

令和 2年 3月 31日

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860005

氏 名

小澤公哉

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

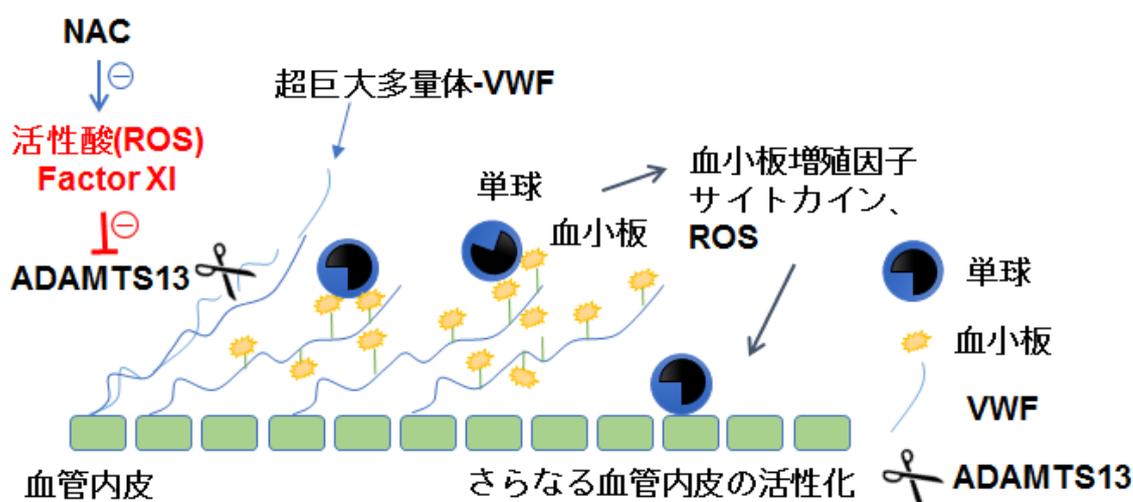
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

## 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ポートランド（国名： 米国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。  
粥腫形成と再灌流傷害の分子画像でのフォンウィルブランド因子と血小板の新規病態解明
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名  
オレゴン健康科学大学、ナイト心血管研究所  
(Oregon Health & Science University, Knight cardiovascular institute)
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**  
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)  
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

近年、心血管疾患に対する造影超音波を用いた非侵襲的な分子イメージング法の開発が進み、前臨床の段階における病態解明や新規治療薬の効果判定への応用が注目されている。超音波造影剤のマイクロバブルに標的となる分子を設定することで、血液と血管内皮の表面における分子の集積の定量評価が可能である。この研究計画では、脂質シェルのマイクロバブル（約2 μm）による造影超音波分子イメージングを用いて、血管内皮のイベントを評価した。この造影剤であるマイクロバブルは50000-75000のリガンドをストレプトアビジン-ビオチンの手法で結合させることでその標的となる分子を検出することが可能である。現時点では、VWF-A1 ドメイン、血小板 GPIb α、血管内皮接着分子を標的にして、マウス並びに霊長類に対する手法が確立しており、今後、ヒトでの応用を考えている。

本研究の全体の目的は、**造影超音波による分子イメージング技術を用いて、心血管疾患における血小板やフォンウィルブラント因子（Von Willebrand factor：VWF）の役割及び、炎症反応との関連を明らかにして、新しい治療方法を開発することである。**具体的には (1) アテローム性動脈硬化の粥腫形成、(2) 心筋虚血再灌流傷害の2つの病態の解明並びに新しい治療方法の開発を行うことを考えている。さらに最終的には基礎研究で明らかにしたことをヒトで応用し、**実践的な検査法や治療法の基盤を確立するトランスレーショナルリサーチを实践したい。**動脈硬化において、血小板-血管内皮相互作用はその進行に関与しているが、初期の粥腫形成における役割は完全には解明されていない。心筋虚血後の冠微小循環傷害や no-reflow 現象は再灌流治療後に直面する重大な問題だが、微小血管における血管内皮と血小板の接着における新しい治療の開発は進んでいない。血管内皮細胞で巨大多量体として産生される VWF は ADAMTS-13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13) により切断され調節されている。血栓性血小板減少性紫斑病は ADAMTS-13 活性が著減し、VWF 多重体が切断されず血中に蓄積して過剰な血小板凝集と血栓形成が生じるが、申請者は「アテローム性動脈硬化の粥腫形成や虚血再灌流傷害の心筋では血管内皮由来の VWF が調節異常により増加し、血小板の集積が起こる」という仮説を考えている (Fig.1)。派遣先では活性化された VWF や血小板接着を標的とした分子イメージングが可能である。



