

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24689049

研究課題名(和文) 不安定プラークの診断・薬物治療効果評価を合目的に施行するためのシステムの構築

研究課題名(英文) PET imaging probes for detection and evaluation of atherosclerotic plaques

研究代表者

小川 美香子 (OGAWA, Mikako)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20344351

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、不安定プラークのイメージングを目指し、FDG、FMISO、NaF、PK11195、Cholineを用い同一個体(WHHLウサギ)にて経時的にPETイメージングを行った。FDGはプラークを不安定化させるマクロファージに多く取り込まれ、不安定化へ向かう病変を捉える可能性が示された。NaFは正常細胞への取り込みが限られているため、最も大きなSN比を得ることができた。また、CTでみられる石灰化とは異なる分布を示した。Cholineは超早期病変を捉える可能性が示されたが、PK11195とともに集積量が十分ではない個体が多く認められた。FMISOはほとんどの個体に集積が見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Disruption of atherosclerotic plaques and the following thrombus formation is currently recognized as the primary mechanism of myocardial and cerebral infarctions. In this study, we compared PET imaging agents, [18F]FDG, [18F]FMISO, [18F]NaF, [11C]Choline, [11C]PK11195, using WHHL rabbit in same animals.

[18F]FDG accumulated into atherogenic M1 macrophages, but SN ratio was not very high. [18F]NaF showed the highest SN ratio, and small region was clearly visualized. Macrophage accumulation was seen with [11C]Choline, however, the signal from the heart and liver disturbed the detection with PET. [11C]PK11195 distribution was different from [18F]FDG, and in some animals, the plaque was not detected due to the high heart uptake. [18F]FMISO did not show significant signal around the atherosclerotic regions.

研究分野：分子イメージング

キーワード：PET 動脈硬化 不安定プラーク

1. 研究開始当初の背景

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、脳梗塞や心筋梗塞といった動脈硬化性疾患発症の原因となる。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である。

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。また、血管内腔体積はプラークの安定性に関与しないため、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。

国内外で超音波、CT、MRIなどの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。これらは病変の石灰化や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。

近年、MRI、PET、SPECT、蛍光イメージングなどにより、生体内分子の動きをインビボで非侵襲的に画像化する分子イメージング技術が大きな発展を遂げている。分子イメージングによれば、プラークの不安定性に関与する生体内分子を直接画像化することができるため、その安定度を指標とした画像化が可能である。申請者らはこれまでに、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PETにより不安定プラークが描出できることを明らかにしてきた。また近年、様々な分子標的を対象とした不安定プラーク分子イメージング剤が発表され、一部は既に臨床検討がなされている。しかし、これらの検討では、不安定プラークを検出することに重点が置かれており、プラークの早期特異的検出・治療効果評価に着目した、それぞれのイメージング剤の特性に関する比較検討はなされていない。そのため、それぞれの薬剤の不安定プラークイメージング剤としての特性を明らかにすることが求められている。

2. 研究の目的

動脈硬化病変に生じる不安定プラークは脳・心筋梗塞の原因となるため、早期に検出し治療を行うことが重要である。これまでに、様々な生体分子をターゲットとした不安定プラーク分子イメージング剤が開発されているが、プラークの早期特異的検出・治療効果評価に着目した比較検討はなされていない。

そこで本研究では、①不安定プラーク進展

過程、②マクロファージの極性(善玉・悪玉)、③血糖・コレステロール、④動脈硬化治療薬が、不安定プラークへの各イメージング剤の集積に及ぼす影響を明らかにし、不安定プラークの臨床診断・薬物治療効果評価を合目的的に施行するためのシステムの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) M1, M2 マクロファージへの取り込みについて

近年、マクロファージにはいくつかの分極タイプが存在することが報告され、その中でもM1およびM2マクロファージと動脈硬化の関連性が注目されている。M1マクロファージは炎症性サイトカインや窒素酸化物産生を介し動脈硬化促進的に働き、M2マクロファージは抗炎症性サイトカイン産生などを介して抗動脈効果的に働く。現在、このマクロファージの分極に着目した薬剤開発も行われている。そこで、マクロファージの分極とイメージング剤の集積との関係について検討を行った。

既に動脈硬化イメージングの臨床検討に用いられているPET用イメージング剤 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ とMRI用イメージング剤USPIOについて、まず、細胞レベルでのin vitro検討を行った。マウス腹腔マクロファージを採取、あるいは株化ヒト白血病細胞をマクロファージに分化させ、これに各イメージング剤を添加して細胞内への取り込み量を測定した。また、acLDLを添加することでマクロファージを泡沫化させ、泡沫化の程度と各イメージング剤の取り込みとの関係についても検討をおこなった。また、代謝性イメージング剤である $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ と $[^{11}\text{C}]\text{Choline}$ の比較検討についてもマウス腹腔マクロファージを用い同様にを行った。

(2) 動脈硬化モデル動物 apoE ノックアウトマウスでの基礎的検討

本研究では同一個体(ウサギ)での各種イメージング剤を用いたPETイメージングを行うが、この際、動物への負担を考えると絶食の回数・条件を最適化する必要がある。そこで、食事が影響を与える可能性がある代謝性イメージング剤である $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ と $[^{11}\text{C}]\text{Choline}$ について、apoE ノックアウトマウスを用いて検討を行い、絶食条件・非絶食条件にて比較した

(3) 動脈硬化モデル動物 WHHL ウサギでのPET, CT, MR イメージング

$[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$, $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$, $[^{11}\text{C}]\text{Choline}$ についてPETイメージングを行った。

WHHL ウサギは月齢によって不安定プラークの成熟度が異なることが知られている。そ

ここで、14 か月齢および 24 か月齢にて時間を追って検討した。なお、14 か月齢での病理検討を行うため、一部の個体においては 14 か月にて屠殺し標本を作製、PET 画像と比較した。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$, $[^{18}\text{F}]\text{NaF}$ については、74MBq を耳静脈から投与し 2 時間後から 30 分間の PET 撮像を行った。 $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$, $[^{11}\text{C}]\text{Choline}$ については、147Mq を耳静脈から投与し、30 分後から 30 分間 PET 撮像を行った。

なお、PET 撮像時には大動脈の位置同定のため造影 CT 撮像も併せて行い、石灰化の評価を同時に行うこととした。MRI での T1, T2 強調画像を撮像も合わせて行い、PET の検出能に関する比較を行った。

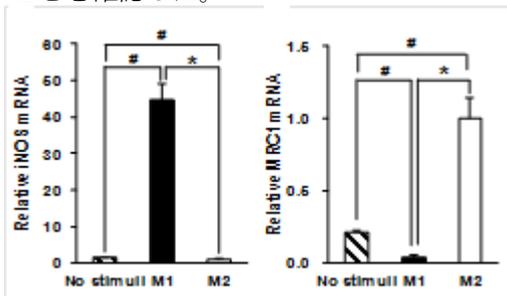
また、PET 画像撮像後、大動脈を摘出し切片を作成し、各種染色（マクロファージ・マッソントリクローム染色、Oil-redO 染色、Azan 染色、HE 染色）を行って病理像と比較し検討した。

4. 研究成果

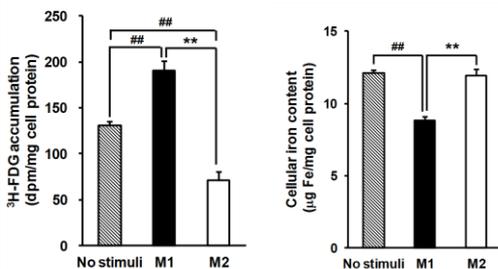
(1) M1, M2 マクロファージへの取り込みについて

まず、

マクロファージが泡沫化することで FDG の取り込み量が上昇することがわかった。さらに、マクロファージの M1/M2 分極誘導を、M1 分極刺激として LPS および $\text{IFN}\gamma$ 、M2 分極刺激として IL-4 および IL-13 を培地加えることで行い、M1, M2 へそれぞれ分極されていることを確認した。

