様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：３５３０３
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2010～2013
課題番号：２２３９０２３９
研究課題名（和文）循環器の最先端治療を支える分子イメージング研究

研究課題名（英文）Molecular Imaging Research for Forefront of Cardiovascular Medicine

研究代表者
犬伏　正幸（INUBUSHI, Masayuki）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：７０３９９８３０
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　14,100,000円、（間接経費）　4,230,000円

研究成果の概要（和文）：(1) 血管新生遺伝子治療のための分子イメージング研究において、HGF遺伝子単独の単回投与では未熟な毛細血管しか形成されないことを証明した。(2) 骨髄幹細胞による心筋再生医療のための分子イメージング研究において、移植細胞追跡が定量的に評価できると期待された。(3) 長時間臓器保存可能な心臓移植のための分子イメージング研究において、新しい高圧乾燥保存法を開発し、摘出後24時間までの保存であれば心筋性状が保たれることを証明した。

研究成果の概要（英文）：(1) In molecular imaging research for angiogenic gene therapy, we demonstrated that HGF gene therapy alone could induce a dysfunctional microvasculature. (2) In molecular imaging research for regenerative medicine using bone marrow stem cells, we demonstrated that transplanted cells could be tracked and assessed quantitatively in vivo. (3) In molecular imaging research for cardiac transplantation following long-time preservation, we developed a new organ preservation method in a high-pressure CO/O2 gas mixture, and demonstrated that the function of transplanted hearts could be kept well by this new preservation method for 24 hours.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：核医学(PETを含む)　分子イメージング

１．研究開始当初の背景

核医学と循環器の研究で日本有数の３つの研究所の人智を結集し、(1)血管新生遺伝子治療のための分子イメージング研究、(2)骨髄幹細胞による心筋再生医療のための分子イメージング研究、(3)長時間臓器保存可能な心臓移植のための分子イメージング研究、という技術課題を共有する３つのテーマの小動物 *in vivo* イメージング研究を実施する。

２．研究の目的

(1) 本研究代表者らは米国留学中、HSV1-sr39TK レポーター遺伝子と[18F]FHBG を用いてラット生体での心筋遺伝子発現イメージングを世界で初めて報告した。帰国後、科研費基盤(B)研究「心筋血管再生治療のための新しい生体内遺伝子発現 イメージング法の確立と応用」(H18～20 年度)を研究代表者として遂行し、99mTc04-や 124I をトレーサとする、より汎用性の高い hNIS レポーター遺伝子を用いた遺伝子発現イメージング法を確立した。さらに、強力な血管新生因子である HGF の遺伝子を hNIS レポーター遺伝子とともに心筋梗塞モデルラットの梗塞辺縁部に投与して、HGF 治療遺伝子の発現の部位や量、期間を考慮した上で HGF 血管新生遺伝子治療の検証も行ったが、残念ながら十分な治療効果は得られなかった。この基盤研究を自ら継続的に発展させていきたいと考えている。

(2) 骨髄に存在する間葉系幹細胞は多分化能を有し心筋細胞や血管内皮 細胞へ分化することが明らかとなってきており、再生医療部ではこれまでに、心不全動物モデルにおいて、 間葉系幹細胞の移植によって心筋が再生され心機能が改善することを見出してきた。2004 年からは臨床応 用も開始し、間葉系幹細胞移植後の心機能と自覚症状の改善を確認している。しかしながら、その治療効果は個人差が大きい上、どのような病態で治療効果が期待できるかが予測できないことが問題となっている。 そこで再生医療部の山原室長は、本研究代表者の前回の基盤(B)研究の成果報告を知り、骨髄幹細胞を hNIS でラベリングして追跡する小動物実験によりエビデンスを蓄積することを提案した。

(3) 我が国では臓器移植法制定以来 10 年余りで 60 人に心臓移植が実施されたが、移植を受けられずに亡くなった患者は 4400 人にも上り、法改正(小児への適応拡大)を目前にしてドナー不足の解決は急務である。その解決を目指し、移植・外科研 究部の畑山研究員は、神奈川大学理学部関邦博研究室における多細胞生物の高圧乾燥保存技術に関する研究 5)の経験を元に、世界でも類を見ない移植臓器の高圧乾燥保存技術へと発展させた。その結果、最長でラット心臓では 26 日間、ブタ心臓では 37 日間もの長期保存後に同種移植を行って蘇生(心拍再開)に成功したが、 全例で蘇生を保証できるのは現時点では 72 時間までである。心拍再開よりも厳格なエンドポイントで、どの時点まで心筋性状を健常に保つことができるかを調べるため、本研究代表者に協力を要請した。

３．研究の方法

(1) ラット心筋梗塞モデルを作成し、日本が中心となって臨床応用を目指している肝細胞増殖因子(HGF)を用いた血管新生治療の長期効果について検証を行った。まず、運び屋となるアデノウイルスベクターに HGF 治療遺伝子とその発現を知らせてくれる NIS レポーター遺伝子を入れた治療ベクターを作成し、これを梗塞部の辺縁の心筋に直接注入したラットを治療群とし、空ベクターを注入したラットを未治療群とした。急性期の間に、cine-MRI 画像で心機能を、SPECT 画像で心筋梗塞の大きさと治療遺伝子の発現を調べ、その全てが同じ程度に揃っているラットを治療群と未治療群から６匹ずつ選んで経過観察を行った。

