

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461148

研究課題名(和文) 葉酸レセプター抗体を用いた分子イメージングの前臨床試験と新規診断法の開発

研究課題名(英文) Preclinical study and development of novel diagnostic method using molecular imaging with anti-folic acid receptor-beta antibody

研究代表者

宮田 昌明 (Miyata, Masaaki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：00347113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：活性化マクロファージに特異的に発現する葉酸レセプター (FR $\beta$ ) に対するモノクローナル抗体を用い、以下の研究を行い成果を得た。抗FR $\beta$ モノクローナル抗体を用いた蛍光分子イメージングにより、動脈硬化モデルマウスに対する薬物治療による動脈硬化抑制効果を検出できるか前臨床試験を行った。アポ蛋白(a)過剰発現クラウンミニプタにおいて動脈硬化病変を認め、抗FR $\beta$ モノクローナル抗体を用いた分子イメージングの前臨床試験を行う。血中の可溶性FR $\beta$ 濃度を測定するELISA法を開発した。腹部大動脈瘤患者では免疫組織染色で動脈硬化巣にFR $\beta$ が存在することを確認し、可溶性FR $\beta$ 濃度の上昇を認めた。

研究成果の概要(英文)：We performed the following 3 projects using a monoclonal antibody against folic acid receptor beta (FR $\beta$ ) which is expressed in activated macrophages. 1. We found that fluorescent molecular imaging using anti-FR $\beta$  monoclonal antibody could detect the decrease of atherosclerosis mediated by angiotensin II receptor blocker in apolipoprotein E deficient mice. 2. We confirmed that the apolipoprotein (a) overexpressing transgenic CLAWN miniature swine developed fatty streak in aorta on normal diet. We try to perform the molecular imaging using anti-FR $\beta$  monoclonal antibody with microbubbles detected by ultrasound machine on high fat diet. 3. We established a sandwich ELISA assay using anti-FR $\beta$  monoclonal antibody and measured the soluble FR $\beta$  concentration of human serum. The patients with abdominal aortic aneurysms (AAA) showed a higher serum FR $\beta$  level compared with the normal control. In addition, we confirmed the expression of FR $\beta$  in AAA by immunohistochemistry.

研究分野：循環器内科

キーワード：動脈硬化 葉酸レセプター 活性化マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

酸化型葉酸をリガンドとする葉酸レセプターには、CD147、CD147、CD147 の4つが存在するが、葉酸レセプター (FR) は、単球や生理的組織 M には発現しておらず、TNF- $\alpha$  や活性酸素を産生する活性化マクロファージ (M $\phi$ ) のみに発現していることが示され (Blood. 2009;113:438-46)、活性化 M $\phi$  の新しいマーカーとして注目されている。さらに、我々の共同研究者である鹿児島大学免疫学教室の松山教授らは、抗 FR モノクローナルに緑膿菌毒素を結合させた FR イムノトキシンが、SCID マウスに移植した関節リウマチ滑膜の活動性を減少させ (Arthritis Rheum. 2006;54:3126-34)、脳腫瘍モデルマウスの腫瘍を縮小させ (Cancer Immunol Immunother. 2009;58:1577-86)、肺線維症モデルマウスの病変を抑制する (Clin Exp Immunol. 2010;161:348-56) ことを報告した。

一方、動脈硬化形成において、血中の単球が血管壁に侵入し M $\phi$  となり、この M $\phi$  は活性化されスカベンジャー受容体を介して酸化 LDL を取り込み、泡沫化する。また、この活性化 M $\phi$  は TNF- $\alpha$  などの多くのサイトカインを分泌するため動脈硬化プラーク病変形成を促進し、さらにプラークを不安定化させプラークの破綻にも関与している。

我々は、ヒト及びアポリポタンパク質 E (アポ E) 欠損マウスの動脈硬化病変において、抗 FR 抗体で標識される活性化 M $\phi$  がプラークに存在することを確認し、FR イムノトキシンの静脈内注射により、アポ E 欠損マウスの動脈硬化病変を有意に 30% 減少することを報告した (J Am Heart Assoc. 2012;1:e003079)。

本研究申請では、分子イメージングのヒトへの臨床応用を目指した前臨床試験として、この蛍光分子イメージングシステムにおいて、アンジオテンシン受容体ブロッカー (ARB) での動脈硬化抑制効果を検知できるかを検討する。我々は、アポ蛋白 E 欠損マウスとアンジオテンシン II の 1 型受容体欠損マウスとのダブルノックアウトマウスで動脈硬化病変が抑制されることを報告しており (Hypertens Res. 2008; 31: 1631-42)、ARB による動脈硬化退縮を蛍光分子イメージングシステムで検出できることが期待される。

さらに、我々は動脈硬化の大型モデル動物として動脈硬化の独立した危険因子である apo(a) を過剰発現させたトランスジェニッククラウンミニプタの作成に成功している。そこで、vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 抗体にマイクロバブルを結合させた造影剤によるアポ蛋白 E 欠損マウスでの動脈硬化病変での報告 (Circulation 2007;116: 276-84、Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:54-9) をもとに、この大型動脈硬化モデル動物で抗 FR モノクローナル抗体を用いたマイクロ超音波イメージングの開発

を前臨床試験として行う。超音波分子イメージングは、非侵襲的かつリアルタイムに病変を認識でき、臨床応用もしやすく、今後の研究の発展が望まれる分野である。

また、FR は GPI アンカー蛋白であり、M $\phi$  の活性化に伴い可溶性が存在する。我々は、抗 FR モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 測定法の開発を目指しており、その臨床的意義を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、活性化 M $\phi$  に特異的に発現する FR に対するモノクローナル抗体を用い、動脈硬化の分子イメージングの前臨床試験と血中可溶性 FR 測定による新規診断法を開発することである。

### 1) 抗 FR モノクローナル抗体を用いた蛍光分子イメージング

動脈硬化モデル動物であるアポ E 欠損マウスに ARB であるテルミサルタンを投与し、コントロールと比較することにより、抗 FR モノクローナル抗体を用いた蛍光分子イメージングで動脈硬化退縮効果を検出できるかを検討する。

### 2) 抗 FR モノクローナル抗体を用いた超音波分子イメージング

大型動脈硬化モデル動物であるアポリポ蛋白 (a) 過剰発現クラウンミニプタの動脈硬化病変において、抗 FR モノクローナル抗体にマイクロバブルを結合させた造影剤を用いた超音波分子イメージングにより、活性化マクロファージが存在する不安定プラークを認識できるかを検討する。

### 3) ELISA 法による可溶性 FR 血中濃度測定の臨床的意義の検討

血中の可溶性 FR 濃度を測定するために ELISA 法を確立し、それを用い腹部大動脈瘤患者において組織性状と CRP や IL-6 などの炎症マーカーとの相関を検討する。

さらに、炎症や酸化ストレスが発症に関与している心房細動患者においてもアブレーション治療の前後において血清 FR 濃度を測定し、アブレーション治療効果の判定や心房細動再発や塞栓症の予後規定因子と成り得るかを検討する。

## 3. 研究の方法

本研究に使用する抗 FR モノクローナル抗体を以下の方法で作成する。BALB/c マウスの肝臓より FR cDNA を準備し、このマウス FR 遺伝子を感染させたラット RBL2H3 で Wistar-Kyoto ラットを免疫した。リンパ節から得たリンパ球を、NS-1 ミエロマ細胞と融合させ、作成されたハイブリドマをフローサイトメトリーとウエスタンブロットでスクリーニングし、FR 感染 RBL2H3 細胞を得た。この細胞株を用い、抗 FR モノクローナル抗体を作成した。

### 1) 抗 FR モノクローナル抗体を用いた蛍光分子イメージング

蛍光分子イメージングのために、上記で作成した 2mg/mL の抗 FR 抗体を Alexa488 蛍光色素でラベリングする。抗 FR -Alexa488 抗体 (1.47mg/mL) を、マウスの尾静脈より 100  $\mu$ l 静注し、1 時間後に上行大動脈を露出し、Maestro in-vivo fluorescence imaging system を用いて撮影する。

実験動物は、普通食飼育下のアポ E 欠損マウスを使用する。

### 2) 抗 FR モノクローナル抗体を用いた超音波分子イメージング

istearoylphosphatidylethanolamine-PEG (2000)biotin と distearoylphosphatidylcholine と polyoxyethylene-40-stearate とを超音波処理してビオチン化されたマイクロバブル (MB) を作成する。3x10<sup>8</sup> の MB と streptavidin (90  $\mu$ g) を 30 分間インキュベーションし結合させ、その中の 1x10<sup>8</sup> を取り出し、EZ-Link (Pierce 社) を用い、ビオチン化した抗マウス IgG1 抗体と抗 FR モノクローナル抗体を 30 分間結合させて、FR を認識する MB を作成する。この FR を認識する MB をアポ E 欠損マウスの尾静脈から注射して、小動物用超音波高解像度イメージングシステムを用いて画像解析する。

コントロールとしては、抗 FR モノクローナル抗体の代わりに非特異的の一次抗体を結合させたものを用い、画像を比較する。

実験動物としては、我々が開発した動脈硬化大型モデル動物の apo(a)トランスジェニッククラウンミニプタを用い、普通食で飼育する。

### 3) ELISA 法による可溶性 FR 血中濃度測定の臨床的意義の検討

ヒト FR 発現 B300-19 (マウス B 細胞株) をラットに免疫した腹腔内リンパ節を用い、細胞融合法にて抗葉酸 FR 抗体を得る。この抗体を用い、サンドイッチ ELISA 測定法を用い、血清の FR 濃度を冠動脈疾患患者、大動脈瘤患者、心房細動患者と正常コントロールで測定する。

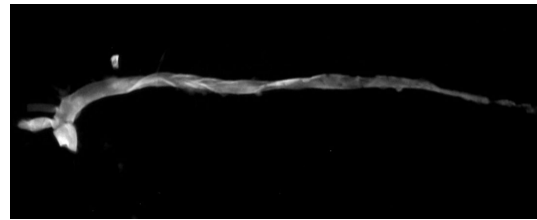
## 4. 研究成果

### 1) 抗 FR モノクローナル抗体を用いた蛍光分子イメージング

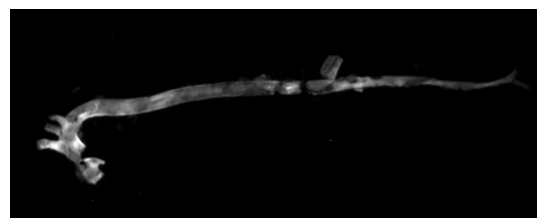
テルミサルタンを飲水に溶解し、3mg/kg で普通食のアポ E 欠損マウスに生後 4 週齢から 12 週齢まで投与した (Takaya T, et al. Atherosclerosis. 2006; 186: 402-410)。抗 FR モノクローナル抗体を用いた蛍光分子イメージングは、図 1 に示すように、コントロールと比較し、テルミサルタン投与により、イメージングの輝度低下を認めた。

### 図 1 アポ E 欠損マウスの抗 FR モノクローナル抗体を用いた蛍光分子イメージング像

#### A. コントロール



#### B. テルミサルタン投与



### 2) 抗 FR モノクローナル抗体を用いた超音波分子イメージング

普通食で飼育した apo(a)トランスジェニッククラウンミニプタの生後 12 か月の動脈硬化病変の組織解析を行った。剖検時、肉眼的に大動脈に脂肪線条を認め、Oil red O 染色において同部位の脂質の取り込みを確認した。しかし、予想以上に動脈硬化病変が少なく、今後は、高脂肪負荷食による観察が必要と考えられた。

apo(a)トランスジェニッククラウンミニプタの繁殖に時間を要しており、個体が揃い次第、高脂肪食で飼育し、動脈硬化巣の組織解析でプラークの形成を確認した後、抗 FR モノクローナル抗体を用いた超音波分子イメージングを行う方針とした。

### 3) ELISA 法による可溶性 FR 血中濃度測定の臨床的意義の検討

ヒトの腹部大動脈瘤患者の動脈硬化切片において、抗 FR モノクローナル抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、図 2 に示すように FR の発現を認めた。

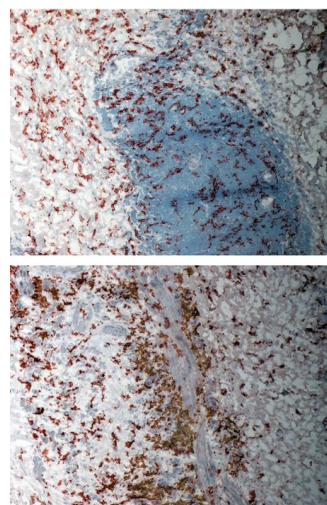


図 2  
腹部大動脈瘤

腹部大動脈患者において、可溶性 FR を測定し、免疫組織と Oil red O 染色の組織性状と CRP や IL-6 の血中濃度との相関を症例数を増やしながらか検討している。

また、心房細動患者において可溶性 FR を測定したが、心房細動患者の可溶性 FR の血中濃度の有意な上昇は認めなかった。

#### 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 6 件)

1. Xuan H, Xu B, Wang W, Tanaka H, Fujimura N, Miyata M, Michie SA, Dalman RL. Inhibition or deletion of angiotensin II type 1 receptor suppresses elastase-induced experimental abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* (in press) doi: 10.1016/j.jvs.2016.12.110. [Epub ahead of print] 査読あり
2. Chaen H, Kinchiku S, Miyata M, Kajiya S, Uenomachi H, Yuasa T, Takasaki K, Ohishi M. The validity of a novel method for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels in diabetic patients. *J Atheroscler Thromb* 2016; 23: 1355-1364. doi:10.5551/jat.35972 査読あり
3. Soejima Y, Munemoto T, Masuda A, Uwatoko Y, Miyata M, Tei C. Effects of Waon Therapy on Chronic Fatigue Syndrome: A Pilot Study. *Internal Medicine* 2015; 54: 333-338. doi: 10.2169/internalmedicine.54.3042 査読あり
4. Ohno S, Miyata M, Kohjitani A, Tohya A, Ohishi M, Sugiyama K. Associations between blood pressure responses to acute stress and impaired renal function and serum uric acid level. *Clin Exp Hypertens* 2015; 37: 656-660. doi: 10.3109/10641963.2015.1047939 査読あり
5. Kanda D, Takumi T, Miyata M, Tokushige A, Sonoda T, Yoshino S, Saihara K, Ohishi M. Angiotensin-converting enzyme inhibitor prevents the worsening of renal function in the late phase after percutaneous coronary intervention. *J Atheroscler Thromb* 2016 23:233-40. doi: 10.5551/jat.33266 査読あり
6. 宮田昌明, 大石 充. Ang(1-7)/Mas 系と Ang /IRAP 系. *Angiotensin Research* 2015; 12: 82-87. 査読なし

[学会発表](計 10 件)

1. 宮田昌明. 特別企画 18 二次予防に対する心臓リハビリテーション最前線. 心臓リハビリテーションとしての和温療法. 第 64 回 日本心臓病学会学術集会、2016 年 9 月 23 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)
2. Chaen H, Kinchiku S, Miyata M, Kajiya S,

Uenomachi H, Yuasa T, Takasaki K, Ohishi M. The validity of a novel method for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels in diabetic patients. European Society of Cardiology (ESC) Congress 2016, 2016 年 8 月 27 日, Roma (Italy)

3. Ikeda Y, Iwabayashi M, Sasaki Y, Akasaki Y, Higuchi K, Miyata M, Ohishi M. Alternative autophagy plays a role in the effect of ras-inhibition on arterial senescence and arteriosclerosis. America Heart Association Basic Cardiovascular Science 2016, 2016 年 7 月 18 日, Phoenix (USA)
4. 宮田昌明. 特別講演 1. 温熱刺激の臨床への応用: 和温療法の効果とその利用機序. 日本東洋医学系物理療法学会 第 41 回学術大会・総会、2016 年 3 月 12 日、筑波大学東京キャンパス(東京都文京区)
5. Iwabayashi M, Ikeda Y, Sasaki Y, Akasaki Y, Miyata M, Sadoshima J, Ohishi M. Inhibition of renin-angiotensin signal retards arterial senescence and development of atherosclerosis in apolipoprotein e knockout mice via induction of alternative autophagy. AHA Scientific Sessions 2015, 2015 年 11 月 7 日, Orlando (USA)
6. 宮田昌明. ディベート 1. 降圧薬は併用か? 増量か? 併用派の立場から. 第 38 回日本高血圧学会総会、2015 年 10 月 9 日、ひめぎんホール(愛媛県松山市)
7. 宮田昌明. 熱帯環境 温熱刺激に対する生体反応と治療への応用: 和温療法. 第 19 回日本適応医学学会学術集会、2015 年 9 月 12 日、一橋講堂(東京都千代田区)
8. Ikeda Y, Miyauchi T, Iwabayashi M, Sasaki Y, Akasaki Y, Miyata M, Ohishi M. Selective estrogen receptor modulator retards arterial senescence and atherosclerosis via upregulation of sirt-1 and autophagy in post-menopause model mouse. AHA Basic Cardiovascular Science (BCVS) 2015, 2015 年 7 月 13 日, New Orleans (USA)
9. 宮田昌明, 小澤政之. 遺伝子改変ブタを用いた成人病メカニズムへの戦略: Lp(a) と動脈硬化. 先進医用ミニブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト第 3 回公開シンポジウム、平成 27 年 3 月 24 日、鹿児島大学稲盛会館(鹿児島県鹿児島市)
10. 宮田昌明. シンポジウム 1 温泉気候物理の効果とその機序. 温熱刺激による血管老化と動脈硬化の抑制効果. 第 79 回日本温泉気候物理医学会総会、2014 年 5 月 13 日、京都国際会議場(京都府京都市)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：動脈硬化又は動脈硬化性疾患の治療剤、及び動脈硬化又は動脈硬化性疾患の診断薬  
発明者：宮田昌明、永井 拓、松山隆美  
権利者：宮田昌明、永井 拓、松山隆美  
種類：特許公開  
番号：W02012/063955  
出願年月日：2011年11月8日  
国内外の別：国外

取得状況（計1件）

名称：動脈硬化又は動脈硬化性疾患の治療剤、及び動脈硬化又は動脈硬化性疾患の診断薬  
発明者：宮田昌明、古庄優子、鄭 忠和、永井 拓、松山隆美  
権利者：国立大学法人 鹿児島大学  
種類：特許  
番号：特許第5896568  
取得年月日：2016年3月11日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

(1)鹿児島大学産学官連携推進センター、研究シーズ集

活性化マクロファージを標的とした動脈硬化の新規診断・治療法の開発【動脈硬化】

<http://www.rdc.kagoshima-u.ac.jp/rdc/search/upload/miyata-med.pdf>

(2)鹿児島大学研究者総覧、宮田昌明

<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp/407594.html>

(3)鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 心臓血管・高血圧内科学ホームページ

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~intmed1/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮田 昌明 (MIYATA Masaaki)

鹿児島大学 医歯学域医学系 准教授

研究者番号：00347113

(2)研究分担者

大石 充 (OHISH Mitsuru)

鹿児島大学 医歯学域医学系 教授

研究者番号：50335345

桶谷直也 (OKETANI Naoya)

鹿児島大学 医歯学域医学系 講師

研究者番号：70598010

小澤政之 (OZAWA Masayuki)

鹿児島大学 医歯学域医学系 教授

研究者番号：90136854

(3)研究協力者

Baohui Xu

Stanford University School of Medicine

Division of Vascular Surgery,

Department of Surgery

Senior Research Scientist

Ronald L. Dalman

Stanford University School of Medicine

Division of Vascular Surgery,

Department of Surgery

Professor