

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 18日現在

機関番号：82502
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009 ～ 2011
 課題番号：21500419
 研究課題名（和文） 機能性マンガン増感磁気共鳴分子イメージング法の開発と病態適用

研究課題名（英文） Development and in-vivo application of functional manganese-enhanced MR molecular imaging
 研究代表者 青木 伊知男（AOKI ICHIO）
 独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー
 研究者番号：10319519

研究成果の概要（和文）：
 細胞内に入り多様な機能性を持つマンガン造影剤を用いて、その造影分子メカニズムを検討すると共に、①胎生期放射線照射による新生児脳神経変性疾患モデルに対して、発生不全の定量的評価、②腫瘍細胞に対するマンガン造影剤集積の定量評価と中皮腫モデルに対する有用性の実証、③血管新生を誘導しうる単核球細胞標識への応用と in vivo での追跡等を達成した。マンガン造影剤と高磁場 MRI による定量計測を組み合わせ、細胞レベルの変性や病態を評価示すことを示した。

研究成果の概要（英文）：
 Molecular mechanism of manganese contrast agent (Mn^{2+}) was investigated, as well as following applications: 1) quantitative evaluation for microencephaly model by neonatal radiation, 2) quantitative observation of Mn accumulation in tumor cells and application for higher Mn-SOD expressed mesothelioma model, 3) development and in-vivo application of monocyte labeling using Mn^{2+} . Positive contrast agent, Mn^{2+} , with high field and quantitative MRI can provide promising in-vivo molecular imaging to assess cellular level alteration or disease non-invasively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学 生体材料学

キーワード：医用・生体画像

1. 研究開始当初の背景

非侵襲的生体イメージングの開発と生物医学研究における適用は、これまでの形態画像や巨視的な機能・代謝画像から、「分子イメージング」へと発展しつつある。最近の高分子化学・細胞工学あるいはナノ加工技術の発展は、次世代型ともいえる薬剤送達技術をもたらし、高磁場 MRI の開発と相俟って、「MR

分子イメージング」とも言える新しい方法論を創出しつつある。申請者は、特徴的な機能性を持つ Mn 造影剤が幅広い応用分野に展開可能であることを予測、その実用化に取り組み、神経脱分極依存の集積、軸索能動輸送トレースなど Mn 増感 MRI (MEMRI) と総称される研究分野創出の一翼を担っている。

2. 研究の目的

本研究は、高い空間分解能での撮像が可能な高磁場 MRI 技術を用いて、細胞膜の電圧作動性 Ca^{2+} チャンネル等を通過する機能性マンガン (Mn) 造影剤を利用した「Mn 増感による MR 細胞・分子イメージング」を実用化し、①高速定量画像法の開発による胎生期神経障害への適用、②Mn 徐放剤の開発による MnSOD 過剰発現腫瘍への適用、および③Mn 細胞標識法の最適化による移植細胞追跡という3つの研究分野に対して、その有用性と更なる拡張性を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

開発項目と適用モデルに関しては、研究成果の欄に記載した。共通する方法として、①7テスラ高磁場動物実験用 MRI および齧歯類専用高周波コイルを使用して、100 μm 前後の高い平面内空間分解能で MRI を撮像した。② Ca^{2+} チャンネル等を通過する機能性マンガン (Mn) 造影剤を投与した点、③ T_1 強調画像法など従来の手法に加えて、定量的な評価あるいは免疫組織学的な検証などを実施した。

4. 研究成果

平成 21 年度は、次の 3 項目について取り組んだ。①新生児脳神経変性疾患モデルの確立、②腫瘍細胞における Mn 蓄積量の定量評価法の確立および徐放剤の開発、③細胞種における標識法の最適化と排出メカニズムの検討。項目①に関しては、母体の放射線被曝を想定した放射線照射による水頭症モデルの作成を行った。項目②に関しては、短時間の MRI 計測では困難であったプロトン縦緩和時間 (T_1) を定量的に評価する為に、高速 T_1 定量マッピング法を、シンガポール分子イメージング共同体の Chuang K. C. 博士らと共同で開発した。また、各種がん細胞のセルラインを用いて *in vitro* にて、Mn 標識後の取り込み濃度の緩和時間計測、および静脈投与後に一定の血中濃度で長時間維持可能な徐放剤を開発した。また、徐放剤の開発は、田畑泰彦教授 (京都大学・再生医科学研) が合成を担当、デキストランを主成分とした材料にて開発した。項目③に関しては、細胞標識に使用するリンパ球・単核球に対して、Mn の取り込み速度 (一定の濃度に達するまでの時間) を比較し、 T_1 緩和能および T_1 強調画像法におけるコントラストの比較を実施した。

