

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15464

研究課題名(和文) 脳梗塞初期の分子病態に基づく新たなPET診断技術法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel diagnostic imaging marker in acute cerebral ischemia

研究代表者

水間 広 (Mizuma, Hiroshi)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：00382200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脳梗塞初期の新規イメージング診断法を開発するために、動物基礎研究を行った。脳虚血-再灌流障害ラットを用い、フルオロ酢酸([<sup>18</sup>F]FACE)の集積を陽電子断層撮影(PET)にて調べた。脳虚血時に障害領域の[<sup>18</sup>F]FACEの集積は健常側よりも2.5倍多く集積した。対照にFACEと同様の挙動を示すと考えられている[<sup>11</sup>C]acetateでは障害領域への集積は健常側よりも低下した。また、代謝物解析では[<sup>18</sup>F]FACEからフルオロクエン酸への代謝は確認されなかった。これらの事から酢酸代謝とは異なる[<sup>18</sup>F]FACEの高集積が認められ、細胞質中におけるFACEの未知の機能が推測される。

研究成果の概要(英文)：Fluoroacetate (FACE) has been known to be incorporated into astrocyte and acts as a metabolic toxin by blocking the tricarboxylic acid cycle. The aim of this study was to determine whether <sup>18</sup>F-labelled FACE ([<sup>18</sup>F]FACE) is useful for a novel diagnostic imaging marker in acute cerebral ischemia. Cerebral ischemia model rats were made by occluding the right middle cerebral artery (MCA) for 60 min followed by subsequent reperfusion. [<sup>18</sup>F]FACE-PET scan was conducted under isoflurane anesthesia. [<sup>18</sup>F]FACE was highly accumulated in the ischemic region during MCA occlusion with low cerebral flow, in which no [<sup>18</sup>F]FACE metabolite was observed. Histological analyses revealed that [<sup>18</sup>F]FACE accumulation was not associated with appearance of reactive astrocyte and breakdown of blood brain barrier. These finding indicate that ischemia causes changes in astrocyte energy metabolism and also alter FACE transportation, in other words [<sup>18</sup>F]FACE can be a promising PET probe in acute cerebral ischemia.

研究分野：分子イメージング

キーワード：脳梗塞 画像診断 PET ラット

## 1. 研究開始当初の背景

脳卒中は日本における死因の第4位に位置し死亡者数は漸減しているが、回復したとしても依然予後は悪くQOLも低い。脳卒中の病態は梗塞に伴う血管支配領域への必須栄養素(グルコースや酸素など)の供給不足、または出血に伴う血管からの細胞浸潤や物質滲出による脳細胞群、特に神経細胞への著しい傷害により細胞死を誘発し、重篤な脳機能障害を引き起こす(Bramlett & Dietrich, 2004)。治療は、2005年に本邦で保険適用されたリコンビナント組織プラスミノゲンアクチベータ(rt-PA)静注による血栓溶解療法が一定の改善を示している。しかし、処置が発症後4.5時間以内に制限され、それ以降では脳出血のリスクを高め、症状を増悪させる(Wechsler, 2011)。したがって、rt-PA療法の適用症例は全体の5%以下と少なく、ミノサイクリン、シンバスタチンなどの併用療法も試験中ではあるが、従来の治療法に置き換わる画期的な治療戦略を構築することが急務である。

適切な治療を施すには正確な診断が必須であり、急性期脳梗塞の臨床画像診断にはCT検査が簡便で普及しているが定量性に乏しい。MRIによる拡散強調画像(DWI)が細胞性および血管性浮腫を明瞭に検出し、さらに超急性期ではDWIに加え灌流強調画像(PWI)とのミスマッチモデル法から、梗塞の中心領域と救済可能なペナンプラ領域を予測することを可能としている。また、PET診断でも、ポジトロン核種である酸素 $^{15}\text{O}$ を標識した $^{15}\text{O}_2$ 、 $\text{C}^{15}\text{O}_2$ および $\text{C}^{15}\text{O}$ によるPET検査で梗塞領域を同定することが可能である。しかし、これら従来の方法では最も治療が有効な発症直後からは観察されない。

我々は以前より脳梗塞モデル動物として中大脳動脈一時虚血/再灌流ラットを用いて、発症後のグリア細胞の役割に関して研究を行ってきた。また、我々は脳梗塞初期である虚血直後から神経細胞死以前の段階で細胞活動異常に応じた変化を $^{18}\text{F}$ 標識したフルオロ酢酸( $^{18}\text{F}$ FACE)を用いた陽電子断層撮影(PET)にて捉えることに成功した。驚くべきことに、虚血領域では通常、脳血流の低下に伴い投与されたPETプローブは反対側の健常領域に比べて取込み低下が予想されるが、 $^{18}\text{F}$ FACEでは取込みが増加する現象が認められた。虚血後はグルコースおよび酸素の供給が低下し、細胞内でのATP産生量低下からATP依存性のイオンポンプやトランスポーターの活動停滞に伴い、 $\text{H}^+$ 、 $\text{Na}^+$ および $\text{Ca}^{2+}$ イオンなどの細胞外能動輸送が止まることで、細胞

内pHの酸性化、細胞性浮腫、アポトーシスカスケードの誘導などの細胞死への一連の現象が引き起こされる時期であり、 $^{18}\text{F}$ FACEが発症早期の新たな分子病態に基づく生体イメージングマーカーとして有用であることが期待される。

## 2. 研究の目的

脳梗塞の発症後、特に発症初期段階でのエネルギー破綻に伴う脳内環境変化に着目し、代償的代謝制御に関連する新たな分子病態メカニズムを同定することで、未だ確立されていない脳梗塞初期における生体分子イメージング技術による新たな診断技術法の開発を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では発症初期から神経細胞死以前の脳内環境変化に着目し、中大脳動脈一時虚血/再灌流ラットを用いて、以下の研究を進めた。

最初に脳梗塞発症前から虚血、再灌流後における障害領域への $^{18}\text{F}$ FACEの経時的な取込み変化を調べるために、1.5%イソフルレンによる吸入麻酔下にて、 $^{18}\text{F}$ FACEを150 MBq/kgを尾静脈投与し、60分間のPET撮影を行った。また、 $^{18}\text{F}$ FACE投与ラットの脳組織を採取し、2 mm厚の冠状切片を作製し、脳組織における $^{18}\text{F}$ FACEの詳細な分布を調べた。集積領域における $^{18}\text{F}$ FACEの代謝物解析を薄層クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーにて行った。

FACEは酢酸と同様にモノカルボン酸トランスポーター(MCT)を介し細胞内に取り込まれ、TCA回路の経路に至ると考えられていることから、脳梗塞モデルラットに対し、酢酸( $^{11}\text{C}$ acetate)によるPET撮影を $^{18}\text{F}$ FACEと同じ時系列にて観察した。また、MCTの阻害剤を $^{18}\text{F}$ FACE投与前に処置し、障害領域における $^{18}\text{F}$ FACEの集積がMCTを介して取り込まれているか否かについても検討した。

$^{18}\text{F}$ FACEの集積領域における脳細胞の形態的变化を観察するために、PETと同じ時系列にて脳組織を摘出および切片を作製し、神経細胞(NeuN)、ミクログリア((Iba-1, CD11b)、アストログリア細胞(S100beta, GFAP)にそれぞれ特異的な抗体を用いて免疫染色を行い、 $^{18}\text{F}$ FACE高集積領域との関連性について組織学的観察を行った。

## 4. 研究成果

脳虚血から再灌流2、5、24時間、4日および7日後における障害領域の

[<sup>18</sup>F]FACE の集積の経時変化を調べた結果、虚血時から再灌流 2 時間後での集積が最も高く、障害後は時間経過とともに集積が低下していくことが明らかとなった。また、虚血時における [<sup>11</sup>C]acetate の障害領域の集積は低下し、[<sup>18</sup>F]FACE とは異なった結果を示した。

障害領域の代謝物解析を行った結果、[<sup>11</sup>C]acetate は代謝物が認められたことから、細胞内での酢酸代謝が認められたが、一方、[<sup>18</sup>F]FACE では代謝物が検出されず、予想されていたフルオロクエン酸への代謝が認められなかった。MCT 阻害剤である alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid および Quercetin 前処置による [<sup>18</sup>F]FACE-PET を行った結果、障害および反対側健常領域における [<sup>18</sup>F]FACE の集積に変化が認められなかったことから、FACE は酢酸とは異なる細胞内移行が考えられる。また、虚血時における PET および代謝物解析のデータから [<sup>18</sup>F]FACE の動態解析を行った結果、血液から脳組織内への流入速度 ( $K_1$ ) は障害側と健常側との間に有意な差は認められなかったが、組織から血液への流出速度 ( $k_2$ ) では障害側が健常側に比べて有意な低下を示し、虚血時では FACE の細胞外への排出機構に何らかの変化が生じている可能性が推測される。脳組織切片による障害領域の神経細胞、ミクログリアおよびアストログリアの細胞数ならびに形態変化の観察では [<sup>18</sup>F]FACE の集積分布が、再灌流後 1 日後から認められる神経細胞死の領域と一致した。しかしながら、ミクログリアの活性化、アストログリアの再活性化と [<sup>18</sup>F]FACE の集積分布とは一致しなかった。

これらの事から障害側での [<sup>18</sup>F]FACE の集積は酢酸代謝とは明らかに異なるものであり、細胞質中における FACE の未知の機能が推測される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yamauchi H, Kagawa S, Kishibe Y, Takahashi M, Nishii R, Mizuma H, Takahashi K, Onoe H, Higashi T. Increase in 2-[<sup>18</sup>F]-fluoroacetate uptake in patients with chronic hemodynamic cerebral ischemia. Stroke, 46(9):2669-72, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Mizuma H, Kagawa S, Ohno M, Matsumoto Y, Kakumoto K,

Higashi T, Nishii R, Onoe H: 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-acetate as an imaging biomarker for cerebral ischemia. SNMMI2016, Annual Meeting of Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, San Diego, CA, USA, Jun. 11-15th, 2016.

2. Mizuma H, Kagawa S, Ohno M, Kakumoto K, Matsumoto Y, Higashi T, Nishii R & Onoe H: Accumulation of [<sup>18</sup>F]FACE in cerebral ischemia. World Molecular Imaging Congress 2015, Honolulu, HI, USA. Sep. 2nd-5th, 2015.

3. 水間広, 加川信也, 大野正裕, 角元恭子, 松本佳乃, 東達也, 西井龍一, 尾上浩隆: フルオロ酢酸のラット脳における [<sup>18</sup>F]FDG 取込みに対する影響. 第 10 回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 東京, 平成 27 年 5 月 20, 21 日.

4. 西井龍一, 水間広, 加川信也, 大野正裕, 合瀬恭幸, 林拓也, 高橋和弘, 尾上浩隆: 早期脳虚血におけるフルオロ酢酸 PET. 第 74 回日本医学放射線学会総会, 横浜, 平成 27 年 4 月 16-19 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
特になし。

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

水間 広 (MIZUMA HIROSHI)  
国立研究開発法人理化学研究所・ライ  
フサイエンス技術基盤研究センター・  
研究員  
研究者番号：00382200