

# 近赤外線自家蛍光法による動脈硬化質的診断法の開発

新潟大学医歯学総合研究科 循環器内科学  
池上 龍太郎

## 【研究背景・目的】

近年、安定冠動脈疾患に対するPCIの適応が見直されるとともに、動脈硬化プラークの不安定性と破綻リスクに応じた治療戦略が求められている。近赤外線自家蛍光法（NIRAF: Near infrared autofluorescence）は、動脈硬化病変の質的診断を可能とする分子イメージング技術として期待されている。不安定プラークには、特定の波長の近赤外線に反応して強い自家蛍光を発する粒子が豊富に存在することがわかっており、この粒子は安定プラーク内には存在しないため自家蛍光を検出することでプラーク不安定化の診断が可能になる。マサチューセッツ総合病院の研究グループは、NIRAFとOCTを併用した血管内イメージングデバイスNIRAF-OCTを開発し、臨床的に有用であることを報告している（図1. *JACC Cardiovascular Imaging*. 2016; 9(11):1304-1314）。不安定プラーク内の発蛍光物質が何かは明らかでなかったが、筆者はこの研究グループに所属して研究に取り組み（2019-2020年）、蓄積する酸化脂質複合体がこの自家蛍光粒子の正体であることを報告した（*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021; 41(7): e385-398）。一方で、自家蛍光粒子がどのような分子メカニズムで発生するのか、プラークの不安定化にどのような役割を果たすのか、については十分に解明できていない。

本研究の目的は、不安定プラークに存在する自家蛍光粒子の発生メカニズムと病態的意義を明らかにすることでNIRAFの診断的意義を確立することである。自家蛍光粒子は泡沫化マクロファージの内部に発生することから、貪食細胞のリソソーム機能不全が自家蛍光発生のメカニズムであり、自家蛍光粒子の発生を抑制することが不安定プラークの治療アプローチとなりうるという仮説を検証した。

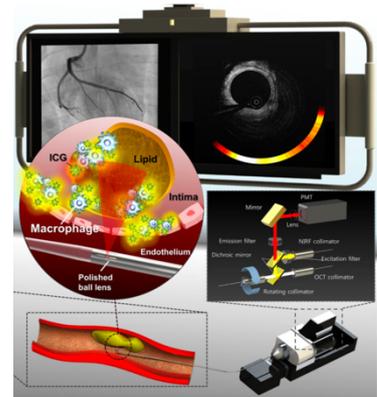


図 1. NIRAF-OCT

## 【方法】

### Step1. 泡沫化マクロファージのリソソーム機能不全と自家蛍光の関係

THP-1細胞をマクロファージに分化し、酸化LDLを添加して5日間培養すると自家蛍光が発生する（図2. *in Vitro* NIRAFモデル）。これら自家蛍光発生細胞のリソソーム機能についてリソソームpHセンサーを用いて評価し、リソソーム阻害薬・賦活化薬を添加して自家蛍光の変化を評価した。

### Step2. 自家蛍光粒子の病態的意義の解明

自家蛍光粒子が炎症の惹起や細胞死の誘導などを介して、プラーク不安定化の“プロモーター”の役割を担いACSの発症に関与しているという仮説を検証した。自家蛍光陽性細胞から比重分離法により自家蛍光粒子をリソソームごと抽出し自家蛍光含有リソソームを血管内皮細胞（HUVEC）、炎症細胞（THP-1 macrophage like cell）に添加し、① 炎症惹起性、② 細胞障害・細胞死誘導性についての細胞応答を解析した。

### Step3. 動物モデルでの自家蛍光抑制法の検証

ApoEノックアウトマウスの頸動脈結紮モデルは不安定プラークの動物モデルとして利用されるが、予備的検討でプラークに一致してNIRAFシグナルを認めることが確認している。このマウスにリソソーム賦活化薬を投与し、自家蛍光の変化とプラークの病理像を分析する。

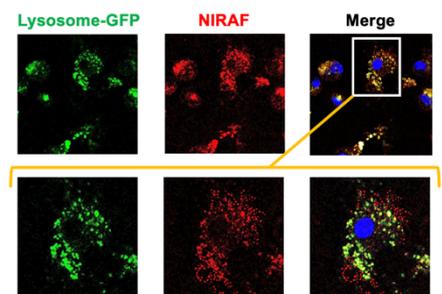


図 2. 自家蛍光粒子  
酸化LDLを添加し5日間培養するとリソソーム内に自家蛍光粒子が発生する。

【結果】

Step1. 泡沫化マクロファージのリソソーム機能不全と自家蛍光の関係

はじめに、自家蛍光発生泡沫化マクロファージのリソソーム機能について、自家蛍光発生泡沫化マクロファージ（酸化LDL添加培養5日間）と非発生マクロファージ（酸化LDL添加培養2日間）のリソソーム内pHについて蛍光プローブ(Lysosomal Acidic pH Detection Kit-Green/Deep Red)を用いて比較した。自家蛍光発生マクロファージでは、非発生マクロファージ及び酸化LDLを添加していないマクロファージと比べて有意にリソソーム内pHの上昇を認めていた(図3)。リソソームpHの上昇はリソソーム内の酵素活性が低下することで分解能の低下を招くことから、リソソーム機能不全に陥っていることを意味している。また、免疫染色による観察では、マロンジアルデヒドや4-ヒドロキシ-2-ノネナルがマクロファージ内に蓄積しており、一部の自家蛍光粒子と共局在していた(図4)。これら脂質酸化の代謝産物の蓄積は、マクロファージ内での脂質分解が正常な経路で行われず、過剰に取り込まれた酸化脂質の消化不良産物が蓄積していること、分解産物が複合体を形成し自家蛍光粒子を発生させているとの我々の仮説を支持するものであった。

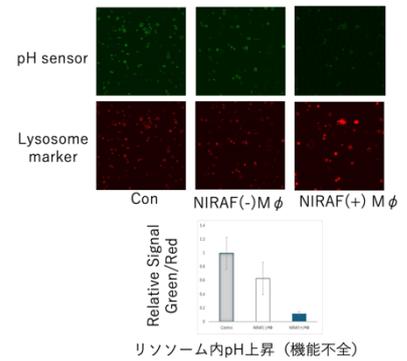


図3. 自家蛍光発生細胞のリソソーム機能

次に、リソソーム機能阻害薬・賦活化薬を酸化LDLと同時に添加して、自家蛍光の発生を共焦点顕微鏡およびFACSを用いて評価した(図5)。酸化LDLとリソソーム機能阻害薬（ヒドロキシクロロキン）を同時に添加し5日後に観察すると、酸化LDLのみを添加した泡沫化マクロファージに比べ自家蛍光の発生が有意に増強していた。一方で、リソソーム賦活化機能が報告されているベラパミルを添加して5日後に観察すると自家蛍光の発生は減弱していた。

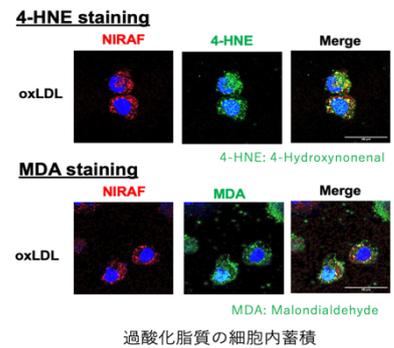


図4. 酸化脂質代謝産物の蓄積

以上より、自家蛍光を発生する泡沫化マクロファージはリソソーム機能不全がより進行した状態であり、分解能低下を背景に酸化脂質の分解不良産物が蓄積している状態にあることが示された。また、マクロファージの機能賦活化により自家蛍光発生を抑制できることを明らかとなった。