平成 22 年度は、次の 3 項目について取り組んだ。①MEMRI を用いた胎生期における放射線被曝による新生児脳神経変性疾患モデルの評価、②新しく開発された Mn 徐放剤を用いた中皮腫モデルの評価、③Mn 標識単核球を用いた虚血モデルへの *in vivo* 適用と評価。項目①に関しては、母体の放射線被曝を想定

した放射線照射による小頭症モデルの作成を行い、Mn 造影剤投与 24 時間後にその集積を高速 T_1 定量画像法にて撮像、画像解析により縦緩和マップを作成し、評価した。項目②に関しては、分担研究者である田畑泰彦教授 (京都大学・再生医科学研) と共同で、デキストランを主成分とした材料にて徐放剤を開発し、中皮腫モデルに投与、呼吸同期撮像によりイメージングに成功した。項目③に関しては、単核球を Mn 造影剤で標識し、下肢虚血モデルにおいて下腿に投与、3 週間に渡って追跡すると主に、インジウム標識 SPECT や蛍光標識と比較した。その結果、MRI にて標識細胞が数週間に渡って観察可能であることが示され、その結果は SPECT の分布と一致した。

平成 23 年度は、①神経変性疾患モデルでの MRI 定量撮像法と動態解析および組織評価、②腫瘍モデルにおける Mn 増感 MRI の取得と定量的比較法の検討、③標識細胞の生体内追跡と機能性回復の評価法開発を行った。項目①に関しては、水頭症モデルにおいて、BBB の形成が完了しない生後 1 週間および完了した 2 週間での Mn 造影剤の投与を行い、動的に高速 T_1 定量計測を実施、神経細胞への Mn 蓄積量を評価し、国際誌に発表した。さらに、高速灌流定量計測により非侵襲的に脳灌流量を計測、統計解析に必要な例数を実施、免疫組織染色と比較した結果を国際誌に報告した。また、Mn 濃度の定量評価に関して、脳下垂体組織を対象に、動脈採血を実施し、血中の Mn 濃度を T_1 定量マップにより定量、3 compartment model による動態解析を実施し、組織間で比較することで実現、国際誌に発表した。項目②に関して、A) Mn-SOD 過剰発現腫瘍と発現の少ない腫瘍を同一の実験動物に作成し、Mn 造影剤の投与後に高速 T_1 定量撮像を実施、Mn-SOD 発現量と Mn 取り込みによる緩和時間短縮との相関を評価し、報告した。項目③に関しては、筋組織の虚血モデルに対して、Mn により標識、最適化された免疫細胞を移植、MRI、SPECT、生体蛍光イメージングで可視化、追跡したものを画像解析し、国際誌に報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Takanashi J, Saito S, Aoki I, Barkovich AJ, Ito Y, Inoue K. Increased N-acetylaspartate in model mouse of Pelizaeus-Merzbacher disease. *J Magn Reson Imaging*. 2012 Feb;35(2):418-25.
- ② Sawada K, Fukunishi K, Kashima M, Imai N, Saito S, Sakata-Haga H, Aoki I, Fukui Y. Neuroanatomic and magnetic resonance imaging references for normal development of cerebral sulci of laboratory primate, cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Congenit Anom*

- (Kyoto). 2012 Mar;52(1):16-27.
- ③ Fukunishi K, Sawada K, Kashima M, Saito S, Sakata-Haga H, Sukamoto T, Aoki I, Fukui Y. Correlation between formation of the calcarine sulcus and morphological maturation of the lateral ventricle in cynomolgus monkey fetuses. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(3):381-6.
- ④ Leuze C, Kimura Y, Kershaw J, Shibata S, Saga T, Chuang KH, Shimoyama I, Aoki I*. Quantitative measurement of changes in calcium channel activity in vivo utilizing dynamic manganese-enhanced MRI (dMEMRI). *Neuroimage*. 2012 Mar;60(1):392-9. Epub 2011 Dec 29.
- ⑤ Odaka K, Aoki I, Moriya J, Tateno K, Tadokoro H, Kershaw J, Minamino T, Irie T, Fukumura T, Komuro I, Saga T. In Vivo Tracking of Transplanted Mononuclear Cells Using Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging (MEMRI). *PLoS One*. 2011;6(10):e25487. Epub 2011 Oct 7.
- ⑥ Liu J, Jo JJ, Kawai Y, Aoki I, Tanaka C, Yamamoto M, Tabata Y. Preparation of polymer-based multimodal imaging agent to visualize the process of bone regeneration. *J Control Release*. 2012 Feb 10;157(3):398-405. Epub 2011 Oct 1.
- ⑦ Hasegawa S, Saito S, Koshikawa-Yano M, Furukawa T, Aoki I, Saga T. Tumor Enhancement Effect of Overexpressed Manganese-superoxide Dismutase in Manganese-enhanced MR Imaging. *Magn Reson Med Sci*. 2011;10(3):155-8.
- ⑧ Autio J, Kawaguchi H, Saito S, Aoki I, Obata T, Masamoto K, Kanno I. Spatial frequency-based analysis of mean red blood cell speed in single microvessels: investigation of microvascular perfusion in rat cerebral cortex. *PLoS One*. 2011;6(8):e24056. Epub 2011 Aug 24.
- ⑨ Tomizawa A, Hadjidekov G, Ishii I, Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Saga T, Kitada M. Nitroxide derivatives for imaging of hypercholesterolemia-induced kidney dysfunction and assessing the effectiveness of antilipidemic drugs. *Mol Pharm*. 2011 Oct 3;8(5):1962-9. Epub 2011 Aug 15.
- ⑩ Tomizawa A, Ishii I, Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Shibata S, Kitada M. Carbamoyl-PROXYL-enhanced MRI detects very small disruptions in brain vascular permeability induced by dietary cholesterol. *Biochim Biophys Acta (BBA-GEN SUBJECTS, General Subjects)*. 2011 Dec;1810(12):1309-16. Epub 2011 Jun 29.
- ⑪ Yao R, Natsume Y, Saiki Y, Shioya H, Takeuchi K, Yamori T, Toki H, Aoki I, Saga T, Noda T. Disruption of Tacc3 function leads to in vivo tumor regression. *Oncogene*. 2012 Jan 12;31(2):135-48. doi: 10.1038/onc.2011.235. Epub 2011 Jun 20.
- ⑫ Saito S, Aoki I, Sawada K, Suhara T. Quantitative assessment of central nervous system disorder induced by prenatal X-ray exposure using diffusion and manganese-enhanced MRI. *NMR Biomed*. 2012 Jan;25(1):75-83. doi: 10.1002/nbm.1715. Epub 2011 Apr 28.
- ⑬ Hasegawa S, Koshikawa-Yano M, Saito S, Morokoshi Y, Furukawa T, Aoki I, Saga T. Molecular imaging of mesothelioma by detection of manganese-superoxide dismutase activity using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Int J Cancer*. 2011 May 1;128(9):2138-46.
- ⑭ Hasegawa S, Saito S, Takanashi J, Morokoshi Y, Furukawa T, Saga T, Aoki I. Evaluation of ferritin-overexpressing brain in newly developed transgenic mice. *Magn Reson Imaging*. 2011 Feb;29(2):179-84. Epub 2010 Dec 3.
- ⑮ Kono K, Nakashima S, Kokuryo D, Aoki I, Shimomoto H, Aoshima S, Maruyama K, Yuba E, Kojima C, Harada A, Ishizaka Y. Multi-functional liposomes having temperature-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor-specific chemotherapy. *Biomaterials*. 2011 Feb;32(5):1387-95. Epub 2010 Nov 19.
- ⑯ Matsumoto K, Aoki I, Nakanishi I, Matsumoto A, Nyui M, Endo K, Anzai K. Distribution of hydrogen peroxide-dependent reaction in a gelatin sample irradiated by carbon ion beam. *Magn Reson Med Sci*. 2010;9(3):131-40.
- ⑰ Saito S, Aoki I, Sawada K, Sun XZ, Chuang KH, Kershaw J, Kanno I, Suhara T. Quantitative and noninvasive assessment of prenatal X-ray-induced CNS abnormalities using magnetic resonance imaging. *Radiat Res*. 2011 Jan;175(1):1-9. Epub 2010 Nov 10.
- ⑱ Sawada K, Sun XZ, Fukunishi K, Kashima M, Saito S, Sakata-Haga H, Sukamoto T, Aoki I, Fukui Y. Ontogenetic pattern of gyrification in fetuses of cynomolgus monkeys. *Neuroscience*. 2010 May 19;167(3):735-40. Epub 2010 Feb 26.
- ⑲ Inoue Y, Aoki I, Mori Y, Kawai Y, Ebisu T, Osaka Y, Hourii T, Mineura K, Higuchi T, Tanaka C. Detection of necrotic neural response in super-acute cerebral ischemia using activity-induced manganese-enhanced (AIM) MRI, NMR in Biomedicine. 2010 Apr;23(3):304-12.
- ⑳ Kawai Y, Aoki I*, Umeda M, Higuchi T, Kershaw J, Higuchi M, Silva AC, Tanaka C. In vivo visualization of reactive gliosis using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Neuroimage*. 2010 Feb 15;49(4):3122-31.

[学会発表] (計 25 件)

- ① 青木伊知男、高磁場磁気共鳴マイクロイメージングとナノ粒子造影剤による腫瘍の血管構築と微細構造の可視化、第

- 89 回日本生理学会大会、松本、March 29-31, 2012
- ② 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージングを使った連携研究について、第5回バイオクリエーション研究会・ナノ生理学研究会、浜松、March 17, 2012
- ③ 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージング研究、第31回日本画像医学会・教育講演、東京、February 18, 2012
- ④ 青木伊知男、MRIとDrug Delivery、総合医用画像技術研究会、東京、October 22, 2011
- ⑤ 青木伊知男、小動物用MRI ~7テスラから超高磁場装置の生体適用と可能性、小動物用MRIの現状と将来展望、第39回日本磁気共鳴医学会大会・シンポジウム「小動物用MRIの現状と将来展望」、小倉、September 29, 2011
- ⑥ 青木伊知男、高磁場MRIによるドラッグデリバリーと分子イメージング、第23回磁気共鳴代謝研究会、京都、August 28, 2011
- ⑦ 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージング、第38回BMSコンファレンス(BMS2011)、箱根、July 12, 2011
- ⑧ 青木伊知男、高磁場MRIとDDS、第27回日本DDS学会シンポジウム2「医療機器とDDS」、東京、June 9, 2011
- ⑨ 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージング研究について、がん研究会セミナー、東京、May 31, 2011
- ⑩ 青木伊知男・佐賀恒夫、高磁場MRIイメージングを用いたDDSの評価、第6回日本分子イメージング学会学術大会・シンポジウム「シンポジウム「創薬に活かす分子イメージング」、神戸、May 27, 2011
- ⑪ 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージング、横浜市立大学大学院セミナー、横浜、April 21, 2011
- ⑫ 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージングへのアプローチ、Neuroscience Seminar in Tokushima、徳島、August 30, 2010
- ⑬ 青木伊知男、高磁場MRIで出来ること、BMAS2010:バイオメディカル分析科学シンポジウム、松島、July 23, 2010
- ⑭ 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージングへの取り組み、第1回九州大学分子イメージング診断学講座シンポジウム、博多、July 12, 2010
- ⑮ 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージングへの取り組み、自治医大私立大学戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム2010・病態解明から治療開発に向けたバイオイメージング研究、下野市、June 4, 2010
- ⑯ *Ichio Aoki, Manganese enhanced MRI and drug delivery imaging, Seminar in Max Planck Institute Leipzig, Leipzig, Germany, May 10, 2010
- ⑰ *Ichio Aoki, Development and theragnostic application of multimodal nano-carrier for optical and MR imaging using thermosensitive liposome, Mind/Brain International Conference, Hamamatsu, Feb 25, 2010
- ⑱ 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージング、愛媛大学プロテオ医学研究

- センター・第1回バイオクリエーション研究会、愛媛、Jan 25, 2010
- ⑲ 青木伊知男、高磁場MRIによる分子イメージングへの取り組み、名古屋分子標的イメージングセミナー、名古屋、Nov 13, 2009
- ⑳ Ichio Aoki, MR-Optical Multimodal Imaging, Korean Congress of Radiology (KCR 2009), Seoul, Oct 21-23, 2009
- ㉑ Ichio Aoki, Trends in MR Molecular Imaging in Japan, Korean Congress of Radiology (KCR 2009), Seoul, Oct 21-23, 2009
- ㉒ 青木伊知男、Molecular Imaging using High Field MRI、第68回日本癌学会学術総会シンポジウム「分子イメージング」、名古屋、Oct 3, 2009
- ㉓ 青木伊知男、高磁場MRIを中心とした複合プローブ開発への取り組み、第37回日本磁気共鳴学会シンポジウム「分子イメージング」、横浜、Oct 2, 2009
- ㉔ 青木伊知男、高磁場MRIによる薬剤送達・分子イメージングの実現に向けて、第13回NMRマイクロイメージング研究会、東京、July 25, 2009
- ㉕ 青木伊知男、温度感受性リポソームと加温トリガーによるDDSマルチモーダル・イメージング、第48回日本生体医工学学会、東京、April 25, 2009

〔図書〕(計4件)

- ① 青木伊知男、動物実験用MRI、磁気共鳴スペクトルの医学応用 —MRSの基礎から臨床まで—、インナービジョン、2012、146-157、ISBN978-4-902131-22-2
- ② 青木伊知男、國領大介、コンパクトMRI、日本DDS学会雑誌、2012 March、Vol. 27 No. 2、126-130
- ③ 青木伊知男、河合裕子、マンガン造影磁気共鳴画像法(MEMRI)の実際、日本磁気共鳴医学会雑誌、31(1)、2011、1-19
- ④ 青木伊知男、Rumiana Bakalova、高磁場MRIによる分子イメージング研究、Medical Imaging Technology、総説、27(5)、2009、305-310

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称：常磁性を有する水溶性ハイパーブランチポリマー
 発明者：古賀登・唐澤悟・薛蕾・青木伊知男・かたは柴田さやか・佐賀恒夫・平田修・田中章博・上杉理
 権利者：日産化学工業・放射線医学総合研究所
 種類・番号：PCT/JP2011/77432
 出願年月日：2011.11.28
 国内外の別：国内

名称：動物固定具
 発明者：下村岳夫・青木伊知男・菅野 巖

権利者：放射線医学総合研究所
種類・番号：特願 2009-117843
出願年月日：2009. 5. 14
国内外の別：国内

〔その他〕

報道発表の掲載：

科学新聞「脳下垂体の働きを観察 ー新しい生体イメージング法開発ー」，（2012年2月10日，一面）、マイナビニュース・Yahoo Japan ニュース他「放医研、ホルモンを分泌する脳下垂体の働きを見る生体イメージング法を開発」，（2012年2月3日17時10分）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木伊知男 (Aoki Ichio)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究者番号：10319519

(2) 研究分担者

田畑泰彦 (Tabata Yasuhiko) H21-H22

京都大学再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

田中忠蔵 (Tanaka chuzo) H21

明治国際医療大学脳神経外科・教授

研究者番号：80163541

(3) 連携研究者

正本和人 (Masamoto Kazuto) H22

電気通信大学先端領域教育研究センター・特任助教

研究者番号：60455384

長谷川純崇 (Hasegawa Sumitaka) H22

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：60415437

小高兼一 (Odaka Kenichi) H22

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：20443062

田中忠蔵 (Tanaka Chuzo) H22-H23

明治国際医療大学脳神経外科・教授

研究者番号：80163541

田畑泰彦 (Tabata Yasuhiko) H23

京都大学再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

(4) 研究協力者

国領大介 (Kokuryo Daisuke) H21-23

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：20508543

齋藤茂芳 (Saito Shigeyoshi) H21-22

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・博士研究員

研究者番号：40583068

城潤一郎 (Jo Junichiro) H23

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：60511243