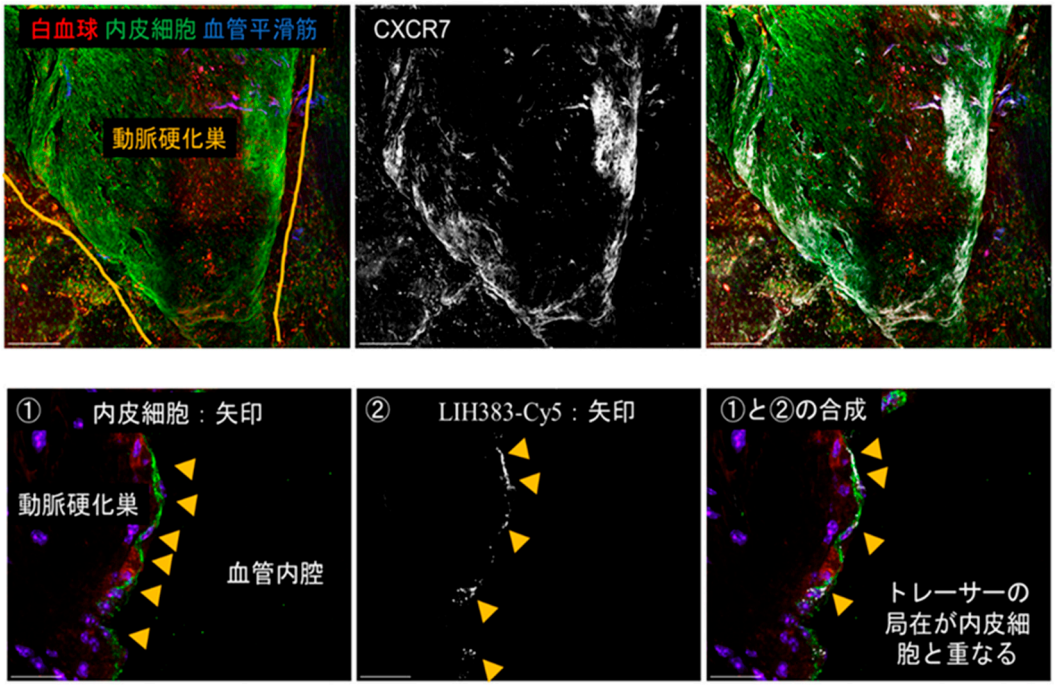
67　CXCR7特異的PETトレーサーを用いた動脈硬化の病態解明	馬場　理

【目的】非定型的ケモカイン受容体 CXCR7 は動脈硬化進展において重要な機能を持つと考えられるが、その動脈硬化巣における発現分布を含めて判明していないことが多い。一方、PET 検査は生体内での分子動態を非侵襲的に評価できる点で、近年、動脈硬化性疾患領域でも注目を浴びている。本研究の目的は、マウス動脈硬化モデルを用いて動脈硬化巣中の CXCR7 の発現細胞および CXCR7 の動脈硬化形成における機能を明らかにすることである。具体的には、1. マウスモデルを用いた動脈硬化巣における CXCR7 の発現および機能解析、2. 臨床応用に向けた CXCR7 特異的 PET トレーサーの開発およびマウスモデルでの動脈硬化巣における PET シグナル解析を行っていった。

【方法】1. マウス動脈硬化巣における CXCR7 の発現を免疫染色、Whole mount 染色、そしてフローサイトメトリーを用いて解析した。2. CXCR7 特異的ペプチド LIH383 を Cy5 によって標識し、アポ E 欠損マウスに投与、動脈硬化巣における分布を免疫染色で確認した。

【結果】1. 動脈硬化含有大動脈の Whole mount 染色によって、CXCR7 が動脈硬化巣に高発現していることが判明した。さらに、動脈硬化巣の血管内皮細胞、特にプラークの裾野や端部に発現していることが明らかになった。また、血管平滑筋細胞にも発現が認められることを明らかにした。血管内皮における CXCR7 の動脈硬化進展に与える影響を評価するために血管内皮特異的 CXCR7 欠損マウスを作製した。2. CXCR7 特異的ペプチド LIH383 は主に動脈硬化巣の血管内皮に集積することが判明した。これにより LIH383 を用いたトレーサーが動脈硬化巣に実際に集積すると考えられたために、CXCR7 特異的 PET トレーサーの開発を開始した。

動脈硬化巣における CXCR7 の分布（上）と LIH383-Cy5 の動脈硬化巣内皮細胞への集積（下）



67. CXCR7 特異的 PET トレーサーを用いた動脈硬化の病態解明

馬場　理

京都大学 医学部附属病院 先制医療・生活習慣病研究センター

Key words：動脈硬化，非定型ケモカイン受容体，CXCR7，PET

緒　言

過去数十年にわたって、動脈硬化性疾患に対する研究は日進月歩で進んでおり、それに伴って様々な診断および治療法が発展してきた。しかしながら、動脈硬化性疾患は本邦において未だに死因の約 25%を占め、世界全体を見ても依然として主要な死因の一つとなっている。このため、動脈硬化性疾患に対する新たな診断・治療法の開発が必要とされている。

近年、特定の分子特異的な放射性トレーサーを開発することによって標的分子の生体内での動態を非侵襲的に観察できるという点で、ポジトロン断層法（PET）が世界的に注目を集めている［1］。しかしながら、現在、臨床現場において動脈硬化性疾患に対する実用的な PET トレーサーは存在しておらず、新たな分子特異的なトレーサーの開発が求められている。多くの動脈硬化に対する研究は、マウスをはじめとした動物実験により遂行されるが、PET 検査は、当該実験により得られる分子動態をヒトにおいて非侵襲的に確認することを可能とする。こういった背景から現在、様々な分子を標的とした PET トレーサーが世界的に開発されており、動脈硬化性疾患における臨床応用について検討がなされている。

ヒトにおいてケモカインの一つである CXCL12 の血中での上昇は冠動脈疾患のリスク因子である［2］。一方、我々は、その主要な受容体の一つであるケモカイン受容体 CXCR4 が逆に動脈硬化抑制的に働くことを報告した［3，4］。非定型的ケモカイン受容体と呼ばれる一群の受容体は、ケモカイン受容体と相同性がありながらも従来のケモカイン受容体シグナルを惹起しないということで近年、着目されている。CXCL12 のもう一つの主要な受容体である CXCR7 はこの非定型的ケモカイン受容体の一つであり、主に内皮細胞に発現すること、CXCR4 とヘテロダイマーを形成すること、そして CXCL12 を除去することによってその量を調節することが知られている［5］。しかしながら、CXCR7 の動脈硬化巣における発現分布や機能については判明していないことが多い。

本研究の目的は、マウス動脈硬化モデルを用いて動脈硬化巣中の CXCR7 の発現細胞および CXCR7 の動脈硬化形成における機能を明らかにすることである。具体的には、1. マウスモデルを用いた動脈硬化巣における CXCR7 の発現および機能解析、2. 臨床応用に向けた CXCR7 特異的 PET トレーサーの開発およびマウスモデルでの動脈硬化巣における PET シグナル解析を行っていった。

結果、動脈硬化巣において CXCR7 は主に血管内皮細胞および血管平滑筋細胞に発現しており、白血球分画には発現していないことが判明した。また、CXCR7 特異的ペプチドを利用したトレーサーの分布を解析したところ、動脈硬化巣における血管内皮細胞に集積することが判明した。

方　法

1. 動脈硬化巣中の CXCR7 発現細胞の解析

動脈硬化巣における CXCR7 の発現をマウス動脈硬化切片の免疫染色および大動脈の Whole mount 染色によって評価し、その結果についてフローサイトメトリーを用いて確認した。そして得られた結果に基づいて、血管内皮細胞特異的な CXCR7 欠損マウスを作製した（$CXCR7^{f1/f1}$: VE-CadherinvCreERT2 : $Apoe^{-/-}$マウス）。さらに血管平滑筋

特異的な CXCR7 欠損マウスについても作製を開始した。そして、ヒト動脈硬化巣における CXCR7 の発現も免疫染色を用いて確認した。

2. CXCR7 特異的 PET トレーサーの開発および動脈硬化巣における PET シグナルの解析

CXCR7 特異的 PET トレーサーの開発については Washington university in St. Louis の Yongjian Liu 博士および Luxembourg Institute of Health の Andy Chevigné 博士と共同研究を開始した。Chevigné 博士は CXCR7 特異的に結合する LIH383 というペプチドを独自に開発しており［6］、Liu 博士の研究室にてこれを用いて PET トレーサーの開発を開始した。PET 画像の解像度は未だに細胞レベルでの解析ができるほど高くはない。我々は、蛍光色素にて標識した CXCR7 特異的トレーサー（Cy5-LIH383）を作製した。これを、アポ E 欠損マウスに静注後に末梢血中および大動脈中の Cy5 陽性細胞を、免疫染色で解析した。また、大動脈の Whole mount 染色によってより広範囲のトレーサーの分布についても確認した。

結果および考察

1. CXCR7 は動脈硬化巣において、主に血管内皮細胞および血管平滑筋細胞に発現する

動脈硬化巣における CXCR7 の発現をマウス動脈硬化切片の免疫染色および胸部大動脈の Whole mount 染色によって評価を行ったところ、動脈硬化巣で高発現していることが判明した（図 1）。さらにその中でも血管内皮細胞（特に動脈硬化巣の裾野や端部）に発現していることが明らかになった。そして、血管平滑筋細胞にも発現していることが示唆された（図 2）。また、フローサイトメトリーを用いた解析においても、動脈硬化含有大動脈内皮細胞および血管平滑筋細胞における CXCR7 の高発現を確認した（図 3）。一方、白血球分画での発現は認められなかった。さらにヒト動脈硬化巣においても CXCR7 の血管内皮細胞での高発現を認めた。これらの結果より、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞における CXCR7 が動脈硬化形成において何らかの役割を担っていると考えられた。これらの結果に基づいて、血管内皮細胞および血管平滑筋細胞特異的な CXCR7 欠損マウスを作製し、動脈硬化進展における影響について解析を行う。

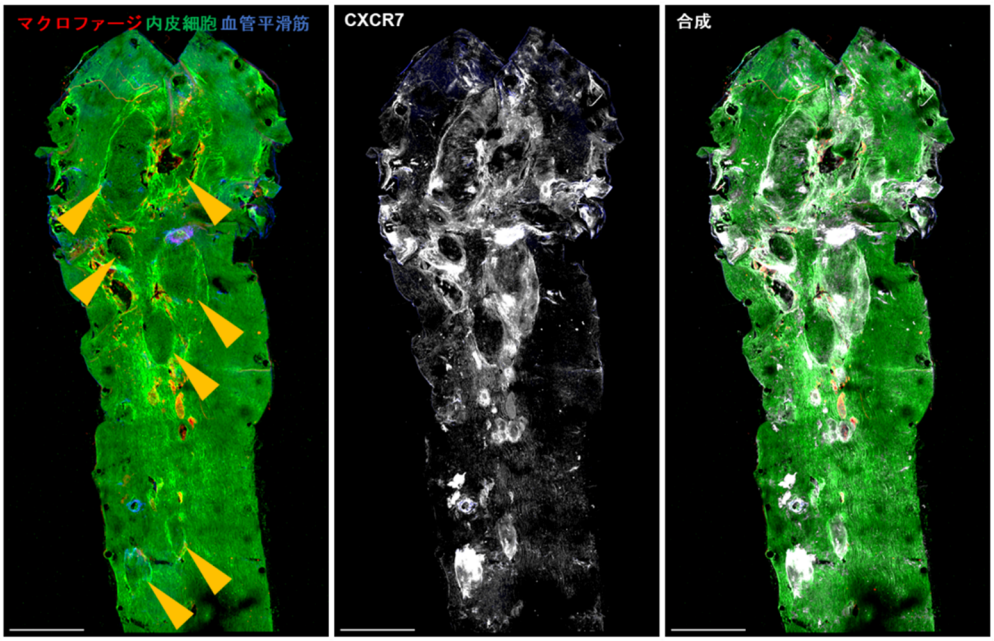


図 1. CXCR7 の動脈硬化巣含有大動脈での分布
CXCR7 は主に動脈硬化巣（黄色矢印）において高発現している。スケールバー：1 mm。

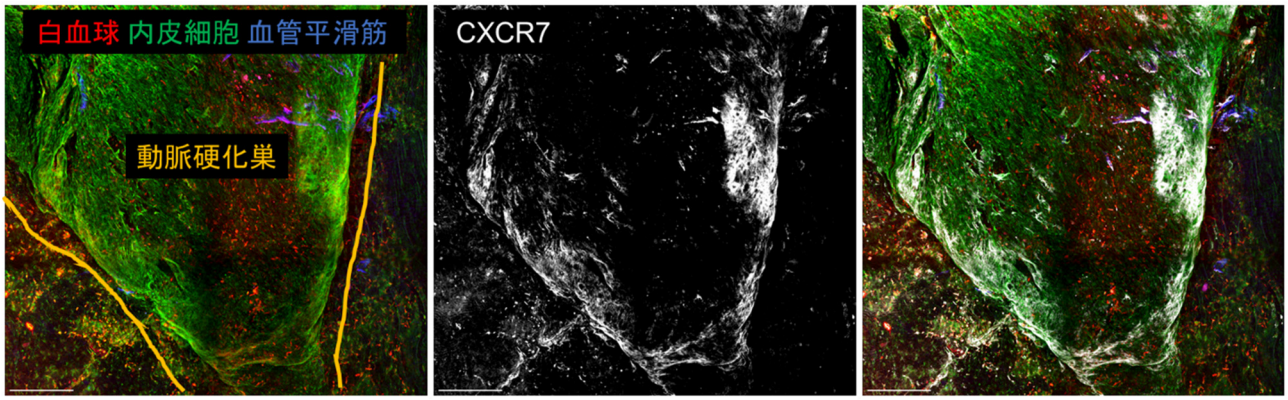


図 2.　CXCR7 の動脈硬化巣においての分布

CXCR7 は主に血管内皮細胞（動脈硬化の裾野および端部）に発現しているが、一部血管平滑筋細胞でも発現が認められる。スケールバー：20μm。

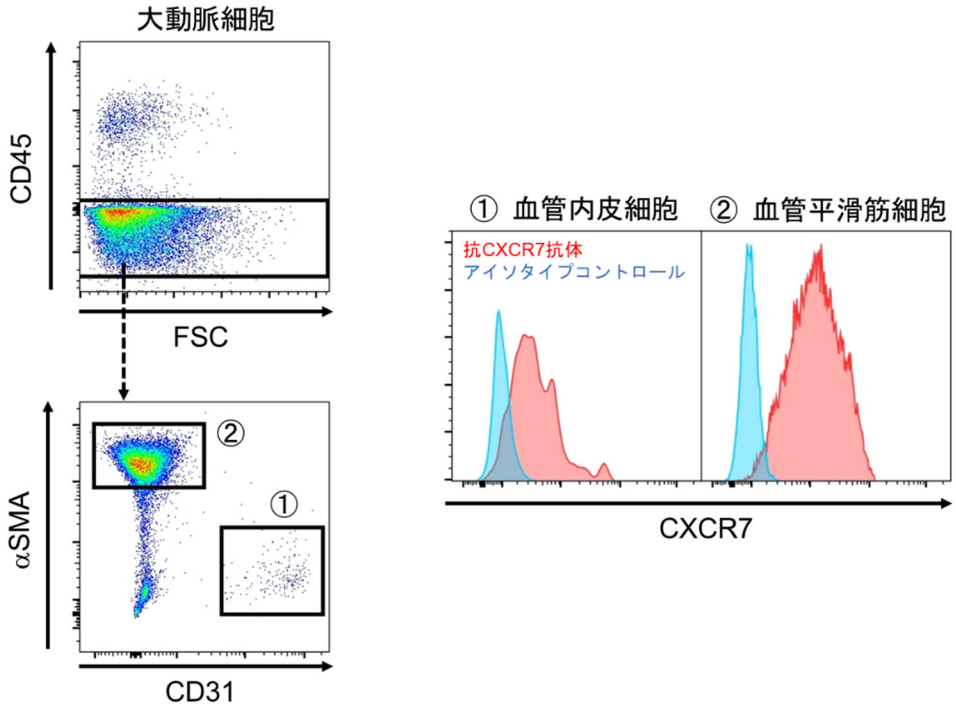


図 3.　CXCR7 の動脈硬化含有大動脈での発現

CXCR7 は血管内皮細胞および血管平滑筋細胞において高発現している。

2.　CXCR7 特異的ペプチド LIH383 は動脈硬化巣の血管内皮細胞に集積する

蛍光色素にて標識した CXCR7 特異的ペプチド（Cy5-LIH383）を、動脈硬化モデルマウスであるアポ E 欠損マウスに投与したところ、動脈硬化巣における内皮細胞に集積することが確認できた（図 4）。この結果より、LIH383 を用いて開発中の CXCR7 特異的 PET トレーサーが動脈硬化巣、特に内皮細胞に集積するであろうことが示唆された。

