

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659573
 研究課題名（和文）
 不安定プラークの早期・特異的同定：プレターゲティング法による組織因子イメージング
 研究課題名（英文）
 Early and specific detection of unstable atherosclerotic plaques: Tissue factor imaging using pre-targeting systems
 研究代表者
 久下 裕司（KUGE YUJI）
 北海道大学・アイソトープ総合センター・教授
 研究者番号：70321958

研究成果の概要（和文）：

組織因子(TF)の選択的な描出により不安定な動脈硬化プラークを特異的に検出する新しい核医学イメージング法の構築のための研究を行った。その結果、①¹⁸F 標識ビオチン誘導体の合成法、②モデル動物における PET 撮像条件・TF 発現、③抗ウサギ TF 抗体の動脈硬化病変への集積性、④抗ウサギ TF 抗体の血液からのクリアランスに関する知見を得た。本研究により、TF イメージングのための基盤的技術の構築が出来た。

研究成果の概要（英文）：

We performed several experiments to establish a new nuclear medicine technique for imaging unstable atherosclerotic plaques through specific detection of tissue factor (TF). Consequently, we obtained several new findings concerning: 1) synthesis methods of ¹⁸F-labeled biotin-derivative, 2) PET imaging protocols and TF expression levels in our rabbit model, 3) accumulation of anti-rabbit TF monoclonal antibody in atherosclerotic lesions, and 4) blood clearance of anti-rabbit TF monoclonal antibody. These findings provided important information to establish a new nuclear medicine technique for TF imaging.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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：(1)放射線 (2)核医学診断 (3)動脈硬化 (4)不安定プラーク (5)組織因子

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞の根幹的原因である“動脈内のプラーク”の不安定性を精度よく評価できる診断法の開発が臨床画像診断学の急務である。超音波診断法、MRI、CT は、形態的診断が主で、質的診断に有効な方法は開発されていない。質的診断に優れる核医学イメージング法(PET, SPECT)では、¹⁸F-FDG

のマクロファージへの集積や ^{99m}Tc-annexin V のアポトーシス細胞への集積を指標とする不安定性評価が、申請者らを含めた多くのグループで試みられている。しかし、¹⁸F-FDG、^{99m}Tc-annexin V は、初期・進行病変への集積も高く、不安定病変の特異的検出に優れたイメージング剤の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、プレターゲット法を取り入れ、動脈内プラークの破綻とそれに伴う血栓形成に深く関与する組織因子(Tissue Factor, TF)の選択的な描出により不安定プラーク(粥状動脈硬化巣)を特異的に検出する新しい核医学イメージング法を提案することにある。

3. 研究の方法

(1) anti-TF-mAb-SAv/¹⁸F-FBB のシステムの合成検討

¹⁸F 標識ビオチン誘導体 ¹⁸F-FBB は、プレターゲットユニットである anti-TF-mAb-SAv と高い親和性を持つポストプローブであるが、¹⁸F の半減期が約 2 時間であるため迅速な合成が必要である。この ¹⁸F-FBB の標識前駆体である ¹⁸F 標識スクシンイミド誘導体 ¹⁸F-SFB の迅速、高品質な合成のため、目的物の精製方法(固相抽出精製、HPLC 精製)について検討した。

¹⁸F-SFB は、以下の方法により標識合成を実施した。1 mL の無水 MeCN に溶解した 4-(Ethoxycarbonyl)-*N,N,N'*trimethylbenzenaminium triflate (4.3 mg, 12 μmol) を乾燥させた [K/K₂₂₂]¹⁸F に加え 90°C で 10 分加熱した。反応混合物は室温まで冷却した。次に 50 μL の無水 MeCN に溶解した Tetrapropylammonium hydroxide (TPAH, 20 μL, 20 μmol) を加え、120°C で 2 分加熱した。N₂ ガス気流下で加熱し溶媒を留去後、反応混合物を室温まで冷却した。1 mL の無水 MeCN に溶解した *O*-(*N*-Succinimidyl)-*N,N,N',N'*tetramethyluronium tetrafluoroborate (TSTU, 15 mg, 50 μmol) を加え、90°C で 5 分加熱した。

得られた反応混合物は、固相抽出 (SPE) 精製及び HPLC 精製により単離精製した。SPE 精製は、C18 と alumina N および strong cation exchange カートリッジを使用し、反応混合物は 2% AcOH により希釈し、これらカートリッジを通過させた。10% MeCN-H₂O により洗浄後、¹⁸F]SFB はエーテルにより抽出した。HPLC 精製は、セミ分取 HPLC (Luna C18: 10 mm×250 mm, 35% MeCN-H₂O, 6 mL/min) を用いた。インジェクト後、目的とする放射能ピークを集め、水により希釈し、C18 カートリッジを通過させた。¹⁸F]SFB はエーテルにより抽出した。