**Fig.1 血小板に関わる病態生理と治療のターゲット**  
**VWF: Von Willebrand factor、NAC: n-acetylcysteine**

本研究の特異的な目的と内容は下記である。

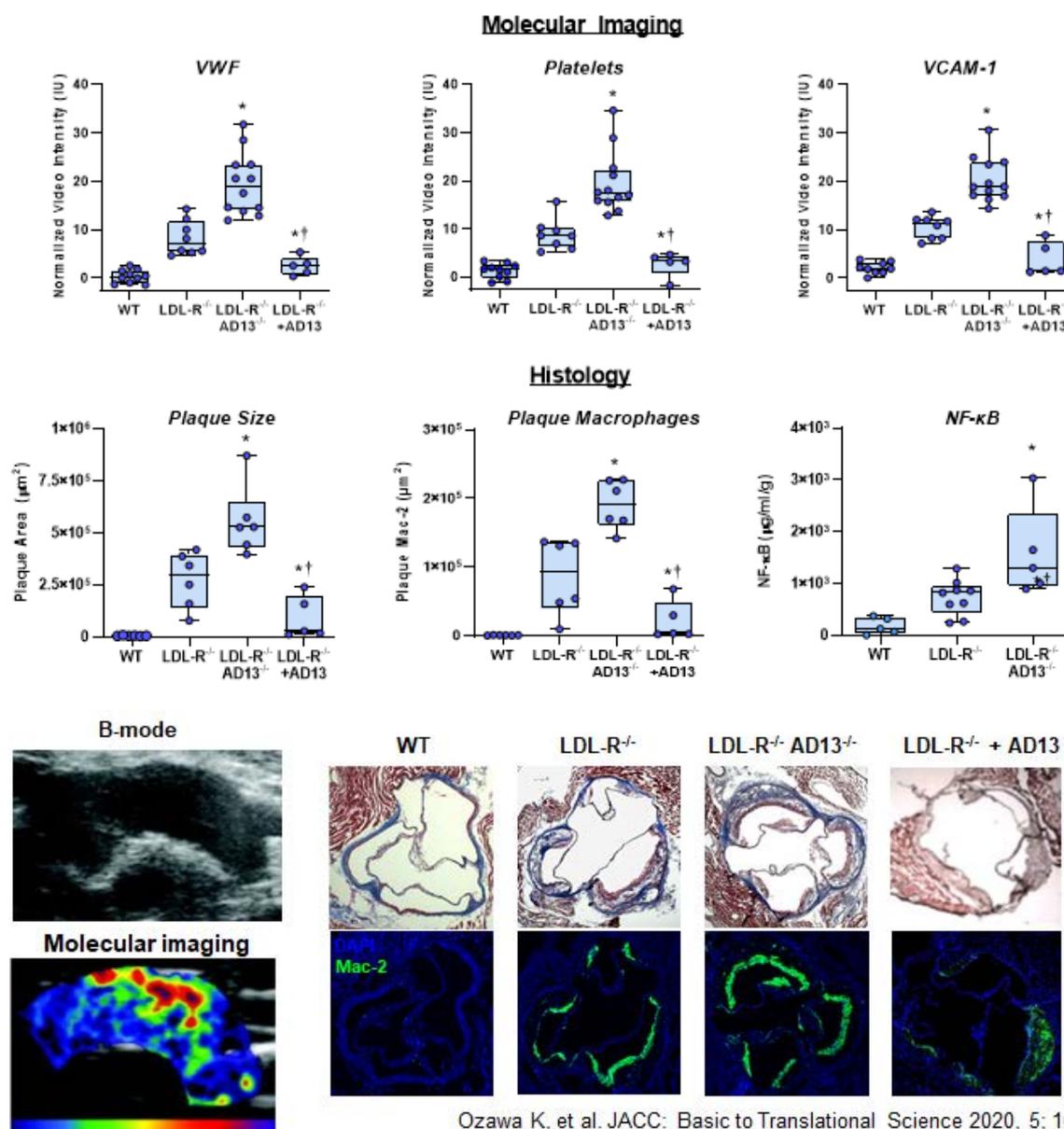
1). 動脈硬化における VWF と誘導される血小板の直接的な病態生理の同定

アテローム性動脈硬化の粥腫形成における VWF と血小板の直接的な病態生理を分子イメージングで明らかにすることである。(1)通常食の野生型(Wild-type:WT)、(2)通常食の LDL 受容体欠損(LDLR -/-)、(3)西洋食(western style diet: WSD)の LDLR -/-、(4)西洋食(WSD)の ADAMTS-13 と LDL 受容体欠損(ADAMTS13 -/- LDLR -/-) マウスの早期 (20 週齢) と中期 (30 週齢) の動脈硬化に対して、血小板、VWF、血管内皮接着分子 (vascular cell adhesion molecule- ; VCAM-1 および P セレクチン) を標的とした分子イメージングを行い、その集積を評価した。ADAMTS-13 非欠損の西洋食を与えた動脈硬化マウス (ADAMTS-13 +/+、LDLR -/-) には、上記に加え ADAMTS-13 の補充療法を行い VWF、血小板、血管内皮接着分子の集積を評価した。ADAMTS-13 補充療法は 1) 浸透圧性のミニポンプを用いた 2 週間の慢性投与、2) 分子イメージングの施行 1 時間前に行った急性投与の 2 つを行った。

それぞれのマウス群において、非侵襲的な血圧測定器を用いて収縮期血圧、拡張期血圧、脈圧を測定し、超音波にて大動脈の収縮期径ならび拡張期径から動脈径変化率を測定し、動脈硬化の指標となる大動脈伸展性の計測を行った。マウスの大動脈洞、下行大動脈に対して、Masson trichrome 染色によって動脈硬化プラーク面積を測定し、抗 CD41 抗体ならび抗 Mac-2 抗体による蛍光免疫染色を用いて動脈硬化の血小板数と Mac-2 面積を測定した。そして、下行大動脈を均質化して、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)を用いて NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) を測定した。

