

平成 21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19590817  
研究課題名（和文） 放射光（スプリングエイト）を利用した新規循環器疾患診断法の開発とその臨床応用  
研究課題名（英文） Development of novel methods to diagnose cardiovascular diseases with synchrotron radiation in SPring-8  
研究代表者  
山下 智也（YAMASHITA TOMOYA）  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90437468

研究成果の概要：放射光を利用して、循環器疾患の診断に使用できる方法の開発を目指して研究を進めた。動脈硬化不安定粥腫の診断を目標に、位相差 X 線 CT を共同で開発し、動物での撮影に成功し、動脈硬化の質的診断にまで到達した。また、X 線回折法にての心筋症の新規診断方法を確率するための動物実験とヒトサンプルでの研究を進めた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 循環器内科学

キーワード：心臓病態学 血管病態学

## 1. 研究開始当初の背景

近年の循環器疾患診断法は、様々な基礎的・臨床的研究を基盤にして目覚ましく進歩しつづけている。しかし未解決な問題も数多く残されており、新規の診断法を開発してそれらをいち早く臨床現場で活用し、問題を解決することが求められている。

我々は以前より SPring-8(兵庫県西播磨にある大型放射光研究施設)との共

同研究を行い、放射光の医学分野を進めており、放射光を利用した全く新しい方法論を用いた疾患診断法を開発し、臨床応用することを目指し研究を続けている。

## 2. 研究の目的

魔法の光とも形容される放射光(SPring-8)を使用して、臨床にも応用できる全く新しい循環器疾患の診断方法

を開発し、循環器領域での未解決な問題を解決すること。さらに、他分野も含めた医学で利用可能な放射光診断学として発展させること。

### 3. 研究の方法

#### 1. 位相差X線CTを使用した動脈硬化巣の不安定粥種の診断

臨床において、急性冠症候群（急性心筋梗塞・不安定狭心症）の治療法はほぼ確立しているが、その原因である動脈硬化不安定粥種の診断を確実にを行う方法は無く、世界中で基礎的・臨床的研究が行われている。

不安定粥種の新規診断法として、**位相差X線CT**という方法にて動脈硬化巣の質的診断を行う研究をすすめている。現在、臨床で使用しているCTは、X線の透過性の差にて画像を構築する。位相差X線CTでは、物質特性の差でX線透過時に生じる波長のズレ（位相差）を測定してその情報からCT画像を構成し、理論的感度は透過像の約1000倍となる。摘出したマウス動脈硬化巣の撮影に成功しており、撮影したサンプルを、免疫染色を含め組織学的に解析し、位相差CT画像を用いた動脈硬化巣解析に必要な基本的な情報のデータベースを確立する。

将来、ヒトでの撮影を行うにあたり、被爆量を軽減でき、しかも理論的には普通のX線源でも撮影できるタルボ法という方法を応用した撮影法とその装置の開発を行う。

#### 2. 放射光X線回折法を用いた拡張型心筋症の診断

病的な心筋の新規診断法としては、**X線回折法**（古典的には単離心筋で収縮の評価法として確立されている）を用いての研究をすすめている。通常X線に代わり、放射光を使用することで生体内の動的な心臓でも撮影可能となり、心筋細胞内のナノオーダーサイズ収縮蛋白（ミオシンとアクチン）の情報を画像化し評価することができる。

我々は、世界で始めて生体内マウス動的な心臓のX線回折像の撮影に成功した(Toh-R et al. *Biophys J.* 2006;90:1723-1728.)。電子顕微鏡でも解析困難なナノオーダーサイズの解剖学的情報を、生体の動的な心臓にて心筋

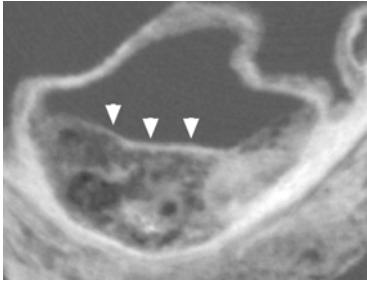
収縮に関連する機能的な情報とともに得られるということであり、新規診断方法として発展させていく。

マウス拡張型心筋症モデル(MLP 遺伝子欠損マウス)での心臓の撮影を行い、どのような特徴がとらえられるのか、さらに他の心臓疾患モデルマウスでの実験をすすめて、病態特異的所見を発見していく。さらに、マウスで薬物負荷条件の撮影を行い、各種病態での特徴をデータベースとして蓄え、診断のための解析プログラムを検討・作成していく。

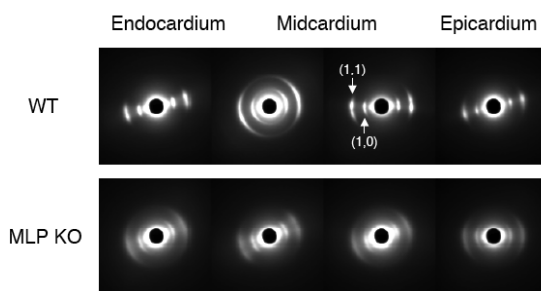
同時に、拡張型心筋症患者心筋生検サンプルの撮影を行い、新規臨床診断法としての有用性や問題点を明らかにしていく。

### 4. 研究成果

不安定粥種診断法の開発に関して、位相差X線CTにて摘出したマウス動脈硬化巣の評価実験を実施した。二次元CT画像上で、動脈硬化巣内のCT値に分布が認められ、質的診断ができる可能性を示唆する結果であった。同一サンプルの顕微鏡組織像ならびに免疫染色像とCT像を比較し、脂質やマクロファージなどの炎症細胞の多い不安定粥腫と平滑筋細胞が豊富な安定粥腫の差異が位相差CTにて容易に鑑別可能であることが示された。この方法論に関しては、今までの臨床で用いられているCTと根本的に異なり、動脈硬化巣のCT値に分布が認められ、10 $\mu$ mの精度であったかも切片を作成して顕微鏡で観察しているかのように組織の性状診断が可能であり、さらに3次元CT画像を構築することで、より立体的に粥腫破綻が起きそうな部位診断ができる可能性が示された。方法論を確立し、次の段階としてウサギなど中動物での実験、さらに同時にDCAにて冠動脈狭窄病変の治療時に得られる患者の冠動脈硬化巣のサンプル、病理解剖で得られる冠動脈標本などを用いて実験を進めていく方針である。さらに、理論的には必ずしも放射光を用いなくてもこの方法論は実施可能であり、小線源を用いた視野の広い一般病院でも使用可能な装置と撮影方法（タルボ法）の開発も行っており、ヒトではまずは体表面に近い頸動脈病変の撮影などで応用可能かと考えている。その基礎実験としてマウスを用いた生体内タルボ法での撮影も開始した。



病的な心筋診断法としてのX線回折法では、生体マウスでの測定方法を確認し報告しており、さらにある拡張型心筋症(DCM)モデルマウスで特徴的な所見(心筋細胞内のミオシンとアクチンの線維が、正常では一定間隔で六角格子状に整然と並んでいるが、このDCMモデルでは格子間隔がバラバラであることが分かった)が得られることを確認した。さらに、薬物負荷条件下での心機能の評価に関する実験、そして心肥大・心筋梗塞などのその他のマウス心臓病モデルの撮影を行い、各種疾患での特徴をデータベースとして蓄えている。マウスの心臓から心筋バイオプシー用の鉗子で取った心筋固定標本でも回折像が撮影可能(解剖学的情報のみ)であることを確認しており、神戸大学医学部倫理委員会にて認可をいただき、臨床患者での心筋生検で得られる患者サンプル(固定標本)を用いて、臨床サンプルでも実験を行っており、結果は現在解析中であるが、将来の拡張型心筋症の新規診断方法として確立することを目指していきたい。



## 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 8 件)

1. Takeda M, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Takaya T, Nakajima K, Inoue N, Masano T, Tawa H, Satomi-Kobayashi S, Toh R, Sugiyama D, Nishimura K, Yokoyama M, Hirata K, Kawashima S. Plasma tetrahydrobiopterin /dihydrobiopterin ratio. *Circ J.* 2009; 73: 955-62. (査読あり)

2. Masano T, Kawashima S, Toh R, Satomi-Kobayashi S, Shinohara M, Takaya T, Sasaki N, Tawa H, Yamashita T, Yokoyama M, Hirata K. Beneficial effects of exogenous tetrahydrobiopterin on left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circ J.* 2008; 72:1512-1519. (査読あり)

3. Sasaki N, Yamashita T, Takaya T, Shinohara M, Shiraki R, Takeda M, Emoto N, Fukatsu A, Hayashi T, Ikemoto K, Nomura T, Yokoyama M, Hirata K, Kawashima S. Augmentation of vascular remodeling by uncoupled endothelial nitric oxide synthase in a mouse model of diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1068-1076. (査読あり)

4. Shinohara M, Yamashita T, Tawa H, Takeda M, Sasaki N, Takaya T, Toh R, Takeuchi, A, Ohigashi T, Shinohara K, Yokoyama M, Kawashima S, Hirata K, Momose A. Atherosclerotic Plaque Imaging using Phase-contrast X-ray Computed Tomography. *Am J Physiol.* 2008; 294: 1094-1100. (査読あり)

5. Shinohara M, Hirata K, Yamashita T, Takaya T, Sasaki N, Shiraki R, Ueyama T, Emoto N, Inoue N, Yokoyama M, Kawashima S. Local overexpression of Toll-like Receptors at the vessel wall induces formation of atherosclerotic lesion: Synergism of Toll-like Receptor 2 and Toll-like Receptor 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 2384-2391. (査読あり)

6. Yamashita T, Kawashima S, Hirase T, Shinohara M, Takaya T, Sasaki N, Takeda M, Tawa H, Inoue N, Hirata K, Yokoyama M.

Xenogenic macrophage immunization reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Am J Physiol.* 2007; 293: C865-873. (査読あり)

7. Matsui A, Okigaki M, Amano K, Adachi Y, Jin D, Takai S, Yamashita T, Kawashima S, Kurihara T, Miyazaki M, Tateishi K, Matsunaga S, Katsume A, Honsho S, Takahashi T, Matoba S, Kusaba T, Tatsumi T, Matsubara H. Central Role of Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 in Endothelial Nitric Oxide Synthase Mediated Angiogenic Response and Vascular Function. *Circulation.* 2007; 116: 1041-1051. (査読あり)

8. Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, Yada T, Goto M, Fukatsu A, Hayashi T, Alp NJ, Channon KM, Yokoyama M, Kawashima S. A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27: 1632-37. (査読あり)

[学会発表] (計 1 件)

1. Yamashita T, Atherosclerotic Plaque Imaging using Phase-contrast X-ray Computed Tomography  
2007. 11. 4-7 Orland FL, USA American Heart association, Scientific Session.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 智也 (YAMASHITA TOMOYA)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90437468

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし