

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293268

研究課題名(和文) 動脈硬化の治療戦略に役立つ核医学イメージング法：EBMのための実験的研究

研究課題名(英文) Nuclear medicine imaging toward therapeutic strategy of atherosclerosis:
Experimental research to establish EBM

研究代表者

久下 裕司 (KUGE, Yuji)

北海道大学・アイソトープ総合センター・教授

研究者番号：70321958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インビトロ、インビボ実験により以下の成果を得た。
インテグリン $\alpha_v\beta_3$ イメージング剤¹⁸F-RGD-K5の自動合成法を確立した。低酸素イメージング剤¹⁸F-FMISO
が、¹⁸F-FDGとは異なり、低酸下のM2マクロファージに集積することを見出した。¹⁸F-FMISOの母体構造である
2-nitroimidazole系化合物が動脈硬化病変に集積することを確認した。
これらの成果は、臨床診断に役立つ動脈硬化イメージング法の構築に資するものである。

研究成果の概要(英文)：The results obtained by our research are as follows.
(1) An automated synthesis method for ¹⁸F-RGD-K5 (an integrin $\alpha_v\beta_3$ imaging agent) has been
successfully established. (2) Unlike ¹⁸F-FDG, ¹⁸F-FMISO (an hypoxia imaging agent) was found to
accumulate in M2 macrophages present in hypoxic environment. (3) It was also confirmed that
2-nitroimidazole compounds selectively accumulated in the atherosclerotic regions of a rabbit model.
These results would contribute to establish diagnostic imaging of atherosclerosis.

研究分野：放射性薬品科学

キーワード：放射線 核医学診断 不安定プラーク 低酸素イメージング マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞の成因として動脈硬化プラークの破綻が挙げられる。したがって、動脈硬化病変の評価においては、早期治療を必要とする“破綻しやすいプラーク (不安定プラーク)”を的確に診断することが重要である (Circ Res, 2012;111:231)。核医学的手法 (PET、SPECT) は、対応する種々のイメージング剤を用いることにより、プラークの不安定性を決定付ける因子を分子・細胞レベルで画像化できる可能性を持つ。実際、 ^{18}F -fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) を用いた炎症イメージング (マクロファージ活性)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -annexin A5 を用いたアポトーシスイメージングをはじめとして、動脈硬化の進展や不安定性に関わる多くの因子の RI イメージング剤が検討されている。しかし、これまでの研究の多くは、各々のイメージング剤について検討し、その有用性を報告するにとどまっている。臨床診断に役立つイメージング法を構築するには、現在すでに臨床使用可能な ^{18}F -FDG と対比し、「 ^{18}F -FDG では病変の性状と治療効果をどこまで評価できるのか?」「新しいイメージング剤は ^{18}F -FDG を超える診断情報を提供しうるのか?」といった点を明らかにすることが必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、臨床診断に役立つ動脈硬化イメージング法を構築することを目的として、以下の検討を行った。すなわち、「新しいイメージング剤 [^{18}F -RGD-K5、 ^{18}F -Fluoromisonidazole (^{18}F -FMISO)] の動脈硬化病変への集積に関する分子・細胞レベルのエビデンスを固め、 ^{18}F -FDG (炎症イメージング) の場合と比較するための基礎的検討として、まず、インテグリン $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ イメージング剤 ^{18}F -RGD-K5 の自動合成法の確立を行った。また、動脈硬化プラークの破綻・血栓形成に深く関与することで知られるマクロフ

ァージに焦点を当て、マクロファージの極性化や低酸素環境が、2-nitroimidazole 系化合物である ^{18}F -FMISO の取込みに与える影響について調べた。さらに、バルーン傷害動脈硬化モデルウサギを用いて、*in vivo* における、2-nitroimidazole 系化合物の動脈硬化病変部位への集積性を評価した。

3. 研究の方法

(1) ^{18}F -RGD-K5 の自動合成法の確立

多目的自動合成装置 (CFN300, 住友重機械工業) を用いてシーメンス株式会社が開発した ^{18}F -RGD-K5 の合成法を検討した。 ^{18}F -RGD-K5 は、1-Tosyloxy-4-pentyne と ^{18}F -KF-cryptate を反応させて 1- ^{18}F -Fluro-4-pentyne を合成した後、RGD-K5 azide 前駆体反応させることで合成した。

(2) 極性化、あるいは低酸素環境によるマクロファージの ^{18}F -Fluoromisonidazole (^{18}F -FMISO) の取込み量の影響の評価

マクロファージは、チオグリコレート培地を ddY マウスに腹腔内投与し、投与 3 日後に腹腔内を PBS (-) で洗浄して回収した。M1 極性化マクロファージは、回収したマクロファージを 10 ng/mL Lipopolysaccharide (LPS)、10 ng/mL Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) 含有培地で 30 時間培養することで作製した。M2 マクロファージ極性化マクロファージは、40 ng/mL Interleukin (IL)-4 含有培地で 30 時間培養することで作製した。サイトカイン未処理で同様に培養したものを M0 とした。

これらのマクロファージを用いて、さらに低酸素 (1%) あるいは通常酸素下 (21%) で 18 時間培養した。その後、マクロファージから mRNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。各マクロファージが M1 あるいは M2 に極性化されているかどうかを確認するため、M1 極性化マーカー-inducible nitric

oxide synthase (iNOS)、および M2 極性化マーカー mannose receptor (MR) の遺伝子発現量を Real-time PCR 解析で調べた。さらに、マクロファージ培養培地に ^{18}F -FMISO を添加し、ガンマカウンターで細胞溶解液の放射能を測定することで、マクロファージの ^{18}F -FMISO 取込み量を測定した。

(3) 動脈硬化病変における Pimonidazole の集積量の評価

動脈硬化モデル動物として、バルーン傷害動脈硬化モデルウサギを使用した。本モデルウサギは、日本白色種ウサギに 0.5% コレステロール食を 1 週間給餌した時点で右腸骨大腿動脈にバルーンカテーテルで傷害を加え、さらに 0.5% コレステロール食を全実験期間で合計 2 ヶ月間与えることで作製した。本ウサギの病変部位に、2-nitroimidazole 系化合物が集積するかどうかを検討するため、60 mg/kg の Pimonidazole を本ウサギに耳静脈内投与し、投与 2 時間後に安楽死させて右腸骨大腿動脈、および無処置の左腸骨大腿動脈を摘出して凍結切片を作製し、免疫組織染色により Pimonidazole の集積を調べた。

4. 研究成果

(1) インテグリン $\alpha v \beta 3$ イメージング剤の自動合成法の確立

多目的自動合成装置を用いて、1-Tosyloxy-4-pentyne から合成した $1\text{-}^{18}\text{F}$ -Fluro-4-pentyne と RGD-K5 azide ヒュスゲン環化付加反応させることで、 ^{18}F -RGD-K5 を合成した。その結果、放射化学的収率 14.4%、放射化学的純度 99% 以上で得ることに成功した。

(2) サイトカイン刺激、あるいは低酸素培養によるマクロファージの M1 および M2 極性化

の検討

サイトカイン刺激により極性化した M1 あるいは M2 マクロファージを、通常あるいは低酸素下で培養し、M1 極性化マーカー iNOS、および M2 極性化マーカー MR の遺伝子発現を調べた。その結果、通常酸素および低酸素培養下のいずれにおいても、LPS および $\text{IFN}\gamma$ で刺激して作製した M1 極性化マクロファージは iNOS、IL-4 で刺激して作製した M2 極性化マクロファージは MR が増加していることが確認できた (図 1)。

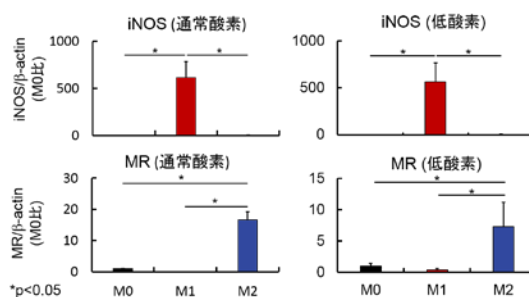


図 1 サイトカイン刺激、あるいは低酸素培養下におけるマクロファージの極性化マーカーの遺伝子発現量。

M1 は LPS および $\text{IFN}\gamma$ 含有培地で培養したマクロファージ、M2 は IL-4 含有培地で培養したマクロファージ、M0 はサイトカイン未処理で培養したマクロファージである。

さらに、本マクロファージを用いて、 ^{18}F -FMISO 取込み量を調べたところ、①通常酸素環境下では、M0、M1、M2 マクロファージ間に ^{18}F -FMISO 集積量の差はないこと、および②低酸素環境下では、 ^{18}F -FMISO の集積量は、M0 マクロファージと比較して M1 マクロファージでは有意に減少、M2 マクロファージでは有意に増加することを見出した (図 2)。すなわち、炎症促進性の M1 マクロファージを可視化する ^{18}F -FDG とは異なり、 ^{18}F -FMISO は低酸素環境下にある炎症抑制性の M2 マクロファージを特異的に可視化できる可能性が示唆された。

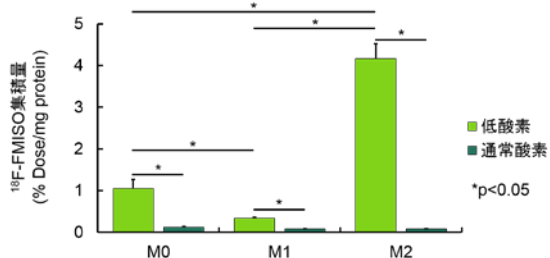


図2 通常、および低酸素培養下における極性化マクロファージの¹⁸F-FMISO 取込み量。

(3) 動脈硬化病変における Pimonidazole の集積量の評価

バルーン傷害大動脈硬化ウサギに 2-nitroimidazole 系化合物である Pimonidazole を耳静脈内投与し、動脈硬化病変と無処置の大動脈への本薬剤の集積を比較した。Pimonidazole は動脈硬化病変に選択的に集積していた (図3)。これらの結果から、正常の血管と比較して動脈硬化プラークでは、低酸素環境下に存在する M2 マクロファージの数が增加すること、および¹⁸F-FMISO を含む 2-nitroimidazole 系化合物がこれらマクロファージの浸潤量を調べられる薬剤として有用である可能性が示された。

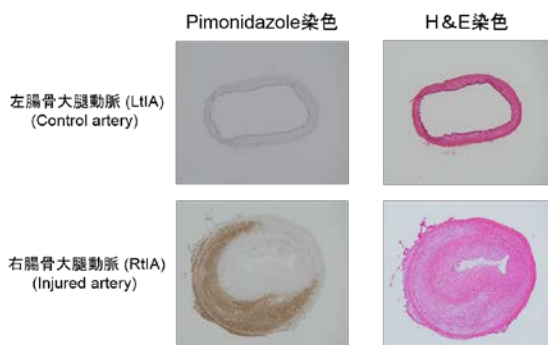


図3 動脈硬化病変における Pimonidazole 染色 (左図)、および H&E 染色 (右図)

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. Shimizu Y, Hanzawa H, Zhao Y, Fukura S, Nishijima K, Sakamoto T, Zhao S, Tamaki N, Ogawa M, Kuge Y: Immunoglobulin G (IgG)-Based Imaging Probe Accumulates in M1 Macrophage-Infiltrated

Atherosclerotic Plaques Independent of IgG Target Molecule Expression. *Mol Imaging Biol.* 2017; 19(4): 531-539. 査読有

2. Shimizu Y, Kuge Y: Recent Advances in the Development of PET/SPECT Probes for Atherosclerosis Imaging. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging. Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2016; 50(4): 284-291. 査読有
3. Zhao Y, Fukao K, Zhao S, Watanabe A, Hamada T, Yamasaki K, Shimizu Y, Kubo N, Ukon N, Nakano T, Tamaki N, Kuge Y: Irbesartan attenuates atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits: Noninvasive imaging of inflammation by 18F-FDG PET. *Mol Imaging.* 2015; 14(0): 1-8. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Sagiri Fukura, Yoichi Shimizu, Hiroko Hanzawa, Ken-ichi Nishijima, Takeshi Sakamoto, Songji Zhao, Mikako Ogawa, Yuji Kuge: Accumulation mechanism of non-targeted immunoglobulin G in atherosclerotic lesions. Ninth Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, National Institute of Radiological Sciences (Chiba, Japan), 2015/11/08.
2. Yoichi Shimizu, Hiroko Hanzawa, Yan Zhao, Songji Zhao, Sagiri Fukura, Ken-ichi Nishijima, Takeshi Sakamoto, Nagara Tamaki, and Yuji Kuge: Accumulation mechanism of non-targeted immunoglobulin G in atherosclerotic lesions. Annual Meeting of Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, Baltimore Convention Center (Baltimore, Maryland), 2015/06/06.
3. 志水陽一、半澤宏子、趙芫、趙松吉、福良沙霧、西嶋劍一、坂本健、玉木長良、小川美香子、久下裕司：動脈硬化病変における放射性標識化免疫グロブリンG 集積機序の探索、第 10 回日本分子イメージング学会総会・学術総会、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)、2015/05/20
4. 大曲 茂生、小松 由紀子、西嶋 劍一、志水 陽一、馮 飛、玉木 長良、久下 裕司：多目的自動合成装置を用いたクリック反応による 18F-標識ペプチドの合成：5-[18F]fluoro-1-pentyne の合成検討。日本薬学会第 135 年会、神戸サンボホール (兵庫県・神戸市)、2015/03/25-28

[図書] (計 1 件)

1. Shimizu Y, Hanzawa H, Zhao Y, Nishijima K, Fukura S, Sakamoto T,

Zhao S, Tamaki N, Kuge Y:
Radioimmunodetection of
Atherosclerotic Lesions Focusing on
the Accumulation Mechanism of
Immunoglobulin G. In: Perspectives on
Nuclear Medicine for Molecular
Diagnosis and Integrated Therapy.
Springer Japan. 2016; 141-150.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
該当なし

○取得状況 (計 0 件)
該当なし

[その他]

ホームページ等

<https://www.hokudai.ac.jp/radiois/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久下 裕司 (KUGE Yuji)
北海道大学・アイソトープ総合センター・
教授
研究者番号：70321958

(2) 研究分担者

玉木 長良 (TAMAKI Nagara)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・
特任教授
研究者番号：30171888

浅田 祐士郎 (ASADA Yujiro)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：70202588

川井 恵一 (KAWAI Keiichi)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号：30204663

七戸 秀夫 (SHICHINOHE Hideo)
北海道大学・大学病院・准教授
研究者番号：80374479

西嶋 剣一 (NISHIJIMA, Ken-ichi)
北海道大学病院・薬剤師
研究者番号：60364254

山下 篤 (YAMASHITA Atsushi)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：90372797

鏡谷 武雄 (ABUMIYA Takeo)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：80270726

志水 陽一 (SHIMIZU, Yoichi)
京都大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90634212

東川 桂 (HIGASHIKAWA, Kei)
北海道大学・アイソトープ総合センター・
助教
研究者番号：10756878

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし