

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06502

研究課題名(和文)スカベンジャー受容体のイメージングに基づく生活習慣病および悪性腫瘍の評価

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms underlying lifestyle-related diseases and malignant tumors based on in vivo imaging of scavenger receptors

研究代表者

河嶋 秀和 (Kawashima, Hidekazu)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70359438

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)：スカベンジャー受容体(SR)に認識される酸化LDL(oxLDL)を放射性ヨウ素123/125Iで標識し、組織におけるSR発現量を定量評価した。

健常マウスに放射性oxLDLを静脈内投与した結果、褐色脂肪に対して特徴的な放射能集積を認め、この集積にはSRのCD36が深く関与していた。一方、担癌マウスあるいはアテローム性動脈硬化症モデルマウスに用いた検討でも、CD36受容体の発現に依存した病変組織への放射能集積が示された。

本研究では老廃物の除去に関わるSR機能の破綻は種々の疾患の要因となることが示され、その定量解析や標的治療分子の開発を通じて関連疾患の診断・予防へと結び付けられると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褐色脂肪組織がCD36受容体を介して酸化LDLを能動的に取り込むことを明らかにし、同組織が「生体内老廃物の除去」という機能を有している可能性が示された。また、CD36受容体は骨格筋にも発現しているため、「運動が健康の増進に繋がる」という既成概念に対して科学的な根拠を導くことで、老年症候群(サルコペニア)の予防に向けて新たな知見を提供しうる。

さらに、アテローム性動脈硬化の形成や腫瘍の悪性度にCD36受容体が関与していることを示した本研究成果は、生活習慣病や転移性腫瘍の診断に資するものであり、スカベンジャー受容体の発現と各種疾患との関係性を探った点においても学術的・社会的意義が大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Oxidized LDL (oxLDL), which is recognized by scavenger receptors (SR), was labeled with radioiodine and the expression level of SR in tissues was quantitatively evaluated in in vivo/ex vivo studies.

When radiolabeled oxLDL was injected intravenously into normal mice, a characteristic accumulation of radioactivity in brown fat was observed, and CD36, one of SRs, was profoundly involved in this distribution. On the other hand, when using tumor-bearing mice or atherosclerosis model mice, accumulation of radioactivity in the lesion sites was indicated to be dependent on the CD36 expression.

SR directly participates in the removal of waste products, and the breakdown of SR function would be a cause of various diseases. It is expected that quantitative analysis and the development of therapeutic molecules targeting CD36 will lead to the diagnosis as well as prevention of related diseases.

研究分野：放射性分子プローブ

キーワード：スカベンジャー受容体 放射性分子プローブ CD36受容体 SPECT/CT in vivoイメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) 低比重リポタンパク質 (Low-density lipoprotein : LDL) が生体内で酸化的修飾を受けて酸化 LDL (oxLDL) となり、アテローム性動脈硬化症の発症に深く関与することは広く知られている。特に oxLDL の細胞内取込みにおいては細胞膜糖タンパク質の一種である Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) が重要な役割を果たしているが、LOX-1 はスカベンジャー受容体 (Scavenger receptor : SR) として oxLDL だけでなく、種々の老廃物や細胞傷害性分子を認識することが報告された (Sawamura T, Curr. Opin. Lipidol., 2012)。一方、褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue : BAT) や骨格筋に発現する CD36 受容体は脂肪酸輸送を通じて全身の脂質代謝を担うが、これも特定の酸化リポタンパク質を認識する SR としてはたらき、動脈硬化病巣における炎症応答や不安定プラーク形成に関与することが示唆されている。さらに、脂肪をエネルギー源とするがん細胞の転移・浸潤にも関わるといふ知見があり (Pascual G, Nature, 2017)、すなわち、CD36 もまた生体ホメオスタシスの維持に寄与するものと考えられていた。

(2) 上記より、SR 機能の破綻は様々な疾患の要因になると予想された。悪性腫瘍のみならず、2 型糖尿病や脂質代謝異常に代表される生活習慣病は動脈硬化症や認知症を始め多くの疾患に対する複合的要素を含んでいるため、その克服は患者 QOL の向上のみならず医療行政や医療経済の観点からも急務である。SR の生理学的意義を追求し、さらにコントロールすることが予防医学・創薬・治療といった幅広い領域に対して大きく貢献すると期待される。

(3) 研究開始時における成果として、研究代表者は放射性ヨウ素を oxLDL に導入した ¹²³I-oxLDL のマウス体内動態に関する検討から、同プローブは静脈内投与後マクロファージ様細胞を介して投与後速やかに肝臓および脾臓に分布すること、一方、肝臓と同等の放射能が主要臓器を取り除いた体部に残存していることを報告していた (Nucl. Med. Mol. Imaging, 52, 2018, J. Label. Compd. Radiopharm., 60, 2017)。そのような中、SR と称される機能性分子の生理・病理的意義についての解析は世界的に行われていたものの、一方でこれらを統合し、臨床応用へと展開するトランスレーショナルリサーチは十分に進んでいない状況にあった。そこで研究代表者は、この問題の克服を当該研究課題の目的に設定した。

2. 研究の目的

SR である LOX-1 および CD36 に結合する放射性分子プローブを作製するとともに、動物(正常マウス、遺伝子改変マウス、病態モデルマウス)を用いた体内動態解析により個体レベルで SR 機能を抽出することを目的とした。

しかし、新規イメージングプローブの合成については、当初予定していた LOX-1 を標的とする 4-Hydroxy-2-nonenal のヒスチジン誘導体の合成原料の入手が困難となったため断念するに至った。また、COVID-19 感染予防措置に伴う行動制限もあり、結果的にプローブは放射性ヨウ素 ^{123/125}I 標識 oxLDL に限定し、マウスに静脈内投与後の体内(局所)分布を測定する実験を行った。本研究を通じ、生理的、病的状態にある個体で特定の組織に発現している SR(主に CD36)を定量的に解析、生活習慣病の予防・診断・治療、あるいは新たながん治療の起点にすることを目的とし、これを達成するために以下に掲げる項目を研究対象とした。

- (1) 正常動物における CD36 の分布とその生理的意義を精査する。
- (2) 悪性腫瘍への oxLDL の取込みを評価する。
- (3) 動脈硬化病巣への oxLDL の取込みを評価する。

3. 研究の方法

- (1) 正常動物における oxLDL の分布とその生理的意義

放射性ヨウ素の求電子置換反応を用いて ¹²³I-oxLDL を作製し、覚醒下および麻酔下の C57BL/6 マウス(雄性)に静脈内投与した。麻酔の影響を調べる個体には、Medetomidine, Midazolam, Butorphanol 三種混合麻酔を、¹²³I-oxLDL 投与の 30 分前に腹腔内投与した。¹²³I-oxLDL 投与 10 分後に安楽死させ、灌流固定した後、小動物用 SPECT/CT にて X 線 CT および Static-SPECT 撮像を実施した。また、同様に作製した ¹²⁵I-oxLDL をマウス投与後に摘出した BAT および白色脂肪組織 (White adipose tissue : WAT) から凍結薄切標本を作製し、その放射能集積と CD36 発現との関係をラジオリミノグラフィーおよび免疫組織化学染色で確認した。

^{123}I -oxLDL を CD36 遺伝子欠損マウス (CD36-KO マウス) (雄性) に覚醒下で静脈内投与し、と同様に Static-SPECT 撮像を実施した。また、CD36 による心筋細胞への能動輸送が報告されている心筋脂肪酸代謝診断薬の ^{123}I -BMIPP を、と同様に覚醒下および麻酔下の C57BL/6 マウス (雄性) に静脈内投与し、Static-SPECT 撮像を実施した。

^{125}I -oxLDL を C57BL/6 マウス (雄性) に覚醒下で静脈内投与し、組織摘出法により骨格筋を含む体内放射能分布を、単位組織重量あたりの放射能 (% injected dose/g) として算出した。

(2) 悪性腫瘍への oxLDL の取込み

SR の一種である CD36 受容体が腫瘍の悪性度に関与しているという報告から、浸潤性に差を認める 2 種類の乳がん細胞株：MCF-7 細胞 (CD36 高発現) と MDA-MB-231 細胞 (CD36 低発現) を BALB/c Slc-*nu/nu* マウス (雌性) に皮下接種し、担がんモデルマウスを作製した。マウスに ^{125}I -oxLDL を静脈内投与し、60 分後における腫瘍への放射能集積性の相違を % injected dose/g にて比較した。

(3) 動脈硬化病巣への oxLDL の取込み

骨髄由来マクロファージを培養している培地に ^{125}I -oxLDL あるいは ^{125}I -LDL を添加し、24 時間後に洗浄した。そこから 48 時間経過後におけるマクロファージへの放射能の取込みをラジオリミノグラフィーで比較した。

アポリipoprotein E 遺伝子欠損マウス (ApoE-KO マウス) (雄性) に ^{125}I -oxLDL をイソフルラン麻酔下で反復静脈内投与し (2 回 / 週, 4 週間) 最終投与の 24 時間後、イソフルラン麻酔下で Static-SPECT 撮像を実施した。撮像終了後に大動脈弓部分を摘出、切開し、ラジオリミノグラムを得た。

4. 研究成果

(1) 正常動物における oxLDL の分布とその生理的意義

覚醒下のマウスでは肝臓や脾臓の他、左右肩甲骨の間に存在する BAT への特徴的な放射能集積を SPECT 像で認めたが、麻酔下では ^{123}I -oxLDL の BAT への移行が顕著に抑制された。一方、この放射能集積は三種混合麻酔薬の前処置により消失した (図 1)。

また、BAT に集積した切片単位面積あたりの放射能は WAT と比較して 2.5 倍高く、これと矛盾しない CD36 の発現が観察された。別に実施した培養細胞を用いた ^{125}I -oxLDL の取込み実験でも CD36 発現細胞では有意な取込み増加を認めたことから、oxLDL が CD36 を介して細胞に取り込まれることが示された (図 2)。

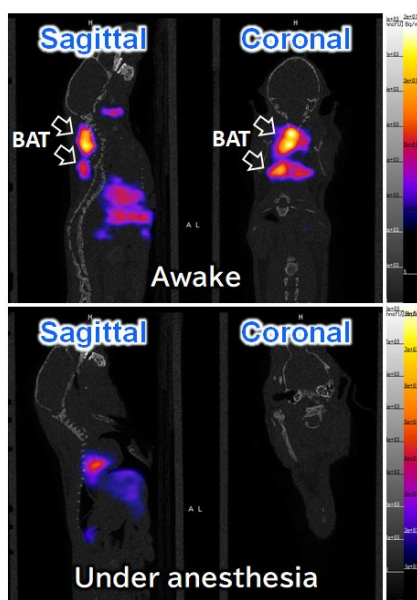


図 1 BAT への ^{123}I -oxLDL 集積における麻酔の影響 (SPECT/CT)

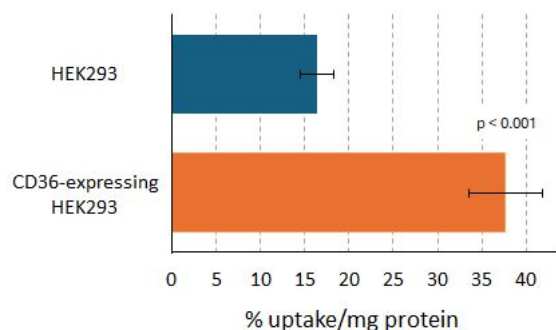
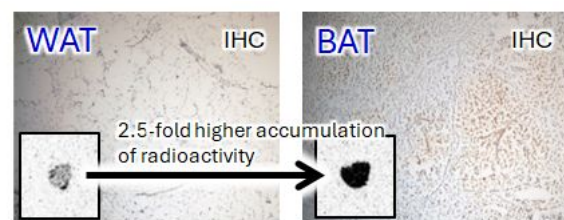


図 2 ^{125}I -oxLDL の組織への集積比較 (BAT vs. WAT) (上) と、CD36 を介した細胞への取込み (下)

CD36-KO マウスでは、BAT に対する ^{125}I -oxLDL の集積が完全に消失した。また、 ^{125}I -BMIPP は正常マウスの SPECT 像にて BAT を明瞭に描出した。しかし、その放射能集積は麻酔下でも継続したことから、両プローブの間に異なる集積機序が存在することが示唆された (図 3)。

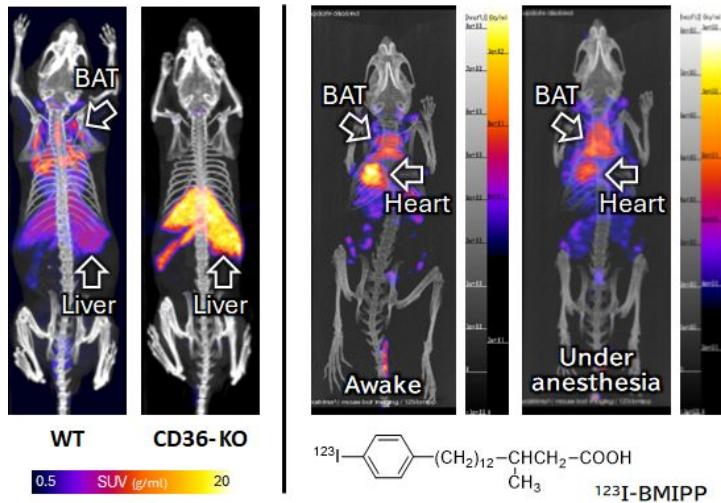


図 3 ^{125}I -oxLDL の CD36-KO マウスにおける体内分布の変化 (左) と、BAT への ^{125}I -BMIPP 集積における麻酔の影響 (SPECT/CT) (右)

^{125}I -oxLDL を静脈内投与した C57BL/6 マウス体内分布を精査した結果、静脈内投与後 10 分で約 20% が全身の骨格筋に移行しており、これは肝臓と同等、BAT (1%) よりも有意に高い数値であることが明らかとなった。さらに、単位組織重量あたりの放射能 (% injected dose/g) は速筋 (腓腹筋) よりも遅筋 (ヒラメ筋) で約 2 倍高く、免疫組織化学染色の結果から CD36 発現量との相関性が示唆された。

(2) 悪性腫瘍への oxLDL の取込み

^{125}I -oxLDL の集積量 (% injected dose/g) は、MDA-MB-231 腫瘍と比較して MCF-7 腫瘍の方が有意に高かった (図 4)。すなわち、CD36 受容体が高発現している MCF-7 腫瘍で高い放射能集積を示し、認知されている両細胞株の悪性度とは負の相関を示す結果であった。CD36 はアポトーシスの誘導に参与する (腫瘍増殖性と負に相関する) との報告もあることから、細胞応答との関連性は検討が必要と考える。

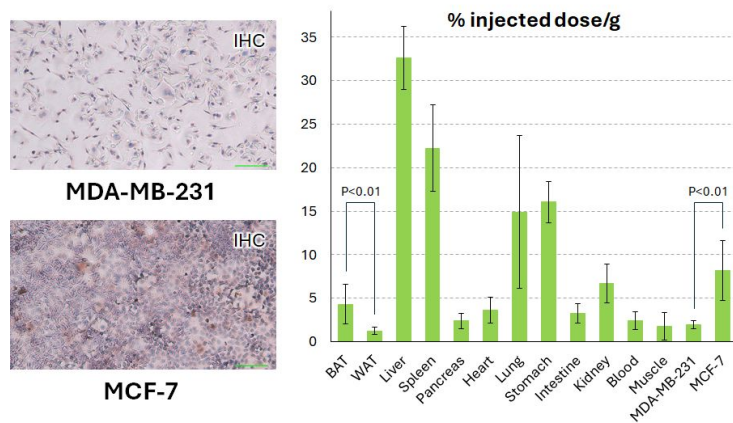


図 4 ヒト乳がん組織への ^{125}I -oxLDL の取込み比較

(3) 動脈硬化病巣への oxLDL の取込み

^{125}I -oxLDL を培地中に添加した骨髄由来マクロファージでは、 ^{125}I -LDL を添加した群と比較して約 8 倍高い放射能の集積を示した。また、oxLDL の取込みは CD36 抗体を前処置することで有意に抑制された。

BAT への放射能集積を低減させるため、イソフルラン麻酔下という条件で ApoE-KO マウスに ^{125}I -oxLDL を反復静脈内投与し、SPECT/CT 撮像を実施した結果、大動脈弓部のアテローム性動脈硬化プラーク形成部位が描出された (図 5)。これは、摘出組織標本から作製した *ex vivo* ラジオルミノグラフィーと一致する結果であった。

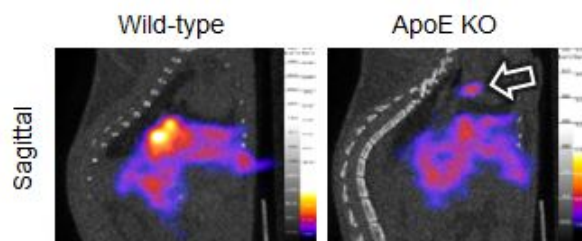


図 5 ^{125}I -oxLDL のアテローム性動脈硬化病巣への集積 (SPECT/CT)

以上、当該研究では生体において老廃物の除去に関わる SR 機能の破綻と疾患形成との関係につき、SR に認識される放射性分子プローブ $^{123/125}\text{I-oxLDL}$ を用いることで有益な知見を得た。oxLDL が悪性腫瘍やアテローム性動脈硬化プラークといった病巣に CD36 を介して取り込まれることを示した研究成果は、CD36 を始めとする SR が種々の関連疾患（転移性腫瘍や生活習慣病等）の予防や診断、治療に対して有用な情報を与えるものである。また、正常個体においても広く BAT や骨格筋に取り込まれたことを示した結果は、骨格筋が体重の 30~40%の重量を占めることから、老廃物の除去という観点において「運動が健康の増進に繋がる」点で科学的な根拠を導き、老年症候群（サルコペニア）の予防に向けて新たな知見を提供しうると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hosomi Kento, Kawashima Hidekazu, Nakano Atsushi, Kakino Akemi, Okamatsu-Ogura Yuko, Yamashita Yuki, Sasaoka Mai, Masuda Daisaku, Yamashita Shizuya, Chen Chu-Huang, Yuzuriha Shunsuke, Hosoda Hiroshi, Iida Hidehiro, Sawamura Tatsuya	4. 巻 119
2. 論文標題 NanoSPECT imaging reveals the uptake of 123I-labelled oxidized low-density lipoprotein in the brown adipose tissue of mice via CD36	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 1008 ~ 1020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvac167	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 河嶋秀和、細見謙登、中野厚史、垣野明美、細田洋司、飯田秀博、沢村達也
2. 発表標題 CD36を介した酸化LDLのマウス褐色脂肪組織への取込み
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 奥野結衣、河嶋秀和、井澤満、中谷純菜、武田麻友子、石原慶一、秋葉聡、高田和幸
2. 発表標題 マウスにおける放射性ヨウ素標識酸化LDLを用いた動脈硬化巣の検出
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 細見謙登、河嶋秀和、中野厚史、垣野明美、岡松優子、山下裕騎、笹岡真衣、増田大作、山下静也、細田洋司、飯田秀博、沢村達也
2. 発表標題 nanoSPECTによる褐色脂肪組織へのCD36を介した酸化LDL集積機構の発見
3. 学会等名 第55回 日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細見謙登、河嶋秀和、中野厚史、岡松優子、垣野明美、杠俊介、飯田秀博、沢村達也
2. 発表標題 褐色脂肪組織における新規酸化LDL代謝機構の解明
3. 学会等名 第86回生化学会中部支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawashima Hidekazu
2. 発表標題 In vivo imaging of metabolic tissue using oxidized LDL
3. 学会等名 Joint symposium supported by Japan Society for the Promotion of Science and Academy of Finland (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井澤満、河嶋秀和、奥野結衣、中谷純菜、石原慶一、秋葉聡、高田和幸
2. 発表標題 酸化LDL標識体を用いた動脈硬化モデルマウスにおける泡沫化マクロファージを標的とした動脈硬化巣バイオイメージングの検討
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手医療科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井澤満、河嶋秀和、奥野結衣、中谷純菜、石原慶一、秋葉聡、高田和幸
2. 発表標題 動脈硬化モデルマウスにおける泡沫化マクロファージを標的とした放射性ヨウ素標識酸化LDLを用いた生体イメージングの解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細見謙登、河嶋秀和、中野厚史、垣野明美、岡松優子、細田洋司、飯田秀博、沢村達也
2. 発表標題 褐色脂肪組織へのCD36を介した酸化LDL集積機構の発見
3. 学会等名 第32回日本循環薬理学会
4. 発表年 2023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

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