

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08992

研究課題名(和文) アクチベータブル酸化鉄ナノ粒子蛍光プローベを用いた脳動脈瘤壁の炎症巢の可視化

研究課題名(英文) Activatable Fluorescence Imaging of Macrophages in Cerebral Aneurysms Using Iron Oxide Nanoparticles Conjugated With Indocyanine Green

研究代表者

石井 暁 (Ishii, Akira)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：30467469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳動脈瘤の形成と増大に慢性炎症が関係しており、その過程にマクロファージが重要な役割を果たしている。実験的脳動脈瘤モデルに投与したインドシアニングリーン標識酸化鉄ナノ粒子を用いた近赤外蛍光イメージングにより、近赤外蛍光が脳動脈瘤と脳血管で検出され、病理学的には近赤外蛍光はマクロファージの局在と相関していた。本研究結果により、脳動脈瘤と脳動脈瘤形成の初期病変と考えられる脳血管におけるマクロファージを標的とした慢性炎症の近赤外蛍光イメージングの可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インドシアニンググリーン標識酸化鉄ナノ粒子を用いた近赤外蛍光イメージングは、3次元的なマクロファージの発現様式を可視化できるため、動脈瘤壁への血行力学的ストレスとの関連性を評価することで、更なる基礎研究の発展に繋がる可能性がある。生体で使用できれば、リアルタイムにマクロファージを標的とした慢性炎症の局在を検出することが可能となる。そのため、脳動脈瘤に対する開頭クリッピング術中に脳動脈瘤と脳血管の慢性炎症を検出して、手術支援と脳動脈瘤根治率の向上に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation is involved in the formation and enlargement of cerebral aneurysms (CAs), with macrophages playing a key role in the process. Iron oxide nanoparticles (IONPs) conjugated with indocyanine green (ICG) was intravenously administered to 15-week-old CA model rats, and ex vivo near-infrared fluorescence (NIRF) imaging and histological assessment of exposed CAs and cerebral arteries were performed. ICG-derived NIRF signals were detected in the CA and at the site of hemodynamic stress in the left posterior cerebral artery. Histologically, NIRF signals correlated strongly with macrophage localization. Based on the results of this study, NIRF imaging using an IONP-ICG probe is feasible for detecting the macrophage-rich regions in CAs and the cerebral artery wall, which is considered an early lesion in the process of CA formation.

研究分野：脳動脈瘤

キーワード：macrophage inflammation cerebral aneurysm iron oxide nanoparticles fluorescent imaging indocyanine green

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳動脈瘤壁の炎症反応

脳動脈瘤の破裂に伴うくも膜下出血は予後不良の疾患である。脳動脈瘤の診断は、MRA、3D-CTA、脳血管撮影により発生部位、サイズ、形状の評価が行われる。偶然に発見された未破裂脳動脈瘤の自然歴は、脳動脈瘤のサイズが小さければ比較的良好であることが明らかになってきた。特に5mm未満のサイズの小さい脳動脈瘤の年間出血率は1%以下であり、このような脳動脈瘤が発見されても通常は経過観察となることが多い。しかし、5mm以下の小さな脳動脈瘤であっても、その一部は経過観察中に増大もしくは破裂して出血を起こすこともあり、サイズ以外の要因が関与していると考えられている。脳卒中治療ガイドライン2015では、サイズが5mm未満であっても、脳動脈瘤により症状をきたしているかどうか、発生部位、形態的特徴(dome neck aspect 比が大きい、不整形、ブレブを有するかどうか)により個々の脳動脈瘤で総合的な治療方針の検討が勧められている。脳動脈瘤の増大と破裂に至るまでに、脳血管壁の退行性変性が関与しており、脆弱化した動脈瘤壁が破綻して破裂すると、くも膜下出血を発症する。実験的脳動脈瘤モデルを用いた研究により、脳動脈瘤の増大と破裂には脳動脈瘤壁の炎症反応が重要な役割を果たしていることが明らかになった。この炎症反応を生体で可視化できれば、今後の脳動脈瘤の増大と破裂に至る要因の評価項目になり、更には増大と破裂の原因解明に繋がる。炎症反応の可視化に関しては、人体に酸化鉄ナノ粒子(フェルモキシトール®を使用)を投与後に、一部の脳動脈瘤においてMRIで炎症反応の有無の評価が可能であると報告されている。しかし、脳動脈瘤壁での炎症反応の範囲と強さを評価できるまでには至っていない。

(2) 脳動脈瘤に対する開頭手術と炎症反応

未破裂脳動脈瘤の根治術の一つとして、開頭手術による脳動脈瘤クリッピング手術が行われる。この手術は、形態的に脳動脈瘤と思われる部位をクリップで閉塞させることで、脳動脈瘤への血行力学的負荷を消失させ、未然に破裂を防ぐ方法である。しかし、クリッピング手術後に脳動脈瘤が増大もしくは破裂する症例が少なからず存在する。手術中に脳動脈壁に発現している炎症反応を可視化できれば、手術後に増大もしくは破裂する可能性がある脳動脈瘤壁を予測することができ、手術中の確実な処置に繋がり根治の可能性を高めることができる。また、脳動脈瘤に発現している炎症反応を定量評価できれば、炎症反応の有無だけではなく動脈瘤壁のどの部分に炎症反応が強くて、どの部分に弱いのかを手術中に判定できる。しかし、手術中の炎症反応の可視化に関する報告は未だ存在しない。

2. 研究の目的

我々は酸化鉄ナノ粒子に ICG を標識させた近赤外線蛍光プローブを合成しており、このプローブはマクロファージ内に取込まれて活性化され、蛍光を発するアクチベータブル蛍光プローブであることを確認している。本研究の目的は本プローブを実験的脳動脈瘤モデルに投与して、脳動脈瘤の蛍光イメージングを行い、脳動脈瘤壁の炎症反応(マクロファージの浸潤)を可視化することである。

3. 研究の方法

(1) 我々は、すでに酸化鉄ナノ粒子に ICG を標識させたアクチベータブル近赤外線蛍光プローブを合成しており^①、ICG 標識酸化鉄ナノ粒子のプローブを実験的脳動脈瘤モデルに投与する。

引用文献^① Ikeda H, Ishii A, Sano K, Chihara H, Arai D, Abekura Y, Nishi H, Ono M, Saji H, Miyamoto S.: Activatable fluorescence imaging of macrophages in atherosclerotic plaques using iron oxide nanoparticles conjugated with indocyanine green. *Atherosclerosis*. 2018 Aug;275:1-10. Epub 2018 May 18.

(2) ラット (Sprague Dawley rat, 7 週齢、雄) にペントバルビタール 50mg/kg の腹腔内投与による全身麻酔を導入し、血行力学的負荷を増大させるため左総頸動脈を結紮し、更に腎性高血圧を誘発させるため左腎動脈を結紮する。3-aminopropionitrile (コラーゲンとエラスチンの架橋結合を阻害) 0.12%と NaCl 8%を混餌した食事を2ヵ月間与えて脳動脈瘤を形成させた。

(3) ICG 標識酸化鉄ナノ粒子のプローブ (0.5mmol Fe/kg) をラットの尾静脈から投与し、48 時間後に深麻酔下にしてラットを死亡させる。4%Paraformaldehyde (PFA) で灌流固定を行い、脳動脈瘤を含む脳を摘出する。蛍光実体顕微鏡で脳動脈、脳動脈瘤の蛍光イメージングを行う。摘出標本を4%PFAに一晩浸漬し、更に30%スクロースに一晩浸漬する。OCT コンパウンドに包埋して標本をクリオスタットで薄切する。薄切標本を蛍光顕微鏡で ICG 由来の近赤外蛍光の局在観察、鉄染色、免疫染色 (Iba-1) を行い、脳動脈瘤壁での ICG 局在部位、鉄の集積部位、マクロファージの発現部位の確認を行う。

4. 研究成果

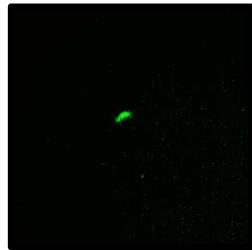
(1) ICG 標識酸化鉄ナノ粒子のプローブを投与した 8 匹のラットで 13 脳動脈瘤のうち、3 匹の 2 つの脳動脈瘤と 1 本の脳血管で ICG 由来の近赤外蛍光が観察された。コントロール群として、酸化鉄ナノ粒子のみを投与した 8 匹のラットで 13 脳動脈瘤と ICG のみを投与した 8 匹のラットで 12 脳動脈瘤において、ICG 由来の近赤外蛍光は観察されなかった。

(2) 近赤外蛍光が検出された脳動脈瘤①

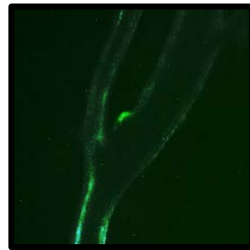
近赤外蛍光は右前大脳動脈と臭動脈分岐部の膨隆状脳動脈瘤で観察された。脳動脈瘤の近赤外蛍光は、脳が背景の状態でも検出可能であった。



明視野



近赤外蛍光



重ね合わせ



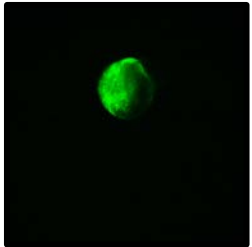
脳底部より観察

(3) 近赤外蛍光が検出された脳動脈瘤②

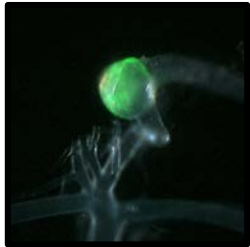
近赤外蛍光は左後大脳動脈の屈曲部に形成された囊状動脈瘤で観察された。脳動脈瘤の近赤外蛍光は、脳が背景の状態でも検出可能であった。



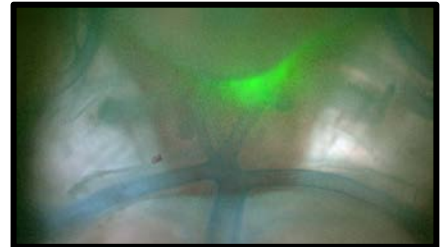
明視野



近赤外蛍光



重ね合わせ



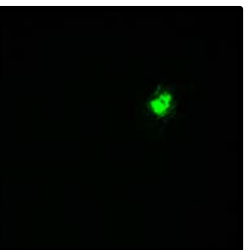
脳底部より観察

(4) 近赤外蛍光が検出された脳動脈

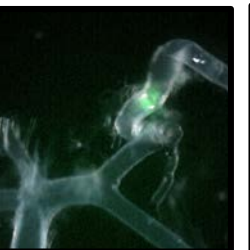
近赤外蛍光は左後大脳動脈の屈曲部で観察された。脳動脈の近赤外蛍光は、脳が背景の状態でも検出可能であった。この部分の近赤外蛍光の検出は、脳動脈瘤の初期病変の可能性が示唆された。



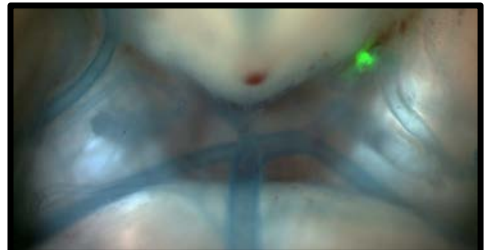
明視野



近赤外蛍光



重ね合わせ

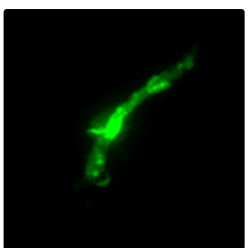


脳底部より観察

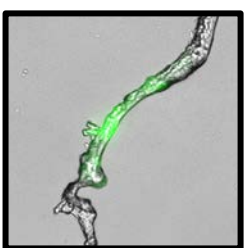
(5) 病理学的所見

動脈瘤壁と脳動脈壁の近赤外蛍光部分に Iba-1 を用いた免疫染色でマクロファージの集積を確認した。更に、マクロファージ集積部分は鉄染色で陽性所見を認めた。そのため、近赤外蛍光は ICG 標識酸化鉄ナノ粒子のプローブ由来であり、マクロファージの局在を示していることが確認された。

