

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591822

研究課題名(和文) フコイダン - 超常磁性体酸化鉄を用いた頭蓋内活性化血栓の検出

研究課題名(英文) Detection of activated platelet on thrombus using fucoidan conjugated with USPIO

研究代表者

鈴木 通真 (SUZUKI, Michimasa)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20534811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：活動性の高い血栓を、造影剤を用いてその存在を判定する手法は確立されていない。近年の分子イメージング研究領域では、これらの活性化血栓に対する造影剤の開発に注力されているが、その安全性には疑問が残る。我々は、造影剤の基質として一般に用いられている超常磁性体酸化鉄を用い、これに活性化血小板に発現するP-selectinへのリガンドとして藻から抽出されるフコイダンという糖鎖を結合させた造影剤を開発した。本研究では、ラットにおける活性化血小板をターゲットとした病変の検出を目指した。MRIにおいて、活動性の高い血小板分布に一致した造影剤による増強効果が確認され、病理・電子顕微鏡での確認を行った。

研究成果の概要(英文)：There is no established method to see the activated platelet on MRI scanner. In this decade, several researcher works on this issue, and developed several contrast agents. However, its safety and feasibility is still questionable. We developed a novel contrast material using USPIO conjugated with fucoidan, that is mucopolysacchrides extracted from sea weeds. In a present study, we made a activated thrombus model with rats. In a acute cerebral infarction model, we could see the enhancement of the region on MRI. Consequently, affinity of fucoidan and P-selectin was examined gently on aortic abdominal aneurysm model. Using an immunohistochemical stain toward P-selectin and an electron microscopy, distribution of USPIO and activated platelets were confirmed.

研究分野：放射線診断

キーワード：分子イメージング 血栓 活性化血小板

1. 研究開始当初の背景

脳血管障害は主要な死因の第3位を占めている。この中でも脳塞栓症の原因となる粥腫の破綻に関しては、臨床適応されている造影剤の有効性が示されている。(Takaya N, et al. *Circulation*. 2005;111:2768-2775.) 一方で、血栓の描出に関する検討は種々行われているものの、後々の塞栓症を惹起する可能性のある血栓に対して、造影剤を用いてその生物学的活性を判定することは出来ない。近年の分子イメージング研究領域では、これらの活性化血栓に対する造影剤の開発に力が注ぎ込まれているが、何れも抗体もしくはその類似ペプチドを用いたもので、その抗原性には疑問が残る。また、近年話題となった、腎性全身性線維症は Gd 錯体を用いた造影剤の投与によって引き起こされるとされている。このメカニズムは明らかとなっていないが、錯体が外れる可能性を考慮するとこれらの重金属を利用することは非常に危険性をはらんでいると言える。我々は、造影剤の基質として一般に用いられている超常磁性体酸化鉄を用い、これに P-selectin へのリガンドとして藻から抽出されるフコイダンという糖鎖を結合させた造影剤を開発した。本研究において、我々はこれまでに開発された造影剤よりも生体適合性の高い造影剤を用いて、活性化血小板および内皮をターゲットとした病変の検出を目指し、血栓症の正確な診断に対する基盤研究を行う。

2. 研究の目的

これまでの研究では動脈硬化性粥腫の研究は進められているものの、器質化した血栓と新鮮な血栓の区別を効率的に検出する手法は確立されていない。活性化血小板と傷害内皮細胞に発現される P-selectin を標的とする分子イメージング技術を用いて、まずは動物実験において脳血管障害に関わる血栓の描出を得ることを目的とする。

- (1) 急性期血栓を誘導し、脳血管障害モデルを作成する系の確立
- (2) *ex vivo* MRI を用いた試験前検討 (病理組織標本との比較)
- (3) *in vivo* における新規造影剤の有効性の検討 (時間-信号曲線の取得、分子マーカー発現量と病巣での造影剤濃度の相関)

3. 研究の方法

本研究の目的は、新たに開発した造影剤を用いて、各種脳血管障害を惹起する活性化血小板・傷害内皮を MRI にて検出することにある。本研究計画としては、前述の3種類の各疾患モデルの系を確立し、摘出した脳および脳血管を *ex vivo* MRI にて本研究の将来性を判断する。検討項目として、病変の有無、造影効果の病変特異性が挙げられる。In vivo MRI では造影剤投与前・投与後に撮影を行い、画

像上で関心領域 (region of interest、以下 ROI) を設定し、時間-信号強度曲線を作成する。病理組織学的評価は、Trichrome Masson 染色にて血栓の有無を、また P-selectin 染色によって P-selectin 発現の分布を確認し、結合している鉄粒子の確認は電子顕微鏡にて行う。静脈洞血栓症モデルのみ、正常コントロールラットを検討に加える必要がある。他のモデルでは、病変は一側性であり、対側大脳や血管を正常コントロール群として組み込むことが可能である。また、フコイダンを付加しない単体の USPIO も造影剤コントロール群として組み込む。

4. 研究成果

(1) 急性期血栓惹起

RS系ラットモデル(9-10週齢)を全身麻酔下にて内頸動脈を確保し、広く用いられている実験動物梗塞モデル作成用モノフィラメントを挿入して動脈閉塞、動脈損傷を惹起した。赤外線血流モニターで右大脳半球の血流低下を確認したのち、頸部を閉鎖しフィラメントを2時間留置した。2時間の経過時には20例中10例で神経脱落症状が確認され、これら全例に梗塞が確認された。神経学的初見の確認前に6例はくも膜下出血、4例は原因不明で死亡した。10例はフィラメントを抜去し、神経脱落症状を確認した。深麻酔下にて開腹を行い、大動脈内にカテーテルを挿入、大量の生理食塩水を動注し、頸静脈を切開して脱血死させた。愛護的に開頭を行い、脳実質を損傷しないように全脳を摘出し、スライサーで2mm厚にしたのち、TTC染色を行った。

TTC染色の行われたラットではさらにHE染色、Trichrome Masson 染色、P-selectin 染色が行われた。内頸動脈は破損し確認が困難であったが、中大脳動脈には内膜損傷があり、血小板凝集とこれに対応すると思われる P-selectin の発現が確認された。

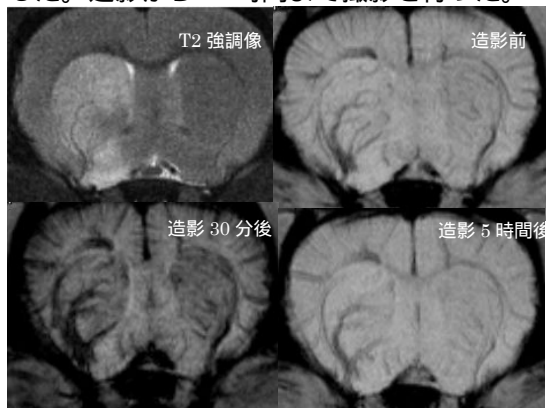
動物実験用 7T MRI システム (Bruker) を用いて実際の梗塞巣を確認した。拡散強調画像や T2-RARE 像において、高信号域として描出された。

(2) MRI での検討

ex vivo MRI での再現性確認試験のため、摘出検体をパラホルムアルデヒドに浸透させ、7T MRI システム (Bruker) のクライオコイルシステムを用いて、撮影が行われた。再現性に問題なかったが、クライオシステムでの長時間での撮影 (12時間) により、微細な振動が影響すると思われるアーチファクトが撮影した。撮影時間の短縮とともに、バスケット状のカゴ内に脳組織を愛護的に固定する方法が模索されたが、明瞭な画像は得られなかった。

(1)と同様の手順で作成された脳梗塞モデルラットで撮影を行った。

引き続き、これまでの ex vivo の実験において P-selectin への特異的結合性を有することの確認された USPIO-CMD-Fucoidan を投与した。造影から 12 時間まで撮影を行った。



15 例のラットに対して (1)の手技から撮影終了まで生存したのは 3 例であった。撮影中における低体温が主な死因と考えられた。撮影まで完遂したラット群では造影剤投与から 30 分までの間に、T2 強調画像で見られた脈管影の分布に一致して強い程信号が見られ、鉄製材の磁化率効果の影響で血管自体が非常に太く描出された。造影 5~12 時間では血管部に対応する低信号はプラトーであった。これら 3 例のラット標本を安楽死させ、脳組織を摘出したが、脳梗塞の発症から 14 時間経過したラット脳は組織自体が非常に脆弱であり、組織の挫滅が顕著であった。それでも血管の内腔には辛うじて血小板の数的増加と、この活動性亢進を示すような P-selectin の発現亢進が確認されたが、所謂 Radiological-Histological correlation の確認をするのは困難を極めた。一方で、USPIO-CMD-Fucoidan の造影剤としての利用は何らかのコントラストを形成することが強く考えられたため、組織挫滅の確率の低い大動脈を用いて再検討することとなった。

(3)1990 年に Michel JB らが作成した腹部大動脈を利用したエラストーゼモデルを参照して、分厚い血栓を形成する腹部大動脈瘤モデルを作成することとした。試験的な動脈瘤作成に 30 例を要した。

本試験では 20 例のラットを対象に腹腔内にペントバルビタール投与を行い、全身麻酔下に開腹。大動脈を局所的に遮断、分枝血管の結紮処理を行ったのち、30 分のおよそ 300mmHg の高圧下でタンパク分解酵素であるエラストーゼ希釈液を血管壁に浸透させた。20 例のうち全例に、6 日後には血栓を伴った動脈瘤が形成されていた (短径が術前に比して平均 $319 \pm 134\%$ 増加)。

造影剤は新たに、P-selectin への親和性を付与していない USPIO-CMD が用意され、正常コントロールとして利用された。

フランス国立衛生科学研究所 (INSERM) U698 で作成された造影剤は、それぞれの磁性体としての緩和能の測定が行われた。

USPIO-CMD 20MHz $r_1=38.8 \pm 1.9$, $r_2=123 \pm 6.2$

60MHz $r_1=15.5 \pm 0.7$, $r_2=119 \pm 5.9$

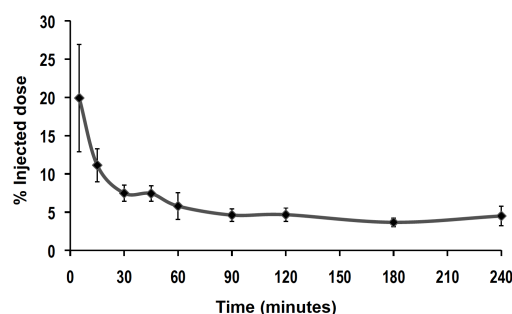
USPIO-FUCO 20MHz $r_1=37.5 \pm 1.8$, $r_2=137 \pm 6.9$

60MHz $r_1=15.2 \pm 0.7$, $r_2=137.4 \pm 6.9$

r_1, r_2 の単位はそれぞれ $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}$

USPIO-FUCO では Fucoidan 分子が付着しているが、緩和能には大差なく高い緩和能が存在することが確認された。

生体内における薬物動態の確認のため、前述の二種類の造影剤に $^{99\text{m}}\text{Tc}$ が付与され、小動物用ガンマカメラにて、薬物動態が計測された。



造影剤投与を USPIO-CMD-Fucoidan 群 ($n=13$) とコントロール群 (Feroxtran ($n=3$)+USPIO-CMD ($n=4$)) に分類し、4.6T MRI (Bruker Biospin) で撮影を行った。ラットは全身麻酔が施され、頸静脈には造影剤投与用のルートが確保された。投与量は鉄当量として $200 \mu\text{mol}/\text{kg}$ が投与された。ラットは PC-MRA (phase-contrast magnetic resonance MR angiography) (repetition time [TR]/echo time [TE]: 17/5.8 ms; flip angle: 20° ; echo train length: 1; 10-mm slice thickness; matrix: 256×256 ; field of view: 715×331 mm) において非侵襲的に動脈瘤の存在が確認され、引き続き FSPGR (fast spoiled gradient echo) T2* 強調像 (TR/TE: 545.6/6.6 ms; flip angle: 60° ; echo train length: 1; 1-mm slice thickness; matrix: 384×384 ; field of view: 720×330 mm) が撮影された。造影前、造影直後から 15 分間隔で 60 分まで撮影が行われた。

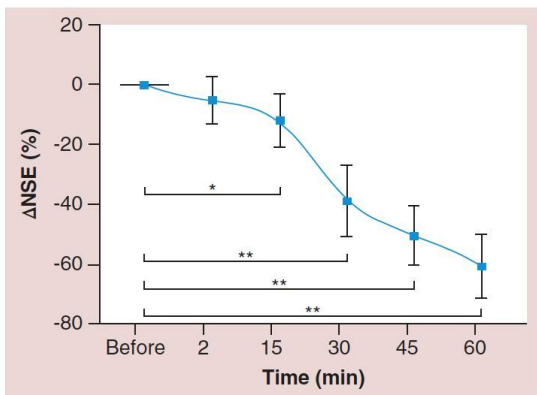
動脈瘤が存在し、血栓の分布する部分に関心領域を設定し、当該部位の造影効果を測定した。同じ時相において、大動脈壁 (SI_{wall})・同じスライス内の筋肉 (SI_{muscle})・背景の信号 (SI_{noise}) をそれぞれ計測し、以下の数式をもって標準化された造影増強効果 (NSE%) を算出した。

$$\text{SNR} = [\text{SI}_{\text{aortic wall}} - \text{SI}_{\text{muscle}}] / \text{SD}_{\text{noise signal}}$$

$$\Delta \text{NSE}\% = (\text{SNR}_t - \text{SNR}_{\text{before}}) / \text{SNR}_{\text{before}} \times 100$$

造影効果は時間経過とともに付図のような動態を示した。

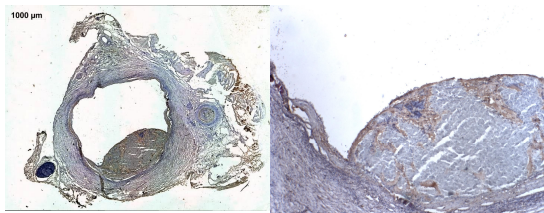
造影開始から 30 分以内には明瞭な信号変化が得られることが確認された。経時的に信号強度が低下していくことも確認された。また、



USPIO-FUCO は血栓の存在しない部分には正しく集積せず、その特異性の高さが示された。

病理組織学的変化との比較

付図のように P-selectin 抗体の染色を行う



と、血栓の表層部分がクレバス状に入り組んだ形態を示しており、この部分に対応して P-selectin の発現が亢進していることが確認された。今回は試験的に ultra short echo time (UTE) での撮影を行った（現在、客観的尺度を用いた類似性を分担研究者の京極・君塚氏とともに検討中につき、画像は非公表）。UTE 画像により、この組織学的な P-selectin 分布に近い画像が得られることが確認された。信号強度の低下する血栓の領域像は MRI での画像所見と限りなく類似し、USPIO-FUCO の有用性が示されたが、ヘモジデリン沈着の確認のため、電子顕微鏡走査 (TEM) が行われた。電子顕微鏡では血小板やフィブリンに富んだ凝集域で多核白血球が優位に分布し、鉄信号が多く描出された。鉄エネルギーフィルタをかけることにより、より明瞭に USPIO の像が確認可能となった。

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6件)

Michimasa Suzuki, Laure Bachelet-Violette, François Rouzet, Anne Beilvert, Gwennhael Autret Murielle Maire, Christine Menager, Liliane Louedec, Christine Choqueux, Pierre Saboural Oualid Haddad, Cédric Chauvierre, Frédéric Chaubet, Jean-Baptiste Michel, Jean-Michel

Serfaty & Didier Letourneur. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with fucoidan for molecular MRI of intraluminal thrombus. *Nanomedicine*. (10)-1,73-87, DOI 10.2217/nnm.14.51

Kamagata K, Tomiyama H, Motoi Y, Kano M, Abe O, Ito K, Shimoji K, Suzuki M, Hori M, Nakanishi A, Kuwatsuru R, Sasai K, Aoki S, Hattori N. Diffusional kurtosis imaging of cingulate fibers in Parkinson disease: comparison with conventional diffusion tensor imaging. *Magn Reson Imaging*. 2013

Nov;31(9):1501-6. doi:

10.1016/j.mri.2013.06.009

Yokoyama J, Ohba S, Fujimaki M, Kojima M, Suzuki M, Ikeda K. Significant improvement in superselective intra-arterial chemotherapy for advanced paranasal sinus cancer by using indocyanine green fluorescence. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014 Oct;271(10):2795-801. doi: 10.1007/s00405-013-2846-9.

Kamagata K, Tomiyama H, Hatano T, Motoi Y, Abe O, Shimoji K, Kamiya K, Suzuki M, Hori M, Yoshida M, Hattori N, Aoki S. A preliminary diffusional kurtosis imaging study of Parkinson disease: comparison with conventional diffusion tensor imaging. *Neuroradiology*. 2014 Mar;56(3):251-8. doi: 10.1007/s00234-014-1327-1.

Kamiya K, Hori M, Miyajima M, Nakajima M, Suzuki Y, Kamagata K, Suzuki M, Arai H, Ohtomo K, Aoki S. Axon diameter and intra-axonal volume fraction of the corticospinal tract in idiopathic normal pressure hydrocephalus measured by q-space imaging. *PLoS One*. 2014 Aug 5;9(8):e103842. doi: 10.1371/journal.pone.0103842.

Hori M, Yoshida M, Yokoyama K, Kamagata K, Kumagai F, Fukunaga I, Kamiya K, Suzuki M, Masutani Y, Hamasaki N, Suzuki Y, Kyogoku S, Hattori N, Aoki S. Multiple sclerosis: Benefits of q-space imaging in evaluation of normal-appearing and periplaque white matter. *Magn Reson Imaging*. 2014 Jul;32(6):625-9.

doi: 10.1016/j.mri.2014.02.024.

〔学会発表〕(計5件)

Suzuki M, Miyauchi K, Hori M, Kamagata K, Ikeda F, Yamamoto M, Ohishi H, Urabe T, Hatsukami TS, Yuan C, Daida H, Aoki S. Relationship between the Intraplaque Calcification on MR Imaging and Increase of HDL-C under Aggressive LDL-C Lowering Statin Therapy. May 17-22, 2014 / American Society of Neuroradiology 52nd Annual Meeting and the Foundation of the ASNR Symposium 2014. Montreal, Canada

Suzuki M, Irie R, Takano N, Kamagata K, Hori M, Yoshida Y, Takayama M, Adachi Y, Sato K, Sato S, Hamasaki N, Yamamoto M, Oishi H, Aoki S. Clinical Application of Ultra-short TE Angiography on Silent Scan. RSNA 2014, Chicago, IL, U.S.A

鈴木通真 頭部領域における Silent MRA の臨床応用 第42回日本磁気共鳴医学会 2014年9月18~20日 京都 (ランチョンセミナー)

鈴木通真、入江隆介、高野直、鎌形康司、堀正明、吉田茉莉子、濱崎望、佐藤秀二、山本宗孝、大石英則、青木茂樹. Silent MRA の臨床応用とその有用性 第42回日本磁気共鳴医学会 2014年9月18~20日 京都

鈴木通真、入江隆介、高野直、鎌形康司、堀正明、吉田茉莉子、濱崎望、佐藤秀二、山本宗孝、大石英則、青木茂樹. サイレント MRA の基礎的検討と臨床応用 第44回日本神経放射線学会 2015年3月6-7日 名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 通真 (SUZUKI Michimasa)
順天堂大学 放射線診断学講座 准教授
研究者番号：20534811

(2) 研究分担者

京極 伸介 (KYOGOKU Shinsuke)
順天堂大学 放射線診断学講座 准教授
研究者番号：
君塚 孝雄 (KIMIZUKA Takao)
順天堂大学 放射線診断学講座 准教授
研究者番号：