

令和 2 年 12 月 13 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12885

研究課題名(和文)天然アミノ酸を利用して動脈硬化を診断・治療する

研究課題名(英文) Can a natural amino acid be used for diagnosis and treatment for arteriosclerosis

研究代表者

守本 祐司 (Morimoto, Yuji)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・生理学・教授)

研究者番号：10449069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：天然のアミノ酸であり、ヘム合成経路の前駆物質である5-アミノレブリン酸を生体に投与すると、中間代謝物質であるポルフィリンが産生される。本研究では、動脈硬化プラークにおけるポルフィリン由来の蛍光を、画像解析技術(マルチスペクトルイメージングとスペクトルアンミキシング処理)を搭載した蛍光血管内視鏡システムによって検知する技術を確立した。さらに、内視鏡観察に関連する新しい技術開発として、深く狭い術野でも十分な視野を確保するための、標的臓器裏面を容易に観察できる内視鏡システムを創製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究開発の推進によって、以下のことが可能となる。5-アミノレブリン酸という生体内在性物質の利用による副作用のない安全な診断医療、蛍光マルチスペクトルイメージングとスペクトルアンミキシングの組み合わせ手法による標的物質の蛍光の定量計測、蛍光性の光増感物質であるポルフィリンによる動脈硬化プラークの診断

研究成果の概要(英文)：When 5-aminolevulinic acid, a naturally occurring amino acid and a precursor of the heme synthesis pathway, is administered to a living body, porphyrin, an intermediate metabolite, is produced. In this study, we established a technique for detecting porphyrin-derived fluorescence in atherosclerotic plaques using a fluorescence vascular endoscopy system equipped with image analysis technology (multispectral imaging and spectral unmixing processing). Furthermore, as a new technological development related to endoscopic observation, we developed an endoscopic system that can easily observe the backside of target organs to ensure a sufficient field of view even in a deep and narrow surgical field.

研究分野：生理学

キーワード：生体分子 生理活性

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化病巣におけるプラーク(血管内膜の肥厚性病変)の破綻は、急性心筋梗塞や塞栓性脳梗塞の主な原因となるため、これを検出することは臨床的に重要である。申請者らは、細径内視鏡を用いたプラークの診断技術の開発を進めてきた。現在までに、蛍光物質を定量的に計測できる蛍光マルチスペクトルイメージング(*1)とスペクトルアンミキシング機構(*2)を搭載した細径内視鏡システムを構築し、プラーク診断のための基盤技術を確認した(A-STEP H26【FS】探索タイプ、Org Biomol Chem (2014)12:8611)。また、正常血管に存在する内因性蛍光物質(FAD、コラーゲン等)を指標にしたプラークの定量的蛍光イメージングに成功している。しかしこの法は、プラーク部位を検知するというよりも「正常ではない」部位を検知する「ネガティブ」イメージング技術であった。これに対して申請者らは最近、ある天然アミノ酸を投与すると蛍光性の代謝物質がプラークに選択的に蓄積することを見出した。この、プラークの「ポジティブ」イメージングを可能にしたのは、5-アミノレブリン酸(ALA)という細胞内ヘム合成経路における出発物質であり、蛍光性の中間代謝物質であるプロトポルフィリンIX(PPIX)を産生する。申請者らはすでに、遺伝子改変による動脈硬化発症マウス(ApoE欠損アウトマウス等)にALAを経静脈投与するとプラークに一致したPPIX由来の蛍光を捕らえることに成功しており、プラークの早期発見ならびに病態の定量評価が可能であることを示唆する知見を得ている。

- *1 マルチスペクトルイメージング：取得する波長域を変えながら連続的にイメージ撮影することで、イメージ上の全ピクセルで、光のスペクトルデータを取得する方法。取得されたデータは、マルチスペクトルイメージと呼称される。本研究では蛍光のマルチスペクトルイメージを対象としている。
- *2 スペクトルアンミキシング：マルチスペクトルイメージ上の1つのピクセルにおけるスペクトルを複数物質に由来する光スペクトル情報が混合されたものと考え、混合スペクトルを分解し各物質の占有率を逆算すること。これにより目的とする物質の存在しているピクセルを知ることができる。

2. 研究の目的

天然のアミノ酸であり、ヘム合成経路の前駆物質である5-アミノレブリン酸を生体に投与すると、中間代謝物質であるポルフィリンが産生される。そこで、動脈硬化プラークにおけるポルフィリン由来の蛍光を、申請者らが開発した、最新の画像解析技術(マルチスペクトルイメージングとスペクトルアン

ミキシング処理)を搭載した蛍光血管内視鏡システムによって検知する技術を確認し、更にポルフィリンの光増感反応を利用したプラークの治療技術を構築する。

3. 研究の方法

3-1. ALA投与後に動脈硬化プラークで観察されるPPIX蛍光の局在部位を同定する

動脈硬化プラーク内のPPIX蛍光が観察される部位が組織内のいかなる構造物に由来するのかを調査した。研究代表者らは、動脈硬化プラークの形成過程においてマクロファージ(MΦ)が深く関与していることから、この蛍光がMΦに起因するとの仮説を立て、仮説検証を目的に以下の実験を行なった。

高コレステロール食を与えたLDL受容体ノックアウトマウス(LDL-KOマウス)にALAを静脈内投与した。数時間後に犠牲死させて大動脈のスライス試料を作製した。共焦点レーザー顕微鏡で蛍光イメージを撮像し、隣接したスライス標本にF4/80抗体によるMΦ染色を施し、MΦ局在の同定を行なった。

3-2. 動脈硬化プラークにおけるPPIX蛍光の細径内視鏡を用いたリアルタイムイメージング

研究代表者らは本申請に先立って、血管内腔をリアルタイムにイメージングできる血管蛍光内視鏡システムを開発した。本イメージングシステムは、外径0.8mmにして画素数が15000dpiと、画素密度が世界最高水準の高解像度細径内視鏡である(図1)。

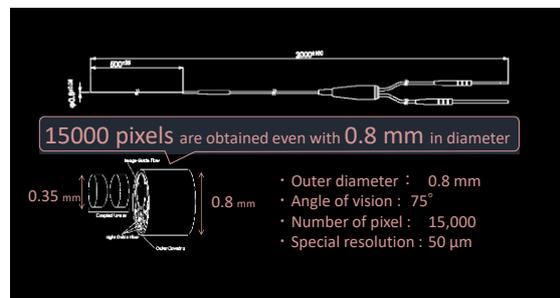


図1. 超細径内視鏡の構成図

麻酔下にあるマウスの腹部大動脈にカテーテル(18G)を留置したのち、開発した細径内視鏡を挿入して、ALA投与後のPPIX蛍光をリアルタイムにイメージングできるか検証した。

さらに病変描出の感度を向上させるべく、スペクトルアンミキシングによる蛍光抽出を行なった。

3-3. 細径内視鏡による病変観察を容易にするための技術開発

上記の開発研究と並行して、内視鏡観察に関連する新しい技術の開発を進めた。

深く狭い術野(とくに脳神経外科領域)では十分な視野を確保することが困難であり、

なかでも、神経・血管の裏面視認性はほとんど確保できない。そこで、術野裏側の観察を容易にし、側方視可能で吸引管に内部留置できる軟性の極細内視鏡システムを着想して開発を行った。

6000 dpi の画素数を持つ超細径ファイバー内視鏡（外径 0.75mm）（Visible, ファーバーテック）と吸引管（フジタ医科器械）とを一体化した内視鏡システム（FUEISA）を構築して、これを脳動脈瘤のクリッピング操作の前後に動脈瘤の裏面に挿入し、病変部周辺の解剖学的状態を観察した。対象とした患者は 21 名である。

4. 研究成果

4-1. ALA 投与後に動脈硬化プラークで観察される PPIX 蛍光の局在部位を同定する

動脈硬化プラークの内部において、F4/80 陽性部位と PPIX 蛍光部位が一致することが分かった（特異度 95%）（図 2）。

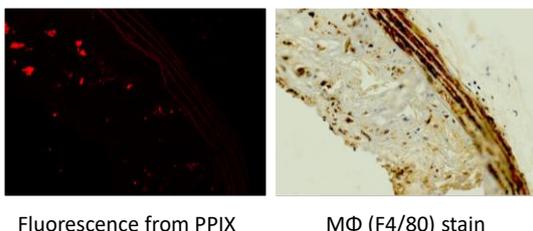


図2. 共焦点蛍光顕微鏡で撮影したPPIXの蛍光画像（左）と、MΦ染色画像（右）。蛍光の見られる部位とMΦ染色陽性部位とが一致している。

また、プラークの PPIX 蛍光部分の面積と MΦ 染色陽性部分の面積は高い正相関を示した（ $R = 0.68$ ）（図 3）。

本結果より、5-ALA 投与後の蛍光イメージングは動脈硬化プラークにおいてマクロファージを観察する特異的な手段になることが示唆された。

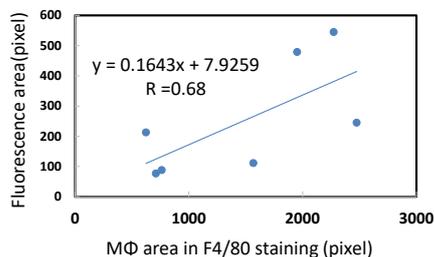


図3. 動脈硬化プラークのPPIX蛍光部分の面積とMΦ染色陽性部分の面積との関係。両者の間に高い正相関がみられる。

4-2. 動脈硬化プラークにおける PPIX 蛍光の細径内視鏡を用いたリアルタイムイメージング

図 4 に、血管内視鏡を用いて撮像した映像を示す。これは蛍光内視鏡で撮影した麻酔下にあるマウス大動脈内腔である。明視野イメージング（図 4 左）によって、白色の動脈硬

化プラークと思しき像が見れるが、周辺血管壁との異同が明確でない。ところが、蛍光観察モード（図 4 右）で画像化すると、プラークに一致すると推測される領域に局限した蛍光が観察できた。

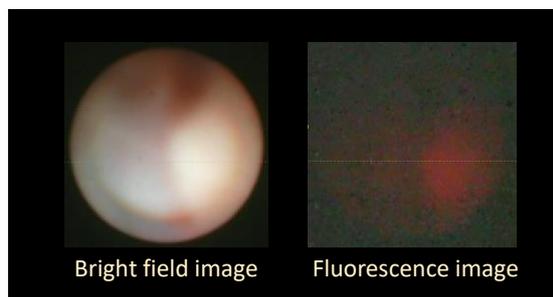


図4. LDL-KOマウスの大動脈内腔の内視鏡像。明視野イメージ（左）と蛍光イメージ（右）

しかしながら、病変と周辺血管壁との境界はさほど鮮明ではなかった。そこで、スペクトルアンミキシングを利用してイメージングを行った（図 5）。

図 5 右側上が蛍光イメージの明暗画像であり、右側下のイメージがスペクトルアンミキシングを施したあとの明暗画像である。単なる蛍光像との比較において、病変と周辺血管壁との境界がかなり明確に描写できた。1 秒程度のフラッシュレート（時間分解能）で画像化することができるので、病変を即時的に捉えることができたといえる。

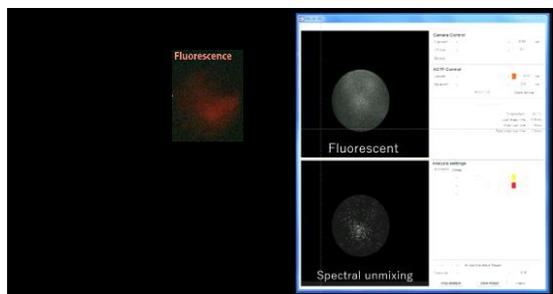


図5. 動脈硬化プラークにおけるPPIX蛍光抽出。蛍光イメージ（左）、蛍光の明暗イメージング（右上）、スペクトルアンミキシング後のイメージ（右下）

4-3. 細径内視鏡による病変観察を容易にするための技術開発

すべての症例において、FUEISA によって標的部位（脳動脈瘤の裏面）の観察に成功した。レンズ核線条体動脈、内側線条体動脈、および/または内頸動脈穿孔部を含む一般的な解剖学的可視化が可能であり、正しいクリップの位置および血管の状態を容易に確認することができた。また、脳動脈瘤クリップの固定位置が不適切であったことをこの内視鏡システムで見ることができた（1 例）。内視鏡システムに関連した合併症は発生しなかった。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. Ho C. S., Horiuchi T., Taniguchi H., Umetsu A., Hagisawa K., Iwaya K., Nakai K., Azmi A., Zulaziz N., Azhim A., Shinomiya N., Morimoto Y. Fluorescence multispectral imaging-based diagnostic system for atherosclerosis. *Biomed Eng Online* 15: 98 (2016).
2. Yamada K., Sato D., Nakamura T., Amano H., Morimoto Y. Unknown biological effects of L-glucose, ALA, and PUFA. *J Physiol Sci* 67: 539-548 (2017).
3. Otani N., Morimoto Y., Fujii K., Toyooka T., Wada K., Mori K. Flexible Ultrathin Endoscope Integrated with Irrigation Suction Apparatus for Assisting Microneurosurgery. *World Neurosurg* 108: 589-594 (2017).
4. 桐野泉, 青笹季文, 山本順司, 四ノ宮成祥, 上本伸二, 守本祐司. 5-アミノレブリン酸による創傷治癒促進と光照射によるさらなる増強効果. *日本レーザー医学会誌* 38: 451-456 (2018).
5. Hagisawa K., Ayaori M, Ikewaki K, Nakajima M, Morimoto Y. 5-Aminolevulinic Acid Attenuates Atherosclerotic Plaque Progression in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice by Heme Oxygenase-1 Induction. *Circulation Reports*.2(1):60-8 (2020)

[学会発表] (計8件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

守本祐司 (Morimoto, Yuji)

防衛医科大学校・生理学講座・教授

研究者番号：10449069

(2)研究分担者

大谷直樹 (Otani, Naoki)

防衛医科大学校・脳神経外科学講座・講師

研究者番号：20573637

萩沢康介 (Hagisawa, Kosuke)

防衛医科大学校・生理学講座・助教

研究者番号：50539244