・近赤外蛍光が検出された脳動脈瘤①の病理所見



近赤外蛍光



重ね合わせ

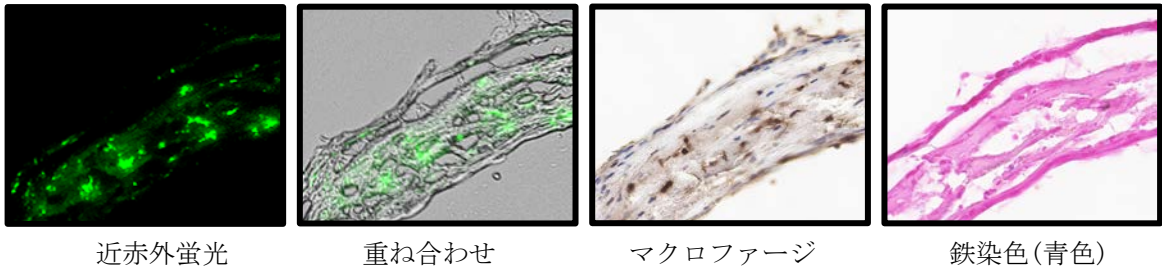


マクロファージ

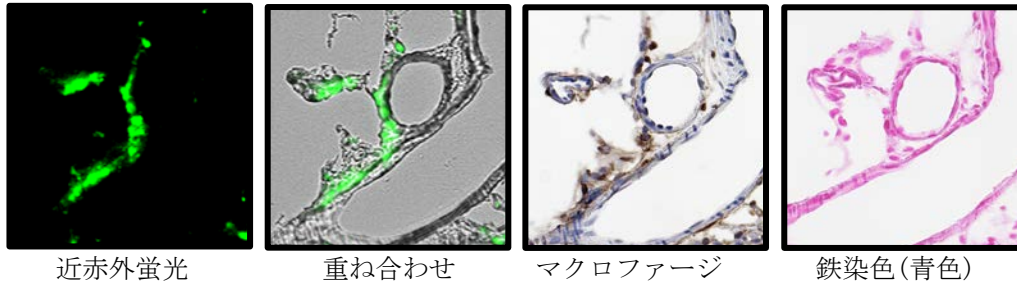


鉄染色(青色)

・近赤外蛍光が検出された脳動脈瘤②の病理所見



・近赤外蛍光が検出された脳動脈の病理所見



(6) ICG 標識酸化鉄ナノ粒子のプロープを投与した 8 匹のラットで 13 脳動脈瘤のうち、2 脳動脈瘤のみで ICG 由来の近赤外蛍光が観察された。どのような脳動脈瘤で蛍光が観察されるのかを検討するために、蛍光有りの 2 動脈瘤と蛍光無しの 11 脳動脈瘤で比較を行った。動脈瘤サイズと瘤壁の厚さは、それぞれ有意差を認めなかった ($p=0.28$ と $p=0.09$)。集積しているマクロファージの数は蛍光無群と比較して、蛍光有群で有意に多かった ($p=0.04$)。更に、蛍光有群の脳動脈瘤はすべて鉄染色陽性であったが、蛍光無群の脳動脈瘤はすべて鉄染色陰性であり、有意な違いを認めた ($p=0.013$)。すなわち、より多くのマクロファージが集積し、ICG 標識酸化鉄ナノ粒子を取り込む脳動脈瘤の蛍光イメージングの可能性が示された。

(7) 研究成果の結論として、ICG 標識酸化鉄ナノ粒子のプロープによる脳動脈瘤と脳動脈瘤形成の初期病変の脳血管におけるマクロファージを標的とした慢性炎症の近赤外蛍光イメージングの可能性を示した。脳動脈瘤壁の近赤外蛍光が検出可能かどうかは、マクロファージ集積数に依存することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroyuki Ikeda, Akira Ishii, Kohei Sano, Hideo Chihara, Daisuke Arai, Yu Abekura, Hidehisa Nishi, Masahiro Ono, Hideo Saji and Susumu Miyamoto	4. 巻 14
2. 論文標題 Activatable Fluorescence Imaging of Macrophages in Cerebral Aneurysms Using Iron Oxide Nanoparticles Conjugated With Indocyanine Green	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.00370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Hiroyuki, Ishii Akira, Sano Kohei, Chihara Hideo, Arai Daisuke, Abekura Yu, Nishi Hidehisa, Ono Masahiro, Saji Hideo, Miyamoto Susumu	4. 巻 275
2. 論文標題 Activatable fluorescence imaging of macrophages in atherosclerotic plaques using iron oxide nanoparticles conjugated with indocyanine green	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田宏之
2. 発表標題 インドシアニングリーン標識酸化鉄ナノ粒子による脳動脈瘤壁に集積するマクロファージのアクチベータブル蛍光イメージング
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田宏之
2. 発表標題 インドシアニンググリーン標識酸化鉄ナノ粒子による脳動脈瘤壁に集積するマクロファージのアクチベータブル蛍光イメージング
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田宏之
2. 発表標題 アクチベータブルインドシアニンググリーン標識酸化鉄ナノ粒子による脳動脈瘤のマクロファージイメージング
3. 学会等名 第43回日本脳卒中学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	青木 友浩 (Aoki Tomohiro) (40633144)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	池田 宏之 (Ikeda Hiroyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------