

令和元年6月20日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09019

研究課題名(和文)冠動脈硬化巣の血栓性リスクを反映する非侵襲的画像診断の開発

研究課題名(英文) Coronary high-signal-intensity plaques on T1 weighted magnetic resonance imaging reflect intraplaque hemorrhage.

研究代表者

黒岩 靖淳 (Kuroiwa, Yasuyoshi)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：20747232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞では冠動脈の動脈硬化巣(プラーク)の血栓形成能が重要となるが、その血栓形成を反映する画像指標は確立していない。本研究では、心筋梗塞の予測因子と報告されている冠動脈プラークMRI T1強調画像の高信号の成分の同定と血栓形成能の解明を目的とし、病理解剖により摘出された心臓を用いて検討した。T1強調画像の高信号は赤血球、平滑筋細胞、マトリックスプロテアーゼ9および血液凝固の開始因子である組織因子の増加が認められた。MRIを用いた冠動脈プラークを検出するT1WIの高信号は、プラーク内出血に関与し、プラークの安定性や血栓形成のリスクを評価する指標の確立への展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞を代表とする虚血性心疾患の予後・予測は極めて困難である。これらを非侵襲的な画像診断方法で可能になることは本邦のみならず全世界からの期待が高い。本研究は心筋梗塞の予測因子と報告されている冠動脈プラークMRI T1強調画像の高信号の成分の同定と血栓形成能を明らかにした研究で、学術的意義が高いと考える。また、非侵襲的に心筋梗塞を予測できる方法が確立することで、患者を層別化し医療費を抑制することが期待され、社会的意義が非常に高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Acute myocardial infarction is triggered by sudden morphological changes in atherosclerotic plaques and thrombus formation. Therefore, it is important to develop non-invasive modalities that can predict future coronary events. Coronary high-signal-intensity plaque (HIP) detected by T1 weighted magnetic resonance imaging is associated with cardiovascular events. However, it is unclear to identify pathological findings reflecting HIPs in coronary arteries. We found that plaque and necrotic core areas or frequency of intraplaque hemorrhage in HIPs were significantly larger or higher than in non-HIPs. Glycophorin-A-, matrix metalloprotease (MMP)9-, and tissue factor-immunopositive areas were larger in HIPs than in non-HIPs. Coronary HIPs may reflect intraplaque hemorrhage and may be a novel marker for plaque instability and thrombogenic potential.

研究分野：血栓症

キーワード：MRI T1強調画像 冠動脈プラーク 急性心筋梗塞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞は、動脈硬化性プラークの破綻に伴う血栓形成により発症する。これまでの病理学的検討から、破綻しやすいプラークの特徴として、炎症細胞浸潤を伴う大きなプラークで、プラークの表面を覆う被膜が薄い、等が知られており、画像診断において、これら特徴を有するプラークの検出が進められてきた。一方、病理学的解析及び血管内視鏡・血管内超音波などの画像技術の進歩により、プラークの破綻が必ずしも心筋梗塞の発症に繋がらないこと(形成された血栓が小さく非閉塞性で発症にいたらない)が認識されるようになった。従って、プラークの血栓形成能(形成能)が心筋梗塞を発症する極めて重要な因子であると考えられる。しかしながら、現在の画像診断は主に病変の形態学的変化を捉えており、血栓能といった病変の質的情報を非侵襲的に検出する技術は確立されていない。

近年、冠動脈プラークの評価に Magnetic resonance imaging (MRI) が導入されており、T1 強調画像において高信号を呈するプラークが検出され、進行性冠動脈プラークの所見と報告された。また、高信号プラークを有する症例では等信号プラークの症例に比して心筋梗塞の発症率が高く、心筋梗塞の予測因子として注目されている。しかし、冠動脈プラークの MRI 画像とプラーク成分を対比することは困難であること、その他の撮像法が一般化されていないため、その高信号プラークが何を反映しているのかは明らかではない。また、T1 強調画像での高信号プラークの血栓形成能は明確ではない。

申請者は、これまで動脈硬化症や血栓症の画像技術の開発を目的に研究を進めており、

- 1) 動脈硬化の動物モデルを用いて、MRI で測定した中性脂肪含有量や T1 緩和時間が炎症細胞浸潤の程度と相関すること、
- 2) T1、T2 緩和時間が静脈血栓の組織変化に関連すること、
- 3) MRI で静脈血栓を検出しうること、
- 4) MRI で高安動脈炎の血管壁の活動性を検出しうることを報告してきた。

この一連の研究から MRI がプラークの性状と血栓の検出に極めて有用であることが示されたが、プラークの血栓形成能を反映する画像指標は確立されていない

MRI は組織コントラスト分解能に優れていることからプラークの質的評価に有用で、プラークの血栓形成能の評価にも可能性があると予想された。

2. 研究の目的

本研究では病理解剖により摘出されたホルマリン固定後の心臓を用いて T1 強調画像で撮像し、冠動脈の高信号プラークとその成分との関連を明らかにするとともに、血栓能を反映する指標を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 剖検症例により摘出された心臓 MRI 解析

急性心筋梗塞と非急性心筋梗塞の心臓を T1 強調画像で撮像し、心筋の信号比 (Plaque-Muscle ratio: PMR) が 1.4 以上の高信号プラーク (HIPs) と 1.4 未満のプラーク (非 HIPs) を比較した。

2) 冠動脈血管標本の病理学的解析

MRI 撮像後に組織標本を作製し、T1 強調画像の高信号・等信号プラークに対応する血管を免疫組織化学で各種細胞 (マクロファージ、平滑筋細胞、赤血球など)、血栓性因子等を染色、各因子の陽性面積を算出した。

3) MRI 画像と免疫組織化学との統計解析

T1 強調画像の PMR や T1 緩和時間と各因子の陽性面積率を相関解析した。

4) 血液成分の違いによる MRI 画像解析

自己血液を用いて、全血液、血漿成分および遠心分離後の血液の異なる成分の MRI 画像と T1 緩和時間を測定した。

4 . 研究成果

1) T1 強調画像高信号の冠動脈プラークと成分

T1 強調画像における高信号プラークとその構成成分を明らかにするために、プラークの PMR 値が 1.4 以上 (HIP, n=11) と 1.4 未満 (非 HIP, n=25) の冠動脈を組織学的に比較検討した。プラークの大きさと壊死層の大きさは HIP で大きかった。HIP におけるプラーク内出血の頻度は非 HIP より有意に高頻度であった。また、プラーク内出血のあるプラークの PMR 値は出血の無いプラークに比べて高値であった。HIP におけるプラーク内出血の感度と特異度は、それぞれ 64% と 91% であった。

次に冠動脈プラークにおける T1 強調画像の高信号部分と T2 強調画像の低信号部分を免疫組織学染色で成分の検出を行なった。

T1 強調画像における 11 プラーク中の 10 プラークの高信号の部分は赤血球、フィブリン、マクロファージが様々な割合で陽性であった。残り 1 つの T1 強調画像における高信号の部分はマクロファージおよびフィブリンが陽性であったが、赤血球は陰性であった。

次に HIP と非 HIP のそれぞれにおけるマクロファージ (CD68)、ヘモグロビン・ハプトグロビン複合体受容体 (CD168)、平滑筋細胞 (α -SMA)、赤血球 (glycophorin A)、フィブリン (fibrin)、鉄沈着 (Berlin blue dye) の免疫陽性面積の比較を行った。

HIP における Glycophorin A の免疫陽性面積は非 HIP より大きく、平滑筋細胞の免疫陽性面積は非 HIP より小さかった。CD68、CD163 およびフィブリン免疫陽性面積は、非 HIP よりも HIP の方が大きい傾向があったが、有意ではなかった。群間でベルリンブルー染料陽性鉄沈着に有意差はなかった。非免疫マウスまたはウサギ免疫グロブリン G に対する免疫反応は観察されなかった。これにより HIP では赤血球が多く存在することが示唆された。

2) 冠動脈プラークの血栓形成と関連する血管性因子

T1 強調画像高信号の冠動脈 HIP の生物学的意義を調べるために、対応する切片を matrix metalloproteinase (MMP)9 に対する抗体 (プラーク不安定性のマーカー) および組織因子 (血液凝固の開始因子、血栓性マーカー) で染色した。MMP9 は主に壊死性コアおよび壊死性コアを囲むマクロファージに局在していた。組織因子は、プラーク中のマクロファージおよび壊死性コアに発現を認めた。MMP9 および組織因子免疫陽性面積率は、非 HIP よりも HIP の方が大きかったことから、T1 強調画像高信号プラークは血栓性の高い不安定プラークであることが示唆された。

次に、冠動脈プラークにおける PMR と免疫陽性面積との関連を調べた。PMR は、glycophorin A ($r=0.35$)、フィブリン ($r=0.35$)、MMP9 ($r=0.33$) および組織因子免疫陽性 ($r=0.37$) 面積率と正の相関を認めた。T1 強調画像の PMR はプラーク内出血の程度、血栓性やプラークの不安定の指標になりうることを示唆された。

3) T1 強調画像と血液成分または血液凝固との関連

T1 強調画像で HIP への血液量または血液凝固の寄与を調べるために in vitro 血液 MRI を行った。全血、血漿、および遠心分離で濃縮した血液中の赤血球数は、それぞれ、 $4.5 \pm 1.2 \times 10^6 / \mu\text{L}$ 、 $0 / \mu\text{L}$ 、および $7.5 \pm 3.5 \times 10^6 / \mu\text{L}$ であった。

凝固もしくは非凝固の全血、血漿、および遠心分離された血液の in vitro T1 強調画像および T1 マッピングを作製した。凝固した血液は T₁ 値が短縮しており、血中の信号強度を高めた。非凝固の全血および遠心分離した血液は、血漿と比較して T1 強調画像において高い信号強度を示した。凝固または非凝固の全血および遠心分離した血液における T1 緩和時間は、血漿におけるものより有意に短縮していた。出血による血液凝固やプラーク内赤血球の増加と T1 高信号の関連が示唆された。

以上の結果より、T1 強調画像で撮像した冠動脈の高信号プラークは、赤血球とフィブリンを反映すると考えられた。またプラークの不安定化や血栓性が高いプラークであることが示唆され、臨床的にイベント予測所見であることを病理学的に証明することができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Kuroiwa Y, Uchida A, Yamashita A, Miyati T, et al. Coronary high-signal-intensity plaques on T1-weighted magnetic resonance imaging reflect intraplaque hemorrhage. *Cardiovasc Pathol*. 2019; 40: 24-31. 査読あり
2. Kuroiwa Y, Yamashita A, Imamura T, Asada Y. Basic Research and Clinical Applications of Magnetic Resonance Imaging: Qualitative assessment of cardiovascular diseases. *Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi*. 2018;74:599-605. 査読あり
3. Shiiba T, Kuga N, Kuroiwa Y, Sato T. Evaluation of the accuracy of mono-energetic electron and beta-emitting isotope dose-point kernels using particle and heavy ion transport code system: PHITS. *Appl Radiat Isot*. 2017;128:199-203. 査読あり
4. Kuroiwa Y, Tai H, Yamashita A, Furukoji E, et al. High signal intensity in arterial walls on diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the active phase of Takayasu arteritis. *Circ J*. 2017; 81: 1747-1748. 査読あり
5. Konishi Y, Satoh H, Kuroiwa Y, Kusaka M, Yamashita A, et al. Application of fiber tractography and diffusion tensor imaging to evaluate spinal cord diseases in dogs. *J Vet Med Sci*. 2017; 79: 418-424. 査読あり
6. Kuroiwa Y, Aburaya M, Yamashita A, Miyati T, et al. Diffusion-weighted MR imaging of deep vein thrombosis. *Magn Reson Med Sci*. 2016; 15: 144-145. 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

1. Shogo Doi, Yasuyoshi Kuroiwa, Kazunori Kusumoto, Atsushi Yamashita, et al. High signal intensity in arterial walls on diffusion-weighted MR images in the active phase of Immunoglobulin 4-related disease abdominal arteritis. 第 46 回日本磁気共鳴医学会大会, ホテル日航金沢 (石川県), 9/7-9/9, 2018
2. Yasuyoshi Kuroiwa, Atsushi Yamashita, et al. Detection of early phase of deep vein thrombosis with diffusion-weighted magnetic resonance imaging. ISMRM 26th and SMRT 27th Annual Meeting & Exhibition Paris, (France) 6/18-6/21, 2018.
3. Yamashita A, Kuroiwa Y, et al. Magnetic resonance T1 high signal intensity in coronary

atherosclerotic plaques reflects intraplaque hemorrhage-derived erythrocyte content. ATVB/PVD 2018 Scientific sessions, San Francisco (USA), 5/10-12, 2018

4. Kuroiwa Y, Yamashita A, et al. Non-invasive detection of fresh deep vein thrombosis with diffusion weighted magnetic resonance imaging. XXVI Congress, International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin (Germany), 7/8-7/13, 2017
5. 黒岩 靖淳, 魏 峻洸, 山下 篤, 深部静脈血栓症における 拡散強調画像の有用性:家兎頸静脈血栓モデルを用いた検討. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 (愛知県), 6/8-6/10, 2017
6. Kuroiwa Y, Yamashita A, et al. Magnetic resonance imaging discriminates organizing from non-organizing area in deep vein thrombus. ISMRM 25th and SMRT 26th Annual Meeting & Exhibition Honolulu (USA), 4/22-4/29, 2017
7. 福見アウエイス, 黒岩 靖淳, 山下 篤, 浅田祐士郎. 核磁気共鳴画像による深部静脈血栓の器質化所見:病理組織像との対比. 第 105 回日本病理学会総会, 仙台国際センター会議棟・展示棟 (宮城県) 5/12-5/14, 2016
8. Kuroiwa Yasuyoshi, Yamashita Atsushi, et al. Low and Iso-Signal Intensities in T2 and T1 Weighted Images in Deep Vein Thrombus Reflect Organizing Reaction. 第 72 回日本放射線技術学会総会学術大会, パシフィコ横浜 (神奈川県), 4/14-4/17, 2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/pathophysiology/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 山下 篤

ローマ字氏名: YAMASHITA ATSUSHI

所属研究機関名: 宮崎大学

部局名: 医学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 90372797

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 内田 暁子

ローマ字氏名: UCHIDA AKIKO

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。