

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860961

研究課題名(和文)細胞外マトリックス構成分子を標的とした動脈硬化症診断用核医学診断剤の開発

研究課題名(英文)Development of novel SPECT imaging probe targeting extracellular matrix-related biomolecule for diagnosis of atherosclerosis

研究代表者

志水 陽一 (SHIMIZU, Yoichi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90634212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動脈硬化病変に発現するThrombospondin-4を標的としたSPECT診断剤“^{99m}Tc-HTA”を創製した。^{99m}Tc-HTAは動脈硬化モデルマウス血管内病変に集積したが、^{99m}Tc-HTAの母体骨格と同様のアイソタイプコントロール抗体を母体骨格にもつ^{99m}Tc-HNAも同様に病変部位に集積し、その集積局在はマクロファージ(Mφ)浸潤領域と類似した。そこで、Mφの極性化と^{99m}Tc-HNAの集積との関連性について評価したところ、^{99m}Tc-HNAはM1 Mφに高集積することを見出した。以上より^{99m}Tc-HNAは動脈硬化病変内の炎症性マクロファージを描出することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Previously, we found thrombospondin-4 (TSP4) expressed highly in atherosclerotic lesions of mouse aorta. Thus, we developed anti-TSP4 monoclonal IgG radio-labelled with ^{99m}Tc (^{99m}Tc-HTA). ^{99m}Tc-HTA showed higher accumulation in atherosclerotic aortas of mice; however, we also found that the non-targeted monoclonal IgG radio-labelled with ^{99m}Tc (^{99m}Tc-HNA) showed similar distribution. Therefore, we next focused on the relationship between radio-labelled IgG accumulation and macrophage polarization. ^{99m}Tc-HNA showed higher accumulation in M1 macrophage than M2 and M0 macrophage. The expression levels of Fc gamma receptor I and II were also higher in M1 macrophage than M2 and M0 macrophage. These results suggest that radio-labelled monoclonal IgG can visualize the active inflammation in atherosclerotic plaque formation independent of its target biomolecules.

研究分野：放射性薬品化学

キーワード：動脈硬化 SPECT マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

動脈内のプラーク破綻とそれに伴う血栓形成は心筋梗塞や脳梗塞の発症に深く関与している。そのため、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)”を評価できる診断法の開発が求められている(Circ Res, 2012)。このような背景の下、超音波診断法、MRI、CT等を用いた検討が行われているが、形態的診断が主で、質的診断に有効な方法は限定され、特に病変に発現する生体分子を質的診断する手法は皆無である(J Nucl Med, 2010)。一方、ポジトロン断層撮像装置(Positron Emission Tomography; PET)、単光子断層撮像装置(Single Photon Emission Computed Tomography; SPECT)を用いる核医学分子イメージング法は、用いる分子プローブが標的とする生体内機能分子の非侵襲的インビボ画像化が可能であることから、動脈硬化プラークの不安定化に関与する機能分子を標的とする分子プローブを用いることで動脈硬化の質的診断への応用が期待されている。しかしながら、临床上最も切望される“破綻を起こす危険性の高い不安定プラークを特異的に”検出することのできる分子プローブは開発されていない。

ところで、動脈硬化病変の進行・不安定化したプラークの形成には病変内部・周辺組織・血流中に存在する様々な生体分子が関与しており、不安定プラークの発生・進行を詳細に評価するにはこれらの分子を網羅的に解析することが重要である。これまでに我々のグループでは、動脈硬化モデルマウス(ApoE 欠損マウス)の大動脈組織を用いてプロテオミクス解析を試み、病変ステージの進行への関与が疑われる複数のタンパク質を新たに同定することに成功した(J Proteome Res, 2015)。同定されたタンパク質のうち、特に不安定動脈硬化プラーク形成に深く関わる病変ステージ、期における病変動脈血管において、細胞外マトリックス構成分子であるThrombospondin-4(TSP4)の発現量が増加し、血液中においては病変ステージに関わらずその発現変化が認められなかったことから、TSP4が不安定動脈硬化プラークを特異的に描出するための標的分子として有望であると考えた。

2. 研究の目的

本申請課題では、不安定動脈硬化プラーク形成に深く関わる病変ステージ、期に発現量が増加したTSP4に対する新規SPECTイメージング剤“ ^{99m}Tc -HTA”を創製し、インビボにおいて動脈硬化病変進行に伴うプローブの放射能集積量・局在変化を調べることにより、不安定動脈硬化プラークの核医学診断プローブとしての有効性について評価することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 新規SPECTイメージングプローブ(^{99m}Tc -HTA)の設計・合成

