

研究テーマ

SV2A-PET を用いた頭部外傷後の機能シナプスイメージング
の有用性の検討

研究代表者

施設名 : 大阪大学医学部附属病院
高度救命救急センター

氏 名 : 細見 早苗

研究テーマ：SV2A-PETを用いた頭部外傷後の機能シナプスイメージングの有用性の検討

所属先：大阪大学医学部附属病院高度救命救急センター

氏名：細見 早苗

① 目的と方法

目的

交通事故に起因する外傷において頭部外傷の占める割合は大きく、なかでも頭部外傷後の後遺症は、患者の社会復帰を妨げる。その社会的損失は甚大であるにも関わらず、未だその発症や重症度を予測できる画像診断方法は充分でない。最近、我々は、頭部外傷後の後遺症の発症の病態に、神経シナプス障害に関わる可能性を見出した。そこで、本病態の新たな画像検査として、機能シナプスを可視化し、その密度の測定が可能となるシナプス小胞タンパク質(Synaptic vesicle glycoprotein 2A: SV2A) - ポジトロン断層法(PET)に着目した(1)。

本研究の目的は、「SV2A-PETによるシナプスの機能評価が、頭部外傷後の後遺症の予測診断や治療効果判断に有用であること」を検証することにある。本研究では、まず我々が過去に損傷部位（大脳皮質）の炎症が収束した後でも脳の遠隔部位（損傷同側の視床）で炎症が持続していることを確認しているControlled cortical impact (CCI)モデルを用いて前臨床研究を行った (2)。

方法

動物

本試験ではC57BL/6J マウス（6週齢）を株式会社日本エスエルシー（日本、静岡県）から購入した。全てのマウスは標準的なケージに入れられ、22～25℃で管理し12 時間の明暗サイクルで飼育され、餌と水は自由に摂取することができた。この動物実験は、大阪大学医学部附属動物実験施設のガイドラインに従って行われ、施設内倫理委員会の承認を得て実施した。

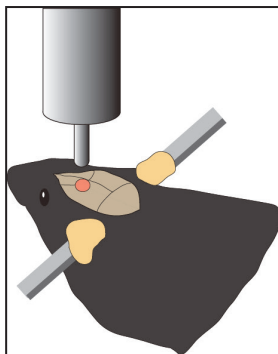
Controlled cortical impact (CCI)

まず、0.3mg/kg塩酸メドミジン (Domitol; 明治製菓ファーマ株式会社、東京、日本)、4mg/kgミダゾラム (Dormicum; アステラス製薬株式会社、東京、日本)、5mg/kgブトルファノール (Vetorphale; 明治製菓ファーマ株式会社) で麻酔した後、マウスを脳定位固定装置 (NARISHIGEグループ、東京、日本) で安定させた。剪刀を用いて頭部の皮膚を切開した。ドリルを用いて左側に4mmの円形開頭術を行った。開頭して硬膜を露出し、空気圧衝撃装置 (Amscien Instruments, Richmond, VA, USA) のインパクターの先端 (直径3mm) を開口した表面の中心に当てた(図1)。その後、先端を1mm上下させ、4.0～4.5m/sの速度で90msの衝撃を皮質に与え脳損傷を加えた(図2)。その後、開頭した際に外した頭蓋骨を戻し、切開した皮膚を針付絹ブレード縫合糸を用いて縫合する。固定から解放し、ヒーター上でマウスを回復させ

た。Sham-ope（すなわち、皮質外傷を伴わない開頭術）を受けたマウス、wild typeマウス（麻酔も皮質損傷も開頭術も行わない）も飼育した。



(図1)



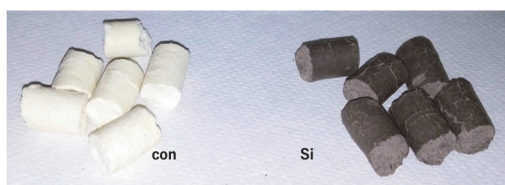
(図2)

ケイ素含有飼料

近年、外傷性脳損傷モデルにおいて水素の抗炎症作用・抗酸化力の効果について報告されている(3)。これらの研究では水素は、水素水や水素ガスといった投与経路が一般的であるが、これらの投与方法では水素濃度が安定しないといった問題点があった。一方で、大阪大学産業研究所で、アルカリ条件下で水素を大量に発生させることができる新たな抗酸化物質としてナノ粒子の形状であるケイ素が開発された(4)。このケイ素を用いてパーキンソン病など様々な神経損傷モデルにおいて効果が報告されている(5)。本研究では、対照実験用飼料には、AIN-93M（オリエンタル酵母工業株式会社、東京、日本）を用いた。ケイ素含有飼料には、AIN-93Mに2.5%のケイ素を配合した特殊飼料を用いた(写真1)。

コントロール飼料（Con: AIN93M /オリエンタル酵母工業株式会社）

シリコン製剤含有飼料（Si: シリコン製剤2.5%含有AIN93M/オリエンタル酵母工業）



(写真1)

実験プロトコル

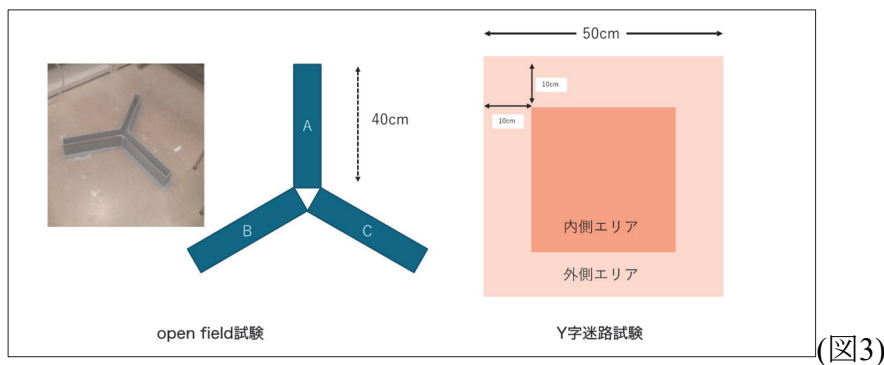
6週齢のマウスをSi群(ケイ素含有飼料投与群)とControl群(対照実験飼料投与群)の2群に分けた。6週齢から1週間それぞれの飼料を与え、CCIで脳損傷を与えた。その後、全てのマウスはゲージに戻され飼育を再開した。CCI1週間後に2群のマウスに対してSV2A-PETの撮影、行動実験、脳組織の免疫染色・q-PCR、循環血液のd-ROM/BAPテストを行った。CCI6週間後にも同様の検査を行った。

行動実験

行動実験は午前8時から午後1時の間に行った。Si群とControl群のマウスはY迷路試験とopen field試験を順次行った。

短期記憶障害の評価には、過去の報告で言及されているY字迷路試験を用いた。Y字迷路は3本の同じアームがあり、それぞれ長さ40cm、幅10cm、高さ25cmである。ラットは迷路のアームの1つ（スタートアーム）に入れられ、8分間自由に探索させた。試験中、ビデオ追跡システム（Anymaze 4.20、Stoelting、イリノイ州、米国）で動物の行動を記録した。進入したアームの数と順序をチェックした。活動性は入った腕の数と定義し、交代率は交代（3つの異なる腕に連続して入ること）の数を可能な交代の総数（すなわち、入った腕の数から2を引いた数）で割り、100を掛けたものとして計算した。

Open field試験は不安レベルと行動量を評価するために行われた。実験装置は灰色のポリ塩化ビニル製の板（50×50×50 cm）を用いた。内側領域を外側から10cm内側に設定し（30×30 cm）、それ以外を外側領域と設定した。不安レベルは同様のビデオ追跡システムを使用して5分間記録し、外側領域にいる時間を測定した。また、行動量は5分間の総移動距離を測定した(図3)。



(図3)

PET-CT撮影

SV2Aに特異的な放射線トレーサー([¹¹C]UCB-J)を合成した。マウスを2%イソフルラン麻酔下で[¹¹C]UCB-Jを尾静脈にボーラス注入した。全ての撮影は、Inveon小動物用PET/CTスキャナー（Siemens Healthineers, Erlangen, Germany）を用いて行った。CCI1週間後にSi群(n=4)とControl群(n=4)を、CCI6週間後も同様にSi群(n=4)とControl群(n=4)の撮影を行なった。解析にはMa-Benveniste-Mirroneのマウス用MRI templateの関心領域を使用した。静注から50-60分後の加算画像を手動でMRIにrigid registrationした。大脳皮質、基底核、視床、脳幹に関心領域（volume of interest (VOI)）を設定し、standardized uptake value (SVUR)を算出した。脳幹をreferenceとし、大脳皮質、基底核、視床のSVURを比較した。

免疫染色

マウスを0.1Mリン酸緩衝液（PB）中4%PFAで経心灌流し、脳を解剖して4℃で一晩後固定し、その後リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中30%スクロースに浸した。組織は最適切断温度で包埋し、ドライアイスで凍結し、-80℃で保存した。18μm厚の連続切片をクライオスタットで切り出し、シランコートした粘着スライド（松波硝子、大阪、日本）にマウントした。切片を5%ウシ血清アルブミンと0.1%トリトンX-100（PBS中）で1時間ブロッキングした後、以下の一次抗体でインキュベートした：ウサギ抗イオン化カルシウム結合アダプター分子1（Iba1）

(1:500; 019-19,741; Wako Chemicals, Richmond, VA)、ウサギ抗NeuN (1:500; ab177487) を4°Cで一晩培養した。切片をPBS中0.05% Tween 20で3回洗浄し、Alexa 488コンジュゲートおよびAlexa Fluor 568コンジュゲートヤギ抗ウサギ、-マウス、-ラット免疫グロブリンG (1:500、Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 二次抗体と20-27°Cで1時間インキュベートした。切片は4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI; 1μg/mL; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) で染色した。すべての画像は、蛍光顕微鏡 (BZ-X800L: 株式会社キーエンス、大阪、日本) を用いて取得した。観察領域を皮質と視床に設定し、1視野あたりにある細胞数をカウントした。

RNA単離と定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR)

CCIマウス、sham-opcマウスの侵襲を与えた側の皮質および視床組織を術後1週間後に採取し、TRIzol (Ambion®, Thermo-Fisher Scientific社製) でホモジナイズした。Total RNAはメーカーの仕様書に従って単離した。Multi Scribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Thermo-Fisher Scientific) を用いて相補的DNAを合成し、7500 RT-PCR System (Applied Biosystems) を用いてPower SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いてqPCRを行った。炎症性サイトカイン遺伝子のmRNAレベルは、β-アクチンの値に対して正規化した。プライマーは以下のものを用いた。

IL-6; F-5' - CTTCCATCCAGTTGCCTTCTTG-3, R-5' - AATTAAGCCTCCGACTTGTGAAG-3
IL-1β, F-5' -TACAGGCTCCGAGATGAACA-3, R-5' -AGGCCACAGGTATTTTGTGCG-3
TNF-α, F-5' -CCACCACGCTCTTCTGTCTA-3, R-5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3
Nfe2l2, F-5' -GCTTTTGGCAGAGACATTCC-3, R-5' -CCAAACTTG CTCCATGTCCT-3
Keap1, F-5' -ATGGCCACATCTACGCAGTC-3, R-5' - CCAATCCTCCGTGTCAACAT-3
Hmox1, F-5' -GCCACCAAGGAGGTACACAT-3, R-5' -CTTCCAGGGCCGTGTAGATA-3
Nqo1, F-5' -GAAGCTGCAGACCTGGTGAT-3, R-5' -GTTGTCTGATCATGGCAGCAT-3
HMO-1, F-5'-GAGGGAGCCTGAGAAACGG-3, R-5' -GTCGGGAGTGGGTAATTTGC-3

ジアクロン反応性酸素代謝物 (d-ROM) および生物学的抗酸化能 (BAP) テスト

酸化ストレスの指標は、フリーラジカルアナライザーFREE CARRIO DUO (Diacron International、イタリア・グロセツト) を用いて測定した。BAPテストでは、鉄イオンをフェリックイオンに還元するために必要な血漿サンプルの量に基づいて、抗酸化能を測定した。さらに、d-ROMテストを用いて酸化ストレスのレベルを測定した。抗酸化療法の効果を示す指標として、BAP/d-ROM率を測定した。

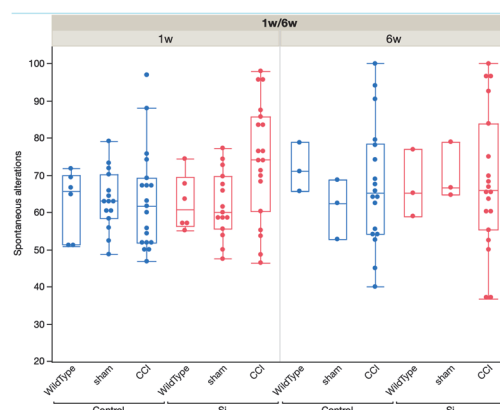
統計解析

定量的データは平均値±平均値の標準誤差で表した。実験群間の差はt検定を用いて分析した。すべての統計解析はJMP Pro 13.0 for Windows (SAS Institute Inc, NC, USA) を用いて行い、統計学的有意性は $p < .05$ と定義した。

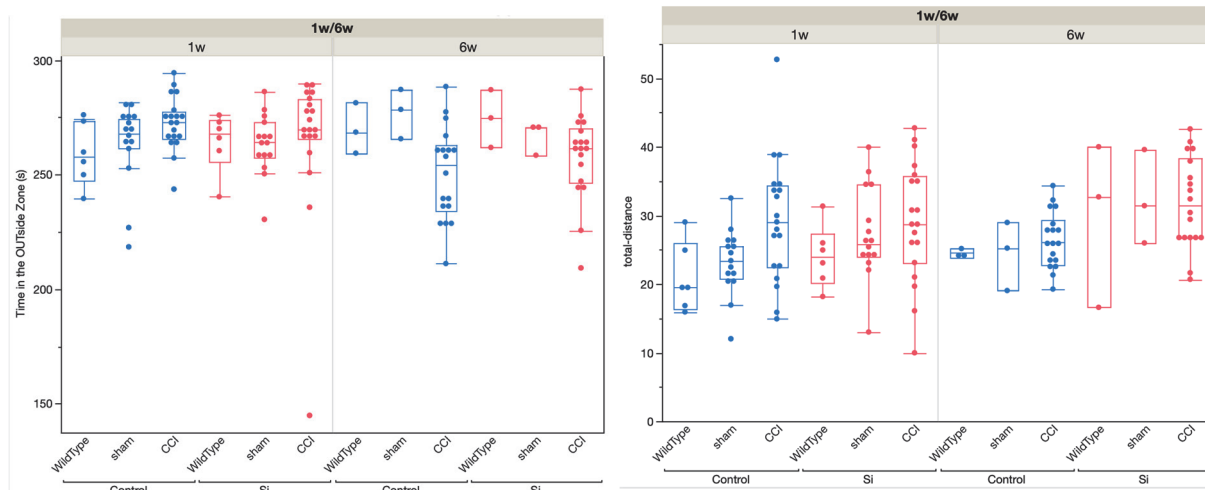
② 結果

行動実験（短期記憶・不安レベルと行動量の評価）

Y字迷路試験を行い、spontaneous alterationを算出することで、Control群とSi群の短期記憶障害を比較した。Control群とSi群では1 weekで有意差がみられたものの、6weekでは差はみられなかった (Control-1week vs. Si-1week: 61.7 vs 74.2 [P=0.03], Control-6week vs. Si-6week: 65.2 vs 65.9 [P=0.86]) (右図)。



次にopen field試験を行い、不安ストレスを外側滞在時間(time in the OUT side zone)で評価し、活動量を総移動距離(total distance)で評価した。外側滞在時間は1weekにおいてControl群とSi群で有意差はみられなかったが、6weekにおいて有意に改善していた (Control-1week vs. Si-1week: 272.8 vs 270.0 [P=0.72], Control-6week vs. Si-6week: 254.4 vs 261.8 [P=0.02]) (下図左)。一方で、総移動距離はControl群とSi群では有意差はみられなかった (Control-1week vs. Si-1week: 29.1 vs 28.8 [P=0.99], Control-6week vs. Si-6week: 26.1 vs 31.4 [P=0.21]) (下図右)。

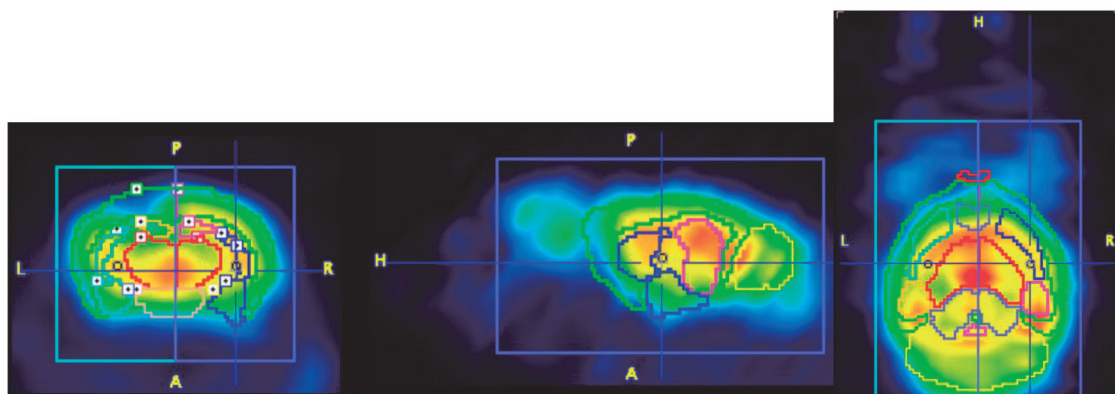


[¹¹C]UCB-Jの合成とSV2A-PET (機能するシナプス濃度の画像化)

