

**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：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15440

研究課題名(和文)動脈硬化症のRI治療への挑戦：マクロファージ浸潤抑制のためのRI内用療法剤の開発

研究課題名(英文)A Challenge of radio-isotope therapy for atherosclerosis: Development of a radiopharmaceutical to suppress macrophage infiltration

研究代表者

久下 裕司 (KUGE, YUJI)

北海道大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：70321958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化症の治療において、心筋梗塞等の成因となる破綻しやすいプラーク(不安定プラーク)を早期に治療することが重要であり、全身に発症リスクを抱える本疾患の根本的な治療法の開発が切望されている。

本研究では、動脈硬化病変(不安定プラーク)の特異的・根治的な治療を達成することを目的とし、動脈内に浸潤したマクロファージに発現し、プラーク破綻とそれに伴う血栓形成に深く関与する組織因子(Tissue Factor, TF)に特異的に結合するRI内用療法用薬剤の創製のための基礎的検討を行なった。

研究成果の概要(英文)：In the medication of atherosclerosis, early treatment of vulnerable plaque which plays a pivotal role for ischemic diseases such as myocardial infarction, is necessary. Thus, it is desired to develop an effective treatment method for this systemic disease. Tissue factor (TF) is a well-known factor which is highly expressed in the macrophages infiltrated in atherosclerotic plaques and is significantly related to the plaque rupture and following thrombus formation. Thus, aiming to achieve a highly selective and complete treatment of atherosclerotic lesions, especially vulnerable plaques, we conducted basic experiments to developed a novel radiopharmaceutical targeting TF for radio-isotope therapy (internal radiation therapy) of atherosclerosis.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射線 核医学 RI内用療法 動脈硬化 組織因子

## 1. 研究開始当初の背景

近年、動脈内のプラーク破綻とそれに伴う血栓形成が、心筋梗塞や脳梗塞の発症に深く関与していることが明らかとなってきた。したがって、動脈硬化プラーク、特に“破綻しやすいプラーク(不安定プラーク)”を早期に治療することが重要である(Ref: Circulation, 2003)。本治療を達成するため、現在臨床では高脂血症薬・抗血小板薬等を用いた薬物療法、バルーン法・ステント挿入等の血管内治療法、バイパス形成術等の外科的療法が行われている。しかしながら、

の治療法はあくまで対症療法であり、長期間持続的治療が必要であること、およびの治療法は侵襲的かつ局所的な治療法であり、患者への身体的負担を強いるのみならず病変の再発・全身性の病変進行に対応が困難であることが問題視されており、全身に発症リスクを抱える本疾患の根本的な治療法の開発が切望されている。

一方、がんの治療法としては、放射性同位元素(RI)内用療法が、転移巣も含めた全身の治療に有効であることが認知されている。そこで申請者らは、RI内用療法により、動脈硬化プラークの形成・進展に深く関与するマクロファージ等の炎症細胞の浸潤を抑制することで、動脈硬化の全身的・直接的な治療が可能であると考えた。実際、限局的な治療法としては、放射性ステントを用いることで炎症細胞の浸潤を抑制し、ステント治療後の再狭窄を予防できることが報告されている(Ref: JACC Cardiovasc Interv., 2013)。

また申請者らはモデル動物を用いた検討から、血液凝固カスケードの初期因子である組織因子(Tissue Factor; TF)が動脈硬化プラーク内のマクロファージ浸潤領域に高く発現していること(Biol Pharm Bull, 2008)、<sup>99m</sup>Tc標識抗TF抗体(<sup>99m</sup>Tc-TF-mAb)がマクロファージの浸潤した不安定病変に高く集積すること(J Nucl Med., 2010)を明らかにしてきた。

我々は、これらの知見に基づき、TFを標的とした放射性同位元素(RI)内用療法用薬剤を用いれば動脈硬化病変へのマクロファージ浸潤の抑制、さらに動脈硬化病変の治療になるのではないかと考えた。

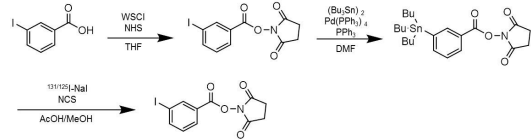
## 2. 研究の目的

本研究ではTFを標的とした放射性同位元素(RI)内用療法用薬剤を創製し、本薬剤を用いてマクロファージ浸潤の抑制、さらに動脈硬化病変の治療が可能かについて評価することを旨とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗TF抗体の<sup>131</sup>I標識化剤“<sup>131</sup>I-SIB”の合成検討

3-Iodo benzoic acidを出発原料として2段階反応でヨウ素標識前駆体であるN-Succinimidyl 4-hydroxy-3-Tri-(n-butyl)stannylphenylbenzoateを合成し、さらに<sup>125</sup>I-NaIを加え、放射性ヨウ素標識体(<sup>125</sup>I-SIB)を合成した(Scheme 1)



Scheme 1. <sup>131</sup>I/<sup>125</sup>I-SIB 合成スキーム

### (2) 抗TF抗体のTFに対する親和性評価

親和性評価に用いるTF Recombinant Proteinを下記の方法に従い作製した。まず、His tag融合TF recombinant Protein発現ベクターをヒートショック方により大腸菌(BL21(DE3)pLysS)に導入した。得られた大腸菌溶液を、LB-カナマイシン クロラムフェニコール培地に加え、37℃一晩インキュベートした後、Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosideを加え、37℃で3時間インキュベートした。得られた培地上清を除去した後、リン酸バッファーに再懸濁し、超音波処理した。超音波処理した懸濁液の上清を除去した後、破碎バッファー(0.2% TritonX-100, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA-Na pH7.0)に再懸濁し、室温30分間攪拌した。再度遠心分離し、沈殿画分を超純水で洗浄した後、溶解バッファー(8 M urea, 20 mM PB, 500 mM NaCl, pH7.8)を加え、37℃、1時間インキュベートして溶解した後、アフィニティークロマトグラフィー(His-tag精製用カラム)にてTF recombinant Proteinを精製した。

得られたTF recombinant Proteinを10 mM酢酸バッファー(pH5.0)に溶解し、表面プラズモン共鳴測定用チップ(CM5)に固相化した後、表面プラズモン共鳴測定機(Biacore X100)を用いて抗TF抗体の本チップへの親和性について測定した。

### (3) マクロファージ細胞のM1、M2 極性化検討

マクロファージモデル細胞として、ヒト単球細胞であるU937細胞およびTHP-1細胞、マウスマクロファージ様細胞であるRAW264.7、およびマウス腹腔内より採取したマクロファージ細胞を用い低下の検討を行った。

まず、U937細胞およびTHP-1細胞については、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate(PMA)を100 nM添加し、48時間インキュベートすることでマクロファージ細胞に分化させた。その後、Lipopolysaccharide(LPS)(10 ng/mL)、

Interferon gamma (INF $\gamma$ ) (10 ng/mL) あるいは Interleukin-4 (IL-4) (40 ng/mL) 含有培地にて 48 時間培養し、M1 (炎症応答惹起)、M2 (抗炎症応答) 細胞へ極性化を試みた。RAW264.7 細胞については、LPS (10 ng/mL)、INF $\gamma$  (10 ng/mL) あるいは IL-4 (40 ng/mL) 含有培地にて 48 時間培養し、M1、M2 細胞へ極性化した。マウスマクロファージについては、ddY マウス腹腔内にチオグリコレート培地 2 mL を投与し、投与 3 日後に腹腔内を PBS(-) で洗浄し、マクロファージを回収し、1 日培養した後、LPS (10 ng/mL)、INF $\gamma$  (10 ng/mL) あるいは IL-4 (40 ng/mL) 含有培地にて 48 時間培養し、M1、M2 細胞へ極性化した。

得られた各マクロファージ細胞を Isogen に溶解し、mRNA を抽出した後、逆転写反応を行い、cDNA 化し、qRT-PCR 法により M1 極性化マーカー (inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS) および M2 極性化マーカー (Mannose Receptor, MR) の発現量を測定した。

#### (4) 各極性化マクロファージ細胞におけるモノクローナル抗体集積量評価

Negative control モノクローナル抗体に Alexa Fluore 488-NHS を当量加え、室温で 1 時間反応した。反応液をサイズ排除カラムを用いて生成し、Alexa Fluore 488 標識モノクローナル抗体 (AlexaFluore 488-IgG) を得た。得られた AlexaFluore 488-IgG (50  $\mu$ g) を M1 極性化、M2 極性化、M0 RAW264.7 細胞に添加し、1 時間インキュベートした後、蛍光顕微鏡を用いて各マクロファージ細胞に結合・内在化した AlexaFluore 488-IgG を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 抗 TF 抗体の $^{131}$ I 標識化剤“ $^{131}$ I-SIB”の合成検討

ヨウ素標識前駆体である N-Succinimidyl 4-hydroxy-3-Tri-(n-butyl)stannyl-phenylbenzoate を 2 段階反応、総収率 4.0% で得た。さらに  $^{131}$ I と同様のヨウ素の放射性同位元素である  $^{125}$ I-NaI と N-chlorosuccinimide 存在下反応することにより  $^{125}$ ISIB を放射化学的純度 95% 以上で得た。

### (2) 抗 TF 抗体の TF に対する親和性評価

今回 RI 内用療法用薬剤の母体骨格として選択した抗 TF モノクローナル抗体の TF Recombinant Protein に対する親和性について SRP 法を用いて測定したところ、親和性はほとんど認められなかった (検出限界以下)。以上のことから、今回選択した抗体は

以降の検討に用いることは困難であることが判明した。

### (3) マクロファージ細胞の M1、M2 極性化検討

マクロファージモデル細胞として選択した U937 細胞、THP-1 細胞、RAW264.7、およびマウス腹腔内マクロファージ細胞に M1 極性化、および M2 極性化サイトカインを添加し、48 時間インキュベートしたところ、特に RAW264.7 において、M1 極性化刺激を行うことにより細胞内が泡沫化する様子が観測された (Figure 1)。

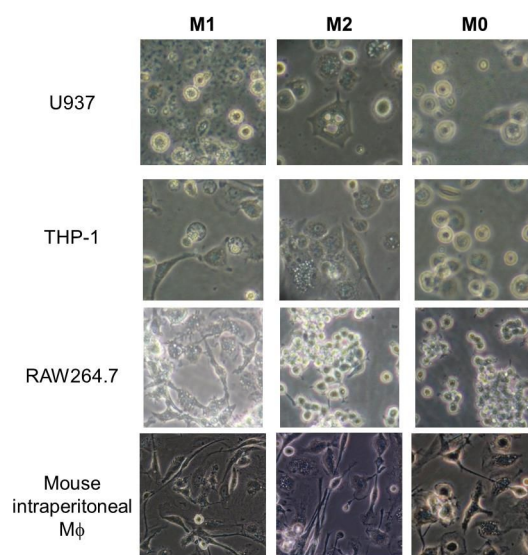


Figure 1. M1、M2 極性化用サイトカイン添加 48 時間後、あるいはサイトカイン未処理 (M0) の U937、THP-1、RAW264.7 およびマウス腹腔内マクロファージ細胞の顕微鏡像

得られた各マクロファージ細胞のうち、U937 細胞および THP-1 細胞については M2 極性化マーカーである MR の発現が認められなかった。

他方、RAW264.7 細胞については LPS および INF $\gamma$  刺激群において M1 極性化マーカーである iNOS の高発現を、IL-4 刺激群において MR の高発現を認めたことから、各極性化が出来ていることを確認した (Figure 2)。

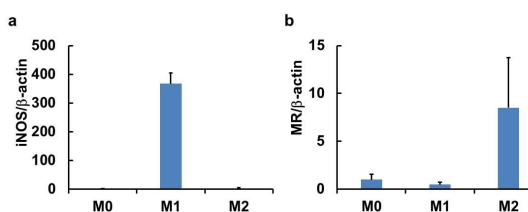


Figure 2. M1、M2 極性化用サイトカイン添加 48 時間後、あるいはサイトカイン未処理 (M0) のマウス腹腔内マクロファージ細胞における iNOS (M1 極性化マーカー) および MR (M2 極性化マーカー) の発現量評価

(qRT-PCR)。

マウス腹腔内マクロファージに関しても同様に LPS および  $\text{INF}\gamma$  刺激群において iNOS の高発現を、IL-4 刺激群において MR の高発現を認め、マクロファージの極性化反応を確認した (Figure 3)。

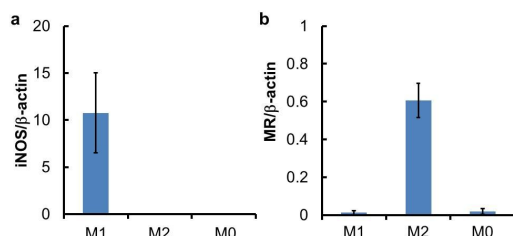


Figure 3. M1、M2 極性化用サイトカイン添加 48 時間後、あるいはサイトカイン未処理 (M0) のマウス腹腔内マクロファージ細胞における iNOS (M1 極性化マーカー) および MR (M2 極性化マーカー) の発現量評価 (qRT-PCR)。

以上の結果より、極性化マクロファージ細胞の検討に用いるモデル細胞としては RAW264.7 細胞およびマウス腹腔内マクロファージ細胞が有用であることが示された。

#### (4) 各極性化マクロファージ細胞におけるモノクローナル抗体集積量評価

AlexaFluore 488-IgG を M1 極性化、M2 極性化、M0 RAW264.7 細胞に添加し、1 時間インキュベートしたところ、AlexaFluore 488-IgG は細胞膜上の TF の発現、および TF との親和性に関わらず M1 極性化マクロファージに高集積することを見出した (Figure 4)。

