

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591437

研究課題名（和文） 虚血心筋障害、リモデリングにおける心筋間質の病態変化とその画像化に関する研究

研究課題名（英文） Interstitial pathological change and its imaging in myocardial ischemia and remodeling

研究代表者 瀧 淳一（TAKI JUNICHI）

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：10251927

研究成果の概要（和文）：ラット心筋における虚血再還流モデルを用い、細胞外マトリックス糖タンパク質の一つである tenascin C(TNC)の発現を I-125-anti-TNC-Ab 画像にて検討した。TNC は虚血領域の中心部の約 50-70%の領域に認め、30 分虚血再還流では 3 日で集積は最大となり、1-2 週で低下、4 週で著明に低下した。Postconditioning では TENC 発現は全体に軽度抑制され、特に 2 週目で著明に抑制された。

研究成果の概要（英文）：Tenascin-C(TNC) expression was examined by autoradiography using I-125-anti-TNC-Ab (I-TNC) in a rat model of myocardial ischemia and reperfusion. I-TNC accumulation was observed in the ischemic area and its accumulation was peaked at day 3 and decreased at day 7-14 and only faint uptake was observed at day 28. Postconditioning mildly suppressed TNC expression at day 3-7 but significantly at day 14.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：核医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：tenascin-C、matricellular 蛋白、リモデリング、心筋梗塞、虚血、再還流

1. 研究開始当初の背景

従来の心筋虚血に関する研究では、その初期には梗塞の大きさや、血行動態の観察により心筋全体の変化を解析しようとするものであった。その後心筋細胞そのものの病理学的、機能的な変化を直接的に検討することにより虚血後の心筋障害をより詳細に検討でき

るようになった。我々は以前の研究で心筋細胞の直接的な変化を心筋壊死の過程ではなく、心筋アポトーシスの観点から Tc-99m-annexin V を用いて検討した。その結果、心筋のアポトーシスは心筋障害に大きな意義を持ち、その病態は虚血後 1 時間以内から数日の間にダイナミックに変化するこ

とを突き止めた。この研究は高く評価され、発表した *Journal of Nuclear Medicine* の表紙を飾ることとなった (*J Nucl Med.* 2004;45:1536-1541)。さらに心筋細胞のアポトーシスは虚血時間に依存し、種々のインターベンションで軽減できることを核医学画像にて示してきた (*Circ J* 2007;71:1141-1146, *J Nucl Med* 2007;48:1301-1307)。しかしながら心筋組織は心筋細胞のみで構築されているのではなく間質系の組織も無視できない構成成分である。心筋梗塞急性期を乗り切った患者は慢性期に、心筋リモデリングによる心不全の脅威に晒され臨床の場で大きな問題となっている。この病態には心筋細胞のアポトーシスの関与に加え間質組織の変化も重要であるらしいことが近年示唆されている。テネイシンCは心筋梗塞後の比較的早期に細胞外マトリックス糖タンパク質として間質に出現するものであり組織障害の治癒、再構築に関与し、リモデリングに重要な役割を果たしていると推測されている。そこで虚血再灌流ラットを用い冠動脈閉塞時間を変えることにより種々の程度の虚血心筋を作成し、これらの障害心筋に対して種々の時間経過後にアイソトープ標識テネイシンC抗体を投与しテネイシンCの発現を画像化することを考えた。これにより、テネイシンC出現の程度と亜急性期から慢性期での心筋リモデリングの有無、程度との比較解析によりテネイシンCと心筋リモデリングの関連の解明が期待できる。心筋虚血後の心筋障害、リモデリングに関してテネイシンCイメージングを用いて検討したものは国内外共に皆無に近い状態である。

2. 研究の目的

本研究は心筋虚血後の組織学的変化を、その

間質組織の病理学的変化に焦点を当て検討しようとするものである。心筋虚血後の治癒再構築過程で心筋間質に発現する細胞外マトリックス糖タンパク質であるテネイシンC (TNC)を、アイソトープ標識テネイシンC抗体を用いて画像化することを目的とした。また心筋虚血後の変化を経時的に画像化することにより、TNCに関する機能画像診断の基本的意義を確立することを目的とした核医学的研究である。心筋間質組織の病態変化を検討し、病理組織標本と比較しながら詳細に画像のもつ意義を精査し臨床応用を目指した研究である。

