

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461310

研究課題名(和文) MMP特異的19F-MRトレーサーを用いた血栓溶解時の出血性梗塞予測法確立

研究課題名(英文) Development of MMP specific 19F-MRS tracer to assess the disruption of neurovascular unit in brain

研究代表者

五十嵐 博中 (Igarashi, Hironaka)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20231128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脳梗塞急性期における重篤かつ頻度の高い副作用である血栓溶解療法後の出血性梗塞の原因、即ち脳血管内皮細胞障害を直接検出することにより、血栓溶解療法適応判断のbiomarkerとなり得る新しいタイプのMRトレーサーを開発することである。これを目的として申請者らは全く新しいタイプのMR用リガンドであるTGN-019を開発し、MMPに対する感度、特異性を検証し、脳梗塞モデルに応用した。TGN-019は梗塞巣におけるMMP 2/9の増加・集積を感度よく検出し、内皮障害が強く見られ、出血性梗塞を来しやすいと思われる病態においてその集積は高度であった。

研究成果の概要(英文)：Hemorrhagic transformation (HT) is one of the most severe side effects in clot buster therapy for an acute stage of cerebral infarction. However, there is no objective biomarker to predict HT in a clinical situation at this point. To solve this issue, we developed the new type 19F molecular ligand, TGN-019, that can assess the disruption of neurovascular unit in the brain. We proved the sensitivity and specificity of TGN-019 for MMP2, MMP9 and MMP3. Then we utilized it to assess the disruption of neurovascular unit of ischemic mouse brain. 19F-MR image of TGN-019 administered mouse with acute cerebral infarction showed the high signal intensity in the case with most severe disruption of neurovascular unit. Beside signal intensity was correlated with total MMP2 and MMP9 activity confirmed with biological test of the specimen.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経機能画像学 磁気共鳴学 19F 脳虚血 出血性梗塞

## 1. 研究開始当初の背景

t-PAの副作用であるHTは発症から治療開始までの時間が長いほど頻度が増加し、HTにより症候の急激な悪化を見る症候性HTを呈した症例は、発症4.5時間以降のメタ解析では6-10%に及ぶ。このため治療可能時間の延長が現実化するにつれ、画像診断による適応の決定が多く試みられており、現時点で試みられている研究ではt-PA後のHT出現の予測指標として、DWIにおける虚血病巣の大きさ、CTPあるいはPIによる脳血流量/脳血液量低下領域、造影MRIにより血液脳関門(BBB)障害を示す虚血病巣の造影所見などが報告されている。しかし、いずれの所見もHTを呈する可能性のある一部の病態を間接的に見ているのみであり、十分な成果はあげられていない。HTを高精度に予測する為にはその病態の本質である血管内皮細胞障害そのものをとらえる必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳梗塞急性期における重篤かつ頻度の高い副作用である血栓溶解療法後の出血性梗塞(hemorrhagic transformation; HT)の原因、即ち脳血管内皮細胞障害を直接検出することにより、血栓溶解療法適応判断のbiomarkerとなり得る新しいタイプのMRトレーサーを開発することである。

脳虚血におけるHT発生の原因はタンパク分解酵素の一種であるマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMPs)活性化による血液脳関門(Blood Brain Barrier: BBB)の破壊であると考えられている。MMPは脳において細胞局在が認められ、その活性化は虚血の経過時間に応じて、一連のカスケードを構成している。このカスケードの始まりはグリアのフットプロセスにおけるMMP2の活性化であり、活性化MMP2が内皮細胞の外周にあるbasal lamina、更にはtight junctionの主たる構成物質であるoccludinを障害する。血栓溶解後、障害が著しい部位に内皮細胞の内腔側よりt-PAが作用することによりMMP3、更にはMMP9の著しい活性亢進が生じ、最終的に血管が破壊されHTが生じると考えられる。そこで、MMP2/9を中心としたMMP Familyを特異的に検出する経静脈投与MRトレーサーの開発、検証を行った。MMPカスケード亢進の初期を捉えるためには、トレーサーはBBBを透過し、脳実質内でMMPと結合しなければならない。Gd化合物など従来のMR造影剤系統はBBBを透過せず、MR測定可能な元素を含む全く新たな観点に立ったトレーサー開発が必要である。実験では臨床MRIで用いられるプロトンの共鳴周波数に最も近く、MR画像評価の妨げとなるバックグラウンドがない<sup>19</sup>Fトレーサーの開発を念頭に実験を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1) Ligand の設計

本研究を進めるに当たり、最も重要な要素はLigandの設計である、当初In Silicoによるsimulationを行い、候補物質のプロトン基を<sup>19</sup>Fに置換し、回収率が最も高い候補物質を選定した。

### (2) 生体に対する薬剤の基本的性質の評価

選択されたLigand候補物質について、MMPに対するsensitivity, specificityをマウスにてMRおよび生化学的手法で評価する。

### (3) 脳梗塞モデルを用いた検出能力の評価

マウス中大脳動脈閉塞による脳梗塞モデル動物を用い、出血性梗塞を来しやすい条件および来しにくい条件にてTGF-019の集積度を比較・検討する。

## 4. 研究成果

### (1) TGF-019(5-<sup>19</sup>F-GM6001)の合成

汎MMP阻害剤であり、Knが低い(=MMPに結合しやすい)GM-6001を元に、プロトン基を<sup>19</sup>Fに置換することで、リガンド開発を行った。その結果、置換基を5位におくことにより、もっとも効率的な<sup>19</sup>F化合物を合成できることが判明し、リガンドにはTGF-019(5-<sup>19</sup>F-GM6001)を用いることとした。

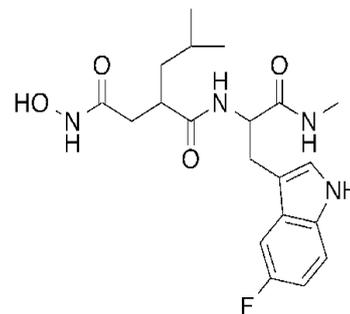
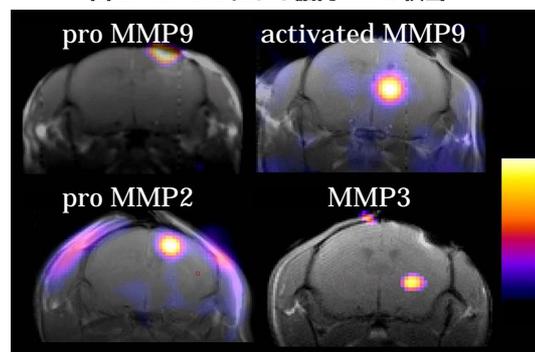


図1. TGF-019

### (2) sensitivity の検証

TGF-019の脳内の主たるMMPであるMMP2,9,3に対するsensitivityを確認するために、MMP backgroundがほぼ皆無であるMMP2 knockout miceの脳内にMMP2, MMP3, pro-MMP9、activated MMP9を各々2μl投与した後、TGF-019を経静脈投与しMRSI撮像を施行、これら3つのMMP投与部を明確に画像化できることを確認した。

図2. TGF-019による脳内MMPの検出



(3) specificity の検証

specificity を確認するために、脳内 LPS 注入モデルを作成、MRSI を測定後、同一動物で in situ zymography を施行、MRSI と比較した。

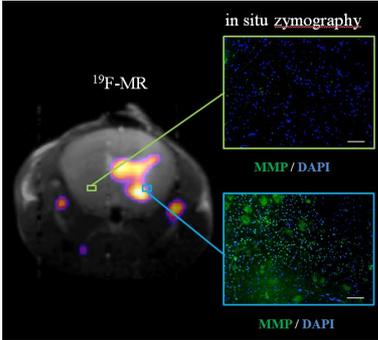


図3. LPS 投与マウス脳における TGN-019 高信号部では in situ zymography で MMP が検出される

(4) 脳梗塞モデルを用いた検出能力の評価

C57BL/6 マウスに中大脳動脈 1 時間閉塞を来した群 (ischemia only 群)、出血性梗塞を惹起させる為に閉塞後再開通時に t-PA を投与した群 (t-PA 群)、虚血後の MMP 群の上昇が抑えられていることが分かっている MMP2 knock-out mouse に同様の閉塞を来した群 (MMP2 ko 群) の 3 群につき、中大脳動脈閉塞 24 時間後に TGN-019 を投与し、信号強度を比較した。その結果、出血性梗塞を来した t-PA 群が最も信号強度が高く、ついて ischemia only 群、MMP2 ko 群の順に信号強度が低下した。これは別動物で行った 3 群についての zymography にて MMP2+MMP9 の反応活性と一致していたが、一部で報告されている MMP3 の上昇は生化学的アッセイを用いた確認では認められず、MRSI の信号強度との一致も認められなかった

図4. 各虚血群における TGN-019 画像

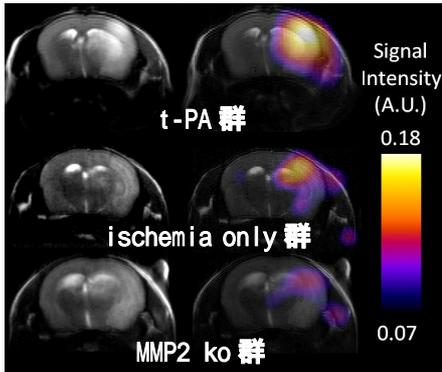


図5. 各虚血群における TGN-019 信号強度

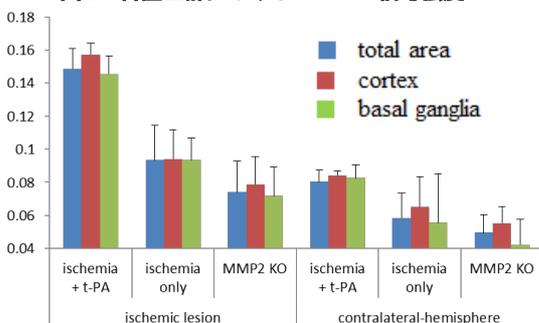
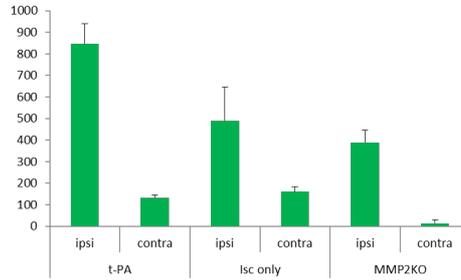


図6. 各虚血群における Zymography 反応強度



(5) まとめ

申請者らは全く新しいタイプの MR 用リガンドである TGN-019 を開発し、MMP に対する感度、特異性を検証し、脳梗塞モデルに応用した。TGN-019 は梗塞巣における MMP2/9 の増加・集積を感度よく検出し、内皮障害が強く見られ、出血性梗塞を来しやすいと思われる病態においてその集積は高度であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Suzuki Y, Nakamura Y, Yamada K, Igarashi H, Kasuga K, Yokoyama Y, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kwee IL, Nakada T. Reduced CSF Water Influx in Alzheimer's Disease Supporting the -Amyloid Clearance Hypothesis. PLoS One. 2015 May 6;10(5):e0123708. doi: 10.1371/journal.pone.0123708. eCollection 2015. (査読あり)

Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Tanaka Y, Koyama M, Toriyabe M, Igarashi H, Nakada T, Nishihara M, Nishizawa M, Shimohata T. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke. Brain. 2015 Jul;138(Pt 7):1932-48. doi: 10.1093/brain/awv079 (査読あり)

Igarashi H, Suzuki Y, Huber VJ, Ida M, Nakada T. N-acetylaspartate decrease in acute stage of ischemic stroke: a perspective from experimental and clinical studies. Magn Reson Med Sci. 2015;14(1):13-24. doi: 10.2463/mrms.2014-0039. (査読あり)

Suzuki K, Igarashi H, Huber VJ, Kitaura H, Kwee IL, Nakada T. Ligand-based molecular MRI: 0-17 JJVCPE amyloid imaging in transgenic mice. J Neuroimaging. 2014 Nov-Dec;24(6):595-8. doi: 10.1111/jon.12091. Epub 2014 Feb 23. (査読あり)

Igarashi H, Suzuki Y, Kwee IL, Nakada T. Water influx into cerebrospinal fluid is significantly reduced in senile plaque bearing transgenic mice, supporting beta-amyloid clearance hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurol Res.* 2014 Dec;36(12):1094-8. doi:10.1179/1743132814Y.0000000434 (査読あり)

Kawamura K, Takahashi T, Kanazawa M, Igarashi H, Nakada T, Nishizawa M, Shimohata T. Effects of angiopoietin-1 on hemorrhagic transformation and cerebral edema after tissue plasminogen activator treatment for ischemic stroke in rats. *PLoS One.* 2014 Jun 4;9(6):e98639. doi:10.1371/journal.pone.0098639. (査読あり)

Igarashi H, Tsujita M, Kwee IL, Nakada T. Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1: 170 JJVCPE MRI study in knockout mice. *Neuroreport.* 2014 Jan 8;25(1):39-43. doi:10.1097/WNR.000000000000042. (査読あり)

Kamiya N, Ueda M, Igarashi H, Nishiyama Y, Suda S, Okubo S, Inaba T, Katayama Y. In vivo monitoring of arterially transplanted bone marrow mononuclear cells in a rat transient focal brain ischemia model using magnetic resonance imaging. *Neurol Res.* 2013 Jul;35(6):573-9. doi:10.1179/1743132813Y.0000000171 (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

五十嵐 博中  
高磁場 MRS の展望 (招待講演)  
第 26 回脳循環代謝学会総会  
シンポジウム 脳画像の進歩  
2014 年 11 月 21 日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

五十嵐 博中  
高磁場 MRS ; マウスからヒトへ (招待講演)  
第 41 回 日本磁気共鳴医学会大会  
シンポジウム  
分子イメージングにおける Breakthrough  
2013 年 9 月 20 日アスティとくしま (徳島県徳島市)

〔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0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〕  
ホームページ等

<http://coe.bri.niigata-u.ac.jp/index.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五十嵐 博中 (IGARASHI, Hironaka)  
新潟大学・脳研究所  
教授  
研究者番号 : 20231128

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

ヒューバー・ジェイ・ビンセント  
(HUBER J, Vincent)  
新潟大学・脳研究所  
准教授  
研究者番号 : 40422620

辻田 実加 (TSUJITA, Mika)  
新潟大学・脳研究所  
准教授  
研究者番号 : 60397180

### (4) 研究協力者

中田 力  
(NAKADA, Tsutomu)

クイー・エル・イングリッド  
(KWEEL, L Ingrid)

ザン・ピンウェン  
(ZHANG, Bingwen)