

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21390350

研究課題名（和文）神経免疫応答の画像診断—新規 PBR リガンドによるアプローチと多角的検証

研究課題名（英文）Imaging of neuroimmunoreactive response—Multilateral validation using newly developed PBR ligands for positron emission computed tomography

研究代表者 外山 宏 (TOYAMA HIROSHI)

藤田保健衛生大学・医学部・准教

研究者番号：90247643

研究成果の概要（和文）：

ラット脳神経傷害モデルの傷害性を増幅する薬物(LPS)を腹腔内に投与し、神経受容体(PBR/TSPO) ポジトロン CT(PET)の所見と組織所見を対比した。神経細胞が傷害され、グリア細胞(ミクログリア)が活性化されると炎症細胞(サイトカイン)が多く発現し、神経受容体(PBR/TSPO)が増加することを PET で捕らえられることができた。PET で生体内での神経受容体(PBR/TSPO)発現をモニタリングできれば神経変性疾患の早期診断に有用と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Neuro-receptor (peripheral benzodiazepine receptor:PBR/translocator protein:TSPO) positron emission CT(PET) imaging and histological findings were compared in rat neuro-inflammation model under lipopolysaccharide(LPS) administration to amplify the inflammation intraperitoneally. Increased bindings of neuro-receptor (PBR/TSPO) PET imaging were shown under cytotoxic damage, activated glia cell (microglia) and increased expression of inflammatory cytokines. These results suggest that increased PBR/TSPO binding by PET appears a promising for early diagnosis of neuro-degenerative disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：核医学(PETを含む)、分子イメージング、ミクログリア、末梢性ベンゾジアゼピン受容体(PBR)/輸送膜タンパク(TSPO)、炎症性サイトカイン、チロシン水酸化酵素(TH)、6-OHDA、リポポリサッカライド(LPS)

1. 研究開始当初の背景

近年、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する方法として、分子イメージングが注目されている。ポジトロンCT(PET)は、小動物専用の高解像度、高感度

の装置が開発され、動物実験での利用が進んでいる。さらに、様々な変性疾患の病変部に集積・活性化したミクログリア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。

これまでにミクログリアが休止型から活性型に変化するとミトコンドリアの表面に末梢性ベンゾジアゼピン受容体/輸送膜タンパク (PBR/TSP0) が発現することが報告されているが、我々が独自のモデルを用いて詳細に検討した結果から、PBR/TSP0の発現は活性型ミクログリアが神経保護的な性質から神経障害性に変化する状態 (毒性転換) に関連性が深いことが明らかになった。したがって、生体内でPBR/TSP0の発現をモニタリングできれば変性疾患の早期診断が可能となると考えられる。我々のこれまでの検討で、以下のことが証明された。

(1) ミクログリア活性化によるPBR/TSP0の増加とリガンド結合部位の証明

我々が開発した株化ミクログリア細胞とPBR/TSP0製剤 (^{11}C -PK11195) との試験管内での結合実験では、リポポリサッカライド (LPS) で活性化させると ^{11}C -PK11195の結合増加を認めた。また、研究協力者のイタリア、Bari 大学 Trapani らが開発した蛍光標識PBR/TSP0製剤CBF5を用いて行った結合実験では、LPS刺激によりミクログリア細胞のミトコンドリア表面に蛍光を持ったCBF5の結合・集積の増加を認め、ミクログリアが活性型になるとミトコンドリアの表面にPBR/TSP0が移動し結合が増加するという仮説が証明された (論文1)。

(2) ミクログリア毒性転換とPBR/TSP0発現の関連性の証明

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/TSP0製剤 ^{11}C -PK11195 PETによる評価では、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ミクログリアの集積を認めた。しかし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、傷害の程度の違いで性質の違う活性型ミクログリアの混在、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、ミクログリアの性状変化によってPBR/TSP0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炎症性サイトカイン (TNF α , IL-1 β) 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非投与群で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ミクログリアの数に有意差を認めなかった。これらの結果から、PBR/TSP0の集積は、活性型ミクログリア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。

^{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 ^{18}F -FEPPAでさら

に検討した。一側ラット線条体への6-hydroxydopamine (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 (活性型ミクログリア) とは相関を認めなかった。 ^{18}F -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、 ^{18}F -FEPPAは、パーキンソン病モデルラットにおいて ^{11}C -PK11195よりも高い信号が得られた。PBR/TSP0 PETはミクログリアの活性化の程度よりも、毒性転換の程度に関連が深いと考えられた。

2. 研究の目的

我々はこれまでの研究で株化ミクログリア細胞をLPSで刺激するとPBR/TSP0製剤の結合が増加することを *in vitro* で証明し、ラット脳線条体傷害モデルにおいてPBR/TSP0 PETで傷害側の集積が高く、摘出脳で同部に活性化ミクログリアの集積していることを *in vivo* で証明した。またLPSをラットの腹腔内に投与するとPBR/TSP0 PETで有意に集積増加を認めた。PBR/TSP0の発現はミクログリアの活性化の程度よりも毒性転換の程度に関連が深いことが示唆され、PBR/TSP0 PETは神経障害性のマーカーとして有用と考えられた。

今回我々は、これまで行ってきたPBR/TSP0リガンドと動物PETによる検討で明らかになったミクログリアの活性化と神経障害性 (毒性転換) との関連についてさらに詳細に検討するため、ラット脳のドーパミン傷害モデルにLPSを腹腔内投与し、神経障害性の増強とPBR/TSP0 PET所見との関係について、ドーパミントランスポーターPETとともに検討した。

3. 研究の方法

(1) 慢性モデル

① 実験 1

ペントバルビツール麻酔下 (50mg/kg) に、ラットの頭部を定位固定装置で固定後、頭蓋骨をドリルで穴を開け、6-OHDA (10 μg) をHamilton シリンジでラット脳内の右側線条体へ局注した。3日後、実験対象としたラットの中で半分のラットにLPSを腹腔内投与し、残りの半分には投与しなかった。4日後、ドーパミントランスポーターPET製剤である ^{11}C - β CFT27.5 ~ 42.8 MBq 静注後1時間撮像し、引き続き新規PBR/TSP0 PET製剤である ^{18}F -FEPPA 22.4 ~ 58.8 MBq 静注後1時間撮像した。PETは動物用PET (浜松フォトニクス社製、SHR-2000、空間分解能 3.5mm FWHM) で撮

像した。撮像終了後脳を摘出し、活性化ミクログリア(ED-1)とドーパミン神経線維(チロシン水酸化酵素)の免疫染色を行い、RT-PCR法により炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β)の遺伝子解析を行った。また、線条体内のドーパミン系濃度(ドーパミン、DOPAC)を測定した。これらの各パラメーターの測定結果から線条体の傷害側/非傷害側比を求め、LPS非投与群とLPS投与群で比較検討した。

②実験2

研究成果に述べるように実験1でドーパミン神経の傷害が不十分であったのはラットに投与した試薬(6-OHDA)のロットが不良であったことが判明したため、新しい試薬、同一プロトコールで追加実験した。

(2)急性モデル

研究成果に述べるように、慢性モデルではLPS投与あり、無しとの2群間でPETの結果に有意差を認めなかったため、繰り返しの測定が可能なPETの利点を生かし、同一ラットで比較する以下のプロトコールで実験を計画した。また、最近長寿研に導入された比較的解像力の良い最新の小動物用PET/CT装置(GAMMA MEDICA-IDES, FX3200、空間分解能1mm FWHM)

で測定することにより、脳内の傷害部位とPETの集積部位の関係をより詳細に評価した。

一側ラット線条体6-OHDA注入モデルを同様に作成3日後、¹⁸F-FEPPAをPET/CTで撮像、その後LPSあるいは生理食塩水を腹腔内注射した。4時間後、再度¹⁸F-FEPPAで撮像し、集積率の変化を求めた。撮像終了後、IBA-1染色によるミクログリアの免疫染色、炎症性サイトカインの遺伝子解析し、LPS投与後急性期の効果とミクログリアの活性化、毒性転換とPBR/TSPO PETの集積との関係を検証した。

4. 研究成果

(1)慢性モデル

①実験1

LPS非投与群、投与群ともに傷害側線条体に¹¹C- β CFT PETで集積低下を認めた。しかし両群間に有意差を認めなかった(0.85 \pm 0.00 vs. 0.87 \pm 0.01, P=0.73)。また、LPS非投与群、投与群ともに¹⁸F-FEPPA PETで傷害側線条体に集積増加を認めたが、両群に有意差を認めなかった(1.02 \pm 0.01 vs. 1.07 \pm 0.01, P=0.52)。

LPS非投与群、投与群ともに傷害側線条体にドーパミン神経線維(チロシン水酸化酵素染色)の障害を認めたが軽度であった。また両群に有意差を認めなかった(0.78 \pm 0.04 vs. 0.91 \pm 0.08, P=0.42)。

LPS非投与群、投与群ともに活性化ミクログリアの染色はわずかであった。また両群に有意差を認めなかった(2.25 \pm 1.22 vs. 1.45

\pm 0.22, P=0.17)。

LPS非投与群、投与群ともに炎症性サイトカインの発現を認めなかった。また両群に有意差を認めなかった(TNF α : 1.14 \pm 0.23 vs. 0.86 \pm 0.13, P=0.34, IL-1 β : 0.94 \pm 0.24 vs. 1.11 \pm 0.07, P=0.52)。

LPS非投与群、投与群ともに傷害側線条体に¹¹C- β CFT PETでドーパミン系濃度の低下を認めた。しかし両群に有意差を認めなかった(ドーパミン: 0.15 \pm 0.05 vs. 0.49 \pm 0.08, P=0.11, DOPAC: 0.27 \pm 0.09 vs. 0.67 \pm 0.21, P=0.20)。

実験1では6-OHDAによるドーパミン神経の機能的な障害をきたしているが傷害の程度は軽度であったために、脳内でミクログリアの活性化が生じず、神経障害性(毒性転換)、LPSによる増強効果は生じなかったと考えられた。ミクログリアの活性化と神経障害性(毒性転換)を認めていない場合はPBR/TSPOの発現は軽度であることが明らかになった。

②実験2

LPS非投与群、投与群ともに傷害側線条体に¹¹C- β CFT PETで集積低下を認めた。しかし両群間に有意差を認めなかった(0.82 \pm 0.08 vs. 0.88 \pm 0.19, P=0.40)。また、LPS非投与群、投与群ともに¹⁸F-FEPPA PETで傷害側線条体に集積増加を認めたが、両群に有意差を認めなかった(1.22 \pm 0.11 vs. 1.08 \pm 0.2, P=0.13)。ドーパミン神経線維(チロシン水酸化酵素染色)はLPS非投与群、投与群ともに傷害側線条体に低下を認めたが、両群に有意差を認めなかった(0.33 \pm 0.13 vs. 0.30 \pm 0.10, P=0.65)。

活性化ミクログリア(ED-1染色)はLPS投与群の方に発現が強い傾向を認めたが、両群に有意差を認めなかった。これらの結果から、実験2では6-OHDAは有効に作用し、ドーパミン神経の障害と脳内でミクログリアの活性化生じていると考えられた。しかし、LPS非投与群、投与群ともに炎症性サイトカインの発現を認めたが、有意差を認めなかった(TNF α : 5.27 \pm 8.0 vs. 2.39 \pm 1.85, P=0.34, IL-1 β : 13.5 \pm 27.0 vs. 5.67 \pm 5.25, P=0.51)。

実験1と2の検討では、LPS非投与群と投与群について、別々のラットで比較した。ラット脳傷害モデルを同様に作成しても傷害の程度に個体差があり、実験2では各々のラットではLPSによるミクログリアの活性化、毒性転換の増幅効果を認めたが、2群間の比較ではLPSによるミクログリアの活性化/毒性転換の増幅によるPBR/TSPO PET、サイトカインの変化を有意な差として検出できないと考えられた。そのため、繰り返しの測定が可能なPETの利点を生かし、同一のモデルラットのLPS投与による測定値の変化を2回の測定で比較する以下の急性モデルの実験を

行う発想にいたった。

(2)急性モデル

腹腔内投与前の線条体の¹⁸F-FEPPA PETの集積比はLPS投与群と生食投与群伴に傷害側線条体に集積増加を認めたが、有意差を認めなかった(1.16 ± 0.14 vs. 1.13 ± 0.10, P=0.61)。4時間後、2回目の撮像では、LPS投与群の方が有意に高かった(1.29 ± 0.24 vs. 1.11 ± 0.14, P=0.037)。また、投与前後の集積率もLPS投与群の方が有意に高かった(11.5 ± 10.9% vs. -1.5 ± 12.6%, P=0.02)。

IBA-1染色ではLPS投与群と生食投与群の両方に、傷害側線条体に活性化ミクログリアの発現を認めた。傷害側線条体における炎症性サイトカインの発現は、LPS投与群は生食投与群よりも高かった(TNF α : 8.3倍、IL-1 β : 10倍)。

LPS投与群で炎症性サイトカインの発現量が大きいラットでは、IBA-1染色で細胞サイズの大きいミクログリアの数が多傾向があった。核の周りの細胞体が大きいアメーバ状のミクログリアが多いことから、LPS投与により我々がこれまでに提唱してきたミクログリアの毒性転換とPBR/TSPOの発現の関連性を示唆する所見と考えられた。

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3件)

1. Denora N, Laquintana V, Trapani A, Suzuki H, Sawada M, Trapani G. New fluorescent probes targeting the mitochondrial-located translocator protein 18 kDa(TSPO) as activated microglia imaging agents. *Pharm Res* 28, 2820-2832, 2011, 査読有り
2. Ito F, Toyama H, Kudo G, Suzuki H, Hatano K, Ichise M, Katada K, Ito K, Sawada M. Two activated stage of microglia and PET imaging of peripheral benzodiazepine receptors with [¹¹C]PK11195 in rats. *Ann Nucl Med* 24, 163-169, 2010, 査読有り
3. 外山 宏, 籀野健太郎, 鈴木弘美, 工藤元, 野村昌彦, 山田貴史, 木村裕一, 市瀬正則, 澤田 誠 小動物における定量的画像解析. *脳循環代謝* 21:50-57, 2010, 査読無し

[学会発表] (計19件)

1. 野村昌彦, 外山 宏, 太田誠一郎, 片田和広, 籀野健太郎, 山田貴史, 伊藤健吾 末梢性ベンゾジアゼピン受容体/輸送蛋白(18kDa) PETによる脳内活性化ミクログリアの評価—毒性転換との関係— 第51回日本核医学会総会 2011年10月

29日、筑波

2. 野村昌彦, 外山 宏, 太田誠一郎, 片田和広, 籀野健太郎, 山田貴史, 伊藤健吾, 鈴木弘美, 澤田 誠 末梢性ベンゾジアゼピン受容体/輸送蛋白(18kDa) PETによる脳内活性化ミクログリアの評価—ラットLPS腹腔内投与と毒性転換との関係— 第73回日本核医学会中部地方会 2011年6月25日、富山
3. Toyama H. Neuro-Nuclear Medicine with SPECT & PET -epilepsy, dementia, Parkinsonism-. Training course of PET/CT in Cho Ray Hospital. February 23, 2011, Ho Chi Minh, Vietnam.
4. 外山 宏 脳核医学—ヒトからマウスまで—(JNNM教育講演)第50回日本核医学会総会 2010年11月11日、埼玉
5. 野村昌彦, 外山 宏, 工藤元, 片田和広, 籀野健太郎, 山田貴史, 加藤隆司, 伊藤健吾 ラット脳6-OHDAモデルと動物PETによるドーパミン機能障害とミクログリア活性化の検討第50回日本核医学会総会 2010年11月11-13日、埼玉
6. Toyama H. Neuro-Nuclear medicine with SPECT and PET -Part 1-. MEXT workshop, October 13, 2010, Ho Chi Minh, Vietnam.
7. Toyama H. Neuro-Nuclear medicine with SPECT and PET -Part 2-. MEXT workshop, October 14, 2010, Ho Chi Minh, Vietnam.
8. Toyama H, Kudo G, Hatano K, Suzuki H, Yamada T, Nomura M, Ichise M, Wilson AA, Sawada M, Ito K. Detection of fully activated microglia with novel translocator protein (18kDa) ligand, [¹⁸F]FEPPA PET. 2010 World Molecular Imaging Congress, September 8-11, 2010, Kyoto, Japan.
9. Hatano K, Yamada T, Toyama H, Kudo G, Nomura M, Suzuki H, Ichise M, Wilson AA, Sawada M, Kato T, Ito K. Correlation of FEPPA uptake and microglia activation in 6-OHDA injured rat brain. Eighth International Mapping of the Living Brain (NRM2010), July 22-24, 2010, Glasgow, UK.
10. 外山 宏 脳の悪い細胞をPETで検出する—動物PETと組織的評価—(特別講演) 第23回海の中道RIカンファレンス 2010年7月10日、福岡
11. 外山 宏 インビボ・イメージングのための小動物ハンドリング—マウス・ラットの静脈注射、動脈内血管カテーテル挿入を含めて—(基調講演第4回小動物インビボイメージング研究会 2010年7月2日、大府
12. 野村昌彦, 外山 宏, 工藤元, 片田和