3. 研究の方法

I-125 標識抗 tenascin-C 抗体(I-125-TNC)を作成し、虚血再還流モデルラットに投与し、オートラジオグラフィにてその集積を定量化することでTNCの発現を検討した。

I-125-TNCの特異性を検討するために非特異的なI-125標識抗体の集積と対比するとともに、オートラジオグラフィに隣接する組織切片におけるHE染色と、抗TNC抗体による免疫組織染色の陽性部とオートラジオグラフィでの集積の空間分布の対応を検討した。体内分布に関する検討は30分虚血再還流3日のモデルを用い、I-125-TNC(1.0-2.5MBq)を投与後1, 5, 24時間後に屠殺し、血液、心臓(正常部と梗塞部)、肝、肺、脾臓、筋肉、腎臓の%ID/gを測定した。

虚血再還流での経時的なTNC発現の検討には20分ならびに30分虚血再還流モデルを用いた。虚血は開胸後左冠動脈を閉塞して作成した。20分虚血では再還流1, 3, 7日後に、30分虚血では再還流1, 2, 7, 14, 28日後にI-125-TNC(1.0-2.5MBq)を投与した。投与後3-5時間後に冠動脈を再結紮し、Tc-99m-MIBI(100-200MBq)を投与し1分後

に屠殺することで虚血領域を確認した。屠殺後直ちに心筋の輪状スライスを 20 ミクロンの厚さで作成し、約 20 分間イメージングプレートに露出し、Tc-99m-MIBI での心筋血流像を撮像し虚血領域を評価した。3-4 後に Tc-99m が減衰後に再度 7 日間イメージングプレートに露出し I-125-TNC のイメージを撮像した。

Postconditioning(PC)が心筋 TNC 発現に及ぼす影響の検討では、30 分虚血再還流 3, 7, 14 日のモデルにて検討した。PC は再還流時に 10 秒間の還流、10 秒間の閉塞を 6 回繰り返すことで行った。TNC の投与後 7-9 時間後に冠動脈を再結紮し、同様に Tc-99m-MIBI(100-200MBq)を投与し 1 分後に屠殺した。以下オートラジオグラフィは同様に施行した。

4. 研究成果

30 分虚血再還流 3 日モデルにおける非虚血部に対する虚血部の集積比は I-125-TNC では 2.71 ± 0.80 であったが、I-125 非特異抗体では 1.36 ± 0.27 であり有意に低かった ($P < 0.005$)。病理組織での抗 TNC 抗体による免疫組織染色陽性部とオートラジオグラフィでの集積部はよく一致した。免疫染色陽性部は病理学的に梗塞部と正常部の境界領域にみられたが、梗塞心筋部に島状に残る心筋部周囲の間質にも認め、オートラジオグラフィの像では全体として虚血部に瀰漫性ないし散在性の不均一な集積としてみられた。以上より、I-125-TNC の集積は TNC への特異的な集積を示していることが確認された。虚血再還流モデルにおける経時的、空間的な TNC 分布の検討では、TNC は非虚血部では集積を認めず、虚血領域の中心部の約 50-70%の領域に認めた。20 分虚血再還流 1 日では正常部に対する虚血部の集積比が

1.81 ± 0.53 であり、3 日後では 2.46 ± 0.91 、7 日後では集積が著明に低下し、 1.23 ± 0.17 であった。一方 30 分虚血群では再還流 1, 3 日後の虚血部集積比はそれぞれ 2.99 ± 0.90 、 2.71 ± 0.80 と高値を示し、7, 14 日後では 1.94 ± 0.23 、 2.06 ± 0.37 と低下し、28 日後には 1.47 ± 0.27 とさらに低下し、極軽度の集積を示すのみとなった。

Postconditioning が TNC 発現に与える影響に関する実験結果は、30 分虚血後再還流 3 日では正常部に対する虚血部の集積比が 3.50 ± 1.38 と高値を示し、7 日後では 2.34 ± 0.41 、14 日後では集積がさらに低下し、 1.91 ± 0.17 となった。一方 30 分虚血 Postconditioning 群では再還流 3, 7 日後の虚血部の集積比はそれぞれ 2.84 ± 0.77 、 1.94 ± 0.37 と対照群に比し低値を示し、14 日後では 1.40 ± 0.08 とさらに低下した。従って再還流時に Postconditioning を行うことで、3, 7, 14 日いずれも TNC の発現を抑制することが示され、虚血再還流後の組織再構築における過剰な TNC の発現が抑制された可能性が示唆された。

