

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860393

研究課題名(和文) FRET法を利用した新規不安定プラーク特異的動脈硬化診断法の開発

研究課題名(英文) Development of new vulnerable plaque specific arteriosclerosis diagnostic method using FRET method

研究代表者

小川 弘子(Ogawa, Hiroko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：70423283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、より鋭敏に不安定プラークを検出する方法の開発を目指した。不安定プラークに細胞外マトリックス分解酵素が発現していることを利用することを考えた。基質となるタンパクに蛍光で標識し、リポソームへ内包化を計画していた。リコンビナント蛋白の作成に時間を要し、想定よりも時間を要した。また、作成したリコンビナント蛋白への蛍光の標識も上手くいかず、研究計画に遅れを生じた。研究期間は終了したが、引き続き、研究を継続していく予定である。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to develop a method for detecting the more sensitive unstable plaque. We consider to use the fact that extracellular matrix degrading enzymes is expressed in unstable plaques. Labeled with fluorescence protein as a substrate, it was planning to encapsulated in liposomes. Takes time to create the recombinant protein, it took time than expected. In addition, the labeling of the fluorescence of the recombinant protein was also created, resulting in a delay in the research plan. The study period was completed, but continue, is expected to continue the research.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 イメージング

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化、生活習慣の欧米化に伴い、動脈硬化性疾患は増加しており、発症前もしくは発症早期に診断・適切な治療を行うことが求められている。

プラークが破綻すると心血管疾患や脳血管障害が起こり危険であるため、動脈硬化では、プラークの存在より性状が問題とされる。性状により、安定プラークと不安定プラークに分けられ、不安定プラークは炎症細胞・脂質に富み、被膜が薄いという特徴を持つ。プラークに浸潤した炎症細胞から細胞外マトリックス分解酵素 (MMP) が分泌され、被膜の主な構成成分であるコラーゲンの分解が進むと、プラークが破綻し、血栓閉塞を起こす。

現在、エコーや CT でプラークの部位や大きさを判定する方法があるが、不安定プラークを検出できる質的診断法はまだ確立していない。血管内視鏡や血管内超音波法なども行われているが、侵襲が大きく精度も低く、簡便に低侵襲に、不安定プラークを判定できる方法はまだない。

2. 研究の目的

本研究では、不安定プラークを特異的に検出できるリポソームを用い、危険な動脈硬化巣を体外から検出する診断法を開発する。

具体的には、不安定プラークでは、細胞外マトリックス分解酵素が発現していることを利用し、基質となるタンパクを内包化したリポソームを用い、より鋭敏に不安定プラークを検出する方法の開発を目指す。

P. Libby らにより細胞外マトリックス分解酵素 (MMP) が動脈硬化巣に発現することが報告 (Proc Natl Acad Sci 1995;92(2): 402-6) されて以降、多くの報告があり、中でも MMP-2、MMP-9 は不安定プラークの代表的

なマーカーとなっている。また、最近、目覚ましく進歩した蛍光蛋白技術 FRET (Fluorescence Response Energy Transfer: 蛍光エネルギー共鳴移動) 法を利用した新しい不安定プラークの検出方法を創出することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) MMP により分解されるタンパクの合成と、蛍光基と消光基の標識

MMP により分解される基質となる組み換えタンパクの作成

MMP-2、MMP-9 が分解する基質として知られている IV 型コラーゲンに SH 基をつけた組み換えタンパクを作成する。消光基と蛍光基の間に FRET (Fluorescence Response Energy Transfer: 蛍光エネルギー共鳴移動) を起こすためには、消光基と蛍光基の立体的な位置が重要である。そのため、アミノ酸配列からタンパクの立体構造を予測し、消光基と蛍光基の標識位置を決定する。標識位置に SH 基が配置できるように DNA 配列を組み換える。また、タンパク精製のために、His-tag 遺伝子もあわせて組み込む。作成した組み換え DNA 断片を組み込んだプラスミドを、HEK293 細胞にリポフェクションする。培養上清を His-tag タンパク質精製用コバルトイオンアフィニティーカラム (GE) にて精製し、目的の組み換えタンパクを回収する。

MMP により分解される基質への蛍光基と消光基の標識

精製した組み換えタンパクに、SH 基を利用して、蛍光基と消光基を標識する。

(2) 基質の分解による FRET の消失 (in vitro)

MMP による基質の分解

組み換えタンパクに MMP-2、MMP-9 を添加し、基質の分解により、FRET が消失することを確認する

マクロファージによる基質の分解

マウスから腹腔マクロファージを回収し培養、PMA で刺激を行い、MMP の発現を促す。基質をマクロファージに添加し、分泌された MMP により分解され、FRET が消失することを確認する。

(3) 基質内包リポソームの作成と動脈硬化モデルマウスへの投与

基質内包リポソームの作成

既に確立している動脈硬化標的リポソームに、片山化学工業の受託製造サービスを利用し、基質の内包化を行う。

動脈硬化モデルマウスへの投与と不安定プラーク検出の評価

動脈硬化モデルとしてアポリポプロテイン E 欠損マウス (ApoE KO) に Western Type Diet (WTD) を 20 週間負荷したマウスを用いる。作成した基質内包リポソームをマウスに尾静注し、24 時間後に in vivo imaging を行う。実体顕微鏡下に摘出した大動脈と比較し、プラークの検出効率を評価する。また、大動脈の薄切切片を作成し、HE 染色、脂肪 (Oil red O) 染色、膠原線維染色、炎症細胞の免疫染色を行う。リポソームの蛍光シグナルと比較し、不安定プラークの検出について検討を行う。

4 . 研究成果

MMP-2、MMP-9 が分解する基質として知られている IV 型コラーゲンに SH 基をつけた組み換えタンパクを作成を試みたが、本来 3 ほんのらせん構造をとるコラーゲン構造を作成することは非常に困難であった。

単鎖コラーゲンに対し、FRET を持つ消光基と蛍光基の修飾は、簡単ではないと予想はしていたものの、非常に困難であった。FRET による消光を認めることが出来なかった。

代替案として検討していた蛍光標識されたコラーゲンを使用することとした。蛍光標識コラーゲンを MMP による分解を行っても、蛍光量が多く、定量を試みても、蛍光量の有

意な変化として、捉えることができなかった。現状では、より良い代替案を実験する時間が足りず、研究期間が終了してしまったが、引き続き、不安定プラークを特異的に検出できる方法の研究を行いたいと考えている。同様に細胞外マトリックス分解酵素のターゲットとなるプロテオグリカンなど、サイズの小さい、コントロールしやすい分子の検索や組み換え蛋白の合成などの可能性を検討したい。

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 6 件)

Emergence of Daptomycin-Resistant Staphylococcus aureus during Treatment. Hagiya H, Haruki Y, Uchida T, Wada T, Shiota S, Ishida T, Ogawa H, Murase T, Otsuka F. Intern Med. 2016;55(1):73-8. doi: 10.2169/internalmedicine.55.4763. 査読あり

A Nephrostomy-associated Urinary Tract Infection Caused by Elizabethkingia meningoseptica. Hagiya H, Ogawa H, Takahashi Y, Hasegawa K, Iwamuro M, Otsuka F. Intern Med. 2015;54(24):3233-6. doi: 10.2169/internalmedicine.54.4998. 査読あり

Klebsiella oxytoca-producing IMP-1 Detected as the First Strain of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Our Hospital. Hagiya H, Ogawa H, Takahashi Y, Yamamoto A, Otsuka F. Intern Med. 2015;54(22):2939-41. doi: 10.2169/internalmedicine.54.4965. 査読あり

Actinomyces turicensis Bacteremia
Secondary to Pyometra.
Hagiya H, Ogawa H, Takahashi Y, Kimura K,
Hasegawa K, Otsuka F.
Intern Med. 2015;54(21):2775-7.
doi: 10.2169/internalmedicine.54.4637.
査読あり

Infective Internal Iliac Artery
Aneurysm Caused by Campylobacter fetus.
Hagiya H, Ogawa H, Takahashi Y, Hasegawa K,
Hanayama Y, Otsuka F.
Intern Med. 2015;54(16):2021-4.
doi: 10.2169/internalmedicine.54.4845.
査読あり

Eagle's Syndrome Manifesting as Chronic
Swallowing Pain.
Hagiya H, Waseda K, Ogawa H, Otsuka F.
Intern Med. 2015;54(10):1321.
doi: 10.2169/internalmedicine.54.4262.
査読あり

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小川 弘子 (OGAWA, Hiroko)

岡山大学病院・卒後臨床研修センター・助教

研究者番号 : 70423283