

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 201860691

氏名 大塚 孝一郎

(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：ボストン (国名：アメリカ合衆国)
2. 研究課題名（和文）  
生体内コラーゲンの可視化と冠動脈病変の進行・不安定化における役割の解明
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 28 日
4. 受入機関名及び部局名  
ハーバード大学 マサチューセッツ総合病院 Wellman Center for Photomedicine
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。

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における後期高齢者の循環器病と脳卒中の死亡者数は悪性新生物による死亡者数を上回り、これらの疾患への対策は超高齢化社会を迎える我が国の緊急課題である。動脈硬化性プラークの進展様式には、病変の量的変化（冠動脈内腔の狭窄・虚血の進行）と病変の質的变化（冠動脈プラークの不安定化）が存在する。これまでの病理学および臨床研究から、病変の質的变化（不安定化）が急性心筋梗塞の発症における独立した予測因子であることが示されている (Virmani R, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:1262-75、Stone GW et al. N Engl J Med 2011;364:226-235)。光干渉断層法 (optical coherence tomography; OCT) は、10  $\mu\text{m}$  の高解像度で生体内組織の構造的特徴を可視化するイメージング技術である。冠動脈内で冠動脈プラークを可視化するカテーテル型 OCT の開発により、冠動脈プラークの構造的特徴が急性冠症候群発症に及ぼす影響が明らかとなりつつある (Tarkin JM, et al. Circulation Res 2016 19;118:750-69)。コラーゲン沈着とコラーゲン性状の改変（コラーゲンリモデリング）が動脈硬化病変の最早期の質的变化と考えられている (Libby P. N Engl J Med 2013;368:2004-13)。しかし、冠動脈プラークのコラーゲン性状を生体内で定量評価する方法はこれまで存在しなかった。したがって、生体内コラーゲンリモデリングがプラーク不安定化に及ぼす役割は未解明で、これらを標的とした治療介入方法は未だ確立していない。

これらの課題を解決するために、次世代 OCT としてより詳細なプラーク組織性状を評価する蛍光イメージングや光音響効果イメージング、OCT の浅いシグナル深達度を補完するための血管内超音波との融合、そして、より微細なプラーク構造を可視化する超高解像度 OCT の開発が進んでいる (Yun SH, Tearney GJ, et al. Nature Med 2006;12:1429-1433)。しかしながら、これらの新規血管内イメージングの臨床応用には、カテーテル自体の開発を必要とする。**偏光感受性 (polarization-sensitive; PS) 光干渉断層法 (optical coherence tomography; OCT)** は、OCT による構造的観察に加え、組織の偏光特性を測定することでプラーク性状を観察できるイメージング技術である (Nadkarni SK, et al. J Am Coll Cardiol. 2007;49:1474-81)。マサチューセッツ総合病院 (Massachusetts General Hospital: MGH) の Bouma 研究室では、従来型 OCT カテーテルを使用し偏光測定を可能とするカテーテル型 PS-OCT を開発した (図 1)。これにより、OCT 画像から得

られる冠動脈プラークの微細構造に加えて、コラーゲンリモデリングを含めたプラーク性状を定量測定することが可能となる。

本研究では、生体内でコラーゲン性状を評価するカテーテル型 PS-OCT を開発し、冠動脈コラーゲン性状と冠動脈プラーク不安定化との関係性の解明を

目的とした。さらにカテーテル型 PS-OCT の臨床応用研究を行い、冠動脈プラーク不安定化におけるコラーゲンリモデリングの意義を解明することを目標とした。

図 1. 従来型 OCT と偏光感受性 OCT の特徴

従来型光干渉断層法 (OCT)	偏光感受性光干渉断層法 (PS-OCT)	
Reflection intensity (Int) 光強度	Birefringence ( $\Delta n$ ) 複屈折	Depolarization 偏光解消度
高い空間分解能 プラーク構造の可視化	プラークの組織性状の補完 偏光測定による定量的な分析	
脂質、石灰化、線維性皮膜、 マクロファージ、新生血管	コラーゲン 血管平滑筋	マクロファージ 脂質・壊死性コア
・本邦で臨床応用されている OCT イメージングカテーテルを使用 ・偏光測定用の OCT コンソール (MGH プロトタイプ) を使用 ・OCT と PS-OCT 画像はカテーテル検査室で同時に取得、画像の描出が可能		

## 2. 研究開始当初の目的

本研究では、生体内でコラーゲン性状を評価するカテーテル型 PS-OCT を開発し、冠動脈コラーゲン性状が冠動脈プラークの進行と不安定化との関係性の解明を目的とした。さらにカテーテル型 PS-OCT を用いてヒト生体内で冠動脈プラークのコラーゲン性状を評価することで冠動脈プラークの不安定化メカニズムの解明を目的とした。

具体的に研究開始時点で以下の 4 つの目標を立て派遣期間中に 1-3 の研究を行った。

- 1) カテーテル型 PS-OCT と偏光測定解析方法の開発
- 2) カテーテル型 PS-OCT を用いたヒト剖検心冠動脈プラーク病理との比較
- 3) 生体冠動脈におけるカテーテル型 PS-OCT を用いた偏光測定解析

#### 4) 偏光測定を用いたヒト生体冠動脈のコラーゲンリモデリングの経時的評価

### 3. 研究の方法及び研究成果

#### 1) カテーテル型 PS-OCT と偏光測定解析方法の開発

PS-OCT はコラーゲンや平滑筋などの層状構造が有する複屈折性を定量し、OCT の高い空間解像度に加えて、詳細な組織性状の断層像を構築するイメージング技術である。1990 年代に顕微鏡型 PS-OCT が考案され、眼科、神経、消化器、癌領域において、特に研究領域で利用されている (de Boer JF, et al. Biomed Opt Express. 2017;8:1838-73)。

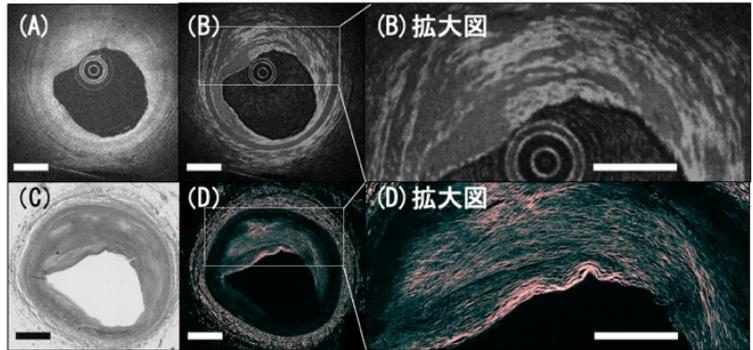
コラーゲン分子は単一波長光を照射された場合、位相の異なる 2 種類の透過光(進相軸と遅相軸)を生じる。遅相軸はコラーゲンの配列方向と一致し、進相軸はコラーゲン配列方向と直行する。PS-OCT は、これらの遅相軸と進相軸の位相差 ( $\Delta n = n_e - n_o$ ) を複屈折として測定している。一般に規則正しく配列した線維性組織ほど高い複屈折を有する。コラーゲンは動脈硬化病変における細胞外基質の構成タンパク質で、血管平滑筋細胞から合成される。コラーゲンは線維性被膜の機械的安定性に寄与し、炎症性マクロファージが産生するマトリックス

メタロプロテアーゼにより分解され、コラーゲン組織の改変と線維性被膜の菲薄化が起こりプラーク破綻に至ると考えられている (Libby P. N Engl J Med 2013;368:2004-13)。PS-OCT は、コラーゲンや血管平滑筋細胞の有する複屈折性を定量することで、プラークの安定性を評価できる可能性があると期待されている (Giattina SD, et al. Int J Cardiol 2006;107:400-9, Nadkarni SK, et al. J Am Coll Cardiol. 2007;49:1474-81)。

2007 年に Nadkarni らは顕微鏡型 PS-OCT を使用してヒト大動脈プラークの複屈折を定量評価した。病理組織標本で得られたコラーゲン線維や血管平滑筋細胞を認める領域と PS-OCT により測定された複屈折性が相関することを報告した (Nadkarni SK, et al. J Am Coll Cardiol 2007;49:1474-81)。従来の OFDI (optical frequency domain imaging) カテーテルを用いた偏光測定には、OFDI システムのコンソール側に偏光感知器の追加が必要である。さらに、カテーテル型 PS-OFDI により測定される偏光状態は、システム内の光ファイバー、組織内での偏光の深さ方向への伝播、そしてカテーテル自体の回転により影響を受ける。したがって、検出された偏光状態のアーチファクトを軽減するスペクトラルバイニング法の開発により (Villiger M, et al. Optics Express 2013; 21:16353, Otsuka K, et al. Circulation Reports 2019;1:550-557)、OFDI カテーテルを介した偏光測定が可能となった (Villiger M, et al. JACC Cardiovasc Imaging. 2018;11:1666-76)。

