

機関番号：32653  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20591463  
 研究課題名(和文) アイソトープ標識抗脂肪酸結合蛋白抗体を用いた心筋虚血の生態イメージングの研究  
 研究課題名(英文) Imaging of heart type fatty acid binding protein under acute reperfusion ischemia using radio-labeled antibody  
 研究代表者  
 百瀬 満 (MOMOSE MITSURU)  
 東京女子医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：40312029

研究成果の概要(和文)：脂肪酸結合蛋白(H-FABP)は高度の心筋虚血に伴い、心筋より涌出されるが、I-125 標識抗脂肪酸結合蛋白抗体(antiHFABP)を用いて、心筋虚血時の生態イメージングを行った。antiHFABPが急性虚血再灌流モデルにおいて認められた虚血部位の高度集積に一致して血流は低下、脂肪酸代謝は亢進していた。心臓由来の脂肪酸結合蛋白の一過性の発現の増加が心筋脂肪酸代謝の亢進を促した可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Heart-type fatty acid binding protein (H-FABP) which is a primary transporter of free fatty acid, accumulated specifically in reperfused area under acute ischemia, and it accorded to the area where fatty acid metabolism was activated.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,700,000 | 810,000   | 3,510,000 |
| 2009年度 | 700,000   | 210,000   | 910,000   |
| 2010年度 | 300,000   | 90,000    | 390,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：H-FABP, 抗体イメージング, I-125, 急性冠症候群, オートラジオグラフィ

## 1. 研究開始当初の背景

心筋は遊離脂肪酸の $\beta$ -酸化による脂肪酸代謝によりエネルギー産生を行っている。心筋由来脂肪酸結合蛋白(Heart-type fatty acid binding protein: H-FABP)は遊離脂肪酸の心筋トランスポーターとして重要な役割を担っており、CK-MB や心筋トロポニンT、

ミオシンなどと同様に心筋特異性が高いことが知られている。日常臨床では急性心筋梗塞・不安定狭心症での診断に有用な血液マーカーとして用いられ、抗 H-FABP 抗体を用いた ELISA 法による迅速定性検査が頻繁に行われている。しかし実際の心筋内分布や心筋脂

脂肪酸代謝における役割および動態、また虚血における動態の変化などについては不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は I-125 標識抗 H-FABP 抗体を用いて虚血心筋のイメージングを試みることである。またそれにより H-FABP の心筋内動態を評価し急性虚血性心筋障害における脂肪酸代謝の変化を明らかにするものである。

## 3. 研究の方法

(1) I-125 標識抗 H-FABP 抗体の標識  
抗体の標識は、抗 H-FABP 抗体にヨードジェン法を用いて I-125 標識抗 H-FABP 抗体 (antiHFABP) を作成した。

(2) antiHFABP の体内集積分布の検討  
オスの Wistar ラット 6-8 週 (200-300g) 5 匹を用いて 1MBq の antiHFABP を尾静脈より投与した。30 分後に屠殺し、体内臓器を分離し、それぞれの activity をウェルカウンターにより測定した。

(3) ラットを用いて以下の 3 つのモデルを作成し、モデル作成後に  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI,  $^{123}\text{I}$ -BMIPP および antiHFABP 標識抗体を投与した。①健常群 (Sham)。②心筋梗塞モデル (INRG) : 開胸し左前下行枝を結紮し、再灌流しない。結紮 1 時間後に antiHFABP を静注。③虚血再灌流モデル : 左前下行枝を結紮した後、20 分後に結紮を解除し 40 分後に antiHFABP を静注する。①-③いずれのモデルも投与 20 分後に sacrifice し、心臓を摘出し凍結標本を作成。μ-イメージャを用いてオートラジオグラフィーを施行し、Vision<sup>®</sup> で集積程度 (TUR=虚血領域/正常領域の集積)

の定量測定を行った。

(4) 免疫染色による虚血障害時における H-FABP の局在の同定 : 連続切片を用いて免疫染色を行った。3%ホルマリン固定後、一次抗体にイメージングで用いた H-FABP 抗体 (1:500) を用い、DAB 法を用いてウサギ由来の抗ラット IgG 二次抗体を用いて染色を行った。染色切片は光学顕微鏡を用いて 20 倍、400 倍で評価した。

