

創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	ポジトロン CT で脳内炎症が確認された患者に対するマイクログリア活性化抑制薬の有効性検証
代表機関名	国立研究開発法人理化学研究所
職名	チームリーダー
研究開発代表者名	渡辺 恭良
全研究開発期間	平成 28 年度～令和 2 年度

1. 研究開発成果

筋痛性脳脊髄炎/慢性疲労症候群 (ME/CFS) は未だ病因も明らかでなく、有効な治療法の開発が渴望されてきた。研究開発代表者らは、これまでに ME/CFS 患者に対し脳内炎症や脳特異的代謝、数種の神経伝達系に関してポジトロン CT (PET) 研究を行い、重症の ME/CFS 患者では、マイクログリア活性化を指標とした脳内炎症が健常者と比べて脳の様々な部位で増加しており、脳に広く神経炎症が起こっていることを世界で初めて発見した。また一方で、血液中、唾液中のバイオマーカーや血液細胞、腸内細菌叢などの特徴を見出してきた。本研究では、PET 試験を多数の患者で行い、脳内炎症が顕著な患者をスクリーニングしてリクルートし、一方で、様々な客観的バイオマーカーや主観的症候も含めた相関解析を行うとともに、抗マイクログリア活性化薬が症状の改善に向かい、その症状改善度と PET による脳内炎症の低下度、バイオマーカーで見る客観的指標の改善度と相関するかどうか、介入試験により検討することを目的とした。ME/CFS の本質的な病態解明と合理的治療法の開発が本研究の意義である。また、ME/CFS には、これまでの様々な試行にも関わらず、十分な動物モデルがなく、得られた臨床知見から考慮できる ME/CFS モデルの開発とそのモデルでの脳内炎症の実証、また、抗マイクログリア活性化薬の開発に利用できるかどうかの判定を行った。

まず、観察研究と称して、PET 試験、MRI 検査と周辺の既知・新規開発バイオマーカーや客観的睡眠状況・心理検査を行った。研究代表者・研究分担者とともに、核となる臨床試験機関での倫理委員会に申請し承認を得た。脳内炎症 PET 試験は、最終的に 119 例[健常者 43 例(2 例脱落)・ME/CFS 76 例(2 例脱落)]について実施することができ、達成率は 98.3% (119 名/121 名)となった。PET データ解析は理化学研究所の分担研究者が実施した。大阪市立大学、山口大学では、PET 検査を実施した患者についての臨床病態について問診票を用いて正確に把握するとともに、疲労関連バイオマーカーに関する検査や睡眠の詳細な分析を実施した。九州大学では心身医学的検査と MRI 計測データ解析を行った。

観察試験で集積した全例(健常者 41 名と ME/CFS 患者 76 名)の PET データの解析を行った。健常者のうち、明らかな原因で除外できるものを除外し、26 名を解析対象者とした。ME/CFS 患者

においても、2名はデータ解析から除外し、74名を解析対象者とした。群間比較解析を行った結果、ME/CFS患者群は健常者群に比し、脳幹と視床において神経炎症の程度が強い傾向を示した(研究代表者・分担者の先行研究の再現性確保)。ME/CFS患者において各種生理学的・生化学的指標と神経炎症度との重症度相関解析も行い、視床の炎症度合を示す定量的指標値と免疫系指標(血中B細胞数とTh細胞数)との正相関、脳幹・橋の炎症度合を示す指標値と抗酸化指標(血中BAP濃度)の負相関の関連性を明らかにした。

ME/CFS患者群および健常者群を対象として、Chalder疲労尺度(身体疲労と精神疲労)や日本語版症状チェックリスト(SCL-90-R;精神症状・身体症状)の質問紙および頭部磁気共鳴画像(MRI)の撮像を行い、質問紙の得点と脳の形態学的特徴との関連を調べた。その結果、脳の形態学的特徴に関しては、Chalder疲労尺度の精神疲労の得点が高いほど島皮質の容積が小さく($p < 0.05$)、Chalder疲労尺度の精神疲労やSCL-90-Rの総得点が高いほど運動野・体性感覚野の容積が小さいことが示された(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.05$)。また、ME/CFS患者および健常者を対象として上記と同様の質問紙と頭部MRI検査を行い、安静時脳活動の機能的結合を調べた。その結果、健常群と比較してME/CFS群では右島皮質と前帯状皮質間との機能的結合が小さく、右一次運動野と左一次体性感覚野との機能的結合が小さかった(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.05$)。質問紙との関連では、Chalder疲労尺度の精神疲労の得点が高いほど右島皮質とヘッセル回との機能的結合が大きかった($p < 0.05$)。これらの結果より、ME/CFS患者では精神的疲労が島皮質の容積や機能的結合の異常に関連していることが示唆された。

ME/CFS患者群と健常者群の睡眠パラメータを比較検討したところ、ME/CFS患者ではベッド滞在時間と総睡眠時間が有意に延長しているものの、入眠潜時も長く、さらにノンレム深睡眠比率が有意に低下していることが判明した。ME/CFS群では、疲労により睡眠欲求が上昇しているものの、睡眠の質が低下しているため、さらに睡眠時間が延長しているものと考えられる。実際、睡眠の満足度を示すPittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)はME/CFS患者で有意に不良であり、倉恒らが開発した自己診断疲労度チェックリストによる疲労度と有意な正相関を示した。また、日中活動量はME/CFS患者群で有意に低下しており、ME/CFSの活動性指標であるPerformance Status (PS)と有意な負の、睡眠の質を示すパワー値やノンレム睡眠ステージ3の時間と有意な正の相関を示した。睡眠満足度の低下は疲労度に負の影響を与え、疲労度の悪化はPSの増悪に寄与し、睡眠欲求の高まりに伴い日中睡眠時間が延長する。日中睡眠時間の延長は夜間睡眠の質を劣化させ、さらに疲労度の増悪につながる。これまでのデータから、ME/CFSと睡眠の間にはこのような悪循環が形成されているものと考察した。

生活習慣調査による一次除外基準(喫煙習慣・大量の飲酒習慣・メタボリックシンドローム・妊娠中および分娩後1年以内・慢性疾患で服薬中・過多の残業習慣)をクリアし、睡眠状態や食事に関する問診票に問題がなく、かつ一般臨床検査値(血液検査・生化学検査・尿検査・感染症検査・腫瘍マーカー等)に異常を認めなかった健常者(スーパー健常者と呼称しても良い)27名を対照に、一般住人ボランティア31名、およびPET/MR試験を実施したME/CFS患者48名の相対的酸化ストレス度およびFACS解析によるリンパ球/単球サブセット比率を比較検討した。その

結果、ME/CFS 患者では健常者に比較して、相対的酸化ストレス度の明らかな上昇、B 細胞比率の増加、正常単球の減少および炎症性単球の有意な増加が確認された。さらに相対的酸化ストレス度上昇と炎症性単球の増加との間に有意な相関が認められた。一方、一般住人ボランティアの中にも相対的酸化ストレス度の上昇を認める症例があり、それらでは炎症性単球の増加も確認された。持続的な相対的酸化ストレス度の上昇と炎症性単球の増加により、慢性炎症が引き起こされることが、ME/CFS 患者の病態形成に関与している可能性が示唆された。

ME/CFS 患者と健常者の血漿を対象とした網羅的メタボローム解析研究も実施した。ME/CFS 患者と健常者を 2 群比較したところ、TCA 回路内の代謝物質が患者群で健常者群より有意に低値であるなど、複数の代謝物に有意な変化がみられた。また、性別比較を行ったところ、男性に比べて女性の方が変化の程度がより顕著であった。本研究代表者・分担者の先行研究で、当該代謝回路の疾患特異的な変化の指標として設定した 2 つの物質比について本研究でも ROC 解析を行ったところ、女性の患者群と健常者群を高精度に判別可能であることが示された。下記のイブジラスト介入試験においても、介入後に複数の血中代謝物において有意な変化が確認された。

次に、ME/CFS 患者を対象とした介入試験の計画を立案した。臨床研究法の適用となるため大阪市立大学医学部附属病院の臨床研究・イノベーション推進センターの協力を得てプロトコル及び臨床研究法に適用の認定臨床研究審査委員会への審査書類を作成し、2019 年 5 月 23 日に本申請を行い、2019 年 9 月 11 日に承認された(OCU0014、jRCTs051190067)。候補薬はミクログリア抑制薬であるイブジラスト(杏林製薬株式会社製)とし、安全性の評価試験を主目的とした脳内神経炎症 PET を中心とするバイオマーカー検証を含むフィージビリティ研究として計画した。イブジラストは海外では 90-100 mg/日といった投与試験が実施されているが、日本での承認は 30 mg/日となっている。これまでの臨床医の経験的な投与状況では、30 mg の投薬の有効性は半数程度に留まり、また 3 - 4 ヶ月間以降の投与は効果に大きな変化が見られない。従って 30 mg 以上の投与が望ましいが、日本人において 30 mg 以上では副作用報告が多くなることも知られている。従って本試験では 30 mg/日の投与からスタートし状況に応じて投与量を変化させる試験デザインを設定した。観察研究の結果から、観察研究のエントリー基準に合致する患者は 130 名であり、そのうち本研究への協力に同意し、かつ、PET 検査に基づく閾値の超える基準を満たしかつ参加が可能な患者はごく限られていることが明らかとなった。(観察研究で実施した ME/CFS 患者のうち介入試験のエントリー基準を満たす PET 検査に基づく閾値を超える対象は 25 名であった。)[25 名(介入試験対象者)/74 名(観察試験対象者)/130 名(観察試験適格者)]。さらに、介入試験の実施で重要な時期である 2020 年 2 月以降、新型コロナウイルス感染症が日本中で蔓延してきたため、大阪市立大学医学部附属病院を受診する ME/CFS 患者が激減したことも影響し、対象患者は当初 30 名程度を予定していたが、介入試験適格者が 25 名であり、そのうち同意が得られたものは 13 名であった。うち 2 名は服薬後間もなくめまいにより中止した[13 名(介入試験同意者)/25 名(介入試験対象者)/74 名(観察試験対象者)/130 名(観察試験適格者)。]

本来は二重盲検プラセボ対照試験を実施することが望ましいが、安全性の面、有効性という観

点、また本疾患自体が稀少疾患であり更に基準を統一するとなると患者数が限られてくるという点から考えても実施はほぼ不可能であり、オープントライアルで実施することと判断した。本研究の結果から、対象者の1-2割程度は本薬剤によりめまい症状を呈するという点と、その症状は服薬後数日で出現するが、服薬中止したところ消失することが明らかとなった。しかしながら、最初の数日で症状を訴えない患者は倍量服薬しても試験中止となる症状は発生しなかった。

観察研究及び介入研究に関連して、すべての分担研究者・研究協力者からのデータを収集し、統合的なデータベースを作成し、統計解析を実施した。新たに判明した ME/CFS のバイオマーカーの1つである細胞外小胞の量が PET 検査の脳部位の一部と正の相関が認められることなどが明らかとなった。イブジラスト投与介入試験の結果解析を実施し、居眠り回数の減少、総合疲労得点の減少等の効果を明らかにした。本介入試験における PET 検査の結果では、ME/CFS 患者 13 名のうち 2 名は途中で試験中止、もう 1 名は PET モデル解析で解析不可であったため、計 10 名を解析の対象とした。症例数が少ないながら対応のある 2 群比較をノンパラメトリック法で解析したがいずれの項目も傾向はあるものの統計的有意には至らなかった。また、脳画像統計解析ソフトウェア SPM12 を用いた解析も実施し、介入前から介入後にかけて視床においては炎症度合を示す指標値の変化を認めなかったが、中脳と島皮質の炎症度合を示す指標値が介入前に比し低下する傾向がみられた。また、介入前から介入後にかけて神経炎症の程度が高まる脳領域は認められず、被験者数は限定的ではあるが本抗炎症薬の安全性を示す結果も得られた。さらに治療効果検証のため、各種生理学的・生化学的指標の介入前後における変化率と神経炎症度の変化率間の相関解析も実施し、介入前から介入後にかけて中脳における炎症度合を示す指標値の低下の程度は、介入前後における日中活動変化率または血中代謝物 X の低下率と相関することを明らかにした。

ME/CFS の動物モデルの構築を行った。疲労負荷中に短い休憩を頻繁に繰り返すことで生体内の疲労回復にかかわる神経・内分泌・免疫系などの恒常性維持機構の機能紊乱を引き起こし、疲労回復を遅延させる慢性疲労モデルの確立を試みた。結果、疲労の慢性化に伴って、睡眠調節機能や体温調節機能が徐々に破綻すること、免疫・内分泌に関わる副腎の重量が増加し、胸腺や脾臓の重量が低下することを明らかにした。また、疲労負荷後半には血中の酸化ストレスが増加し、炎症性サイトカインが上昇すること、炎症や感染症に関連する遺伝子の発現が血球で急激に増加することを突き止めた。次に、脳内炎症を定量評価可能な PET プローブである ^{18}F DPA-714 の特異性について、局所脳内炎症モデル動物を用いて評価した結果、これまでに臨床研究で広く使われてきた ^{11}C PK-11195 より結合度が高く、非特異的な結合が低いことを明らかにした。この結果により、本臨床研究では ^{18}F DPA-714 を用いることに決定した。続いて、脳内の炎症が確認されたこの慢性疲労動物モデルを用いて、イブジラストの有効な投与量の検討を行った。しかし、げっ歯類ではイブジラストの血中半減期がヒトと大きく異なることが判明し、臨床試験に向けた投与量の検討は中止した。脳内炎症と疲労の関連について検討した研究では、Poly I:C の腹腔内投与によって、脳内の広い範囲において脳内炎症が引き起こされ、その中で背側縫線核の ^{18}F DPA-714

の集積が自発行動量の低下と正の相関を示すことを明らかにし、感染や末梢組織での炎症反応が背側縫線核などの脳内領域での脳内炎症を介して疲労状態に関わる可能性を明らかにした。

[Summary in English]

To establish the biomarkers effective for objective diagnosis and development of rational therapies for Myalgic Encephalomyelitis/Chronic Fatigue Syndrome (ME/CFS), we tried the recruitment of the patients who showed statistically significant grade of positive neuronal inflammation detected by PET study. We have done PET study on 76 ME/CFS patients and 43 healthy control subjects with integrated studies on a variety of biomarkers and clinical symptomatology.

PET data showed 34% of the ME/CFS patients showed the neuronal inflammation higher than the threshold of the healthy controls in the thalamus and brainstem, which was the reproducible data with our previous publication.

Ninety-five percent of ME/CFS patients are aware of sleep disorders. The ME/CFS patients group has a longer sleep time due to poor sleep quality compared to the control group. Decreased daytime activity due to chronic fatigue worsens sleep quality in ME/CFS patients. Chronic fatigue and sleep status form a vicious circle in ME/CFS patients.

We collected all data from the collaborators, created a comprehensive database, and conducted statistical analysis. The number of extracellular vesicles, which is one of the newly discovered biomarkers of ME/CFS by our group, was positively correlated well with the extent of neuroinflammation in a part of the brain region.

ME/CFS patients and healthy subjects completed the Chalder's Fatigue Scale (physical and mental fatigue) and MRI measurements. The relationship between the questionnaire scores and brain morphological features or functional connectivity of resting state was examined. The results showed that the higher the score of mental fatigue on the Chalder's Fatigue Scale, the smaller the volume of the insular cortex ($p < 0.05$). As for the functional connectivity, that between the right insular cortex and the anterior cingulate cortex was smaller in the ME/CFS group compared to the control group ($p < 0.05$). In addition, the higher the mental fatigue score on the Chalder's Fatigue Scale, the greater the functional connectivity between the right insular cortex and the Heschel's gyrus ($p < 0.05$). These results suggest that mental fatigue is associated with abnormalities in the volume and functional connectivity of the insular cortex in ME/CFS patients.

We compared oxidative stress index (OSI) levels, lymphocyte subset ratios, and monocytes surface antigen in ME / CFS patients and healthy subjects. The results confirmed that the OSI levels were significantly higher in sera of the ME / CFS patients than in those of the healthy volunteers. In addition, lymphocyte subset analysis showed that ME / CFS patients had a significantly increased proportion of B cells compared to healthy subjects. Furthermore, the surface antigen analysis of

monocytes revealed that the proportion of CD14⁺ / CD16⁻ monocytes significantly decreased and the proportion of CD14⁺ / CD16⁺ monocytes were significantly increased in ME / CFS patients as compared with healthy subjects.

We then proceeded to the next stage of treatment study with Ibudilast, a subtype of phosphodiesterase 4 inhibitor and well known as an anti-inflammatory drug. Open trial with the ME/CFS patients who fulfilled the inclusion criteria including the positive neuroinflammation by [¹⁸F]DPA-714 PET has been conducted with 4-month treatment of Ibudilast. The therapeutic effects were evaluated by PET and other biomarkers with the clinical scores of the patients' symptoms. Unfortunately, during the COVID-19 infection period, we could not recruit enough number of the patients (13 participation, 2 withdrawal, 1 PET study problem). Completing ten patients showed the total fatigue score decreased after administration of Ibudilast. Concerning the PET study, binding potentials (BP_{ND}) of the midbrain and insula after the intervention for treatment using ibudilast were trended to be lower than those before the treatment. The brain regions with higher BP_{ND} after the intervention as compared with those before the treatment were not observed, suggesting that the safety of ibudilast for treatment in ME/CFS patients was confirmed although the number of participants was limited.

To evaluate the anti-fatigue effect and examine underlying mechanisms of fatigue chronification, we attempted to develop several preclinical fatigue animal models. A chronic fatigue model has been developed by using an intermittent water immersion procedure in which fatigue was evoked via the gradual disruption of homeostasis induced by repeated short-term rest periods during continuous fatigue loading. In this chronic fatigue model, we demonstrated that the sleep- and thermos-regulatory functions were altered with the development of chronic fatigue. The tissue weight of immune- and endocrine-related organs was altered, such as the adrenal gland increased but the thymus and spleen decreased. Moreover, the plasma level of the oxidative stress and pro-inflammatory cytokines was increased in the late phase of fatigue loading. To evaluate the imaging capability of [¹⁸F]DPA-714, a second-generation PET probe developed for quantitative analysis of neuroinflammation, we performed a PET study in an acute focal neuroinflammation animal model and demonstrated that the [¹⁸F]DPA-714 has better imaging sensitivity and signal-to-noise ratio than [¹¹C]PK11195, a gold standard for imaging neuroinflammation has been used extensively in clinical and preclinical studies so far. To investigate whether and how the regional neuroinflammation is involved in fatigue pathophysiology, we also performed a quantitative investigation of neuroinflammation in a peripheral infection-induced fatigue animal model using [¹⁸F]DPA-714, and found that the brain uptake of the [¹⁸F]DPA-714 was significantly increased in widespread brain regions and some of them were positively correlated with fatigue-like behavior, indicating that regional neuroinflammation may be involved in fatigue development following peripheral infection.

However, to our regret, we could not show the positive effects of Ibudilast in this animal model, possibly because of much faster metabolism of Ibudilast in model rats than humans.

2. 総合評価

良い

【評価コメント】

大阪府北部地震や COVID-19 などの影響で介入試験の患者登録が計画通りに行えず、進捗は限定的であったが、発症機序が不明で未だに有効な治療法のない筋痛性脳炎髄炎/慢性症候群 (ME/CFS) について、長年にわたる疲労研究の実績に基づいて、ME/CFS 患者と健康者を幅広く比較研究し、疲労パラメーターと脳内炎症等の相関性から ME/CFS の発症メカニズムの一端を明らかにするなど評価できる。しかし、介入試験が不十分で、ミクログリア活性化の抑制の有効性が示されていないかった。

今後、ME/CFS 患者に確かな治療薬を届けるため、参画企業とも連携し、ミクログリア活性化抑制薬の有効性について、観察研究や介入試験で得た成果とバイオマーカー研究との関連付けを深耕し、創薬研究が加速することを希望する。

以上