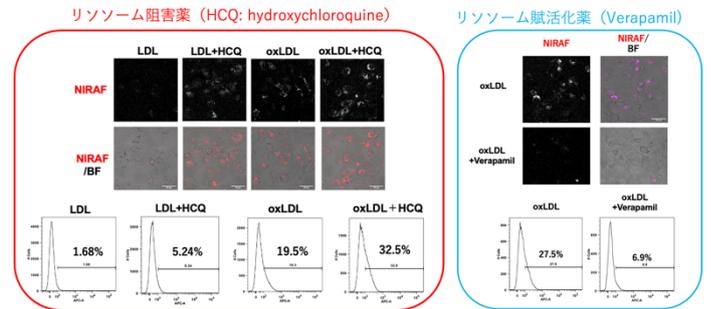


図5. リソソーム機能阻害薬・賦活化薬の添加

Step2. 自家蛍光粒子の病態的意義の解明

次に、これらの自家蛍光粒子がプラーク内環境においてどのような病態的意義を持つかを検証した。リソソーム抽出キットと超遠心法を用いてマクロファージから自家蛍光粒子をリソソームごと抽出した。リソソームが抽出できていることはリソソームマーカー蛋白 (LAMP2A) のウェスタンブロットで確認し、抽出リソソーム分画の蛋白定量により含有蛋白濃度を測定した。この抽出リソソーム分画を培養マクロファージ(分化THP-1細胞)および血管内皮細胞(HUVEC)に添加して細胞応答を解析した(図6)。自家蛍光非

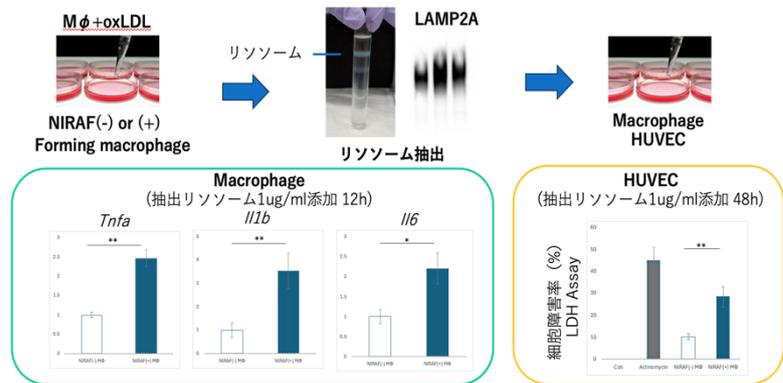


図6. 自家蛍光含有リソソームに対する細胞応答

発生マクロファージ（酸化LDL添加培養2日間）から抽出したリソソームをコントロールとして用いた。

自家蛍光粒子含有リソソームを添加したマクロファージでは、自家蛍光粒子を含有しないリソソームを添加したものに比べて有意に炎症性分子のmRNA発現が上昇していた。また、HUVECに添加して細胞障害を評価すると、自家蛍光粒子含有リソソームは細胞障害性が強いことがわかった。

これらの結果から、自家蛍光粒子そのものが炎症惹起性や細胞障害性を有することが示された。泡沫化マクロファージが細胞死を起こし、自家蛍光粒子がプラーク内環境に放出されることでプラークの不安定化に寄与している可能性が示された。

### Step3. 動物モデルでの自家蛍光抑制法の検証

自家蛍光の発生を確認した頸動脈結紮ApoEノックアウトマウスにリソソーム機能賦活化薬を投与し、自家蛍光とプラーク進行抑制の効果を検証する実験の準備を進めている（図7. 実験結果未）。