分子イメージングの結果、20 週齢、30 週齢の西洋食 ADAMTS13  $-/-$ LDLR  $-/-$ 群では他と比較し、血小板、VWF、血管内皮接着分子の動脈硬化への集積は有意に大きかった( $p < 0.05$ )(Fig.2)。30 週齢の WSD の LDLR  $-/-$ 群に急性の ADAMTS13 治療を行ったところ、血小板と VWF の信号の低下を認めたが( $p < 0.05$ )、P セレクチンの低下は認めなかった。しかし、浸透圧性のミニポンプを用いた持続的な ADAMTS13 治療を行ったところ血小板、VWF の信号の低下に加えて、血管内皮接着分子である VCAM-1 と P セレクチンの有意な低下を認めた ( $p < 0.05$ )。

収縮期血圧、拡張期血圧は西洋食の ADAMTS13  $-/-$ LDLR  $-/-$ 群では、WT 群、通常食 LDLR  $-/-$ 群と比較し有意に高値であり( $p < 0.05$ )、大動脈伸展性の低下も認めた( $p < 0.05$ )。30 週齢の下行大動脈の ELISA における NF- $\kappa$ B も西洋食 ADAMTS13  $-/-$ LDLR  $-/-$ 群で最も高値であった(西洋食 ADAMTS13  $-/-$ LDLR  $-/-$  > 西洋食 LDLR  $-/-$  > 通常食 LDLR  $-/-$  > WT)。病理組織の結果、30 週齢の西洋食 ADAMTS13  $-/-$ LDLR  $-/-$ 群では他と比較し、有意に大動脈洞と下行大動脈の動脈硬化プラーク面積が高値であり、蛍光免疫染色においても動脈硬化の Mac-2 面積、血小板接着の数が高値であった(西洋食 ADAMTS13  $-/-$ LDLR  $-/-$  > 西洋食 LDLR  $-/-$  > 通常食 LDLR  $-/-$  > WT)。2 週間の持続的な ADAMTS13 治療により動脈硬化プラーク、Mac-2 面積、血小板接着を低下させた。



**Fig. 2**

以上の結果から、動脈硬化の早期から中期において血管内皮の VWF の制御異常は血小板接着と血管内皮の炎症性接着分子のアップレギュレーションに関与していた。これらの相互作用は動脈硬化の形成や進展に重要な役割を果たしており、新規治療に貢献できる可能性が示唆された。本研究内容は、2019 年 12 月に行われたヨーロッパ心臓超音波学会の Young Investigator Award で発表し、JACC Basic Transl Sci. 2020 Oct 14;5(10):1017-1028 で論文発表を行った。

2). 分子イメージングを用いた虚血再灌流傷害における血小板の微小血管への接着と VWF の役割を同定

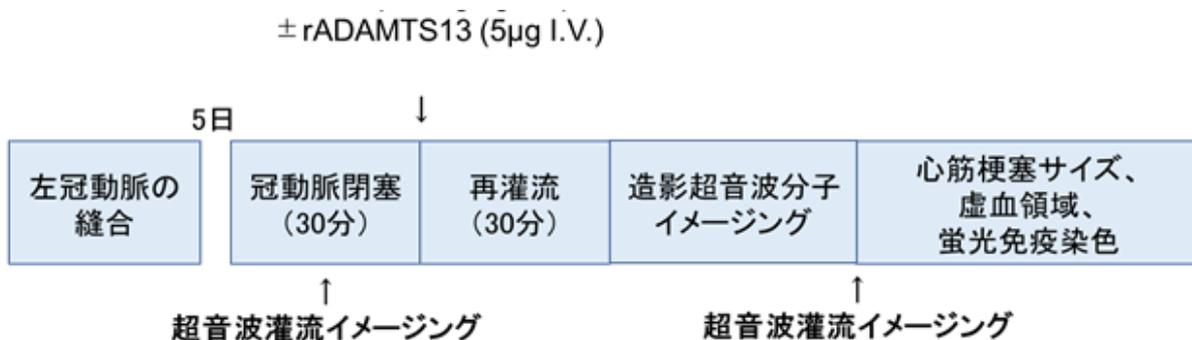


Fig.3 実験プロトコール

本研究では分子イメージングを用いて、心筋虚血再灌流傷害における血小板の微小血管への接着と VWF の役割を同定する。閉胸下での虚血再灌流傷害のマウスにおける血小板と VWF を標的とした分子イメージングを行い、虚血危険領域、正常領域のそれぞれの心筋において解析を行った。①野生型、②ADAMTS-13 欠損、③野生型+ADAMTS-13 補充療法、の3群に血小板、VWF を標的とした分子イメージングを行い、その集積を比較した。動脈硬化型マウスは C57Bl/6 を背景として LDLR 受容体ならびに apolipoprotein-B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 1 (ApoBc-1) をダブルノックアウト (DKO) させて作成した。この動脈硬化型マウスは高脂血症が持続し、年齢依存的に動脈硬化を形成することが確認させている。具体的な方法として 10~20 週齢のマウスに画像評価前の 5 日-7 日前に左前下行枝に縫合糸をかける (Fig.3)。そして、炎症が落ち着いた後、閉胸下で左前下行枝の縫合糸を閉塞させて、心筋虚血状態とした。30 分の心筋虚血後に再灌流をして、30 分後に VWF と血小板を標的とした分子イメージングを行った。その後、左冠動脈前下行枝を再度閉塞して、蛍光マイクロスフィアを投与して虚血危険領域を決定し、後述の梗塞領域を除いた部分を非梗塞の虚血危険領域と定義した。心筋梗塞領域は、2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) における非染色部とした。心筋は 7 断面にスライスして各断面で虚血危険領域、心筋梗塞領域を測定した。同条件のマウスにおいて、虚血再灌流後に灌流イメージングを行い、各領域において血流量を測定した。心筋虚血再灌流傷害直後 (Day0) と 3 日後 (Day3)、虚血危険領域と正常領域の微小血管において、抗 CD41 抗体 (血小板)、抗 Ly-6G 抗体 (好中球) による蛍光免疫染色を用いて血小板、単球、好中球の集積を評価した。

分子イメージングの結果、野生型マウスの Sham や正常領域では VWF と血小板接着の増加は認めなかったが、虚血危険領域では有意に高値であった。ADAMTS13<sup>-/-</sup>マウスでは野生型と比較し、虚血危険領域での VWF と血小板接着は有意に高値であった。野生型マウスに ADAMTS13 治療を行ったところ虚血危険領域の VWF と血小板接着は改善した。

灌流イメージングの結果、虚血再灌流傷害後の虚血危険領域では、正常領域と比較し心筋血流量の低下を認め、特に ADAMTS13<sup>-/-</sup>マウスで有意に低下を認めた。虚血危険領域の面積は各マウス群で同等であり有意差を認めなかったが、虚血危険領域面積で補正した心筋梗塞サイズは ADAMTS13<sup>-/-</sup>マウスで有意に上昇を認め、野生型マウスは ADAMTS13 治療によって心筋梗塞サイズの改善を認めた。さらに、抗 CD41 抗体による血小板の免疫染色において、ADAMTS13<sup>-/-</sup>マウスでは野生型マウスと比較し、虚血危険領域において有意な血小板接着を認め、野生型マウスに ADAMTS13 治療を行ったところ血小板接着の改善を認めた。

心筋虚血再灌流後、虚血領域において VWF と血小板の発現が亢進し、特に ADAMTS13 欠損モデルでは野生型と比較し、その発現は高値であった。VWF や血小板接着が高値である ADAMTS13 欠損モデルでは野生型と比較し、虚血再灌流部位で心筋血流量が低下し、心筋梗塞サイズが大きかった。

以上より、心筋虚血再灌流傷害において、ADAMTS13 欠損モデルでは、野生型と比較し、虚血領域において VWF と血小板の発現が亢進しており、心筋血流量が低下し、心筋梗塞サイズも増大していた。野生型に対して ADAMTS13 による治療を行うと VWF と血小板の発現を抑制し、心筋血流量を改善し、心筋梗塞サイズも低下させた。心臓超音波分子イメージングを用いることで心筋の微小血管における血小板や VWF を評価することが可能であり、灌流イメージングを従来の研究手法に追加することで心筋虚血エリアにおける心筋血流量の評価が可能となり、心筋梗塞サイズにどう寄与するかを明らかにすることが可能であった。

この研究成果は 2018 年の American College of Cardiology 年次集会で発表し、論文発表も行った (Circ Cardiovasc Imaging. 2018 Nov;11(11):e007913.)。さらに本研究の関連する研究内容については第 29 回日本心エコー図学会 (2018 年 4 月、盛岡、日本) Young Investigator's Award、第 30 回米国心エコー図学会 (2019 年 6 月、Portland、USA) Young Investigator's Award で発表を行った。

本研究では、小動物に対して造影超音波分子イメージングという新しい技術を用いて、アテローム性動脈硬化の粥腫発生と心筋虚血再灌流傷害の病態の VWF と血小板の役割について検討した。今後の展望として、上記の研究で明らかにしたことを大型動物で応用し、ヒトを対象として臨床試験を行うトランスレーショナル研究を实践したい。そのためには、マウスなどの小動物を用いた更なる研究に加えて、ヒトと同じ動脈硬化を示す霊長類を用いて行う研究を計画している。そしてその効果や安全性を確認後、Investigational New Drug (IND) Application を申請して最終的にはヒトでの臨床試験を実施したいと考えている。

本研究に加えて、造影超音波であるマイクロバブルに超音波を照射することで組織の血流量を改善する結果も予備実験では得られており、血栓症に対する新しい治療になり得る。そのため、急性心筋梗塞や末梢血管疾患の患者に対して、マイクロバブルを用いた超音波造影剤を用いて血流を改善するかどうかを目的とした研究を行うことも並行して行っている。