

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461847

研究課題名(和文) 梗塞後左室リモデリングの病態に関するマルチトレーサ生体分子イメージングの研究

研究課題名(英文) Multi-tracer molecular imaging for the assessment of pathophysiology of ventricular remodeling after myocardial infarction

研究代表者

瀧 淳一 (Taki, Junichi)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：10251927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：虚血再還流ラットにおけるI-125-抗tenascin-C抗体の集積を検討した結果、集積は3日でピークに達しその後漸減した。虚血直後のpostconditioningで集積は全経過を通して低下し左室リモデリングは抑制された。Tenascin-Cの間質での発現の抑制が2か月後の左室リモデリングの抑制に関連していることが考えられた。I-125-RGDの心筋梗塞後の集積の意義を検討した結果、7日から1か月後では強い集積を認め、2か月でやや低下した。集積は微小血管様構造にほぼ一致し、マクロファージの出現とは一致をみず、集積は血管新生を反映した。

研究成果の概要(英文)：Tenascin-C expression after myocardial ischemia and reperfusion was investigated using I-125-anti-tenascin-c-antibody (TNC). Autoradiography showed that the uptake peaked 3 days after reperfusion, followed by gradual reduction. Postconditioning at reperfusion suppressed TNC uptake at day 3 and thereafter and attenuated the left ventricular remodeling at 2 months later, suggesting that suppression of tenascin-C expression related to the attenuation of ventricular remodeling.

α v β 3 integrin is expressed both by macrophages and angiogenic endothelial cells. We investigated whether I-125-RGD, which showed high affinity and selectivity for α v β 3, reflects inflammatory process or angiogenesis after myocardial infarction. I-125 RGD accumulated in the infarcted area, and its uptake corresponded closely to micro vessel formation rather than macrophage infiltrations until 2 months after infarction. RGD imaging may be useful for the evaluation of angiogenesis after myocardial infarction.

研究分野：核医学

キーワード：myocardial ischemia remodeling tenascin C angiogenesis RGD apoptosis annexin V

1. 研究開始当初の背景

左室リモデリングは、急性心筋梗塞発症後の治癒過程において左心室の拡大をおこす現象をさしている。心筋梗塞急性期における血行再建や薬物療法の発達により救命率が飛躍的に向上した。しかし急性期を乗り切ったのちに左室リモデリングにより心不全を発症し多くの命が失われており、臨床上の大きな問題として注目されている。従って左室リモデリングを予測し、かつ治療効果を判定できるような分子イメージングの開発は非常に重要である。

従来からの急性期心筋梗塞における病態画像診断は、梗塞サイズ、心筋血流、血行動態の観察により心筋全体の変化をみるものであった。我々はさらに踏み込んで心筋細胞そのものの病理学的、機能的な変化に加え、心筋間質組織の病態変化に対しても、直接的に画像化することを試みてきた。心筋細胞に関しては、虚血による心筋壊死の過程ではなく、心筋アポトーシスの観点から Tc-99m-annexin V を用いて検討してきた。その結果、心筋のアポトーシスは心筋障害に大きな意義を持ち、虚血後 1 時間以内から数日の間にダイナミックに変化することを突き止めた。この研究は高く評価され、Journal of Nuclear Medicine の表紙を飾ることとなった (J Nucl Med. 2004;45:1536-41)。また心筋アポトーシスは虚血時間に依存し、種々のインターベンションで軽減できることをアポトーシスイメージングで示した (J Nucl Med 2007;48:1301-7, Circ J 2007; 71:1141-6)。一方、心筋組織の構成成分である間質組織も重要な役割を担っており、単に組織を力学的に支えるのみでなく、細胞と細胞外の物質との相互的作用を多彩な生物活性により仲介する役割を担う matricellular protein が組織再構築に重要な役割を担っていることが解ってきた。テネイシン C はその代表的な蛋白であり、間質再構築における発現と役割が近年注目されている。左室リモデリングには心筋アポトーシスの関与に加え、間質組織の再構築も重要な因子であることが示唆されている。そこでテネイシン C の発現の画像化を I-125 標識抗テネイシン C 抗体を用いて検討した。その結果、虚血部位にて 3 日後に発現がピークとなり 2 週間以上発現が持続し、1 か月で消退することを報告してきた (J Nucl Med. 2010;51:1116-1122)。病理組織学的にはこの集積は虚血領域内に不均一に散在するが特に正常心筋組織と梗塞心筋組織の移行部で強く認められた。また梗塞後の血管新生

の評価の可能性を C-14 メチオニンによるイメージングで探したが、その亜急性期の集積は梗塞部へのマクロファージ浸潤を反映することが判明した (J Nucl Med. 2013;54:431-6)。ただし左室リモデリングをおこす慢性期の集積の血管新生との関係が課題として残された。

これらの結果をふまえ、梗塞後の左室リモデリングの過程や機序を多角的に分子イメージングにて評価することは、梗塞後の左室リモデリングの病態解明やその予測、治療戦略構築において重要な役割を果たす可能性が高いと考えるに至った。そこで生体での SPECT による画像化を前提として、心筋アポトーシス、間質の変化としてのテネイシン C の発現、マクロファージを主体とした炎症性変化の評価としてのメチオニンの各イメージングに加え、血管新生の直接的指標となりうる Galactro-RGD の画像化を試み、各画像が示す所見が、梗塞後の左室リモデリングといかに関連するかを明らかにすることで、マルチトレーサによる新たな分子イメージングの可能性を追求することを目標とした。

2. 研究の目的

本研究は臨床で問題となっている急性心筋梗塞再還流後の左室リモデリングによる心不全の発生に焦点をあて、その病態変化を画像化することを目的とした核医学的研究である。ラット虚血再還流モデルを用い、梗塞心筋のアポトーシス、細胞外マトリックス糖タンパク質の発現、血管新生、アミノ酸トランスポートと蛋白合成を反映するメチオニン代謝をアイソトープ標識トレーサを用いて画像化し、その動態を解析する。治療効果に関しても SPECT による in-vivo イメージングを施行し、心機能の変化と病理組織標本との対比検討する。以上より各画像のもつ意義を精査し、また画像による左室リモデリングの予測の可能性を含め、臨床応用を目指す研究である。

3. 研究の方法

ラットを用いて虚血再還流モデルを作成した。左開胸後、左冠動脈下に糸を通し両端をビニルチューブに通し、同時に引っ張ることにより左冠動脈血流を 20-30 分間途絶し、その後、糸を緩めることで再還流を得た。Postconditioning は再還流時に 10 秒ごとの冠動脈閉塞解放を 6 回繰り返すことで達成した。用いたトレーサは I-125 標識 anti Tenascin-C antibody(I-125-TNC)と I-125 標識 RGD である。

I-125-TNC は 30 分虚血再還流 1, 3, 7, 14 日

後に 1.0-2.5 MBq 投与した。その 6-9 時間後に左冠動脈を再閉塞し、虚血領域を描出するために直ちに 100-200 MBq の Tc-99m-MIBI を投与し 1 分後に屠殺した。20 ミクロンの厚さの左室短軸スライスを作成しデュアルトレーサーオートラジオグラフィを施行した。まず 15-20 分間の露出にて Tc-99m-MIBI の分布を画像化し、虚血領域すなわち area at risk を決定した。3 日後に再び 7 日間の露出にて I-125-TNC の分布を画像化した。Postconditioning モデルでも同様にオートラジオグラフィのデータを収集した。左室リモデリングの評価は虚血再還流 2 か月後に心臓超音波検査にて行った。虚血再還流、虚血再還流+ Postconditioning モデルそれぞれにおいて、乳頭筋レベルの短軸像にて毎秒 265 フレームレートにて拡張末期径、収縮末期径を測定し、左室 % fractional shortening は[(拡張末期径 - 収縮末期径) / 拡張末期径] x 100 で求めた。

I-125-RGD の実験では 30 分虚血再還流モデルを用い、再還流 1, 3, 7, 14 日と 1, 2 か月後に I-125-RGD 1.48 MBq を静注し、80 分後に area at risk 描出のため冠動脈を再結紮し、直後に Tc-99m-MIBI(150-180MBq)を投与し、1 分後に屠殺した。20 ミクロンの厚さの左室短軸スライスを作成しデュアルトレーサーオートラジオグラフィを施行した。まず 15-20 分間の露出にて Tc-99m-MIBI の分布を画像化し、虚血領域すなわち area at risk を決定した。3 日後に再び 7 日間の露出にて I-125-TenC の分布を画像化した。

各トレーサーの集積は area at risk 全体のトレーサー集積濃度を正常還流域のトレーサー集積濃度で徐して、集積比として求めた。

4. 研究成果

Tenascin-C 発現に関する実験：

心筋梗塞における matricellular 蛋白の代表である Tenascin-C の発現と治療的インターベンションとしての postconditioning による Tenascin-C の発現に対する影響、ならびにその後の左室リモデリングへの影響に関して以下の実験を施行した。虚血再還流ラット (30 分虚血再還流モデル, n=27) における Tenascin-C の発現を I-125 標識抗 tenascin-C 抗体(I-125-TNC)を用い、再還流 1,3,7,14 日後にオートラジオグラフィにて集積を検討した。その結果 I-125-TNC の非虚血部に対する虚血部の集積比はそれぞれ 3.73 ± 0.71 , 4.65 ± 0.87 , 2.91 ± 0.55 ($P < 0.005$ vs 3 day), 2.01 ± 0.17 , ($P < 0.005$ vs 1 day and 3 day)と 3 日でピークに達し、

その後漸減した。次いで虚血直後に postconditioning を行うことでその Tenascin-C 発現の及ぼす影響を検討した (n=27)。Tenascin-C の発現(I-125-TNC)の集積)は 1, 3, 7, 14 日後でそれぞれ 2.59 ± 0.59 ($p < 0.05$), 3.10 ± 0.42 ($P < 0.005$), 1.93 ± 0.37 ($P < 0.05$), 1.40 ± 0.07 ($P < 0.001$)と有意に低下した。左室リモデリングに関しては虚血再還流 2 月後に心臓超音波検査にて評価した。その結果 30 分虚血再還流群(n=6)に対して postconditioning を施行した群(n=6)では拡張末期径は 1.0 ± 0.06 cm から 0.90 ± 0.15 cm ($P < 0.05$)、収縮末期径は 0.90 ± 0.15 cm から 0.62 ± 0.19 cm ($P < 0.05$)へと縮小し、% fractional shortening は 10.5 ± 3.7 から 28.2 ± 10.7 ($p < 0.005$)へと改善した。また梗塞サイズも postconditioning により $59.7\% \pm 9.0\%$ から $44.5 \pm 7.9\%$ へと有意に縮小した ($P < 0.05$)。以上より、I-125-TNC イメージングにより、心筋梗塞後の間質に発現する matricellular 蛋白の代表である Tenascin-C は 3 日でピークとなり以後漸減すること、この発現は postconditioning により梗塞 1 日後から 14 日後までのすべての時期にわたって抑制されること、postconditioning により 2 か月後の左室リモデリングが抑制されることが判明した。この結果からは postconditioning による心筋梗塞後の急性から亜急性期の組織治癒過程における Tenascin-C の間質での発現の抑制が 2 か月後の左室リモデリングの抑制に関連していることが考えられた。

I-125-RGD による血管新生に関する実験：

心筋梗塞後の組織修復過程はその後の左室リモデリングを含め予後に重大な影響を及ぼす。梗塞後のリモデリングを規定する重要な因子の一つと予想される血管新生の画像化をめざして検討を行った。

arginine-glycine-aspartic acid (RGD)は血管新生時の内皮細胞の遊走を制御する $\alpha_3\beta_1$ integrin に特異的に結合するとされている。しかし一方で $\alpha_3\beta_1$ はマクロファージにも発現するとの報告がある。そこでラット虚血再還流モデルにて、I-125-RGD の心筋梗塞後の経時的空間的集積の変化をまず検討した。ついで集積が血管新生を反映するのか、マクロファージ等の炎症生変化を反映するのかについて検討した。30 分虚血再灌流ラット (n=31)に対して再還流 1, 3, 7, 14 日と 1, 2 か月後に I-125-RGD (1.48 MBq) を静注し、80 分後に area at risk 描出のため冠動脈を再結紮した。直後に Tc-99m-MIBI(150-180MBq)

を投与し、その1分後に屠殺し心筋を摘出した。心筋短軸スライスを2核種オートラジオグラフィにて画像化した。隣接するスライスに対して病理組織学的検討も行った。免疫組織学的検討ではマクロファージはCD36の染色にて、血管新生はanti-smooth muscle actin(SMA)染色にて評価した。その結果、再還流1日ではarea at risk内のRGD集積は不明瞭であった。3日ではarea at risk部に一致してRGDの弱い集積を、7,14日,1月では強い集積を認め、2月でやや低下した。集積比はそれぞれ正常部の1.22±0.22, 2.27±0.36, 2.04±0.17, 1.93±0.16, 1.57±0.15となった。集積はSMAで染まる微小血管様構造に空間的、時間的にほぼ一致した。マクロファージの出現とは集積の程度、分布、時期いずれも一致をみなかった。以上より、I-125-RGDの集積は梗塞1週間後から著明に増加し、1-2ヵ月にわたって血管新生を反映していると考えられた。以上よりI-125-RGDにより血管新生を反映したイメージングが可能であることが示された。今後I-123-RGDや新たなTc-99m標識RGDにより生体イメージングが可能であることが示唆された。

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7件)

- 1) Taki J, Inaki A, Wakabayashi H, Matsunari I, Imanaka-Yoshida K, Ogawa K, Hiroe M, Shiba K, Yoshida T, Kinuya S. Effect of postconditioning on dynamic expression of tenascin-C and left ventricular remodeling after myocardial ischemia and reperfusion Eur J Nucl Med and Molecular Imaging Research 2015;5:21, 査読あり
- 2) Wakabayashi H, Taki J, Inaki A, Shiba K, Matsunari I, Kinuya S Correlation between Apoptosis and Left Ventricular Remodeling in Subacute Phase of Myocardial Ischemia and Reperfusion. Eur J Nucl Med and Molecular Imaging Research (EJNMMI Research) 2015;5:72, 査読あり

[学会発表](計16件)

- 1) Taki J, Inaki A, Wakabayashi H, Ogawa K, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Matsunari I, Shiba K, Kinuya S. Revisiting the RGD uptake after myocardial infarction: Does it

reflect inflammatory change or angiogenesis or both? 63rd Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, 2016.6.14, San Diego (USA).

- 2) Taki J, Wakabayashi H, Matsunari I, Hiroe M, Imanaka-Yoshida K. What pathophysiology does the RGD imaging reflect after myocardial ischemia and reperfusion (Featured research session) The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2016.3.20, Sendai.
- 3) Taki J, Wakabayashi H, Inaki A, Ogawa K, Matsunari I, Hiroe M, Imanaka-Yoshida K, Shiba K, Kinuya S. Imaging of angiogenesis using I-125 labelled arginine-glycine-aspartate targeting $\alpha v \beta 3$ integrin after myocardial ischemia and reperfusion. 62nd Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2015.6.9, Baltimore (USA).
- 4) Taki J. Apoptosis, Somatostatin receptor and other novel imaging agents (Symposium). International conference of Nuclear Cardiology and Cardiac CT 12, 2015.5.4, Madrid (Spain).
- 5) Taki J, Wakabayashi H, Inaki A, Imanaka-Yoshida K, Hiroe M, Ogawa K, Shiba K, Yoshida T, Kinuya S. Postconditioning facilitate myocardial inflammatory resolution after severe ischemia and reperfusion: Assessment by C-14 methionine autoradiography. 61st Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine. 2014.6.7, St. Louis (USA).

[図書](計1件)

- 1) Matsunari I, Taki J. Chapter 14: Autonomic imaging in myocardial ischemia. In: Slart RHJA, Tio RA, Elsinga PH, Schwaiger M, eds. Autonomic Innervation of the Heart: Role of molecular Imaging, Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag, 2016, P289-308. ISBN 978-3-662-45074-1

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀧 淳一 (TAKI, Junichi)

金沢大学・附属病院・講師
研究者番号：10251927

(2)研究分担者

柴 和弘 (SHIBA, Kazuhiro)
金沢大学・学際科学実験センター・教授
研究者番号：40143929

小川 数馬 (OGAWA, Kazuma)
金沢大学・新学術創成研究機構・准教授
研究者番号：30347471

(3)研究協力者

若林大志 (WAKABASHI, Hiroshi)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：60622818

稲木杏吏 (INAKI, Anri)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：40645131