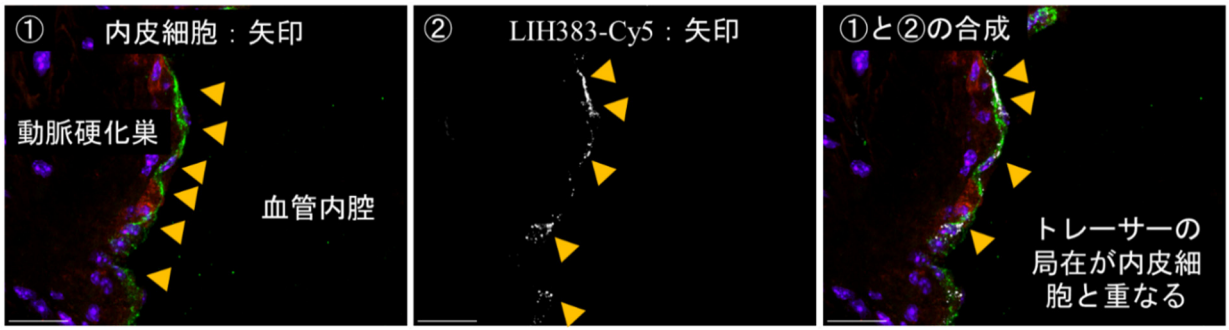


図 4. LIH383-Cy5（CXCR7 特異的蛍光標識トレーサー）の動脈硬化巣での分布
LIH383-Cy5 は黄色矢印に示されるように動脈硬化巣での血管内皮細胞に集積する。
スケールバー：20 μ m。

共同研究者

本研究の共同研究者は、Washington university in St. Louis の Yongjian Liu 博士および Luxembourg Institute of Health の Andy Chevigné 博士である。

文　献

1) Lawrence W Dobrucki, Albert J Sinusas. PET and SPECT in cardiovascular molecular imaging. Nat Rev Cardiol. 2010 Jan;7(1):38-47. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19935740 DOI: 10.1038/nrcardio.2009.201.

2) Jennifer Sjaarda, Hertzel Gerstein, Michael Chong, Salim Yusuf, David Meyre, Sonia S Anand, Sibylle Hess, Guillaume Paré. Blood CSF1 and CXCL12 as Causal Mediators of Coronary Artery Disease. J Am Coll Cardiol. 2018 Jul 17;72(3):300-310. Epub 2018 Jul 9. PMID: 30012324 DOI: 10.1016/j.jacc.2018.04.067.

3) Osamu Baba, Li-Hao Huang, Andrew Elvington, Martyna Szpakowska, Deborah Sultan, Gyu Seong Heo, Xiaohui Zhang, Hannah Luehmann, Lisa Detering, Andy Chevigne, Yongjian Liu, Gwendalyn J Randolph. CXCR4-Binding Positron Emission Tomography Tracers Link Monocyte Recruitment and Endothelial Injury in Murine Atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2021 Feb;41(2):822-836. Epub 2020 Dec 17. PMID: 33327748 DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.315053.

4) Yvonne Döring, Heidi Noels, Emiel P C van der Vorst, Carlos Neideck, Virginia Egea, Maik Drechsler, Manuela Mandl, Lukas Pawig, Yvonne Jansen, Katrin Schröder, Kiril Bidzhekov, Remco T A Megens, Wendy Theelen, Barbara M Klinkhammer, Peter Boor, Leon Schurgers, Rick van Gorp, Christian Ries, Pascal J H Kusters, Allard van der Wal, Tilman M Hackeng, Gabor Gäbel, Ralf P Brandes, Oliver Soehnlein, Esther Lutgens, Dietmar Vestweber, Daniel Teupser, Lesca M Holdt, Daniel J Rader, Danish Saleheen, Christian Weber. Vascular CXCR4 Limits Atherosclerosis by Maintaining Arterial Integrity: Evidence From Mouse and Human Studies. Circulation 2017 Jul 25;136(4):388-403. Epub 2017 Apr 27. PMID: 28450349 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027646.

5) Robert J B Nibbs, Gerard J Graham. Immune regulation by atypical chemokine receptors. Nat Rev Immunol. 2013 Nov;13(11):815-29. PMID: 24319779 DOI: 10.1038/nri3544.

6) Max Meyrath, Martyna Szpakowska, Julian Zeiner, Laurent Massotte, Myriam P Merz, Tobias Benkel, Katharina Simon, Jochen Ohnmacht, Jonathan D Turner, Rejko Krüger, Vincent Seutin, Markus Ollert, Evi Kostenis, Andy Chevigné. The atypical chemokine receptor ACKR3/CXCR7 is a broad-spectrum scavenger for opioid peptides. Nat Commun. 2020 Jun 19;11(1):3033. PMID: 32561830 DOI: 10.1038/s41467-020-16664-0.