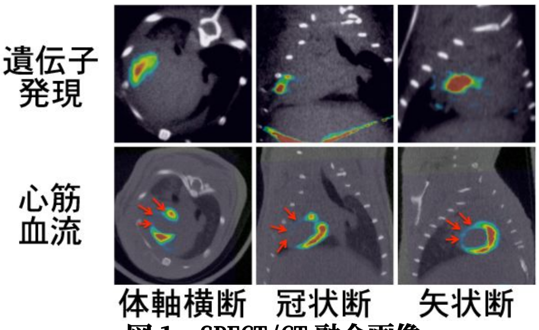


図１. SPECT/CT 融合画像
（矢印が心筋梗塞部）

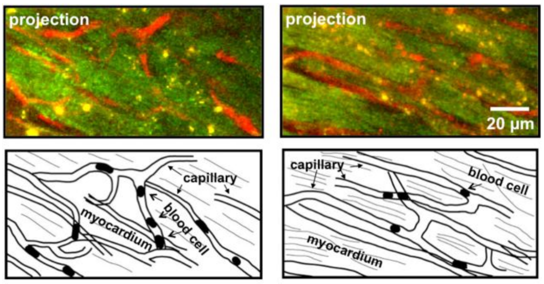
(2) 心筋梗塞作成２週間後の T 細胞機能欠損ラット(n=3)に、hNIS 過剰発現したマウス由来線維芽細胞シート(9×106 cells)を移植し、４日後に小動物用高感度高解像度マルチピンホール SPECT/CT 装置(NanoSPECT/CT; Bioscan 製)を用いて、99mTc04-(412～529MBq)を投与、同時に移植細胞と心プールを含む胸部を３時間ダイナミック SPECT 撮像した。入力関数は、心プール画像および、AV シャントしたチューブ内の放射能濃度を GSO シンチレータで測定し、血漿全血比を乗じた。2 コンパートメントモデル解析(2-CM)および Logan プロット法を用いて、薬剤の組織への取込能の指標である分布容積(VT)を評価した。血中の分布容積(Va)の影響も考慮した。

(3) ドナーとなる Lewis ラット(8W♀)から深麻酔下に心臓を摘出し、高圧乾燥保存法(02:C0=6:4, 3.5 気圧, 4℃; n=8)または陰性対照法(02:C0=4:6, 3.5 気圧, 4℃; n=3)によって 24 時間または 48 時間保存した後、冷却した生理食塩水に浸して蘇生させ、レシピエントとなる Lewis ラット(8W♀) の右頚部に異所性心臓移植を行った。陽性対照群(n=7)では、摘出後保存せずに直ちに異所性心臓移植を行った。移植後２時間以内に[18F]FDG(約 37MBq)を投与し、小動物用 PET 装置 Inveon (Siemens Medical Solutions, Malvern, PA)

を用いて PET 画像を撮像した。一部のラットでは、[18F]FDG 投与 30 分前に心筋[18F]FDG 集積を促進するためにブドウ糖(1mg/gBW)とレギュラーインスリン(8mU/gBW)を腹腔内投与した(GI 負荷)。1 週間後には再び[18F]FDG-PET を撮像した。半定量指標としては、ドナー心臓(D)とレシピエント心臓(R)への[18F]FDG 集積の最大値を求め、その比を D/R として算出した。

４．研究成果

(1) 10 週間後に行った cine-MRI で、治療群の心機能については未治療群と比べて有意な治療効果が見られなかった。免疫染色という特殊な染色を行った心筋組織標本を作成して顕微鏡で見てみると、最も細い毛細血管の数は未治療群と比べて治療群で有意に増加していたが、もう少し太い細動脈の数には差がなかった。さらに二光子顕微鏡という特殊な顕微鏡を使って治療群の新生血管を立体的に観察してみると、血球（7-8μm）と比べても極めて細い直径 2-5μm の毛細血管が増加し、それらが不規則なネットワーク構造を呈していることが判明した。これらの結果から、HGF 遺伝子単独で単回投与した血管新生遺伝子治療では、未熟な毛細血管しか形成されないと我々は結論づけた。



HGF遺伝子治療後　　正常対照心筋

図 2．二光子顕微鏡画像

（赤：血管、緑：心筋細胞）

(2) 移植細胞シートが明瞭に描出され(図１)、放射能濃度時間変化曲線(TAC)と心プールからの入力関数(LV)が得られた(図２)。また、シャントにより連続的な入力関数が得られた。2-CM では Va を考慮することで、推定 TAC が測定 TAC と良く一致し、VT も Logan 法と良く一致していた。LV 入力関数とシャント入力関数で VT が精度 7%以下で良く一致した。血中分布容積を考慮することでモデル定量解析が有効で、入力関数として心プール画像の利用可能性が示唆された。移植細胞追跡が定量的に評価できると期待される。