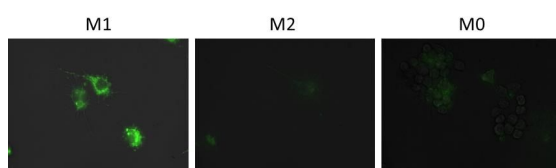


Figure 4. AlexaFluor-488 標識抗体を添加 1 時間後における各極性化マクロファージ (RAW264.7 細胞) の蛍光顕微鏡下観察像。

以上、本研究ではまず  $^{131}\text{I}$  標識モノクローナル抗体の創製に必須であるヨウ素標識剤 “ $^{131}/^{125}\text{I}$ -SIB” の合成方法を確立した。また、本研究の *in vitro* RI 内用療法検討において必要となる M1/M2 極性化マクロファージの作成法も確立した。一方、モノクローナル抗体は TF との親和性の有無、およびマクロファージ細胞膜上の TF 発現の有無にかかわらず M1 極性化マクロファージに高集積することも見出した。この原因としては、IgG 中に含まれる Fc ドメインと特異的に結合する Fc

受容体が M1 マクロファージに高発現していることと関連していることが示唆される。そのため、TF を標的とした RI 内用療法用薬剤の母体骨格としては、Fc ドメインを有さない抗 TF-IgG 類似体 (Fab、scFv など) が有用である可能性が示された。

上述のことから、本研究では動脈硬化の RI 内用療法の評価までは至らなかったものの、TF を標的とした RI 内用療法用薬剤の創製のための基礎的基盤を構築することが出来た。

#### 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 1 件)

1. Yoichi Shimizu, Hiroko Hanzawa, Yan Zhao, Songji Zhao, Sagiri Fukura, Ken-ichi Nishijima, Takeshi Sakamoto, Nagara Tamaki, and Yuji Kuge: Immunoglobulin-G (IgG)-based imaging probe accumulates in M1 macrophage-infiltrated atherosclerotic plaques independent of IgG target molecule expression. *Mol Imaging Biol.* In press. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Sagiri Fukura, Yoichi Shimizu, Hiroko Hanzawa, Ken-ichi Nishijima, Takeshi Sakamoto, Songji Zhao, Mikako Ogawa, Yuji Kuge: Radiolabeled immunoglobulin G visualizes active inflammation in atherosclerosis, Ninth Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, 2015.11.9、放射線医学総合研究所 (千葉県、千葉市)
2. Yoichi Shimizu, Hiroko Hanzawa, Nagara Tamaki, and Yuji Kuge: Accumulation mechanism of non-targeted immunoglobulin G in atherosclerotic lesions, International symposium 2015, 札幌京王プラザホテル (北海道、札幌市), July 31th, 2015
3. Yoichi Shimizu, Hiroko Hanzawa, Yan Zhao, Songji Zhao, Sagiri Fukura, Ken-ichi Nishijima, Takeshi Sakamoto, Nagara Tamaki, and Yuji Kuge: Accumulation mechanism of non-targeted immunoglobulin G in atherosclerotic lesions, Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2015, June 9th, 2015.6.9, Baltimore(米国)

4. **志水陽一**、半澤宏子、趙莞、趙松吉、福良沙霧、**西嶋劍一**、坂本健、玉木長良、小川美香子、**久下裕司**：動脈硬化病変における放射性標識化免疫グロブリン G 集積機序の探索、第 10 回日本分子イメージング学会総会・学術総会、2015.5.20 21、タワーホール船堀(東京都、江戸川区)

(4)研究協力者  
なし

〔図書〕(計 1 件)

1. **Shimizu Y.**, Hanzawa H, Zhao Y, **Nishijima KI**, Sakamoto T, Zhao S, Tamaki N, **Kuge Y.** Radioimmuno-detection of Atherosclerotic Lesions Focusing on the Accumulation Mechanism of Immunoglobulin G. Perspectives on Nuclear Medicine for Molecular Diagnosis and Integrated Therapy (Springer Open) 2016. 141-150

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当なし

取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hokudai.ac.jp/radiois/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

久下 裕司 (KUGE, Yuji)  
北海道大学・アイソトープ総合センター・  
教授  
研究者番号：70321958

### (2)研究分担者

西嶋 劍一 (NISHIJIMA, Ken-ichi)  
北海道大学病院・薬剤師  
研究者番号：60364254

志水 陽一 (SHIMIZU, Yoichi)  
京都大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90634212

東川 桂 (HIGASHIKAWA, Kei)  
北海道大学・アイソトープ総合センター・  
助教  
研究者番号：10756878

### (3)連携研究者

なし