

令和元年6月10日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10817

研究課題名(和文) 脊髄障害性疼痛の分子・細胞病態解明とニューロイメージング評価法の開発

研究課題名(英文) The assessment of molecular/cellular pathophysiology and the development of neuroimaging for spinal cord-related pain

研究代表者

中嶋 秀明 (Nakajima, Hideaki)

福井大学・学術研究院医学系部門・講師

研究者番号：10397276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：PBR(末梢性ベンゾジアゼピン受容体)の動態と起原を検討し、PETによるニューロイメージングの可能性を検討した。

急性脊髄損傷モデルにおける免疫染色では、PBRはCD11b、Iba-1とはmergeしたが、GFAPやNeurN、CC1、GFP陽性細胞とのmergeはほとんどみられなかった。PBRは主に脊髄由来の活性化ミクログリアに発現することが示唆された。また、[11C]-PK11195では損傷後4日後に優位な集積を認めた。PBRは活性化ミクログリアに特異的に発現する傾向があり、[11C]-PK11195を用いたPETにて活性化ミクログリアの動態を可視化できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経損傷による神経障害性疼痛については、その病因メカニズムが研究されている一方で、脊髄実質の損傷による脊髄障害性疼痛発現の病態については未だ不明な点が多い。本研究では、GFPマウスの骨髄細胞移植のキメラマウスとを用いることで、脊髄由来あるいは骨髄由来のmicroglia/macrophgeを区別してそれぞれの役割を明らかにする。また11C-(R)PK11195-PETは活性化型ミクログリアの可視化と報告されており、脳-脊髄の活性化ミクログリアの動態を捉えることができれば、この病態解明や治療効果判定など臨床的な面からも多大の貢献を成すものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed experiments on animal model and clinical study to aim to make visible the microglia activation by neuroimaging. PK11195 is antagonist of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) that migrate to cell membrane depending on the microglia activation in response to spinal cord dysfunction.

In the animal model, PBR positive cells were colocalized with CD11b and iba-1. Most of PBR-positive cells were not merged with GFP-positive cells. In autoradiography, accumulation of PK11195 was identified after injury. In the clinical study, no uptake was seen in the healthy volunteer and the uptake was seen only in patients within one year after the neuropathic pain onset. Our results suggest that PBR is mainly located in activated microglia, and [11C]-PK11195 PET/MRI imaging is available to investigate whether microglial activation is evident in for the patients with neuropathic pain.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：脊髄障害性疼痛 神経障害性疼痛 ニューロイメージング PK1195 PET マイクログリア マクロファージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄障害性疼痛とは、神経障害性疼痛のうちの中枢性疼痛に分類され、脊髄損傷後および圧迫性脊髄症（頸髄症、後縦靭帯骨化症）術前術後患者などに生じる慢性疼痛、難治性疼痛である。本症の国内での正確な実数調査およびその病態解明のため、厚生労働研究「脊髄障害性疼痛症候群の実態の把握と病態の解明に関する研究」の一環として行われた「脊髄に由来する神経障害性疼痛の実態の調査」では、通常痛みを起ささない触覚刺激が痛みを引き起こすアロデニア、障害脊髄高位部（at level）、それ以下（below level）の締め付けられるような自発痛、様々な上下肢の痛みが主な症状であり、約 26%に厳しい痛みにより日常生活が障害されていることがわかった。特に体幹部から両下肢に至る（below level）の自発痛、異常感覚の頻度が高く、その 50-70%が複数のオピオイドを含めた薬物療が無効であることが報告された。従ってこの本症の病態解明、その治療法の確立は急務であると考えられる。また、主観的評価が主である疼痛を客観的に評価できる方法を確立することは、患者の病態把握、治療効果判定にも重要と考える。

脊髄障害由来の疼痛（灰白質あるいは白質障害）発現の病態については未だ不明な点が多いが、脊髄後角グリア細胞の活性化や生化学的な変化が注目されており、免疫担当細胞であるミクログリアが活性化型ミクログリアとなることが神経障害性疼痛の一因であることが明らかとなっている。我々のグループでは、障害高位の脊髄後角ニューロンが、SP、CGRP、PKC、CREBなどの疼痛関連物質を発現し、ミクログリア/マクロファージ（M/M）の活性化が ERK1/2、p38-MARK 発現を介して、中枢性感作発症に関与していることを明らかにした。さらに、近年、マクロファージ（単核球由来）の極性化（polarization）（M1・M2 type）が神経炎症悪化のトリガーとして関与し、神経変性疾患などの慢性炎症性変化に重要な役割を果たすとの報告が散見されるようになった。我々はこれまでにラット・マウス胸髄損傷モデルの損傷部位（at level）において、活性化 M/M が極性変化し、M1 type が神経毒性に、M2 type が神経保護に働くことを報告している。即ち、脊髄障害性疼痛の更なる病態解明には、脳脊髄全体での活性化 M/M の起源（resident microglia; 脊髄由来、bone marrow derived macrophage; 骨髄、血液由来）、および活性化 M/M のフェノタイプ（極性）を区別した上での検討が必要である。

さらに臨床への応用を考慮した場合、この活性化 M/M の可視化が可能となれば、脊髄障害性疼痛や慢性疼痛の生体イメージングの開発につながると考えられる。活性化ミクログリアに発現する末梢性ベンゾジアゼピン受容体（PBR）の特異的リガンドである PK11195 が注目され、³H-(R)PK11195 によるオートラジオグラフィ、続いて ¹¹C-(R)PK11195 による PET 検査が、一部の神経変性疾患の診断に期待されている。脊髄障害後の ¹¹C-(R)PK11195 - PET による活性化ミクログリアの動態解析は脊髄障害性疼痛の臨床病態、評価に大変有用となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、活性化型ミクログリアおよびマクロファージのそれぞれに対して、活性化型 M/M の由来・起源（脊髄あるいは骨髄由来）を同定したうえで、動物モデルを用いた PET による活性化型ミクログリアの可視化の可能性を探り、さらには臨床に向けて、脊髄損傷や圧迫性頸髄症など、脊髄由来の神経障害性疼痛を有する患者を対象として、PET/MRI を用いた検討を行い、ニューロイメージングの可能性について検討することを目的とした。以下のテーマについて検討を行った。

- (1) GFP マウスを利用した活性化 M/M の動態による由来・起源
- (2) ラット頸髄損傷・疼痛モデルを用いた PET（脳脊髄ニューロイメージング）による活性化ミクログリアの可視化・定量化
- (3) 急性脊髄損傷患者、圧迫性脊髄症急性増悪患者の ¹¹C-PK11195-PET/MRI による評価

3. 研究の方法

(1) GFP マウス骨髄細胞移植後のキメラマウスを用いた動態解析（由来・起源の同定）と組織学的検討

GFP 陽性骨髄細胞移植キメラマウスの作成

C57BL6/N マウスへ 10Gy の放射線照射後、ほぼ同週齢の CAG-EGFP transgenic マウス（日本 SLC 社）の大腿骨および脛骨より採取した骨髄細胞（ 5.0×10^6 個/ml）を尾静脈より移植し、4 週間後、脊髄圧挫損傷モデルを作成する。

免疫組織化学的検討

免疫組織化学的検討は活性化 M/M のマーカーは OX-42、Iba-1、CD11b を、骨髄由来マクロファージ（GFP 陽性）で同定する。疼痛関連因子の免疫組織化学的解析、フローサイトメトリーにて定性、定量化を行う。

