

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19805

研究課題名(和文) 不安定プラークの早期診断を可能とする蛍光・PETデュアルイメージング薬剤の開発

研究課題名(英文) Development of a PET/optical dual-modality imaging agent for the early detection of venerable plaques

研究代表者

山口 藍子(Yamaguchi, Aiko)

群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座等教員

研究者番号：80609032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ポジトロン放出核種と蛍光色素の両方で標識したマクロファージ標的イメージング薬剤DCM10を開発し、不安定プラーク検出薬剤としての有用性を評価することである。酸性条件下においてのみ蛍光を発する蛍光色素であるAcid Fluor Orange (AFO) で標識したAFO-DCM10はマクロファージ細胞および、動脈硬化モデルマウスの大動脈に高集積性を示した。また、ポジトロン放出核種である銅-64で標識したDCM10を用いてポジトロン断層撮影を行ったところ、動脈硬化好発部位に高い集積を認めた。以上の結果は、DCM10の不安定プラーク検出薬剤としての有用性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：This project aims to develop a mannosylated dextran derivative (DCM10)-based PET/optical dual-modality imaging probe targeting macrophage mannose receptor in the venerable plaques. An acid activatable fluorescent-labeled DCM10 showed high accumulation in both macrophage cells and atherosclerotic lesion in apolipoprotein E knock out mice. Positron emission tomography imaging with a positron emitter (Cu-64)-labeled DCM10 demonstrated clear uptake in coronary artery region of an atherosclerosis model mouse. These results suggest DCM10 warrants further evaluation as a PET/optical dual-modality imaging probe for the detection of venerable plaques.

研究分野：放射線科学

キーワード：PET 蛍光 動脈硬化 不安定プラーク マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患や脳梗塞などの心血管疾患は今日においても主な死因のひとつであり、これらの疾患の多くは動脈硬化巣の破綻と、それに引き続く血栓の形成に起因することが知られている。そのため、破綻リスクの高い不安定プラークを早期診断し、治療介入することができれば、心血管疾患の予防に繋がると考えられる。

動脈硬化巣におけるマクロファージの浸潤および増殖は、プラークの破綻のしやすさと関連することが知られており、マクロファージを標的とする不安定プラークのイメージングプローブ開発が国内外で行われている。一方、申請者はこれまでセンチネルリンパ節検出薬剤として、マクロファージを標的とするテクネチウム-99m 標識 DCM20 (^{99m}Tc -DCM20) を開発し、その有用性を報告してきた。マウス足裏より皮下投与された ^{99m}Tc -DCM20 は、膝窩リンパ節に高く特異的な集積を示し、SPECT 画像では直径 1-2mm 程度と非常に小さなリンパ節を明瞭に描出した (図 1)。このことから、リンパ節同様にマクロファージが高濃度で存在する不安定プラークの検出においても DCM20 が利用可能であると考へた。

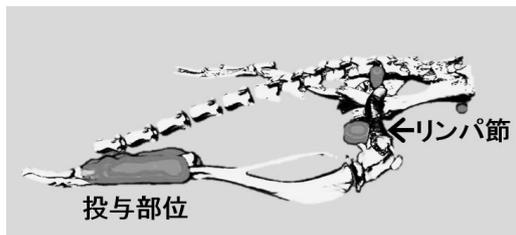


図 1. ^{99m}Tc -DCM20 皮下投与後の SPECT 画像 (マウス)。非常に小さなリンパ節を明瞭に描出することができた。

2. 研究の目的

本研究では、体外からの診断に優れたポジトロン放出核種と内視鏡での検出を可能とする蛍光色素の両方で標識したマクロファージ標的イメージング薬剤を開発し、不安定プラーク検出薬剤としての有用性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、既存の DCM20 に加え、分子量が約半分の DCM10 も作製し、比較検討を行った。以下、両者の区別が必要な場合を除き DCM として総称する。

・蛍光標識体の作製

微小病変である不安定プラークを高感度に描出するため、血中や非特異的臓器では蛍光を示さずに、マクロファージに取り込まれた場合のみ蛍光を発する「アクチベータブルプ

ローブ」とすることが望ましい。DCM はマクロファージのマンノース受容体に結合した後、細胞内に取り込まれ、酸性顆粒であるリソソーム内に代謝を受けずに滞留することが示されている。そこで、酸性 pH 下においてのみ蛍光を発する蛍光色素である Acid Fluor Orange (AFO) で標識した AFO-DCM を作製した。

・ラジオアイソトープ (RI) 標識体の作製

基礎的検討には、DCM の骨格に修飾を加えることなく標識が可能な SPECT 核種である ^{99m}Tc を用いて DCM を標識した。ポジトロン断層撮影 (PET) を実施するため、DCM に二官能性キレート剤である 1,4,7-トリアザシクロノナン-1,4,7-三酢酸 (NOTA) を導入し、群大病院で製造可能なポジトロン放出核種であるフッ素-18 (^{18}F) または銅-64 (^{64}Cu) を用いて標識した。

・蛍光標識体を用いた基礎的検討

AFO-DCM の蛍光強度の pH 依存性を、蛍光光度計を用いて測定した。また、AFO-DCM の *in vitro* におけるマクロファージ集積性を確認するため、培養マクロファージ細胞 (RAW264.7) に AFO-DCM を加え、一定時間経過後に共焦点顕微鏡を用いて観察した。

動脈硬化自然発症モデルマウスとして知られる apoE ノックアウトマウスに AFO-DCM を静脈投与し、二時間後に大動脈を摘出し、蛍光イメージング装置を用いて観察を行った。

・RI 標識 DCM の正常マウス体内動態評価

^{99m}Tc -DCM を正常マウス尾静脈より投与し、一定時間後に関心臓器を摘出し、重量および放射活性を測定した。

・PET イメージング

^{18}F -A1F-DCM10 または ^{64}Cu -NOTA-DCM10 を apoE ノックアウトマウスに投与し、一定時間後に PET 撮像を行った。

4. 研究成果

① AFO-DCM20 を用いた予備的検討

作製した AFO-DCM20 の蛍光強度は pH 依存的に増強し、pH5.0 条件下では pH7.4 の場合に比べ約 8 倍となった。続いて、マウス腹腔マクロファージを用いて取り込み実験を行ったところ、取り込まれた薬剤のみが蛍光シグナルを示し、その局在はリソソームの分布と一致した (図 2 (a))。このことから、AFO-DCM10 はマンノース受容体結合後にマクロファージに取り込まれ、リソソームに集積することが示唆された。

さらに、動脈硬化モデルとして知られている ApoE ノックアウトマウスに AFO-DCM20 を尾静脈より投与し、投与 2 時間後に動脈硬化病変の組織内分布を調べたところ、AFO-DCM20

は ApoE ノックアウトマウス大動脈に高集積を示し (図 2 (b)), その集積はマクロファージ陽性領域と相関することを認めた。以上のことから、AFO-DCM20 は不安定プラーク診断薬剤として有用である可能性が示された。

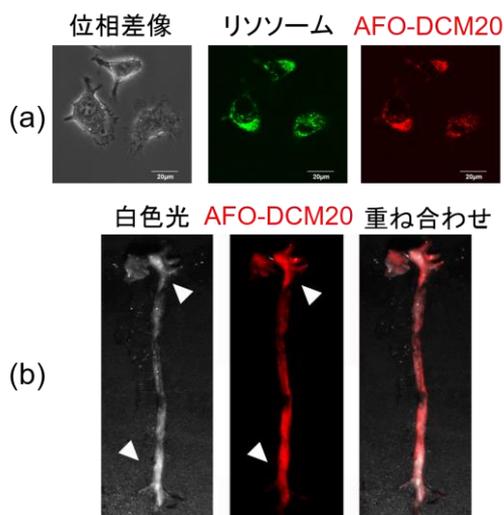


図 2. (a) AFO-DCM20 のマクロファージ細胞への取込み画像。(b) AFO-DCM20 投与二時間後の apoE ノックアウトマウス大動脈の ex vivo 蛍光画像。広範な動脈硬化病変が観察された。強い石灰化を認める部位に一致して AFO-DCM20 は高い集積を示した (矢印)。

② ^{99m}Tc -DCM20 のマウス体内動態評価

^{18}F 標識に先立ち、 ^{99m}Tc -DCM20 の apoE ノックアウトマウスにおける体内動態を調べたところ、投与二時間後における ^{99m}Tc -DCM20 の大動脈集積は血液よりも低いことが明らかとなった。非常に小さな動脈硬化病変部位を検出するためには、高い病変部位対血液比が求められることから、半減期が 110 分と短い ^{18}F による診断には血中半減期の改善が必要であることが示唆された。

③ DCM10 の作製と評価

デキストランを母体骨格とした化合物の血液クリアランスにはその分子サイズが大きく影響することが知られている。そこで、分子量が約半分のデキストランを用いて「DCM10」を作製し、 ^{99m}Tc 標識体のマウス体内動態を調べたところ、DCM10 は DCM20 に比べ速やかな血液クリアランスを示した (図 3(a))。

マンノース受容体を用いた結合阻害実験により、DCM10 は DCM20 よりはやや低いものの十分に高いマンノース受容体結合能を有していることが明らかとなった (図 3(b), $K_i = 1.6 \pm 0.05 \text{ nM}$)。

④ AFO-DCM10 の評価

続いて蛍光標識 DCM10 (AFO-DCM10) を用いた検討を行った。培養マクロファージに AFO-DCM10 を添加し、蛍光顕微鏡にて観察を行ったところ、マクロファージ細胞内にお

ける経時的な蛍光集積を、洗浄操作を行うことなく確認することができた。このことから、AFO-DCM10 のマクロファージを標的としたアクチベータブルプローブとしての有用性が示唆された。また、AFO-DCM10 を apoE ノックアウトマウスに投与し、二時間後に大動脈を摘出し、蛍光イメージングを行ったところ、動脈硬化巣に一致して AFO 由来の蛍光が観察された。

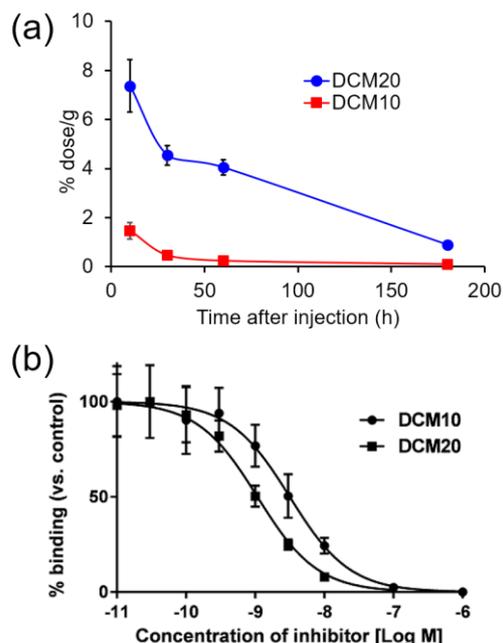


図 3. (a) ^{99m}Tc -DCM10 および ^{99m}Tc -DCM20 静脈投与後の血液クリアランス (マウス)。 ^{99m}Tc -DCM10 は ^{99m}Tc -DCM20 に比べ速やかな血液クリアランスを示した。(b) DCM10 および DCM20 のマクロファージマンノース受容体結合阻害実験。

⑤ DCM10 による PET イメージング

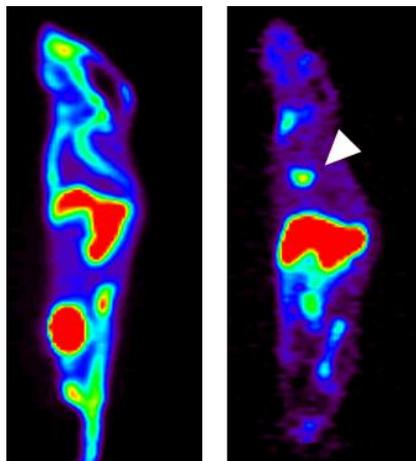


図 4. ^{18}F -AIF-NOTA-DCM10 (左) および ^{64}Cu -NOTA-DCM10 (右) 投与後の PET 画像 (apoE ノックアウトマウス)。 ^{64}Cu -NOTA-DCM10 投与後には、胸部領域に非常に高い集積を認めた (矢印)。

以上の結果を受け、汎用性の高いポジトロン放出核種である ^{18}F で標識した DCM10 (^{18}F -AIF-NOTA-DCM10) を作製し、PET 撮像を行ったところ、 ^{18}F -AIF-NOTA-DCM10 投与後早期から高い骨集積が認められた (図 4. 左)。 ^{18}F -イオンは骨集積性を有することから、 ^{18}F -AIF-NOTA-DCM10 は生体内安定性が十分ではない可能性が示唆された。

そこで、NOTA と錯体形成可能な ^{64}Cu で標識した、 ^{64}Cu -NOTA-DCM10 を作製し、apoE ノックアウトマウスを用いて PET 撮像を行ったところ、マクロファージ高発現臓器である肝臓に加え、動脈硬化病変の好発部位である胸部領域に高い集積が認められた (図 4. 右)。

以上の結果から、DCM10 は不安定プラーク検出薬剤として有用であることが示された。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Yamaguchi A, Hanaoka H, Tsushima Y: Development of a positron emission tomography (PET) imaging agent targeting macrophage mannose receptor for the early detection of venerable plaques. Progress in Radiology 2018, Bergen, Norway, June, 2018.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 藍子 (YAMAGUCHI AIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・寄附講座
等教員
研究者番号：80609032

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし