

平成22年 4月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791025

研究課題名 (和文) MPTP サルにおける脳深部電気刺激の分子イメージング研究

研究課題名 (英文) The molecular imaging study for the mechanism of the Deep brain stimulation in MPTP treated monkey

研究代表者

方 欣 (FANG XIN)

浜松医科大学 分子イメージング先端研究センター 特任助教

研究者番号：00469917

研究成果の概要 (和文)：視床下核への脳深部電気刺激術 (STN-DBS) の機序を解明するために、MPTP サルパーキンソン氏病モデルにおける分子イメージング研究を行った。サルは、MPTP 注射を受け、パーキンソン氏病モデルを作成し、刺激電極留置手術後、行動判定テストで STN-DBS の効果を確認した。

これらのサル (3頭) において、 $H_2^{15}O$  を用いて、サル脳血流の変化を測定した。STN-DBS 施行中の、脳血流を PET で測定した結果は、STN-DBS 側の運動野、補助運動野、上頭頂葉、視床、と対側の小脳の血流増加であった。次に、有効な電気刺激 (刺激頻度 145HZ、持続時間 60 $\mu$ s、電圧 2.8v) 又は手運動における、サルのドパミン  $D_2$  受容体の変化を、MNPA を用いて測定した。STN-DBS 対側の淡蒼球、尾状核の一部における MNPA の取り込みが高くなり、前帯状回と刺激側の LIP 野の一部では低くなった。これらの結果によって、STN-DBS はパーキンソン病における視床下核の過興奮を抑制し、引き続いて視床を過抑制の状態から解放し、視床から投射している運動野、補助運動野、及び対側の小脳半球等運動相関神経回路を活性化し、パーキンソン氏病モデル動物の運動能力を高めることが推測される。

更に、パーキンソン氏病の病態生理として、ドパミン神経の減少に伴い、pre-synaptic dopamine transporter (DAT) および  $D_2$  受容体の dynamic な変化は、STN-DBS の効果に影響する可能性がある。そこで、線条体破壊モデルラットと MFB 破壊モデルラットを用いて、DAT と post-synaptic  $D_2$  receptor を反映する放射性トレーサーを使用して、DAT 及び  $D_2$  受容体の変化パターンを研究した。結果として、ドパミンの reuptake inhibitor である D-amphetamine による回転運動と DAT を反映する [ $^{11}C$ ]CFT の取り込みは線条体破壊でも MFB 破壊でもほぼ同様の変化がみられ、いずれのモデルでも強度は違うが pre-synaptic 機能は障害されているものと考えられた。一方、 $D_2$  受容体の agonist である bromocriptine による回転運動と  $D_2$  受容体トレーサーの取り込みは、線条体破壊と MFB 破壊では正反対であり、post-synaptic  $D_2$  受容体機能は線条体破壊では down-regulate され、MFB 破壊では up-regulate されているものと考えられた。パーキンソン氏病においては、初期には黒質のドパミン神経の脱落に伴い、線条体における post-synaptic 機能は up-regulate されていると考えられており、MFB 破壊モデルはこの状態に類似している。一方、線条体の虚血などによって引き起こされるパーキンソン症候群においては線条体の pre-および post-synaptic 機能の両方が障害されており、線条体破壊モデルはこの状態に類似する。このような違いはパーキンソン病モデルラットを用いる研究において十分に考慮される必要がある。

研究成果の概要 (英文)：To clarify the mechanism of the deep brain stimulation (DBS), we performed the PET study in the MPTP treated monkey by the tracer of  $H_2^{15}O$  to measure the regional cerebral blood flow (rCBF). We found the rCBF of medial superior frontal gyrus, supplementary motor cortex, superior parietal lobule and thalamus in the DBS side, the anterior cerebellar cortex in the contralateral side significantly increased, which

gave an evidence that the mechanism of STN-DBS lies in the correcting the overactivation of motor controlling network.

In order to clarify the dynamic variation pattern of dopamine transporter (DAT) and D<sub>2</sub> receptor after the dopamine depletion, which greatly influences the efficiency of DBS, we studied the variation of pre-synaptic DA transporter and post-synaptic D<sub>2</sub>-like receptor in nigrostriatal DA system using binding assay, behavioral test and a small animal PET. Our data showed that there was a same tendency of the striatal DA transporter decrease both in MFB lesion rats and striatal lesion rats 4 weeks after lesion, however, it showed increase (up-regulation) of D<sub>2</sub>-like receptor in the MFB lesion rats, whereas showed decrease (down-regulation) in the striatal lesion rat. This finding strongly indicated the dynamic variation pattern of DAT and D<sub>2</sub> receptor after the dopamine depletion should be taken into account in the molecular imaging study in PD animal models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：機能脳神経外科学、パーキンソン氏病、脳深部電気刺激術、視床下核、PET、ドパミン受容体、脳血流

1. 研究開始当初の背景

近年、重症パーキンソン氏病患者 (PD) にも有効な外科的治療法として、視床下核 (STN) への脳深部電気刺激療法 (STN-DBS) が注目を集めているが、いまだその機序には不明な点が多い。これまでに、STN-DBS の機序解明を目指し、電気生理学的手法およびマイクロダイアリシス法などを用いた研究が散見されるが、これらの研究には限界があり、DBS の機序や応用条件について、一致した見解は得られていない。

本研究は、視床下核への STN-DBS の作用機序理論の実験的証明という意味で先見性をもつ。サルなどの動物実験及び臨床経験より、PD では、視床下核が異常興奮を来しており、同部位を破壊することにより、パーキンソン氏病に伴う症状が改善することが確認されている。また、STN-DBS は、同部位の破壊と同じ効果を持つ。現在、STN-DBS の作用機序の仮説として、高頻度電気刺激が異常興奮をしている視床下核に対して破壊と同様に抑制的に働く、または、他の神経核の興奮を促進して神経回路を活性化させた結果で

あると考えられている。

2. 研究の目的

STN-DBS の作用機序理論の実験的証明のために、脳全体、特に運動コントロール相関する神経回路、STN、淡蒼球外側核 (Gpe)、黒質網様体/淡蒼球内側核 (SN r/Gpi)、線条体 (Str) の各領域における脳血流、DAT、D<sub>2</sub> 受容体、更に、tracer の供給ができれば、GABA およびグルタミン酸 (Glu) 神経伝達の DBS 前後の変化を測定すること。又は、PD の病態生理として、ドパミン神経の減少に伴い、pre-synaptic dopamine transporter (DAT) および D<sub>2</sub> 受容体の dynamic 変化は、DBS の効果を影響する可能性があり、本研究の目的の一つとして、線条体破壊モデルと MFB 破壊モデルにおける、DAT と post-synaptic D<sub>2</sub> receptor を反映する放射性トレーサーを用いることにより、DAT 及び D<sub>2</sub> 受容体の変化パターンを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) PD 動物モデルの作成：全身投与の MPTP

サルモデル、及び線条体破壊と MFB 破壊ラット PD モデルの作成。

(2) 動物の行動判定テストのための訓練、施行、評価

(3) STN-DBS 手術施行前後におけるパーキンソン氏病モデルサルの PET 測定

(4) PD ラットにおける、DAT と D<sub>2</sub> 受容体の dynamic 変化を PET で測定。

#### 4. 研究成果

(1) これらのサル(3頭)における、H<sub>2</sub><sup>15</sup>O を用いて、サル脳血流の変化を測定した。DBS 施行中の、脳血流を PET で測定した結果は、DBS 側の運動野、補助運動野、上頭頂葉、視床、と対側の小脳の血流増加であった。次に、有効な電気刺激(刺激頻度 145HZ、持続時間 60μs、電圧 2.8v)又は手運動の条件下 MNPA を用いて、サルのドパミン D<sub>2</sub> 受容体の変化を測定した。DBS 対側の淡蒼球、尾状核の一部における MNPA の取り込みが高くなり、前帯状回と刺激側の LIP 野の一部では低くなった。これらの結果によって、STN-DBS は PD 状態の過興奮の視床下核を抑制し、引き続いて視床を過抑制の状態から解放し、視床から投射している運動野、補助運動野、及び対側の小脳半球等運動関連部分を活化し、PD 動物の運動能力を高めることが推測された。具体的な成果は

①サルにおける、PET 計測など条件下で、客観的に施行できる行動判定テスト、Food reaching test を開発した。

②<sup>11</sup>C 化合物 PET で、全身投与のサル PD モデルの作成に成功したことを確認した。(図 1)。

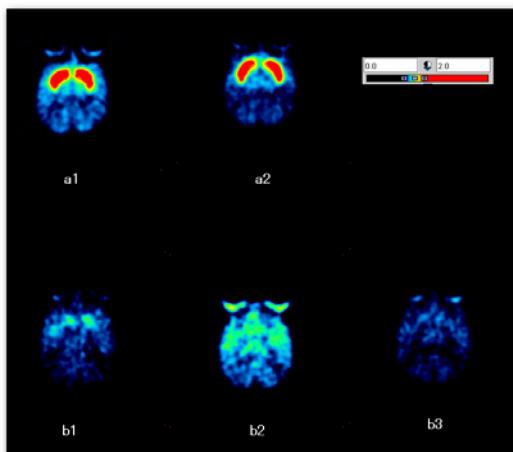


図 1 [<sup>11</sup>C]CFT の画像で、下の 3 頭サルの線条体の DAT が見えないことより、3 頭が PD モデルであることを確認した。上の 2 頭は normal control.

③ Food reaching test で、DBS の効果を確認した (図 2)。

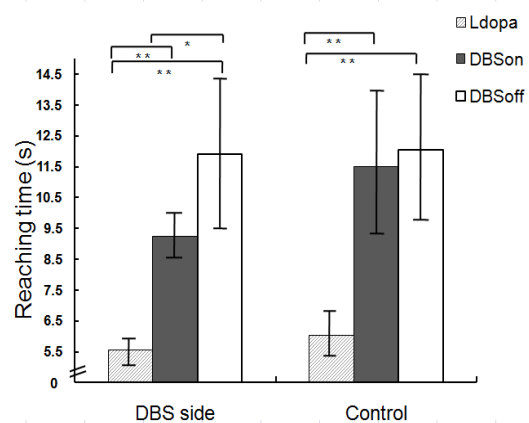


図 2、DBS は、PD サルの food reaching time を短縮し、DBS の効果を確認した

④ H<sub>2</sub><sup>15</sup>O を用いて、サル脳血流の変化を測定した。DBS 施行中の、脳血流を PET で測定した結果は、DBS 側の運動野、補助運動野、上頭頂葉、視床、と対側の小脳の血流増加であった(図 3 a,b,c,d)。

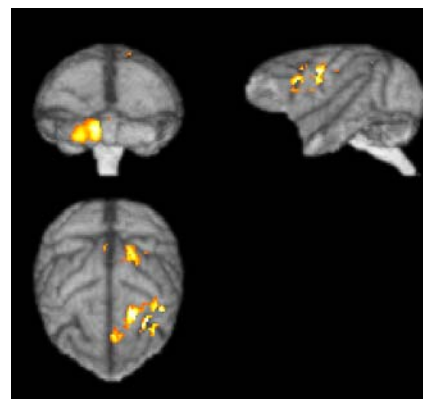


図 3 a

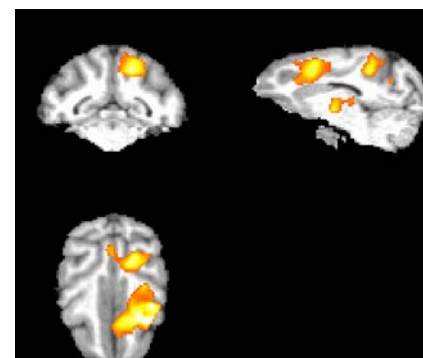


図 3 b

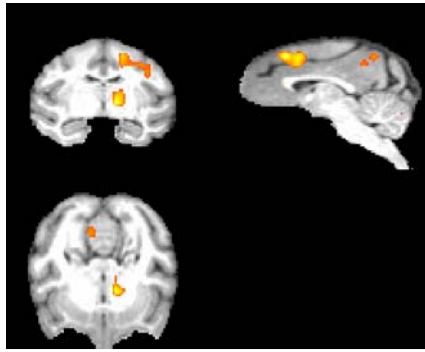


図 3 c

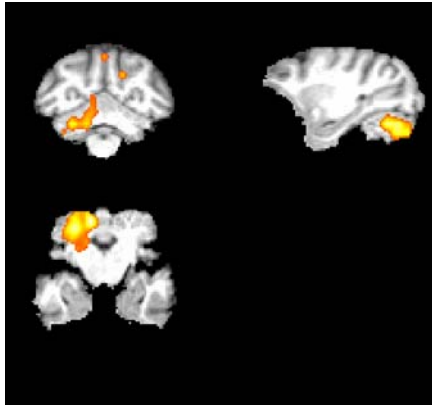
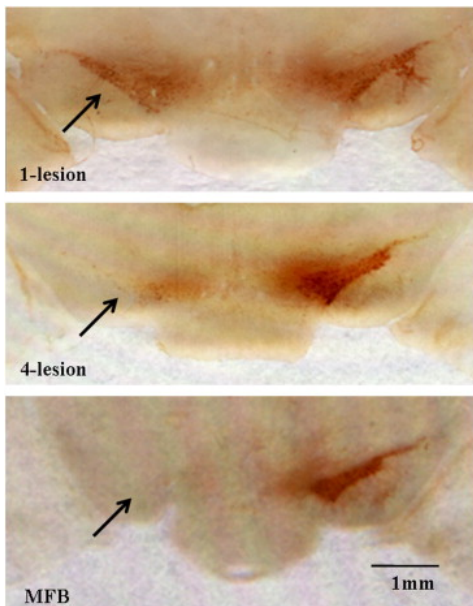


図 3 d

(2) 線条体破壊モデルと MFB 破壊モデルにおける、DAT と post-synaptic D<sub>2</sub> receptor を反映する放射性トレーサーを用いることにより、DAT 及び D<sub>2</sub> 受容体の変化パターンを明らかにする。

① 黒質を含む切片を tyrosine hydroxylase により免疫染色し、この部位におけるドパミン神経の数を数え対照群と比較すると、1-lesion 群では 20%、4-lesion 群では 85% 減少しており、MFB 群では 98% 減少しており、ほぼすべてのドパミン神経が破壊されるモデルと考えられた。(図 4)



② bromocriptine の投与による回転運動は線条体破壊群では D-amphetamine と同様に破壊と同側に向かうが、MFB 群では破壊と反対側に向かう回転運動がみられた。(図 5)

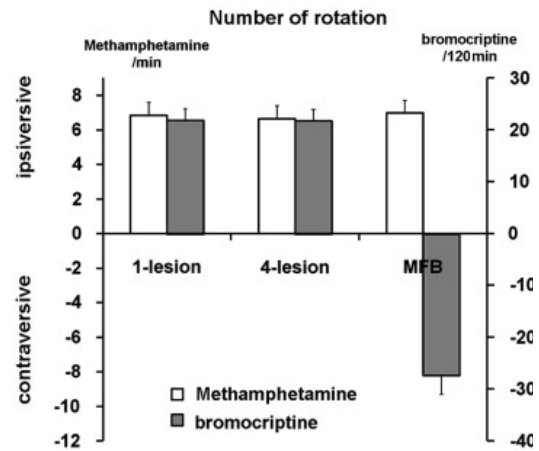


図 5. Bromocriptine と D-amphetamine 誘発回転運動

③ 線条体における [<sup>11</sup>C]CFT の取り込みは 4-lesion 群で  $-23.7 \pm 5.0\%$  ( $p < 0.05$ )、MFB 群で  $-62.9 \pm 7.0\%$  ( $p < 0.01$ ) と、いずれも破壊側で有意な取り込みの減少がみられた。黒質のドパミン神経の減少を反映して、MFB 群での減少はより強く、MFB 群と 4-lesion 群の 2 群間の差も有意であった ( $p < 0.01$ )。一方、 [<sup>11</sup>C]raclopride の取り込みは 4-lesion 群で  $-18.0 \pm 5.0\%$  と有意な減少がみられたが ( $p < 0.05$ )、MFB 群では逆に  $+35.0 \pm 6.0\%$  と有意な増加がみられた ( $p < 0.01$ ) (図 6)。また PET 画像でも上記の変化が視覚的に明らかに示された。(図 7)

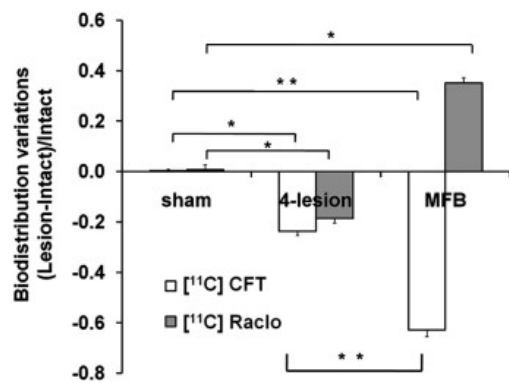


図 6. [<sup>11</sup>C]CFT と [<sup>11</sup>C]raclopride の取り込みを計測する binding assay の結果

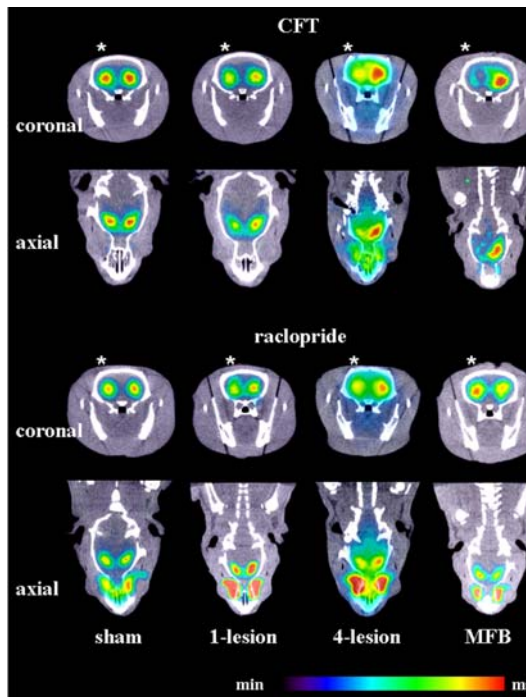


図 7. PET 計測の結果と binding assay 法の結果は一致した

これ等の結果を踏まえて、将来の研究方向は (1) 同じラットモデルにおける、神経毒物を投与後 0、2 週、3 週、後は 1、2、3、4、6、9、12、15、24 ヶ月で同じの実験システムで、DAT 及び D<sub>2</sub> 受容体の変化を計測し、変化のパターン曲線を作って、全局的な変化を解明することを目指す。

(2) 以上の結果を参考し、適切な投与期間のサル PD モデルに DBS 術を施行、将来 GABA、Glutamate を反映する tracer の供給ができれば、同じ実験システムで、STN-DBS の機序を解明することは可能である。又は、いろいろ新開発の豊富なトレーサを用いて、DBS 機序の各方面も探知、理解することができる。

##### 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 2 件)

- ① Wu YX, Fang X: Apigenin, chrysin, and luteolin selectively inhibit chymotrypsin-like and trypsin-like proteasome catalytic activities in tumor cells. *Planta Med.* Feb; 76(2): 128-32, 2010.
- ② Sun W, Sugiyama K, Fang X, Yamaguchi H, Akamine S, Magata Y, Namba H: Different

striatal D<sub>2</sub>-like receptor function in an early stage after unilateral striatal lesion and medial forebrain bundle lesion in rats. *Brain Res.* Mar 4;1317 C: 227-235, 2010.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 孫偉, 杉山憲嗣, 方欣, 山口博司, 赤嶺壮一, 間賀田泰寛, 難波宏樹: パーキンソンモデルラットの片側線条体破壊モデルと片側 MFB 破壊モデルの違い—PET による D<sub>2</sub> 受容体活性の経時的変化測定. 第 49 回日本定位機能神経外科学会, 2010.
- ② 孫偉, 杉山憲嗣, 方欣, 山口博司, 赤嶺壮一, 間賀田泰寛, 難波宏樹: The dynamic variation of D<sub>2</sub> receptor between the unilateral striatal and complete medial forebrain bundle in early and late stage by 6-hydroxydopamine in rats. 日本脳神経外科学会第 68 回学術総会, 2009.
- ③ 方欣, 杉山憲嗣, 赤嶺壮一, 難波宏樹, 宿里充穂, 横山ちひろ, 水間広, 塚田秀夫, 尾上浩隆: H2150 を用いて、MPTP サルにおける脳深部電気刺激下、脳血流の PET 測定第 2 3 回日本大脳基底核研究会, 2008.
- ④ Fang X, Sugiyama K, Akamine S, Namba H, Yokoyama C, Shukuri M, Mizuma H, Magata Y, Umemura K, Hokamura K, Yamaguchi H, Tsukada H, Onoe H: H2150-PET study of motor control network activated by the deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in chronic Parkinsonian monkey model. 2008 World Molecular Imaging Congress, 2008.
- ⑤ Sun W, Fang X, Sugiyama K, Akamine S, Magata Y, Umemura K, Hokamura K, Yamaguchi H, Namba H: The difference of D2 receptor alteration between the unilateral striatal lesion and complete medial forebrain bundle lesion by 6-hydroxydopamine in rats, a PET study. 2008 World Molecular Imaging Congress, 2008.
- ⑥ 方欣, 孫偉, 杉山憲嗣, 赤嶺壮一, 難波宏樹: パーキンソン氏病ラットモデルに対する分子イメージング研究における共同開発. メディカルイノベーションフォーラム, 2008

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

方 欣 (FANG XIN)

浜松医科大学 分子イメージング先端研究  
センター 特任助教

研究者番号：00469917

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：