

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659397

研究課題名(和文) in vivo分子イメージングによる肺アミロイドーシス新規診断法の確立

研究課題名(英文) Development of in vivo imaging for pulmonary amyloidosis

研究代表者

海老原 覚 (EBIHARA, Satoru)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：90323013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺アミロイドーシスの診断には、生検により組織を採取しコンゴレッド染色でアミロイドの沈着を証明するしかない。しかし生検は侵襲が大きく、コンゴレッド染色も熟練を要して困難であり診断がつかない場合が多い。近年、アルツハイマー病患者に対して非侵襲的にPETなどで脳内のアミロイドの沈着を撮影する技術が開発され、臨床応用されている。そこでこの技術が肺アミロイドーシスにも使えないかと考え研究を行った。研究は実際の患者に投与する計画と動物モデルを作成し投与する計画の二本立てで行った。動物モデルの作製は成功し、これにアミロイド蛍光プローブTHK-265を投与し、肺に沈着したアミロイドを撮影することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary amyloidosis is a disease characterized by extracellular deposition of protein in an abnormal fibrillar form in the lung. The identification of amyloid requires biopsy procedures and Congo red staining that produces green birefringence under polarized light. However, the biopsy procedures have risk such as bleeding. Moreover, Congo red staining of amyloid is not a very sensitive test and requires adequate observer experience. Recently, amyloid imaging for Alzheimer disease has been developed using fluorescent probes. These probes might be useful for amyloid imaging for lung amyloidosis. Therefore, the ultimate aim of this study was to establish the method for amyloid imaging for the lung amyloidosis. To achieve this model purpose, we developed a mouse model for pulmonary amyloidosis. Using this model and THK-265, we detected amyloid deposition in the lung. The results suggest that it is feasible to perform amyloid imaging for pulmonary amyloidosis patients.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：肺アミロイドーシス in vivoイメージング PETプローブ 近赤外線

1. 研究開始当初の背景

(1) アミロイドーシスはシート構造を有する特異な線維状蛋白アミロイドが、全身諸臓器の細胞外に沈着することによって機能障害を引き起こす一連の疾患群である。アミロイド沈着病変はコンゴレッド色素により選択的に染色され、これを偏光顕微鏡下で観察すると黄緑色の偏光を呈する領域として同定される。こうしたアミロイドーシスの病理形態学的特徴は古くからよく知られていたが、「アミロイドーシスは成因が不明で、有効な治療法がない」という残念な状態が長らく続いている。アミロイドーシスの確定診断には、生検により組織を採取しコンゴレッド染色でアミロイドの沈着を証明する以外にないが、更に免疫組織学的検査・血清学的検査・遺伝子検査により、アミロイド前駆蛋白を特定し最終診断に至る。

(2) 近年、同様にアミロイドが蓄積するアルツハイマー病においてアミロイドに特異的選択的に結合するアミロイドイメージング用 PET (陽電子断層撮影装置) プローブを用いて in vivo でアミロイドを非侵襲的に画像化する診断法が開発された。分担研究者の東北大学未来医工センターの工藤教授らは、アミロイドに特異的選択的に結合する [11C]BF-227 を独自開発し、それがアミロイドに結合するだけでなくそのおもな代謝臓器がアミロイドの好蓄積臓器と重複しない特性をもつことを示し、アミロイドーシス診断用 PET プローブとしても有用であることが示してきた (J Neurosci. 2004 Mar 10;24(10):2535-41)。また BF-227 は、上図で示したようにコンゴレッド染色で淡く描出されている部分も明瞭な染色像 (右写真白い部分) を心アミロイドーシス患者の剖検心臓で示してきた (Circulation. 2012 Jan 24;125(3):556-7)。そこで、これまで診断が困難であった肺アミロイドーシスにおいても同様に、[11C]BF-227 が肺組織に沈着したアミロイドに結合し、in vivo イメージングのプローブとして使えるのではないかと着想したのが、研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記のようにしてアルツハイマー病患者用に開発されてきた PET プローブを用いたアミロイドイメージングの肺病変への臨床応用である。すなわち肺アミロイドーシスの局在や広がりや PET プローブでアミロイド PET を in vivo 撮像し、X 線・CT 画像・生検結果と比較し、その質的・量的局在診断の有用性を検証することである。イメージングに関しては、胸部レントゲン撮影、CT、陽電子放射断層撮影 (PET) と CT を組み合わせたもの、シンチグラフィなどが挙げられますが、それぞれにまだ問題点が存在している。したがって、アミロイド沈着を可視化し、また病態の進行を把握できるより効率的・非侵襲的・低コストの検出技術を開発す

ることを研究の究極の目的である。

3. 研究の方法

(1) マウス肺アミロイド シスモデルの作成

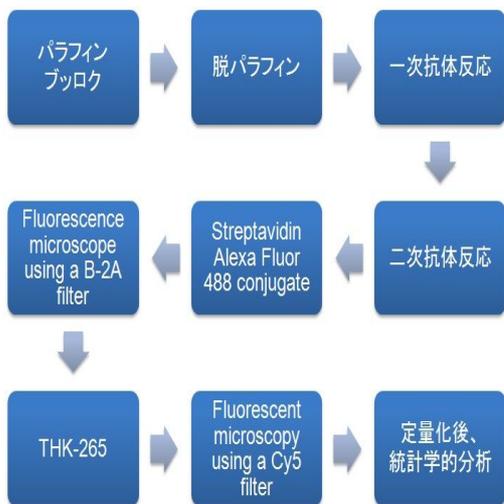
当初はマウスの肺アミロイド シスモデルを作成し、[11C]BF-227 を使って肺アミロイドイメージングを行う予定であった。しかし、動物モデルでの肺アミロイドイメージングにおいて PET 撮影は困難が多く、時間がかかる。そこでより簡便な近赤外線にてイメージングすることを考えた。[11C]BF-227 は蛍光 PET プローブとしては使えるが、近赤外線プローブとしては使えないことより、近赤外線プローブと PET プローブの両方に使える THK-265 を使ってイメージングを試みることにした。まずこれまでの報告で肺アミロイドーシスモデルマウスが存在しないため、最も最適な肺アミロイドーシスモデルマウスを作製し、モデル作製方法を構築することとした。肺アミロイドーシスは AL (Amyloid Light chain) 蛋白が重要であるが、市販されていないため同様の β -sheet 構造をもち、アルツハイマー診断用のアミロイドプローブと結合が確認されている限局性脳アミロイドーシスのアミロイド蛋白 A 1-40 を用いた。また、外部から投与したアミロイドの組織の定着には一般的に炎症を惹起したほうが定着率が高いことが知られているので、ブレオマイシンを経気道的に肺に投与し、間質性肺炎を惹起しその後アミロイド蛋白 A 1-40 を経気道的に投与し定着率が増加するのかを検討した。その目的でマウスを以下の 4 群にわけて検討した。

1	ブレオマイシン 塩酸塩	A β 1-40	肺組織の 取り出し	A β 1-40 plus BLM (pulmonary amyloidosis model)
2	-	A β 1-40	肺組織の 取り出し	A β 1-40 (A β 1-40-injected mice)
3	ブレオマイシン 塩酸塩	-	肺組織の 取り出し	BLM (bleomycin-induced inflammation model)
4	-	-	肺組織の 取り出し	Sham (no treated mice)

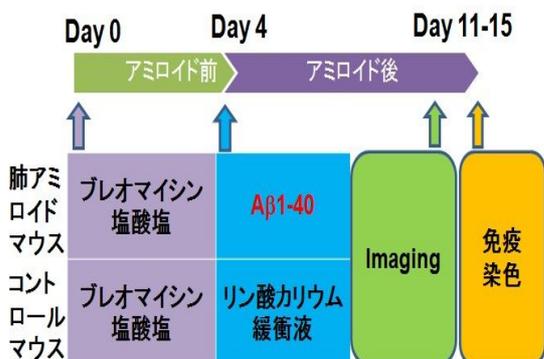
そしてそれぞれの薬物投与のタイミングとサクリファイスの時期を以下のように設定した。



そしてその後の A 1-40 の肺沈着の検出及び定量解析は蛍光イメージングと免疫染色を組み合わせ以下の手順で行った。



(2) In vivo 肺アミロイドイメージング法確立
 つぎに上記の実験にて見出した効率的な肺アミロイド定着モデルに対して、尾静脈から THK-265 を投与し、近赤外線を用い体外から肺の A 1-40 沈着を観察できるかを評価することを試みた。その後、肺の A 1-40 に THK-265 が確実に結合していたのかを凍結切片にて検証することを試みた。そのために以下の二群のマウスを以下のようなプロトコルで作成した。



そして THK-265 を以下のように尾静脈から投与し、肺の A 1-40 への結合を調べた。



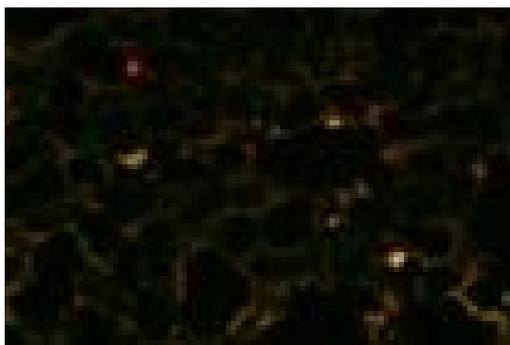
In vivo での肺アミロイドーシスの検出は近赤外線を用い以下の装置により 5 方向から測定した。パラフィン切片および凍結切片にて免疫染色および尾静脈からの THK265 の染色との一致の確認を行った。



<http://www.an.shimadzu.co.jp/bio/clairvivo/index-opt.htm>

4. 研究成果

(1) マウス肺アミロイド シスモデルの作成
 モデルマウス (BLM plus A 1-40) とコントロールマウス (BLM plus potassium phosphate buffer) に対し、肺における A 1-40 の沈着を A 1-40 の免疫染色にて確認し、そしてさらにそれらに THK265 が結合するかを蛍光顕微鏡にて観察した。A 1-40 の免疫染色は蛍光顕微鏡下で緑色に発光し、THK265 は赤に発光する。したがって、両者をマージすると、A 1-40 が沈着し THK265 がくっついた部分はオレンジ色に光る。下図に示されるように肺組織においてオレンジ色に発光している物質があり、A 1-40 を投与したマウス肺において A 1-40 が沈着し THK265 が結合するものが存在することが確認された。

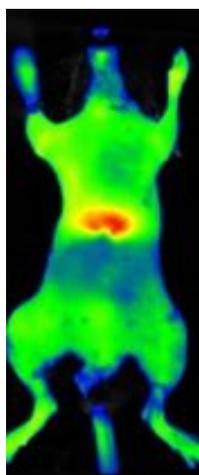


つぎにそれらを定量するため、6 つのイメージをそれぞれの個体の肺から無作為に抽出し、各々のイメージに対し 300 のグリッドを表示させ、A 1-40 の沈着と重なった部分をカウントする Point counting method を行ったところ、プレオマイシン投与したものの方が有意に A 1-40 の沈着が多いことが示された。これにより本法が肺アミロイドーシスの動物モデルとして今回の目的において機能することが示された。

(2) In vivo 肺アミロイドイメージング法確立
 上記確立されたモデルに対して尾静脈より THK265 (10 mg/kg) を静脈注射することにより、肺アミロイドイメージングができることが確かめた。THK-265 投与後 60 分では THK-265 がクリアランスされていることが

確認された。そこで HK-265 投与後 5、10、20、30 分後と時間を追って調べて行った。すると右図に示されるような蛍光イメージングが撮影可能であった。

さらに THK-265(10 mg/kg)投与による近赤外線イメージングイメージングと Ex vivo のデータを確認するべく、二重染色にて THK-265 が標的蛋白に結合していることを確認しました。



これらの蛍光技術の習得のために、肺の脈管新生に対する蛍光染色も行った。

(3)考察

本研究では、プレオマイシンを事前投与することで A の沈着が増加し、最も効率的な肺アミロイドーシスモデルマウス作製できることが示された。プレオマイシンの気管内投与は、以前より肺の炎症および線維化を来すことは良く知られ、モデル作製に頻繁に用いられている。そのプレオマイシンの特性を踏まえると、プレオマイシン投与による肺および気管の炎症は肺胞内のサーファクタントの減弱などに伴う肺胞防御機構の障害を引き起こし、また気道内では粘液分泌物過多と貯留を来す。このことによって、異物のクリアランスが障害され A 沈着が A +プレオマイシン群で増加したと考えられる。

また、蛍光発光 THK-265 プローブを用い近赤外線にて体外から肺内の A 沈着を観察できた。この研究結果は、脳アミロイドーシス (A の沈着) を THK-265 プローブを用い近赤外線にて体的に評価した先行研究と一致した結果であった。しかしながら、蛍光強度比がコントロール群で 1~60 分間において 2 以上を示していたことは先行研究と異なる点でした。これは、目的領域 (肺 vs 脳) やモデルマウス (外部からの異物投与によるモデルマウス vs トランスジェニックマウス) が異なることが影響していると考えられる。

本研究の限界と強みをまとめてみると、限界としてはモデル構築において、肺アミロイドーシスで最も重要とされる AL 蛋白を用いていないことがある。しかし、AL 蛋白に関して市販されている試薬はないという現状がある。また、10mg/kg まで毒性がないとされている THK-265 プローブの用量作用関係を評価していないことが挙げられる。しかしながら、先行研究で最も効率的にイメージングできる用量で本研究は実施しているのでこの点はクリアされてると思われる。

本研究の強みとしては、蛍光強度比を用い標準化したことで生物個体ごとの蛍光散乱のばらつきが補正されたことである。また生体試料を多方向観察したことから、組織全体

の空間的・時間的モニタリングが可能となった点が優れた点と考えられる。

以上総括すると、肺アミロイドーシスにおいても THK-265 を用いたアミロイドイメージングは、非侵襲的かつ効率的な新規診断ツールとなり得る。このイメージングは近赤外線のみならずさらに深部を検出できる PET 検査においても有用であるものと考えられる。そして本研究期間においては、実際の肺アミロイドーシス患者にアミロイドイメージング用プローブを投与して撮影するまでには至らなかったが、ヒトにおいても有用な方法であることは間違いないものと思われた。現在これらの動物実験アミロイドイメージングの成果を論文として投稿すべく準備中である。

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 2 件)

Nihei M, Okazaki T, Ebihara S, Kobayashi M, Niu K, Gui P, Tamai T, Nukiwa T, Yamaya M, Kikuchi T, Nagatomo R, Ebihara T, Ichinose M. Chronic inflammation, lymphangiogenesis, and effect of an anti-VEGFR therapy in a mouse model and in human patients with aspiration pneumonia. *Journal of Pathology* 235: 632-645, 2015. doi: 10.1002/path.4473 審査有

海老原 覚: 高齢者によくみられる肺炎 *Geriatric Medicine* 52(11):1297-1298, 2014 <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ai5gemdd/2014/005211/001&name=1297-1298j&UserID=202.16.215.1> 審査無

[学会発表](計 1 件)

Ebihara S: Cough in older people. *European Respiratory Society International Congress 2014, Munich, Germany*, 2014.9.10

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/info/news/20140604/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老原 覚 (EBIHARA, Satoru)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：90323013

(2) 研究分担者

工藤 幸司 (KUDO, Yukitsuka)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：80375203

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(3) 研究協力者

大国 生幸 (OKUNI, Ikuko)

佐藤 隆平 (SATO, Ryuhei)