

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791356

研究課題名(和文) 高感度PETイメージングによる中枢神経疾患と脳血液関門機能の関連性の解明

研究課題名(英文) PET imaging for blood-brain barrier

研究代表者

岡田 真希 (OKADA, Maki)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：00415407

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)：血液脳関門(BBB)の破綻を¹¹C-アミノイソ酪酸(¹¹C-AIB)を用いて、PETイメージングを行った。その結果、BBB破綻側は対照側に比べて¹¹C-AIBは顕著に集積し、その集積はエバンスブルーによって染色されたBBB破綻領域とほぼ一致していた。またその集積の程度はBBB破綻やその回復の程度に依存していた。Gd造影MRIと動態を比較したところ、集積機序の違いを反映する結果が得られた。これらの結果から、BBB破綻イメージングに¹¹C-AIB PETが有用であると示唆されたが、¹¹C-AIBとGd-DTPA MRIの動態には違いがあることを理解する必要があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We visualized the blood-brain barrier (BBB) opening by ¹¹C-2-aminoisobutyric acid (¹¹C-AIB) PET. ¹¹C-AIB significantly and gradually accumulated the BBB-opening side compared with contralateral side. Moreover, the ¹¹C-AIB accumulated area was co-localized with the area stained by Evans blue, the marker of BBB breakdown. The kinetic of ¹¹C-AIB in brain was different from that of Gd-DTPA-enhanced MRI. These results suggest that ¹¹C-AIB PET is a useful method for visualizing BBB opening. However, the accumulating mechanism of ¹¹C-AIB PET is different from that of Gd-DTPA-enhanced MRI.

研究分野：核医学

キーワード：PET 血液脳関門 アミノイソ酪酸

1. 研究開始当初の背景

血液脳関門 (BBB) は、血液から脳への物質供給を制限することによって中枢神経内の環境を保護している重要な構造であり、その異常はパーキンソン病やてんかん、多発性硬化症などの中枢神経疾患において報告されている。一方、脳内への効率的な薬物輸送を目的として意図的に BBB を一時的に開放させる手法が検討されているが、その効果を生きたままの状態を高感度・非侵襲的に確認する方法はない。PET は高感度かつ定量性に優れた非侵襲的な画像測定技術であり、PET による BBB の状態の確認が可能になれば、中枢神経疾患あるいは薬物輸送の研究に大きく貢献するに違いない。人工アミノ酸である 2-アミノイソ酪酸 (AIB) は、BBB (血管内皮細胞) の血管側には存在しないシステム S 輸送体の基質であり、BBB が正常であればほとんど脳へ移行しないが、一度脳へ移行すると脳側にあるシステム A 輸送体で血管内皮細胞内へ速やかに取り込まれることが知られている。そのため AIB は BBB の機能評価に適したプローブになりうると考えられ、本課題では ^{11}C -AIB の BBB 機能イメージング PET プローブとしての有用性を評価することとした。

2. 研究の目的

本課題は BBB の機能の非侵襲的な評価法の構築と、その評価法に基づく BBB と中枢神経疾患との関連性の解明、および薬物輸送に対する BBB の調節効果の評価等の応用研究を目的とした。BBB の評価には PET を利用し、BBB 機能イメージング PET プローブとして有望な ^{11}C -AIB の評価、およびその他の新規 BBB イメージングプローブの開発を試みた。

3. 研究の方法

すべての動物実験は独立行政法人放射線医学総合研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

またすべての実験において 7-9 週齢の雄性 SD ラットを用い、BBB 破綻・開放操作および PET、MRI 撮影はイソフルラン麻酔下で行った。

(1) BBB 破綻・開放モデルラットを用いて ^{11}C -AIB の PET 撮像 (60 分間のダイナミック撮像) を行い、 ^{11}C -AIB の BBB イメージング PET プローブとしての有用性を評価した。エバンスブルー (EB:30mg/mL, 1.5mL) を尾静脈投与し、灌流脱血後、作成した脳切片から EB の蛍光検出画像を取得し、 ^{11}C -AIB の集積と EB の染色の位置の違いを比較した。その後ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行った。

片側線条体にリポポリサッカリド (LPS:50 μg 、対照側は PBS) を直接微量注入 BBB 破綻モデルラットを作製した。約 24 時

間後に ^{11}C -AIB PET (60 分間のダイナミック撮像) を行い、PET 撮像終了後に EB を投与し評価を行った。

マンニトール (20%, 2mL, 30 秒) の右頸動脈投与し BBB 開放モデルを作製した。マンニトール投与 1 分後に ^{11}C -AIB PET を行った。EB はマンニトール投与 5 分前に投与した。

(2) PET 画像よりも空間分解能・検出感度に優れたオートラジオグラフィ (ARG) 法によって、 ^{11}C -AIB の集積と EB の染色位置の比較を行った。(1) と同様に LPS 投与約 24 時間後に ^{11}C -AIB 投与した。20 分後に深麻酔下にて灌流脱血し、脳切片を作成した。EB は ^{11}C -AIB 投与 2 分前に投与した。イメージングプレートに得られた脳切片をコンタクトし、オートラジオグラムを得た後、EB の蛍光検出画像を取得し、同一脳切片における ^{11}C -AIB の集積と EB の染色の位置の違いを比較した。

(3) ^{11}C -AIB の in vivo での安定性を確認するとともに、動脈血中の ^{11}C -AIB 動態を測定した。 ^{11}C -AIB 投与後大腿動脈に挿入したカニューレから継時的 (~60 分) に得られた動脈血サンプルおよび脳ホモジナイズサンプルをオートガンマカウンタで放射能を測定した。また、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で分析し、 ^{11}C -AIB の安定性を測定した。

血中データおよび(1) で得られた PET データを用いて Patlak Plot 法から BBB 破綻 (LPS) 側および対照側における脳への取り込み定数 K_i を求めた。

(4) AIB の類似体である N-メチル AIB (MeAIB) を ^{11}C 標識合成 (^{11}C -MeAIB) し、新たな BBB 機能イメージング PET プローブとして、 ^{11}C -AIB と比較検討した。(1) と同様の LPS による BBB 破綻モデルを用い、LPS 投与約 24 時間後に ^{11}C -AIB PET を、その 4 時間後に同一個体を用いて ^{11}C -MeAIB PET を行った。また(3)と同様に継時的に動脈血中の ^{11}C -MeAIB の動態測定および K_i の算出を行った。

(5) 収束超音波 - マイクロバブル (FUS-MB) によって BBB 開放モデルを作製し、 ^{11}C -AIB PET 撮像 (60 分間のダイナミック撮像) を行った。MB を尾静脈投与し 15 秒後に FUS を照射 (1MHz、間欠発振モード、1 分間) した。EB は MB 投与約 5 分前に投与した。

FUS-MB 処置 (FUS:0.49MPa) 5 分、1, 2, 5, 24 時間後に ^{11}C -AIB PET を行った。また FUS-MB 処置 (FUS:0.33MPa) 5 分後に ^{11}C -AIB PET を行い 0.49MPa 照射時と比較した。PET 終了後、灌流脱血し脳切片を作成した。脳切片から EB の蛍光検出画像を得、その後 HE 染色を行った。

FUS-MB 処置 1 時間後に Gd-DTPA 造影剤 (0.5mmol/kg) を尾静脈投与し、MRI 撮影 (FLASH 法による 30 分間のダイナミック撮

影:DCE-MRI)を行いその動態を¹¹C-AIB PETと比較した。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞の密着結合に作用すると言われるLPSによるBBB局所破綻モデルラットを用いた¹¹C-AIB PETを行った結果、対照側と比べて、BBB破綻(LPS)側で¹¹C-AIBの有意な集積が認められた。BBB破綻(LPS)側における¹¹C-AIBの集積は、時間経過とともに徐々に増加していった。破綻領域がごく小さいにもかかわらず、¹¹C-AIB PETで高感度に測定することが可能であった。また¹¹C-AIBの集積はEBの染色領域とほぼ一致していた。HE染色の結果から¹¹C-AIBの集積は炎症には無関係であることも認められた。これらの結果から、¹¹C-AIBの集積はBBBの破綻に由来するものと示唆された。

マンニトールを用いたBBB開放モデルラットではBBB開放側に¹¹C-AIBの集積が認められた個体と認められない個体が存在した。¹¹C-AIBの集積が認められない個体ではEBの染色の程度も低かったため、マンニトールによる安定したBBB開放が得られていなかったことが原因であると想定された。¹¹C-AIBの集積が認められた個体では(1)のような時間と共に集積が増加する傾向は認められず初期の高値が持続していた。

(2) ¹¹C-AIBのPET画像とEBの蛍光画像は完全に一致していないため、同一脳切片における¹¹C-AIBの集積とEBの染色位置を比較した。その結果、それらの集積・染色位置はほぼ一致していた。また、BBB破綻(LPS)側の同位置における¹¹C-AIBの集積量の相対値とEBの蛍光量の相対値には、正の相関があった。

(3) ¹¹C-AIB投与後の動脈血および脳ホモジナイズサンプルをHPLCで継時的(～60分)に分析した結果、血中、脳内の¹¹Cはすべて未変化体(¹¹C-AIB)として検出され、他の化学形の物質(代謝物)は検出されなかった。このことから¹¹C-AIBは長時間にわたり体内で安定であることが証明された。また動脈血単位質量あたり(/cc)の放射能(¹¹C-AIB)は投与20分後には投与した放射能量の0.5%程度にまで素早く消失するが、その後は長時間(～60分)にわたりその濃度が維持されていた。

動脈血中の動態と(1)から得られたPETの結果をもとにPatlak Plot法によって脳へのKiを求めたところ、BBB破綻(LPS)側のKiは対照側のKiの約3倍と有意に大きかった。この結果からも¹¹C-AIBの取り込みはBBB破綻(LPS)側において顕著に増加していることが確認された。

(4) AIBはシステムS輸送体だけでなくBBB(血管内皮細胞)の血管側にも存在するシス

テムL輸送体の基質でもあるため、BBBが正常の場合でもシステムL輸送によって脳へ取り込まれている可能性もある。一方、AIBの類似体であるMeAIBはシステムA輸送体だけの基質であり、¹¹C-MeAIBを新たなBBB機能イメージングPETプローブとして評価し、¹¹C-AIBと比較検討した。その結果、¹¹C-AIBと同様に¹¹C-MeAIBも対照側に比べてBBB破綻(LPS)領域に優位に集積した。またBBB破綻(LPS)領域における両PETプローブの集積量、対照領域との集積比、および血中動態はほぼ同等であり、Kiにも違いは見られなかった。これらの結果から¹¹C-MeAIBのBBB機能イメージングPETプローブとしての有用性も確認されたと同時に、¹¹C-AIBの脳への取り込みにはシステムL輸送体による影響はほとんどなく、その集積はBBBの機能(破綻)状態を反映していると示された。

(5) FUS-MBによるBBB開放術は脳への効果的な薬物輸送を目的として研究されている手法である。FUS-MBによるBBB開放モデルを用いてPETを行った結果、FUS-MB処置側は対照側に比べて¹¹C-AIBは顕著に集積し、その集積はEBで染色される領域とほぼ一致していた。FUS-MB処置によって、部分的に脳表面(FUS入射側)に微小な出血や神経変性が見られた個体があったが、他の大きな変化は見られなかった。

FUS-MB処置後の経過時間(5分、1,2,5,24時間)による¹¹C-AIBの変化をPETで測定した結果、処置直後(5min)が最も¹¹C-AIBの集積が高く、処置後の時間が経つにつれ集積が低くなっていった。FUS-MB処置24時間後ではわずかな¹¹C-AIBの集積が認められた程度であった。FUS-MBによるBBBの開放は可逆的であると言われており、この結果は時間経過によってBBB開放が回復している様子を探らえていると考えられた。照射するFUSの音圧(0.33、0.49MPa)を変化させて¹¹C-AIB PETを行った結果、0.33MPaよりも0.49MPa照射時で¹¹C-AIBの集積が顕著であり、¹¹C-AIBの集積はBBBの開放の程度(音圧)に依存していると示唆された。これらの結果から、FUS-MBによるBBB開放の程度や回復状況を¹¹C-AIB PETでイメージングすることが可能であり、BBB開放操作の条件検討に¹¹C-AIB PETが有用であると示唆された。

¹¹C-AIB PETの有用性をBBBの機能イメージング法として一般的に利用されているGd-DTPA造影MRIと比較した。¹¹C-AIB PETと比較するために、FUS-MBによるBBB開放モデルにおいて、Gd-DTPA造影剤を用いたDCE-MRIを行った。その結果、FUS-MB処置側で高信号が認められた。¹¹C-AIB PETの集積は投与後の時間が経つにつれ増加したが、Gd-DTPA造影MRIの信号強度は投与約10分後にピークに達し、その後徐々に減少した。この動態の違いはGd-DTPAは細胞外液

にのみ分布し、細胞内には取り込まれないが、 ^{11}C -AIB は細胞内に取り込まれるという両者のイメージングプローブとしての性質の違いによるものと考えられた。MRI 造影剤の濃度とシグナル強度に単純な比例関係はないため、その絶対濃度を算出するのは困難であるが、PET は定量性が良いため、単純に絶対濃度を測定することが可能であり、定量性の面では PET の方が優位であると想定された。一方、空間分解能の面では MRI の方が優位であることも考慮する必要があるため、総合的に各々の性質理解し、イメージングを行う必要性があると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 5 件)

Maki Okada, Atsushi Tsuji, Tatsuya Kikuchi, Hidekatsu Wakizaka, Toshimitsu Okamura, Ming-Rong Zhang, Koichi Kato. In Vivo Imaging of Blood-brain Barrier Permeability with 2-Amino-[^{11}C]isobutyric Acid by Positron Emission Tomography. : 2012 World Molecular Imaging Congress. 2012 年 9 月 6 日, ダブリン・アイルランド

岡田 真希, 辻 厚至, 菊池 達矢, 脇坂 秀克, 岡村 敏充, 張 明栄, 加藤 孝一. 2-Amino-[^{11}C]isobutyric acid による血液脳関門の高感度 PET イメージング: 第 52 回日本核医学会学術総会, 2012 年 10 月 12 日, ロイトン札幌・ニトリ文化ホール(北海道札幌市)

岡田 真希, 辻 厚至, 菊池 達矢, 脇坂 秀克, 岡村 敏充, 加藤 孝一, 張 明栄. [^{11}C]AIB および [^{11}C]MeAIB による血液脳関門の高感度 PET イメージング: 第 53 回日本核医学会学術総会, 2013 年 11 月 9 日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Maki Okada, Atsushi Tsuji, Tatsuya Kikuchi, Hidekatsu Wakizaka, Toshimitsu Okamura, Koichi Kato, Ming-Rong Zhang. PET imaging with 2-amino-[^{11}C]isobutyric acid for the assessment of blood-brain barrier opening induced by focused ultrasound in the rat.: the 11th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology, World Federation of Nuclear Medicine and Biology, 2014 年 8 月 28 日, カンクン・メキシコ

岡田 真希, 辻 厚至, 菊池 達矢, 脇坂 秀克, 岡村 敏充, 加藤 孝一, 張 明栄. 2-Amino-[^{11}C]isobutyric acid PET を用いた収束超音波-マイクロバブルによる血液脳関門開放の評価: 第 54 回日本核医学会学術総会, 日本核医学会, 2014 年 11 月 6 日, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡田 真希 (OKADA, Maki)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員