広、籀野健太郎、山田貴史、加藤隆司、伊藤健吾、鈴木弘美、澤田 誠 ラット 6-OHDA モデルにおける末梢性ベンゾジアゼピン受容体/輸送蛋白(18kDa)とドーパミントランスポーターPET -ドーパミン機能障害とミクログリア活性化の検討- 第 71 回日本核医学会中部地方会 2010 年 6 月 19 日、金沢

13. 外山 宏 小動物のインビボ分子イメージング (ランチョンセミナー、第 10 回日本核医学会春季大会、2010 年 5 月 9 日、東京)
14. 外山 宏 小動物における定量的画像解析. (シンポジウム II : 小動物分子イメージング研究の最前線) 第 21 回日本脳循環代謝学会総会 2009 年 11 月 20 日、大阪
15. 外山 宏、籀野健太郎、工藤 元、山田貴史、野村昌彦、木澤 剛、伊藤文隆、片田和広、伊藤健吾 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 (^{11}C -PBR28, ^{18}F -FEPPA) の比較、検討 第 49 回日本核医学会総会 2009 年 10 月 1 日、旭川
16. 籀野健太郎、外山 宏、工藤 元、山田貴史、伊藤健吾 PBR リガンドフッ素-18 FEPPA の実践的調製法 第 49 回日本核医学会総会 2009 年 10 月 1 日、旭川
17. Toyama H, Hatano K, Suzuki H, Kudo G, Ichise M, Wilson AA, Yamada T, Katada K, Sawada M, Ito K. Comparison of [^{18}F]FEPPA and [^{11}C]PBR28, novel peripheral benzodiazepine receptor ligands for PET, in a rat model of neuroinflammation. 56th Annual Meeting Society of Nuclear Medicine, June 13-17, 2009, Toronto, Canada
18. Hatano K, Toyama H, Yamada T, Kudo G, Suzuki H, Ichise M, Wilson AA, Sawada M, Ito K. Practical preparation of [^{18}F]FEPPA using protic solvent system. 18th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, July 12-17, 2009, Edmonton, Canada
19. 外山 宏 脳核医学の基礎と臨床: 基礎編 (教育講演) 第 68 回日本医学放射線学会総会 2009 年 4 月 17 日、横浜

[図書] (計 1 件)

1. 外山 宏、籀野健太郎、鈴木弘美、佐治英郎 編集、【創薬研究への分子イメージング応用】PET・PECT 分子イメージングと医薬品開発 画像バイオマーカーとしての分子イメージングの利用. 治療効果評価への分子

イメージングの利用: 小動物 PET によるラットパーキンソン病モデルの神経傷害性と治療効果判定 (解説/特集).

遺伝子医学 MOOK 18 号、メディカルドゥ、大阪 2010、pp. 195-200

[産業財産権]

○出願状況 無し

○取得状況 無し

[その他]

ホームページ

藤田保健衛生大学医学部

http://www.fujita-hu.ac.jp/honbu/open_info/result_2010/

国立長寿医療研究センター、認知症先進医療開発センター、脳機能画像診断開発部

<http://www.ncgg.go.jp/camd/lab02.html>

名古屋大学環境医学研究所脳機能分野 (脳生命科学)

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1710/1720/nouseimeigaku.html>

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

籀野 健太郎 (HATANO KENTARO)

国立長寿医療研究センター・脳機能画像診断開発部・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

工藤 元 (KUDO GEN)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号: 20440466

山田貴史 (YAMADA TAKASHI)

国立長寿医療研究センター・脳機能画像診断開発部・流動研究員

研究者番号: 50531860

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

野村昌彦 (NOMURA MASAHIKO)

藤田保健衛生大学・医学部・大学院生

太田誠一郎 (OTA SEIICHIRO)

藤田保健衛生大学・医学部・大学院生
鈴木 弘美(SUZUKI HIROMI)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
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