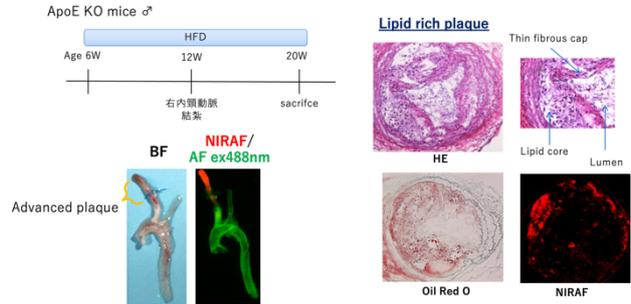


図7. 自家蛍光発生プラークの動物モデル（マウス）

### 【考察と今後の研究の展開】

本研究の結果から、プラークが不安定になると発生する自家蛍光粒子の発生メカニズムについて新たな知見を得ることができた。プラークの不安定化に泡沫化マクロファージが重要な役割を担うことは広く知られているが、酸化脂質の分解産物が蓄積したマクロファージが自家蛍光を発生するようになること、自家蛍光粒子の存在はリソソーム機能低下とともに、より細胞死に近づいたエンドステージにあるマクロファージの存在を反映していることを示している。また、自家蛍光粒子を含む機能不全リソソームは周囲の炎症や細胞障害を誘導することから、自家蛍光粒子が細胞死を契機にプラーク内環境に放出されることによりプラーク内炎症を促進し、壊死性プラークの増大や線維性被膜の菲薄化を誘導すると考えられる。そして、自家蛍光粒子そのものがプラーク不安定化のプロモーターの役割を担うことも明らかとなった。このことはNIRAF-OCTにより検出される不安定プラークが活動性の高いハイリスクなプラークである可能性が高いことを示している。さらに、本研究のin Vitroの実験よりリソソーム機能賦活化薬がリソソーム機能維持によりプラーク不安定化を抑制する可能性も示された。この点についてIn Vivoの検討結果(Step3)が待たれるところである(図8)。

本研究の今後の展開として、リソソーム機能賦活化薬がプラーク内マクロファージの機能維持や細胞死の抑制を介してプラーク不安定化を抑制できる可能性について、さらに検証していきたいと考えている。今回使用した薬剤以外に、リソソーム機能及びオートファジー機能に関連する薬剤や遺伝子が数多く報告されており、これらがプラーク内マクロファージに有効に作用すればプラーク内環境を抗炎症・抗不安定化に変化させられる可能性があると考えている。カテーテル治療の世界ではドラッグコーティングバルーンの登場により、動脈硬化プラークへ薬剤の直接塗布が可能となっている。NIRAF-OCTにより自家蛍光を発生するハイリスクプラークを同定し、リソソーム機能を維持する薬剤を用いてプラーク安定化を促進する薬剤を塗布できれば、全く新しい不安定プラークの診断・治療法の開発につながる可能性がある。

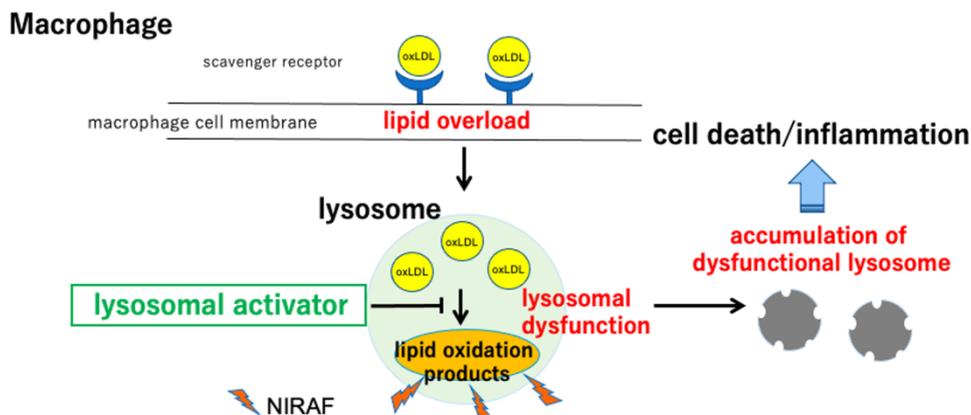


図7. 自家蛍光発生のメカニズムと病態的意義