

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591756

研究課題名(和文) 虚血心筋障害、リモデリングにおける心筋間質の病態と血管新生の画像化に関する研究

研究課題名(英文) Interstitial pathophysiology and angiogenesis and its imaging in myocardial ischemia and remodeling

研究代表者

瀧 淳一(Taki, Junichi)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：10251927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：ラット心筋虚血再還流モデルにおいて、C-14-methionineを用い、その経時的空間的集積の動態を病理組織学的所見と対比検討した。メチオニン集積は虚血領域の中心部を主体に、ほぼTl-201の集積低下部に一致して再還流3日で最大となり、その後漸減し4週後以降は正常部とほぼ同等の集積となった。病理学的にはその集積は浸潤したマクロファージの分布(CD68陽性細胞)と一致し、血管新生に関するmyofibroblast(SMA陽性細胞)とは相関しなかった。メチオニンイメージは梗塞後の炎症反応の評価に有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the serial changes and mechanisms of C-14-methionine uptake in a rat model of myocardial ischemia and reperfusion. Both C-14-methionine and Tl-201 uptake were reduced in the area at risk at 1 day after reperfusion. However, 3 days after reperfusion, an increased C-14-methionine uptake was observed corresponding to the area of still reduced Tl-201 uptake, and the C-14-methionine uptake gradually declined until 28 days. The C-14-methionine uptake area at 3-7 days corresponded well to the macrophage infiltrations demonstrated by positive CD68 staining. Anti alpha-SMA staining appeared at 7 days, after which CD68 staining was gradually replaced by the SMA staining, suggesting that methionine uptake in the early phase after ischemia and reperfusion might reflect inflammatory activity. Methionine imaging may be useful for inflammatory imaging early after myocardial infarction.

研究分野：核医学

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：心筋虚血 心筋梗塞 メチオニン 血管新生 リモデリング マクロファージ 心筋繊維芽細胞 テネイシンC

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞における病態画像に関する従来からの研究では、梗塞の大きさや、血行動態の観察により心筋全体の変化を解析しようとするものであった。その後心筋細胞そのものの病理学的、機能的な変化を直接的に検討することに虚血後の心筋障害をより詳細に検討できるようになった。我々は以前の研究で心筋細胞の直接的な変化を心筋壊死の過程ではなく、心筋アポトーシスの観点から Tc-99m-annexin V を用いて検討した。その結果、心筋のアポトーシスは心筋障害に大きな意義を持ち、その病態は虚血後 1 時間以内から数日の間にダイナミックに変化することを突き止めた。この研究は高く評価され、発表した Journal of Nuclear Medicine の表紙を飾ることとなった (J Nucl Med. 2004;45:1536-1541)。さらに心筋細胞のアポトーシスは虚血時間に依存し、種々のインターベンションで軽減できることを核医学画像にて示してきた (J Nucl Med 2007;48:1301-1307 、 Circ J 2007;71:1141-1146)。しかしながら心筋組織は心筋細胞のみで構築されているのではなく間質系の組織も無視できない構成成分である。特に心筋梗塞急性期を乗り切った患者は慢性期に、心室のリモデリングによる心不全の脅威に晒され、臨床の場で大きな問題となっている。この病態には心筋細胞のアポトーシスの関与に加え、間質組織の変化も重要であることが近年示唆されている。特に細胞外マトリックス糖タンパク質であるテネイシン C は間質組織の変化に重要な役割をはたしていると推測されている。そこで我々はラット虚血再還流モデルを用い、テネイシン C の発現の画像化を I-125 標識抗テネイシン C 抗体を用いて検討してきた。その結果 20 分虚血再還流では 3 日後にテネイシン C 発現がピークを示し 7 日で消退するが、より強い 30 分虚血ではその発現が 14 日後でも弱いな

がら持続することが判明した (J Nucl Med. 2010;51:1116-1122)。病理学的にはこの集積は虚血領域内に不均一に散在するが、特に正常心筋組織と梗塞心筋組織の移行部で強く認められた。

これらの研究をふまえ、間質のリモデリングに関連するテネイシン C に加え、血管新生が心筋リモデリングにはたす役割も十分に検討する必要があると考えるに至った。そこで血管新生の直接的指標となりうる Galactro-RGD とアミノ酸トランスポート、蛋白合成を反映することで間接的な血管新生の指標となる可能性が期待される標識メチオニンを用い、空間的時期的変化を核医学的画像として表現し、その病態変化を相互に関連づけて評価することで新たな分子イメージングの可能性を追求することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究は心筋虚血再還流後の心筋組織の変化を、その再生過程に焦点を当て検討しようとするものである。心筋虚血後の治癒再構築過程で心筋間質のリモデリングならびに血管新生の出現過程を経時的に画像化する機能画像診断法の確立を目的とした核医学的研究である。細胞外マトリックス糖タンパク質、血管新生の直接的指標であるインテグリン、アミノ酸トランスポートと蛋白合成を介して間接的に血管新生を反映する可能性のあるメチオニンを RI 標識し、その動態画像を解析する。心筋間質組織の病態変化を病理組織標本と詳細に比較し C-14 標識メチオニン画像のもつ意義を精査し、臨床応用を目指す研究である。

3. 研究の方法

C-14 標識メチオニンを、虚血再還流ラットに投与しオートラジオグラフィにてその集積を定量化することでメチオニン集積の経時

的、空間的分布を検討した。

虚血時間は心筋梗塞を生じるように 30 分とし、再還流 1、3、7、14、28 日、3、6 月後にトレーサ分布を評価した。それぞれの再還流後の時点において、まず C-14 メチオニン 0.74MBq を投与しその 10 分後に心筋 viability 評価を目的として Tl-201 14.8Mq を投与した。さらに 10 分後に、左冠動脈の閉塞のために使用した糸を再度結紮し、直後に Tc-99m-MIBI 150-180MBq を投与し 1 分後に屠殺した。これは虚血時の area at risk を描出するための処置である。摘出した心筋の 20 μ 厚の短軸切片をオートラジオグラフィ用に作成し、その隣接する 5 μ 厚の切片を病理組織学的検索に用いた。最初のイメージングプレートでの露出にて Tc-99m-MIBI の分布、すなわち左冠動脈結紮時の心筋血流分布(虚血領域、area at risk)を画像化した。ついで 3 日後の露出にて心筋 viability を反映する Tl-201 の分布を画像化した。1 月後の露出にて C-14 メチオニンの分布画像を得た。

Postconditioning(PC) が心筋のメチオニン集積に及ぼす影響の検討では 30 分虚血再還流 1,3,7,14,28 日のモデルにて同様にオートラジオグラフィを行った。PC は再還流時に 10 秒間の灌流、10 秒間の閉塞を 6 回繰り返すことで行った。

病理組織学的検討は通常の HE 染色に加え、免疫組織染色にてマクロファージ、心筋繊維芽細胞の分布を検討した。マクロファージは抗 CD68 マクロファージ抗体、心筋繊維芽細胞は抗平滑筋 α -actin 抗体にて染まる細胞として評価した。

4 . 研究成果

視覚的評価では 30 分虚血再還流 1 日後では area at risk 内の Tl-201 と C-14 メチオニンの集積は共に非虚血部の集積と比べ低下していた。しかし、再還流 3 日では Tl-201 の集積は依然として低い、その部にほぼ一致

してメチオニン集積は有意に増加した。以後 Tl-201 の集積低下部にほぼ一致するように b 分布したメチオニン集積は漸減した。従ってその集積は心筋 viability 低下部への集積と判定され、心筋細胞以外の間質組織への集積であろうと考えられた。Tc-99m-MIBI の血流欠損部(area at risk)に相当する関心領域(ROI)における、正常血流部に対する Tl-201、C-14-methionine の集積比は、再還流 1 日後ではそれぞれ、 0.35 ± 0.13 , 0.71 ± 0.13 といずれも減少していた。しかしながら再還流 3 日目には Tl-201 の集積は 0.66 ± 0.10 へと改善したが依然として正常部に比べ大きく低下していた。しかるに C-14-methionine は 1.79 ± 0.23 と大きく増加していた。その後 Tl-201 の集積比は 6 か月まで 0.7-0.55 の間でおおむね一定していたが、C-14-methionine の集積は 7 日で 1.52 ± 0.20 、14 日で 1.31 ± 0.12 、28 日で 1.12 ± 0.08 と徐々に低下し、3、6 月ではそれぞれ 1.03 ± 0.04 、 0.94 ± 0.04 とほとんど正常部と同等となった。以上より梗塞亜急性期に methionine 集積が増加することが判明した。

病理組織学的検討では、どのような細胞にメチオニンが集積しているかを検討するためにマクロファージに対する CD68 抗体と血管新生に関与する myofibroblast に対する抗 SMA 抗体ならびに心筋のマーカーである抗トロポニン I 抗体による免疫組織染色を施行し比較した。その結果、再還流 3 日では心筋細胞間に浸潤したマクロファージが主体で、

SMA 陽性の myofibroblast はほとんど認めなかった。7 日ではマクロファージ浸潤が依然として主体であったが、有意に myofibroblast が出現していた。14 日ではマクロファージは減少し、myofibroblast が相対的に増加していた。以上の経過から、虚血再還流による心筋梗塞の亜急性期のメチオニン集積はマクロファージに主に集積していると考えられた。

治療的介入として虚血後の再還流時の Postconditioning (PC)がメチオニンの集積に及ぼす影響に関する検討の結果は以下のごとくであった。再還流1日後ではPCの有無にかかわらずメチオニンの集積が低く(正常灌流部に対する虚血部のカウント比: PCなし 0.74 ± 0.12 vs PCあり 0.78 ± 0.11 , $P=ns$)、病理学的には好中球等の炎症細胞浸潤が始まる時期であった。メチオニン集積は再還流3日後に増加し、ピークを示したがPCにより集積は抑制されなかった(PCなし 1.72 ± 0.12 vs PCあり 1.64 ± 0.24 , $P=ns$)。しかし7日(PCなし 1.44 ± 0.13 vs PCあり 1.20 ± 0.21 , $P < 0.05$)、14日(PCなし 1.25 ± 0.04 vs PCあり 1.08 ± 0.09 , $P < 0.005$)、は有意にPCによりメチオニン集積は抑制された。PCの有無にかかわらず病理組織学的には、再還流3日では心筋細胞間に浸潤したマクロファージ(CD68抗体陽性細胞)が主体で、SMA陽性のmyofibroblastはほとんど認めなかった。7日ではマクロファージ浸潤が依然として主体であったが、有意にmyofibroblastが出現していた。14日ではマクロファージは減少し、特にPCではほとんど認めず、myofibroblastが相対的に増加していた。

今回の研究での最も重要な知見は、ラット心筋虚血再還流モデルにおけるC-14-methionineの集積は、心筋梗塞による心筋 viability 低下部にほぼ一致して再還流3日後にピークとなりその後漸減すること。そしてその集積は脳腫瘍等でいわれてきたangiogenesisとの関連は証明されず、病理組織学的にマクロファージの浸潤にほぼ一致していたことである。従ってメチオニンイメージングは梗塞後の炎症反応の評価に応用可能であることが示唆された。

また、本研究では病理組織学的変化と放射性アイソトープで標識したトレーサ集積と比較検討したが、それぞれの手法の利点が浮き

ぼりとなった。病理組織学的検討ではマクロファージやmyofibroblastの空間的浸潤度、経時的経過が詳細に検討できるが、その全体像の把握は困難を伴う。すなわちその分布は大まかに把握できるものの、定量化はかなり難しいといわざるおえない。その一方で核医学イメージングは空間的な集積分布の把握が簡単にできることに加え、定量化がカウントを計測することできわめてシンプルにできる利点があったため認識された。将来的に生体での体外イメージングの検討が必要だが、この利点を生かした臨床応用が望まれる。

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 9 件)

- Taki, J., Wakabayashi, H., Inaki, A., Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Ogawa, K., Morooka M., Kubota K., Shiba, K., Yoshida, T., Kinuya, S. ¹⁴C-Methionine Uptake as a Potential Marker of Inflammatory Process after Myocardial Ischemia and Reperfusion. J Nucl Med 54 (2013), 431-436, 査読あり
- Taki J., Matsunari I., Wakabayashi H., Inaki A., Kinuya S. Editorial: Potential utility of ^{99m}Tc-annexin V imaging in ischemically damaged myocardium. Intv Cardiol 2 (2011), 765-767, 査読あり.

〔学会発表〕(計 20 件)

- Taki, J., Wakabayashi, H., Imanaka-Yoshida, K., Matsunari, I., Hiroe, M. C-14-Methionine Accumulation as a Potential Marker of Inflammatory Process after Myocardial Ischemia and Reperfusion. The 77th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2013. 3. 15, (Yokohama)
- Taki, J., Wakabayashi, H., Inaki, A., Imanaka-Yoshida, K., Hiroe, M., Ogawa,

K., Shiba, K., Kinuya, S. ¹
Postconditioning attenuates interstitial
tissue remodeling in a rat model of severe
ischemia and reperfusion: Assessment by
I-125-anti tenascin-C antibody imaging.
59th Annual Meeting of the Society of
Nuclear Medicine, 2012. 6. 12, Miami
Beach Convention Center (USA)
Taki, J., Wakabayashi, H., Inaki, A., Ogawa,
K., Shiba, K., Morooka, M., Kubota, K.,
Hiroe, M., Kinuya, S. Spatial and temporal
change of C-14-methionine uptake in a rat
model of acute ischemia and reperfusion.
58th Annual Meeting of the Society of
Nuclear Medicine, 2011. 6. 6, San Antonio
Convention Center (USA)

〔図書〕(計 3 件)

Taki, J., Matsunari, I., Wakabayashi, H.,
Inaki, A., Kinuya, S. Role of Fatty Acid
Imaging with ¹²³I- p-¹²³I-Iodophenyle
-Pentadecanoic Acid (¹²³I-BMIPP) in
Ischemic Heart Diseases. INTECH,
Ischemic Heart Disease, 2013, 175-200.

Taki, J., Wakabayashi, H., Inaki, A.,
Matsunari, I., Kinuya, S. Apoptosis
Imaging in Diseased Myocardium.
INTECH, 12 Chapters in Nuclear Medicine,
2011, 251-264.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

瀧 淳一 (TAKI JUNICHI)
金沢大学・大学病院・講師
研究者番号：10251927

(2)研究分担者

柴 和弘 (SHIBA KAZUHIRO)
金沢大学・学際科学実験センター・教授
研究者番号：40143929

小川数馬 (OGAWA KAZUMA)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号：30347471