

平成 22 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390319
 研究課題名 (和文) 末梢性 BZ 受容体とグリア及び心筋代謝との相関に関する研究：イメージングへの展開
 研究課題名 (英文) Study on functional roles of PBR (TSP0) in glia and myocardium

研究代表者
 井上 修 (INOUE OSAMU)
 大阪大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：50159969

研究成果の概要 (和文)：キノリン酸注入ラット及びグリア代謝抑制ラット脳における糖代謝亢進に対する PK-11195 及び抱水クロラル麻酔の影響を比較した結果、PK-11195 はグリア細胞の嫌氣的解糖系の亢進を抑制すること、及びこの抑制作用が神経保護作用と大きく関連していることが強く示唆された。Li-pilocarpine モデルラットにおいて、PBR リガンドは抗痙攣作用をほとんど認めなかったが、脂肪族ケトン体は抗痙攣作用、神経保護作用を有することを見出した。結合-解離度が速いリガンドとして、¹⁸F-FEDAC を用い、心筋や腎、肺における PBR の結合パラメーターを算出した。

研究成果の概要 (英文)：PK-11195 suppressed the enhancement of glucose metabolism in rat brain induced by infusion of quinolinic acid (QUIN). The enhancement of glucose use induced by QUIN mainly occurred in glial cells, and neuroprotective effect of PK-11195 might be related to the suppression of anaerobic glycolysis in glial cells. Methyl ethyl ketone and diethyl ketone showed significant anticonvulsive and neuroprotective effects in lithium-pilocarpine SE rats, while Ro5-4864 showed only a very weak effect. The binding parameters of PBR in heart, lung and kidney of rats were estimated by employing ¹⁸F-FEDAC, which had rapid kinetic properties in these peripheral tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：末梢性 BZ 受容体、グリア細胞、心筋、PK-11195、Ro5-4864

1. 研究開始当初の背景

(1) 末梢性 BZ 受容体 (PBR) はミトコンドリア外膜に存在し、細胞の分化、増殖、アポトーシス、ステロイド産生等に重要な役割を担っている。PBR は肺、心筋、腎、副腎等

の他、中枢神経系においてはグリア細胞に存在することが知られている。PBR の選択的リガンドである PK-11195 は興奮性アミノ酸 (キノリン酸) 注入により誘発される神経細胞死に対して保護作用を有すること、またそ

の神経保護作用はマイクログリアの活性化を抑制することによるものであることが報告されている。一方、我々はキノリン酸注入後の早期の段階においてラット脳の糖代謝が著明に亢進し、PK-11195はこの糖代謝亢進を抑制することから、興奮性アミノ酸による早期の段階における脳のエネルギー代謝の変容が神経細胞死と大きな関連がある事を示唆した。

(2) リチウム-ピロカルピン (Li-P) てんかんモデルは、ヒト側頭葉てんかんのモデルとして汎用されている。本モデルにおいては急性期の痙攣発作時に著明な糖代謝亢進を引き起こし、また慢性期では海馬 CA 領域への著明な神経細胞死が認められる。PBR リガンドが本モデルに対して神経保護作用を有するか否かについては明らかになっていない。

(3) グリア細胞の神経保護作用においてグリア-ニューロン間のグルタミン-グルタミン酸サイクルが主要な役割を担っていることが強く示唆されたが、この代謝関連を測定する方法としては¹³C 標識基質を用いる MRS 法しか開発されていなく、PET 用分子プローブは実用化されていなかった。我々はグリア細胞の選択的基質として¹⁴C-ベンジルアセテートを開発し、その有用性を実証した。

(4) PBR 測定用の PET 分子プローブは¹¹C-PK-11195 が古くから開発されていたが、特に心筋や腎等の末梢組織における PBR の結合活性の定量評価法については方法論が開発されていなかった。PBR リガンドは心筋保護作用を有することが報告されているが、受容体占有率と薬効との関係も明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1)① 興奮性アミノ酸注入によるラット脳の循環・代謝の変容を明らかにする。

② キノリン酸注入直後に認められる糖代謝亢進がグリア細胞または神経細胞で生じているのかを明らかにする。

(2) PK-11195 が Li-P てんかんモデルラットにおいて神経保護作用を有するか否かを明らかにする。

(3) ¹⁴C または ¹¹C で標識したグリア細胞選択的な PET プローブを投与した後のラット脳の細胞外液における標識グルタミン、標識グルタミン酸を高感度で測定する方法論を構築し、神経細胞死とグルタミン-グルタミン酸サイクルとの関連を明らかにする。

(4) 生体組織における結合-解離速度が大きい PET 用プローブを開発し、平衡法の適用により心筋、腎、肺における PBR のインビボ結合パラメーター、並びに PBR リガンドによる受容体占有率を測定する。

3. 研究の方法

(1)① 興奮性アミノ酸注入によるラット脳の循環・代謝の変容について、ラット線条体に予めカニューレを装着し、キノリン酸、イボテン酸、カイニン酸等の興奮性アミノ酸を微量注入後、1~2 時間後に ¹⁴C-DG、¹⁴C-酢酸、¹⁴C-IMP を静注し、脳を摘出して定量的オートラジオグラフィによるそれぞれ糖代謝、グリア代謝及び局所脳血流量の指標とした。PK-11195 を同時に注入したラットについても同様の検討を行った。またイボテン酸注入ラットについては、¹⁵O-H₂O、¹⁵O₂、¹⁸FDG を用いた PET イメージングを実施しその画像を解析した。

② キノリン酸注入ラット及びグリア代謝抑制ラット脳の糖代謝に及ぼす PK-11195 と抱水クロラル麻酔の影響についてオートラジオグラフィによる比較検討を行った。

(2) Li-P てんかんモデルにおける Ro5-4864 の効果を行動科学的指標 (Racine score) 及び病理所見により検討した。対照群としてアセトン、メチルエチルケトン、ジエチルケトンを用いた。

(3) 高感度放射能検出器を用いた PET 分子プローブ用オンラインマイクロダイアリシシステムを構築し、グリア選択的プローブとして ¹³N-アンモニア、¹¹C-ベンジルアセテートをラットに投与し、脳における標識グルタミン、標識グルタミン酸の定量測定を行った。検証系として、グルタミン合成酵素阻害剤、グリア代謝抑制剤 (フルオロクエン酸) 等を前処置し、主に標識グルタミンの変化を計測した。

(4) ¹¹C-DAC をリード化合物として結合-解離動態の速いプローブとして ¹⁸F-FEDAC を標識合成し、投与量を変化させて PET 分子イメージングを行い、平衡法により心筋、腎、肺における PBR の B_{max}、K_D を算出した。また 10 mg/kg の Ro5-4864 の心筋における PBR 占有率を求めた。

4. 研究成果

(1)① 興奮性アミノ酸注入により早期の段階 (注入 1~2 時間後) で糖代謝量の亢進、局所血流量の低下、及び ¹⁴C-酢酸のグリア細胞への取り込み低下を認めた。イボテン酸注入ラットを用いた PET 計測の結果、糖代謝量は亢進するのに対して酸素代謝には変化を認めなかった。以上の結果から、興奮性アミノ酸により誘発される糖代謝亢進は嫌氣的解糖系の亢進によるものであることが推定された。

② キノリン酸注入ラット及びグリア代謝抑制ラット脳における糖代謝亢進とそれに対する PK-11195 及び抱水クロラル麻酔の効果を比較した結果、図-1 に示すようにキ

ノリン酸注入ラット脳で観測される糖代謝亢進は麻酔によって消失しないことから、主としてグリア細胞で生じていることが判明した。グリア代謝抑制ラット脳においてはキノリン酸注入ラット脳とはまったく逆に、麻酔によって完全に糖代謝亢進は消失し、さらに PK-11195 がまったく抑制効果を示さなかったことから、PK-11195 はグリア細胞の嫌氣的解糖系の亢進を抑制すること、及びこの抑制作用が神経保護作用と大きく関連していることが示唆された。

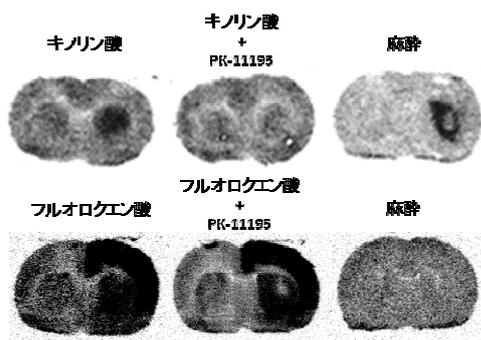


図-1

- (2) Li-P てんかんモデルにおいてはピロカルピン投与 30 分後から Stage 4~5 の痙攣発作が発現し、2 週間後の病理所見では海馬における著明な神経細胞死を認めた。Ro5-4864 (10 mg/kg) を前処置したラットにおいては微弱な抗けいれん作用を認めた。一方、アセトンのみならずメチルエチルケトンやジエチルケトン等の脂肪族ケトン体は用量依存的に痙攣発作を抑制したのみならず、メチルエチルケトン (2 回投与) 群では海馬における神経細胞死を完全に抑制することを見出した。従来から難治性てんかんの治療法として臨床的に用いられているケトン食療法の作用機序の一つとして、脳のエネルギー代謝の変化が想定されてきたが、メチルエチルケトンやジエチルケトンは基質とはなり得ないことから、ケトン食療法の機序解明に新しいアプローチを拓く所見であると考えられる。
- (3) 新しく構築した高感度放射能検出器を用いたオンラインマイクロダイアリシシステムによる、 ^{13}N -アンモニアからの ^{13}N -グルタミン及び ^{11}C -ベンジルアセテートからの ^{11}C -グルタミンの細胞外液中の濃度を定量測定することができた。グルタミン合成阻害剤の前処置により細胞外液中の ^{13}N -グルタミンは著明に減少した。またフルオロクエン酸によりグリアの代謝を抑制すると、同様に ^{11}C -グルタミン濃度の著明な減少を確認できた。現在、本システムの有用性について病態モデルを用いて検討している。
- (4) 図-2 に示す ^{18}F -FEDAC のラット全身イ

メージを取得した結果、心筋や腎、肺において結合-解離速度が速く、平衡法を適用した PBR の結合パラメーターの算出が可能であることが判明した。その結果、正常 SD ラット (♂) においては表-1 に示すようなインビボでの結合パラメーターを得た。さらに虚血心筋に対して保護作用を有することが報告されている Ro5-4864 (10 mg/kg) の PBR 占有率を測定した結果、90%以上の占有率を示した。

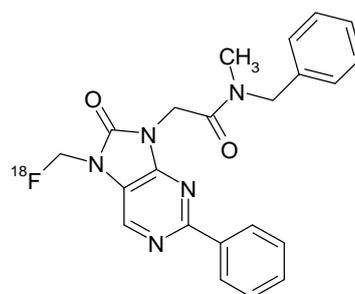


図-2

表-1

Tissue	B_{\max} (pmol/mL)	K_D (nM)
Heart	428	138
Kidney	138	36
Lung	142	105

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

Yanamoto K, Kumata K, Fujinaga M, Nengaki N, Takei M, Wakizaka H, Hosoi R, Momosaki S, Yamasaki T, Yui J, Kawamura K, Hatori A, Inoue O, Zhang MR. In vivo imaging and quantitative analysis of TSPO in rat peripheral tissues using small-animal PET with [^{18}F]FEDAC. Nucl Med Biol. 査読有、2010、in press

Momosaki S, Imamoto N, Hosoi R, Sawada Y, Abe K, Zhang MR, Inoue O. PK11195 might selectively suppress the quinolinic acid-induced enhancement of anaerobic glycolysis in glial cells. Brain Res. 査読有、2010、in press

Inoue O, Sugiyama E, Hasebe N, Tsuchiya N, Hosoi R, Yamauchi M, Abe

K, Gee A. Methyl ethyl ketone blocks status epilepticus induced by lithium-pilocarpine in rats. *Br J Pharmacol*. 査読有、2009、158(3):872-8.

Okada M, Nakao R, Hosoi R, Zhang MR, Fukumura T, Suzuki K, Inoue O. In vivo monitoring of extracellular 13N-glutamine derived from blood-borne 13N-ammonia in rat striatum using microdialysis with radio-LC method. *J Neurosci Methods*. 査読有、2009、184(1):37-41.

Sugiyama E, Matsuki Y, Momosaki S, Hosoi R, Hasebe N, Abe K, Inoue O. Inhibitory effect of methyl ethyl ketone upon the enhancement of cerebral blood flow during status epilepticus induced by lithium-pilocarpine. *Neurosci Lett*. 査読有、2009、462(3):300-2.

Yanamoto K, Yamasaki T, Kumata K, Yui J, Odawara C, Kawamura K, Hatori A, Inoue O, Yamaguchi M, Suzuki K, Zhang MR. Evaluation of N-benzyl-N-[11C]methyl-2-(7-methyl-8-oxo-2-phenyl-7,8-dihydro-9H-purin-9-yl)acetamide ([11C]DAC) as a novel translocator protein (18 kDa) radioligand in kainic acid-lesioned rat. *Synapse*. 査読有、2009、63(11):961-71.

Hirose S, Momosaki S, Sasaki K, Hosoi R, Abe K, Gee A, Inoue O. De-coupling of blood flow and metabolism in the rat brain induced by glutamate. *Ann Nucl Med*. 査読有、2009、23(3):293-300.

Hirose S, Momosaki S, Hosoi R, Abe K, Gee A, Inoue O. Role of NMDA receptor upon [14C]acetate uptake into intact rat brain. *Ann Nucl Med*. 査読有、2009、23(2):143-7.

Nakao R, Okada M, Inoue O, Fukumura T, Suzuki K. Combining high-performance liquid chromatography-positron detection and on-line microdialysis for animal metabolism study of positron emission tomography probes. *J Chromatogr A*. 査読有、2008、1203(2):193-7.

Amitani M, Ohashi A, Hatazawa J, Gee A, Inoue O. Effect of PK11195 on attenuating the enhancement of glucose utilization induced by quinolinic acid infusion in the rat brain. *Synapse*. 査読有、2008、62(4):253-8.

[学会発表] (計 14 件)

三船祐輔、野口翔嗣、桃崎壮太郎、細井理恵、井上修、てんかんモデルラットの脳エネルギー代謝に及ぼす MK-801 の影響、第 130 年会 日本薬学会、2010/3/29、岡山

沢田 義一、宮武 由梨子、桃崎 壮太郎、細井 理恵、井上 修、虚血耐性心筋における代謝と PBR 結合に関する検討、第 9 回 放射性医薬品・画像診断薬研究会、2009/11/14、京都

桃崎壮太郎、山田明史、澤田義一、細井理恵、井上 修、メチルエチルケトンによるケイレン発作抑制作用と糖代謝について、第 49 回 日本核医学会総会、2009/10/2、旭川

岡田真希、中尾隆士、細井理恵、張明榮、入江俊章、福村利光、鈴木和年、井上修、In vivo マイクロダイアリス radio-LC を用いたラット線条体細胞外液中 13N-アンモニアの動態計測、第 49 回 日本核医学会総会、2009/10/2、旭川

桃崎壮太郎、広瀬慎一郎、佐々木和成、細井理恵、井上 修、グルタミン酸注入による神経障害時の脳循環・代謝に関する検討、第 129 年会 日本薬学会、2009/3/27、京都

岡田真希、中尾隆士、細井理恵、入江俊章、福村利光、鈴木和年、井上修、グリア細胞代謝阻害時における 11C-Benzyl Acetate および 13N-NH₃ ラット線条体マイクロダイアリス in vivo 動態計測、第 129 年会 日本薬学会、2009/3/27、京都

杉山恵理子、松木祐依奈、桃崎壮太郎、細井理恵、長谷部伸嘉、阿部浩司、井上修、リチウムピロカルピンてんかんモデルにおけるメチルエチルケトンのケイレン抑制作用と血流画像、第 8 回 放射性医薬品・画像診断薬研究会、2008/12/6、京都

細井理恵、桃崎壮太郎、合瀬恭幸、福田肇、樋掛正明、林拓也、渡部浩司、三宅義徳、飯田秀博、井上修、イボテン酸注入早期のラット脳における糖代謝の亢進と酸素代謝について、第 48 回 日本核医学会総会、2008/10/25、千葉

杉山恵理子、細井理恵、桃崎壮太郎、井上修、メチルエチルケトンによるケイレン発作抑制作用と [14C]酢酸の取り込み、第 48 回 日本核医学会総会、2008/10/25、千葉

細井理恵、望月智広、桃崎壮太郎、井上修、薬物誘発性のけいれん発作時における 14C-酢酸取り込みについて、第 128 年会 日本薬学会、2008/3/28、横浜

産田雄介、沢田義一、広瀬慎一郎、桃崎壮太郎、細井理恵、井上修、興奮性アミノ酸によるラット脳の血流・代謝のDecouplingに関する検討、第128年会
日本薬学会、2008/3/28、横浜

杉山恵理子、細井理恵、桃崎壮太郎、井上修、アセトンによるてんかん発作抑制作用とグリア細胞への14C-酢酸の取り込みに関する検討、第128年会
日本薬学会、2008/3/26、横浜

細井理恵、北野大介、桃崎壮太郎、井上修、Li-pilocarpine てんかんモデルにおける14C-酢酸取込みの亢進について、第47回
日本核医学会総会、2007/11/4、仙台

広瀬慎一郎、細井理恵、桃崎壮太郎、畑澤順、井上修、グリア代謝抑制時におけるラット脳血流の亢進に関する検討、第47回
日本核医学会総会、2007/11/4、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 修 (INOUE OSAMU)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50159969

(2) 研究分担者

細井 理恵 (HOSOI RIE)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30291446
桃崎 壮太郎 (MOMOSAKI SOTARO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30379268
山口 政俊 (YAMAGUCHI MASATOSHI)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号：50117280

(3) 連携研究者

張 明榮 (Zhang Ming-Rong)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター分子認識研究グループ・チームリーダー
研究者番号：80443076