

## 様式 C-19

### 科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年 4月25日現在

機関番号：10101  
研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2008～2010  
課題番号：20390321  
研究課題名（和文） 核医学的手法による実験動物でのプラークの性状評価と治療効果判定  
研究課題名（英文） Radionuclide imaging for tissue characterization and treatment effect of experimental atherosclerosis  
研究代表者  
玉木 長良（TAMAKI NAGARA）  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30171888

研究成果の概要（和文）：本研究では動脈硬化の進展に伴って認められる動脈硬化の不安定性を同定するため、適切な放射性薬剤を用いて画像化する方法を確立する。そのために自然発症動脈硬化モデルマウスを用いて、FDGとAnnexin A5を用いてオートラジオグラフィにてその集積度を定量的に解析し、得られた結果と免疫、病理組織所見と対比した。その結果、これらの薬剤は病理学的に増殖期でマクロファージの集積の高い領域を反映することが確認できた。

研究成果の概要（英文）：In order to assess atheroma vulnerability, we have selected two radiopharmaceuticals to probe atheroma imaging in vivo using apolipoprotein E knockout (apoE<sup>-/-</sup>) mice. The uptakes of FDG and Annexin A5 were quantitatively measured on autoradiography to compare with various parameters on histological and immunohistochemical staining. These uptakes were closely correlated with atheroma staging and macrophage infiltration. The current study indicated that the radionuclide imaging has a potential to identify atheroma vulnerability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究代表者の専門分野：放射線医学

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 社会的背景

心筋梗塞や脳卒中の成因として血管内プラークの破たんが挙げられる。このプラークの不安定性については、病理学的・分子生物学的な解明が進むと共に、不安定プラークの画像診断法が動脈硬化の早期診断やリスクの層別化、さらには治療効果判定などの観点から注目されている。生体では血管内視鏡、血管内超音波、光CTなどの侵襲的な画像診断法や、超音波、MRIやCTなどの非侵襲的な画像診断法が注目されている。核医学的手法の特徴は最適な放射性薬剤を用いて種々の分子機能を映像化できる点である。近年欧米では動脈硬化病変におけるF-18標識FDGやTc-99m標識アネキシンA5の集積に関する報告が散見される。しかし両者を併用してプラークの性状を詳細に把握した報告はまだみられない。

### (2) 我々のこれまでの取り組み

我々はこれまで腫瘍モデル動物を用いてFDGやアネキシンVの集積から病態評価を行ってきた。病理組織学的、免疫組織学的検討からアネキシンA5の集積がアポトーシスを反映するTunnel染色の程度と高い相関があることを報告した。またFDGの集積についてはブドウ糖輸送遺伝子発現や酵素学的な検索との関連を示した。本研究はこれらの実績を活かし、悪性腫瘍とは異なる動脈硬化病変の診断、評価に挑戦するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では核医学診断法の特徴を活かして、ノックアウトマウスを用いた動脈硬化動物モデルにおいて動脈内のプラークの性状評価と治療評価への応用を試みる。使用する放射性薬剤は不安定プラーク内のマクロファージの活性を示すブドウ糖代謝のマーカースとしてFDGと、血管内に生じるアポトーシスを映像化するアネキシンA5である。

本研究では活動性動脈硬化病変に親和性のある2種類の放射性薬剤を用いて不安定

プラークの診断法を確立し、免疫、病理組織所見と対比することで、上記の薬剤の集積がどのような病態を示すかについて詳細に検討をする。

## 3. 研究の方法

- (1) 動脈硬化モデル動物として ApoE ノックアウトマウス、コントロールとして wild type のマウスを購入し、2週間～6週間高脂肪食を与えて、種々の程度の自然発症の動脈硬化モデル動物を作成した。なお遺伝子操作動物を利用するため、動物購入については、遺伝子操作の倫理委員会の承認を得た。
- (2) アポトーシスを画像化するため、米国の施設から送られてきたアネキシン V を Tc-99m で標識した。また、ブドウ糖代謝を画像化するため大学病院に設置されている小型サイクロトロンおよび自動合成装置で F-18 標識 FDG を合成した。さらにはオートラジオグラフィを行うため、C-14 標識 FDG を購入して実験を行った。
- (3) 北大アイソトープ総合センターに設置されているクリオスタットやイメージアナライザーなどを用いてオートラジオグラフィを作成、定量的解析をおこない病理組織所見と対比することで、動脈硬化病変をどの程度判定しているかを検討した。
- (4) 得られた組織について、脂肪染色をはじめ、線維化、マクロファージなどの病理組織学的所見を詳細に検討することで、上記薬剤の局所ごとの集積部位と対比することで集積機序について検討を加えた。

## 4. 研究成果

- (1) 免疫組織学的所見との対比  
種々の動脈硬化の時期における  $^{14}\text{C}$ -FDG と  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anvein A5 の集積度をオートラジオグラフィで検討し、組織の線維化を示す Movat 染色、マクロファージ浸潤を示す

Mac-2 染色、および脂肪沈着を示す Oil red O 染色とそれぞれ対比した。図 1 にその対比を示す。特にこれらの薬剤の集積はマクロファージ浸潤および脂肪沈着と関係の深いことが示された。そこでこれらの分布を判定量的に解析したところ、FDG と Annexin A5 の集積度はそれぞれマクロファージ浸潤および脂肪沈着と関係があることが確認できた。

特にマクロファージ浸潤を示す指標として、Mac-2 染色で陽性となった領域の面積を求めて、FDG や Annexin A5 の集積度との関係を見たところ、それぞれ比較的高い正の相関関係が見られた (図 2, 3)。このことより、この動脈硬化モデルにおけるこれらの薬剤の集積がマクロファージ浸潤を反映していることが確認できた。

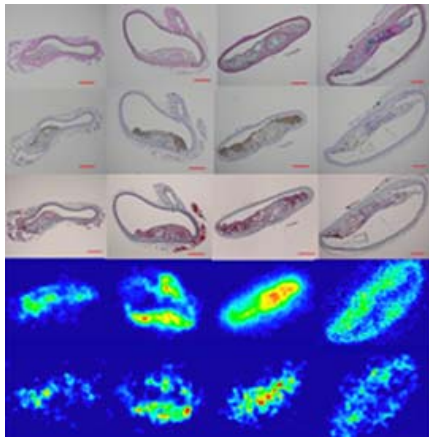


図 1 各領域における Movat 染色、Mac-2 染色、脂肪染色、およびほぼ同じ断面での FDG、および 99mTc-annexin A5 のオートラジオグラフィ (左より正常領域、早期動脈硬化期、動脈硬化期、線維化期)、

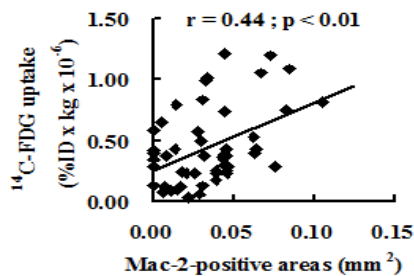


図 2 FDG と Mac-2 染色との関係

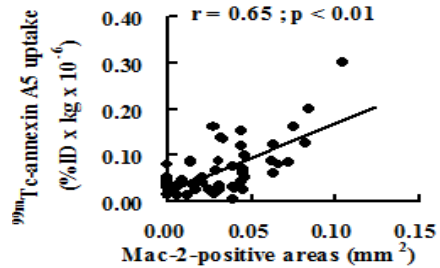
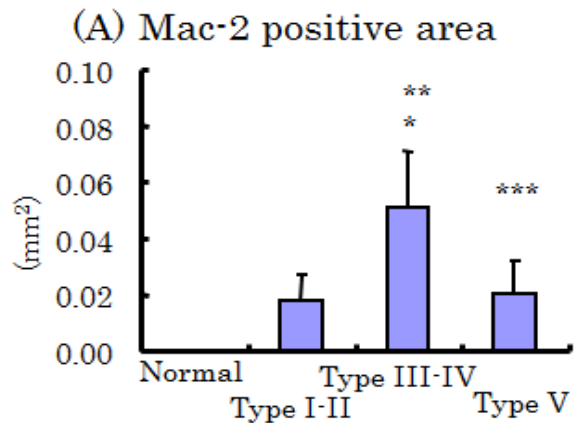


図 3 Annexin A5 と Mac-2 染色との関係

## (2) 病理学的進展度との対比

Movat 染色を利用して線維化の度合いを解析し、動脈硬化病変を正常期(normal)、動脈硬化早期(early: E, AHA Type I-II)、動脈硬化進行期(atheromatous lesion: AHA Type III-IV)、および動脈硬化線維化期(fibroatheroma lesion: AHA Type V)の4段階に分けて検討した。病巣の厚みは stage の増加と共に大きくなった。それに対し、マクロファージ浸潤は Stage III-IV 期が最も高く、その時期に合わせて Annexin A5 や FDG の集積が最も高くなることが示された(図 4)。



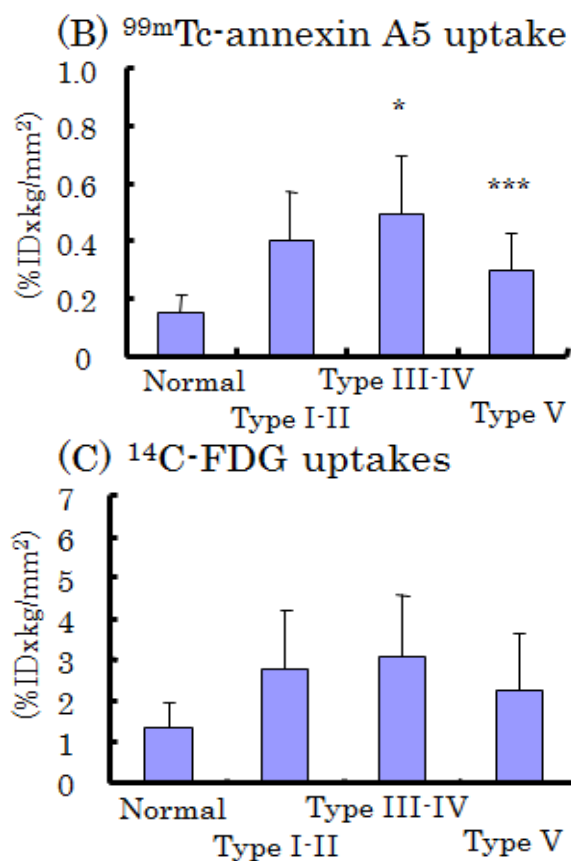


図4 AHA 分類の各ステージにおける病変のマクロファージ浸潤度(A), Annexin A5 の集積度(B)およびFDGの集積度(C)。

これらのことから動脈硬化病変におけるFDGやAnnexin A5の集積は病変の大きさではなく、マクロファージが浸潤し、脂肪沈着の進む動脈硬化の増殖期に最も強く集積しており、不安定な時期をある程度反映しているものと考えられた。

現在小動物用画像診断装置を用いて in vivoでの映像化も始めたところであり、明瞭に大動脈の集積度増加を映像化できるまでに至っている。今回の検討で得られた結果を活かして、動脈硬化の不安定性を映像化できるようになれば、その重症度判定はもちろん、治療効果判定などにも利用可能となることが期待でき、さらに研究を加速しているところである。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ① Zhao Y, Zhao S, Kuge Y, Strauss WH, Blankenberg FG, Tamaki N. Localization of deoxyglucose and annexin A5 in experimental atheroma correlates with macrophage infiltration but not lipid deposition in the lesion. Mol Imaging Biol. 2011 査読有(印刷中)
- ② Akizawa H, Zhao S, Takahashi M, Nishijima K, Kuge Y, Tamaki N, Seki K, Ohkura K. In vitro and in vivo evaluations of a radioiodinated thymidine phosphorylase inhibitor as a tumor diagnostic agent for angiogenic enzyme imaging. Nucl Med Biol. 査読有 2010; 37(4): 427-32
- ③ Yamazaki Y, Kitagawa Y, Hata H, Abe T, Murai C, Shiga T, Tamaki N. Use of FDG PET to evaluate hyperbaric oxygen therapy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. Clin Nucl Med. 査読有 2010; 35(8): 590-1
- ④ Yoshinaga K, Manabe O, Katoh C, Chen L, Klein R, Naya M, Dekemp RA, Williams K, Beanlands RS, Tamaki N. Quantitative analysis of coronary endothelial function with generator-produced <sup>82</sup>Rb PET: comparison with <sup>15</sup>O-labelled water PET. Eur J Nucl Med Mol Imaging 査読有 2010; 37(12): 2233-2241
- ⑤ Kuge Y, Obokata N, Kimura H, Katada Y, Temma T, Sugimoto Y, Aita K, Seki K, Tamaki N, Saji H: Synthesis and evaluation of a radioiodinated lumiracoxib derivative for the imaging of cyclooxygenase-2 expression. Nucl Med Biol 査読有 2009; 36(8): 869-876
- ⑥ Sato M, Inubushi M, Shiga T, Hirata K, Okamoto S, Kamibayashi T, Tanimura K, Tamaki N: Therapeutic effects of acupuncture in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study using <sup>18</sup>F-FDG-PET. Ann Nucl Med 査読有 2009; 23(3): 311-316

- ⑦ Ohira H, Tsujino I, Ishimura S, Oyama N, Takei T, Tsukamoto E, Miura M, Sakaue S, Tamaki N, Nishimura M: Myocardial imaging with <sup>18</sup>F-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography and magnetic resonance imaging in sarcoidosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 査読有 2008; 35(5): 933-941
- ⑧ Zhao S, Kuge Y, Kohanawa M, Takahashi T, Zhao Y, Yi M, Kanegae K, Seki KI, Tamaki N: Usefulness of <sup>11</sup>C-methionine for differentiating tumors from granulomas in experimental rat models: a comparison with <sup>18</sup>F-FDG and <sup>18</sup>F-FLT. *J Nucl Med* 査読有 2008; 49(1): 135-141
- ⑨ Zhao Y, Kuge Y, Zhao S, Strauss HW, Blankenberg FG, Tamaki N: Prolonged high-fat feeding enhances aortic <sup>18</sup>F-FDG and <sup>99m</sup>Tc-annexin A5 uptake in apolipoprotein E-deficient and wild-type C57BL/6J mice. *J Nucl Med* 査読有 2008; 49 (10): 1707-14

[学会発表] (計4件)

- ① Tamaki N: Perspectives of cardiovascular molecular imaging. (Educational Session, Organizer). World Molecular Imaging Congress 2010, Sep 8-11, 2010 (Kyoto, Japan)
- ② Zhao Y, Zhao S, Kuge Y, Tamaki N: Careful assessment of FDG uptake due to elevated FDG concentration in the blood and organs by high dose ARB administration: Experiment in mice given telmisartan. 56 th Annual Meeting, Society of Nuclear Medicine, Jun 5-9, 2010 (Salt Lake City)
- ③ Tamaki N: Perspectives of PET in cardiovascular medicine (Invited lecture) 13th Asia-Oceanian Congress of Radiology, Mar 20-23, 2010 (Taipei, Taiwan)
- ④ Tamaki N: Circulation to vessel walls: 2009 SNM Hermann Blumgart Award

Lecture. (Invited lecture) 56th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, Jun 13-17, 2009 (Toronto)

[図書] (計1件)

- ① Tamaki N, Kuge Y (eds.): *Molecular Imaging for Integrated Medical Therapy and Drug Development. State of the art and future perspectives.* Springer, Tokyo, 2010 (総ページ数 303)

[産業財産権] なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

玉木 長良 (TAMAKI NAGARA)

北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号 30171888

### (2) 研究分担者

久下 裕司 (KUGE YUJI)

北海道大学・アイソトープ総合センター・教授  
研究者番号 70321958