

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23791452

研究課題名(和文) RI 標識抗 HIF - 1 抗体を用いたラット急性心筋梗塞のイメージングに関する研究

研究課題名(英文) Myocardial imaging of radiolabeled anti HIF-1 antibody in infarct rat

研究代表者

福島 賢慈 (Fukushima, Kenji)

東京女子医科大学・医学部・准講師

研究者番号：50408613

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)：RI 標識抗 HIF-1 抗体の心筋梗塞モデルラットにおけるイメージングに関する研究を行った。初年度から次年度での急性心筋梗塞モデル作成によるイメージングでは明瞭に描出できたが、慢性期モデルでは描出が困難であった。HIF-1 は虚血性障害により代謝が遅延されイメージングに有効と考えられたが、虚血障害が慢性化した状態では発現が低下している可能性が示唆された。また梗塞モデル作成時にラット心の冠動脈を完全結紮するモデルと結紮後に開放し梗塞後再灌流モデルを作成しイメージングを試みたところ、完全結紮モデルではイメージングによる描出が困難であった。

研究成果の概要(英文)：The feasibility of myocardial imaging of radiolabeled anti HIF-1 antibody was evaluated. In acute infarction model, significant uptake signal from infarct myocardium was observed, but in chronic myocardial infarction model, myocardial imaging was not detectable. Anti HIF-1 imaging was thought to be feasible in acute phase, but not in chronic phase. We also performed comparison study for total occlusion and re-perfusion model. There was significant myocardial signal uptake in re-perfusion model, but not in total occlusion model.

研究分野：イメージング

キーワード：心臓核医学 心筋梗塞 小動物

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患の画像診断は、現在日常臨床ではさかんに用いられている。多くのモダリティが心筋梗塞を含む虚血性心疾患を画像化出来るのに対して、急性冠症候群と呼ばれる急性心筋梗塞発症時や発症寸前での不安定狭心症などにおいては有効な画像診断は存在せず、救急診療においては症状や心電図、血液学的マーカーが唯一の診断ツールである。しかしこれらの血液学的マーカーは心臓に特異的なものでなく、また腎障害などで血中濃度が上昇しやすく偽陽性となる事が多い。更にはそれらのマーカーより急性冠症候群の診断となり侵襲的な冠動脈造影を行っても、多枝病変や既に血栓溶解療法により再開通した症例では責任血管の同定が困難な場合がある。

しかし診断ツールとして用いられている血清マーカーをイメージング製剤として開発すれば、心臓をターゲットにした画像診断となるのでマーカーの心筋非特異性や腎機能低下による血中濃度上昇などに関係なく、画像診断として急性虚血を診断できるため、これらの問題を解決できると考えられる。

2. 研究の目的

低酸素誘導因子 (Hypoxia-induced factor-1= HIF-1) は細胞へ供給される酸素分圧の低下に反応して誘導されるタンパクである。HIF-1 は血管内皮細胞、糖代謝、アポトーシスの制御に関わっていると推測される。HIF-1 は心筋細胞にも発現しており虚血あるいは心不全モデル等での上昇が報告されている。虚血による低酸素状態となった細胞では本来は数分以内に分解されるはずの HIF-1 がプロテアソームによる分解が急激に抑制されるため心筋に多く停留

する事になる。心筋虚血の血清マーカーにはクレアチンキナーゼ MB や心筋トロポニン T、あるいは心筋脂肪酸結合蛋白などが挙げられるが、どれも検出可能になるには数時間を要し、急性心筋梗塞超急性期や不安定狭心症に代表される急性冠動脈症候群では早期検出に有用なマーカーとは言えない。片や HIF-1 は超急性期から発現するが、ほぼ全身の組織に存在しているため心筋の特異的血清マーカーとしての有用性は低いと予想される。しかしながらイメージング製剤として心臓が描出されれば臨床的有用性がある。本研究の目的は抗 HIF-1 抗体をアイソトープ標識し静脈内注射で心筋の HIF-1 の分布を画像化することで急性心筋虚血下において極めて早い段階で障害心筋を検出できる可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 抗 HIF-1 抗体に I-125 標識を行い標識抗体の作成を行う。ヨードジェン法を用いて、リン酸緩衝液下で抗 HIF-1 抗体 (Abcam 社製) 400 μ g に I-125 (Perkin Elmer 社製) 0.01mCi/ μ l を混合し標識させる (室温 30 分)。バイオゲルを用いたカラムで、フラクションコレクター (Shimazu 社製) を用いて抽出を行う。コレクターでは 10 滴毎にチューブを移動させ、全てのチューブの放射カウントを測定しカウントがピークとなる前後 3 チューブを標識抗体含有溶液とした。標識された抗体は thin-layer chromatography 法を用いて標識率を評価した。標識率が 85% に満たない標識抗体は破棄した。

(2) 雄 Wistar-Rat (6-8 週齢) を用いてラットの心筋梗塞モデルを作成した。3% イソフルラン吸入麻酔を用いて深麻酔の下にライトで口腔内から声門を確認

し、18ゲージのサーフロー外筒で気管内挿管を行った。気管内挿管が困難な場合は深麻酔のままで咽頭部を切開、気管枝輪状軟骨を露出させ18ゲージのサーフロー留置針の外筒を挿入し人工呼吸器（Shimazu社製）での呼吸管理を行った。深麻酔の持続および呼吸の安定を確認した上で胸部を剃毛し、第5肋間を切開し側開胸を行い、心臓を露出させた。胸腺と左心耳の間に位置する左冠動脈をライトを当てて確認し6-0のナイロン糸を用いて結紮、20-30分後に結紮を解除する虚血再灌流モデル、また結紮のままに閉胸しイメージングを行う完全閉塞モデルを作成した。前壁の色調変化および壁運動低下を目視し心筋梗塞完成を確認した。

術直後の場合は深麻酔を継続したまま、尾静脈に24Gのサーフロー留置針で穿刺し外筒を留置した。I-125標識抗HIF-1抗体（1MBq）を投与し30分待って深麻酔下のまま正中開胸により即座に心臓を摘出した。慢性期モデルでは一旦閉胸し麻酔から覚醒させケージで保育し、術後4週間の段階で再び深麻酔下で同様のプロトコルを行った。

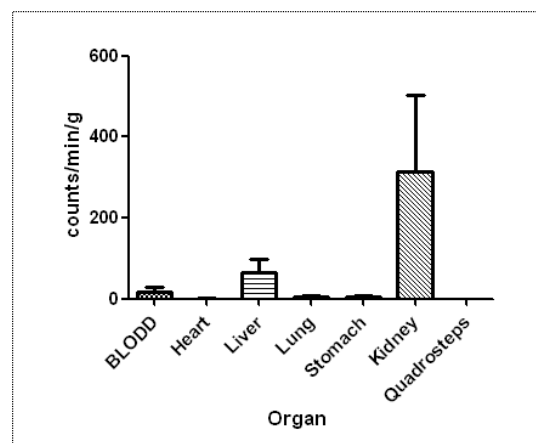
心臓を摘出した後、埋没材で心臓の右室左室の内腔を満たし心外膜側を完全に包み込み、EMフリーザスプレー（日新EM社製）で即座にマイナス80度まで冷却した。その後にクライオスタット（ライカ社製）の内部に留置し10分待機させ、完全に冷却されたのを確認して10 μ m厚にスライスを開始した。左心室の中部レベルで心室の凍結標本切片を最低5枚のスライドグラスに移し替え切片スライドを作成した。作成したスライドを常温のエアドライヤーで乾燥させ、 μ イメージャ（フランスバイオスペース社製）を用いてオートラジオグラフィ画像を撮像した。撮像条件はスライド1枚あたり73

時間で撮像し、ターンテーブルに3スライド設置してラット1匹につき3スライド作成した。イメージャで撮像された画像は、解析ソフトのAMIDEで集積所見を評価した。陽性集積であった場合は虚血部位である左前下行枝領域の集積と同一個体の健常部と考えられる後側壁の集積とを対比し放射カウンターの数値から虚血部の集積比（虚血心筋の放射カウント/健常心筋の放射カウント）を算出した。

4. 研究成果

(1) 標識されたI-125抗HIF-1抗体イメージング製剤の純度はthin-layer chromatography法を用いて標識率を評価し、90%以上の標識率であった。

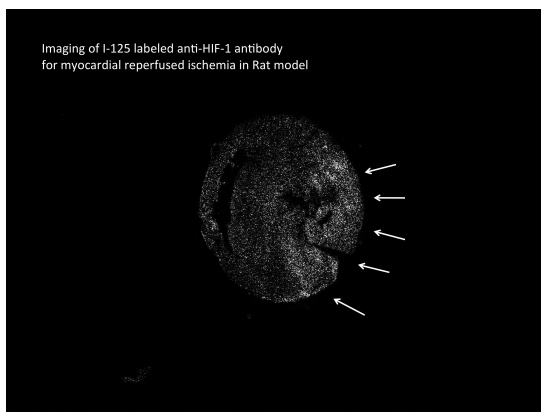
(2) I-125標識抗HIF-1 antibodyの健常ラットでの生体内分布を以下に示す。下記のグラフに示す通り健常心筋ではその集積は極めて低いと考えられ、健常であれば集積陰性となる事が推察され、実臨床への応用において偽陽性を少なく出来る可能性が示唆された。



(3) ラット心筋梗塞虚血再灌流急性期モデルでイメージングを行ったところ以下の写真に示す通り、オートラジオグラ

フィでは虚血再灌流部に I-125 標識抗 HIF-1 抗体の有意な集積が見られた。全例集積陽性と判断され、虚血再灌流部と対側の健常部との集積比は、虚血心筋 / 健常心筋 = 2.4 ± 1.6 であった。しかし完全結紮モデルでは有意な集積が見られず、ほぼトレーサ集積は欠損の状態であった。また梗塞モデル作成後 4 週間以降の慢性期モデルでもイメージングを行ったが、オートラジオグラフィでは完全結紮モデルでも虚血再灌流モデルでも有意な集積は得られず、健常心筋に対する集積比はほぼ 1 であった。

また、標識抗体のターゲットへの特異性を確認するため、急性心筋梗塞再灌流モデルのラット 3 匹に I-125 で標識されていない抗 HIF-1 抗体を大量 (2000 μ g) を投与し 10 分後に尾静脈から I-125 標識抗 HIF-1 抗体 (1MBq) を投与した。心臓を摘出し通常の実験プロトコールと同様にオートラジオによるイメージングを行ったところ、心筋への集積は見られず、これらの事象より抗 HIF-1 抗体は急性虚血時に心筋に発現した HIF-1 に特異的に結合している可能性が考えられた。



〔考察〕 hypoxia induced factor は健常状態では速やかに代謝され、組織内に残ることは非常に考えにくいですが、虚血による低酸素状態下で分解が抑制され、細胞内あるいは間質での停留が顕著となる

と考えられている。急性虚血モデルでは画像化が可能であったことから、急性心筋梗塞などの急性虚血では分解が抑制された HIF-1 が大量に心筋内に停留しており抗体イメージングを容易にしたと考えられる。しかしながら完全結紮モデルでは急性期でも画像化が見られなかった。この理由としては結紮による結構が遮断された状態では、標識抗体がターゲットとなる HIF-1 が貯留している虚血心筋巢への標識抗体のデリバリーが不十分となっている可能性が考えられる。実際の臨床では完全閉塞を起こすケースでは心原性ショックとなり臨床所見として急性虚血の診断が容易であり、臨床診断にイメージングによる画像診断はあまり寄与できない可能性がある。一方心筋梗塞に至っても再灌流したり側副血行路からの血流が少なからず確保されていれば標識抗体が病変部まで血流によるデリバリーされる可能性が高くイメージングにより臨床診断に貢献できる可能性がある。

梗塞後慢性期でのイメージングでも画像化が困難であったが、その理由として HIF-1 の発現そのものが急性虚血の時期と比べて低活性となっており、そのためにイメージングに十分な放射カウントが得られなかった事が考えられる。つまり急性虚血の浮腫性変化を伴い細胞外液に漏出した HIF-1 が分解されない間はイメージングが可能であるが、時間が経過して分解が進んでしまえばイメージングが困難となると推察される。これらより急性心筋梗塞などの急性冠症候群では診断に有用な画像診断法となることが考えられ、また陳旧性心筋梗塞では逆に陽性所見とならないため、実臨床で応用された場合には陳旧性心筋梗塞の既往がある症例で急性心筋梗塞を発症した場合はもはや心電図や既存の画像診断などでの

評価には限界があり、急性か陳旧性かを判別する画像化が可能となると推察される。また実臨床に応用した場合はラット体内分布の解析からは肝臓への集積がある程度高く vivo での撮像を行った場合には心臓の下後壁で隣接臓器である肝臓の集積が影響し診断が難渋することが予想される。しかしこれらは近年の技術革新による画像再構成や CT を併用した吸収補正や位置情報の提供などが進歩しており克服可能と推察される。また in vivo でのイメージングの可能性の検討が残されており、引き続き In-111 などのガンマ線トレーサを用いた SPECT カメラでの画像化を検討する予定である。更には同様のモデルで TL-201、I-123 BMIPP など既存の血流製剤や脂肪酸製剤を用いてイメージングを行い、既に臨床で用いられているイメージング手法との対比をはかる。また ex-vivo での検討として TTC 及び H-E 染色、また抗 HIF-1 抗体、CD31、Tunel などの免疫染色を行い虚血下での線維化やアポトーシス、血管新生などとの関連を検討する。

5 . 主な発表論文等
日本循環器学会へ発表予定

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

福島 賢慈 (Fukushima, Kenji)
東京女子医科大学・医学部・准講師
研究者番号 : 50408613