## 4. 研究成果

(1) I-125 標識抗 H-FABP 抗体の標識率は 90% 前後と良好であった。

(2) 以下に antiHFABP の体内分布を示す (図 1)。

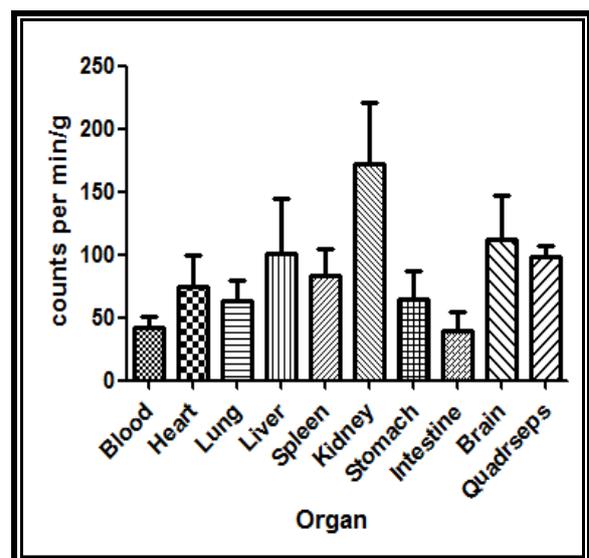


図 1. antiHFABP の体内分布

(3) 各モデルの TUR は Sham, INRG, IRG モデルでそれぞれ、antiHFABP :  $1.09 \pm 0.069$ ,  $0.22 \pm 0.073$ ,  $3.04 \pm 1.53$ ; MIBI :  $0.98 \pm 0.08$ ,  $0.12 \pm 0.01$ ,  $0.20 \pm 0.03$ ; BMIPP :  $1.00 \pm 0.09$ ,  $0.24 \pm 0.07$ ,  $2.78 \pm 1.28$  であった。IRG モデルの TUR は有意に Sham, INRG より高値 ( $p < 0.05$ ,  $0.01$ ) であったが、同部位で血流

は低下、脂肪酸代謝は有意に増加していた (図 2)。

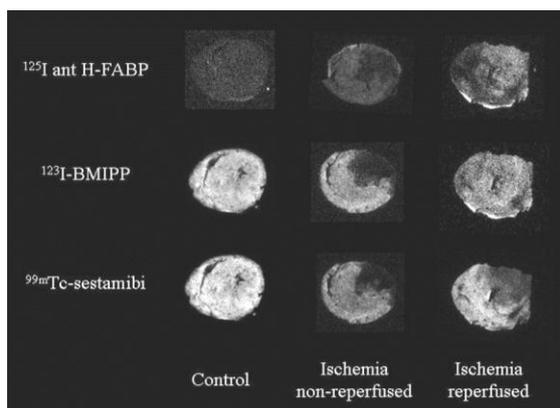


図 2. H-FABP, BMIPP, MIBI の心筋局所集積

antiH-FABP が虚血部位に特異的に集積するかどうかを確認するために、分子量が同等の non-specific Mouse IgG を I-125 で標識した薬剤を用いて、同様に静脈内投与を行ったところ、標識薬剤の虚血部位の集積は見られなかった (図 3)。

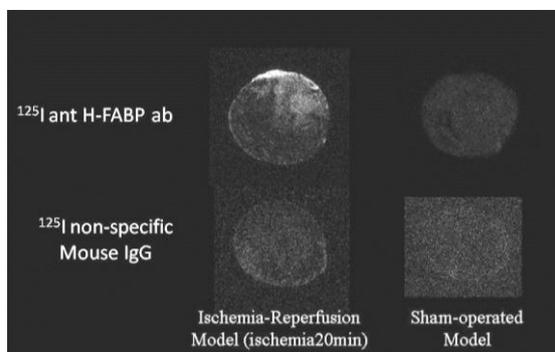


図 3. I-125 非特異的マウス IgG の局所集積

#### (4) 免疫染色による non-radiolabel H-FABP の局在の同定

20 倍では H-FABP 抗体は虚血部に分布しているのが確認され、400 倍では心筋および周辺の炎症細胞が染まっているのが確認された。その局在より I-125 標識抗 H-FABP 抗体の集積部位、即ち虚血再灌流部位に一致していた (図 4)。

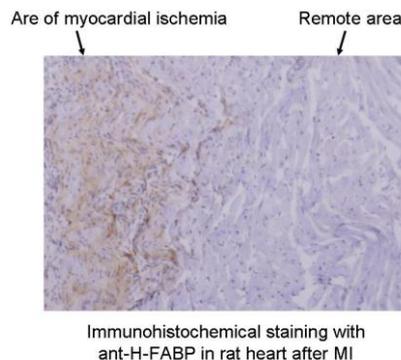


図 4. 免疫染色による H-FABP の局在

#### (5) 考察

過去の臨床研究においては、H-FABP は急性心筋梗塞発症後 1-2 時間で血中に出現し、その後 24-48 時間で消失するといわれている [1]。これまでの研究報告では H-FABP はマウスの心臓では心筋内・心筋細胞膜・血管内皮細胞に存在すると考えられており、虚血性障害により血中へ release されると考えられている [2]。Antohe らによる蛍光抗体組織染色では心筋および血管内皮細胞に H-FABP の発現が確認されている [3]。本研究でのラット心では I-125 標識抗 H-FABP 抗体は同様に集積すると考えられ、健常群ではまず非特異的な分布を示すと考えられる。マウスの心筋梗塞モデルを用いた基礎研究では H-FABP はトロポニン T よりも早期かつ鋭敏に検出され、さらに H-FABP の血中濃度は心筋梗塞サイズに比例すると報告されている [4]。従って、今回は検討されていないが、心筋梗塞慢性期モデルでは H-FABP の分布は梗塞部位で亢進しないと考えられる。一方、虚血急性期モデルでは脂肪酸代謝が一過性に亢進することが我々の研究でも明らかになっている。本研究でも、高度虚血領域に一致して脂肪酸代謝の亢進が見られた。そして同部位に一致して antiH-FABP が高集積を示したが、これは虚血に対する代償機転として H-FABP が

upregulation し、それに伴い脂肪酸代謝が相関して亢進した可能性がある。しかし、高度虚血により細胞から漏出した HFABP が虚血巣の細胞外組織に貯留し、そこに抗体が結合した可能性もある。いずれの機序で集積したかは今回の検討では十分には解明されておらず、今後の課題となった。いずれにしても antiH-FABP は急性冠症候群における虚血責任病変の領域に急性期に集積し、可視化することが可能であり、病態の重症度をより正確に評価できる可能性がある。

#### (6) 結論

antiHFABP が急性虚血再灌流モデルにおいて認められた虚血部位の高度集積に一致して血流は低下、脂肪酸代謝は亢進していた。心臓由来の脂肪酸結合蛋白の一過性の発現の増加が心筋脂肪酸代謝の亢進を促した可能性が考えられた。

#### (7) 参考文献

1. G. Haltern *et al.*, *Am J Cardiol* **105**, 1 (Jan 1, 2010).
2. L. C. Heather *et al.*, *Cardiovasc Res* **72**, 430 (Dec 1, 2006).
3. F. Antohe *et al.*, *Eur J Cell Biol* **76**, 102 (Jun, 1998).
4. W. M. Aartsen *et al.*, *Pflugers Arch* **439**, 416 (Feb, 2000).

#### 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 2 件)

- ① Fukushima K, Momose M, Kondo C, Hagiwara N, Sakai S. Fatty acid metabolism is accelerated immediately after reperfusion ischemia in the isolated rat

heart model. *Ann Nucl Med* 2011 (in press) 査読有

- ② Fukushima K, Momose M, Kondo C, Kusakabe K, Hagiwara N. Myocardial kinetics of Tc-99m sestamibi in hypertensive heart failure using isolated rat heart model. *Nucl Med Biol.* 2010; 37(8):1005-12 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 百瀬満, 福島賢慈, 金谷和子, 日下部きよ子 Imaging of <sup>125</sup>I-anti H-FABP antibody in acute ischemia-reperfusion rat heart. 第 73 回日本循環器学会総会学術集会 2009/3/20
- ② Kenji Fukushima, Mitsuru Momose, Kazuko Kanaya, Chisato Kondo, Kiyoko Kusakabe, Nobuhisa Hagiwara. <sup>125</sup>I-anti H-FABP Antibody Imaging in Acute Reperfusion Ischemia in Rat Heart. American Heart Association Scientific Sessions 2008, 2008/11/12, USA

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

百瀬 満 (MOMOSE MITSURU)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号：40312029