

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790543

研究課題名(和文) TSP0-PETによる肝疾患画像診断法の開発及び発生機序の解明に関する研究

研究課題名(英文) Development of TSP0-PET imaging for noninvasive diagnosis of liver diseases

研究代表者

謝琳(XIE, Lin)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：30623558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：患者数が最多の肝疾患である脂肪肝の確定診断には、侵襲性が高い肝生検で行なわざるを得ないのが現状である。患者数の急増に備え、非侵襲的な確定診断法の開発は強く望まれている。本研究は独自に開発したTSP0の放射性プローブを用い、PETにより代表的な肝疾患に対し、非侵襲的な画像診断法の開発と機序の解明を目指した。その結果、脂肪肝疾患に対し、発症及び病気進展の先行指標である蛋白質TSP0をバイオマーカーとして特定したうえで、TSP0に特異的な分子プローブ[18F]FEDACを開発し、PETでTSP0を可視化することにより、世界で初めて脂肪肝疾患の早期診断、進行度判定が可能なPET診断法の開発が成功した。

研究成果の概要(英文)：Due to the limitations of liver biopsy and currently available noninvasive imaging techniques, new noninvasive approaches for diagnosis of liver diseases, especially the most common subgroup fatty liver disease (FLD), have become an urgent requirement. In this study, we focused on the mitochondrial dysfunction that is responsible for disease progression of FLD, and translocator protein (18 kDa)(TSP0)-a mitochondrial transmembrane protein, explored whether TSP0 can be used as an imaging biomarker of noninvasive diagnosis and staging of FLD, monitored using PET with a TSP0 specific radioligand [18F]FEDAC. Our data demonstrated TSP0 is a good imaging biomarker, and [18F]FEDAC-PET can accurate and noninvasive diagnosis and staging of FLD with excellent sensitivity and specificity. Our study may open a novel avenue for noninvasive and reliable clinic screening of FLD focusing on the general population.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：肝疾患 脂肪肝 TSP0 PET [18F]FEDAC 画像診断法

1. 研究開始当初の背景

患者数が最多の肝疾患である脂肪肝とは、中性脂肪が肝細胞に過剰沈着し、ミトコンドリア障害を引き起こすことによって、肝障害を生じる生活習慣病である。我が国では脂肪肝患者数が約 1000 万人以上と推定され、そのうち約 10% が脂肪性肝炎から肝硬変、肝がんへ進行することが知られている。脂肪肝疾患の診断には、血液検査、超音波検査、CT、MRI などによる定性的な診断はできるが、病変特徴を定量し、確定診断することができない。また、これらの手法は病変の進行度の鑑別やフォローアップが困難であり、肝生検のみが現段階では唯一の確定診断法である。ただし、この方法は患者に負担が大きく、全てに実施できる検査法ではない。そのため臨床では多くの脂肪肝患者が存在しているのに関わらず、診断が行なわず肝硬変へ進展していく患者が少なくない。患者数の急増に備え、非侵襲的な確定診断法の開発及び確立が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、脂肪肝疾患にミトコンドリア障害が起きていることから、ミトコンドリア膜に特異的に存在するTranslocator protein (18kDa) (TSPO、末梢型ベンゾジアゼピン受容体ともいう) に着目し、独自に開発したTSPOの特異的なプローブを用い、PET イメージングにより代表的な肝疾患である脂肪肝疾患を早期、定量かつ非侵襲的な画像診断法の確立及び発生機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 進行性脂肪肝モデルの作製及び TSPOプローブ^[18F]FEDACの合成

6-8週齢C57BL/6マウスにメチオニン・コリン欠損食 (MCD) を2週間、4週間、8週間投与することにより進行性脂肪肝モデルを作製し、病理染色より肝臓組織の変化を経時的に調べる。また、既存の自動標識合成装置を用い、放医研で独自に開発されたTSPO特異結合

の PETプローブ^[18F]FEDACを定常的に製造する。

(2) ^[18F]FEDAC-PET/CTで脂肪肝に肝内放射能集積を測定

MCD食投与後0週、2週、4週、8週のマウスは静脈内^[18F]FEDACを投薬し、動物用PET/CTにて肝内放射能濃度を経時的に測定し、脂肪肝におけるPET/CTイメージングの最適条件を検証する。また、得られたイメージング結果を定量解析する。

(3) Ex vivoオートラジオグラフィ法で肝内放射能集積の確認

PET測定後モデルマウスを安楽死させ、肝組織を摘出し、組織切片を作り、オートラジオグラフィ法より肝内放射能の蓄積、濃度および部位を確認する。また、免疫染色よりTSPO蛋白質の発現および局在部位を調べる

(4) TSPO-PETイメージングの有用性検証

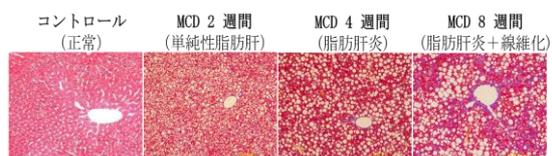
TSPOに特異的な阻害剤であるPK11195との負荷実験を行う、^[18F]FEDACの結合がTSPOに特異であるかを検証する。また、進行性脂肪肝マウスの肝臓病理障害スコアとPETの放射能定量結果との相関性を解析する。

(5) 発生機序の検証

リアルタイムRT-PCRにより、肝臓組織におけるTSPO及びTSPO機能ユニットの遺伝子発現量を定量解析する。

4. 研究成果

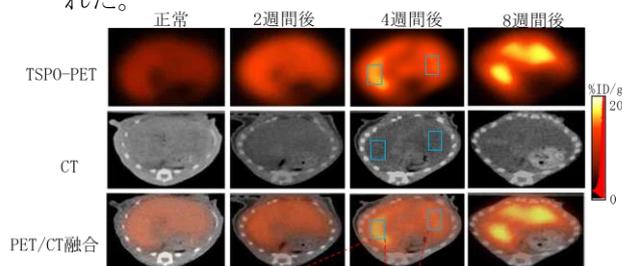
(1) 組織学的にヒト脂肪肝疾患と類似した進行性脂肪肝動物モデルを樹立した。MCD 食マウスにおいて、時間の経過につれ、肝臓に単純性脂肪肝 (2 週間) から脂肪性肝炎 (4 週間) を経て脂肪性肝線維化 (8 週間) の進行に悪化していることを病理染色より確認できた。



Masson-trichrome 染色

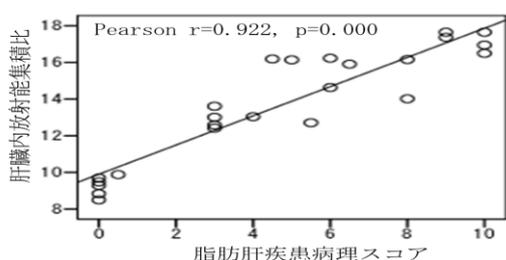
また、高い品質 (98% 以上の収率、得量及び 140-210 GBq/ μmol 比放射能) を担保した TSPO プローブ [^{18}F]FEDAC を安定的に得られた。

(2) これらの脂肪肝モデルマウスに対し、 [^{18}F]FEDAC-PET/CT を行い、肝臓における放射能集積の変化を経時的に定量した。その結果、脂肪肝疾患の進行に伴い、肝臓における [^{18}F]FEDAC の放射能集積は経時的に増加し、その集積量が肝臓病変の程度を反映し、同じ肝臓の CT 像及び病理染色によっても確認された。



(3) PET 撮影を終えたモデルマウスに、Ex vivo オートラジオグラフィで確認検証を行った。その結果、正常肝臓における [^{18}F]FEDAC の放射能集積量が低いのにに対して、単純性脂肪肝から脂肪性肝炎、脂肪性肝線維化への進行に伴い肝臓における [^{18}F]FEDAC の集積が増加することが確認した。さらに、肝臓内の [^{18}F]FEDAC 結合量は、肝臓病変の程度及び TSPO 発現量を反映することが見られた。

(4) TSPO-PETイメージングの特異性を検証した。脂肪肝モデルマウスにおける肝臓内放射能集積は非標識TSPOリガンドPK11195の前投与より大幅に抑制され ($p < 0.01$)、TSPO起因であることが証明された。また、肝臓における [^{18}F]FEDAC放射能の集積レベルは脂肪肝の病理スコアと高い相関性を示した (Pearson's $r = 0.922$, $p = 0.000$)。



(5) 脂肪肝疾患の進行にTSPOが果たす役割及び制御ネットワークを解明するため、TSPO機能ユニットの遺伝子解析を行った。その結果、脂肪肝疾患の進行に伴い、TSPO及びTSPO機能ユニットである遺伝子STAT3、StAR、PKARI α 、PAP7、 and P450sccの発現量が高くなった。

これらの研究成果によって、TSPO は脂肪肝疾患の進行度を客観的に反映できるバイオマーカーであることが証明された。さらに、 [^{18}F]FEDAC-PET は、脂肪肝疾患の早期診断、進行度の判定及び分類に対し、高感度かつ特異性をもつ有用性が高い診断ツールであることが示唆され、臨床への応用が大きく期待されている。

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 6 件) 全て査読付き

- ① Tiwari AK, Ji B, Yui J, Fujinaga M, Yamasaki T, Xie L, Luo R, Shimoda Y, Kumata K, Zhang Y, Hatori A, Maeda J, Higuchi M, Wang F, Zhang MR. [^{18}F]FEBMP: Positron Emission Tomography Imaging of TSPO in a Model of Neuroinflammation in Rats, and in vitro Autoradiograms of the Human Brain. *Theranostics* 2015; 5:961-969. doi:10.7150/thno.12027.
- ② Tiwari AK, Fujinaga M, Yui J, Yamasaki T, Xie L, Kumata K, Mishra AK, Shimoda Y, Hatori A, Ji B, Ogawa M, Kawamura K, Wang F, Zhang MR. Synthesis and evaluation of new ^{18}F -labelled acetamidobenzoxazolone-based radioligands for imaging of translocator protein (18 kDa, TSPO) in brain. *Org. Biomol. Chem.* 2014;12:9621-9630. doi: 10.1039/c4ob01933d.
- ③ Tiwari AK, Yui J, Fujinaga M, Kumata K, Shimoda Y, Yamasaki T, Xie L, Hatori A,

- Maeda J, Nengaki N, Zhang MR. Characterization of a novel acetamidobenzoxazolone-based PET ligand for translocator protein (18 kDa) imaging of neuroinflammation in the brain. *J Neurochem*. 2014;129:712-720. doi: 10.1111/jnc.12670.
- ④ Hatori A, Yui J, Xie L, Yamasaki T, Kumata K, Fujinaga M, Wakizaka H, Ogawa M, Nengaki N, Kawamura K, Zhang MR. Visualization of acute liver damage induced by cycloheximide in rats using PET with [¹⁸F]FEDAC, a radiotracer for translocator protein (18 kDa). *PLoS One*. 2014;9:e86625. doi: 10.1371/journal.pone.0086625.
- ⑤ Xie L, Yui J, Hatori A, Yamasaki T, Kumata K, Wakizaka H, Yoshida Y, Fujinaga M, Kawamura K, Zhang MR. Translocator protein (18 kDa), a potential molecular imaging biomarker for non-invasively distinguishing non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2012; 57: 1076-1082. doi: 10.1016/j.jhep.2012.07.002.
- ⑥ Hatori A, Yui J, Yamasaki T, Xie L, Kumata K, Fujinaga M, Yoshida Y, Ogawa M, Nengaki N, Kawamura K, Fukumura T, Zhang MR. PET imaging of lung inflammation with [¹⁸F]FEDAC, a radioligand for translocator protein (18 kDa). *PLoS One*. 2012;7:e45065. doi: 10.1371/journal.pone.0045065.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 謝琳, 由井 讓二, 熊田 勝志, 羽鳥 晶子, 山崎 友照, 季 斌, 河村 和紀, 張 明榮. ヒト肝臓検体を用いる脂肪肝に対する ¹⁸F-FEDAC イメージングの有用性評価. 2014 年 11 月 6 日 - 8 日. 第 54 回日本核

医学会総会. 大阪.

- ② Lin Xie. [¹⁸F]FEDAC-PET: a novel approach for non-invasively discriminating non-alcoholic fatty liver disease. Molecular Imaging Center International Peer Review 2013. 2013 年 11 月 18-19 日. 千葉.
- ③ 謝琳, 由井 讓二, 羽鳥 晶子, 山崎 友照, 熊田 勝志, 脇坂 秀克, 吉田 勇一郎, 藤永 雅之, 河村 和紀, 張 明榮. トランスロケータタンパク質 (18 kDa)、非アルコール性脂肪肝疾患診断の新たな分子イメージングバイオマーカー. 第 53 回日本核医学会学術総会. 2013 年 11 月 8-10 日. 福岡.
- ④ Lin Xie. Molecular Imaging of Multiple Sclerosis and Non-alcoholic Fatty Liver Disease Using Translocator Protein (18kDa) Radioligands. 2013 NSFC-JSPS seminar. September 18-20, 2013. Shanghai, China.
- ⑤ 謝琳, 由井 讓二, 羽鳥 晶子, 山崎 友照, 熊田 勝志, 脇坂 秀克, 張 明榮. TSPO を標的とした [¹⁸F]FEDAC による肝細胞癌イメージング. 第 8 回日本分子イメージング学会学術集会. 2013 年 5 月 30-31 日. 横浜.
- ⑥ 謝琳, 由井 讓二, 羽鳥 晶子, 山崎 友照, 熊田 勝志, 脇坂 秀克, 張 明榮. [¹⁸F]FEDAC-PET による非アルコール性脂肪性肝疾患画像診断法の開発. 第 12 回放射性医薬品・画像診断薬研究会. 2012 年 12 月 15 日. 京都.
- ⑦ 謝琳, 由井 讓二, 羽鳥 晶子, 山崎 友照, 熊田 勝志, 藤永 雅之, 脇坂 秀克, 吉田 勇一郎, 河村 和紀, 張 明榮. TSPO-PET による脂肪肝画像診断法の開発及び発生機序の解明に関する研究. NIRS テクノフェア 2012. 2012 年 12 月 6 日. 千葉.

- ⑧ 謝 琳, 由井 讓二, 羽鳥 晶子, 山崎 友照, 熊田 勝志, 脇坂 秀克, 張 明榮. TSP0 を標的とした肝細胞癌の画像診断法の開発に関する研究. 第 52 回日本核医学会学術総会. 2012 年 10 月 11-13 日. 札幌.
- ⑨ 羽鳥 晶子, 由井 讓二, 山崎 友照, 謝 琳, 脇坂 秀克, 吉田 勇一郎, 熊田 勝志, 張 明榮. TSP0 リガンド [¹⁸F]FEDAC を用いたラット肝線維化の PET イメージング. 2012 年 10 月 11-13 日. 第 52 回日本核医学会学術総会. 札幌.
- ⑩ Lin Xie, Joji Yui, Akiko Hatori, Tomoteru Yamasaki, Katsushi Kumata, Hidekatsu Wakizaka, Yuichirou Yoshida, Masayuki Fujinaga, Toshimitsu Fukumura, Ming-Rong Zhang. Translocator Protein (18 kDa) is a Potential Biomarker for Molecular Imaging of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. World Molecular Imaging Congress 2012, September 5-8, 2012. Dublin, Ireland.
- ⑪ 謝 琳, 由井 讓二, 羽鳥 晶子, 山崎 友照, 熊田 勝志, 吉田 勇一郎, 福村 利光, 張 明榮. [¹⁸F] FEDAC-PET による非アルコール性脂肪肝疾患の定量かつ非侵襲的な画像診断法の開発. 日本薬学会 第 132 年会, 2012 年 3 月 28-31 日. 札幌.

[その他]

報道 (計 3 件)

- ① 脂肪肝, PET 画像で診断. 朝日新聞, 脂肪肝の発症及び進行を PET でモニタリングすることに成功. 2012 年 9 月 5 日, 7 面掲載
- ② 脂肪肝, 画像で把握. 読売新聞, 2012 年 9 月 5 日, 31 面掲載.
- ③ 脂肪肝を超早期診断—PET 用薬剤開発.

科学新聞, 2012 年 9 月 14 日, 4 面掲載

ホームページ (計 4 件)

- ① 第 53 回日本核医学会学術総会において研究奨励賞と優秀ポスター賞を受賞
<http://www.nirs.go.jp/research/division/mic/newsrelease/131122/index.html>
- ② 欧州肝臓学会の雑誌「Journal of Hepatology」の表紙を飾りました
<http://www.nirs.go.jp/research/division/mic/newsrelease/121206/index.html>
- ③ 脂肪肝の発症及び進行を PET でモニタリングすることに成功—PET 検査が脂肪肝の診断や進行度判定に有効な手段となる可能性—
http://www.nirs.go.jp/information/press/2012/09_04.shtml
- ④ 2012 World Molecular Imaging Congress Student Travel Stipend Award 受賞
<http://www.nirs.go.jp/research/division/mic/newsrelease/120911-2/>

受賞 (計 3 件)

- ① 2013 年 11 月 日本核医学会で第 10 回日本核医学会研究奨励賞
- ② 2013 年 11 月 武田科学振興財団で医学系研究賞
- ③ 2012 年 9 月 世界分子イメージング学会 2012 年会で Student Travel Stipend Award

6. 研究組織

(1) 研究代表者

謝 琳 (XIE Lin)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号 : 30623558