleus following axotomy. *Mol Brain Res* 37:273–282.
- Moran LM, Graeber MB. 2004. The facial nerve axotomy model. *Brain Res Rev* 44:154–178.
- Nakanishi H. 2003. Microglial functions and proteases. *Mol Neurobiol* 27:163–176.
- Nakanishi H, Zhang J, Koike M, Nishioku T, Okamoto Y, Kominami E, von Figura K, Peters C, Yamamoto K, Saftig P, Uchiyama Y. 2001. Involvement of nitric oxide released from microglia/macrophages in pathological changes of cathepsin D-deficient mice. *J Neurosci* 21:7526–7533.
- Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrushova N, Stock J, McNeish JD, Eastmen SE, Howard ED, Clarke SRM, Roslonic EF, Elliott EA, Rudensky AY. 1999. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 19:207–217.
- Nishioku T, Hashimoto K, Yamashita K, Liou SY, Kagamiishi Y, Maegawa H, Katsube N, Peters C, von Figura K, Saftig P, Katunuma N, Yamamoto K, Nakanishi H. 2002. Involvement of cathepsin E in exogenous antigen processing in primary cultured murine microglia. *J Biol Chem* 277:4816–4822.
- Petanceska S, Canoll P, Devi LA. 1996. Expression of rat cathepsin S in phagocytic cells. *J Biol Chem* 271:4403–4409.
- Priller J, Flügel A, Wehner T, Boenter M, Hass CA, Prinz M, Fernández-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons D, Dirnagl U. 2001. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 7:356–361.
- Rao JS. 2003. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 3:489–501.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CUA, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 30:77–105.
- Raivich G., Gehrman J, Kreutzberg GW. 1991. Increase of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors in the regenerating rat facial nucleus. *J Neurosci Res* 30:682–686.

- Ravich G, Jone LL, Kloss CUA, Werner A, Neumann H, Kreutzberg GW. 1998. Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *J Neurosci* 18:5804–5816.
- Ravich G., Moreno-Flores MT, Moller JC, Kreutzberg GW. 1994. Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. *Eur J Neurosci* 6:1615–1618.
- Ryan RE, Solane BF, Sameni M, Wood PL. 1995. Microglial cathepsin B: an immunological examination of cellular and secreted species. *J Neurochem* 65:1035–1045.
- Serpe CJ, Kohm AP, Huppenbauer CB, Sanders VM, Jones KJ. 1999. Exacerbation of facial motoneuron loss after facial nerve transection in severe combined immunodeficient (scid) mice. *J Neurosci* 19:RC7.
- Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, Haley KJ, Riese R, Ploegh HL, Chapman HA, 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10:197–206.
- Shimizu, Hayashi Y, Yamasaki R, Yamada J, Zhang J, Ukai K, Koike M, Mine K, von Figura K, Peters C, Saftig P, Fukuda T, Uchiyama Y, Nakanishi H. 2005. Proteolytic degradation of glutamate decarboxylase mediates disinhibition of hippocampal CA3 pyramidal cells in cathepsin D-deficient mice. *J Neurochem* 94:680–690.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. 1989. Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 21:117–123.
- Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, Wada Y, Yamamoto T, Naito M, Kodama T, Tsimikas S, Witztum JL, Lu ML, Sakara Y, Chin MT, Libby P, Shi GP. 2003. Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 111:897–906.
- Uwabe K, Gahara Y, Yamada H, Miyake T, Kitamura T. 1997. Identification and characterization of a novel gene (neurorep 1) expressed in nerve cells and up-regulated after axotomy. *Neuroscience* 80:501–509.

日本臨牀 66巻 増刊号1 (2008年1月28日発行) 別刷

# アルツハイマー病

—基礎研究から予防・治療の新しいパラダイム—

## III. 臨床編

アルツハイマー病の診断

新しい診断法の開発

アミロイド画像化用プローブ

工藤幸司 古本祥三 岡村信行

## III. 臨床編

アルツハイマー病の診断  
新しい診断法の開発

## アミロイド画像化用プローブ

The probes for amyloid imaging

工藤幸司<sup>1</sup> 古本祥三<sup>1</sup> 岡村信行<sup>2</sup>

## Key words

アルツハイマー病, アミロイドイメージングプローブ, タウイメージングプローブ,  
近赤外線蛍光プローブ

## はじめに

アミロイド画像化(イメージング)用プローブは, アルツハイマー病(AD)の代表的病理像の一つ, 老人斑の主構成成分であるアミロイド $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )の $\beta$ シート構造に高い親和性を有する標識ないしは非標識化合物であり, 画像としてのアミロイドイメージングを可能にするために用いられる。

AD診断におけるアミロイドイメージングの有用性については本誌岡村らおよび樋口らの別稿に譲るとして, 本稿では positron emission tomography (PET) プローブを中心に, アミロイドイメージングに用いられる種々のプローブ群の現状, 開発状況, 薬理学的特性などにつき概説するとともに, 併せてタウイメージング用PETプローブのそれらについても若干言及してみたい。

1. アミロイドイメージング用プローブに  
求められる一般的な特性および特徴

いずれのアミロイドイメージング用プローブもまず第1に $\beta$ シート構造をとったA $\beta$ に対して高い親和性をもつことが必要である。プローブは化学構造的に Congo red タイプ, thioflavin

Tタイプおよびそのほかに大きく分類される。普通のレセプターアッセイでは多少の標識リガンドの構造の違いは克服できるが, 例えば Congo red タイプ標識リガンドのA $\beta$ バインディングは同タイプのプローブによってよく置換されるが, その他のタイプのそれらによっては極めて置換されにくく, またその逆も真であることが知られている<sup>1,2)</sup>。このことはプローブの基本構造の違いによってA $\beta$ バインディングサイトはそれぞれ異なること, いいかえればプローブの基本構造の違いの数だけバインディングサイトが存在することを示唆している。

A $\beta$ はAD患者脳内に蓄積する。当然プローブは血液-脳関門を透過することが必要であるが, 投与直後には急速かつ大用量が脳へ移行し, その後急速に脳からウォッシュアウトされるという極めて相反する2つの特性をもたせなければならぬことが, これらプローブの開発を難しくしている最大の要因である。

現状のアミロイドイメージングはプローブのいずれかの部位に標識された同位体を追跡することから, 代謝された同位体が標的以外に集積するような標識法は避けなければならない。 [<sup>18</sup>F]標識体において脱フッ素により<sup>18</sup>Fイオンが骨に集積し, あたかも(頭蓋)骨PET画像とな

<sup>1</sup>Yukitsuka Kudo, Shozo Furumoto: Biomedical Engineering Research Organization (TUBERO), Tohoku University 東北大学先進医工学研究機構 <sup>2</sup>Nobuyuki Okamura: Department of Pharmacology, Tohoku University School of Medicine 東北大学大学院医学系研究科 機能薬理学分野

ることはよく経験することである<sup>3)</sup>。プローブごとに適切な標識法および部位を開発しなくてはならないことも、プローブ開発を難しくしている一因である。

## 2. アミロイドイメージング用 PET プローブ

Aβに親和性が高く、しかも血液-脳関門を容易に透過する化合物を標識し、ADの診断に応用しようとするアイデアは1990年代初めのころから提唱されていたが、具体例として我々の目に触れたのはこの分野のパイオニア、ピッツバーグ大学 Klunk らのプロトタイププローブ chrysamine-G<sup>4)</sup>が最初である(図1)。彼らの chrysamine-G 系統プローブは X-34、更に methoxy-X04 へと引き継がれている。X-34 が更に修飾されたのがペンシルベニア大 Kung 夫妻らによって報告された BSB, ISB, IMSB であり、夫妻らは更に TZDM, TZPI, IBOX をも報告している(図1)。著者らのプローブは BF-108 から始まり、次いで BF-168 へと研究が転換した(図1)。

これら以外にも数多くのプローブが学術誌および学会で報告されてきたが、それらの集大成が図2に示した臨床研究に供されたプローブ群である。2002年初頭、世界で初めてAD患者にアミロイドイメージング用 PET プローブが投与された画像が紹介された。この栄誉に浴したのには UCLA Barrio らのチーム、プローブは [<sup>18</sup>F] FDDNP<sup>5)</sup>であった。しかし [<sup>18</sup>F] FDDNP は非特異的結合があまりにも多く、このプローブがスタンダードな AD 診断用プローブになるとは考えにくい。

現時点で最も臨床試験実施例の多いプローブは、ピッツバーグ大 Klunk らによって開発されたその数100例を超えると思われる [<sup>11</sup>C] PIB<sup>6)</sup>である。 [<sup>11</sup>C] PIB の最も優れた特徴は脳からのウォッシュアウトに優れていることであり、この特性に基づくと思われる非特異的結合が少ないことである。

[<sup>11</sup>C] SB-13<sup>7)</sup>はペンシルベニア大 Kung 夫妻らによって開発されたプローブであるが、ヒト

画像はほとんど [<sup>11</sup>C] PIB と同様といわれている。

著者らによって開発された [<sup>11</sup>C] BF-227<sup>8)</sup>の AD 患者脳における集積像は、Aβ ないしは老人斑の空間的分布とほぼ一致するのが特徴である。

現在、世界中で主として研究用に使用されているアミロイドイメージング用 PET プローブのほとんどは [<sup>11</sup>C] 標識体である。 [<sup>11</sup>C] 標識プローブはその半減期の短さ(約20分)から、これを使用するためには PET 施設の極近隣にサイクロトロンおよび合成装置の併設が必要である。一方、もう一つの代表的 PET 用標識体である [<sup>18</sup>F] はその半減期(約110分)が長く、サイクロトロンおよび合成装置を備えた製造拠点で標識合成し、PET 施設へのデリバリーが可能であることなどから、診断用(臨床用)プローブとしての有用性は [<sup>11</sup>C] のそれに比し圧倒的に優れている。これらのことから、次世代のアミロイドイメージング用プローブとして [<sup>18</sup>F] 標識体の開発が進行中であり、著者らもこれに取り組んでいる。

2007年6月末までに探索的臨床研究が実施されている [<sup>18</sup>F] 標識プローブはピッツバーグ大・General Electrics 社の [<sup>18</sup>F] PIB<sup>9)</sup>、ペンシルベニア大(Avid社)・Bayer(Schering)社の [<sup>18</sup>F] AV1/ZK<sup>10)</sup>である。両プローブとも今後臨床例数が積み重ねられた後、プローブごとの評価が下されるであろう。また、開発者に巨大企業名がみられることから、AD 診断用の [<sup>18</sup>F] 標識プローブがいよいよ巨大ビジネスとして動き出すであろう未来をうかがわせる。

## 3. その他のアミロイドイメージング用 プローブ

ADの病理像を追跡することにより同病を診断しようとする PET プローブ・PET を用いたアミロイドイメージングは、これまでのあらゆる診断法に比し、感度、特異度、診断精度などのいずれをとっても明らかに優れていることは確かである。しかしこの診断法には、将来的にみてもどうしても克服できないと予想される一つの課題がある。それは診断装置、すなわち PET の普及台数の問題である。今後、標識プロ



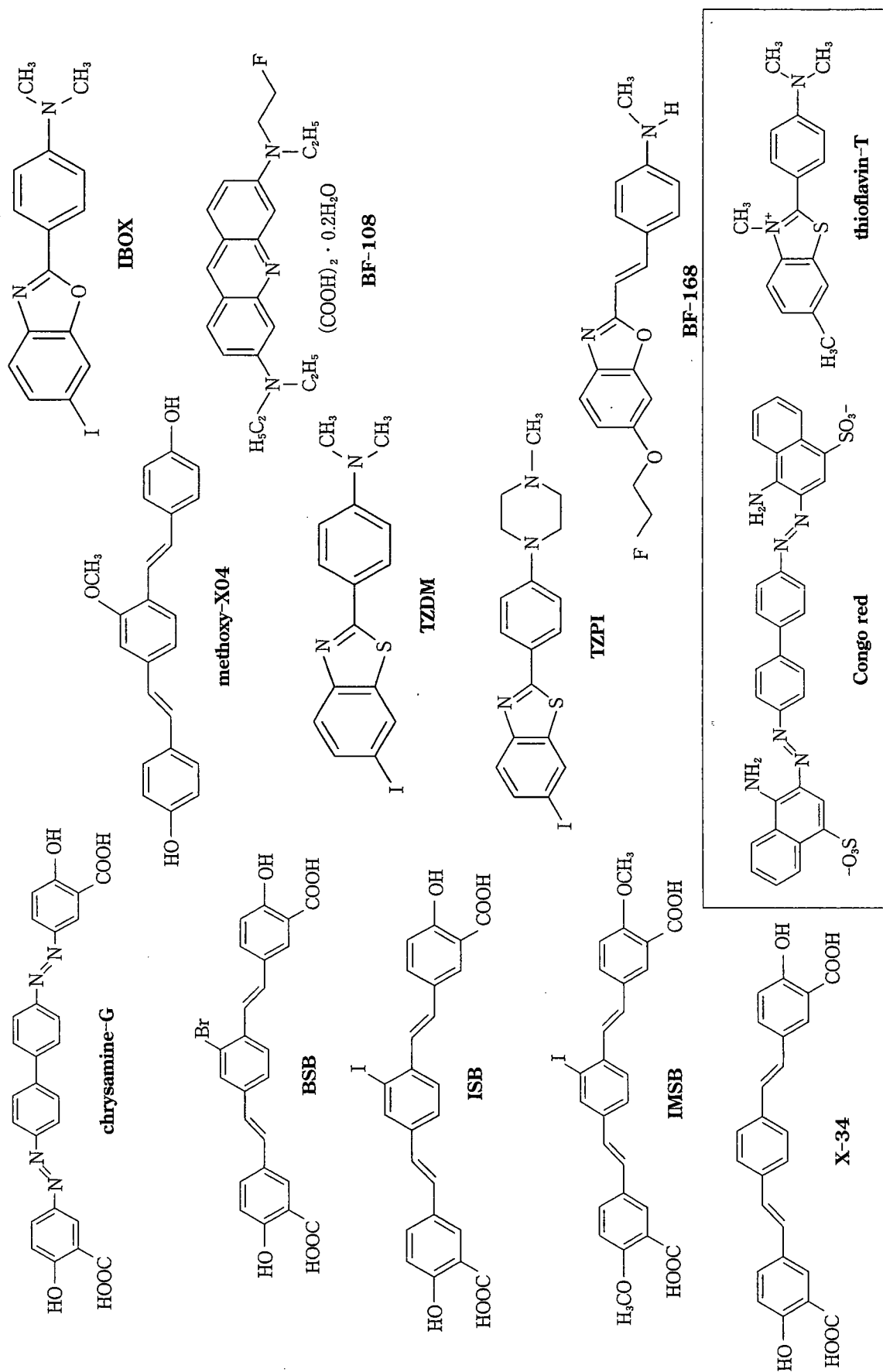


図 1 アミロイドイメージング用に開発されたPETプローブ群

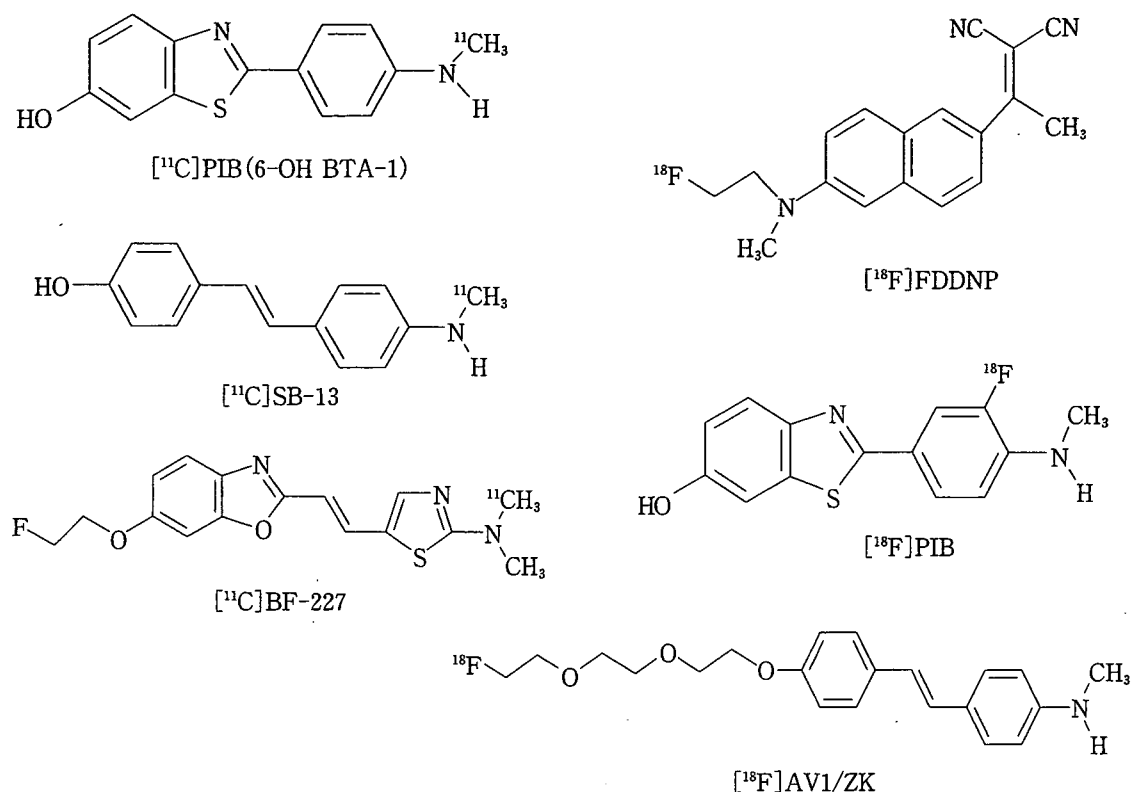


図2 臨床試験に供されたアミロイドイメージング用PETプローブ

ープのデリバリーが日常化されたとしても、MRIやSPECTのように国内設置台数が数千といった普及は、PETにおいては到底到達不可能であろう。

そこでMRIまたはSPECTにそれぞれ対応したプローブを用いたアミロイドイメージングが試みられつつある。MRI用プローブについては、本誌樋口らの別稿を参照していただきたい。

次にSPECT用プローブであるが、ペンシルベニア大Kungらによって開発された[<sup>125</sup>I]IMPY<sup>11)</sup>(図3)は、AD患者においてAβが蓄積することが知られている部位においてuptakeが増加していることが第10回国際アルツハイマー病学会にて報告された<sup>11)</sup>。また、KungらはIMPY後も精力的にSPECT用プローブ候補化合物を報告している。一方、国内においてもSPECT用プローブの開発を進めている企業が存在することを聞いている。

最近、より簡便なAD診断法として近赤外線蛍光(near infra-red fluorescence: NIRF)プローブ・蛍光イメージング診断装置が注目されて

いる。その診断原理はAβに親和性をもち、しかも血液-脳関門を越え、更に生体を透過する光(波長約600-1,000nm、いわゆる生体の分光学的窓領域)を照射することによって同領域波長の蛍光を発するNIRFプローブをAD診断に応用しようとするものである。

この診断に用いる蛍光イメージング診断装置はベッドサイド、外来を問わず可搬性に優れており、放射線を利用せず、また、短時間での診断、集団検診または人間ドックへの応用が可能である。

この診断に用いるプローブについては最初のプロトタイププローブAOI-987<sup>12)</sup>、更にNIAD-4<sup>13)</sup>(いずれも図3)も既に紹介されており、著者らもその開発に取り組んでいる。

図4は著者らが見いだしたAβに親和性を有するNIRFプローブを、脳内にAβが蓄積するTgおよび野生型マウスに静脈内投与し、小動物用NIRFイメージング装置で撮影した例であるが、Tgマウス脳においてAβとプローブとの結合が示唆される画像が観察された。

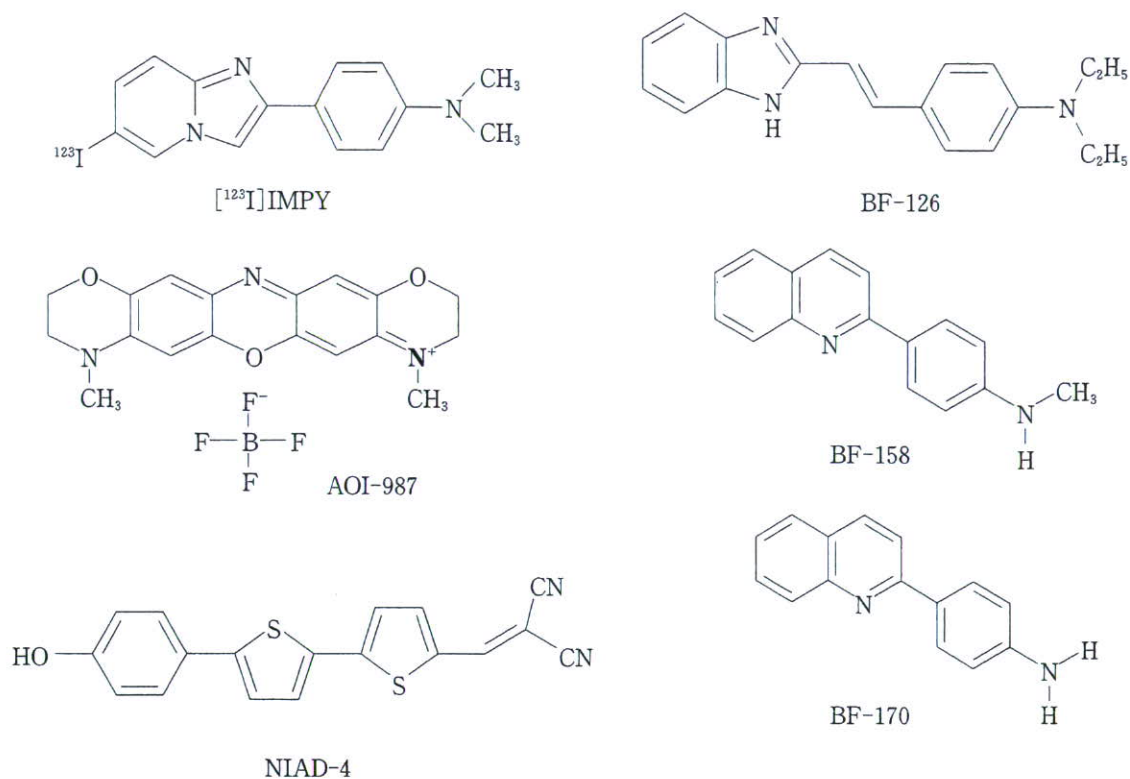


図3 アミロイドイメージング用に開発された SPECTプローブ (IMPY) および近赤外線蛍光 (NIRF) プローブ (AOI-987, NIAD-4), ならびにタウイメージング用に開発されたプローブ (BF-126, BF-158, BF-170)

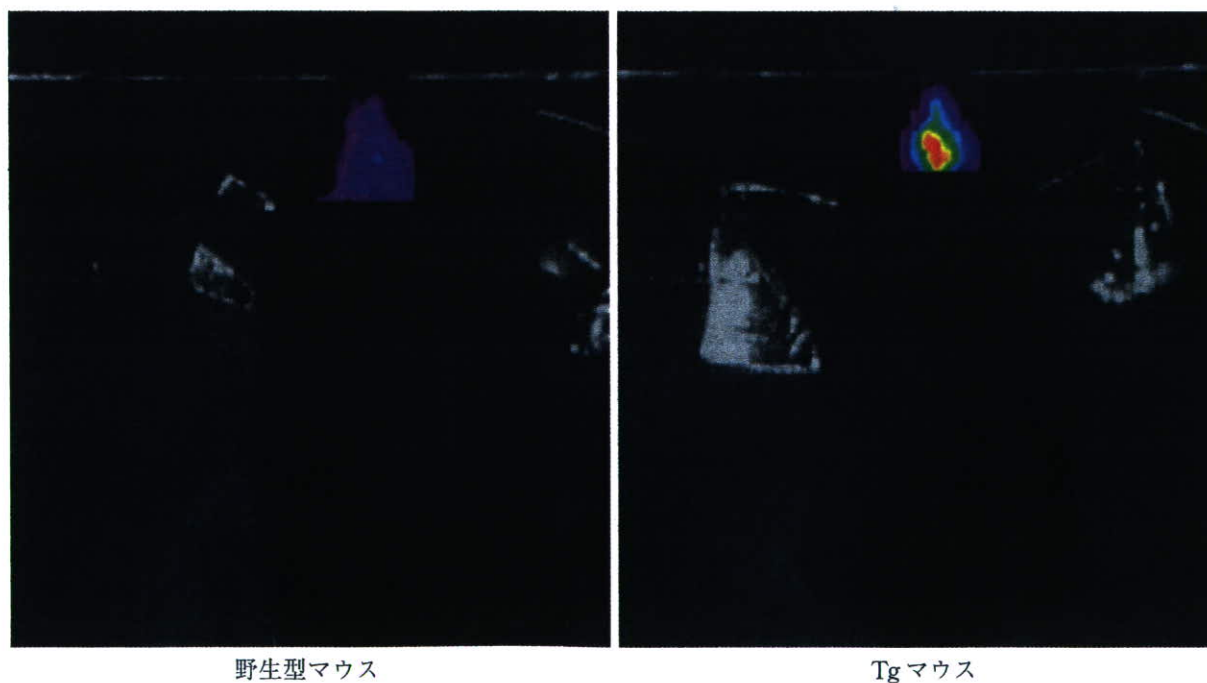


図4 Tg マウスに A $\beta$  親和性近赤外線蛍光 (NIRF) プローブを投与した際の蛍光イメージング

著者らが見いだした NIRF プローブを A $\beta$  脳内蓄積 Tg および野生型マウスに静脈内投与し, 小動物用 NIRF イメージング装置で撮影した. Tg マウス脳において A $\beta$  とプローブとの結合が示唆される画像が観察された. (提供: GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社)

AD 診断用 NIRF プローブ開発の難しさは、従来のアミロイドイメージング用プローブの備えるべき特性に加えて、波長、量子収率、ストークスシフトなど、多くの克服すべき課題が存在することである。更に現状の蛍光イメージング装置は小動物用においてでさえも必ずしもプローブ開発者を満足させるレベルにはなく、プローブとともに診断装置の更なる進化も必要であることを痛感している。

しかし、将来の AD 診断はその簡便さから NIRF プローブ・蛍光イメージング診断装置で最初のスクリーニングが行われ、疑わしい場合は PET プローブ・PET で診断という 2 段階になる可能性が高いと著者らは推測している。

#### 4. タウイメージング用 PET プローブ

AD 患者脳内において特有の病理像を示す蛋白、すなわち A $\beta$  (ないしは老人斑) と (過剰リン酸化) タウ蛋白 (ないしは神経原線維変化) の両者は  $\beta$  シート構造をとるが、これまで A $\beta$  を認識する、あるいは A $\beta$  と タウ蛋白の両者を認識するプローブは数多く報告されているが、選択的にタウ蛋白を認識するプローブは著者らが見いだした化合物群 (BF-126, BF-158, BF-

170)<sup>14)</sup>のみである (図 3)。

タウイメージングは AD の進行度ないしは重症度診断にはむしろアミロイドイメージングに勝る有用性を示すと予想されてはいるが、臨床試験に供されたタウイメージング用 PET プローブはいまだ報告されていない。

謝辞 著者らの研究には科学技術振興調整費、独立行政法人医薬基盤研究所の「保健医療分野における基礎研究推進事業」、厚生労働科学研究費補助金の「基礎研究成果の臨床応用推進研究事業」、同「長寿科学総合研究事業」、同「難治性疾患克服事業」、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 産業技術研究助成事業の支援をいただきました。また BF 研究所に出資していただきました医薬品医療機器総合機構および各社に感謝いたします。本研究には「平成 16 年度三井住友海上福祉財団研究助成金」、「ノバルティス老化および老年医学研究基金」、「アストラゼネカ・リサーチグラント」の支援をいただきました。最後に共同研究者の福祉村病院 長寿医学研究所 赤津裕康、山本孝之、東北大学医学部 老年/漢方内科 荒井啓行、同機能薬理学分野 谷内一彦 諸先生、旧 BF 研究所アミロイドイメージング研究チームおよび現東北大学 PET イメージング研究チームの同僚に感謝の意を表します。

#### 文献

- 1) Zhuang ZP, et al: Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates. *J Med Chem* 44: 1905-1914, 2001.
- 2) Lockhart A, et al: Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on beta-amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem* 280: 7677-7684, 2005.
- 3) Tipre DN, et al: PET imaging of brain 5-HT1A receptors in rat in vivo with <sup>18</sup>F-FCWAY and improvement by successful inhibition of radioligand defluorination with miconazole. *J Nucl Med* 47: 345-353, 2006.
- 4) Klunk WE, et al: Development of small molecule probes for the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 15: 691-698, 1994.
- 5) Shoghi-Jadid K, et al: Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 10: 24-35, 2002.
- 6) Klunk WE, et al: Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55: 306-319, 2004.
- 7) Verhoeff NP, et al: In-vivo imaging of Alzheimer disease beta-amyloid with [<sup>11</sup>C]SB-13 PET. *Am J Geriatr Psychiatry* 12: 584-595, 2004.
- 8) Kudo Y, et al: 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-[fluoro]ethoxy) benzoxazole: a novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med* 48: 553-561, 2007.
- 9) Mathis CA, et al: Comparison of the amyloid imaging agents [F-18]3'-F-PIB and [C-11]PIB in

- Alzheimer's disease and control subjects. *J Nucl Med* 48(Suppl 2): 56, 2007.
- 10) Rowe CC, et al: First results from human studies of a novel F-18 PET ligand for brain  $\beta$ -amyloid imaging. *J Nucl Med* 48(Suppl 2): 57, 2007.
  - 11) Clark CM, et al: Imaging amyloid with I<sup>123</sup>IMPY SPECT. *Alzheimer's & Dementia* 2(Suppl 2): 342, 2006.
  - 12) Hintersteiner M, et al: In vivo detection of amyloid-beta deposits by near-infrared imaging using an oxazine-derivative probe. *Nat Biotechnol* 23: 577-583, 2005.
  - 13) Nesterov EE, et al: In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers. *Angew Chem Int Ed Engl* 44: 5452-5456, 2005.
  - 14) Okamura N, et al: Quinoline and benzimidazole derivatives: candidate probes for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25: 10857-10862, 2005.

日本臨牀 66 卷 増刊号 1 (2008 年 1 月 28 日発行) 別刷

# アルツハイマー病

—基礎研究から予防・治療の新しいパラダイム—

## III. 臨床編

アルツハイマー病の診断

新しい診断法の開発

アミロイドイメージング

PET

岡村信行  
荒井啓行

谷内一彦  
工藤幸司

古川勝敏

### III. 臨床編

## アルツハイマー病の診断 新しい診断法の開発 アミロイドイメージング PET

*In vivo* amyloid imaging using PET

岡村信行<sup>1</sup> 谷内一彦<sup>1</sup> 古川勝敏<sup>2</sup> 荒井啓行<sup>2</sup> 工藤幸司<sup>3</sup>

**Key words** : アルツハイマー病, 老人斑, アミロイドβ蛋白, positron emission tomography (PET)

#### はじめに

認知症の診断プロセスにおいて、脳内の器質性変化を正確に把握することは重要であり、その手段としての画像診断の役割は大きい。従来の画像診断では、萎縮や血流・代謝の低下を認知症診断の指標としてきた。これらは主として神経細胞の脱落を反映した変化である。軽度認知機能障害(MCI)以降の症状が顕在化した段階での診断には優れた指標となるが<sup>1)</sup>、神経細胞の脱落が軽微な段階では、その検出力に限界がある。

アルツハイマー病(AD)では、神経細胞の脱落に先立って、アミロイドβ蛋白、タウ蛋白を主要構成成分とする老人斑、神経原線維変化の脳内沈着が出現する<sup>2)</sup>。これらは同時に疾患特異性の高い変化でもある。したがって、上記病理像を生体で非侵襲的に検出し得る検査こそが、ADを早期診断するうえで理想的な診断法となる。こうした理由から、アミロイドの脳内蓄積を非侵襲的に計測する画像診断法(アミロイドイメージング)が近年脚光を浴びるようになった。ここ数年の研究の進展により、ADの早期

診断におけるアミロイドイメージングの有用性が広く認知された。更に、MCIあるいは無症候段階における進行予測や、脳内のアミロイドβ蛋白蓄積量をモニタリングする新たな薬効評価系としても、その活用が強く期待されている。

そこで本稿では、近年進歩の著しいpositron emission tomography (PET)を用いたアミロイドイメージングについて紹介する。

#### 1. アミロイドイメージング用プローブ

PETを用いてアミロイドを画像化するには、アミロイドのβシート構造に結合親和性を有する低分子化合物をポジトロン放出核種(<sup>11</sup>Cあるいは<sup>18</sup>F)で標識し、これをプローブとして用いる<sup>3)</sup>。静脈から投与されたプローブが脳内へ移行し、老人斑に選択的に結合して局所からの排出が遅延する性質を利用して、プローブの結合した老人斑の脳内濃度を計測する。これまでに、<sup>[18F]FDDNP</sup>, <sup>[11C]PIB</sup>, <sup>[11C]SB-13</sup>, <sup>[11C]BF-227</sup>などの複数のアミロイドイメージング用プローブが臨床応用されている。プローブの開発状況の詳細については本誌の工藤らの別稿を参照されたい。本稿ではPIBとBF-227

<sup>1</sup>Nobuyuki Okamura, Kazuhiko Yanai: Department of Pharmacology, Tohoku University School of Medicine 東北大学大学院医学系研究科 機能薬理学分野 <sup>2</sup>Katsutoshi Furukawa, Hiroyuki Arai: Department of Geriatrics and Gerontology 同 老年病態学分野 <sup>3</sup>Yukitsuka Kudo: Tohoku University Biomedical Engineering Research Organization (TUBERO) 東北大学先進医工学研究機構

のPET所見を中心に述べる。

## 2. PIB

### a. アルツハイマー病早期診断への応用

現在最も多くの施設で利用されているプローブは、 $^{11}\text{C}$ で標識されたPIB(正式名6OH-BTA-1)である。母化合物であるthioflavin Tと同様にAD脳内に蓄積した老人斑に選択的に結合する特性に加えて、高い脳血液関門透過性を有する<sup>4)</sup>。このPIBを用いてAD患者でPET検査を実施すると、大脳皮質領域を中心にPIBの顕著な集積が観察され、その集積分布はBraak and Braakが記載した老人斑の蓄積分布に一致する<sup>5,6)</sup>。更にMCIの約半数の症例でもAD患者と同様の高集積が観察される<sup>6,7)</sup>。これらの症例は既に老人斑の沈着が進行し、ADと同等の病理像を呈した‘AD発症予備群’と推測される。実際にMCIでPIB高集積を示した症例の多くがADに進行したとのpreliminaryな報告もあり、PIB-PETでMCIの予後予測ができる可能性は高い。

### b. 非アルツハイマー型変性認知症での所見

PIBの異常集積を示す疾患はADには限定されず、レビー小体型認知症(DLB)の多くの症例でも集積上昇を認める。ただし、この集積上昇がレビー小体の沈着を反映しているとは考えにくい。*in vitro*での検討では、PIBの $\alpha$ シヌクレインとの結合性は $\text{A}\beta$ に比して低いとされている<sup>8)</sup>。DLBにおけるPIBの集積分布はAD患者とほぼ共通しているため、むしろ併存する $\text{A}\beta$ 蓄積病変を反映した変化と考えられる<sup>9)</sup>。一方、前頭側頭葉型認知症(FTD)などのタウオパチーでは正常な集積像を示し、ADとの鑑別に有用である。またPIBは神経原線維変化への結合性も低く<sup>8)</sup>、辺縁系への神経原線維変化の蓄積を主体とする認知症の検出力は低いと予想される。

### c. 発症前診断への応用は可能か

アミロイドイメージングに課された役割として、無症候例での老人斑沈着が検出可能か否かに注目が集まる。41人の認知機能正常例を対象とした検討<sup>9)</sup>では、うち4人でPIBの高集積が認められている。同症例では脳脊髄液中

$\text{A}\beta_{42}$ 濃度の低下も併せて観察されており<sup>10)</sup>、症状発現前の老人斑沈着を反映している可能性が高い。このような集積が、良性(正常加齢の範囲内)のものか、悪性(ADへの進行を示唆する老人斑の病的沈着)のものかを見極めることは現時点では難しい。今後、PET検査実施例を長期にフォローアップすることにより、結論が下される。

もう1点検証する必要があるのは、PET画像が老人斑の蓄積分布を本当に忠実に反映しているか否かという点である。これには病理と画像の対比研究が求められよう。最近PIB-PETを施行した症例の剖検結果が報告されている<sup>11)</sup>。この症例は、DLBの臨床診断でありながら、生前のPET検査ではPIBの高集積が認められていた。病理でもDLBの診断が下されたが、 $\text{A}\beta$ の病理としては脳アミロイドアンギオパチーが顕著であった。老人斑の沈着はびまん性老人斑を主体とした軽微な変化にとどまっており、本症例では脳血管アミロイドの存在がPIBの集積に大きく関与していると考えられる。したがって、アミロイドイメージングにおける異常集積例に対しては、老人斑以外へのプローブの結合の可能性も念頭に置いた慎重な解釈が求められる。

## 3. BF-227

著者らはベンズオキサゾール誘導体がアミロイドイメージング用プローブの候補化合物になり得ることを見だし<sup>12)</sup>、その最適化化合物であるBF-227の臨床的有用性を検証している。 $^{11}\text{C}$ BF-227投与後20-40分のPET画像を観察すると、AD患者では大脳皮質領域で $^{11}\text{C}$ BF-227の顕著な集積が確認できる(図1-a)。側頭葉におけるSUV対小脳比を算出すると、AD患者のほぼ全例で高値を示し、診断に有用である<sup>13)</sup>。更にSPM2ソフトウェアを用いて、健常者に比べてAD患者で有意な集積上昇のみられた脳領域を抽出した結果、側頭-頭頂葉領域を中心とする大脳皮質の広範な領域で集積上昇が確認された(図1-b)。このような集積分布は、病理学的研究で示されているneuritic plaqueの



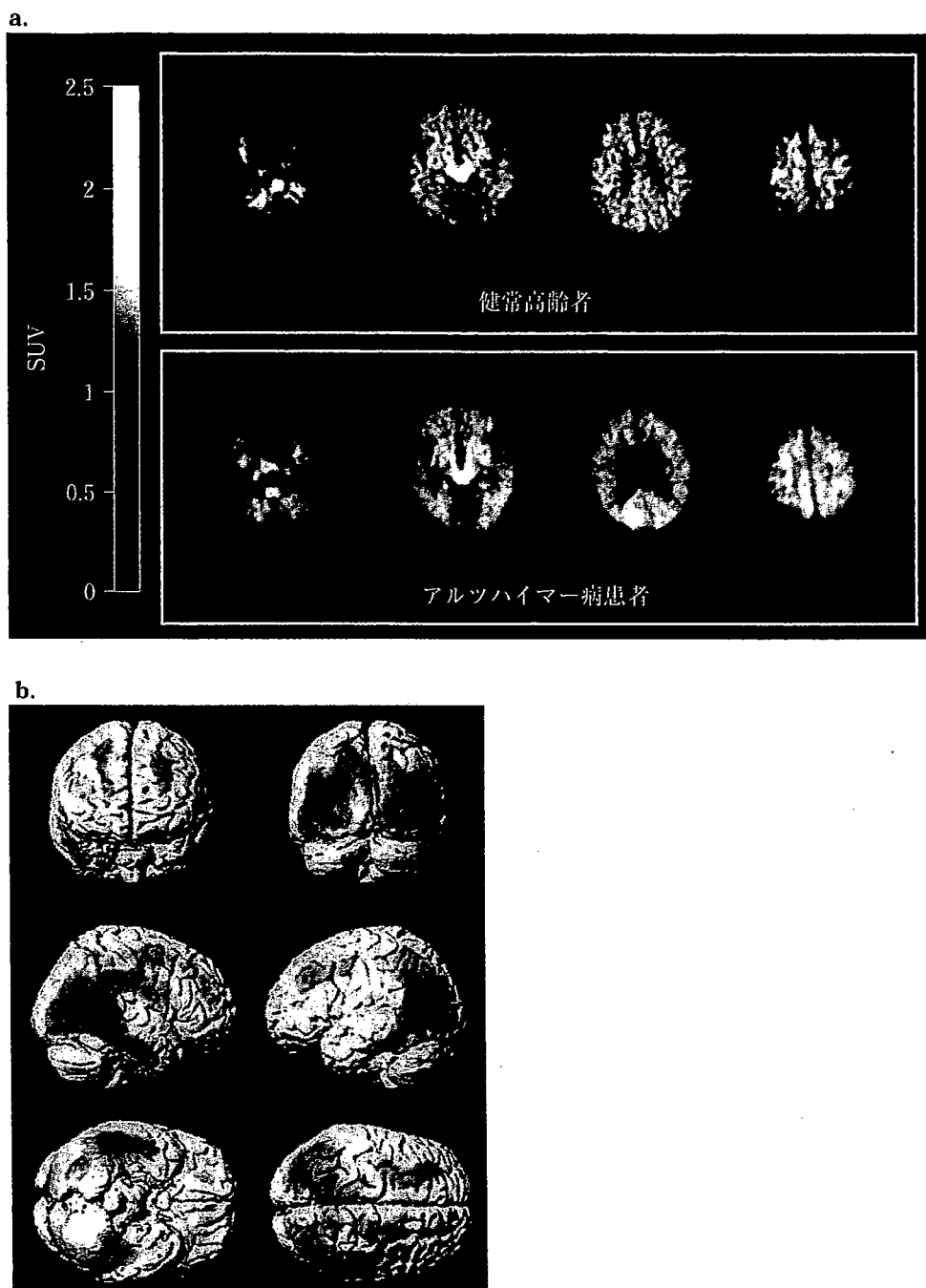


図1  $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$  投与後 20-40 分の PET 画像 (a), アルツハイマー病患者での集積上昇部位 (b)

沈着分布に近く、比較的成熟した老人斑の蓄積を反映しているものと推測される。

MCIでは、PIBと同様、半数以上の症例で大脳皮質領域での集積上昇が観察されているが、健康高齢者と同程度の集積を示す症例も存在する。MCIが病理学的には heterogeneous な集団であることを裏付ける所見といえる。また図2

に示すように、MCI症例におけるBF-227の集積上昇は、AD患者に比べれば相対的に軽度である。このことからMCI段階では、老人斑の脳内蓄積はまだ進行途上にあることが示唆される。

#### 4. $^{18}\text{F}$ 標識プローブの開発状況

現在、PIBやBF-227などは半減期20分の

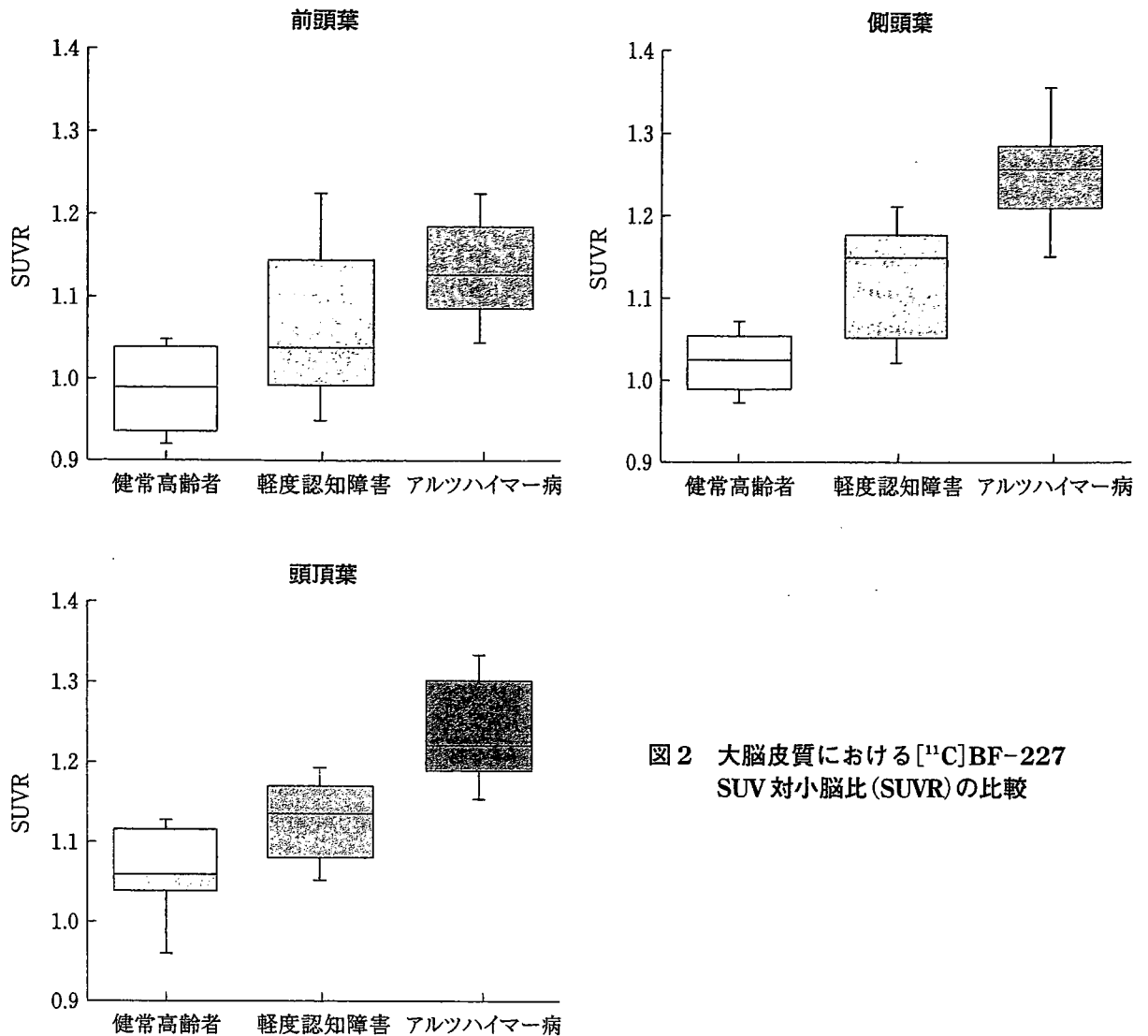


図2 大脳皮質における $^{11}\text{C}$ BF-227 SUV対小脳比(SUVr)の比較

$^{11}\text{C}$ で標識されていることから、薬剤供給面での制約があり、検査実施可能な施設が限定されている。本検査の普及を図るには、放射性薬剤として供給できる $^{18}\text{F}$ (半減期110分)で標識したPETプローブ、ないしはSPECT用に $^{123}\text{I}$ (半減期13.2時間)で標識したプローブの実用化が望まれる。 $^{18}\text{F}$ 標識プローブとしては、FDDNPが既に実用化されているが<sup>14)</sup>、PIBなどと比べて、老人斑蓄積部位の非蓄積部位に対するコントラストが不良である。現在、PIB、SB-13の $^{18}\text{F}$ 標識体である $^{18}\text{F}$ 3'-F-PIB、 $^{18}\text{F}$ AV1の臨床評価が海外で進められており、良好な成績を収めている。著者らも新規 $^{18}\text{F}$ 標識プローブの臨床

評価へ向けて準備を進めており、PET診断用薬剤としての供給を目指している。

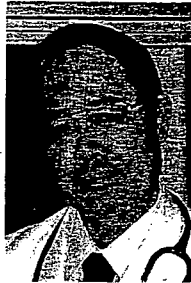
#### おわりに

アミロイドイメージング検査が広く普及すれば、今後多くの臨床施設で本検査が認知症の診断や治療評価のプロセスに組み込まれることになる。ただし、本検査が健常人のAD発症予測にどれほど信頼性の高い情報を提供できるのか、まだ十分なエビデンスが得られていない。今後、一般住民を対象とした大規模な長期フォローアップ研究を通じて、正常加齢と病的過程の線引きを行わねばならない。

## ■ 文 献

- 1) Chong MS, Sahadevan S: Preclinical Alzheimer's disease: diagnosis and prediction of progression. *Lancet Neurol* 4: 576-579, 2005.
- 2) Price JL, Morris JC: Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45: 358-368, 1999.
- 3) Cai L, et al: Radioligand development for PET imaging of  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ )—current status. *Curr Med Chem* 14: 19-52, 2007.
- 4) Mathis CA, et al: Synthesis and evaluation of  $^{11}C$ -labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem* 46: 2740-2754, 2003.
- 5) Klunk WE, et al: Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55: 306-319, 2004.
- 6) Rowe CC, et al: Imaging  $\beta$ -amyloid burden in aging and dementia. *Neurology* 68: 1718-1725, 2007.
- 7) Lopresti BJ, et al: Simplified quantification of Pittsburgh Compound B amyloid imaging PET studies: a comparative analysis. *J Nucl Med* 46: 1959-1972, 2005.
- 8) Klunk WE, et al: The binding of 2-(4'-methylaminophenyl) benzothiazole to postmortem brain homogenates is dominated by the amyloid component. *J Neurosci* 23: 2086-2092, 2003.
- 9) Mintun MA, et al: [ $^{11}C$ ]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology* 67: 446-452, 2006.
- 10) Fagan AM, et al: Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid  $A\beta_{42}$  in humans. *Ann Neurol* 59: 512-519, 2006.
- 11) Bacskai BJ, et al: Molecular imaging with Pittsburgh Compound B confirmed at autopsy: a case report. *Arch Neurol* 64: 431-434, 2007.
- 12) Okamura N, et al: Styrylbenzoxazole derivatives for in vivo imaging of amyloid plaques in the brain. *J Neurosci* 24: 2535-2541, 2004.
- 13) Kudo Y, et al: 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-[fluoro]ethoxy) benzoxazole: a novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med* 48: 553-561, 2007.
- 14) Small GW, et al: PET of brain amyloid and tau in mild cognitive impairment. *N Engl J Med* 355: 2652-2663, 2006.

# アルツハイマー病バイオマーカー開発の現況と Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative



荒井 啓行

東北大学 加齢医学研究所  
加齢老年医学研究分野 教授

荒井 啓行



古川 勝敏

東北大学大学院 医学系研究科  
先進漢方治療医学講座 准教授

古川 勝敏



工藤 幸司

東北大学 先進医工学研究機構  
高度情報通信分野 教授

工藤 幸司

## 1—はじめに

高齢者は一見健康に見えても種々の潜在的な臓器機能低下が見られる。老年医療では、臓器機能の決定的な破局を回避し、病状の平穏な管理と生活の自立をサポートすることにまず目を向けなければならない。高齢者の自立を支える基盤となる生体機能は、①食べること、②移動すること、③判断すること、の3点である。食べることの障害は嚥下性肺炎として、移動することの失敗は転倒・骨折として、そして判断する能力の喪失が認知症としてどれも老年医療にとって最重要課題であることは言うまでもない。Alzheimer's Disease (以下ADと略称)は、人生の晩年において人間らしく生きるための様々な生活機能を奪い取り、ADの発症は実社会との決別を意味し、介護にあたる家族は自らの生活の質を犠牲にしながらかその精神的・肉体的負担は計り知れない。外見は同じでありながら脳だけが変貌し人格が崩壊していく姿は恐しく、惨めとしか言いようのないものである。何としてでもADを制圧しなければならぬ思いは世界共通であろう。この10年の間にADなど認知症の病態の理解には著しい進歩が見られ、脳内蓄積物質を基本的な出発点として疾患の本質が論じられるようになったことは特記すべきことである。その最も大きな流れが、今日のADのアミロイド仮説である。アミロイド仮説では、上流側にアミロイド、下流側にtauと神経変性が位置するものである。つまり、アミロイドの蓄積はtau蛋白の異常リン酸化や神経細胞死などすべてのイベントを引き起こすものであり、アミロイドの蓄積がコントロールされれば、

ADそのものも制圧可能と考える。そのためには、アミロイドが蓄積した状態を簡便にしかも感度よく検出するバイオマーカーを開発する方法論がどうしても必要である。それが、アミロイドイメージングと呼ばれる新しい技術である。

## 2—バイオマーカーが必要とされる理由

### 1) 診断のサポート

典型的で中等度以上に進行したAD患者の診断は、介護者からの詳細な病歴の聴取、心理学的検査、MRIなどの画像検査をもとに十分可能であろう。実際、市中のかかりつけ医での診断はこのようになされることが多いと思われる。一方、レビー小体病や前頭側頭型認知症などADに似て非なるものとの鑑別はしばしば問題となる。病理学上も前者は $\alpha$ -シヌクレインの沈着を主とし、後者はtauやユビキチンが蓄積する疾患で、アミロイド $\beta$  ( $A\beta$ )の沈着を本質的な病理像とするADとは区別されるべきである。

### 2) 早期診断と近未来の発症前診断

今日世界的に広く用いられている認知症あるいはADの診断基準では、認知症とは「記憶障害を含め少なくとも2つ以上の大脳高次機能の後天的な障害により社会・職業生活上の重大な支障をきたした、或いは日常生活上の自立性が失われた状態」とされている。この場合大脳高次機能障害としての記憶障害、失語、失行、失認、あるいは実行機能障害などによって生活破壊が生じていることが診断の拠り所となっている。問題なのは、これらの大脳の高次機能の低下が実際には時系列を以てゆっくりと進行し出揃うまでには数年