将来的な SPECT/CT による撮像を念頭において I-125-TNC の体内分布の変化を検討した結果は、心臓梗塞部で、I-125-TNC 静注 1, 5, 24 時間後の % injected dose/(gID/g) はそれぞれ 0.53 ± 0.089 、 0.62 ± 0.13 、 0.27 ± 0.11 であり、心臓非虚血部では 0.22 ± 0.018 、 0.16 ± 0.026 、 0.059 ± 0.035 。肝臓では 0.97 ± 0.43 、 0.99 ± 0.28 、 0.34 ± 0.099 。肺臓では 0.48 ± 0.39 、 0.32 ± 0.068 、 0.054 ± 0.012 。血液では 0.59 ± 0.069 、 0.33 ± 0.063 、 0.057 ± 0.020 。腎臓では 1.23 ± 0.71 、 0.87 ± 0.084 、 0.24 ± 0.11 。筋肉では 0.063 ± 0.052 、 0.077 ± 0.023 、 0.020 ± 0.0064 であった。1, 5, 24 時間後の梗塞/肝臓、梗塞/血液、梗塞/肺の %ID/g 比はそれぞれ 0.69 ± 0.45 、 0.66 ± 0.16 、 0.82 ± 0.25 なら

びに 0.91 ± 0.087 , 1.85 ± 0.14 , 4.8 ± 1.0 と 1.20 ± 0.71 , 1.97 ± 0.19 , 4.9 ± 1.2 であった。従って投与5時間以降で SPECT が可能であると考えられた。

以上より、I-125-TNC による TNC 発現のイメージングによる可視化は可能となった。また虚血再還流モデルによる TNC 発現の経時的空間的なダイナミックな変化が明らかとなり、Postconditioning による介入的処置により発現が抑制されることも示された。今後 SPECT/CT での in-vivo イメージングによる更なる検討が期待される。

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)

- ① Taki, J., Inaki, A., Wakabayashi, H., Imanaka-Yoshida, K., Ogawa, K., Hiroe, M., Shiba, K., Yoshida, T., Kinuya, S. Dynamic expression of tenascin-c after myocardial ischemia and reperfusion: Assessment by 125I-anti-tenascin-c antibody imaging. J Nucl Med 51(2010), 1116-1122, 査読あり
- ② Taki, J., Matsunari, I., Wakabayashi, H., Inaki, A., Kinuya, S. Potential utility of 99mTc-annexin V imaging in ischemically damaged myocardium. Intv Cariol 2(2010), 765-767, 査読あり

[学会発表] (計 12 件)

- ① Taki, J. Detection of ischemia and apoptosis in the diseased myocardium. World Molecular Imaging Congress 2010. 2010. 9. 8, Kyoto International Conference Center (Kyoto)
- ② Taki, J., Wakabayashi, H., Inaki, A., Imanaka-Yoshida, K., Ogawa, K., Shiba, K., Hiroe, M., Nakajima, K., Matsuo, S., Kinuya, S. Temporal change of Tnascin-C

expression in a rat model of moderate and severe ischemia: Assessment by I-125-anti tenascin-C antibody imaging. 57th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine. 2010. 6. 8, Salt Place Convention Center (USA)

- ③ Taki, J., Inaki, A., Wakabayashi, H., Ogawa, K., Shiba, K., Hiroe, M., Imanaka-Yoshida, K., Kayano, D., Nakajima, K., Kinuya, S. Temporal assessment of Tnascin-C expression in a rat model of myocardial ischemia and reperfusion. 56th Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine. 2009. 6. 15, Toronto Convention Center (Canada)

[図書] (計 1 件)

- ① 滝 淳一, 先端医療技術研究所, 臨床医とコメディカルのための最新クリニカル PET, 2010 年, 283 頁-287 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧 淳一 (TAKI JUNICHI)
金沢大学・附属病院・講師
研究者番号: 10251927

(2) 研究分担者

柴 和弘 (SIBA KAZUHIRO)
金沢大学・学際科学実験センター・教授
研究者番号: 40143929

小川 数馬 (OGAWA KAZUMA)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号: 30347471