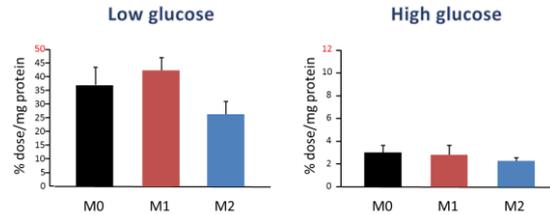


この M1, M2 マクロファージに FDG あるいは USPIO を加え取り込みを検討したところ、FDG は動脈硬化病変をより不安定化させると言われている M1 マクロファージによくとりこまれ、USPIO は動脈硬化病変を終息させると言われている M2 マクロファージによくとりこまれることがわかった。

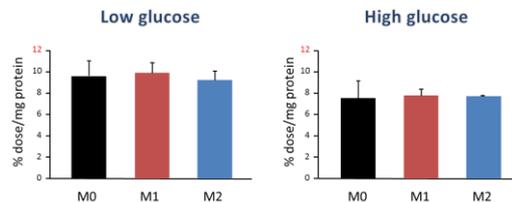


また、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ と $[^{11}\text{C}]\text{Choline}$ の動脈硬化病変への集積について検討を行ったところ、両薬剤ともマクロファージへの取り込みは認められたが、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ においては培地中のグルコース濃度に大きく影響を受け、高グルコース条件 (4000 mg/L (40 mg/dL)) では、その取り込み量は $[^{11}\text{C}]\text{Choline}$ よりも低いとなった。また、M1, M2 への取り込みは $[^{11}\text{C}]\text{Choline}$ では差が認められなかった。

In vitro $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ uptake to cultured macrophages



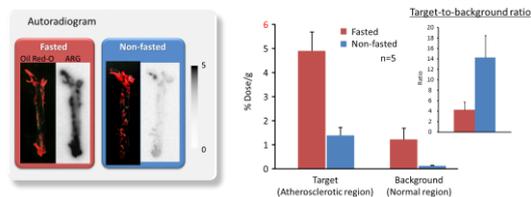
In vitro $[^{11}\text{C}]\text{choline}$ uptake to cultured macrophages



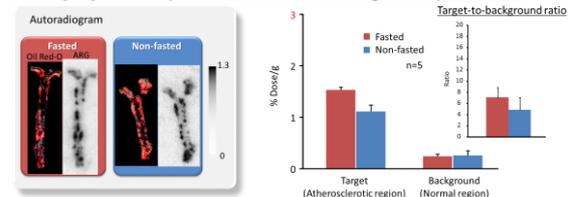
(2) 動脈硬化モデル動物 apoE ノックアウトマウスでの基礎的検討

さらに、apoE ノックアウトマウスを用い、インビボでの検討を行った結果、絶食条件下では $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の病変への高い取り込みが認められたが、正常血管への取り込みもやや高く、病変/正常部位の比は非絶食条件のほうが却って高くなり、絶食条件下では $[^{11}\text{C}]\text{Choline}$ のほうが $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ より病変/正常部位比は高いものとなった。このことから、糖尿病患者など、血糖コントロールの難しい対象においては、 $[^{11}\text{C}]\text{Choline}$ のほうが適している可能性が示された。

In vivo $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ uptake to atherosclerotic region in apoE^{-/-} mice



In vivo $[^{11}\text{C}]\text{choline}$ uptake to atherosclerotic region in apoE^{-/-} mice



(3) 動脈硬化モデル動物 WHHL ウサギでの PET, CT, MR イメージング

[¹⁸F]FDG, [¹⁸F]NaF, [¹¹C]PK11195 においては、動脈硬化病変が画像化される個体が認められた。また、14 か月齢と 24 か月齢において集積が変化しており、それぞれの薬剤の分布も一致する場所と一致しない場所が認められた。また、特に 14 か月齢においては必ずしも [¹⁸F]NaF と CT で観察された石灰化は一致していなかった。 [¹¹C]Choline では肝臓・心臓への高集積を認めており、また、取り込みの絶対量がやや少なく、半減期も短いことから、PET にて微小病変を検出するのは困難である可能性が示された。

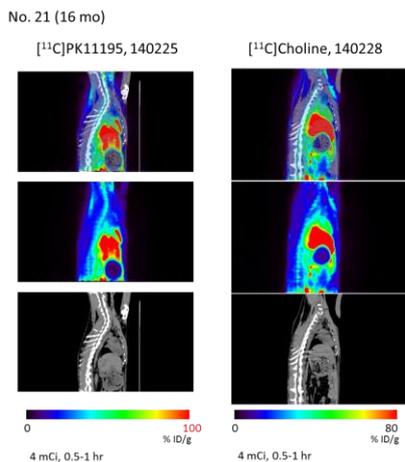
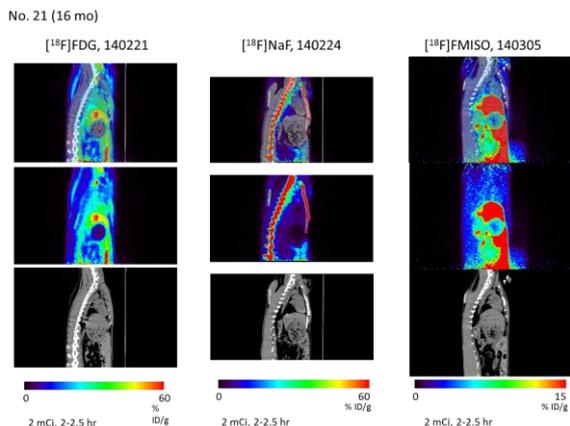
画像撮像後、大動脈を摘出し切片を作成し、各種染色（マクロファージ・マッソントリクローム染色、Oil-redO 染色、Azan 染色、HE 染色）を行って病理像と比較し検討したところ、MRI で認められる脂質の蓄積だけでは評価を行うことが難しく、PET の情報を加味した総合的な評価が必要であることが判った。

さらに、胸椎の番号を基準とし [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]FMISO, [¹⁸F]NaF, [¹¹C]PK11195, [¹¹C]Choline の PET 画像について個体内での分布の違いを詳細に検討した。また、ウサギの体による放射線の吸収・散乱補正を行い、定量的な評価を試みた。この結果、 [¹¹C]PK11195, [¹⁸F]NaF, [¹¹C]Choline では集積量の変化がほぼ一致しており、No. 2-4 にかけての集積が多いことが判った。 [¹⁸F]FDG では No. 5 以降についても集積があり、胸部大動脈全体に分布していることが判った。 [¹⁸F]FMISO ではほとんど集積が認められなかった。

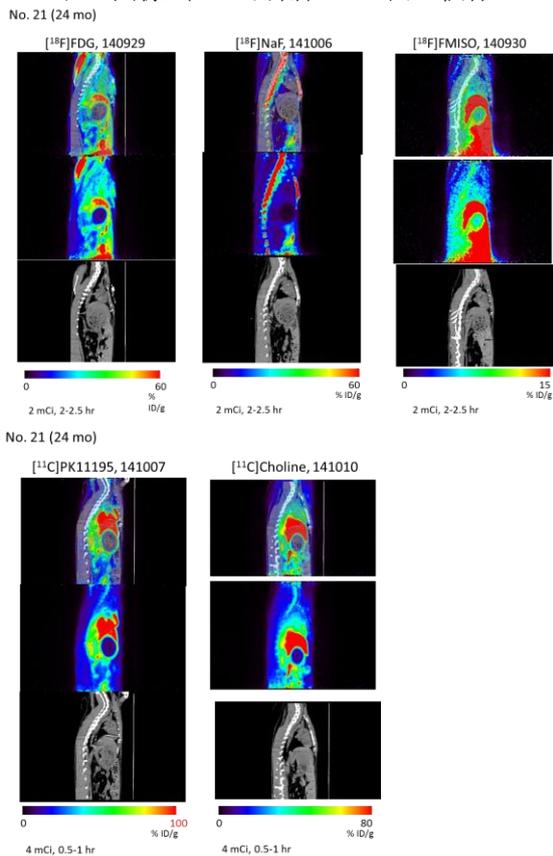
また、病理組織とも比較したところ、マクロファージの集簇がやや少ない部位であり [¹⁸F]FDG の集積が少ない部位への [¹¹C]Choline の集積が認められた。

なお、 [¹⁸F]NaF に関しては spotty な集積が多くみとめられ、さらに CT での石灰化画像とは一致しない部位への集積も見られた。また、Ca 染色の結果とも必ずしも一致するものではなかった。

PET/CT 画像 (16 か月齢)



PET/CT 画像 (24 か月齢) 上と同一個体



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 3 件)

1. S. Ishino, M. Ogawa, I. Mori, S. Nishimura, S. Ikeda, T. Sugita, T. Oikawa, T. Horiguchi, Y. Magata, F-FDG PET and intravascular ultrasonography (IVUS) images compared with histology of atherosclerotic plaques: F-FDG

accumulates in foamy macrophages. Eur J Nucl Med Mol Imaging 41, 624-633 (2014). doi: 10.1007/s00259-013-2635-0. 査読あり

2. S. Iwaki, K. Hokamura, M. Ogawa, Y. Takehara, Y. Muramatsu, T. Yamane, K. Hirabayashi, Y. Morimoto, K. Hagiwara, K. Nakahara, T. Mineno, T. Terai, T. Komatsu, T. Ueno, K. Tamura, Y. Adachi, Y. Hirata, M. Arita, H. Arai, K. Umemura, T. Nagano, K. Hanaoka, A design strategy for small molecule-based targeted MRI contrast agents: their application for detection of atherosclerotic plaques. Org Biomol Chem 12, 8611-8618 (2014). doi: 10.1039/c4ob01270d. 査読あり
3. T. Satomi, M. Ogawa, I. Mori, S. Ishino, K. Kubo, Y. Magata, T. Nishimoto, Comparison of Contrast Agents for Atherosclerosis Imaging Using Cultured Macrophages: FDG Versus Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide. J Nucl Med 54, 999-1004 (2013). doi: 10.2967/jnumed.112.110551. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

1. 小川美香子、動脈硬化診断のための分子イメージングプローブの開発、第 55 回日本核医学会学術総会 (招待講演)、2015 年 11 月 8-9 日、ハイアットリージェンシー東京 (東京都新宿区)
2. Ogawa M, Kosugi M, Ishiguro H, Magata Y., Comparison of the PET imaging agents for atherosclerotic plaque detection, World Molecular Imaging Congress, 2015 年 9 月 2-5 日、ホノルル (米国)
3. 小川美香子、小杉睦、間賀田泰寛、動脈硬化不安定プラーク PET イメージング剤としての [18F]FDG と [11C]choline の比較、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 26-28 日、神戸学院大学 (兵庫県神戸市)
4. 小川美香子、小杉睦、間賀田泰寛、動脈硬化不安定プラークイメージング剤としての [18F]FDG と [11C]choline の比較、日本核医学会、2014 年 11 月 6-8 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
JCNN Best Poster Presentation Award (脳神経核医学研究会) 受賞
5. 小川美香子、マルチモダル分子イメージングによる病態解析、第 87 回 日本生化学会大会 (招待講演)、2014 年 10 月 17 日、京都国際会議場 (京都府京都市)

6. 小川美香子、朱恵君、間賀田泰寛、清水広介、奥直人、WHHL ウサギを用いた動脈硬化のイメージング、第 3 回ウサギバイオサイエンス研究会、2014 年 8 月 2 日、山梨大学 (山梨県甲府市)

7. Ogawa M, Kondo Y, Kosugi M, Magata Y., Evaluation and comparison of [18F]FDG and [11C]choline as atherosclerosis imaging agents, Society of Nuclear Medicine Annual Meeting, 2014 年 6 月 10 日、セントルイス (米国)
8. 小川美香子、インビボ分子イメージングで探る生体機能、第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (招待講演)、2013 年 9 月 27-28 日、航空会館 (東京都港区)
9. Ogawa M. et al. Development of new molecular imaging probes for in vivo atherosclerotic plaque imaging. (シンポジウム講演)、第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2012 年 7 月 19, 20 日、ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市)
10. Ogawa M, Satomi T, Mori I, Ishino S, Kubo K, Magata Y, Nishimoto T. Macrophage polarization in atherosclerotic plaque affects FDG uptake, Society of Nuclear Medicine Annual Meeting, 2013 年 6 月 8-12 日、バンクーバー (カナダ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 美香子 (OGAWA, Mikako)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 20344351