(2) モデル動物における PET 撮像条件・TF 発現の検討

TF イメージング実験の前段階として、大腿動脈バルーン障害ウサギを用いて、¹⁸F-FDG による PET 撮像実験と、病変部位における TF 発現の検討を行った。すなわち、雄性日本白色種ウサギ (体重 2.5 ~ 3 kg) を 5

羽使用し、バルーンカテーテル操作より、片側の下肢動脈に血管内膜傷害を与えた。その後、0.5% コレステロール食を 3 週間摂取させて、炎症性動脈硬化病変ウサギモデルを作成した。次いで ¹⁸F-FDG (約 200 MBq/body) を耳静脈より投与し、2 時間後 2.0% isoflurane の吸入麻酔下に小動物用 PET イメージング装置 (Inveon, Siemens Medical Solutions USA Inc.) を用いて 40 分撮影を行った。¹⁸F-FDG-PET 撮影後、バルーンカテーテル操作より動脈硬化病変を破綻させて、動脈血栓を誘発した。その 15 分後ウサギを屠殺し、動脈組織を採取、病変部の切片を作成し、オートラジオグラフィー、及び TF の免疫染色等の病理組織学検討を行った。

(3) プレターゲット法のプレ投与薬剤の動脈硬化病変への集積性の検討

プレ投与薬剤である抗ウサギ TF 抗体が動脈硬化病変特異的に集積するか検討を行った。抗体は、放射性金属元素である ^{99m}Tc を、抗体結合部位と金属結合部位を有する二官能性キレートである 6-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid (HYNIC) を用いて標識した。動物には、雄性日本白色種ウサギ (体重 2.5 ~ 3 kg) を使用した。バルーンカテーテル操作より片側の下肢動脈に血管内膜傷害を与えた後、0.5% コレステロール食で飼育した。また、^{99m}Tc-TF-mAb に対する陰性対照として同一サブタイプである IgG₁ の ^{99m}Tc 標識体 (^{99m}Tc-IgG₁) を用いた。

投与 4 時間前から絶食とし、^{99m}Tc-TF-mAb または ^{99m}Tc-IgG₁ を耳静脈より投与した。6 時間後にペントバルビタールの過量投与によって安楽死させ、大腿動脈から腸骨動脈を採取し放射エネルギーを測定した。

(4) 血中放射能推移に関する検討

本研究では、プレ投与薬剤の血中からの消失 (クリアランス) と特異的集積の保持時間の把握が重要である。そこでプレ投与薬剤である抗ウサギ TF 抗体投与 6、24 時間後の正常、病変動脈における本抗体の集積量および血中の推移を、前項のバルーン傷害モデルウサギを用いて検討した。プレ投与薬剤、陰性対照 (IgG₁) の標識についても、前項と同様に ^{99m}Tc を用いて行った。なお、投与 4 時間前から絶食とし、^{99m}Tc-TF-mAb または ^{99m}Tc-IgG₁ を耳静脈より投与した。6、24 時間後にペントバルビタールの過量投与によって安楽死させ、血液および大腿動脈から腸骨動脈の放射エネルギーを測定した。

4. 研究成果

(1) anti-TF-mAb-SAv/¹⁸F-FBB のシステムの合成検討

SPE 精製では ¹⁸F-SFB の収量は 4.7 ± 0.7

GBq (照射条件 25 μ A, 20 min, n=3)、放射化学的収率は、 $33.6 \pm 9.5\%$ (減衰補正なし) であった。合成時間は約 55 分程度であり、迅速かつ高収率の ^{18}F -SFB を得ることに成功した。一方、HPLC 精製では ^{18}F -SFB の収量は 2.9 ± 0.3 GBq (n=3)、放射化学的収率は、 $24.7 \pm 3.1\%$ (減衰補正なし)、合成時間は約 85 分程度であった。放射化学的純度はともに 95%以上であったが、SPE 精製により得られた [^{18}F]SFB において多くの構造不明の化学的不純物が検出された。

HPLC 精製では、SPE 精製に比べ目的物の溶出・回収の工程により時間を要した。収量及び収率についても、固相抽出法よりも合成時間を要したことにより低下した。しかしながら、HPLC 精製により得られた ^{18}F -SFB では、SPE 精製で検出された化学的不純物が除去された。固相抽出法により迅速な [^{18}F]SFB を達成したものの、多くの構造不明の化学的不純物による ^{18}F -SFB と標的分子との反応を阻害する可能性がある。 ^{18}F -SFB の精製には、目的に応じて SPE 精製と HPLC 精製を使い分ける必要性が考えられた。

(2) モデル動物における PET 撮像条件・TF 発現の検討

PET 画像において、動脈硬化病変は高 ^{18}F -FDG を示し、明瞭に描出された。一方、正常血管への ^{18}F -FDG 集積は低かった。これらの PET 画像における ^{18}F -FDG 集積の定量的解析では、動脈硬化病変と正常血管との集積差を確認できた (0.63 ± 0.12 vs. 0.34 ± 0.08 SUV max; $p < 0.05$)。すなわち、PET 撮像実験により 200 MBq/rabbit 程度の投与量で、動脈硬化病変を明瞭に描出できることが分かった。

病理組織学検討より、バルーン内膜傷害ウサギモデルの病変において、顕著な TF 発現が認められた。また、破綻した病変局所での ^{18}F -FDG 集積量と TF の発現量 ($r = 0.64$; $p < 0.01$) 及び血栓サイズ ($r = 0.73$; $p < 0.01$) との間に正の相関が認められた。

(3) プレターゲティング法のプレ投与薬剤の動脈硬化病変への集積性の検討

正常動脈では、抗体に関わらずほぼ一定の集積量を示した。病変動脈においては、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG₁ の場合であっても正常動脈と比較して集積量の増加が認められた。しかしながら、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TF-mAb の病変/正常動脈の集積比は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG₁ の場合に比べて高かった ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TF-mAb: 2.7, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG₁: 1.3)。

これらの結果より、プレ投与薬剤である抗ウサギ TF 抗体が、病変の状態に関わらず動脈硬化病変に集積することが示された。

(4) 血中放射能推移に関する検討

投与後 6 及び 24 時間後の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TF-mAb、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG₁ の病変への集積を比較した結果、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TF-mAb の動脈硬化病変への集積は 24 時間後においても保たれていた。すなわち、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TF-mAb の病変/正常動脈の集積比は、6、24 時間後でそれぞれ 2.7 及び 3.3 であった。これに対し、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG₁ の病変/正常動脈の集積比は、6、24 時間後でそれぞれ 1.3 及び 2.2 であった。一方、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TF-mAb の病変動脈/血液比は、投与後 6 時間で 0.5、24 時間で 0.7 であり、血中放射能は投与後 24 時間においても病変動脈への集積よりも高かった。すなわち、プレ投与薬剤と放射性核種標識ポスト薬剤の投与間隔は、24 時間以上要することが示唆された。

以上の検討により、プレターゲティング法による組織因子 (Tissue Factor, TF) イメージングのための基盤的技術の構築が出来たものと考えられる。

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 1 件):

1. Atsushi Yamashita, Yan Zhao, Songji Zhao, Yunosuke Matsuura, Chihiro Sugita, Takashi Iwakiri, Nozomi Okuyama, Kazuyo Ohe, Chihiro Koshimoto, Keiichi Kawai, Nagara Tamaki, Yuji Kuge, and Yujiro Asada. Arterial ^{18}F -fluorodeoxyglucose uptake reflects thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor- κ B in rabbit atherosclerotic lesions. *Circulation Journal*. (In press)

[学会発表] (計 2 件):

1. Atsushi Yamashita, Yan Zhao, Yunosuke Matsuura, Kazuaki Yamasaki Chihiro Sugita, Keiichi Kawai, Nagara Tamaki, Songji Zhao, Yuji Kuge, Yujiro Asada. ^{18}F -fluorodeoxyglucose uptake reflects thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor- κ B in rabbit atherosclerotic lesions. American Heart Association Scientific Sessions 2012, Los Angeles Convention Center, Los Angeles, CA, U.S.A, Nov 3-7, 2012.
2. 山下 篤、趙 莞、趙 松吉、松浦 祐之介、川井 恵一、玉木 長良、久下 裕司、浅田 祐士郎。動脈血栓能を反映する ^{18}F -フルオロデオキシグルコースの血

管集積。第 52 回日本核医学会学術総会。
2012 年 10 月 11 日～17 日、ロイトン札幌。

[その他]

ホームページ等

http://www.hokudai.ac.jp/radiois/kenkyu/kenkyu_kenkyusitsu_gaiyou.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久下 裕司 (KUGE YUJI)

北海道大学・アイソトープ総合センター・
教授

研究者番号：70321958

(2) 研究分担者

趙 松吉 (ZHAO SONGJI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80374239

西嶋 剣一 (NISHIJIMA KEN-ICHI)

北海道大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：60364254

(H24→H25：連携研究者)

川井 恵一 (KAWAI KEIICHI)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：30204663

山下 篤 (YAMASHITA ATSUSHI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90372797

(3) 連携研究者

西嶋 剣一 (NISHIJIMA KEN-ICHI)

北海道大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：60364254

(H25)

志水 陽一 (SHIMIZU YOUICHI)

北海道大学・アイソトープ総合センター・

助教

研究者番号：90634212

(H25)