Abramsらの報告(J Nucl Med, 1990)に従い、TSP4に対するモノクローナル抗体に二官能性キレートである6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid(HYNIC)を導入したHYNIC導入抗TSP4抗体(HTA)を作製した。さらに得られたHTAを $^{99m}\text{Tc}(\text{tricine})_2$ と反応させることにより、 ^{99m}Tc -HTAを得た(図1)。得られた ^{99m}Tc -HTAについて、サイズ排除クロマトグラフィー法を用いて放射化学的純度を算出した。また、比較対照として、抗TSP4抗体と同一サブタイプであるアイソタイプコントロール抗体についても上記と同様の方法でHYNIC導入抗体(HNA)を得た後、 $^{99m}\text{Tc}(\text{tricine})_2$ と反応させることにより、 ^{99m}Tc -HNAを得たHTAのTSP4に対する認識能については表面プラズモン共鳴法を用いて確認した。また、 ^{99m}Tc -HTAのマウス血漿中における化学的安定性について、添加24時間後まで経時的に測定した。

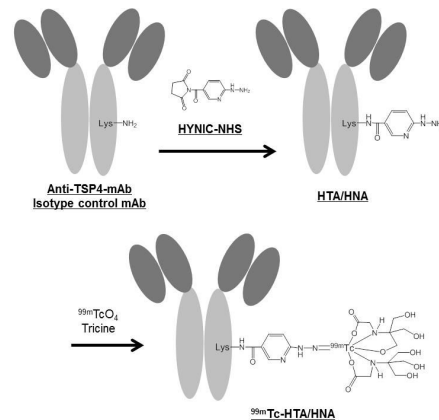


図1 ^{99m}Tc -HTA/HNAの合成経路。

(2) 動脈硬化モデルマウスにおける ^{99m}Tc -HTAの体内動態

^{99m}Tc -HTA (200-592 kBq/mouse) あるいは ^{99m}Tc -HNA (481-962 kBq/mouse)をApoE^{-/-}マウスあるいはC57BL/6J(Wild)マウス(35週齢、6週齢より高脂肪食給餌)にそれぞれ尾静脈投与し、投与24時間後に心臓採血により屠殺した後、各臓器を摘出した。摘出した臓器について、重量測定した後、放射エネルギーを測定した。摘出した大動脈血管について、縦軸方向に割いた後イメージングプレートに一晩露光し、オートラジオグラフィ(ARG)測定に供した。また、摘出した大動脈起始部については凍結薄切切片化した後、上記と同様の方法でARG測定に供した。

(3) 極性化マクロファージにおける^{99m}Tc-HNAの細胞取り込み検討

RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞をLipopolysaccharide (LPS)、Interferon gamma (INF γ)あるいはInterleukin-4 (IL-4)含有培地にて48時間培養し、M1(炎症応答惹起)、M2(抗炎症応答)細胞へ極性化した。極性化についてはInducible nitric oxide synthase (iNOS) (M1 マーカー)およびmannose receptor (MR) (M2 マーカー)の発現をqRT-PCR法により測定することにより確認した。各極性化マクロファージに^{99m}Tc-HNA (100 kBq/0.1 μ g/2 ml PBS)を添加し、添加1時間後に0.2N NaOHに溶解し、細胞由来の放射能を測定した。また上記の細胞溶解液について、BCA法により細胞由来のタンパク質量を求めた。

(4) 極性化マクロファージにおけるFc γ 受容体発現評価

(3)の方法で極性化したRAW264.7 マウスマクロファージ様細胞をRIPA bufferに溶解した後、溶解液に含まれるFc γ Receptor I, II, IIIの含有量をWestern Blot法を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 新規SPECTイメージングプローブ(^{99m}Tc-HTA)の設計・合成

^{99m}Tc-HTAおよび^{99m}Tc-HNAを図1の合成経路に従い合成したところ、放射化学的収率17.6 \pm 3.8%および31.8 \pm 6.8%で得られた。また得られた^{99m}Tc-HTAおよび^{99m}Tc-HNAの放射化学的純度はいずれも99%以上であった。得られたHTAのTSP4に対する結合能(解離定数)は10.4 \pm 1.2 nMであり、HTAの母体化合物である抗TSP4モノクローナル抗体の解離定数(3.6 \pm 0.6 nM)とほぼ同等であった。一方HNAについてはTSP4に対する結合能は認められなかった。以上のことから、HYNICの導入後もTSP4に対する結合能を保持していることを確認した。また、^{99m}Tc-HTAのマウス血漿中における放射化学的純度を求めたところ、添加24時間後まで90%以上であったことから、^{99m}Tc-HTAはマウス体内において長時間血液中に安定した状態で滞留することが示唆された。

(2) 動脈硬化モデルマウスにおける^{99m}Tc-HTAの体内動態

^{99m}Tc-HTAはApoE $^{-/-}$ マウス大動脈において、Wildマウスと比べて有意に高い集積を示した(0.22 \pm 0.07 (ApoE $^{-/-}$) vs. 0.10 \pm 0.01 (Wild) %ID/g, p<0.05)。一方、ApoE $^{-/-}$ マウス大動脈における^{99m}Tc-HTAの集積量はWildマウ

スと比べて有意に高くなると共に(0.22 \pm 0.03 (ApoE $^{-/-}$) vs. 0.12 \pm 0.02 (Wild) %ID/g, p<0.05)。その集積量は^{99m}Tc-HTAとほぼ同等であった(図2)。

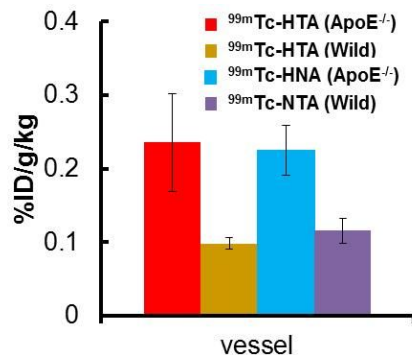


図2 ^{99m}Tc-HTA/HNA投与24時間後におけるApoE $^{-/-}$ マウスおよびWild (C57BL/6J)マウス大動脈の放射能集積量。

また、ApoE $^{-/-}$ マウス大動脈における^{99m}Tc-HTAおよび^{99m}Tc-HNAの放射能分布をARG法により評価したところ、いずれの薬剤も大動脈内の動脈硬化病変部位に局在することを認めた(図3)。

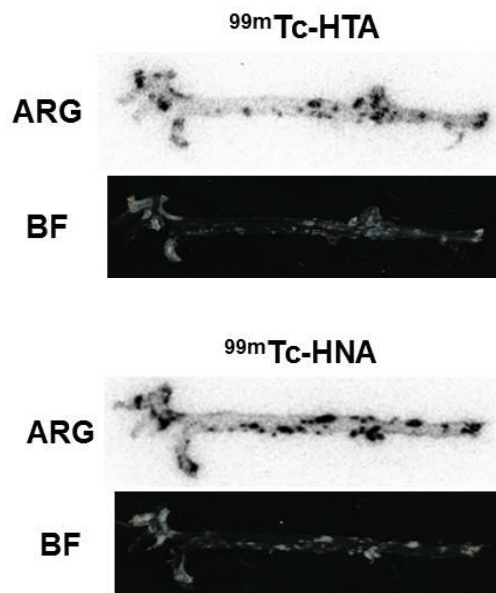


図3 ^{99m}Tc-HTA/HNA投与24時間後におけるApoE $^{-/-}$ マウス大動脈のARGおよび明視野(BF)画像。

さらに^{99m}Tc-HNA投与ApoE $^{-/-}$ マウス大動脈起始部における放射能分布はマクロファージ(Mac-2)陽性領域と類似していることを見出した(図4)。

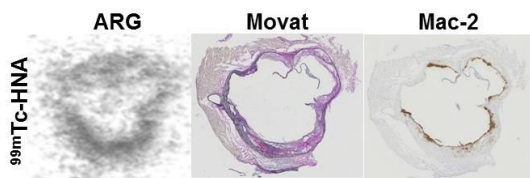


図4 ^{99m}Tc -HNA 投与 24 時間後における ApoE^{-/-} マウス大動脈起始部 ARG 画像および Movat 染色、Mac-2(マクロファージ)染色画像。

以上の事から ^{99m}Tc -HNA は動脈硬化病変内のマクロファージ浸潤領域に集積していることが示唆された。

(3) 極性化マクロファージにおける ^{99m}Tc -HTA の細胞取り込み検討

^{99m}Tc -HNA を M1、M2 極性化あるいは未極性化 (M0) RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞に添加し、添加 1 時間後に各細胞の放射能を測定したところ、M1 マクロファージにおいて M2 および M0 マクロファージと比べて有意に高い放射能集積を認めた(図 5)。

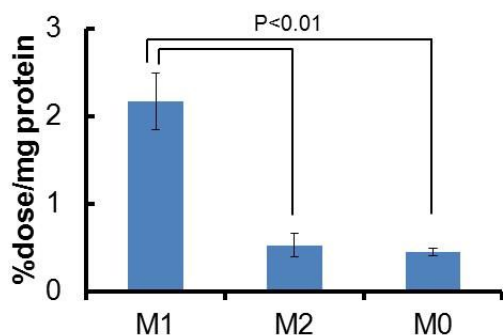


図5 各極性化 RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞における ^{99m}Tc -HNA 集積量(添加 1 時間後)。

(4) 極性化マクロファージにおける Fcγ 受容体発現評価

M1、M2 極性化あるいは未極性化 (M0) RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞における各 Fcγ 受容体の発現量を Western Blot 法を用いて評価したところ、Fcγ 受容体 I および II については M1 マクロファージにおいて、M2 および M0 マクロファージと比べて高い発現を認めた。一方、Fcγ 受容体 III についてはいずれのマクロファージにおいてもほぼ同等の発現量であった。

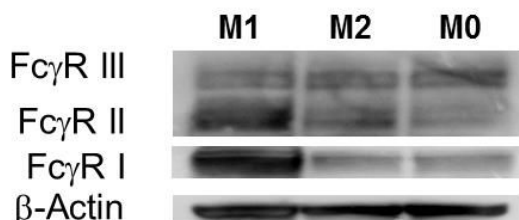


図6 各極性化 RAW264.7 マウスマクロファージ様細胞における Fcγ 受容体 (FcγR) I-III の発現評価 (Western Blot)。

以上、本申請課題では不安定動脈硬化プラークを特異的に発現する TSP4 を標的とした SPECT イメージング剤である ^{99m}Tc -HTA の創製に成功した。しかしながら、 ^{99m}Tc -HTA により動脈硬化病変内に発現した TSP4 を特異的に可視化するにはさらなる改善が必要であることも示唆された。一方、モノクローナル抗体を母体骨格とする ^{99m}Tc -HNA も動脈硬化病変、特にマクロファージ浸潤領域に集積することを見出すと共に、 ^{99m}Tc -HNA は炎症惹起性マクロファージである M1 マクロファージに高集積し、この集積はマクロファージに発現した Fcγ 受容体由来である可能性を見出した。本来の目的である病変内に発現した TSP4 を可視化することによる動脈硬化診断法の確立には至らなかったものの、 ^{99m}Tc -HNA を用いることにより動脈硬化病変内の炎症性マクロファージの可視化が可能であることを見出した。

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 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 6 件)

1. **志水陽一**、半澤宏子、趙莞、福良沙霧、西嶋剣一、趙松吉、坂本健、玉木長良、小川美香子、久下裕司：動脈硬化症における Thrombospondin-4 の発現変動解析：核医学診断のための標的バイオマーカーとしての評価、日本薬学会第 136 年会、2016.3.29、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)
2. Sagiri Fukura, **Yoichi Shimizu**, Hiroko Hanzawa, Ken-ichi Nishijima, Takeshi Sakamoto, Songji Zhao, Mikako Ogawa, Yuji Kuge: Radiolabeled immunoglobulin G visualizes active inflammation in atherosclerosis, Ninth Japan-China Joint Seminar on Radiopharmaceutical Chemistry, 2015.11.9、放射線医学総合研究所 (千葉県、千葉市)
3. **志水陽一**：質量分析法を用いた放射性薬剤の開発基盤形成・作用機序解明への取り組み、第 14 回日本質量分析学会北海道談話会・講演会、2015.7.24、北海道大学薬学部(北海道、札幌市)
4. **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, Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2015, June 9th, 2015.6.9, Baltimore(米国)

5. **志水陽一**、半澤宏子、趙莞、趙松吉、福良沙霧、西嶋剣一、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、2015.5.20-21、タワーホール船堀(東京都、江戸川区)
6. **志水陽一**、半澤宏子、趙莞、趙松吉、福良沙霧、西嶋剣一、坂本健、玉木長良、久下裕司: 動脈硬化病変への免疫グロブリン G 集積機序の探索: 動脈硬化診断用薬剤開発への応用に関する基礎的検討、日本薬学会第 135 年会、2015.3.27、神戸サンボホール(兵庫県、神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

1. **Shimizu Y***, Hanzawa H, Zhao Y, Nishijima KI, Sakamoto T, Zhao S, Tamaki N, Kuge Y. Radioimmunodetection of Atherosclerotic Lesions Focusing on the Accumulation Mechanism of Immunoglobulin G. Perspectives on Nuclear Medicine for Molecular Diagnosis and Integrated Therapy (Springer Open) 2016. 141-150

〔産業財産権〕

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/bunseki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志水 陽一 (SHIMIZU, Yoichi)

北海道大学・大学院薬学研究院・ 助教

研究者番号: 90634212

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし