

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09645

研究課題名(和文) 脊髄障害性疼痛におけるニューロン-グリア連関解明とニューロイメージング評価の確立

研究課題名(英文) Assessments of neuron-glia linkage in spinal cord-related pain and clinical significance of neuroimaging (PK11195 PET/MRI)

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄障害由来の疼痛発現について、ミクログリアの活性化が注目されている。ベンゾジアゼピン受容体(PBR/TSP0)は主に脊髄由来活性化ミクログリアに発現し、TSP0に特異的な結合性リガンドであるPK11195を用いたPET imagingによって、活性化ミクログリアの動態(疼痛)を可視化できる可能性がある。しかし本研究では、PET/MRIを用いた臨床応用例でのuptakeの確認は急性期症例に限られ、慢性期の活性化ミクログリアの動態評価としての有用性は確認されなかった。慢性期に残存する難治性疼痛にはミクログリアの活性化以外の病態が関与している可能性や、他の核種での検討の必要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄実質の障害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く、治療が難渋している要因となっている。活性化ミクログリアが脊髄障害性疼痛に関与していることは理解されているが、本研究では脊髄障害性疼痛における活性型ミクログリアの脳-脊髄領域での動態を理解したうえで、活性化ミクログリアの可視化を試みた。慢性疼痛の客観的評価が行うことができれば大変興味深い研究成果となり得たが、本研究では亜急性期までのuptakeの確認にとどまった。慢性期に残存する難治性疼痛にはミクログリアの活性化以外の病態が関与している可能性も示唆する結果であり、当初の想定とは異なったものの臨床的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Our results in the animal model suggest that PBR is mainly located in activated microglia in injured spinal cord and [3H]-(R)-PK11195 PET imaging may be useful to evaluate the activation of microglia. In the clinical study, [11C]-PK11195 PET/MRI imaging is available to investigate whether microglial activation, an indication of neuroinflammation, is evident in for the patients with neuropathic pain in the acute/subacute stage. The pathomechanism of the patients with neuropathic pain except the microglia activation in the injured or compressed site may affect in the chronic stage.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：活性化ミクログリア 神経障害性疼痛 脊髄損傷 PK11195 PET/MRI

1. 研究開始当初の背景

脊髄障害性疼痛症候群は、後縦靭帯骨化症や脊髄空洞症などの難病・難治性疾患や脊髄損傷後、脊髄腫瘍術後などの脊髄障害に起因して引き起こされる難治性の疼痛症候群と定義される。我々は、「厚生労働省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班」による研究事業の一環として行った全国アンケートの結果によると、原疾患の内訳は、圧迫性脊髄症(頸椎症性脊髄症や後縦靭帯骨化症)が46.3%と最も多く、脊髄損傷が17.4%であった。損傷髄節レベル(at level)の疼痛は62.5%の症例でみられ、疼痛の種類としては、異常感覚、自発痛が多く、上肢のピリピリとしたしびれや、焼けつくようなしびれの訴えが多かった。一方、損傷髄節より下位レベル(below level)は38.7%の症例でみられ、疼痛の種類としては、筋肉の異常感覚の訴えが一番多く、発作痛の頻度は低かった。

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。この活性化ミクログリア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。

2. 研究の目的

急性脊髄損傷後の二次損傷や脊髄損傷後疼痛において、活性化ミクログリアが関与していることは理解されているが、活性化ミクログリアの動態については十分解明されているとはいえない。本研究では、動物モデルおよび脊髄損傷・頸髄症患者を対象として、PK11195(ミクログリアの活性化に伴いミトコンドリア膜上に発現するベンゾジアゼピン受容体(PBR/TSPO)のantagonist)を核種としたPET imagingを行い、活性化ミクログリア動態可視化の可能性を検証した。

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

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した。免疫組織化学的検討として、NeuN, CD11b, CC1, GFAPとTSPOの蛍光二重染色を行い、TSPOのsourceを調べた。また、CD11bと骨髄由来マクロファージ(GFP陽性)の蛍光二重染色を行い、TSPOのsourceとしての活性化ミクログリア・マクロファージの割合を調べた。

(2) ラット頸髄損傷・疼痛モデルを用いた ^3H -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した。オートラジオグラフィにより、末梢性ベンゾジアゼピン受容体(PBR/TSPO)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した。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 ^3H -PK11195を作成し、その可視化・定量化(AJS社製Dr View/LINUX)について評価した。損傷後3日、2週、4週で組織学的・行動学的検討を行った。

(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 $[^{11}\text{C}]$ -PK11195-PET/MRIによる検討

圧迫性脊髄症（頸椎症性脊髄症や後縦靭帯骨化症） 頸髄損傷患者のうち障害脊髄高位以下の保存療法抵抗性の脊髄障害性疼痛を有する患者を対象とした。疼痛評価として、JOACMEQ、SF-36、Neuropathic Pain System Inventory Score (NPSI)を用いた。PET-MRI は、 $[^{11}\text{C}]$ -PK11195 を静脈注射後、30 分で PET/MRI 撮影を頸髄および腰膨大部を中心におこなった。集積部位の SUVmax を計測した。

4. 研究成果

(1) PBR/TSPO の source について

PBR/TSPO と NeuN, CD11b, CC1, GFAP の蛍光二重染色では、CD11b とのみ merge がみられた（図 1）。また、CD11b と GFP の蛍光二重染色では、PBR/TSPO 陽性細胞は GFP とは merge しない細胞が主であり、主に活性化ミクログリアを source とすることが分かった（図 2）。

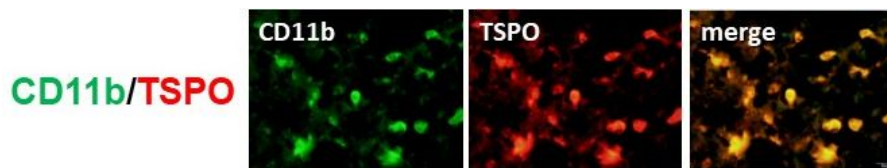


図 1. CD11b と PBR/TSPO の蛍光二重染色

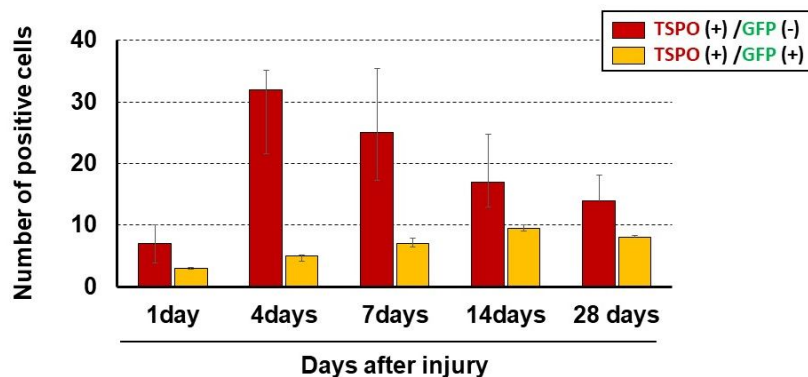


図 2. PBR/TSPO と GFP の蛍光二重染色結果

(2) ラット頸髄損傷・疼痛モデルを用いた $[^3\text{H}]$ -PK11195-autography、 ^3H -PK11195-PET

$[^3\text{H}]$ -PK11195-autography での $[^3\text{H}]$ -PK11195 発現は、脊髄損傷後 4 日をピークとして発現がみられ、以後漸減していた（図 3）。

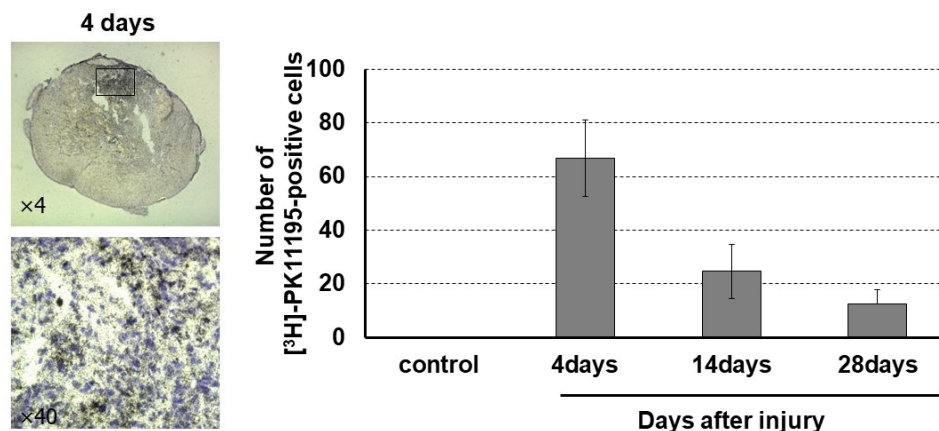


図 3. 頸髄損傷モデルに対する $[^3\text{H}]$ -PK11195-autography

^3H -PK11195-PET では、損傷部を中心として uptake がみられ、SUV は損傷後 4 日目をピークとして以後漸減していた (図 4)。

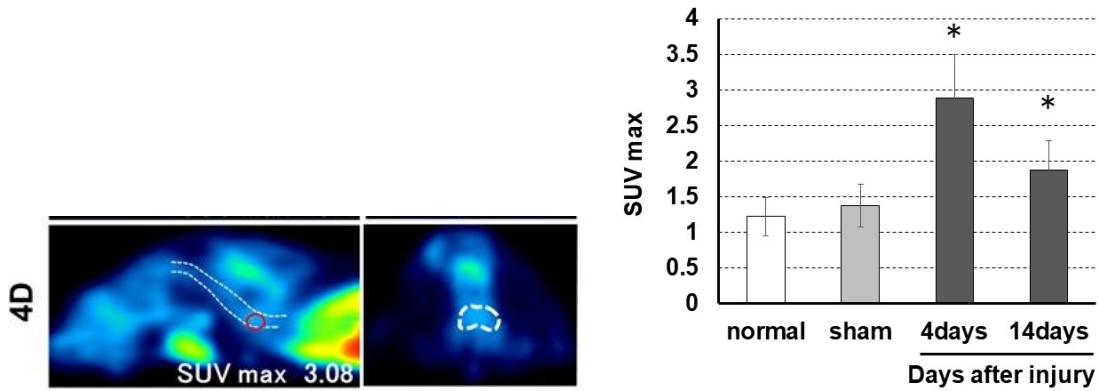


図 4. 頸髄損傷モデルに対する ^3H -PK11195-PET

(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

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 5)。

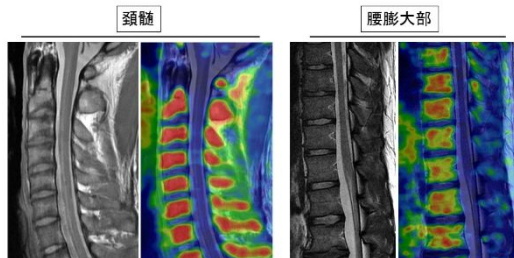


図 5. 健常者での ^{11}C -PK11195 PET/MRI

急性脊髄損傷患者、圧迫性頸髄症急性増悪患者 6 名を対象として、 ^{11}C -PK11195 PET/MRI を施行した。いずれも NPSI>10 の突痛の強い患者を対象としたが、PET/MRI での uptake が確認されたのは、術後経過 1 年以内の症例のみであった。図 6 右も頸髄損傷患者は、NPSI 30.5 と強い疼痛があるにもかかわらず、受傷後 9 年で ^{11}C -PK11195 PET/MRI における uptake は損傷部には確認されなかった。しかしながら、本患者は視床にはやや uptake がみられた。脳での uptake 評価は今後の検討課題と考える。

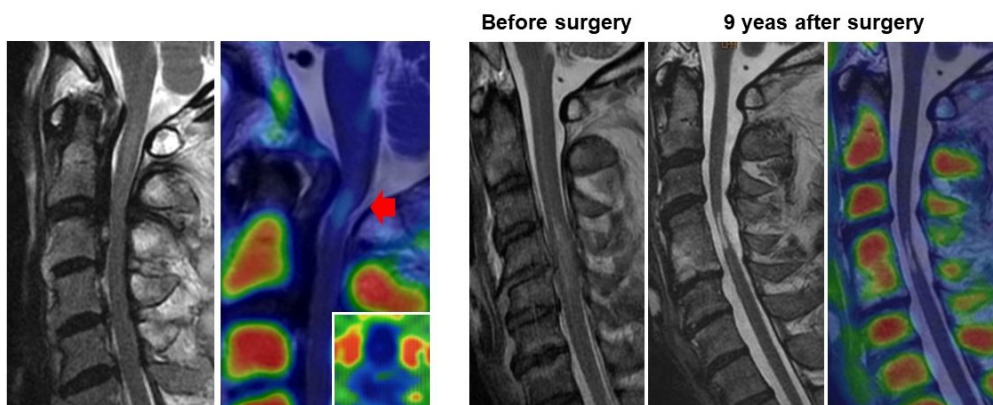


図 6. 非骨傷性頸髄損傷患者 (受傷後 4 週) (左) と頸髄損傷患者 (受傷後 9 年) (右) の ^{11}C -PK11195 PET/MRI

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakajima Hideaki, Honjoh Kazuya, Watanabe Shuji, Kubota Arisa, Matsumine Akihiko	4. 巻 737
2. 論文標題 Distribution and polarization of microglia and macrophages at injured sites and the lumbar enlargement after spinal cord injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135152 ~ 135152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2020.135152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Honjoh K, Nakajima H, Hirai T, Watanabe S, Matsumine A	4. 巻 13
2. 論文標題 Relationship of Inflammatory Cytokines From M1-Type Microglia/Macrophages at the Injured Site and Lumbar Enlargement With Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury in the CCL21 Knockout (plt) Mouse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2019.00525	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 -

1. 著者名 Takeura N, Nakajima H, Watanabe S, Honjoh K, Takahashi A, Matsumine A	4. 巻 9
2. 論文標題 Role of macrophages and activated microglia in neuropathic pain associated with chronic progressive spinal cord compression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15656
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-52234-1	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北出誠、中嶋秀明、渡邊修司、本定和也、松峯昭彦
2. 発表標題 PK11195 PET imagingを用いた脊髄内活性化ミクログリア動態評価と臨床的有用性
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田有咲、中嶋秀明、渡邊修司、本定和也、松峯昭彦
2. 発表標題 急性脊髄損傷後慢性期までの脳 - 脊髄におけるmicroglia/macrophageの動態解析
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田 有咲、中嶋 秀明、渡邊 修司、本定 和也、松峯 昭彦
2. 発表標題 脊髄損傷後の損傷部および腰膨大部におけるactivated microgliaおよびhematogenous macrophageの動態と極性
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北出誠、中嶋秀明、渡邊修司、本定和也、松峯昭彦
2. 発表標題 頸髄損傷モデルにおけるtranslocator protein (TSPO) 発現とPK11195 PET imagingによる動態解析
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
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
---------	---------