

京都大学	博士 (医学)	氏名	池田 宏之
論文題目	Activatable fluorescence imaging of macrophages in atherosclerotic plaques using iron oxide nanoparticles conjugated with indocyanine green (インドシアニンググリーン標識酸化鉄ナノ粒子による動脈硬化性プラークにおけるマクロファージのアクチベイタブル蛍光イメージング)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>マクロファージは不安定な動脈硬化性プラークの形成に重要な役割を果たしている。近年、不安定な動脈硬化性プラークを検出する手法として、生体透過性に優れた近赤外領域に励起・蛍光波長を示す分子プローブを用いる、簡便かつ高感度なインビボ蛍光イメージング法が注目されている。不安定な動脈硬化性プラークは内頸動脈狭窄症に対する頸動脈内膜剥離術において術中塞栓の危険因子とされており、手術中の近赤外蛍光 (NIRF) イメージングにより、動脈の遮断位置や動脈硬化性プラークの摘出範囲の決定の指標となれば、手術支援に繋がる可能性がある。</p> <p>酸化鉄ナノ粒子 (IONP) は生体適合性が良好であり、炎症局所のマクロファージに取り込まれる特徴を持つ。一方、近赤外領域に蛍光波長を持つインドシアニンググリーン (ICG) は、安全性の高い蛍光色素であり、臨床利用されている。そのため、IONP に ICG を結合させた分子プローブは、動脈硬化性プラークにおけるマクロファージを標的とする、生体適合性の高い NIRF プローブとなることが期待できる。また、ICG が持つ消光作用を利用して、蛍光をオフからオンへと変換しうることから、動脈硬化性プラークを特異的に検出可能なアクチベイタブル蛍光プローブとして利用できる可能性がある。そこで本研究では、ICG 標識 IONP (IONP-ICG) がアクチベイタブル蛍光プローブとしての特性を有し、動脈硬化性プラークにおけるマクロファージの局在同定が可能であるか評価した。</p> <p>IONP に対する ICG の導入数が、蛍光感度、マクロファージへの取込み能、体内動態に影響を与えることが予想されたため、IONP 1 分子に異なる数の ICG を結合させた 3 種類のプローブを合成し、以下の評価を行った。まず、IONP-ICG 溶液の蛍光シグナル特性を評価した結果、水溶液中では消光状態であったが、界面活性剤の添加により蛍光強度が回復した。この結果より、IONP-ICG の構造変化が蛍光のオフオンスイッチングを誘発する可能性を示した。マクロファージによる取込み実験では、IONP-ICG がマクロファージへ経時的に取込まれ、IONP に対する ICG の導入数の増加に伴い、より強い蛍光シグナルが観察された。一方、細胞内に取込まれた鉄量は、ICG の導入数に依存しておらず、ICG の導入数は、IONP-ICG のマクロファージによる取込みに影響を与えない可能性が示された。</p> <p>自然発症アポ E 欠損高脂血症 (SHL) マウスに西洋食もしくは正常食を 14 週間与え、20 週齢になった時点で、IONP-ICG を静脈内より投与し、投与 48 時間後に動脈硬化性プラークを含む大動脈を摘出して NIRF イメージング実験を行った。主に動脈硬化性プラークの辺縁に強い蛍光が明瞭に観察され、プラーク内部の蛍光は比較的弱かった。蛍光シグナルの定量評価を行った結果、西洋食を与えた SHL マウスでは、IONP への ICG 導入数の増加に伴って蛍光シグナルが増強し、IONP への ICG 導入数が多いプローブが NIRF イメージングに効果的であると考えられた。また、正常食を与えた SHL マウスと比較して、西洋食を与えた SHL マウスでは、動脈硬化病変における蛍光シグナルが有意に高く、集積するマクロファージの増加を反映していると考えられた。病理学的所見では、動脈硬化性プラークの蛍光シグナル部位はマクロファージの局在との高い相関を認めた。</p> <p>以上、本研究で開発した IONP-ICG は蛍光のオフオンスイッチング機能を有するアクチベイタブル蛍光プローブであり、マクロファージ細胞に取り込まれることで、マクロファージ特異的な蛍光シグナルを示した。また、SHL マウスの動脈硬化性プラーク内マクロファージの蛍光イメージングに成功したことから、IONP-ICG を用いる、動脈硬化性プラークのマクロファージの局在同定の可能性を示した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

不安定な動脈硬化性プラークを検出するために様々な蛍光プローブが用いられているが、臨床で使用可能な水準には至っていない。そこで申請者は、生体適合性が良好な試薬から合成した IONP-ICG を用いて、動脈硬化性プラークにおけるマクロファージの局在同定が可能であるか評価した。

IONP-ICG は水溶液中では消光状態であったが、界面活性剤の添加により蛍光強度が回復し、IONP-ICG の構造変化が蛍光のオフオンスイッチングを誘発する可能性を示した。マクロファージによる取込み実験では、IONP-ICG がマクロファージへ経時的に取込まれ、IONP に対する ICG の導入数の増加に伴い、より強い蛍光シグナルが観察された。IONP-ICG を投与した SHL マウス大動脈の NIRF イメージングでは、動脈硬化性プラークの辺縁に強い蛍光が明瞭に観察された。蛍光シグナルの定量評価を行った結果、IONP への ICG 導入数の増加に伴って蛍光シグナルが増強し、IONP への ICG 導入数が多いプローブが NIRF イメージングに効果的であることが示唆された。病理学的所見では、動脈硬化性プラークの蛍光シグナル部位はマクロファージの局在との高い相関を認めた。

本研究で開発した IONP-ICG は、アクチベイタブル蛍光プローブの特性を有し、動脈硬化性プラークにおけるマクロファージの局在同定の可能性を示した。

以上の研究は動脈硬化性プラークにおけるマクロファージの局在同定の解明に貢献し、脳血管障害における慢性炎症の蛍光イメージングの発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成30年10月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降