

表 題 マルフアン症候群動脈瘤モデルマウスにおける MRI による
大動脈壁内エラスチンの定量化に関する研究

論文の区分 論文博士

著 者 名 岡村 誉

所 属 自治医科大学附属さいたま医療センター
総合医学第2講座

2014年10月15日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療学系 専攻 外科系総合医学
職名・氏名 教授 安達 秀雄

	目次	頁
要約		3
1. 緒論		5
2. 実験方法		
2-1 実験動物		7
2-2 エラスチン特異的造影剤		7
2-3 エラスチカーワンギーソン染色		8
2-4 大動脈中膜におけるエラスチンの占める割合の計測		8
2-5 核磁気共鳴画像法 (MRI)		9
2-5-1 エラスチン特異的造影剤の緩和度		9
2-5-2 マウス大動脈の撮影		10
2-5-3 T1 mapping		10
2-5-4 摘出された大動脈の T1 mapping		11
2-6 大動脈壁内のガドリニウムの定量		11
2-6-1 Ex vivo 大動脈壁内のガドリニウムの定量		12
2-6-2 In vivo 大動脈壁内のガドリニウムの定量		12
2-7 統計処理		13

3. 結果	
3-1 Fbn1 ^{C1039G/+} マウスにおける上行大動脈瘤	14
3-2 Fbn1 ^{C1039G/+} マウスの上行大動脈内エラスチンの減少	15
3-3 上行大動脈瘤壁内ガドリニウムの定量	17
3-4 7.0 テスラ MRI におけるエラスチン特異的造影剤の緩和度	19
3-5 マウス上行大動脈の MRI 撮影	19
3-6 マウス上行大動脈内のエラスチンの定量	23
4. 考察	25
5. 結論	32
6. 当学位論文の研究における筆者の担当	32
引用文献	33

要約

マルファン症候群は常染色体優性遺伝の形式をとる全身の結合織疾患であり眼・骨格・血管など様々な器官に症状が現れる。その中でも大動脈解離と動脈瘤破裂が患者の予後を規定するとされ、適切な治療を受けなければ大血管系疾患で命を落とすことが多い。エラスチンは皮膚・腱・大動脈壁など伸縮性の必要な組織に多く含まれている線維状の不可溶性タンパク質で、組織に弾性を与える。またエラスチンの形成異常や分解亢進と大動脈瘤・肺気腫などの疾患の発症及び病態の形成との関連性が示唆されている。

マルファン症候群の大動脈瘤では組織学的にエラスチンの生成低下と分解の亢進が認められる。しかしながら、組織診断は検体採取を必要とし、非侵襲的な画像検査での大動脈壁の評価は困難とされる。本研究ではエラスチン特異的な MRI 造影剤を使用し、非侵襲的にマルファン症候群マウスの大動脈瘤壁内のエラスチンの定量化を行った。32 週齢の $Fbn1^{C1039G/+}$ マルファン症候群マウスと C57BL/6J 野生株マウスの上行大動脈径を比較すると、有意にマルファン症候群マウスで大動脈径が拡張していた。ガドリニウムベースのエラスチン特異的造影剤をマウスに静注後に MRI で上行大動脈を撮影し、T1 mapping 法にて大動脈壁内の R1 値を測定することでエラスチンを定量化した。マルファン症候群マウスの上行大動脈では野生株マウスと比べ、有意に血管壁内のエラスチン量が低

下 (R1 値の低下) していた。また MRI 撮影後に大動脈を摘出し、血管壁内ガドリニウム量を直接測定したところ、MRI で測定した R1 値と血管壁内ガドリニウム量の間には有意な相関関係を認めた。

エラスチン特異的造影剤を用いた MRI によって非侵襲的に大動脈壁内のエラスチン定量化ができ、また野生株マウスと比べマルファン症候群マウスの大動脈壁内でエラスチンが減少していることを確認できた。本研究結果は、同手法が将来的に非侵襲的に大動脈瘤の破裂リスクおよび治療効果判定等に適応できる可能性を示唆するものである。

1. 緒論

本邦では年間約 16,000 人の大動脈疾患による死亡を認めており [1]、原因として結合織疾患、動脈硬化性、炎症性、大動脈解離、感染などが挙げられる。マルファン症候群は常染色体優性遺伝の全身結合組織病であり、細胞間接着因子の異常により結合組織が脆弱になり、大動脈、網膜、硬膜、骨の形成等の全身臓器に異常をもたらす。これら全身症状のうち大動脈解離および動脈瘤破裂が主な死因で平均余命が 45 歳とされ、大動脈病変に対する予防的手術のみが唯一生命予後改善効果が認められている[2]。マルファン症候群はフィブリリン-1 遺伝子の変異が原因とされ、transforming growth factor- β の亢進を介して全身の結合組織の異常を引き起こすとされている[3]。胸部大動脈瘤の病理学的特徴として、内膜変性、血管平滑筋の壊死、エラスチン層の減少、プロテオグリカンの蓄積等が指摘されている[4,5]。エラスチンは大動脈壁に強度と弾性を与える細胞外基質の弾性線維の 1 つであり、マルファン症候群患者の動脈瘤壁においても、組織学的にエラスチンの断裂が認められる[3,6]。

Magnetic resonance imaging (MRI)分子イメージングは生体内で種々の生物学的マーカーを定量化する画期的な手法である[7-9]。近年、エラスチン特異的 MRI造影剤を用いた腕頭動脈（マウス）や冠動脈壁（ブタ）の動脈硬化病変におけるエラスチンの定量化が可能であることが報告されている[10,11]。エラスチンが

増加している動脈硬化病変での定量化は報告されているが、大動脈瘤のようにエラスチンが減少している病変における MRI による定量化は報告されていない。大動脈壁における病理学的変化を非侵襲的に画像診断することは幅広い応用の可能性があり、動脈瘤の進行の予測、破裂・解離のリスク評価、薬物治療の効果判定、等への適応が考えられる。

本研究では、MRI を用いて非侵襲的に大動脈壁内エラスチンを定量化し、マルファン症候群マウスにおいて野生株マウスに比べて大動脈壁内エラスチンが減少していることを確認したので報告する。

2. 実験方法

2-1 実験動物

Heterozygous C57BL/6J Fbn1^{C1039G/+}マルファン症候群マウス（以後、Fbn1^{C1039G/+}マウス）[3]は Johns Hopkins 大学の Dietz 博士より入手した。C57BL/6J 野生株マウス（以後、野生株マウス）は、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) から購入した。Fbn1^{C1039G/+} マウスの遺伝子型の決定は PCR 法にて行った。本研究は、32 週齢のマウスを使用した。実験動物の使用法および管理はスタンフォード大学実験動物管理委員会のガイドラインに従い行った。

2-2 エラスチン特異的造影剤

本研究ではガドリニウムベースのエラスチン特異的MRI造影剤 (Elastin specific MRI contrast agent: ESMA) であるLMI1174を使用した。LMI1174は854.02ダルトンの低分子量造影剤で、Lantheus Medical Imaging (North Billerica, MA) より入手した。LMI1174は、同じくエラスチン特異的MRI造影であるBMS753951 (Lantheus Medical Imaging, North Billerica, MA)と類似した構造[10,11]をもっており、BMS753951はガドリニウムのキレート剤としてdiethylenetriaminepentaacetic acid(DTPA)を使っているのに対して、本研究で使用したLMI1174はよりキレート化の優れたtetraazacyclododecanetetraacetic acid (DOTA)[12]を使用した。

2-3 エラスチカーワンギーソン染色

マウスから上行大動脈を摘出し、4%パラフォルムアルデヒドにて固定した。大動脈の形態を保つために大動脈摘出前に3%アガロースを左室から大動脈に注入した。摘出した大動脈をOCT Compound Histomount (Sakura, Torrance, CA) に凍結包埋した。凍結包埋した大動脈より、4 μ m厚の切片を作製し、その標本をエラスチカーワンギーソン染色キット(Sigma Aldrich, St. Louis, MO) を用いて染色した。

2-4 大動脈中膜におけるエラスチンの占める割合の計測

マウス上行大動脈を4 μ m厚で切片を作成し、全周の8等分点をLeica DM4000B 蛍光顕微鏡でそれぞれ撮影した。中膜におけるエラスチン層をエラスチンの自家蛍光で同定した。中膜の厚さは内弾性膜と外弾性膜間の距離として計測した。中膜におけるエラスチンの占める割合を、Image J ソフトウェア(color threshold mask; hue 80, saturation 0, brightness >100)を使用して、中膜領域内の自家蛍光の割合として計算した。

2-5 MRI

2-5-1 ESMAの緩和度

MRI造影剤は、造影剤が分布した周辺組織のプロトンの緩和を促進させる働きを持つ。7.0テスラMRIにおける非結合型および結合型ESMAの緩和度を調べた。非結合型ESMAの緩和度を調べるために、異なる濃度のESMA(0-2.0 mmol/L)を小動物研究用の7.0テスラMRI (Discovery MR901, Agilent Technologies General Electric Healthcare社)にて撮影し、緩和度を測定した。0.5mlチューブに入れたESMA溶液をQuadrature birdcage radiofrequency coil (Agilent Technologies)上に置き、T1 mapping inversion recovery fast spin echo (IR-FSE) sequence (パルスを与える間隔=5 s, エコー時間=10 ms, inversion times=50,100, 200, 400, 600, 800, 2000, 3000, 4000ms, 512x512 matrix, 撮像領域=8 cm, 3 averages, スライス数=1, スライスの厚さ=1.5 mm, 解像度=156 μm)にて撮影した。R1値をInteractive data language-based software (RT Image 2.5.4, Department of Radiation Oncology, Stanford University School of Medicine)を使用して計算した[13]。結合型ESMAの緩和度の測定は、32週齢の野生株マウスの大動脈を採取し、大動脈を異なる濃度のESMA(0-10 mmol/L)に2時間(37°C)浸し、洗浄した後に3%アガロースに包埋して7.0テスラMRIにて大動脈のR1値を測定した。MRI撮影後にInductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS)法[11]にて大動脈壁内に取り込まれたガドリニ

ウム造影剤(ESMA)の量を測定した。

2-5-2 マウス大動脈の撮影

7.0テスラMRI Discovery MR901 (Agilent Technologies-General Electric Healthcare)

にradiofrequency coil (Rapid MR International, LLC) と radiofrequency

transmission (Agilent Technologies)を使用してマウスの大動脈を撮影した。

マウスを3%イソフルレンにて麻酔をかけ、30ゲージ針にて尾静脈に点滴ライン

を確保した。心拍同期させたThree-plane fast spoiled gradient echo (FSPGR)

sequenceを使用して、上行大動脈の最大径箇所を垂直に横断する撮影断面を決定

した。上行大動脈径はFSPGR像にて計測した。続いて拡張期IR-FSE像を下記の

設定で撮影した：撮像領域=30 mm, 256x256 matrix, スライス厚=0.9 mm, 解像度

=117 μm , 撮影時間=3分20秒。null pointを異なる反転時間 (550, 580, 600, 620,

640, 660, 680, 700 ms) で撮影し、決定した。造影剤注入前に拡張期IR-FSE像を

撮影し、造影剤 (0.2 mmol/kg) 静注30分後に再度MRI撮影した。

2-5-3 T1 mapping

T1 mappingデータをmodified cine inversion recovery (mCine-IR) pulse sequence[14]

を用いて下記の設定で撮影した。パルスを与える間隔=4.5 ms, エコー時間=1.4

ms, フリップ角度=12° , 3 averages, 撮像領域=2 cm, 192x192 matrix (解像度104 μm), スライス数=1, スライス厚=1 mm, and views per segment=2, 撮影時間は15分31秒であった。mCine-IR pulse sequenceを用いて、造影剤静注前と非特異的 gadolinium-DTPA造影剤静注30分後に撮影を行い、その後24時間経過し造影剤が排泄された後にESMA造影剤を静注し再度撮影した[11]。上行大動脈の最大径の箇所を血管に対して垂直のスライスにて撮影し、T1 mappingをおこなった。mCine MRIデータの解析はT1値測定用ソフトウェアを使用し、大動脈壁のT1値を計測した[15]。R1値はT1値の逆数として計算した。mCine-IR像での大動脈壁の同定をより正確に行うために、FSPGR像をmCine-IR像に重ね合わせ、大動脈壁のRegion of Interest(ROI)領域を選択した。

2-5-4 摘出された大動脈のT1 Mapping

ESMA造影剤静注後のMRIでマウス大動脈を撮影した後に、上行大動脈を摘出し、3%アガロースに包埋した。この採取された大動脈を、マウスで撮影した時と同じ設定のmCine-IR sequenceでMRI撮影した。mCine-IR像を用いてR1値を計測した。

2-6 大動脈壁内のガドリニウムの定量

2-6-1 Ex vivo大動脈壁内のガドリニウムの定量

上行大動脈を32週齢マルファン症候群および野生株マウスより摘出した。大動脈を10mmol/LのESMA溶解液中に37°Cで2時間浸漬し、エラスチンとESMAを結合させ、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し結合しなかったESMAを洗い流した。その後70%硝酸に60°Cで一晩浸漬し、大動脈を分解した。2%硝酸に希釈した後に、大動脈壁内のガドリニウム量をInductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)法[11]にて測定した。ICP-MS法にはXSERIES 2 ICP-MS (Thermo Scientific)を使用した。硝酸にて溶解した大動脈検体を10,000°Cに加熱することでイオン化し、電離した元素をmass spectrometerで計測することでガドリニウム量を測定した。測定されたガドリニウム値を大動脈検体の重量で割り、大動脈壁内のガドリニウム濃度を計算した。

2-6-2 In vivo大動脈壁内のガドリニウムの定量

マウスの尾静脈よりESMA(0.2mmol/kg)を静注し、MRI撮影し、ESMA静注の1時間後に上行大動脈を摘出した。大動脈を70%硝酸に60°Cで一晩浸漬し、大動脈を分解した。2%硝酸に希釈した後に、Ex vivo検体と同様に大動脈壁内のガドリニウム量をICP-MS法[11]にて測定した。測定されたガドリニウム値を大動脈検体の重量で割り、大動脈壁内のガドリニウム濃度を計算した。

2-7 統計処理

全ての結果は平均値±標準誤差で表した。2 群間の比較はマン・ホイットニーの U 検定 で計算した。3 群間の比較は反復のある分散分析法で計算し、個々の群間の多重比較はボンフェローニ法にて解析した。散布図における 2 変数の関係性は線形回帰分析をおこなった。統計ソフトは、SPSS version18/19 (SPSS Inc., Chicago, IL)を使用し、*P* 値が 0.05 未満のとき統計学的に有意差有りとした。

3. 結果

3-1 $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスにおける上行大動脈瘤

$Fbn1^{C1039G/+}$ マウスでは 2 週齢より上行大動脈の拡大が始まると報告されていたが[17]、同マウスにおける遠隔期の動脈瘤径に関する報告はなされていない。本研究で 32 週齢のマウスにおける上行大動脈径を MRI で測定したところ、野生株マウスでは 1.63 ± 0.04 mm だったのに対して $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスでは 2.30 ± 0.13 mm と有意に拡大していた ($P < 0.001$) (図 1 A, 1 B)。

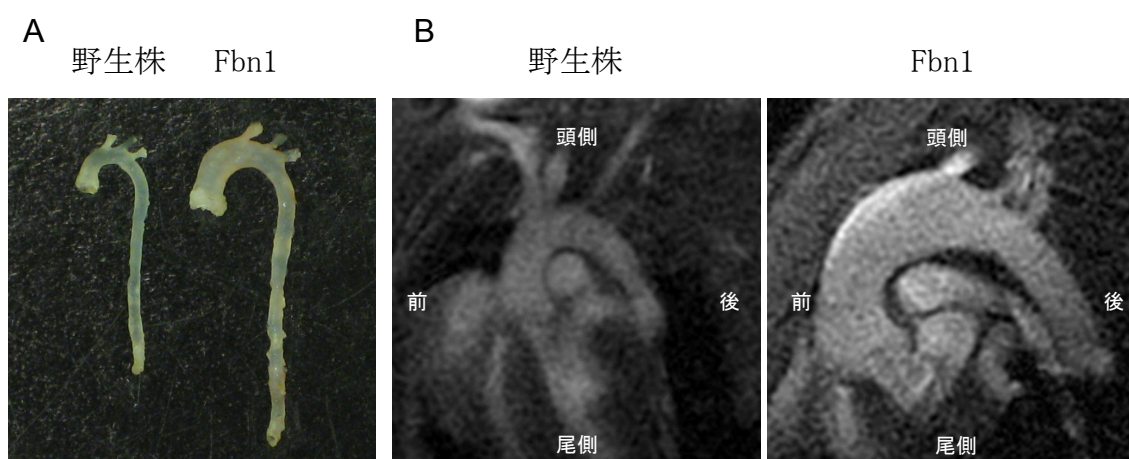


図 1 : 32 週齢の野生株マウスおよび $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスの摘出された大動脈と MRI 画像。(A) $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスでは大動脈基部から弓部大動脈にかけて大動脈瘤を認める。(B) 野生株マウスおよび $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスの Fast spoiled gradient echo 像。 $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスでは大動脈基部から弓部大動脈にかけて大動脈瘤を認める。

3-2 Fbn1^{C1039G/+}マウスの上行大動脈内エラスチンの減少

Fbn1^{C1039G/+}マウスの上行大動脈瘤壁のエラスチカーワンギーソン染色では、野生株マウスとくらべて壁内のエラスチンが断裂・分解している所見を認めた(図 2 A)。中膜におけるエラスチン層の占める割合を測定したところ、上記所見と一致して野生株では $27.8 \pm 1.7\%$ であったのに対して、Fbn1^{C1039G/+}マウスでは $19.5 \pm 1.6\%$ と有意に減少していた ($P=0.018$) (図 2 B, 2 C)。

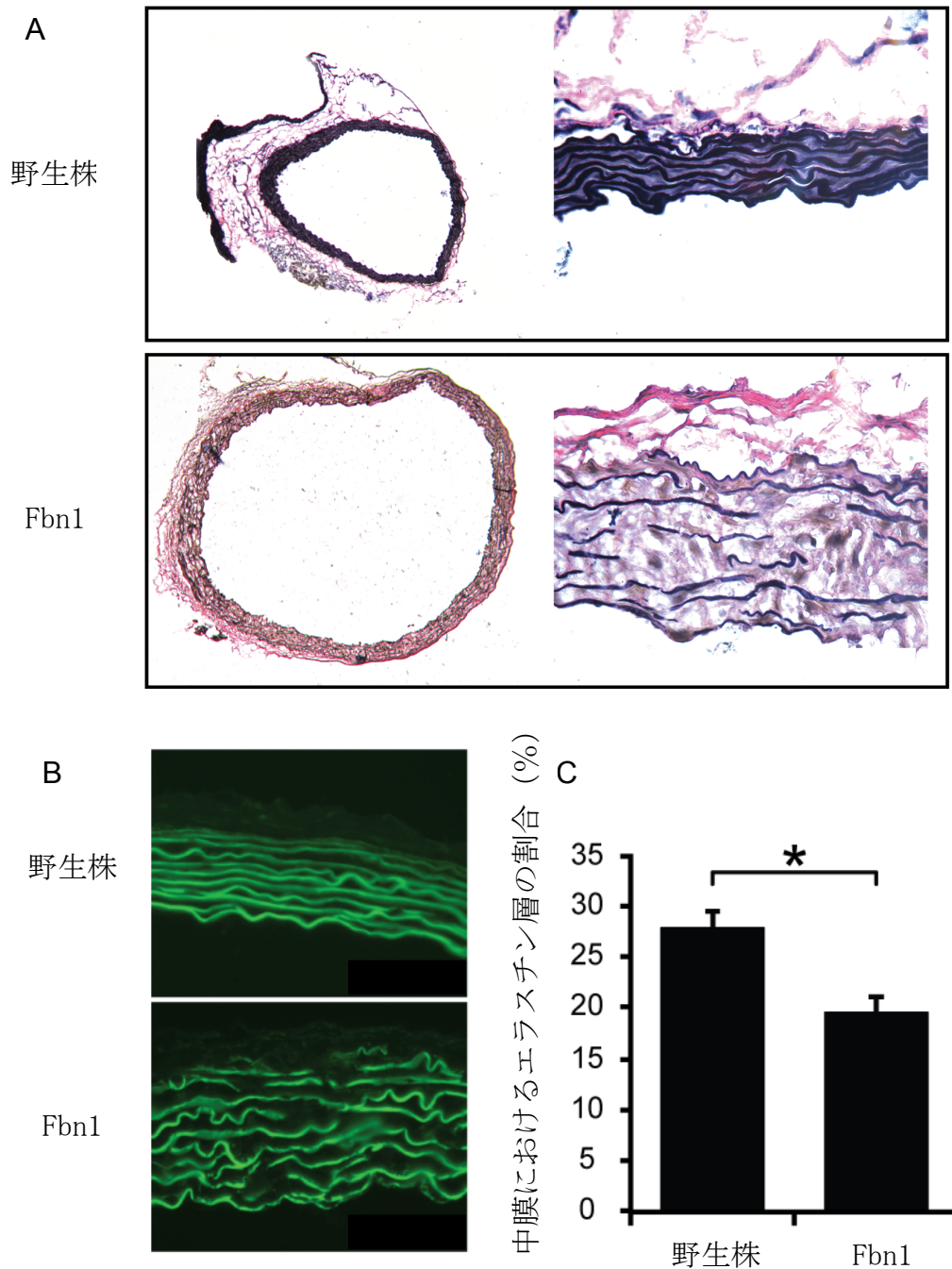


図 2 : Fbn1^{C1039G/+}マウスの上行大動脈におけるエラスチンの減少 (A) 野生株
 および Fbn1^{C1039G/+}マウスの上行大動脈のエラスチンカーワンギーソン染色像。
 Fbn1^{C1039G/+}マウスでは中膜のエラスチン層の変性・断裂を認める。(B) 野生株
 および Fbn1^{C1039G/+}マウスの上行大動脈のエラスチンの自家蛍光

(C) 32 週齢の野生株(n=6)および Fbn1^{C1039G/+}マウス(n=5)の上行大動脈の中膜におけるエラスチン層の割合。* $P<0.05$ 。データは平均値±標準誤差で示す。

3-3 上行大動脈瘤壁内ガドリニウムの定量

本研究ではガドリニウムをベースとした ESMA を使用した (図 3A)。野生株と Fbn1^{C1039G/+}マウスの上行大動脈内エラスチンに対する ESMA の結合量を比較するために、野生株と Fbn1^{C1039G/+}マウスそれぞれから上行大動脈を摘出し、体外で ESMA に浸漬し、ICP-MS 法にて動脈壁内のガドリニウム量を測定することで、壁内のエラスチン量を比較した。Fbn1^{C1039G/+}マウスの上行大動脈は、野生株と比べて有意に ESMA の含有量が低下していた (0.21 ± 0.03 vs. 0.39 ± 0.03 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $P=0.027$) (図 3B)。

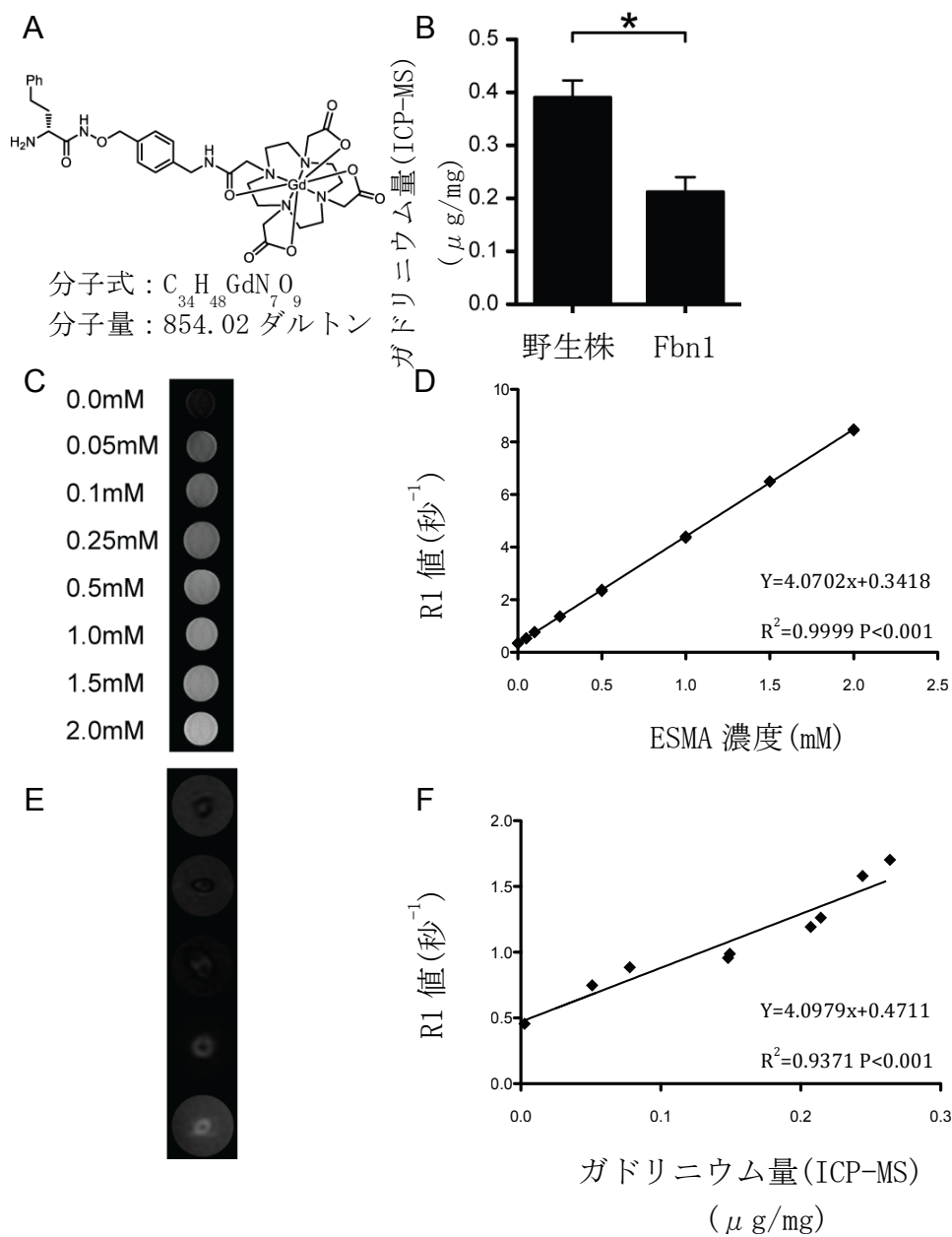


図3 : (A) エラスチン特異的 MRI 造影剤(ESMA)の分子構造式と分子量 (B) マウス上行大動脈に取り込まれた ESMA 量。野生株および Fbn1^{C1039G/+}マウスの上行大動脈を摘出し、ESMA に浸漬したところ、野生株で有意に造影剤の取り込みが多かった。* $P < 0.05$ (C) 7 テスラ MRI における非結合型 ESMA の異なる濃度における IR-FSE sequence 像 (D) MRI における R1 値と非結合型 ESMA 濃

度との関連性 (E) 7.0 テスラ MRI におけるマウス大動脈へ異なる濃度の ESMA を結合させた IR-FSE sequence 像。マウス大動脈を異なる濃度の ESMA(0-10mmol/L)に浸漬させた。(F) R1 値とマウス大動脈に取り込まれたガドリニウム量との関連性。

3-4 7.0 テスラ MRI における ESMA の緩和度の測定

まず非結合型の ESMA の緩和度を測定し、ESMA 濃度と R1 値の関連性を確認した。ESMA 濃度上昇に伴い、R1 値も増加し、両者に直線相関関係を認めた (図 3C、3D)。続いて異なる濃度の ESMA に大動脈壁断片を浸漬し、ESMA の大動脈壁への取り込みと R1 値の相関関係を調べた。非結合型の結果と同様に大動脈壁に取り込まれた ESMA 量と R1 値の間に正の相関を認めた (図 3E、3F)。

3-5 マウス上行大動脈の MRI 撮影

始めに MRI (FSPGR sequence) にてマウス上行大動脈に対して垂直な撮影断面を決定した(図 4 A)。続いて ESMA による大動脈壁の造影の違いをみるために、IR-FSE sequence を用いて野生株と Fbn1^{C1039G/+}マウスをそれぞれ撮影した。造影前は両マウスともに大動脈壁が造影されていなかったが、ESMA 注入後に撮影すると、上行大動脈瘤壁の造影が Fbn1^{C1039G/+}マウスでは野生株マウスと比べ

で弱かった(図4B)。これらは、組織学的に $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスの大動脈壁でエラスチンが低下していた結果と一致する。

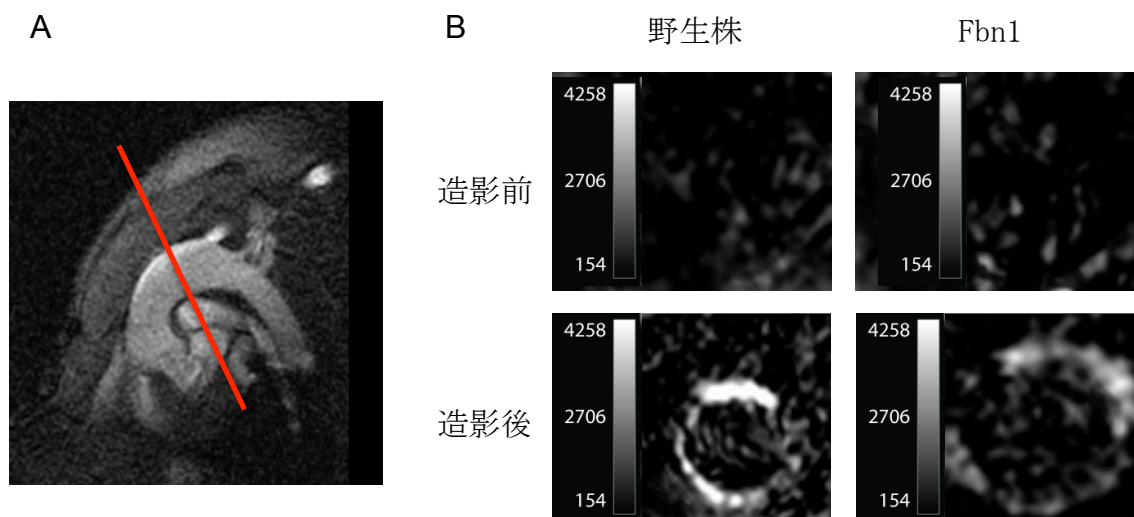


図4：マウス上行大動脈壁のMRI撮影。(A) 上行大動脈の最大径部を垂直に横断する断面で撮影した。(B) ESMA 静注前後の野生株マウスと $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスの IR-FSE 像。野生株マウスの上行大動脈壁は $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスと比べ強く造影されている。

続いて、大動脈壁内のエラスチン層に結合したESMAの定量化を行った。大動脈壁内に取り込まれたESMA量を測定するためにMRIでmCine-IR pulse sequenceを用いて撮影後に大動脈壁のT1値を測定した。T1値測定にはmCine-IR pulse sequenceを使用した。大動脈壁をより正確に同定する目的でFSPGR像をmCine-IR像に重ね合わせ、大動脈壁のROIを選択した(図5A)。造影剤静注前の

R1値(T1値の逆数)はFbn1^{C1039G/+}マウス(n=9)、野生株マウス(n=10)ともに低く、両群間に有意差を認めなかった (0.63 ± 0.04 vs. 0.71 ± 0.05 秒⁻¹, $P=0.25$) (図5B)。

続いて非特異的ガドリニウムDTPA造影剤を静注すると、Fbn1^{C1039G/+}マウス(n=9)、野生株マウス(n=10)ともに、上行大動脈壁のR1値が上昇したが、両マウス群間に有意差を認めなかった(1.07 ± 0.08 vs. 1.02 ± 0.09 秒⁻¹, $P=0.78$)。非特異的ガドリニウムDTPA造影剤が静注後24時間で大動脈壁から排泄されることを確認するために、造影前と非特異的ガドリニウムDTPA造影剤静注24時間後のR1値を比較してみると、Fbn1^{C1039G/+}マウス(n=6)で、それぞれで 0.63 ± 0.07 vs. 0.63 ± 0.05 秒⁻¹で有意差を認めず、24時間で造影剤が十分排泄されることを確認した ($P=0.98$)。続いて非特異的ガドリニウムDTPA造影剤静注24時間後にESMAを静注し、同様に上行大動脈壁のR1値を測定したところ、Fbn1^{C1039G/+}マウス(n=9)のR1値の方が野生株マウス(n=10)より有意に低かった (1.15 ± 0.07 vs. 1.36 ± 0.05 秒⁻¹, $P=0.045$) (図5C)。この結果からFbn1^{C1039G/+}マウスの上行大動脈壁におけるESMAの取り込みが野生株マウスより有意に少ないことが分かり、組織学的所見と一致するものであった。

またマウス体内で撮影されたR1値(In vivo)が正確に大動脈壁のR1値を反映していることを確認するために、MRI撮影後に上行大動脈を摘出し、3%アガロースに包埋し、マウス体外でも上行大動脈をMRI撮影しR1値(Ex vivo)を測定した。

In vivo と Ex vivo の R1 値を比較したところ有意差を認めず、マウス体内で上行大動脈の R1 値を正確に測定できていることが確認された (In vivo R1/ex vivo R1 値=1.04±0.18, P=0.76)。

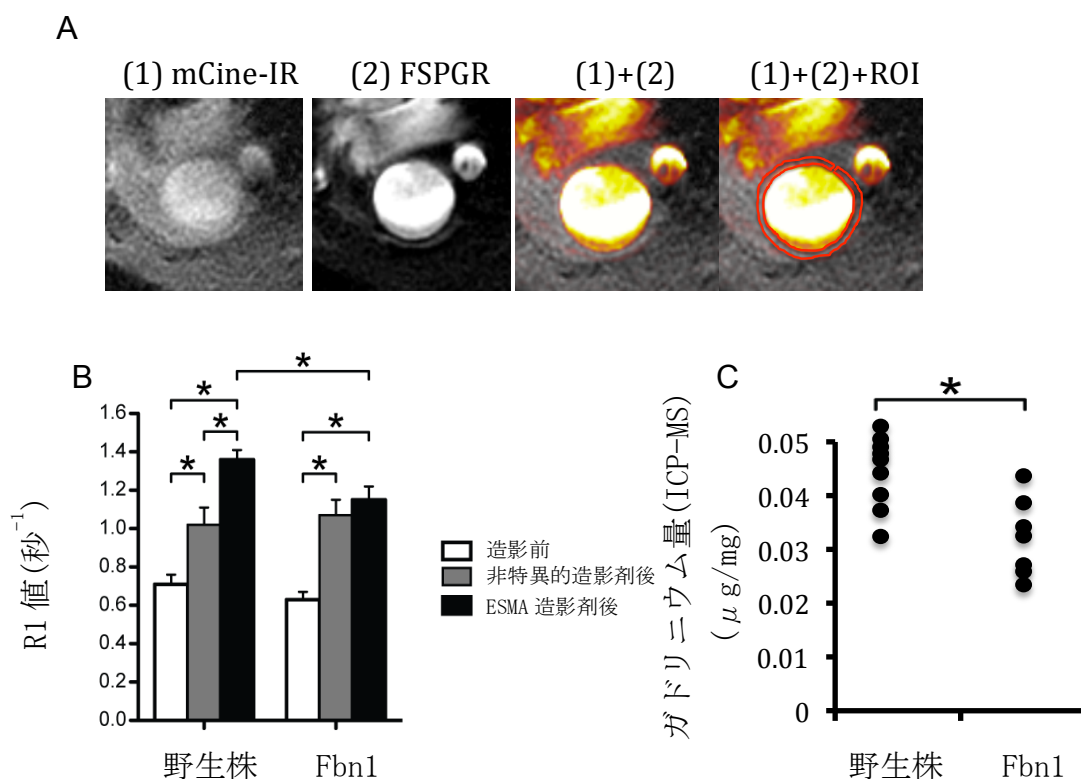


図 5 : MRI による In vivo R1 値の測定 (A) modified cine inversion recovery(mCine-IR)と Fast spoiled gradient echo(FSPGR)による R1 値測定。大動脈内腔をより正確に同定するために FSPGR 像を mCine-IR に重ね合わせ、大動脈壁の Region of Interest(ROI)を描いた。(B) 32 週齢 野生株マウス(n=10)および Fbn1^{C1039G/+}マウス(n=9)の上行大動脈の R1 値。造影前、非特異的 DTPA 造影剤後、ESMA 造影剤後の R1 値を比較した。(C) 32 週齢 野生株マウス(n=9)および

Fbn1^{C1039G/+}マウス(n=7)の ESMA 静注後の上行大動脈に含まれているガドリニウム量。 * $P < 0.05$ 。データは平均値±標準誤差で示す。

3-6 マウス上行大動脈内のエラスチンの定量

MRIで測定されたR1値と実際に大動脈壁内エラスチンに結合しているガドリニウムベースであるESMA量に相関があることを確認するために、上行大動脈内のガドリニウム量をICP-MS法にて測定した。ESMA静注しMRI撮影したマウスから上行大動脈を摘出し、大動脈壁内のガドリニウム量を測定したところFbn1^{C1039G/+}マウスでは野生株マウスと比べてガドリニウム量が有意に低く、MRIで測定したR1値の結果と一致した(0.033 ± 0.003 vs. 0.045 ± 0.002 $\mu\text{g}/\text{mg}$, $P=0.007$)(図 5 C)。またR1値とICP-MS法にて測定された大動脈壁内ガドリニウム値には有意な正の相関を認めた($R^2=0.687$; $P=0.006$)(図 6)。

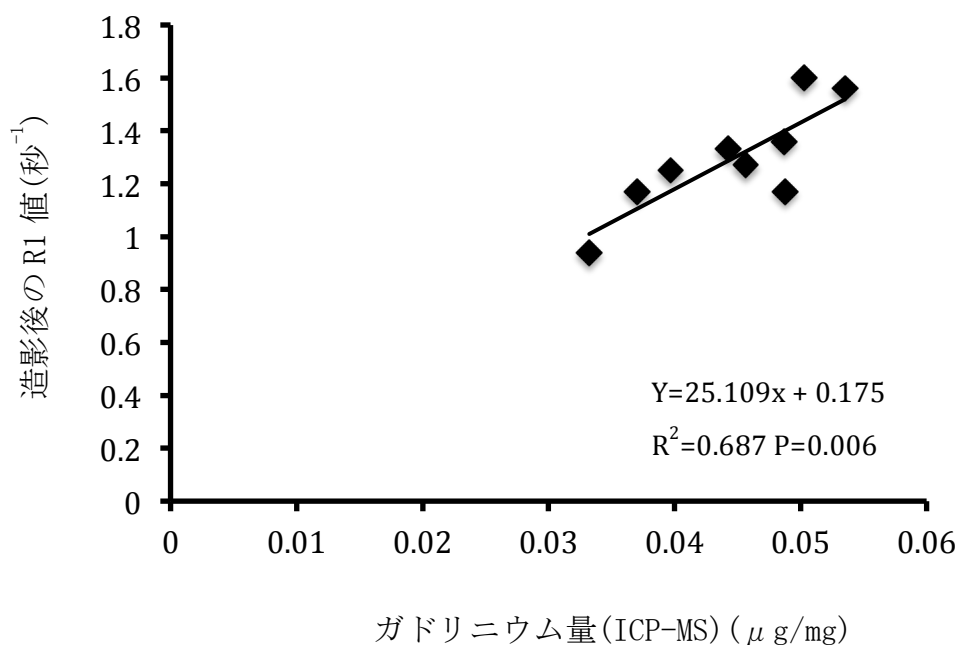


図6：上行大動脈の R1 値とガドリニウム量の関連性。エラスチン特異的造影剤後に MRI で測定した野生株マウス (n=9) 上行大動脈の R1 値と大動脈壁内のガドリニウム量に有意な相関を認めた。

4. 考察

ESMA を用いた MRI によって非侵襲的に冠動脈プラークや腕頭動脈のリモデリングを動物実験で定量化した報告[11, 12]は認めるが、動脈瘤モデルにおいて動脈瘤壁のエラスチン量を MRI で評価が可能かどうかについては不明である。Makowski らは ApoE 欠損マウスのアンギオテンシン II 注入による腹部大動脈瘤モデルにおいて ESMA を使用した MRI によるエラスチン定量化について報告した [19]。動脈瘤モデルには ApoE 欠損マウスに対するアンギオテンシン II 注入、血管外塩化カルシウム塗布、血管内豚膵エラスターゼ注入などがあるが、いずれも非生理的な化学的な動脈瘤形成法であり、必ずしもヒトにおける動脈瘤形成を正確に反映しているとは限らない。アンギオテンシン II 注入による動脈瘤形成は、まず腹部大動脈に大動脈解離を認め、引き続き大動脈瘤化していくモデルである。塩化カルシウムや血管内豚膵エラスターゼ注入法は化学物質による大動脈壁の腐食作用による手法である。一方、本研究で用いたマルファン症候群マウスモデルは、外的手法を用いることなく先天的なフィブリリン遺伝子の異常により再現性をもって大動脈瘤を形成し、より生理的かつヒトのマルファン症候群で観察される病態と一致している。それにより、マルファン症候群マウス ($Fbn1^{C1039G/+}$ マウス) は大動脈瘤の進展予測や治療効果判定をみる優れた実験モデルと考えられる。

マルファン症候群患者の大動脈病変は、通常大動脈基部から瘤化を認めることが多いとされる。本研究で用いた $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスは図 1 に示す通り、大動脈基部から上行大動脈にかけて全体的に拡大を認める。 $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスはヒトのマルファン症候群と同じフィブリリンの遺伝子異常を持っているが、マウスではヒトに特徴的な長い四肢を認めない点や、大動脈拡大部位が基部に限局していない点など完全にヒトと同一な症状を示すわけではない。 $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスでは大動脈基部よりも上行大動脈径の方がより大きく、上行大動脈を研究の対象部位とした。また大動脈基部は心臓に接しているため **motion artifact** が非常に強く、心拍数が 400 回/分以上のマウスにおいて MRI で撮影するのが極めて困難であり、上行大動脈での撮影の方が技術的に可能とも判断した。

