

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 25日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791181

研究課題名（和文） 動脈硬化不安定プラークを特異的に検出する分子標的イメージング剤の開発

研究課題名（英文） Development of a molecular imaging probe for vulnerable plaque imaging

研究代表者

小川 美香子（OGAWA MIKAKO）

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・准教授

研究者番号：20344351

研究成果の概要（和文）：動脈硬化病変に生じる不安定プラークは、破綻し血管を閉塞させ脳梗塞・心筋梗塞などを引き起こすため、早期に検出し治療を行うことが重要である。そこで本研究では、不安定プラークへの特異性が高い分子イメージング剤の開発を機能性リポソームを用いて行った。この結果、ホスファチジルセリンにより修飾したリポソームを用いることで、不安定プラークに多く存在するマクロファージを標的としたイメージングに成功し、動脈硬化モデル動物を用いて病変を画像化することができた。

研究成果の概要（英文）：The rupture of atherosclerotic vulnerable plaques and the subsequent formation of thrombi are the main factors responsible for myocardial and cerebral infarctions. Macrophage infiltration is characteristics for atherosclerotic vulnerable plaques. Macrophages recognize phosphatidylserine (PS) that is exposed on the cell surface of the apoptotic cells to phagocytize these cells. In this study, we prepared PS liposomes for detection of vulnerable plaques. As a result, the atherosclerotic region was detected by this imaging probe.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子イメージング

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：動脈硬化・分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪の蓄積、高血圧、高血糖、高脂血症を特徴とする『メタボリックシンドローム』が、心筋梗塞や脳梗塞といった動脈硬化性疾患の発症要因となるマルチプルリスクファクター症候群として提唱され、適切な対策が求められている。

動脈硬化病変に生じるプラークは、破綻しに

くい安定なもの、破綻しやすい不安定なものに分類される。不安定プラークは、破綻、血栓形成、血管内腔の狭窄・閉塞という一連の病態を引き起こし、動脈硬化性疾患発症の原因となる。一方、動脈硬化病変が進行しても安定プラークであればこのような病態を生じない。したがって、動脈硬化性疾患の予防のためには、不安定プラークを早期に検出

し治療を行うことが重要となる。

不安定プラークの特徴として、①脂質に富む粥腫②繊維性被膜の脆弱化③マクロファージなどの炎症性細胞の浸潤が挙げられる。安定プラークでは、繊維性組織による内膜の肥厚は認められるものの、マクロファージの浸潤はほとんど無い。

すなわち、血管内腔体積はプラークの安定性に関与しないため、従来の血管造影などの狭窄度を測定する手法ではプラークの安定性を判断できない。最近、国内外で超音波、CT、MRI といった形態学的診断法による不安定プラークの検出が試みられている。これらは動脈硬化病変の石灰化や不安定プラークに蓄積した脂質を画像化しようとするものであるが、不安定プラークの破綻にはこれらの形態的な特徴よりもむしろ、マクロファージによる炎症反応など形態的には現れない形質的变化が直接的な原因となると報告されている。

最近、生体内の分子の動きを *in vivo* で非侵襲的にイメージングすることができる『分子イメージング』が注目されている。『分子イメージング』によれば、プラークの不安定性に直接関わる生化学的、生理学的反応を画像化することができるため、上記の形態学的診断法とは異なり、炎症反応などの不安定性にかかわる分子の変化を指標にした、機能診断が可能となると考えられる。

最近我々は、マクロファージは糖代謝が活発であることに着目し、PET 用糖代謝イメージング剤¹⁸F]FDG を用いて動脈硬化モデル動物である WHHL ウサギにおいて不安定プラークを描出することに成功した。

これを基に国内外で¹⁸F]FDG-PET の臨床検討が精力的に行われつつあるが、これに伴い、

1. ¹⁸F]FDG はその集積が血糖値に影響を受けるため、動脈硬化発症要因である糖尿病での検出に困難である可能性がある。

2. ¹⁸F]FDG は悪性腫瘍など他の病変にも集積し、また、エネルギー活動度の高い正常細胞にも集積するため、不安定プラークイメージング剤としての特異性に劣る。といった問題点が明らかとなってきた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでの研究結果を踏まえ、他の病態に影響を受けることなく不安定プラークへの特異性が高い分子イメージング剤の開発を目指すこととした。このために、不安定プラークを標的した機能性リポソームでの実現を試みた。すなわち、不安定プラークへの分子標的部位、核医学イメージングのための放射性標識部位、光イメージングのための蛍光標識部位を導入した、分子イメージング剤を機能性リポソームを用いて

作成した。

3. 研究の方法

(1) 分子標的部位を導入したリポソームの作成

不安定プラークに浸潤しているマクロファージはフォスファチジルセリン(PS)を認識し取り込む性質があることが知られているため、リポソーム構成分子として PS を導入することとした。

DSPC: DSPE: chol = 1:1:1 にて脂質を混合し、クロロホルムに溶解させ、フラスコに薄膜を作成した。これを、10 mM NTA が入った 30 mM HEPES / 5% mannitol buffer で 60 度にてゆっくり膨潤させた。得られた溶液をエクストルーダにとおし、100 nm または 200 nm の粒径のリポソームを作成した(PS100, PS200 リポソーム)。なお、コントロール実験のため、フォスファチジルコリンのみからなるリポソーム(DSPC: chol = 2:1、PC100, PC200 リポソーム)も作成した。

(2) 放射性標識部位の導入

作成した NTA 内包リポソームに ¹¹¹InCl₃, 51 mM Oxine (in EtOH)、2 M AcONa buffer 混合溶液を加え、キレート剤 Oxine と NTA の交換反応により、リポソームを ¹¹¹In 標識した。

得られた ¹¹¹In 標識リポソームは超遠心後、生理食塩水で最懸濁することにより回収した。

(3) マウス腹腔マクロファージを用いた、取り込みの定量評価

マウス腹腔にチオグリコレート培地を 2 mL 投与した。3 日後に ice-cold PBS 8 mL にて腹腔マクロファージを回収し 30 mm ディッシュに播種し、DMEM 培地中 CO₂ インキュベータ内で 24 時間培養した。

¹¹¹In-PC100, ¹¹¹In-PS100, ¹¹¹In-PC200, ¹¹¹In-PS200 を 37 kBq ずつそれぞれのディッシュに添加し、37°C にて 2 時間、CO₂ インキュベータ中にて静置した。2 時間後、培地を取り除き、細胞を PBS にて洗浄し、これらを合わせて上清とした。細胞は、0.35 mL の PBS を加えたのち、ディッシュの底から掻き取り回収した。これを 2 回繰り返すことにより細胞液を得た。ガンマカウンタにて上清と細胞液の放射能を測定し、細胞への各リポソームの取り込み量を求めた。なお、カウント測定後、細胞液のタンパク濃度を測定し、結果はタンパク量あたりの取り込み量で表示した。また、比較のため、¹¹¹InCl を用いて同様に検討を行った。

(4) 動脈硬化モデル動物 WHHL ウサギでの SPECT イメージング

¹¹¹In 標識リポソームを WHHL ウサギの耳静脈から 74 MBq 投与し、投与 2, 24, 48 時間後に、動物用 SPECT 装置にて 1 時間 SPECT 撮像を行った。

なお、48 時間の SPECT 撮像後、ウサギを屠殺し大動脈を摘出した。摘出した大動脈は、胸骨の番号を指標に 11 個の部位に分け、それぞれドライアイスにて凍結した。各ブロックから連続凍結切片を作成し、オートラジオグラフィ(ARG)、Oil-Red O 染色、Azan 染色、RAM-11 抗体を用いたマクロファージの免疫組織染色を行った。

(5) 蛍光標識部位の導入

TAMRA または ICG を注射用水に溶解し、(1)と同様に作成した脂質の薄膜を施したフラスコに加え、凍結融解法によりリポソームに封入した。得られたリポソームは超遠心により回収し、1 mL の生理食塩水に懸濁した。

(6) 培養マクロファージでの蛍光観察

蛍光標識リポソームをマウス腹腔マクロファージを培養したディッシュに加え、1 時間後に蛍光顕微鏡にて観察した。

(7) apoE ノックアウトマウスでの蛍光イメージング

ICG-リポソームを apoE ノックアウトマウスの尾静脈より投与し、2 時間後に血管を摘出した。摘出した血管は、蛍光イメージング装置にて撮影し、蛍光画像を得た後に、Oil-Red O 染色を施した。

4. 研究成果

(1) 放射性標識機能性リポソームのマクロファージへの取り込み

培養マクロファージへの取り込みは、図 1 に示すとおり、¹¹¹In-PS100 で最も高いものとなり、また、PS リポソームでは PC リポソームに比較し有意に高い取り込みを示し、PS によるマクロファージへのターゲティングが所期のとおりなされていることが示された。¹¹¹InCl のマクロファージへの取り込みはほとんど認められなかった。

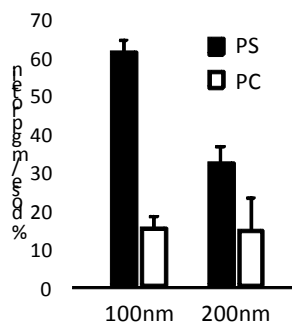
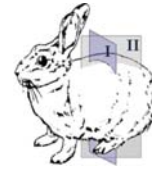


図 1 培養マクロファージへの取り込み

(2) 動脈硬化モデル動物 WHHL ウサギでの SPECT イメージング

WHHL ウサギにより SPECT イメージングを行ったところ、図 2 に示すように、大動脈が描出された。なお、病変は不安定プラークであることが組織染色により確認された。



Sagittal (II)

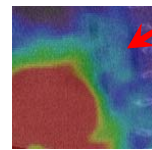
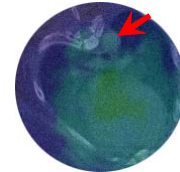


図 2

WHHL ウサギでの SPECT/CT 重ね合わせ画像。赤矢印は大動脈を示す。

Transaxial (I)



48hr after the iv injection, 74 MBq

(3) 蛍光標識リポソームの作成

TAMRA, ICG リポソームを作成することに成功した。また、ICG を高濃度にて封入することで、濃度消光により ICG 蛍光が減弱していることが示された (図 3)。蛍光はリポソームを破壊することにより復活し、約 4 倍の蛍光のアクチベーションが認められた。

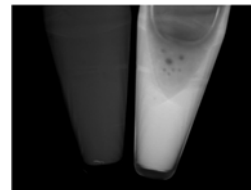


図 3 ICG-リポソームの蛍光像

ICG をリポソームに封入することにより蛍光が減弱した (左)。また、リポソームを破壊することにより、蛍光を発するようになった (右)。

(4) 培養マウス腹腔マクロファージでの蛍光観察

図 4 に示すように、マクロファージ内にて蛍光を発した。

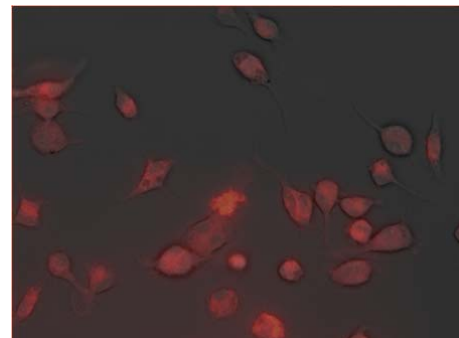


図 4 培養マクロファージでの蛍光像

(5) apoE ノックアウトマウスでの蛍光イメージング

apoE ノックアウトマウスを用いて蛍光イメージングを行ったところ、図 5 に示すように動脈硬化病変に一致した蛍光像が得られた。



図 5 apoE ノックアウトマウスでの蛍光イメージング画像

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 1 1 件)

- ① Ogawa M, Nakamura S, Saito Y, Kosugi M, Magata Y., What can be seen by ^{18}F -FDG PET in atherosclerosis imaging? The effect of foam cell formation on ^{18}F -FDG uptake to macrophages in vitro. J Nucl Med. 2012;53(1):55-8. 査読あり

[学会発表] (計 2 3 件)

- ① 小川 美香子、インビボ分子イメージングによる生体機能解析、次世代医工学研究会、2012 年 3 月 16 日、浜松
- ② 小川 美香子、マルチモダル分子イメージングによる生体機能解析、震災復興分子イメージング化学シンポジウム、2012 年 3 月 6 日、仙台
- ③ 小川 美香子、動脈硬化の分子イメージング～核医学を中心に～基礎編、第 24 回 21 世紀カンファレンス、2011 年 9 月 3 日、福岡
- ④ Ogawa M. et al., Effect of macrophage foam cell formation on ^{18}F -FDG uptake in atherosclerotic plaques, Society of Nuclear Medicine Annual Meeting, 2011 年 6 月 7 日, San Antonio
- ⑤ 小川 美香子ら、不安定プラークイメージングにおける ^{18}F -FDG-PET 画像の意義、日本分子イメージング学会、2011 年 5 月 26 日、神戸
- ⑥ Ogawa M. et al., Changes in hexokinase

activity by macrophage foam cell formation affect the ^{18}F -FDG uptake in atherosclerotic plaques, ATVB2011, 2011 年 4 月 28 日, Chicago

- ⑦ 小川 美香子、動脈硬化の分子イメージング、第 50 回日本核医学会学術総会、2010 年 11 月 13 日、大宮
- ⑧ Ogawa M. et al., Effect of foam cell formation on ^{18}F -FDG uptake to macrophages in atherosclerosis, World Molecular Imaging Congress 2010, 2010 年 9 月 8 日, 京都
- ⑨ 小川 美香子、動脈硬化イメージングの基礎、東海循環器画像研究会、2010 年 7 月 24 日、名古屋
- ⑩ 小川 美香子ら、What can be seen by ^{18}F -FDG-PET?: Changes in ^{18}F -FDG uptake by foam cell formation、第 42 回 日本動脈硬化学会、2010 年 7 月 14 日、岐阜
- ⑪ 小川 美香子、有機化学を駆使した新しい分子イメージングー本シンポジウム企画意図説明およびマルチモダル分子イメージングプローブ、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月、岡山
- ⑫ 小川 美香子、マウスでもわかるマルチモダリティ・イメージングーOptical imaging は PET を越えるか?ー、第 3 回小動物インビボイメージング研究会、2010 年 1 月、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 美香子 (OGAWA MIKAKO)

浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・准教授

研究者番号：20344351