PS-OCT/OFDI は、複屈折性に加えて偏光状態のランダム性に対応する偏光解消度 (depolarization) を測定できる (Lippok N, Villiger M, et al. Nat Photonics. 2017;11:583-588, Villiger M, et al. JACC Cardiovasc Imaging. 2018;11:1666-76) (図 1、3)。偏光状態の散乱を引き起こす組織、例えば脂質成分およびマクロファージの集簇により偏光解消度は上昇する (図 3)。PS-OCT における偏光解消の範囲は、ランダム性のない完全偏光の 0 から、完全にランダムな偏光状態を 1 と定義している。偏光解消度が上昇する領域では複屈折性を正確に評価することが難しいため、PS-OCT では偏光解像度の上昇を認めない領域の複屈折性を断層画像として表示している。

図 2. PS-OCTにより可視化されたコラーゲン局在



(A) 従来型OCT画像、(B) PS-OCT複屈折性画像

(C) マッソントライクローム染色

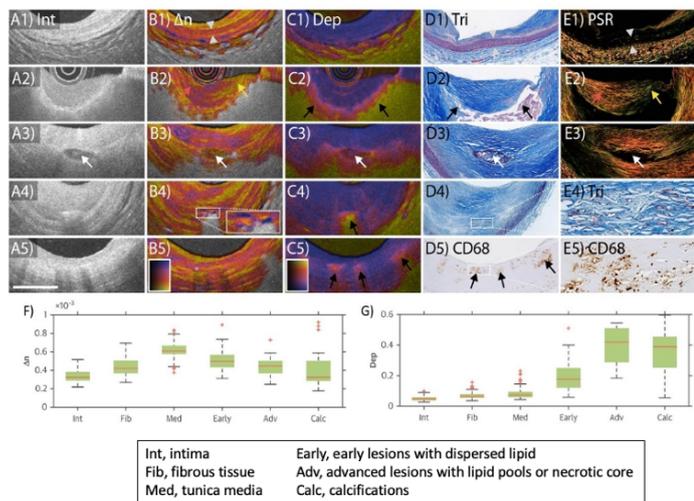
(D) ピクロシリウスレッド染色

PS-OCTによりコラーゲン局在が明瞭に可視化される(図B、D拡大図)。実際のPS-OCTは複屈折性に応じたカラーマップによりコラーゲン性状と局在を可視化できる。

## 2) カテーテル型 PS-OCT を用いたヒト剖検心冠動脈プラーク病理との比較

図2はカテーテル型 PS-OCT を用いたヒト剖検心冠動脈における偏光測定と病理組織切片との比較を示している(図3、Villiger M, et al. J Am Coll Cardiol Img 2018;11:1666-76)。冠動脈中膜が最も高い複屈折を有し、線維成分を認める内膜領域が高い複屈折性を有することが観察された。顕微鏡型 PS-OCT の研究と同様に、複屈折性の主な要因はコラーゲンと血管平滑筋細胞であることが示唆された。また、脂質/壊死性コアを有するプラークで高い偏光解消度が観察された。偏光解消度はコレステロールクリスタルやマクロファージの集簇、壊死性コアを客観的に検出できると期待されている。

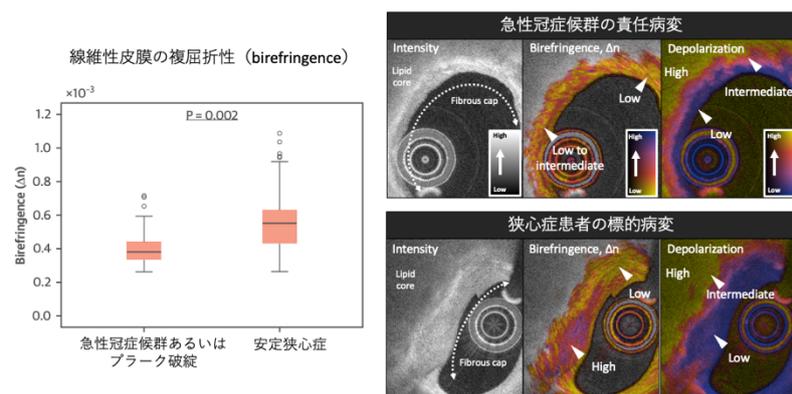
図3. ヒト冠動脈病理標本と偏光測定画像の比較



## 3) 生体ヒト冠動脈におけるカテーテル型 PS-OCT を用いた偏光測定解析

Bouma 研究室では、エラスムス大学医療センターとの共同研究において冠動脈疾患患者(30名)を対象にカテーテル型 PS-OCT/OFDI のパイロット試験を行った。PS-OCT/OFDI は従来の OFDI イメージングカテーテルと MGH で開発したカスタムコンソールを用いて行った。PS-OCT/OFDI を用いた生体内冠動脈プラークの偏光測定により、再現性のある偏光状態の測定結果が得られた (Villiger M, Otsuka K, et al. IEEE Trans Med Imaging. 2018;37:1618-25)。さらに、脂質含有量の少ないプラークにおいては比較的高い複屈折性が観察され、脂質含有量の多いプラークでは顕著な脱分極の上昇が観察された。ACS あるいはプラーク破綻を有する病変の線維性被膜では、安定狭心症患者の線維性皮膜よりも有意に低い複屈折性が観察された(図4、Otsuka K, et al. J Am Cardiol Cardiol Img 2020;13:790-801)。これにより、線維性皮膜における血管平滑筋細胞の欠如やコラーゲン性状を客観的に診断できる可能性が示唆された。また、プラーク破綻後の血栓形成と血管治癒過程ではコラーゲン III 型の沈着とコラーゲン I 型への置換は、組織の複屈折性の変化をもたらすため、複屈折性は血栓の器質化と治癒過程を生体内で観察できる可能性がある。

図4. ヒト生体冠動脈における PS-OCT を用いた偏光測定



一方、線維性皮膜における偏光解消度の検討においては、偏光解消度と normalized standard deviation (NSD) との間に有意な正の相関が観察された。NSD はマクロファージの存在を示唆する OCT のメトリックであるため (Tearney GJ, et al. Circulation. 2003;107:113-119)、偏光解消度により線維性被膜内のマクロファージ集簇を検出できる可能性があると考えられる。またステント留置後の新性動脈硬化は、脂質含有マクロファージの存在により定義されるため、偏光解消度の測定は、生体内での新性動脈硬化の客観的診断に有用であると考えられる。

#### 4. 本研究からの今後の展開

本研究では、従来の OCT 画像による解剖学的特徴に加えて、生体内で偏光特性（複屈折性と偏光解消度）を応用したプラーク性状を定量評価できるカテーテル型 PS-OCT を用いた血管内偏光測定法を開発した。申請者らは世界に先駆けて、カテーテル型 PS-OCT により測定された複屈折性はコラーゲンや血管平滑筋などの規則正しく配列した層状構造により上昇すること、そして偏光解消度はマクロファージや脂質・壊死性コアの上昇を検出できることを報告した (Villiger M, et al. J Am Coll Cardiol Img 2018;11:1666-76)。さらに、ACS やプラーク破綻病変では、慢性冠動脈疾患の病変と比較して複屈折性が有意に低いことを報告し、線維性皮膜の安定性とコラーゲン性状との関連が示唆された (Otsuka K, et al. J Am Coll Cardiol Img 2020;13:790-801)。しかし、これらの検討では血管治癒過程を経時的に評価できていない。したがって今後の研究の展開として、「PS-OCT によるコラーゲン性状の評価が新たな不安定プラークの指標となり得るか？」、さらには、「生体内でのコラーゲン性状分布やその 3 次元構造は冠動脈プラークの進行と不安定化を予測することができるか？」を明らかにすることで、プラークの 3 次元構造とコラーゲンリモデリングがどのように血管治癒過程をヒト生体内で解明する研究が進むと考えられる。申請者は帰国後も引き続きハーバード大学マサチューセッツ総合病院 Bouma 研究室の客員研究員として本邦での臨床研究を行うことが決定している。

【結論】本研究からカテーテル PS-OCT を用いたコラーゲン性状の評価がヒト冠動脈で可能となった。さらに偏光測定により得られたプラーク性状は冠動脈不安定化メカニズムに寄与してすることが示唆された。本研究により開発されたカテーテル型 PS-OCT を用いた臨床研究を継続して行うことで、コラーゲンリモデリングと冠動脈プラーク不安定化メカニズムの解明が期待される。また、本研究を基盤として今後コラーゲンリモデリングを標的とした新規治療法の開発や治療戦略の開発が進むと期待される。