

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591369

研究課題名（和文）アルツハイマー病早期診断のための分子イメージングに関する基礎的研究

研究課題名（英文） Basic research of molecular imaging for early diagnosis of Alzheimer's disease

研究代表者 外山 宏(Toyama Hiroshi)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：90247643

研究成果の概要：アルツハイマー病などの神経変性疾患では脳内でグリア細胞であるミクログリア(Mi)が病変部に集積し活性化している。Miが脳内で休止型から活性型になると末梢性ベンゾジアゼピン受容体(PBR)が発現し、PBRの発現とMiの毒性転換に関連性が深いことが示唆されている。ポジトロンCT(PET)を用いて生体内でPBRの発現をモニタリングできれば神経変性疾患の早期診断が可能となる。ラットモデルに対しPETとPBR製剤により、活性型Miを生体内で画像化可能かどうか検討した。活性化した株化Mi細胞で基礎的検討も行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,300,000	0	2,300,000
2007年度	600,000	180,000	780,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	360,000	3,860,000

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：画像診断学（含放射線診断学、核医学）、アルツハイマー病、分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は原因不明の進行性痴呆症であるが、近年治療薬の開発により、記憶障害の改善などの有用性が報告され、その早期診断が重要になりつつある。ポジトロンCT(PET)は生体内の分子レベルの生理的な体内動態を非侵襲的に評価可能な方法である。近年の技術の進歩により、小動物専用の高解像度、高感度の装置が開発さ

れ実験での利用も進んでいる。ADでは、ニューロンの変性、脱落とともにグリアの活性化や増殖が惹起され、老人斑(アミロイド)の周囲には、活性型ミクログリア(Mi)が観察される。最近、病変部に集積・活性化したMiの一部が神経障害性を惹起(毒性転換)し、病態形成に重要な役割を果たしていることがわかってきた。Miが休止型から

活性型に変化すると末梢性ベンゾジアゼピン受容体 (PBR) が発現するが、PBRの発現とMiの毒性転換に関連性が深いことが示唆されている。したがって、生体内でPBRの発現をモニタリングできればADの早期診断が可能となると考えられる。

2. 研究の目的

ラットモデルによる内在性Mi活性化モデル、活性化した外来性株化Mi注入モデルに対しPETとPBR製剤により、活性型Miを生体内で画像化可能かどうか検討した。基礎的検討として、PBR製剤と活性化した株化Mi細胞の結合が増加するかどうか検討した。また、蛍光標識PBR製剤と株化Mi細胞の結合部位を蛍光顕微鏡下で観察した。

3. 研究の方法

(1) PBR 製剤と活性化した株化 Mi 細胞の結合実験

Miが活性化することによってPBR結合能が増加するのか、またPBR製剤との結合の様子を観察する目的で、株化Mi細胞を培養条件下に結合実験を行った。PBR製剤は、¹¹C-PK11195 と共同研究として蛍光標識 PBR 製剤 CBF5 (Dr. Trapani G, Bari 大学、イタリアが開発) で検討した。

(2) MRI と PET によるラット線条体の定位的撮像

PET画像では解剖学的な情報が不十分であるため、線条体の障害モデルに対し、定位的な線条体の位置決めをMRIとPETで試みた。

(3) PETのデータ解析

動脈採血を省略した2つの新しいPBRの定量法を試みた。

①簡便な脳内分布容積算出法

Lassenの理論により、脳内分布容積 (distribution volume: V) の算出は以下の式で定義される。

$$V = \frac{\int_0^{\infty} ROI dt}{\int_0^{\infty} Plasma dt}$$

: リガンドの関心領域 (region of interest: ROI) の time activity curve (TAC) の area under the curve (AUC) と plasma の TAC の AUC の比であることから、患側の右線条体 (RST) に対する正常の左線条体 (LST) の V の比は、 $V(RST) / V(LST) = (RST \text{ AUC} / \text{plasma AUC}) / (LST \text{ AUC} / \text{plasma AUC}) = RST \text{ AUC} / LST \text{ AUC}$ となり、動脈採血を省略できる。スキャン時間 (60 分間) の AUC の比 (V_{60}) で定量した。

②相対的脳内分布容積算出法

動脈採血を必要としない Ichise らによって提唱された2種類のパラメーターを用いた多線形参照領域モデル (two-parameter multilinear reference tissue model: MRTM2) により、初期血流分布 (relative tracer delivery : R_t) と受容体結合画像 (normalized distribution volume : V^*) を求め、 R_t と V^* の機能画像を作成した。

(4) PBR 製剤と PET によるラット活性型ミクログリア生体内画像化実験

最初に一側ラット線条体へのエタノール注入モデルと旧来のPBR製剤¹¹C-PK11195 PETによる評価を行った。さらに同様のモデルに対しLPSを腹腔内に投与し、PETと活性型ミクログリアの発現の数、RT-PCRによる遺伝子解析でサイトカイン (TNF α , IL-1 β) の発現について非投与群と比較した。また、培養下で活性化した外来性株化Miを直接一側ラット線条体へ注入したモデルでも検討した。

共同研究として旧来のPBR製剤¹¹C-PK11195 に比べ約20倍の親和性を持つ新たに開発されたリガンド¹¹C-CB148 (Dr. Trapani G, Bari 大学、イタリア)、¹⁸F-FEPPA (Dr. Wilson. A, Toronto 大学、カナダ) で一側ラット線条体へ

のエタノール注入モデル、一側ラット線条体への6-OHDA注入モデルで同様に検討した。

4. 研究成果

(1) LPSで刺激していない株化Mi細胞に比べ、刺激後の細胞に結合増加を認めた。Mi細胞が活性化すると ^{11}C -PK11195の結合が増加することが試験管内で証明された。

株化Mi細胞と蛍光標識PBR製剤CBF5との結合実験でもLPS刺激により株化Mi細胞に集積が増加し、さらにミトコンドリア表面に集積の増加を認めたことから、活性型になるとミトコンドリアの表面にPBRが移動し結合が増加するという仮説が画像として証明された。

(2) ラットの定位脳アトラスをもとに、MRI画像上門歯、左右外耳孔、Bregma上のマーカーを3断面で同時に同定することにより、脳定位固定装置無しに再現性良く線条体の断面が得られた。同様の基準点をもとに脳定位固定具を使用してPETを撮像することにより、線条体のROIの設定が容易になった。

(3) ^{11}C -PK11195に対し、簡便な脳内分布容積算出法と相対的脳内分布容積算出法の正当性を証明するために、動脈採血と代謝分析による様々なモデル解析を試みたが、動脈血中カウントに対して脳への集積が低すぎるために、どのモデルも適合せず、直接的な定量法の正当性は証明できなかった。

(4) 最初に一側ラット線条体へのエタノール注入モデルと旧来のPBR製剤 ^{11}C -PK11195 PETによる評価を行った。健側と比べ、傷害側線条体に10%前後の有意な集積増加を認め、免疫組織染色で患側線条体に活性型Miの集積を認めた。

傷害側線条体の集積に高いものから低いものにばらつきが認められたことから、線条体の傷害の程度の違いで性質の違う活性型Miの混在、毒性転換との関連が示唆されたため、同様のエタノール傷害モデルラットの腹

腔内にLPSを投与し、Miの性状変化によってPBRの集積に変化が生じるかどうか検討した。LPS投与群は非投与群と比べPETで有意な集積増加を認めた。さらに、RT-PCRによる遺伝子解析で、LPS投与群の方が多くのラットにサイトカイン($\text{TNF } \alpha$, $\text{IL-1 } \beta$)の発現を認め、発現を認めなかったラットは集積が低かった。LPS非投与群はサイトカインの発現したラットは少なかった。LPS投与群と非投与群は活性型Miの数に有意差を認めなかった。これらの結果から、PBRの集積は、活性型Miの発現の数よりも毒性転換との関連が高いことが示唆された。培養下で活性化した外来性株化Miを直接ラットの脳内に注入したモデルでは、健側と比べ、注入側線条体に10~15%前後の有意な集積増加を認め、PET撮像後の免疫組織染色で注入された活性型株化Miを認めた。PETの集積と顕微鏡下で計測された活性型株化Miの数は有意な正の相関を認めた。

旧来のPBR製剤 ^{11}C -PK11195とPETによる評価では、健側との比が10~15%と十分な信号が得られなかったことから、 ^{11}C -PK11195の脳内集積率が低く、PBRへの親和性が低いことが原因と考えられた。 ^{11}C -PK11195に比べ約20倍の親和性を持つ新たに開発されたリガンド ^{11}C -CB148、 ^{18}F -FEPPAで検討した。一側ラット線条体へのエタノール注入モデルにおける ^{11}C -PK11195と ^{11}C -CB148の比較では、共に健側との比が10~15%と有意な差を認めなかった。しかし一側ラット線条体への6-OHDA注入モデルにおける ^{11}C -PK11195と ^{18}F -FEPPAの比較では、 ^{11}C -PK11195は約15%、 ^{18}F -FEPPAは約30%の左右差を認め、 ^{18}F -FEPPAの集積の方が有意に高かった。 ^{18}F -FEPPAの集積と免疫組織学的評価の比較では、チロシ水酸化酵素（ドーパミン神経）とは有意な負の相関を認めた。ED-1染色（活性型Mi）とは相関を認めなかつ

た。¹⁸F-FEPPAの集積とRT-PCRの比較では、炎症性サイトカイン(TNF α、IL-1 β)と正の相関を認めた。これらの結果から、¹⁸F-FEPPAは、パーキンソン病モデルラットにおいて¹¹C-PK11195よりも高い信号が得られた。PBR PETはMiの活性化の程度よりも、毒性転化の程度に関連が深いと考えられた。

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 4 件)

1. Toyama H, Hatano K, Suzuki H, Ichise M, Momosaki S, Kudo G, Ito F, Kato T, Yamaguchi H, Katada K, Sawada M, Ito K. In-vivo imaging of microglial activation using a peripheral benzodiazepine receptor ligand, [¹¹C]PK-11195 and animal PET following ethanol injury in rat striatum. Ann Nucl Med 22, 417-424, 2008, 査読有り
2. 伊藤文隆、外山 宏、工藤 元、片田和広 末梢性ベンゾジアゼピン受容体リガンドを用いた PET によるミクログリア毒性転換検出の可能性 藤田学園医学会誌 32, 83-88, 2008, 査読有り
3. 外山 宏、工藤 元、伊藤文隆、片田和広、大橋正男、中根正人、籠野健太郎、加藤隆司、伊藤健吾、鈴木弘美、澤田 誠、市瀬正則. 脳の標的化画像診断—PETによる活性化ミクログリアの分子イメージング—. 21 世紀 COE プログラム、超低侵襲標的化診断治療開発センター研究成果報告書, 87-88, 2008, 査読無し
4. 外山 宏、工藤 元、伊藤文隆、片田和広、大橋正男、中根正人、籠野健太郎、加藤隆司、伊藤健吾、鈴木弘美、澤田 誠、市瀬正則 アルツハイマー病早期診断マーカーのための活性化ミクログリアの画像化—PET による末梢性ベンゾジアゼピ

ン受容体イメージング—. 医科学応用研究財団研究報告 26, 415-420, 2007, 査読無し

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 外山 宏、工藤 元、伊藤文隆、片田和広、籠野健太郎、山田貴史、伊藤健吾、鈴木弘美、澤田 誠 ラット脳 6-OHDA モデル PET における末梢性ベンゾジアゼピン受容体制剤 (¹¹C—PK11195, ¹¹C—PBR28, ¹⁸F—FEPPA) の比較、検討 日本核医学会第 68 回中部地方会 2009 年 2 月 14 日、名古屋
2. Kudo G, Toyama H, Hatano K, Suzuki H, Wilson AA, Ichise M, Ito F, Kato T, Katada K, Sawada M, Ito K. In-vivo imaging of microglial activation using a novel peripheral benzodiazepine receptor ligand, ¹⁸F-FEPPA and animal PET following 6-OHDA injury of the rat striatum; A comparison with ¹¹C-PK11195. 7th International Symposium on Neuroreceptor Mapping, July 17-19, 2008, Pittsburgh, USA
3. Toyama H, Kudo G, Hatano K, Suzuki H, Ichise M, Wilson AA, Kato T, Katada K, Sawada M, Ito K. PET imaging of microglial activation using a novel peripheral benzodiazepine receptor ligand, ¹⁸F-FEPPA, in a rat neuroinflammation model. 55th Annual Meeting Society of Nuclear Medicine, June 14-18, 2008, New Orleans, USA
4. 鈴木弘美、外山 宏、籠野健太郎、工藤元、伊藤文隆、小野健治、加藤隆司、Alan Wilson、伊藤健吾、市瀬正則、澤田 誠 新規末梢性ベンゾジアゼピン受容体制剤：[¹⁸F]FEPPA PET とパーキンソン病モデルラットを用いた活性化ミクログリア

- のイメージング, 日本分子イメージング学会第3回総会・学術集会, 2008年5月22-23日, 大宮
5. 伊藤文隆、工藤 元、外山 宏、簗野健太郎、加藤隆司、片田和広、市瀬正則、伊藤健吾. 動物PETによるラット線条体モデルにおけるミクログリア毒性転換の検討. 第47回日本核医学会総会, 2007年11月5日, 仙台
 6. 鈴木弘美、外山 宏、簗野健太郎、工藤元、伊藤文隆、小野健治、加藤隆司、伊藤健吾、澤田 誠、動物PETによるラット線条体障害モデルにおけるミクログリア毒性転換の検討, 第16回日本バイオイメージング学会学術集会, 2007年10月31日~11月2日, 東京
 7. 伊藤文隆、工藤 元、外山 宏、鈴木弘美、簗野健太郎、加藤隆司、片田和広、市瀬正則、澤田 誠、伊藤健吾. 動物PETによるラット線条体障害モデルにおけるミクログリア毒性転換の検討. 日本分子イメージング学会第2回総会・学術集会 2007年6月28-29日、福井
 8. Kudo G, Toyama H, Hatano K, Suzuki H, Ichise M, Ito F, Yamaguchi H, Sekimata K, Kato T, Katada K, Serra M, Trapani G, Sawada M, Ito K. In-vivo imaging of microglial activation using a peripheral benzodiazepine receptor ligand, ^{11}C -CB148 and animal PET following ethanol injury in rat striatum: A comparison with ^{11}C -PK11195. 54th Annual Meeting Society of Nuclear Medicine, June 2-6, 2007, Washington DC, USA
 9. Ito F, Kudo G, Toyama H, Hatano K, Suzuki H, Ichise M, Yamaguchi H, Sekimata K, Kato T, Katada K, Serra M, Trapani G, Sawada M, Ito K. In-vivo imaging of microglial activation using a peripheral benzodiazepine receptor ligand, ^{11}C -CB148 and animal PET following ethanol injury in rat striatum. Brain PET`07, May20-24, 2007, Osaka, Japan.
 10. 工藤 元、外山 宏、伊藤文隆、片田和広、簗野健太郎、加藤隆司、伊藤健吾、市瀬正則. 末梢性ベンゾジアゼピン受容体制剤 ^{11}C -CB148 と ^{11}C -PK11195 の比較-エタノール障害モデルラットによる検討-. 第46回日本核医学会総会, 2006年11月9日, 鹿児島
 11. 工藤 元、外山 宏、伊藤文隆、片田和広、簗野健太郎、加藤隆司、伊藤健吾、市瀬正則. 末梢性ベンゾジアゼピン受容体制剤 ^{11}C -PK11195、株化ミクログリア注入モデルによる活性型ミクログリア評価. 第46回日本核医学会総会, 2006年11月9日, 鹿児島
 12. Suzuki H, Toyama H, Hatano K, Kudoh G, Ito F, Ono K, Kato T, Ito K, Sawada M. Imaging of activated microglia in brain injury 第49回神経化学学会大会, 2006年9月14-16日、名古屋
 13. Ito F, Kudo G, Toyama H, Suzuki H, Hatano K, Nakane M, Ohashi M, Kato T, Katada K, Ichise M, Sawada M, Ito K. Stereo-tactic imaging of the rat brain lesions using 1.5 T MRI system -Development of reproducible imaging technique without stereo-tactic device. Fifth Annual Meeting of the Society for Molecular Imaging, August 30 - September 2, 2006, Hawaii, USA.
 14. Kudo G, Toyama H, Hatano K, Suzuki H, Ichise M, Ito F, Kato T, Sawada M,

Katada K, Ito K. In vivo imaging of microglial activation using a peripheral benzodiazepine receptor ligand, [¹¹C]PK11195 and animal PET following implantation of cultured activated microglia into rat striatum. 6th International Symposium on Neuroreceptor Mapping, July 6-8, 2006, Copenhagen, Denmark

15. 伊藤文隆、工藤 元、外山 宏、鈴木弘美、篠野健太郎、中根正人、大橋正男、加藤隆司、片田和広、市瀬正則、澤田 誠、伊藤健吾. 1.5T MRIによる定位的ラット線条体撮像-定位脳固定具を用いない撮像法の開発-日本分子イメージング学会設立総会, 2006年5月23-24日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

外山 宏 (TOYAMA HIROSHI)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：90247643

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

篠野 健太郎 (HATANO KENTARO)

国立長寿医療センター研究所・長寿脳科学研究部・室長

研究者番号：50228475

澤田 誠 (SAWADA MAKOTO)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：10187297

伊藤 健吾 (ITO KENGO)

国立長寿医療センター研究所・長寿脳科学研究部・部長

研究者番号：70184653

加藤 隆司 (KATO TAKASHI)

国立長寿医療センター研究所・長寿脳科学研究部・室長

研究者番号：60242864

片田 和広 (KAZUHIRO KATADA)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00101684

(4) 研究協力者

工藤 元 (KUDO GEN)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

伊藤 文隆 (ITO FUMITAKA)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

大橋 正男 (OHASHI MASAO)

藤田保健衛生大学病院・放射線科・技師

鈴木 弘美 (SUZUKI HIROMI)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

中根 正人 (NAKANE MASATO)

名古屋セントラル病院・放射線科・医長

市瀬 正則 (ICHISE MASANORI)

コロンビア大学・放射線科・教授

Giuseppe Trapani

Bari 大学・薬学部・教授

Alan A Wilson

トロント大学・医学部・准教授