$Fbn1^{C1039G/+}$ マウスの動脈瘤壁において野生株マウスと比べて組織学的にエラスチン線維の断裂を多く認めた。ただエラスチンの量自体が $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスにおいて減少しているかどうかについては議論の余地がある。大動脈壁内のエラスチン線維の数に関して、野生株と $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスとで差を認めなかった (図 2 A)。文献検索した限りでは動脈瘤壁と正常大動脈壁におけるエラスチン量を定量・比較した報告はみられないが、 $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスの大動脈瘤壁では明らかなエラスチン線維の断裂を多く認め、エラスチカーワンギーソン染色像でエラスチン線維の菲薄化もみられることから、 $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスの大動脈瘤壁で

はエラスチン量が減少していると考えられる。また 32 週齢の $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスにおいて下行大動脈・腹部大動脈では瘤化を認めず、同部位では組織学的にエラスチンの断裂を認めなかった。

本研究では マルファン症候群マウスの上行大動脈瘤モデルにおける MRI による大動脈壁内エラスチンの定量化が可能であることを示した。さらに組織学的結果に一致して、野生株マウスに比べて、 $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスでは有意に上行大動脈瘤内のエラスチン量が減少していることを示した。Makowski ら[11]の先行研究では 動脈硬化モデルにおいて ESMA を使った MRI で腕頭動脈内でのエラスチンの増加を報告しているが、本研究では血管壁内のエラスチン量が減少する病態においても MRI による定量化が可能であることを示した。しかしながら、 $Fbn1^{C1039G/+}$ マウスと野生株マウスそれぞれで計測されたエラスチン量を反映する MRI の R1 値の差がそれほど大きくないことから、MRI による非侵襲的診断を将来的に日常診療へ応用していけるのかはまだ不明である。

Makowski らは DTPA をキレート剤として持つ ESMA が正常血管においてエラスチンのみに結合することを電子顕微鏡にて示した[11]。本研究では DTPA の代わりに DOTA でキレート化された ESMA を使用しており、DOTA の方が DTPA よりも安全でガドリニウムベースの MRI 造影剤のキレート剤として適しているとされている。DOTA はガドリニウムに対して DTPA より特異度が高く、解離反応速度が遅

く、腎機能障害患者における腎毒性が低いことで知られる[12, 20]。

本研究で用いた MRI による非侵襲的なエラスチン定量化は診断的・予後予測の手段として将来的にヒトへの応用が考えられる。大動脈瘤患者における予防的外科手術の目的は致命的な大動脈解離や破裂を未然に防ぐことであり、手術適応として症状の有無、大動脈径および大動脈の拡大速度があげられる。大動脈径は通常 CT、超音波検査または MRI にて測定されるが、MRI による大動脈壁内エラスチン量の評価は大動脈壁の組成や構造について新たな情報を与え、動脈瘤破裂リスク評価に活用できる可能性がある。大動脈内エラスチンを定量化することで大動脈解離や瘤化するリスクの高い大動脈を同定し、そのような患者ではより厳密なフォローアップを行い、大動脈径だけにとらわれないより早期の手術時期決定の判断を助けることが考えられる。

MRI 分子イメージングは血管壁のプラーク量・脆弱性や腫瘍学など様々な疾患・病態の研究に用いられている[21]。フィブリン、マクロファージ、vascular cell adhesion molecule 1、lectinlike oxidized-1、matrix metalloproteinases などに特異的に取り込まれる造影剤を用いている[22]。分子イメージングに加え大動脈疾患の研究における MRI の CT と比べた利点として(1)放射線被曝の回避(2)高い空間分解能(3)造影剤未使用で撮影時の情報量(4)生理学的・解剖学的評価能力、などが挙げられる。

上行大動脈は心臓に近いため motion artifact の影響を受けやすく、同部位における MRI 撮影は困難を伴う。マウスの心拍数は通常 400 回/分以上あり、心拍数が画像の解像度に大きく影響する。Motion artifact への対応としては、心電図同期を行うことと、吸入麻酔深度を調節することで心拍数を 200 台/分まで減らして撮影した。ただ麻酔を深くして心拍数を 200 台/分以下に下げると心停止をきたすため、200 回/分が撮影可能な心拍数の下限と思われた。また MRI での撮影は長時間におよぶため、撮影時のマウス体温の維持も重要である。

本研究において、造影剤静注後何分後に MRI 撮影するかについて検討を要した。Makowskiらは各臓器におけるESMA取り込み量を造影剤注入後各時間において示した[11]。これによると大動脈壁においては造影30分後が最も取り込みが多いとされた。造影剤静注後より長時間待つことで他臓器から造影剤が washoutされる可能性も考慮したが、造影剤静注後もマウスを麻酔下において管理を続ける必要があるため、長時間の麻酔によるマウスへの侵襲および麻酔による死亡も懸念された。これらより造影後30分後にMRI撮影を行うこととした。マウスの上行大動脈の撮影断面の同定から造影前後のmCine-IR画像の撮影、造影剤投与後の待ち時間を含めると、マウス1匹あたり2時間以上の麻酔時間を必要とし、安全性からも造影剤投与後の待ち時間を可能な限り短くする必要があった。

T1 mapping のための mCine-IR 画像における大動脈壁の同定について工夫を要した。mCine-IR 画像は解像度それほど高くなく、大動脈の内腔と壁との境界をはっきりと認識するのは困難である (図 5 A)。そこでより解像度の高い FSPGR の画像を mCine-IR に合成することで血管内腔を同定した。心拍によって上行大動脈が前後するため心電図同期させ撮影し、FSPGR と mCine-IR とともに心臓拡張期の同じタイミング部になるようにして撮影し両画像を重ね合わせることで、motion artifact の影響を除いた。ROI の設定は、上記合成画像を用いて、mCine-IR 上の大動脈壁にあたる箇所 (血管内腔の外側) に 2 pixel の厚みに統一した ROI を設定し、大動脈壁とした。

今回、大動脈内に取り込まれたESMA量をMRIで正確に測定できているかを、大動脈を摘出してICP-MS法にてガドリニウムを定量しMRIの結果と照合した。MRIで測定したR1値とICP-MS法で直接測定した大動脈壁内ガドリニウム量に相関を認めたことで、ESMAを用いたMRI撮影にて血管壁内エラスチン量が正確に計測されていると考えられた。現在のところ大動脈瘤破裂のリスクと大動脈壁内エラスチン量の間には明らかな関連性は報告されていないが、MRIによるエラスチン量の評価が可能になったことで、今後大動脈瘤の予後予測の有用な補助診断的手段となりうる可能性がある。現在のところ、大動脈壁内のエラスチン線維の変性の程度を確認する方法は、実際に検体を採取し組織学的に評価する以

外に方法はない。しかし、将来的に本研究の方法を用いることによって非侵襲的にMRIによる大動脈壁内エラスチンの定量を行える可能性がある。今後、エラスチンと大動脈瘤形成・進展の機序についてさらなる研究が求められるが、大動脈壁内のエラスチンを定量化することで将来的な瘤化の可能性を予測したり、動脈瘤における破裂のリスクを推測することが期待される。また現在薬物療法における動脈瘤の進展予防の可能性が報告されているが、経時的にMRIで大動脈内エラスチンを定量化することで、薬物による治療効果判定にも活用できると思われる。しかし将来的にヒトにおいてESMA投与によるMRI撮影を行うためには、ESMAの毒性や代謝経路についての評価が十分にされる必要がある。マウスにおいてESMAは腎代謝であることが示されているが、毒性について研究された報告は現在認めていない[11]。ESMA投与後の予後のフォローアップ、血液学的所見、各臓器の組織学的評価などを行う必要がある。またMRIによるエラスチンの定量化は大動脈を摘出することなく血管壁内エラスチン量を評価できることから、将来的に動脈瘤研究における実験動物の数を減らすことにも役立つと考えられる。

5. 結論

本研究では、ESMA を使用することで、(1) MRI で大動脈壁内のエラスチンを定量化できる、(2)マルファン症候群マウスの上行大動脈瘤において、野生株マウスの上行大動脈と比較し、血管壁内のエラスチンが減少していることを非侵襲的に診断することが可能であることを示した。非侵襲的に大動脈瘤の形成・進展との関連が指摘されている血管壁内エラスチンを定量化することが可能になり、それに加え、同手法が大動脈瘤の予後の予測や治療効果判定を評価する診断法として有効である可能性が示唆された。また同手法が動脈瘤以外にも様々な血管疾患の診断補助にも役に立つ可能性がある。

6. 当学位論文の研究における筆者の担当

当研究において、筆者は大動脈径の計測、大動脈の摘出、エラスチカーワンギーソン染色、大動脈壁エラスチンの蛍光顕微鏡での撮影、MRI によるマウス大動脈の撮影、造影剤の静注、R1 値の計測、ICP-MS によるガドリニウム量測定のための検体の処理、論文作成・投稿・修正を行った。MRI sequence の作成、T1 mapping 解析ソフトの作成、ESMA 緩和度の計測に関しては共同研究者らの協力を得た。

引用文献

1. 厚生労働省 平成25年 人口動態統計

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/kakutei13/>

2. Milewicz DM, Dietz HC, Miller DC. Treatment of aortic disease in patients with Marfan syndrome. *Circulation*. 111:e150–e157;2005.

3. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, Myers L, Klein EC, Liu G, Calvi C, Podowski M, Neptune ER, Halushka MK, Bedja D, Gabrielson K, Rifkin DB, Carta L, Ramirez F, Huso DL, Dietz HC. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*. 312:117–121;2006.

4. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother*. 57:195–202;2003.

5. Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res*. 94:1158–1167;2004.

6. Bunton TE, Biery NJ, Myers L, Gayraud B, Ramirez F, Dietz HC. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res*. 88:37–43;2001.

7. Perrone-Filardi P, Dellegrottaglie S, Rudd JH, Costanzo P, Marciano C, Vassallo E, Marsico F, Ruggiero D, Petretta MP, Chiariello M, Cuocolo A. Molecular imaging of atherosclerosis in translational medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 38:969–975;2011.
8. Millon A, Dickson SD, Klink A, Izquierdo-Garcia D, Bini J, Lancelot E, Ballet S, Robert P, Mateo de Castro J, Corot C, Fayad ZA. Monitoring plaque inflammation in atherosclerotic rabbits with an iron oxide (P904) and (18)F-FDG using a combined PET/MR scanner. *Atherosclerosis*. 228:339–345;2013.
9. Clough R, Taylor P. Future imaging techniques in aortic pathologies and clinical implications. *J Cardiovasc Surg*. 54(1 suppl1):15–19;2013.
10. von Bary C, Makowski M, Preissel A, Keithan A, Warley A, Spuentrup E, Buecker A, Lazewatsky J, Cesati R, Onthank D, Schickl N, Schachoff S, Hausleiter J, Sch.mig A, Schwaiger M, Robinson S, Botnar R. MRI of coronary wall remodeling in a swine model of coronary injury using an elastin-binding contrast agent. *Circ Cardiovasc Imaging*. 4:147–55;2011.
11. Makowski MR, Wiethoff AJ, Blume U, Cuello F, Warley A, Jansen CH, Nagel E, Razavi R, Onthank DC, Cesati RR, Marber MS, Schaeffter T, Smith A, Robinson SP, Botnar RM. Assessment of atherosclerotic plaque burden with an elastin-specific

magnetic resonance contrast agent. *Nat Med.* 17:383–388;2011.

12. Allard M, Doucet D, Kien P, Bonnemain B, Caill. JM. Experimental study of DOTA-gadolinium. Pharmacokinetics and pharmacologic properties. *Invest Radiol.* 23(suppl 1):S271–S274;1988.

13. Graves EE, Quon A, Loo BW Jr. RT_Image: an open-source tool for investigating PET in radiation oncology. *Technol Cancer Res Treat.* 6:111–121;2007.

14. Milanesi M, Barison A, Positano V, Masci PG, De Marchi D, Marinelli L, Hardy CJ, Foo TK, Landini L, Lombardi M. Modified cine inversion recovery pulse sequence for the quantification of myocardial T1 and gadolinium partition coefficient. *J Magn Reson Imaging.* 37:109–118;2013.

15. Smit H, Guridi RP, Guenoun J, Poot DH, Doeswijk GN, Milanesi M, Bernsen MR, Krestin GP, Klein S, Kotek G. T1 mapping in the rat myocardium at 7 tesla using a modified CINE inversion recovery sequence. *J Magn Reson Imaging.* 39:901–910;2014.

16. Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY, Dietz HC. Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest.* 114:172–181;2004.

17. Merk DR, Chin JT, Dake BA, Maegdefessel L, Miller MO, Kimura N, Tsao PS,

- Iosef C, Berry GJ, Mohr FW, Spin JM, Alvira CM, Robbins RC, Fischbein MP. miR-29b participates in early aneurysm development in Marfan syndrome. *Circ Res.* 110:312–324;2012.
18. Kuivaniemi H, Platsoucas CD, Tilson MD 3rd. Aortic aneurysms: an immune disease with a strong genetic component. *Circulation.* 117:242–252;2008.
19. Makowski MR, Wiethoff A, Ebersberger U, Blume U, Warley A, Jansen C, Onthank DC, Cesati RR, Razavi R, Marber M, Schaeffer T, Robinson SP, Botner RM. Molecular assessment of aortic aneurysm wall integrity using an elastin-specific MR imaging probe. *J Cardiovasc Mag Reso.* 15:4;2013.
20. Kaewlai R, Abujudeh H. Nephrogenic systemic fibrosis. *Am J Roentgenol.* 199:W17–W23;2012.
21. Harisinghani MG, Barentsz J, Hahn PF, Deserno WM, Tabatabaei S, van de Kaa CH, de la Rosette J, Weissleder R. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N Engl J Med.* 348:2491–2499;2003.
22. Sadeghi MM, Glover DK, Lanza GM, Fayad ZA, Johnson LL. Imaging atherosclerosis and vulnerable plaque. *J Nucl Med.* 51:51S–65S;2010.