

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07920

研究課題名(和文) 老化による酸化ストレスリスクファクターのEPRイメージング法による画像化研究

研究課題名(英文) Evaluation of risk factor under oxidative stress in aging by EPR imaging

研究代表者

江本 美穂 (EMOTO, Miho)

北海道医療大学・医療技術学部・講師

研究者番号：10578735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病モデルマウスの酸化ストレス研究の成果から、高齢化による様々な疾患に酸化ストレスに関与しているのではないかと考えるに至った。酸化ストレスという観点から老齢マウスと若齢マウスとの間にどのような共通点や差異があるのか？という問いを立て、レドックス状態の相対的指標を非侵襲的に画像化できるEPRイメージング法と、in vitroによる複数の脳内酸化ストレスマーカーの情報を統合し、老化により脳内ではどのような変化が起きたのかを明らかにする画像指標(Risk factor map)を作成する事を目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会となっている我が国では、更なる高齢化に向けて長期的な対応策を打ち出すことが喫緊の課題となっている。

老化による健康に対する影響はと言えば、最も深刻なものの一つがアルツハイマー病に代表される認知症問題である。平成29年高齢社会白書(内閣府)によると、2025年には65歳以上の高齢者の約5分の1は認知症有病者になる推計があるとされている。また、認知症に関わる医療費は、年間1.9兆円、介護費が6.4兆円などと認知症には莫大な費用が必要という試算がある。この事から、老化に関する科学的根拠に基づく知見が増え認知症の予防が可能となれば、日本経済にも非常に大きな波及効果をもたらすことが可能となる。

研究成果の概要(英文)：Our previous studies reveal that amyloid-beta level correlates to the oxidative stress level of Alzheimer's disease model mice. This study focuses on the same and different points of oxidative stress for control and aged mice brain using the EPR imaging method. The EPR imaging and the concentration of oxidative stress substances, such as ascorbic acid, glutathione, and SOD, were combined and remapped. The remapping image shows the risk factor for oxidative stress levels for aged mice compared to control mice.

研究分野：酸化ストレスイメージング

キーワード：酸化ストレス aging EPRイメージング ナイトロオキサイド化合物

1. 研究開始当初の背景

医学・公衆衛生学をはじめとする科学技術の発展により、日本だけでなく世界的に平均寿命が延びている。WHOによると、急速に高齢化が進み 2015 年から 2050 年までの間に世界の人口の 60 歳以上の割合は 12% から 22% に増えるとされている。超高齢社会となっている我が国では、更なる高齢化に向けて長期的な対応策を打ち出すことが喫緊の課題となっている。

老化による健康に対する影響で言えば、1950 年代に Harman により The free radical theory of aging が提唱されたが、その後、様々な研究によりこの仮説が拡大されたり、反証論文が発表されるなど現在でもフリーラジカルや酸化ストレスと老化に関する統一見解は得られていない状況である。また、老化の問題として、最も深刻なものの一つがアルツハイマー病(Alzheimer's disease:AD)に代表される認知症問題である。平成 29 年高齢社会白書(内閣府)によると、2025 年には 65 歳以上の高齢者の約 5 分の 1 は認知症有病者になる推計があるとされている。また、認知症に関わる医療費は、年間 1.9 兆円、介護費が 6.4 兆円などと認知症には莫大な費用が必要という試算がある(慶応大学と厚生労働科学研究共同グループ)。このことから、老化に関する科学的根拠に基づく知見が増え認知症の予防が可能となれば、日本経済にも非常に大きな波及効果をもたらすことが可能となる。

これらの事を踏まえ、脳内酸化ストレスの観点から老化がどのような影響を与えるのかを明らかにするために、**老齢マウスと若齢マウスとの間にどのような共通点や差異があるのか?**という問いを立て、この問いにアプローチすべく研究を行っていく。

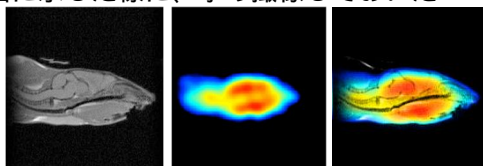
2. 研究の目的

前述の問いの回答を得るべく、これまでに我々が酸化ストレス研究で蓄積してきた基礎データを元に、電子常磁性共鳴 (electron paramagnetic resonance : EPR) イメージング法を用い 酸化ストレスの観点から、老化により脳内ではどのような変化が起きたのかを明らかにする画像指標 (risk factor map) を打ち立てる事を目的とする。 老齢マウスの酸化ストレスによる脳内レドックス状態の経年変化を、EPR 画像及び生化学的、組織学的に総合的に検討し、若齢マウスとの違いを浮き彫りにする。

3. 研究の方法

本研究では、若齢マウスと老齢マウスとの間にどのような共通点や差異があるのかという問いにアプローチすべく、以下の 2 段階のステップで検証していくことを予定していた。

実験動物として広く用いられているマウス、C57BL/6 の生後 3 ヶ月以下の月齢のマウスを若齢コントロールとして、生後 15 ヶ月以上のマウスを老齢マウスとして実験に用いる。マウスにイメージングプローブであるナイトロオキシドを投与し、経時的に EPR 画像を撮像した後、得られた EPR 画像の計算処理を行い、酸化ストレス状態を反映するレドックスマップを作成する。左図に示した様に、予め撮像しておいた MRI 画像(左)とレドックスマップ(中央)を重ね合わせる



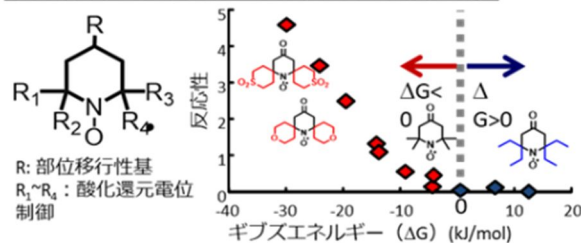
左：マウス頭部の MRI 画像
中央：マウス頭部のレドックスマップ
右：MRI 画像とレドックスマップの重ね合わせ

事(右)により、脳内部位特異的にレドックス状態の情報を得る。 イメージングプローブとしてのナイトロオキシドは下図に示したように、反応点周囲の置換基の修飾により酸化還元電位を変化させることができ、構造によりそれぞれ固有の酸化還元電位を持っているため、酸化ストレス感受性が異なる特性がある。過酸化脂質などの ROS への反応性が異なる事が in vitro の検証で明らかなものなど、複数のナイトロオキシドを用いて、月齢の違いにより、

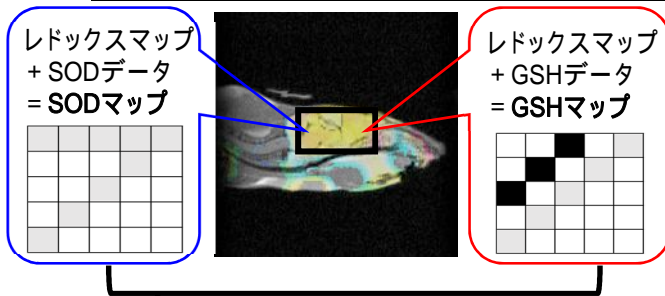
マウス脳内の酸化ストレスによるレドックス状態の変化がどの程度生じるかを検討する。

EPR イメージングと並行して、脳内の酸化ストレスに關与する複数の物質を in vitro で測定し、Step1 で得たレドックス状態との相関を検討する。測定物質は アスコルビン酸、GSH、SOD、過酸化脂質、8-OHdG、Nrf2 など である。

B) 反応性制御法 (化合物の反応性を ΔG で説明可能)

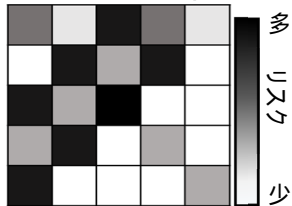


Step1 で得られたレドックスマップと、Step2-1 で得られた酸化ストレスマーカーとの相関性が認められるものに関しては、左図に示した GSH マップ、SOD マップなどのように酸化ストレス



マーカーマップをそれぞれ作成する。複数の酸化ストレスマーカーマップを1つに統合して risk factor map を作成する。risk factor map では、老齢マウスの酸化ストレスによるレドックス状態の変化が『どの部位』で『どのマーカー』の影響により生じているのかを可視化する事が可能となる。 risk factor map の検証を目的として、3, 9, 15 ヶ月の AD モデルマウスのイメージングを行い、risk factor map により脳内のどの部位が最も酸化ストレスに対して脆弱性を示すか確認する。

Risk factor map

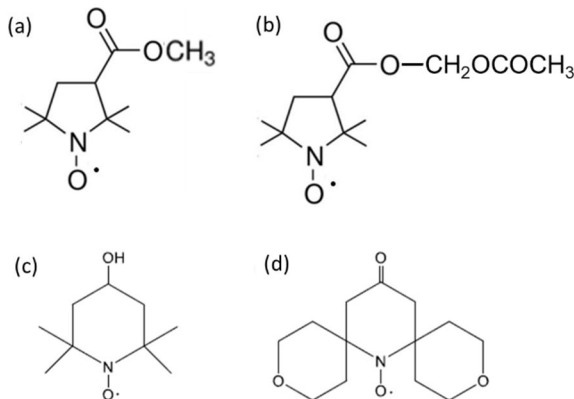


risk factor map の概略図：レドックスマップと相関が見られた酸化ストレスマーカーマップを作成する。複数の酸化ストレスマーカーマップを統合して risk factor map を作成する。

4. 研究成果

1) ナイトロオキサイド化合物の脳内移行性について

本研究課題においては、生後3ヶ月以下のマウスをコントロールとして、老齢マウスとの酸化ストレス状態にどのような共通項や差異があるかを確認する事とした。イメージングプローブであるナイトロオキサイドを複数用意し、マウスに投与しナイトロオキサイド化合物の違いにより酸化ストレスの見え方がどのように異なるかを検証した。



本研究課題において、脳内の酸化ストレス状態を可視化することが重要となるため、複数のナイトロオキサイド化合物をマウスに投与し脳内移行性を確認することとした。図1において本研究課題でイメージング実験を行ったうちの一部のナイトロオキサイド化合物の構造式を示した。3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-1-yloxy (MCP) Carbonyl-PROXYL-acetoxymethyl ester (AMCP), 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-Oxyl (Tempol), 2,6-dispiro-4',4''-dipyrene-piperidine-4-one-N-oxyl (Dipy) を示した。

図1 脳内移行性を確認したナイトロオキサイド化合物の構造式 (a)MCP, (b)AMCP, (c)Tempol, (d)Dipy

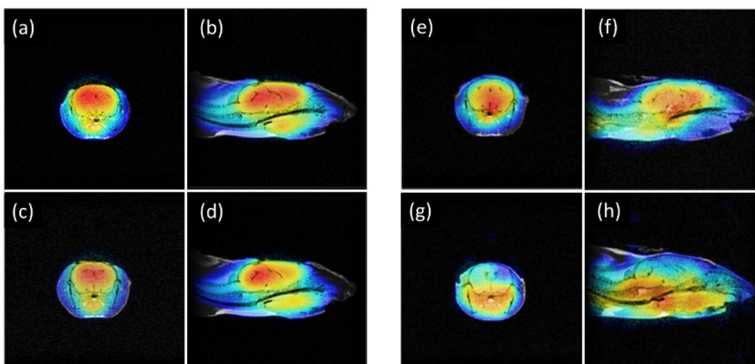


図2. ナイトロオキサイド化合物の違いによる、脳内移行性の差異(a)(b)は MCP を、(c)(d)は AMCP を、(e)(f)は Tempol を、(g)(h)は Dipy をそれぞれ投与したときのマウスの頭部 EPR イメージング。(a)(c)(e)(g)は coronal 断面を、(b)(d)(f)(h)は sagittal 断面を示す。

図2には図1で示した4種のナイトロオキサイド化合物をマウスに投与した EPR 画像と MRI を重ね合わせた画像を示した。重ね合わせの検討の結果、これら4種のナイトロオキサイド化合物は脳内移行性が認められた。しかし、その分布は同一では無く、脳内全体に広がっている MCP に対し、Dipy は脳内移行性が高いとは言えず、AMCP や Tempol も脳内均一と言うより局在していることが画像から判明した。

2) 月齢の違いによるレドックス状態の差異

1) の結果から脳内移行性の認められたナイトロオキサイド化合物の投与により得られた EPR 画像を元に脳内酸化還元状態を可視化した。可視化の方法は図 3 に示すとおり、レドックスマップ

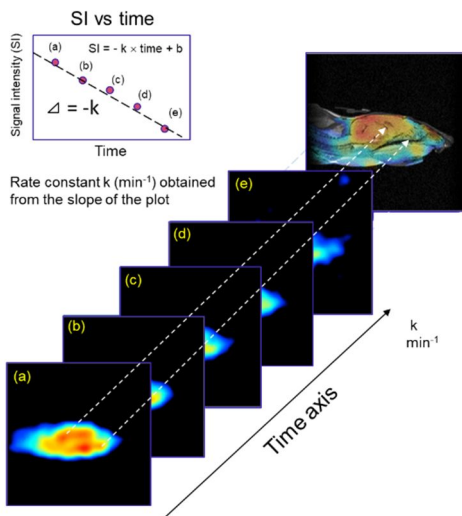


図 3 .レドックスマップの算出方法

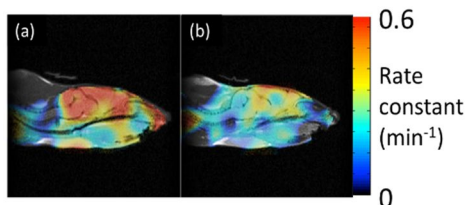


図 4. コントロールと高齢マウスのレドックス状態の差異

3) アルツハイマー病モデルマウスとコントロールの検証

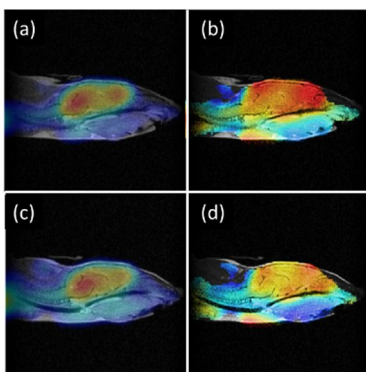


図 5. D-tempone を用いたコントロールマウスと高齢マウスのレドックスマップ

マップで表す。レドックスマップは次の手順、1)三次元 EPR 画像を時系列に取得し、2)目的のスライス面を抽出し、3)時系列に沿った EPR スライス画像の同一座標の画像強度を抽出する。4) 画像強度を縦軸、時間を横軸に取り、データをプロットし、5) 画像強度の減衰速度を求める。6) 全てのピクセルにおいてこの減衰速度を求め 7) 元の座標に減衰速度情報を戻し、8) 再マッピングを行う。この手順により得られた画像をレドックスマップと呼び、減衰速度情報を持っているため、どの領域でどれくらいの速度で信号が減少しているのかを定量的に表すことができる。

このレドックスマップを用いてコントロールと高齢マウスの脳内レドックス状態を比較した。図 4 に MCP を用いたレドックスマップを示す。(a)がコントロールマウスのレドックスマップ、(b)が高齢マウスのレドックスマップである。コントロールマウスのレドックス状態は比較的均一であるのに対し、高齢マウスのレドックス状態は不均一性が高いことが明らかとなった。今後、他のナイトロオキサイド化合物においても、コントロールと高齢マウスの脳内酸化ストレス状態を画像化し、共通項と差異を探索していく。

当初の計画ではコントロールと高齢マウスのレドックスマップを作成し、脳内抗酸化物質の測定を行い、両者の情報を統合することを計画していた。統合した結果の検証としてアルツハイマー病モデルマウスの画像を用いる予定であったが、新型コロナウイルスの影響により抗酸化物質測定を行う実験が計画通りに進んでいないため、先にアルツハイマー病モデルマウスの脳内レドックスマップを作成し、コントロールマウスとの比較を行った。その結果、使用するナイトロオキサイド化合物の種類によって、従来観察されていたよりも早期に EPR イメージング上でコントロールと高齢マウスの差異を描出する事が可能となった。図 5 にコントロールとアルツハイマー病モデルマウスのレドックスマップを示す。従来より早期に差異を検出

できたのは D-tempone をイメージングプローブとして使用した時で、これまでより 2 ヶ月早い段階で有意に酸化ストレス状態に変化がある事を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato-Akaba Hideo, Okada Yuki, Tsuji Kentaro, Emoto Miho C., Fujii Hirotada G.	4. 巻 52
2. 論文標題 Design and Fabrication of Compact Arrayed Magnet for Biological EPR Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 1017 ~ 1029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00723-020-01256-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato-Akaba Hideo, Emoto Miho C., Yamada Ken-ichi, Koshino Hisashi, Fujii Hirotada G.	4. 巻 55
2. 論文標題 Three-dimensional electron paramagnetic resonance imaging of mice using ascorbic acid sensitive nitroxide imaging probes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 950 ~ 957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2021.1991918	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Emoto Miho C., Sato-Akaba Hideo, Hamaue Naoya, Kawanishi Katsuya, Koshino Hisashi, Shimohama Shun, Fujii Hirotada G.	4. 巻 172
2. 論文標題 Early detection of redox imbalance in the APP ^{sw} /PS1 ^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 9 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato-Akaba Hideo, Emoto Miho C., Yamada Ken-ichi, Koshino Hisashi, Fujii Hirotada G.	4. 巻 55
2. 論文標題 Three-dimensional electron paramagnetic resonance imaging of mice using ascorbic acid sensitive nitroxide imaging probes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 950 ~ 957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2021.1991918	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato-Akaba Hideo, Okada Yuki, Tsuji Kentaro, Emoto Miho C., Fujii Hirotsada G.	4. 巻 -
2. 論文標題 Design and Fabrication of Compact Arrayed Magnet for Biological EPR Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00723-020-01256-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Taro, Hisahara Shin, Iwahara Naotoshi, Emoto Miho C., Yokokawa Kazuki, Suzuki Hiromi, Manabe Tatsuo, Matsumura Akihiro, Suzuki Syuuichirou, Matsushita Takashi, Kawamata Jun, Sato-Akaba Hideo, Fujii Hirotsada G., Shimohama Shun	4. 巻 145
2. 論文標題 Early administration of galantamine from preplaque phase suppresses oxidative stress and improves cognitive behavior in APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 20 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokokawa Kazuki, Iwahara Naotoshi, Hisahara Shin, Emoto Miho C., Saito Taro, Suzuki Hiromi, Manabe Tatsuo, Matsumura Akihiro, Matsushita Takashi, Suzuki Syuuichirou, Kawamata Jun, Sato-Akaba Hideo, Fujii Hirotsada G., Shimohama Shun	4. 巻 72
2. 論文標題 Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Amyloid- Pathology by Modifying Microglial Function and Suppressing Oxidative Stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 867 ~ 884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-190817	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miho C Emoto, Naoya Hamaue, Hideo Sato-Akaba, Hirotsada G Fujii	4. 巻 145
2. 論文標題 Effect of Glutathione and Ascorbic Acid on the Brain Redox Status in Transgenic Mouse Model of Alzheimer ' s Disease Evaluated by EPR Imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 S100 ~ S101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hideo Sato-Akaba, Miho C. Emoto, Hirotada G. Fujii
2. 発表標題 Development of digital EPR imaging system for biological applications.
3. 学会等名 ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirotada G Fujii, Hideo Sato-Akaba, Miho C Emoto
2. 発表標題 Brain imaging of small animals by compact bench-top EPR imager.
3. 学会等名 ISMAR-APNMR-NMRSJ-SEST2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Emoto Miho, Sato-Akaba H, Fujii H
2. 発表標題 Brain redox status of Alzheimer's disease model mouse using piperidine nitroxide Tempone with EPR imaging system
3. 学会等名 第49回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江本美穂
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスを用いた脳内酸化ストレスのイメージング研究
3. 学会等名 第72回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miho C Emoto, Naoya Hamaue, Hideo Sato-Akaba, Hirotada G Fujii
2. 発表標題 Effect of Glutathione and Ascorbic Acid on the Brain Redox Status in Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease Evaluated by EPR Imaging
3. 学会等名 The Society for Redox Biology and Medicine's 26th Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Emoto Miho, Sato S, Sato-Akaba H, Fujii H
2. 発表標題 Brain redox imaging using blood-brain barrier-permeable nitroxide probes with different lipophilicity
3. 学会等名 第47回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

江本研究室 北海道医療大学 http://www.hoku-iryu-u.ac.jp/~emoto/index.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------