(3) 陰性対照群と高圧乾燥保存 48 時間群では移植直後からドナー心臓への集積が低かった(D/R はそれぞれ 16.8±0%、21.0±3.4%)。一方、高圧乾燥保存 24 時間群と陽性対照群では術直後のドナー心臓への集積は比較的良好であった（D/R は、GI 負荷なし高圧乾燥保存 24 時間群 119.3±41.9%、GI 負荷あり陽性対照群 73.0±0%、GI 負荷なし陽性対照群 79.2±20.0%)が、両群ともに、1 週間後には集積が低下していた(D/R は、GI 負荷なし高圧乾燥保存 24 時間群 60.0±26.9%、GI 負荷なし陽性対照群 54.8±17.8%)。高圧乾燥保存法による保存は 24 時間までであれば、移植直後の心筋性状は、摘出直後に移植した陽性対照群と同様に保たれていた。しかしながら移植 1 週間後には、高圧乾燥保存 24 時間群のみならず陽性対照群でもドナー心臓への集積低下が見られ、頚部異所性心移植モデルを評価モデルとして用いることの限界が示唆された。

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 13 件）

① Jin YN, Inubushi M, Masamoto K, Odaka K, Aoki I, Tsuji AB, Sagara M, Koizumi M, Saga T. Long-term effects of hepatocyte growth factor gene therapy in rat myocardial infarct model. Gene Ther. 2012; 19(8): 836-843. 査読有り
DOI: 10.1038/gt.2011.128.

② Inubushi M. Assessment of gene therapy and regenerative therapy using radionuclide technique. Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi. 2010; 66(5): 542-546. 査読有り

〔学会発表〕（計 42 件）

① Otani K, Zeniya T, Kawashima H, Fukuda H, Hashikawa Y, Moriguchi T, Inubushi M, Iida H, Yamahara K. Noninvasive spatial and temporal tracking of multilayered cell sheet on infarcted heart using reporter gene imaging. American Heart Association Scientific Sessions 2013. Dallas Convention Center, Dallas, TX, 2013.11.16-20.

② Zeniya T, Kawashima H, Otani K, Fukuda H, Hashikawa Y, Koshino K, Hori Y, Moriguchi T, Enmi J, Iguchi S, Yamamoto A, Miyake Y, Inubushi M, Iida H. Tracking of transplanted stem cells in myocardial infarction model rat: validation of simultaneous dual-isotope SPECT imaging with Tc-99m and Tl-201. 2012 World Molecular Imaging Congress, Dublin, Ireland, 2012.9.5-8.

③ Jin YN, Inubushi M, Masamotoa K, Odaka K, Aoki I, Tsuji AB, Sagara M. Koizumi M, Saga T. Hepatocyte growth factor angiogenic gene therapy in rat myocardial infarct model: multimodal assessment with cine MRI, SPECT/CT, and two-photon excitation fluorescent microscopy. 10th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology, Cape Town, Republic of South Africa, 2010.9.18-23.

④ Inubushi M, Hatayama N, Li XK, Jin YN, Koizumi M, Saga T. [18F]FDG-PET studies of heterotopic heart transplantation in rats. 10th Congress of the World Federation of Nuclear Medicine and Biology, Cape Town, Republic of South Africa, 2010.9.18-23.
⑤ Jin YN, Inubushi M, Masamotoa K, Odaka K, Aoki I, Tsuji AB, Sagara M. Koizumi M, Saga T. Multimodal assessment of hepatocyte growth factor angiogenic gene therapy in rat myocardial infarct model. 2010 World Molecular Imaging Congress, Kyoto, 2010.9.8-11. (Poster Awarded)

〔図書〕（計　1　件）
① 犬伏　正幸　他、山代印刷、核医学技術総論 改訂版、京都、2014、印刷中

〔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://kwweb-res.kawasaki-m.ac.jp/kwmhp/KgApp?kyoinId=Kgyysggk

６．研究組織
(1)研究代表者
犬伏　正幸（INUBUSHI, Masayuki）
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：７０３９９８３０

(2)研究分担者
佐賀　恒夫（SAGA, Tsuneo）
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・グループリーダー
研究者番号：４０２７３４４５

小泉　満（KOIZUMI, Mitsuru）
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・上席研究員
研究者番号：２０１３６３５２
（平成23年度より研究分担者から外れた）

金　永男（Jin, Yong-Nan）
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・博士研究員
研究者番号：５０５６８２８５
（平成23年度より研究分担者から外れた）

山原　研一（YAMAHARA, Ken-ichi）
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・再生医療部・室長
研究者番号：５０４５０８８８

梨井　康（LI, Xiao-Kang）
独立行政法人国立成育医療研究センター・RI管理室・室長
研究者番号：６０３２１８９０

(3)連携研究者
大谷　健太郎（OTANI, Kentaro）
独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・再生医療部・研究員
研究者番号：５０４７０１９１

畑山　直之（HATAYAMA, Naoyuki）
東京医科大学・人体構造学講座・助教
研究者番号：８０５３４７９２