

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890003

研究課題名(和文)新規同定生体分子を標的とした不安定動脈硬化プラークイメージング剤の開発

研究課題名(英文)Development of an atherosclerosis imaging probe for novel biomarker of vulnerable plaque

研究代表者

志水 陽一 (Shimizu, Yoichi)

北海道大学・アイソトープ総合センター・助教

研究者番号：90634212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、不安定動脈硬化プラークの早期診断を目指し、プロテオミクス解析にて同定したFatty acid-binding protein 5 (FABP5)、Thrombospondin-4 (TSP4) について、動脈硬化進展との関連性について評価する共に、不安定動脈硬化プラークイメージングプローブ "99mTc-HVPA" を開発した。その結果、FABP5は不安定動脈硬化プラーク形成に関わるType IV病変(AHA分類)、特に炎症性マクロファージに高発現することを見出し、99mTc-HVPAはTSP4を標的とした不安定動脈硬化プラークイメージング剤としての基本的な性質を有していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the relationship of the biomolecules (Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) and Thrombospondin-4 (TSP4)) detected by proteomics analysis to the progression of atherosclerotic state, and developed a novel imaging probe "99mTc-HVPA" for early diagnosis of vulnerable plaque. FABP5 showed higher expression in Type IV lesion (AHA classification) in the vessels of atherosclerotic model mice (ApoE -/- mice) and in the inflammatory (M1) macrophages. Furthermore, we succeeded to develop 99mTc-HVPA which targeted to TSP4, and found that 99mTc-HVPA had a basic property as a SPECT imaging probe for diagnosis of vulnerable plaque.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線科学

キーワード：放射線 循環器 薬学

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。そのため、動脈硬化の根幹の原因である動脈内のプラークの不安定性を精度よく評価できる診断法の開発が臨床画像診断学の急務である。このような背景の下、超音波診断法、MRI、CT等を用いた検討が行われているが、形態的診断が主で、質的診断に有効な方法は限定され、特に病変に発現する生体分子を質的診断する手法は皆無である (Nat Rev Drug Discov, 2004)。一方、ポジトロン断層撮像装置 (Positron Emission Tomography; PET)、単光子断層撮像装置 (Single Photon Emission Computed Tomography; SPECT) を用いる核医学分子イメージング法は、用いる分子プローブが標的とする生体内機能分子の非侵襲的インビボ画像化が可能であることから、動脈硬化プラークの不安定化に関与する機能分子を標的とする分子プローブを用いることで動脈硬化の質的診断への応用が期待されている。これまでに¹⁸F-FDGのマクロファージへの集積性や、^{99m}Tc-annexin Vのアポトーシス細胞への集積性を指標とする動脈内プラークの不安定評価が試みられている (JACC, 2006) もの、臨床上最も切望される“破綻を起こす危険性の高い不安定プラークを特異的に検出することのできる分子プローブ”は開発されていない。

動脈硬化病変の進行・不安定化したプラークの形成には病変内部・周辺組織・血流中に存在する様々な生体分子が関与しており、不安定プラークの発生・進行を詳細に評価するにはこれらの分子を網羅的に解析することが重要である。そこで、研究代表者のグループではこれまでに動脈硬化モデルマウス (ApoE 欠損 (ApoE^{-/-}) マウス) より抽出した動脈組織のプロテオミクス解析を試み、病変ステージの進行への関与が疑われる複数のタンパク質を新たに同定することに成功した (半澤ら、特開 2011-232218、Sakamoto et al., HUPO 2011, 10th World Congress)。同定されたこれらのタンパク質のうち、特に不安定動脈硬化プラーク形成に深く関わる病変ステージ IV、V 期における病変動脈血管において、Fatty acid-binding protein 5 (FABP5)、Thrombospondin-4 (TSP4) の発現量が正常マウス由来動脈血管と比較して相対的に増加することを認めた。そこで本申請課題では、これらの知見を基に不安定動脈硬化プラークを特異的に検出可能な核医学診断剤の開発を計画した。

2. 研究の目的

本申請課題では、動脈硬化モデルマウス動脈硬化病変組織プロテオミクス解析により

特に不安定動脈硬化プラーク形成に深く関わる病変ステージ、期に発現量が増加した FABP5 の動脈硬化病変内での局在・発現細胞について、動脈硬化病態との関連が報告されている FABP4 の発現と比較検討し、不安定動脈硬化プラークを特異的に検出するための標的分子としての有効性について評価した。また、FABP5 と同様に病変ステージ、期において発現量が増加した TSP4 を標的とした新規 SPECT 用診断剤“^{99m}Tc-HVPA”を創製し、不安定動脈硬化プラークの核医学診断剤としての有効性について評価した。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化病変形成・進行における E-FABP の発現量・局在変化に関する検討

動脈硬化病変における組織学的検討
高脂肪食投与下飼育した 25・35 週齢の ApoE KO マウスより大動脈を摘出し、パラフィン包埋後、大動脈起始部の連続切片を作製した。得られた組織切片について Movat 五重染色を行い、得られた染色像より AHA 分類に従って切片中の病変を Type I ~ V に分類した。また、隣接切片について、FABP5、FABP4 並びに Mac-2 (マクロファージ細胞マーカー) それぞれ特異的に検出する抗体を用い、免疫組織染色により、各病変における各タンパク質の発現解析を実施した。

各種極性化マクロファージ細胞における E-FABP 発現解析

RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞を Lipopolysaccharide (LPS) および Interferon γ (IFN γ)、あるいは IL-4 含有培地にて 48 時間培養し、マクロファージ細胞の M1、M2a 極性化を行った。得られた各極性化細胞より mRNA を抽出し、逆転写反応を行った後、リアルタイム PCR 法を用いて inducible nitric oxide synthase (iNOS、M1 極性化マーカー)、Macrophage mannose receptor (MMR、M2a 極性化マーカー)、FABP5、FABP4 の発現量を求めた。

(2) Thrombospondin-4 を標的とした動脈硬化診断用新規 SPECT 用分子イメージングプローブ (^{99m}Tc-HVPA) の開発

TSP4 イメージングプローブ (^{99m}Tc-HVPA) の設計・合成

Abrams らの報告 (J Nucl Med, 1990) に従い、TSP4 に対するモノクローナル抗体に

二官能性キレートである

6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid (HYNIC) を導入したHYNIC導入抗TSP4抗体 (HVPA) を作製した。さらに得られたHVPAを $^{99m}\text{Tc}(\text{tricine})_2$ と反応させることにより、 ^{99m}Tc -HVPAを得た (図1)。得られたHVPAの TSP4に対する認識能については表面プラズモン共鳴法を用いて確認した。また、 ^{99m}Tc -HVPAのマウス血漿中における化学的安定性について、添加24時間後まで経時的に測定した。

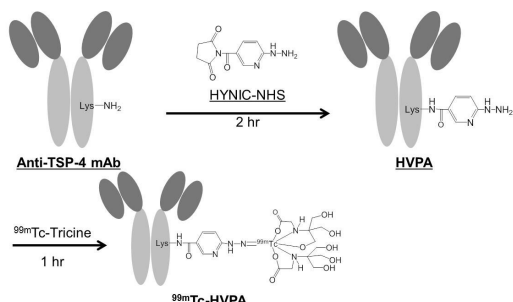


図1 ^{99m}Tc -HVPAの合成経路。

^{99m}Tc -HVPAの動脈硬化病変集積能に関する *in vitro* Auto Radiography (ARG) 検討

ApoE KO マウス (35 週齢) および正常マウス (35 週齢) より採取した大動脈起始部凍結組織切片に ^{99m}Tc -HVPA を添加した後、イメージングプレートに露光し、ARG 測定を行った。

4. 研究成果

(1) 動脈硬化病変形成・進行におけるE-FABPの発現量・局在変化に関する検討

動脈硬化病変における組織学的検討

FABP5のApoE KOマウス動脈硬化病変における発現は、主に泡沫化マクロファージの集積部位で観察され、Type IV病変において最も顕著であった (図2.A)。また、FABP5の染色陽性領域はマクロファージ細胞浸潤領域と非常に良く一致し (図2.C)、FABP5がマクロファージ細胞の病変への浸潤に関与することが示唆された。一方、動脈硬化病変形成との高い関連性が報告されているものの我々のバイオマーカー探索では動脈硬化病変進展との関連性が認められなかったFABP4について同様の検討を行ったところ、FABP5同様にType IV病変で顕著に高い発現を認めた (図2.A、B)。

各種極性化マクロファージ細胞におけるE-FABP発現解析

RAW264.7細胞のM1、M2a極性化については、それぞれiNOS (M1マーカー分子) およびMMR (M2aマーカー分子) の発現増大

を評価することにより確認した。また、FABP4およびFABP5はいずれもM1極性化マクロファージにおいて、M2a極性化マクロファージおよび未極性化マクロファージ (M0) と比べて有意に高い発現を認めた (図3)。以上の結果から、FABP5はFABP4同様に動脈硬化病変のM1極性化マクロファージに発現し、動脈硬化病変進展に寄与する可能性が示唆され、不安定動脈硬化プラークを特異的に検出するための標的分子として有望であることを見出した。

