

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15794

研究課題名（和文）神経因性疼痛の環境療法開発への試み：非侵襲的PETによる環境治療効果長期追跡

研究課題名（英文）Evaluation of non-invasive and longitudinal PET imaging strategy for developing environmental therapy for neuropathic pain

研究代表者

下地 佐恵香（Shimochi, Saeka）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・研究員

研究者番号：50791563

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、神経因性疼痛バイオマーカーとしての脊髄ミクログリア活性化の有効性に着目し、18kD Translocator Protein 標的のプローブ [18F]F-DPAを用いた活性化ミクログリア PET イメージングによる客観的疼痛評価法の確立を試みた。本研究結果より、Ex vivo試験では[18F]F-DPAは高感度に脊髄内の炎症を評価できることが明らかになったが、in vivo PET評価では客観的疼痛評価法として用いるには課題が残る事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的な特色は、非侵襲的PETを用いて、従来観測困難であった主観的な“痛み”に客観的な評価指標を与え、さらに、新規に開発された[18F]F-DPA PETをイメージングバイオマーカーとして活用することで、神経因性疼痛治療の有効性を明らかにすることにある。生体動物での病態評価指標としての[18F]F-DPA PETには課題が残る事が示唆されたが、本研究により小動物での脊髄炎症PETイメージングにおける生物学的、物理学的な問題が明らかとなり、神経因性疼痛診断・治療法開発および背景メカニズム解明における具体的な課題が提示できたことから、今後の研究に与える意義は極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have linked activated spinal glia to neuropathic pain. Here, we evaluated the feasibility and sensitivity of [18F]F-DPA (18-kDa translocator protein radioligand) PET imaging for detecting spinal cord microglial activation as an objective evaluation method for neuropathic pain. [18F]F-DPA aided visualization of the spinal cord inflammation site in neuropathic pain model rats on ex vivo autoradiography and ex vivo PET. However, in vivo [18F]F-DPA PET did not allow for visualization of tracer accumulation.

研究分野：病態分析学

キーワード：神経因性疼痛 ミクログリア 脊髄 TSPO PET [18F]F-DPA

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性神経障害は糖尿病合併症の中でもっとも高頻度とされ、ほとんどすべての病型で糖尿病性神経因性疼痛がおこりうる。神経因性疼痛は自発痛、痛覚過敏、非侵害性の触刺激を激痛として誤認識する病態(アロディニア)を主症状とする。神経因性疼痛を有する多くの疼痛患者は、身体の活動量や機能が低下し生活の質が著しく損なわれることから、痛み自体が治療の対象となるが、その発症メカニズムが未解明であることに加え、従来の非ステロイド性抗炎症薬や麻薬性鎮痛薬が奏功しない問題点を有している。従って神経因性疼痛の発症メカニズムの解明および治療法・治療薬開発は臨床糖尿病学における喫緊の課題である。

近年、げっ歯類に自発運動を促す環境エンリッチメントが神経活動亢進や種々の液性因子の働きを介して脳梗塞や神経変性疾患に付随する神経症状改善に効果的であることが明らかとなってきた。環境エンリッチメントとは飼育環境に変化を与えることにより動物の自発運動促進・心的ストレス低減・社会性向上を引き起こす行動学的実験手法であり、ヒトに外挿することが出来れば、薬物に依存しない有用な治療法となり得る。最近、神経因性疼痛緩和においても環境エンリッチメントの有効性が示されつつあるものの、その鎮痛メカニズムや長期間での効果は十分に解明されていない。

また痛みは主観的な病態の表出であることから、痛覚試験等の行動薬理的手法以外に評価法が無く、痛みを客観的に評価し得るバイオマーカーあるいは評価・診断法の開発が望まれている。最近、アロディニア誘発末梢神経傷害モデル動物を用いた病理学的研究において、脊髄後角におけるミクログリア活性化の程度がアロディニア重症度とよく相関することが報告され、痛みの客観的指標としての脊髄後角ミクログリアの有効性が指摘された。ポジトロン断層撮像法 (PET) は非侵襲的に生体内標的分子の挙動を捉えるインビボ分子イメージング法であり、アロディニアに付随する脊髄後角ミクログリア活性化を PET により画像化できれば、その画像情報は痛みの客観的指標としてのイメージングバイオマーカーとなり、その非侵襲性故に同一個体を用いた長期間に亘る追跡研究をも可能とする。さらに、近年の技術進歩によって、PET 装置の本質的な性能向上が実現されてきている。具体的には高速で高い発光量を有するシンチレーション結晶検出器と、半島体型の光電子増倍素子を組み合わせることで、高解像と高速処理が可能になってきている。最新鋭の小動物装置としてこれらの技術を搭載した PET 装置が実用化されて注目を集めているところである。

以上を背景として申請者は、神経因性疼痛に及ぼす環境エンリッチメントの効果を、脊髄後角における活性化ミクログリアを対象として、さらに上記の最新鋭の PET 装置を利用することにより、高空間解像度下の PET 画像を長期間追跡評価することを計画した。痛みは主観的かつ個体差の大きな病態であることから、このような同一個体を用いた長期間のフォローアップ研究により初めて、環境エンリッチメントの神経因性疼痛治療法としての有効性と限界を明確化できると期待される。

2. 研究の目的

活性化ミクログリアマーカー-18kD Translocator Protein(TSP0)を標的とした PET 撮像は脳内神経炎症イメージングにおいて有効であることが知られている。本研究では神経因性疼痛モデルラットを用いて Turku 大学のグループが新規に開発した [¹⁸F]F-DPA PET と、さらに半導体型光電子増倍素子を利用した高解像度・高感度、さらに最新鋭の画像再構成ソフトを搭載した PET 装置 (Molecubes, Ghent, Belgium)を利用してイメージング評価することを目的とした。その上で行動薬理評価、病理学的解析との比較検討により、痛みの客観的指標としての [¹⁸F]F-DPA PET の有効性を確立する。さらに、神経因性疼痛モデルラットに環境エンリッチメントを施し、疼痛尺度の推移を行動薬理評価、 [¹⁸F]F-DPA PET により長期にわたり追跡することにより、環境エンリッチメントの神経因性疼痛治療法としての有効性を示す。

3. 研究の方法

(1) 神経因性疼痛モデルラットの作製と疼痛行動評価

Seltzer らによって報告された方法により、ラット大腿上部の坐骨神経の 1/2 から 1/3 をきつく結紮することにより、坐骨神経部分損傷(partial sciatic nerve ligation; PSNL)モデルを作製した。触刺激に対する痛み行動(アロディニア)の評価として von Frey filament 試験を行い、50%閾値を算出し、後肢の反応閾値が手術前より低下した個体をアロディニア発現個体として実験に使用した。

(2) 脊髄内ミクログリアの活性化の指標としての $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ の評価

PSNL 処置動物に対し、坐骨神経結紮一週間後に *in vivo* $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ PET を施行し、非侵襲的疼痛イメージング法としての有効性を検討した。また、脊髄凍結切片に対し *ex vivo* autoradiography 試験、活性化ミクログリアのマーカとして Iba-1 を用いた免疫組織化学染色を行い、脊髄への RI 集積分布とタンパク発現分布との関連を評価した。

4. 研究成果

(1) 神経因性疼痛モデルラットの確立

Seltzer らに報告された方法により、坐骨神経部分損傷 (partial sciatic nerve ligation; PSNL) モデルを確立した。術前、術後 3 日、7 日後に von Frey filament を用いて後肢足底を刺激し、疼痛誘発側 (患側) と、結紮していないコントロール側 (健側) を同一固体と比較し、接触からの逃避行動を疼痛行動の指標とした。図 1 の通り、接触反応への閾値は術後 3 日から患側で低下しており、7 日後まで一定の反応が認められた。

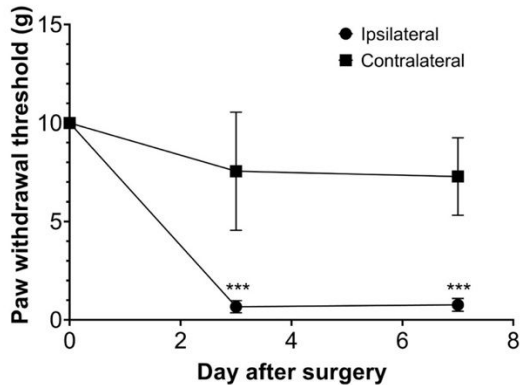


図 1

(2) *In vivo* $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ PET イメージング

-Cube (Molecubes, Ghent, Belgium) PET 装置を用いて、術後 1 週間のモデル動物に対し、*in vivo* $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ PET イメージングを行ったが、図 2 (a) の通り、坐骨神経結紮により炎症が誘発される、腰髄における $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ の集積は確認できなかった。比較検討の為、異なる PET 装置 Inveon (Siemens, Knoxville, USA) を用いた $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ PET、さらに、既に同じ疼痛モデル動物のイメージングにおいて有効性が報告されている 18kD Translocator Protein 標的のプロープ $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ を用いた PET イメージングを実施したが、図 2 (b, c) の通り、いずれも脊髄内炎症部位における RI 集積は認められなかった。脊髄炎症部位 (lumbar spinal cord) と、比較部位として thoracic spinal cord での SUV を比較した所、図 2 (e) の通り、 $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ PET (-Cube) ではそれぞれ 1.00 ± 0.10 , 1.16 ± 0.08 、 $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ PET (Inveon) ではそれぞれ 0.72 ± 0.08 , 0.75 ± 0.06 であった。脊髄周囲の椎骨での SUV は $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ PET (-Cube) で最も高かった。

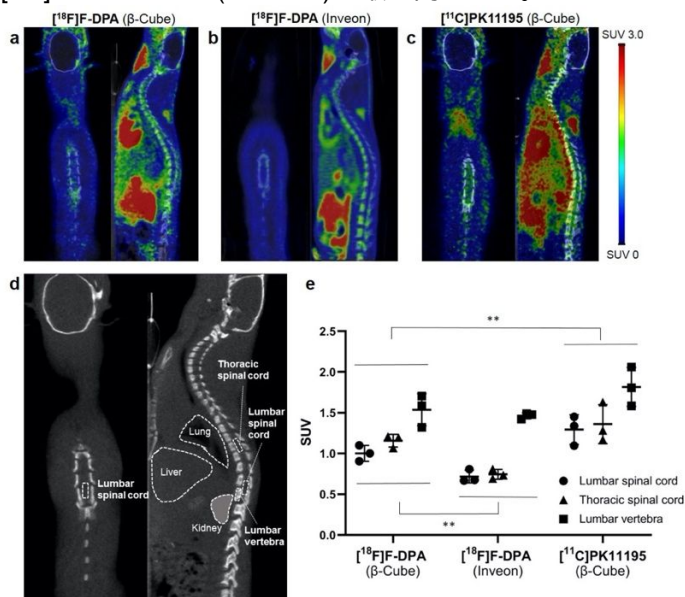


図 2

(3) *Ex vivo* autoradiography、組織学的解析

$[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ または $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ を投与した術後 1 週間の疼痛モデル動物に対して、脊髄凍結切片を用いた autoradiography を実施し、炎症部位での RI 集積を比較した。図 3 (a) の通り、腰髄において坐骨神経結紮側（右側）での明らかな $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ の高集積が認められた。比較部位としての胸髄と腰髄での PSL/mm² 値の比率を比較した所、 $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ よりも $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ において有意に高く、 $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ はより高感度に炎症を評価できる可能性が示唆された。抗 Iba-1 抗体を用いた免疫染色では、腰髄右側で、Iba-1 陽性細胞(マクロファージ/ミクログリア)の有意な増加が認められ、RI 集積部位と一致した。

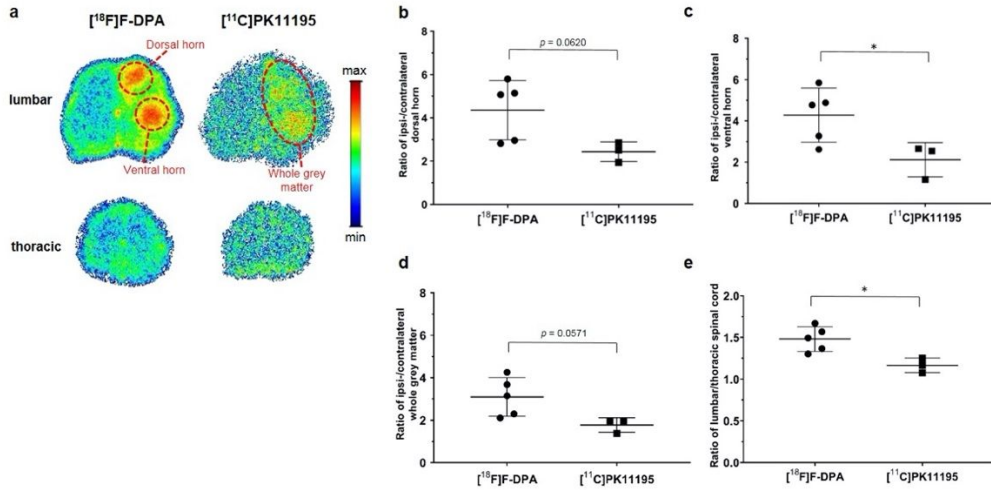


図 3

(4) 摘出脳脊髄の *ex vivo* $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ PET イメージング

$[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ を投与した術後 1 週間の疼痛モデル動物の脳脊髄を摘出し、*ex vivo* $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ PET イメージングを実施した。図 4 の通り、腰髄内右側炎症部位における明らかな $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ の高集積が認められた。

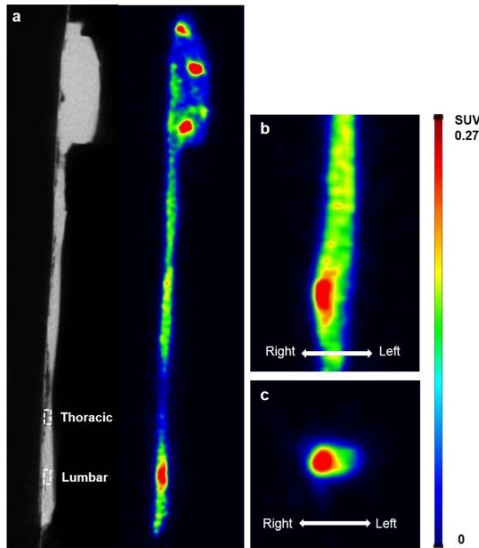


図 4

本研究の申請当初の計画では、18kD Translocator Protein 標的プローブ $[^{18}\text{F}]\text{PBR 111}$ を用いた活性化ミクログリア PET イメージングによる客観的疼痛評価法を確立し、この手法の非侵襲的な特性を最大限活用することにより神経因性疼痛に対する環境エンリッチメントの疼痛治療効果を同一個体を用いて長期にわたって評価することを目的としていた。実際の研究では、小動物の脊髄内の小さな範囲 (<2mm) の炎症を評価することを考慮し、より高感度な炎症の評価を期待できる 18kD Translocator Protein 標的プローブ $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ と、高空間分解能 (<1.0 mm) を有する PET 装置 -Cube (Molecubes, Ghent, Belgium) を用いて本研究を遂行した。*Ex vivo* autoradiography、摘出脳脊髄の *ex vivo* PET イメージングの結果、片側坐骨神経結紮に起因する腰部脊髄右側での $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ 高集積が認められ、比較部位である胸部脊髄との SUV 比、Lumbar (inflammation site)-to-thoracic (reference) は *ex vivo* PET で (1.43 ± 0.002) であり、*ex vivo* autoradiography の結果 (1.48 ± 0.15) とほぼ一致する値であった。

一方、*in vivo* $[^{18}\text{F}]\text{F-DPA}$ PET では脊髄内の炎症部位での RI の特異的な集積を検出する事

ができず、客観的疼痛評価法としての有効性を認めることはできなかった。この結果の一因として、*ex vivo* [^{18}F]F-DPA PET での炎症部位における SUV 値 0.20 ± 0.02 に比較して、*in vivo* [^{18}F]F-DPA PET での炎症部位における SUV 値は 1.00 ± 0.10 と高く、高い background noise が脊髄全体の PET イメージ評価を阻害していると考えられる。脊髄は RI が高く集積する椎骨や他の臓器に囲まれており、脊髄内の限られた小さな領域の炎症を検出する事は非常に困難であると予想されたが、本研究での高感度のトレーサーと高空間分解能を有する PET 装置を用いても、疼痛治療効果を追跡するための客観的評価法としての利用には課題が残ると結論した。今後は PET 装置の持つ物理学的な要因の改善、より高感度な PET トレーサーの評価など、更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kondo Naoya, Temma Takashi, Aita Kazuki, Shimochi Saeka, Koshino Kazuhiro, Senda Michio, Iida Hidehiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Development of matrix metalloproteinase-targeted probes for lung inflammation detection with positron emission tomography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-19890-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shimochi Saeka
2. 発表標題 Evaluation of [18F]F-DPA PET for detecting microglial activation in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain
3. 学会等名 Turku PET Centre Scientific Meeting
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------