(2) ラット頸髄損傷・疼痛モデルを用いた ¹¹C-PK11195-PET による活性化ミクログリアの可視

化・定量化の検討

成熟雄ラット(SD) (500-600g) の第4頸椎高位に IH impactor (200Kdyn) 圧迫を加えて圧挫損傷モデルを作成する。オートラジオグラフィ法及び FACS により、末梢性ベンゾジアゼピン受容体(PBR)が活性化ミクログリアの特異的マーカーであることを確認する。また、日本鋼管(NKK)製 12MeV 超小型サイクロトロンと自動合成装置を用いて ^{11}C -PK11195 を作成し、その可視化、定量化 (AJS 社製 Dr View/LINUX) について評価する。損傷後 3 日、2 週、4 週で組織学的・行動学的検討を行う。

(3) 急性脊髄損傷患者、圧迫性頸髄症急性増悪患者に対する ^{11}C -PK11195-PET/MRI による検討

当科での脊髄損傷患者 (ASIA 分類 type A, B, C) のうち脊髄損傷後疼痛を有する患者や圧迫性頸髄症急性増悪患者を対象として、 ^{11}C -PK11195-PET/MRI を施行し、その臨床症状 (ASIA スコア、SF36、神経障害性疼痛重症度評価ツール) などと比較検討する。

4. 研究成果

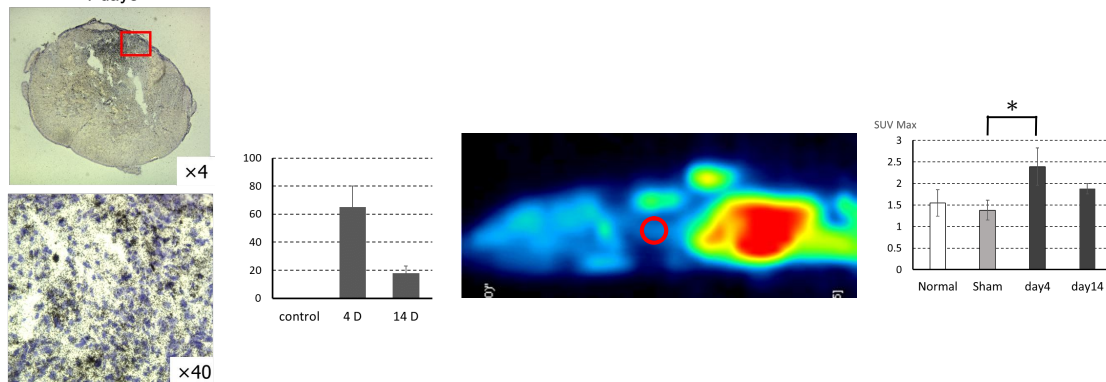
(1) GFPマウス骨髄細胞移植後のキメラマウスを用いた動態解析 (由来・起源の同定) と組織学的検討

急性脊髄損傷モデルにおける免疫組織学的検討では、PBR は CD11b, Iba-1 とは一部 merge したが、GFP 陽性細胞との二重陽性細胞はほとんどみられなかった。これらの結果から、PBR は主に脊髄内ミクログリア由来の活性化ミクログリアに発現することが示唆された。

(2) ラット頸髄損傷・疼痛モデルを用いた ^{11}C -PK11195-PET による活性化ミクログリアの可視化・定量化の検討

^3H -PK11195 PET では損傷部を中心に uptake がみられ、免疫染色と同等の経時的変化がみられた。オートラジオグラフィでの ^3H -PK11195 発現は、脊髄損傷後 4 日から 14 日で発現上昇がみられ、28 日目での発現は低かった。

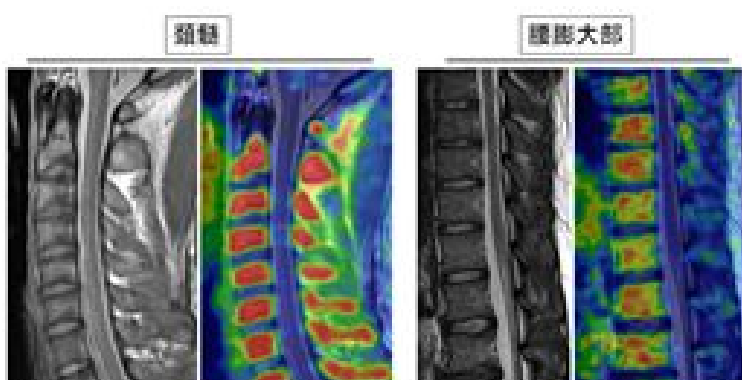
図 1. オートラジオグラフィ、ラット頸髄損傷モデル ^3H -PK11195 PET (脊髄損傷後 4 日目)



(3) 急性脊髄損傷患者、圧迫性頸髄症急性増悪患者に対する ^{11}C -PK11195-PET/MRI による検討

PK11195 は正常中枢神経組織には取り込まれないとされているが、健常者では取り込みがないことを確認した。

図 2. 健常者での ^{11}C -PK11195 PET/MRI



^{11}C -PK11195 PET/MRI を用いた臨床応用では、脊髄損傷後 3 ヶ月以内での症例で uptake がみられた。しかし、いずれも NPSI > 10 の症例を選択したが、急性期であっても損傷程度が強いと思われた症例や、疼痛の程度が強い症例であっても慢性期には uptake は確認されなかった。

表 1. [¹¹C]-PK11195 PET/MRI 結果

	疾患	術後期間	NPSI	疼痛部位	SUV
					頸髄部
症例1	OPLL	6ヵ月	16	at level, below level	1.89
症例2	SCI	9年	30.5	at level, below level	uptake (－)
症例3	CSM	3年	10.5	at level	uptake (－)
症例4	CSM	1年	21	at level	1.19
症例5	OPLL	4年	14	at level, below level	uptake (－)
症例6	OPLL	4週	16	at level	1.62

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Takahashi A, Nakajima H, Uchida K, Takeura N, Honjoh K, Watanabe S, Kitade M, Kokubo Y, Johnson WEB, Matsumine A. Comparison of Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Murine Adipose Tissue and Bone Marrow in the Treatment of Spinal Cord Injury. Cell Transplant. 2018 Jul;27(7):1126-1139 査読有 doi: 10.1177/0963689718780309
2. Nakajima H, Uchida K, Takayasu M, Ushida T. A Nationwide Survey of Spinal Cord-Related Pain Syndrome in Japan: Clinical Characteristics and Treatment. Spine Surg Relat Res. in press 査読有 doi: dx.doi.org/10.22603/ssrr.2018-0096
3. Nakajima H, Uchida K, Taguchi T, Yamashita T, Tominaga T, Tanaka M, Yamagata M, Kaito T, Ushida T. Multicenter cross-sectional study of the clinical features and types of treatment of spinal cord-related pain syndrome. J Orthop Sci. in press 査読有 doi: 10.1016/j.jos.2019.01.012

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Nakajima H, Kitade M, Watanabe S, Honjoh K, Yamamoto Y, Matsumine A. Clinical assessment using PK11195 PET/MRI imaging for neuropathic pain in the patients with cervical spinal cord injury and compressive myelopathy. Cervical Spine Research Society Annual Meeting 2018
2. 中嶋秀明, 北出誠, 渡邊修司, 本定和也, 山本悠介, 松肇昭彦
PK11195 PET imaging を用いた脊髄内活性化ミクログリア可視化の試み
第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会(2018)
3. 北出誠, 中嶋秀明, 渡邊修司, 本定和也, 高橋藍, 平井貴之, 小久保安朗
ラット脊髄損傷におけるmicrogliaの[¹¹C]-PK11195によるPETイメージング
第46回日本脊椎脊髄病学会学術集会(2017)
4. 北出誠, 中嶋秀明, 渡邊修司, 本定和也, 平井貴之, 小久保安朗, 松肇昭彦
ラット脊髄損傷におけるmicrogliaの[¹¹C]-PK11195によるPETイメージング
第32回日本整形外科科学会基礎学術集会(2017)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。