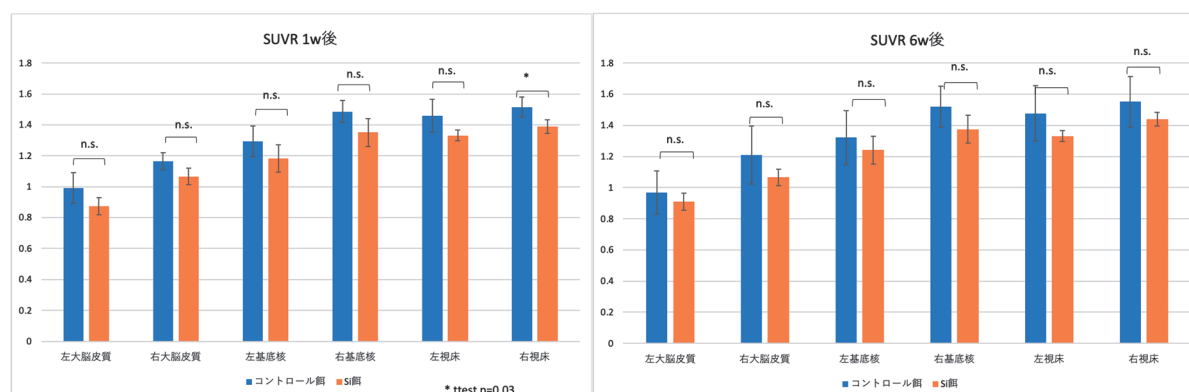
合計4回の撮影を行ない、 [¹¹C]UCB-Jの合成結果は以下に示すようであった。

	放射能 (MBq)	液量 (ml)	放射化学的純度 (%)	UCB-J担体量 (μg/mL)
平均	1033.5	1.22	99.05	5.43
誤差	1150.0	0.72	0.93	3.28

撮影後、関心領域(VOI)を設定した。設定例を以下のように示す。



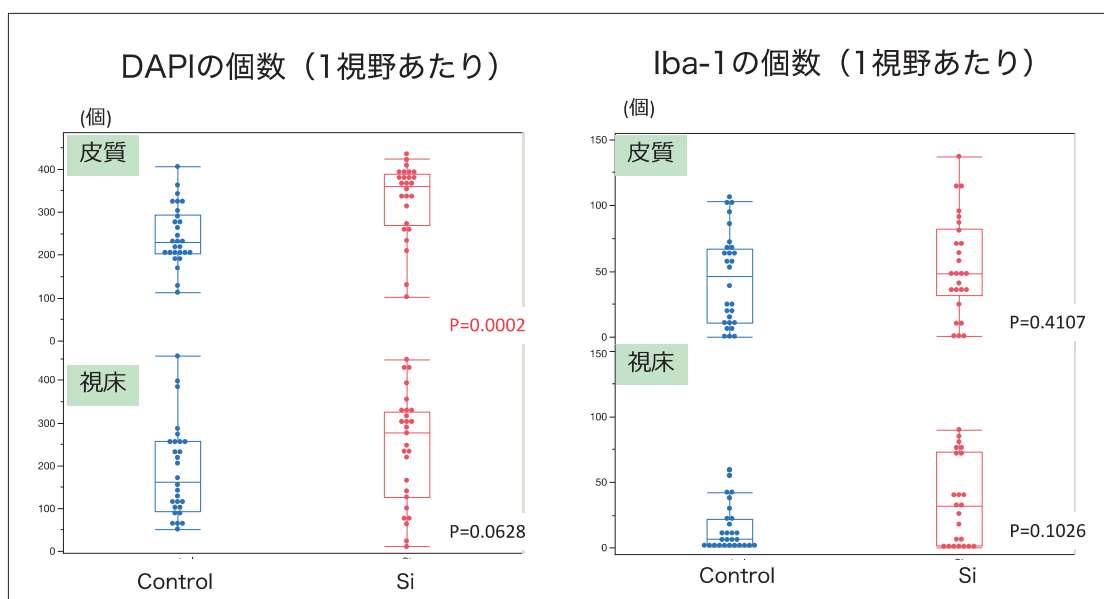
大脳皮質、基底核、視床のSUVRを測定し、Control群とSi群を比較した。左側大脳皮質に脳損傷を与えており、損傷部の集積は欠損しているのがわかる（上図左）。



CCI1週間後の損傷側対側の右視床においてSVURに有意差がみられたが、治療群のほうが低かった。そのほかの領域ではSVURに有意差はみられなかった。CCI6週間後では全ての領域においてControl群とSi群とでSUVRに有意差はみられなかった。

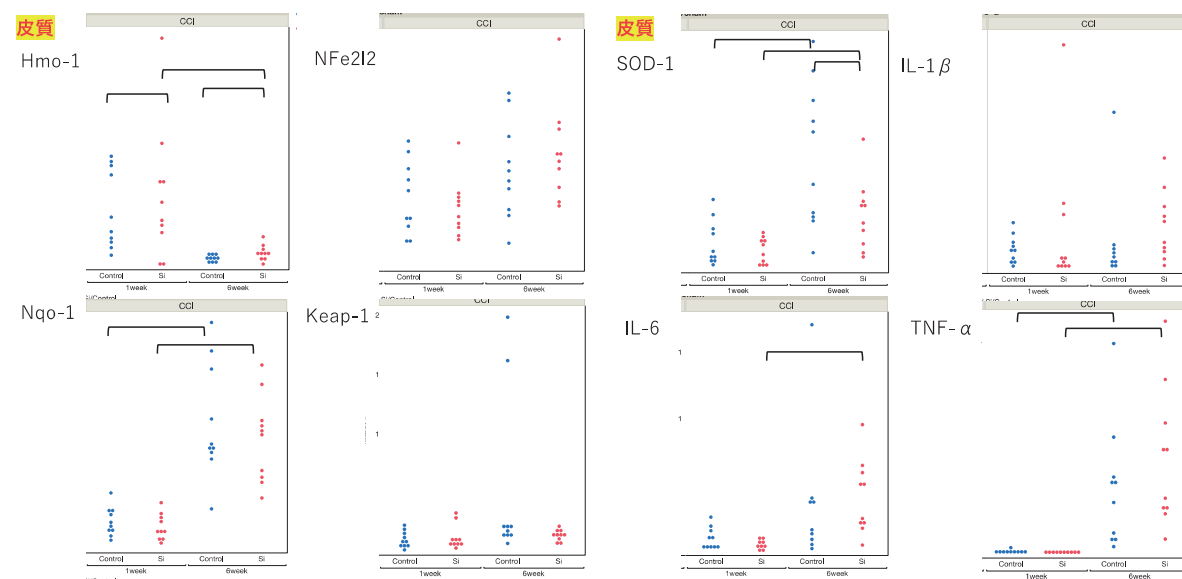
免疫染色（炎症細胞の集積・細胞数の評価）

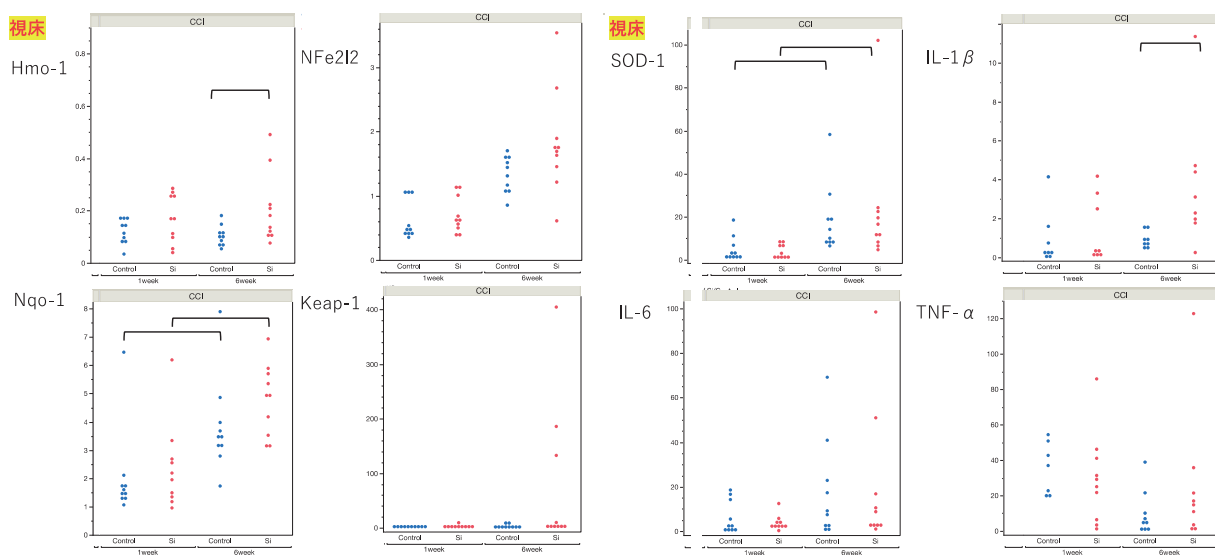
CCI1week後の損傷側皮質と視床の細胞数をControl群とSi群で比較した。DAPI染色は細胞核を標識することで細胞数を評価でき、Iba-1はミクログリア・マクrophageの集積を比較するためのものである。



Iba-1はControl群とSi群で有意差はみられず、DAPIにおいて皮質でControl群とSi群に有意差がみられた(P=0.0002)。

qRT-PCR (サイトカイン・抗酸化酵素評価)

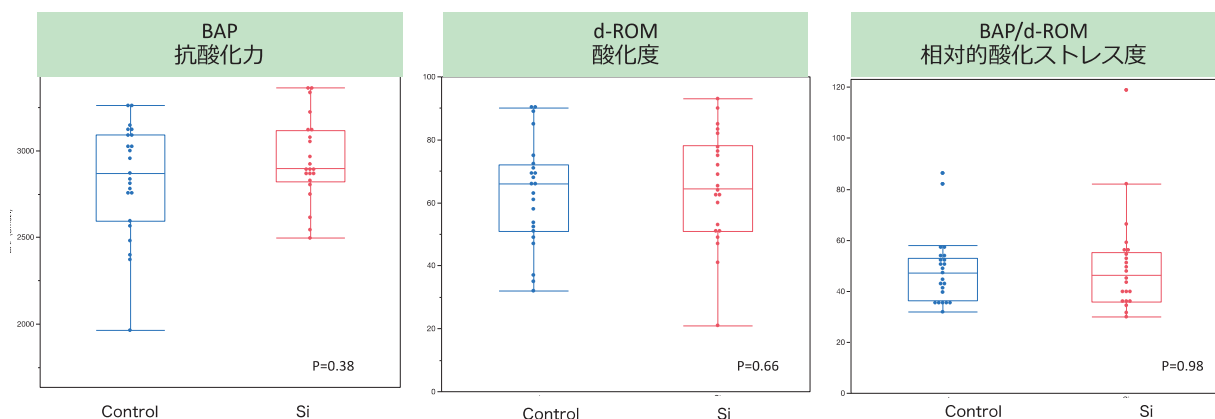




大脳皮質損傷後、損傷側の皮質・視床ともにサイトカイン、抗酸化酵素は上昇することが確認できた。またCCIを加えたSi群とControl群を比較したところ、皮質において1weekと6weekで、視床において6weekでHmo-1がSi群で多く発現していた。

d-ROM/BAPテスト（酸化ストレス度・抗酸化力測定）

CCI1weekにおいてSi群とControl群の循環器血液中の酸化ストレス度・抗酸化力測定を比較したところ、BAP, d-ROM, BAP/d-ROMすべてにおいて2群に差はみられなかった。



③ 考察

我々の外傷性脳損傷モデルにControl餌とSi餌を投与したところ、行動実験ではSi群とControl群でY字迷路試験においてCCI1週間後にspontaneous alterationに有意差があり、受傷1週間後の短期記憶障害に対して機能改善を認めた。また、open field試験で測定した外側滞在時間は受傷1週間後ではControl群とSi群では差はなかったものの、6週間後では有意にControl群で低下しており不安ストレスが低かった。水素療法による短期記憶の改善、ならびに不安ストレス軽減の理由として、外傷によって損傷した神経のシナプスが機能回復したからと考え、機能

するシナプス濃度を画像化できるSV2A-PETを撮像した。しかしながら、今回の検証ではControl群とSi群において損傷側皮質、視床、基底核それぞれにおいてSUVRに有意差はみられなかった。要因として、実際はシナプスの機能や神経回路などに改善しているが、SV2A-PETではマウスモデルにおける変化を描出することが困難であった可能性があげられる。このSV2A-PETは、近年アルツハイマー病や脳梗塞など多くの疾患を対象に報告されているが、マウスモデルも含めヒトに対しても頭部外傷を対象とした報告はなく、今回の研究で新たに評価できたことは報告に値する。今後ヒトに応用するためには安定した同位体の供給が望ましいが、今回の前臨床検査では同位体の合成は非常に困難だったことがわかっており、引き続き合成方法の改善をこころみる。

次に、ケイ素製剤による水素療法によって頭部外傷後の脳機能が改善した病態を明らかにするため、神経炎症の指標である活性化ミクログリア・マクロファージの集積を比較検討した。損傷1週間後の視野あたりの活性化ミクログリア・マクロファージの細胞数はSi群とControl群で有意差はなく炎症の程度は変わらないと考えられた。一方で、細胞数を評価するDAPI染色では大脳皮質における視野あたりの細胞数はControl群ではSi群より有意に少なかった。よってケイ素による水素療法で亜急性期の神経細胞の細胞死を抑制し、機能改善に至った可能性を考えられた。今後、慢性期の評価や、神経細胞数を評価するためにNeu-N抗体を用いた染色、そしてアポトーシスをおこした細胞数を評価するTunnel染色を行う予定にしている。

さらに、損傷側皮質と視床における炎症と抗酸化作用を評価として、q-PCRで各部位のサイトカイン並びに抗酸化酵素のRNA量を測定した。炎症性サイトカイン(IL-6, TNF- α , IL-1 β)にうち、Si群とControl群で有意差を認めたものは6weekの視床のIL-1 β でのみだった。一方で抗酸化酵素の一つHmo-1は皮質では1week・6week両方で、視床では6weekにおいてSi群で有意に発現していた。ケイ素による水素療法によって、神経炎症を抑制することはできなかったものの、時間経過による抗酸化酵素の発現低下を抑制することができると考えられた。

上記の評価方法は脳の局所的な変化を捉えている。ケイ素製剤による水素療法により全身の酸化ストレス、抗酸化力の変化を評価するために、頭部外傷後の血液を回収し血清を用いてd-ROM/BAPテストを行った。しかしながらd-ROM/BAPテストではSi群とControl群で有意差はなかった。すなわち、外傷性脳損傷では水素が全身の酸化ストレス度と与える影響に違いはなく、抗酸化力も差はない結果であった。今後、sham-opeマウスとの比較や1weekと6weekとの違いを評価する必要がある。

④ 結論

頭部外傷マウスモデルに対するケイ素による水素療法により、外傷性脳損傷後の短期記憶・不安レベルの改善が確認された。SV2A-PETでの評価では、損傷側の皮質・視床・脳幹のSVURの有意差はなく、SV2A-PETで機能シナプス密度の改善を捉えることはできなかった。しかしながら、ケイ素による水素療法で損傷後の神経細胞数の減少を抑制すること、脳損傷後の脳内の抗酸化作用を維持できていることが見出された。今後、さらに研究をすすめ、外傷性脳損傷後の後遺症の機能回復のメカニズムや治療法に関する新しい知見を集積していく。

参考文献

1. Bavarsad MS, Grinberg LT. SV2A PET imaging in human neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci.* 2024;16:1380561.
2. Hosomi S, Watabe T, Mori Y, Koyama Y, Adachi S, Hoshi N, Ohnishi M, Ogura H, Yoshioka Y, Hatazawa J, et al. Inflammatory projections after focal brain injury trigger neuronal network disruption: An (18)F-DPA714 PET study in mice. *Neuroimage Clin.* 2018;20:946-54.
3. Zhao QH, Xie F, Guo DZ, Ju FD, He J, Yao TT, Zhao PX, Pan SY, Ma XM. Hydrogen inhalation inhibits microglia activation and neuroinflammation in a rat model of traumatic brain injury. *Brain Res.* 2020;1748:147053.
4. Kobayashi Y, Matsuda S, Imamura K, Kobayashi H. Hydrogen generation by reaction of Si nanopowder with neutral water. *J Nanopart Res.* 2017;19(5):176.
5. Kobayashi Y, Imamura R, Koyama Y, Kondo M, Kobayashi H, Nonomura N, Shimada S. Renoprotective and neuroprotective effects of enteric hydrogen generation from Si-based agent. *Sci Rep.* 2020;10(1):5859.