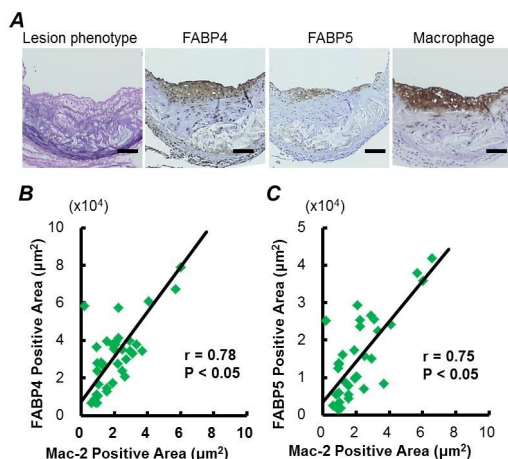


図2 A: ApoE KOマウス大動脈起始部病変 (AHA分類: Type IV) におけるFABP4、FABP5の免疫組織染色。B、C: FABP4およびFABP5の発現量とマクロファージ陽性領域との相関性。

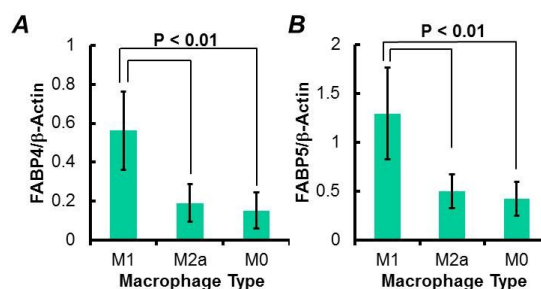


図3 M1/M2a極性化RAW264.7マウスマクロファージにおけるFABP4 (A) およびFABP5 (B) の発現解析。

(2) Thrombospondin-4を標的とした動脈硬化診断用新規SPECT用分子イメージングプローブ (^{99m}Tc -HVPA) の開発

TSP4イメージングプローブ (^{99m}Tc -HVPA) の設計・合成

図1の合成経路に従い ^{99m}Tc -HVPAを放射化学的収率 $17.6 \pm 3.8\%$ 、放射化学的純度: $99.5 \pm 0.1\%$ にて得た。得られた

HVPA の TSP4 に対する結合能（解離定数）は 10.4 ± 1.2 nM であり、HVPA の母体化合物である抗 TSP4 モノクローナル抗体の解離定数（ 3.6 ± 0.6 nM）とほぼ同等であったことから、HYNIC の導入後も TSP4 に対する結合能を保持していることを確認した。また、 ^{99m}Tc -HVPA のマウス血漿中における放射化学的純度を求めたところ、添加 24 時間後まで 99%以上であったことから、 ^{99m}Tc -HVPA はマウスに投与した後も長時間血液中に安定した状態で滞留することが示唆された。

^{99m}Tc -HVPA の動脈硬化病変集積能に関する *in vitro* Auto Radiography (ARG) 検討
 ^{99m}Tc -HVPA を ApoE KO マウス大動脈起始部組織切片に添加したところ、動脈硬化病変部位において高い集積を認めた。一方、正常マウス大動脈起始部組織切片に添加したところ、血管内への集積はほとんど認められなかった(図4)。以上の結果より、 ^{99m}Tc -HVPA は動脈硬化病変に集積することが示唆された。

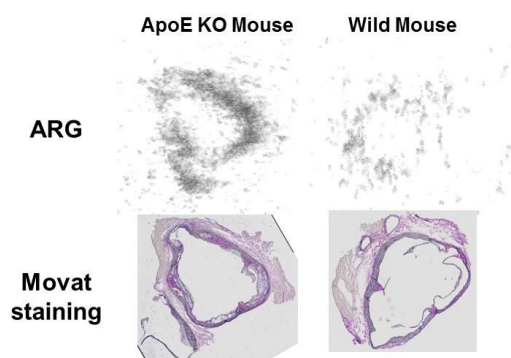


図4 ApoE KO マウスおよび正常マウス大動脈起始部における ^{99m}Tc -HVPA の *in vitro* ARG 画像。

以上、本申請課題では FABP5 が不安定動脈硬化プラークを特異的に検出するための標的分子として有望であることを見出すと共に、TSP4 を特異的に認識する新規 SPECT 用診断剤である ^{99m}Tc -HVPA が不安定動脈硬化プラークイメージング剤としての基本的な性質を有していることを見出した。

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0件)

なし

〔学会発表〕(計1件)

志水陽一 他6名、動脈硬化病変の進行における脂肪酸結合タンパク質 (FABP4、FABP5) の発現変動に関する組織学的・生化学的検討、第134回日本薬学会、2014年3月28日、熊本市総合体育館(熊本県)

〔図書〕(計0件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
なし

取得状況(計0件)
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

志水 陽一 (Shimizu Yoichi)
北海道大学・アイソトープ総合センター・助教
研究者番号：90634212

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし