

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月20日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790741

研究課題名（和文）分子イメージングを利用した冠動脈硬化性病変の非侵襲的診断法の開発

研究課題名（英文）

研究代表者

高濱 博幸（TAKAHAMA HIROYUKI）

独立行政法人国立循環器病研究センター・心臓血管内科・医師

研究者番号：10570301

研究成果の概要（和文）：

経緯：当初の研究計画に基づきイヌ虚血・再灌流モデルにて心筋虚血/再灌流後における再灌流時の血管内皮に物理的障害や局所炎症による受動的機転によるバブルリポソームの集積、エコーでの虚血部位同定を期待して実験を行ったが、このような受動的な機転ではバブルリポソームの集積は認められないばかりか、心筋とバブルリポソームのコントラストも不鮮明であった。ただこの実験において心内腔とバブルリポソームのコントラストは良好でありこのような内腔の構造物質のイメージングにはバブルリポソームは有効に働く可能性が示唆された。そのため以下のような検討を追加して行った。

免疫修飾型バブルリポソームを用いた新しいエコー左心耳内血栓診断方法の開発

背景：左房左心耳血栓の存在は脳梗塞の発症リスクに関与することが広く知られているが、左心耳血栓は不定形であり従来の経胸壁心エコーでは診断自体が困難であった。リポソームは様々な物質の内封が可能なナノ粒子であり、また表面修飾を行うことで臓器特異的な集積が可能となる。バブルを封入することでエコーによる可視化が可能となるが、このバブルのリポソームへの封入も可能である。RGD ペプチドは特定の細胞や血栓上に存在する細胞接着因子（インテグリン  $\alpha_v\beta_3$ ）に特異的に結合する機能を持つ。今回、我々はリポソーム表面をこの RGD ペプチドを修飾させたバブルリポソームを用いて血栓の可視化が可能であるか？について検討を行った。

方法：RGD ペプチドは reversephase evaporation vesicle (REV)方法を用いて精製した。麻酔開胸犬を用いて左心耳の結紮を2時間にわたって行った（n=4）。

結果：生理食塩水投与によっても血栓の存在は不明瞭であったが、RGD ペプチド修飾バブルリポソームを静脈投与後、鮮明にエコー輝度の高い血栓の存在を確認し得た。また組織学的に血栓であることを確認した。

結論：RGD ペプチド修飾バブルリポソームと心エコーの併用によりイヌモデルにおいて左心耳内血栓は明瞭に観察可能であった。エコーと免疫修飾型バブルリポソームは組織学的な診断情報として有用な情報をもたらす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Molecular imaging using bubble immune-liposomes and echocardiography to detect thrombus in left atrial appendage in canine hearts.

**Background:** Although the presence of thrombus in left atrial appendage was widely known to increase the risk of cerebral infarction in patients with atrial fibrillation, but its morphology was amorphous and has been difficult for the detection and histological evaluation using the conventional echocardiography in the clinical settings. Liposomes are

nanoparticles that can deliver various agents to target tissues such as bubble and could be coated with antibody or peptide binding to the target molecule. We investigated whether immune-bubble liposomes could detect the thrombus in left atrial appendage in dogs.

**Methods and Results:** Bubble liposomes coated with RGD peptide (Arg-Gly-Asp) were prepared by reversephase evaporation vesicle (REV) and sonication methods. RGD peptide has an affinity to integrin ( $\alpha_v\beta_3$ ) which was abundant in the thrombus. We ligated the left atrial appendage of anesthetic dogs for 120 minutes (n=4). After the identification of thrombus evaluated by echocardiography, firstly we intravenously administered saline under the observation of echocardiography as control study (Figure A). After 10 minutes of the infusion of saline, we intravenously administered immune-bubble liposomes into the dogs. Thrombus in left auricular appendage was clearly identified using echocardiography (Figure B.) Left atrial appendage samples were obtained at the end of the experimental protocol (Figure C.) and its histological analysis revealed to be a thrombus.

**Conclusion:** By adding immune-bubble liposomes, thrombus in left atrial appendage can be clearly recognized. Echocardiography using immune-bubble liposomes provide the diagnostic information of the thrombus in left atrial appendage in dogs. Bubble liposomes targeting to the molecule could be a novel echocardiographic modality.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：循環器・分子イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

急性心筋梗塞に対する経皮的冠動脈形成術は標準的治療となっているが、一方心筋虚血/再灌流後、再灌流時に血管内皮に物理的障害や局所炎症が生じることが知られている。近年、我々は虚血再灌流後にナノ粒子（リポソーム）が受動的な機転により虚血再灌流心筋に集積し、かつこのリポソームに心保護作用をもつことでしられるアデノシンを配合させることにより全身への血行動態への影響を抑制する一方、強い心保護効果をもたらすことをみいだした (*J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 709-17)。

ここで虚血再灌流後の冠動脈内皮には虚血・再灌流後早期に接着分子が発現すること

が知られている。このような接着分子発現に対して結合する抗体や糖鎖等を用い、またリポソームにバブルを含有させることでエコーによる可視化をおこなうことで虚血再灌流領域の接着分子発現領域を可視化できれば、診断に応用が可能なことが予想された。まず虚血再灌流刺激のみで表面修飾を行っていないバブルリポソームが受動的な機転のみで障害心筋に蓄積しエコーでの描出が可能であるか？について検討することとした。

### 2. 研究の目的

虚血・再灌流後の心筋部位をエコーと免疫修飾型バブルリポソームを用いて同定評価を

行うことが可能であるか、検討を行うこと。

### 3. 研究の方法

帝京大学・薬学部との共同研究を行いバブルリポソームの作成を行った。

ビーグル犬を全身麻酔下開胸、左前下行枝—頸動脈のバイパスモデルを作成。バブルリポソームの投与を行ったがこのような受動的な機転ではバブルリポソームの集積は認められないばかりか、心筋とバブルリポソームのコントラストも不鮮明であった。

ただこの実験において心内腔とバブルリポソームのコントラストは良好でありこのような内腔の構造物質のイメージングにはバブルリポソームは有効に働く可能性が示唆された。

そこで血栓の組織学的な特性に基づく描出が可能であるか？についての検討を行うこととなった。心内血栓は脳梗塞、心筋梗塞の原因となり特に心房細動患者の左心耳内に生じる血栓は脳梗塞のリスクを上げることがよく知られている一方、一般的な経胸壁エコーでは描出が困難なことはよく知られている。

血栓には細胞接着因子（インテグリン $\alpha_v\beta_3$ ）が豊富に含まれることが知られている。またRGD ペプチドは血栓上の細胞接着因子（インテグリン $\alpha_v\beta_3$ ）に特異的に結合する機能を有している。このRGD ペプチドを用いて血栓の組織診断が可能か？について検討を行った。

次に帝京大学薬学部との共同研究でリポソーム表面にRGD ペプチド（Arg-Gly-Asp）修飾を行った表面修飾型バブルリポソームを作成した。

さらに我々は麻酔開胸ビーグル犬で左心耳結紮モデルを作成し実験的な血栓の作成が可能であるかの検討を行った。

### 4. 研究成果

2時間の左心耳結紮後、左心耳内血栓をエコーにて確認した。（n=4）次に生理食塩水を投与しても血栓像の変化は認められなかった（図A）。次にRGD ペプチド修飾バブルリポソームを投与すると、左心耳内にエコー輝度の高い浮遊性物質を確認した（図B）。実験後に左心耳を取り出し肉眼的に血栓を確認した（図C）。病理組織学的にも血栓であることを確認し得た。

この結果に基づき再現性確認実験、コントロールバブルリポソームの投与実験を今後行う予定である。

### 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0件）

〔学会発表〕（計1件）

2012年アメリカ心臓病学会の学術集会上記演題を投稿中である。

**Molecular imaging using bubble immune-liposomes and echocardiography to detect thrombus in left atrial appendage in canine hearts.**

Takahama H et al.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高濱 博幸 (TAKAHAMA HIROYUKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・心臓血管内科・医師

研究者番号：10570301

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：