

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24601021

研究課題名(和文)酸化LDL及びその受容体LOX-1の全身動態の非侵襲分子イメージング

研究課題名(英文)Whole body imaging of 123I-oxLDL distribution in mouse with high resolution SPECT system

研究代表者

中野 厚史(Nakano, Atsushi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：90217787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年血中の微量酸化LDL量が計測できるようになり、循環器疾患との関連が改めて指摘されている。我々は高解像度SPECTを用いてマウスの全身の酸化LDLの分布のイメージングを行った。その結果、従来から知られていた肝臓以外に、心臓、肺、褐色脂肪等にも集積することが本研究で明らかになった。特に褐色脂肪への集積密度は肝臓に匹敵していた。血中からの酸化LDL等老廃物除去には肝臓以外のこうした組織も大きく寄与していると考えられ、疾患状態ではその機能が破綻していると推定された。

研究成果の概要(英文)：The oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) is involved in vascular endothelial dysfunction, injury and inflammation, and plays a key role in atherogenesis and also related to various cardiovascular diseases. The clearance of oxLDL were studied in middle of 1970's using RAT, monkey and human. These studies suggested the applied oxLDL rapidly accumulated to liver and cleared from blood in several minutes. However, the CVD (such as stroke, heart diseases) were strongly related to the micro dose oxLDL in blood. We think, the clearance mechanism may be were breakdown in CVD. We investigated the oxLDL metabolism/distribution of mouse whole body imaging with high resolution SPECT system and found that not only the liver but also many organs including brown fat were involved in oxLDL metabolism.

研究分野：生理学、画像処理、薬理学、流体力学

キーワード：小動物イメージング 酸化LDL 動脈硬化 RI標識法 褐色脂肪組織 SPECT

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化をはじめとする循環器疾患は、罹患率が高く潜在的に致命的な疾患であり治療費も高額かつ長期にわたる。数々の大規模な疫学研究の結果から、血中の低比重リポタンパク質濃度 (LDL:いわゆる悪玉コレステロール) が引き起こす、粥状動脈硬化を原因とした血管内皮の損傷などを基盤とする循環器疾患の主要な危険因子であることが広く認知されるようになった。しかし、LDLそのものは血管の柔軟性を保つのに必須の要因であり、また動脈硬化病変部位にはLDLそのものではなく変性したLDLが沈着していることが観察されている。そのため、LDLそのものが動脈硬化発症の原因ではなく、修飾を受けた変性LDLが重要であることが明らかとなってきた。そして現在では、Steinbergらが提起した、LDLの酸化変性を引き金とする粥状動脈硬化の発症機序が広く受け入れられている (Steinberg, D., et al., *N Engl J Med*, 1989. 320(14): p. 915-24)。さらに近年、酸化LDLは、循環器疾患のみならず、糖尿病や妊娠中毒症、変形性関節症の進行などとも密接な関係があることが報告されている。

こうした、生体内でのLDLの酸化変性を抑制し循環器疾患を予防する目的で、抗酸化剤やビタミン剤を投与する研究が数々なされてきた。しかしながら、様々な切り口での臨床研究が行われ、その結果抗酸化剤は動脈硬化による心臓病に効き目がないと結論づけられている (Myung, S.K., et al., *BMJ*, 2013. 346: p. f10.)。

一方、酸化LDLの体内での分布や動態については、1990年代後半、RI標識した酸化LDLにより、臓器分布や血中濃度の評価がヒト (Iuliano, L., et al., 1996. 126(1): p. 131-41) やマウス (Ling, W., et al., *J Clin Invest*, 1997. 100(2): p. 244-52.) がなされ、酸化LDLは血中で産生または血中へ放出されてもすぐに肝臓に取り込まれて代謝されるため、血中に存在しないと考えられてきた。しかし、2000年代に入り血漿中の微量酸化LDL測定法が開発され、「動脈硬化巣中に不安定プラークを持つ患者は血中酸化LDL値が高いこと」 (Itabe, H., *Biol Pharm Bull*, 2003. 26(1): p. 1-9.) 「メタボリックシンドローム発症と血中酸化LDL高値が高い相関を示すこと」 (Holvoet, P., et al., *Jama*, 2008. 299(19): p. 2287-93.)。さらには、「急性心筋梗塞症群の急性期では高脂血症の有無に関わらず、有意に高値であること」 (Ehara, S., et al., *Circulation*, 2001. 103(15): p. 1955-60.) や「循環器病疾患なかでも脳卒中発症との高い相関がある」 (Inoue, N., et al., *Clin Chem*, 2010. 56(4): p. 550-8.) が報告されるに至り、

血中の微量の酸化LDLの体内代謝動態や活性自体が循環器疾患の進行を左右しており、その量が病態進行を評価していく上で重要であると考えられるようになってきている。

酸化LDLの肝臓による速い代謝は、酸化LDLを異物として認識し、すぐに代謝する強力な恒常性維持の機構があることを示しているに他ならない。それにも関わらず、病態において血中に酸化LDLが存在している事実は、こうした恒常性維持機構に何らかの異常が発生しているものと考えられる。

酸化LDLを認識する受容体としてスカベンジャー受容体があり、マクロファージの泡沫化に關与するSR-AやCD36、内皮に発現し、機能異常を引き起こすLOX-1などが知られている。

研究代表者は、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHR-SP) への高脂肪食で形成される腸間膜動脈への脂質沈着が、内因性の酸化LDLによるものであり、その機序として高脂血症・高血圧が血管内皮のLOX-1への刺激し、透過性亢進などの血管機能異常を引き起こし病態を進行させることを示した

(Nakano, A., et al., *Journal of Hypertension*, 2010. 28(6): p. 1273-80.)。

一方、近年小動物をターゲットとしたイメージング装置が開発され、薬物の体内動態の評価等に用いられるようになってきた。本研究では、RI標識した酸化LDLとこうした小動物イメージング技術を用いて、酸化LDLの体内動態や分布、代謝について改めて観察、解析をおこない、何故病態下で酸化LDL代謝に破綻が生じているかについての知見を得ようとするものである。

2. 研究の目的

小動物用イメージング装置を用いてマウス全身でのRI標識した酸化LDLの体内動態の評価及び、生体内での酸化LDL受容体との関係の分子レベルの機序の基礎研究とすること。

3. 研究の方法

(1) [^{123}I]酸化LDLの標識法の確立

酸化LDLのRI標識については、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ や ^{125}I を用いた標識法の報告があるが、本研究ではマウスでのSPECTイメージングを目的としているため、SPECT核種である ^{123}I を用いた酸化LDL標識を確立した。標識物の必要条件として、マウスでのSPECTイメージングを行うにあたり、酸化LDLのタンパク量 (少ないほど良い)、イメージングに必要な放射線量 (20-30MBq)、注射の液量 (50ul以下) とする。アガロースゲルによる電気泳動、Tbars測定、LOX-1発現細胞への取込のDose Responseや非標識の酸化

LDL との競合阻害実験を行い、RI 標識に伴う酸化 LDL の性状に変化が発生しない。この 2 つの条件を、直接法である、ICL 法、Chloramine-T 法や、SIPP を用いた間接法で酸化 LDL を標識し評価を行った。

(2) ワイルドタイプマウスの全身動態評価

臨床用 SPECT 装置 (東芝 7200A) にパラレルコリメータを取り付け、新たに設計したマウス保定用ベッドに 12 週令のワイルドタイプマウス(WT マウス)を保定し、コリメータ上に設置して、マウス尾静脈より $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL (約 30MBq/10ug @ 50ul)を尾静脈より投与し、投与 10 分までの動態を観察し、酸化 LDL の体内での動態をダイナミックプレーン画像で得る。画像データより各臓器での Time Activity Curve データ(TAC)の解析を行う。また、こうして得られた TAC データは、投与量、標識率、個体差、投与手技などのデータのバラつきを発生させる原因があるため、これを正規化する統計解析法を開発する。

(3) 動脈プラークへの酸化 LDL 集積の観察

ApoE KO マウスに尾静脈より $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL を投与した ApoE KO マウスを 10 分後に安楽死させ、大動脈を摘出し autoradiography 法を用いて、動脈硬化プラークへの酸化 LDL の集積ができるのか、動脈硬化好発部位とされる分岐部などに酸化 LDL の集積が高いかを観察する。

(4) 超高解像度小動物用 SPECT を用いた全身分布

動態評価に用いた臨床用 SPECT では 3D SPECT 像を構成した場合に、再構築された全身分布像の解像度や約 8mm となり、肝臓以外のマウス内部の臓器形状の描出は困難であった。そこで、新たに導入された超高解像度小動物用 SPECT (nanoSPECT)を用いてマウスの $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL 全身分布の撮影方法の開発及び評価法の開発を行った。また、データの定量性を担保するために撮影した個体を解剖し、集積が確認された組織を well counter を用いて計測した。

(5) 酸化 LDL 代謝における酸化 LDL 受容体 LOX-1 の影響について

酸化 LDL 受容体 LOX-1 KO マウスでの酸化 LDL の全身分布の評価を行う。そのときに LOX-1 KO により全身分布に差異があるようであれば LOX-1 抗体を標識し、LOX-1 受容体の全身分布のイメージングを行う。

4. 研究成果

(1) $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL の標識法の確立

前述の 3 法を用いて $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL し性状変化を調べたが、3 法共に生化学的性質や細胞を用いた検証において非標識の酸化 LDL の性状の変化は認められなかった。標識体の比放射能が、3 法のうち最も高い比放射能

が比較的安定して得られた Chloramine-T 法を用い、従来比 5 倍の比放射能である 3-5MBq/ug の $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL を作成し、動物実験に使用した。

(2) ワイルドタイプマウスの全身動態評価

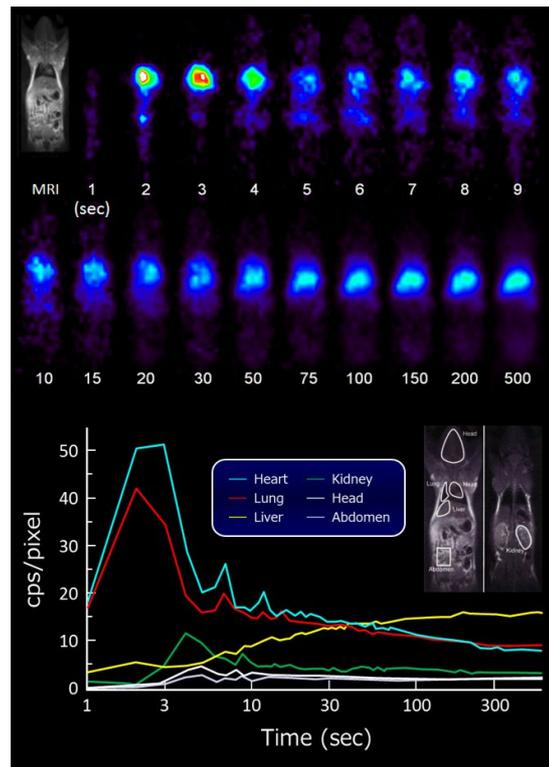


図 1 WT マウスでの $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL の動態

図 1 に全身動態の例を示す、尾静脈より投与された酸化 LDL は約 90 秒でほぼ肝臓に集積することが明らかになった。また 10 分後に安楽死させ血中の酸化 LDL の残存量を HPLC を用いて評価をおこなったが、酸化 LDL 分画は殆どないことが確認された。

(3) 動脈プラークへの酸化 LDL 集積の観察

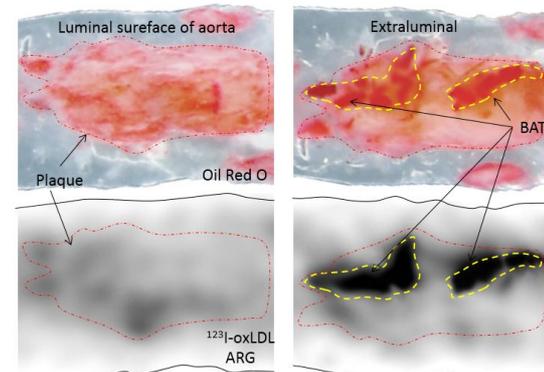


図 2 ApoE KO マウスの動脈硬化プラークへの $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL の集積

図 2 に ApoE $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL を尾静脈注射後 10 分で安楽死させ、大動脈を摘出し EnFace 標本としてプラーク部分の像を示す。上段が Oil Red O により脂質を染めたもの、下段が ARG 法によりプラーク部位での $[^{123}\text{I}]$

酸化 LDL の集積をみたものである。図左 2 枚が血管内側からプラーク部位を観察したもの、右 2 枚は血管外側より観察したものである。以外なことに血管の内外で ARG 像に差異があることが判った。これを詳細に観察したところ大動脈周囲にある褐色脂肪細胞が採取した部位に残存しておりその影響であることが判明した。

(4) 超高解像度小動物用 SPECT を用いた全身分布

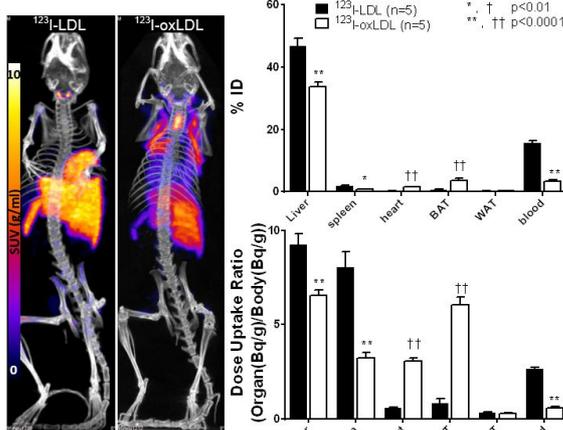


図3 WTマウスの $[^{123}\text{I}]$ LDLと $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDLの全身分布 nanoSPECT 像

図3にWTマウスに $[^{123}\text{I}]$ LDL投与時と、 $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL 投与時の全身分布を nanoSPECT で撮影した画像を示す。この画像より酸化 LDL のみが肩甲骨周辺に特異的な形状で集積が認められた。この組織は肩甲骨後部、下部および、頸部深部に存在する褐色脂肪である。カウンタで定量解析した結果、褐色脂肪への集積密度(Dose Uptake Ratio)は、肝臓並みの集積密度を示すことが明らかになった。また、褐色脂肪を活性化させる寒冷刺激等によりその部位への取込は亢進することも確認された。心臓や脾臓といった臓器でも代謝に寄与していることも明らかになった。

(5) 酸化 LDL 代謝における酸化 LDL 受容体 LOX-1 の影響について

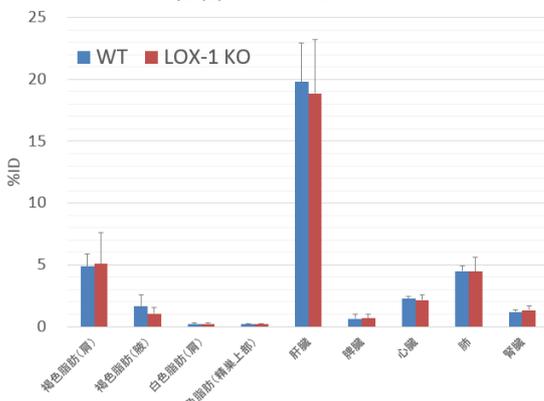


図4 WTマウスとLOX-1 KOマウスの $[^{123}\text{I}]$ 酸化 LDL 全身臓器分布

図4にWTマウスとLOX-1KOマウスの酸化 LDL の臓器分布を示す。すべての臓器においてWTと酸化 LDL の集積の有意差は見られなかった。このことより、LOX-1は肝臓、心臓、脾臓、肺、褐色脂肪における酸化 LDL の集積に関しては大きな影響を持たないものと考えられた。そのため当初計画ではLOX-1 受容体の標識法の開発及び全身分布イメージングについては中止した。

本研究により、酸化 LDL の代謝には肝臓のみならず、他の臓器も関与していることが明らかになってきた。特に褐色脂肪において肝臓に匹敵する集積密度であることは特筆すべき現象である。**褐色脂肪への酸化 LDL の集積はこれまでに報告されておらず、本研究での新たに発見された現象**である。

褐色脂肪は近年FDG-PETを用いた研究によりヒト成人でもその存在が報告され、エネルギー代謝や体温調節にも寄与していることが判ってきた。さらに、その熱産生力を利用した肥満解消法として非常に注目されている。今回発見された褐色脂肪への酸化 LDL の集積は、褐色脂肪の活性化により酸化 LDL をはじめとした血中の老廃物のクリアランスが亢進する可能性を示唆している。また、循環器疾患患者で血中に微量酸化 LDL が検出される事実はこうしたクリアランス機能が破綻しているものと考えられた。

現在引き続き、今回発見された褐色脂肪における酸化 LDL 受容体や褐色脂肪の活性化により抗動脈硬化作用があるのかについての検討を行っている。

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3件)

1. Yamamoto K, Kakino A, Takeshita H, Hayashi N, Li L, Nakano A, Hanasaki-Yamamoto H, Fujita Y, Imaizumi Y, Toyama-Yokoyama S, Nakama C, Kawai T, Takeda M, Hongyo K, Oguro R, Maekawa Y, Itoh N, Takami Y, Onishi M, Takeya Y, Sugimoto K, Kamide K, Nakagami H, Ohishi M, Kurtz TW, Sawamura T and Rakugi H. Oxidized LDL (oxLDL) activates the angiotensin II type 1 receptor by binding to the lectin-like oxLDL receptor. *FASEB J.*, doi: 10.1096/fj.15-271627 (2015). 査読有
2. 中野厚史, 銭谷勉, 河嶋秀和, 飯田秀博, 沢村達也:高解像度 SPECT を用いたマウス酸化 LDL 全身分布イメージング, *JSMI Report Vol.8 No.2 p.94* (2015). 査読無
3. 中野厚史, 河嶋秀和, 三宅義徳, 沢村達也, 飯田秀博: ^{123}I -oxLDL のマウス全身

動態に関する研究, バイオエンジニアリング論文集 Vol 25. pp205-206 (2013). 査読無

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Nakano A, Zeniya T, Kawashima H, Iida H, Sawamura T: Whole body imaging of ¹²³I-oxLDL distribution in mouse with high resolution SPECT system, JSMI 2015, 2015/5/21, 東京
2. 中野厚史、銭谷勉、河嶋秀和、飯田秀博、沢村達也: 高解像度 SPECT を用いたマウス酸化 LDL 全身分布イメージング, 第 10 回日本分子イメージング学会総会, 2015-/5/20-21, 東京
3. Kakino A, Yamamoto K, Nakano A, Li L, Fujita Y, Rakugi H, Sawamura T: AT1 directly interacting with LOX-1 mediates signal transduction induced by oxidized LDL, 82nd European Atherosclerosis Society Congress (EAS 2014), 2014/5/31-6/3, Madrid, SPAIN
4. Kakino A, Nakano A, Fujita Y, Sawamura T: Overexpression Of Del-1, An Oxidized LDL Blocking Protein, Suppressed Atherogenesis In Mice Without Lowering Oxidized LDL Concentration, But with Reducing LOX-1 Ligand Containing ApoB Activity (LAB), 2014 Annual Meeting & Clinical Lab Expo, 2014/7/27-31, Chicago, USA
5. 垣野明美、李 蕾、池末昌弘、中野厚史、藤田佳子、岡澤 慎、真下知士、沢村達也: LOX-1 遺伝子欠損 SHRSP の作製とその形質の予備的解析, 第 50 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2014/12/5-6, 和歌山市
6. Kakino A, Nakano A, Fujita Y, Sawamura T: Regulation Of Cellular Lipid Metabolism In Atherogenesis, The 81st Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS 2013), 2013/9/6-7, Lyon, France
7. 垣野明美、山本浩一、中野厚史、李蕾、藤田佳子、柴木宏実、沢村達也: AT1 は LOX-1 を介した酸化 LDL によるシグナル伝達と血管壁脂質沈着を促進する, 第 49 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 2013/9/6-7 東京
8. Kakino A, Nakano A, Fujita Y, Sawamura T: An endogenous blocker of oxidized LDL", 13th International Conference on Endothelin (ET-13), 2013/9/11-13, 東京
9. 垣野明美、中野厚史、藤田佳子、沢村達也: 内因性蛋白質による新しい酸化 LDL 作用阻害機構, 第 86 回日本生化学会大会, 2013/9/11-13, 横浜
10. Kakino A, Nakano A, Fujita Y, Sawamura T: Identification of Endogenous Anti-Atherogenic Protein Which Blocks the Interaction between Oxidized LDL and Its Receptors, AHA Scientific Sessions 2013, 2013/11/16-20, Dallas, USA
11. 垣野明美、中野厚史、藤田佳子、沢村達也: Del-1 は酸化 LDL - 受容体相互作用を阻害し、血管壁脂質沈着を抑制する, 第 17 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2013/11/22-23, 大阪
12. 垣野明美、中野厚史、藤田佳子、沢村達也: 酸化 LDL 阻害分子 Del-1 の過剰発現は、マウス血管壁脂質沈着を抑制する, 第 23 回日本循環薬理学会, 2013/12/6, 福岡
13. 河嶋秀和、中野厚史、銭谷 勉、垣野明美、三宅義 徳、沢村達也、飯田秀博: 放射性ヨウ素標識酸化 LDL (¹²³I-oxLDL) の開発と動脈硬化病変への集積に関する基礎的検討, 日本分子イメージング学会 第 8 回学会総会・学術集会, 2013/5/30-31, 横浜
14. 中野厚史、河嶋秀和、三宅義徳、沢村達也、飯田秀博: ¹²³I-oxLDL のマウス全身動態に関する研究, 日本機械学会 第 25 回バイオエンジニアリング講演会, 2013/1/9-11, 筑波
15. 河嶋秀和、中野厚史、銭谷 勉、圓見純一郎、垣野明美、三宅義徳、沢村達也、飯田秀博: ヨウ素-123 標識酸化 LDL ([¹²³I]oxLDL) の体内動態に関する検討, 第 12 回放射性医薬品・画像診断薬研究会, 2012/12/15, 京都
16. Kawashima H, Nakano A, Zeniya T, Kakino A, Miyake Y, Sawamura T, Iida H: Synthesis and evaluation of iodine-123 labeled oxidized low-density lipoprotein (¹²³I-oxLDL) as a non-invasive imaging probe for vascular disease, World Molecular Imaging Congress 2012, 2012/9/5-8, London, England.
17. 河嶋秀和、中野厚史、銭谷 勉、垣野明美、三宅義徳、沢村達也、飯田秀博: アテローム性血管病変のイメージングを目的としたヨウ素-123 標識酸化 LDL の合成と基礎評価, 第 52 回日本核医学会学術総会, 2012/10/11-13, 札幌

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中野 厚史 (Atsushi Nakano)
国立研究開発法人 国立循環器病研究センター・研究所・上級研究員
研究者番号 : 90217787