

令和 5 年 4 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20954

研究課題名（和文）心筋炎のレドックス状態を非侵襲的に可視化する早期診断法の開発研究

研究課題名（英文）Development of the diagnostic method to visualize the non-invasively redox status of myocarditis.

研究代表者

水田 幸恵 (Mizuta, Yukie)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20906341

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：心筋炎の病態には心筋の酸化ストレスやミトコンドリア機能異常が深く関わっており、それらを生体イメージングで可視化できれば、非侵襲的な診断が可能となる。本研究では薬剤性心筋炎モデルマウスにおける生体内レドックス状態を、分子イメージングプローブを用いて磁気共鳴代謝イメージング装置（in vivo DNP-MRI）で評価した。マウスの全身状態が悪化する以前の早い段階から有意差が見られたことから、in vivo DNP-MRIは心筋炎の早期診断に有用であることが示唆された。さらにin vitroの評価によって、心筋でのCmPの代謝は主にミトコンドリア機能を反映していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋炎では無症状から循環不全に至る劇症型まで幅広い病像を来すが、心不全症状が現れるまでの早期診断は困難である。本研究で示された磁気共鳴代謝イメージング装置を用いたミトコンドリア機能の可視化による早期診断の可能性を発展していくことで、今後臨床応用につながっていく可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Myocarditis is related to myocardial oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Therefore, a noninvasive in vivo imaging procedure for monitoring the redox status of the heart may aid in monitoring diseases and developing treatments. In this study, we demonstrate a technique for detecting the redox status of the Doxorubicin(DOX)-administered mice heart using in vivo dynamic nuclear polarization-magnetic resonance imaging (DNP-MRI) with a molecular imaging probe. DNP-MRI showed a slower DNP signal reduction in the DOX group than in the control group. Importantly, the difference in the DNP signal reduction rate between the two groups occurred earlier than that detected by physiological examination or clinical symptoms. In vitro experiment suggested that the redox metabolism of CmP in the myocardium is mitochondria-dependent.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：心筋炎 レドックス DNP-MRI

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心筋炎では、心筋壊死とともに炎症性物質による心筋細胞機能障害が起こり、心臓のポンプ機能が阻害される。心筋炎の症候は非特異的であり、診断は他の疾患を鑑別したうえで臨床症状などから総合的に判断されるが、確定には心内膜心筋生検が必要となる。心筋炎では無症状から循環不全に至る劇症型まで幅広い病像を来すが心筋炎の早期診断は困難であり、臨床症状が重篤化する前に心筋炎の診断を確定する手段は現在のところ生検以外にない。しかし生検は心室穿孔などの危険がある侵襲的な検査であり、生体イメージングでの診断法の開発が望まれる分野である。心筋はミトコンドリア含有率が高く、心筋炎の病態には酸化ストレスやミトコンドリア機能異常が関与していることが動物実験や細胞実験で報告されている。心筋のレドックス状態を非侵襲的に可視化することができれば、心筋炎の早期診断につながると考えられる。

我々は、DNP-MRI と呼ばれる、フリーラジカルを利用し MRI の感度を上昇させ、生体内のレドックス反応を非侵襲的に可視化する技術を開発してきた。Carbamoyl-PROXYL (CmP) をプローブとしてマウスへ静脈投与後に DNP-MRI による撮像を行うと、DNP による核偏極の増大により通常の MRI に比べて最大 10,000 倍に高感度化されるため、従来見ることでできなかった微小なシグナル変化を可視化することが可能である。生体内での CmP のラジカルの酸化還元反応によって MRI 信号が消失する速度から、生体内でのレドックス反応を定量化、及び画像強度として可視化することができる。過去に我々は、非アルコール性脂肪肝炎マウスで肝臓のミトコンドリア機能低下が DNP-MRI 画像での信号消失速度低下として捉えられることを明らかにした。一方、心疾患モデルを用いた DNP-MRI 診断の検討はこれまでに行っていなかった。

### 2. 研究の目的

動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization: DNP) - MRI を用いて、心筋の酸化ストレスやミトコンドリア機能を非侵襲的に可視化し、心筋炎の病態を定量的に評価可能かどうかを明らかにするとともに、早期診断の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

#### (1) 薬剤性心筋炎モデル動物作成及び DNP-MRI での画像評価

- ドキソルビシン誘発心筋炎モデルマウスを作成し、心臓生理学的評価(生存率、心臓超音波検査)、組織学的評価 (H&E 染色)、免疫組織学的染色 (8-OHdG 染色)を行う。
- CmP をプローブとして、静脈投与後に DNP-MRI の撮影を行う。MRI 信号消失速度を疾患群とコントロール群で比較する。

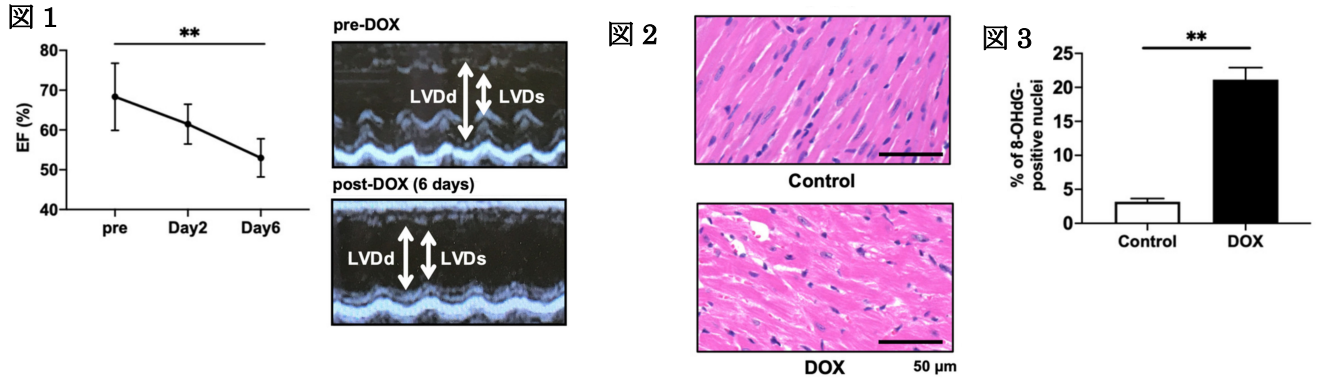
#### (2) in vitro での CmP プローブの反応メカニズムの検討

- 心筋ホモジネートと CmP プローブとの反応を電子スピン共鳴装置(X-band EPR)を用いて解析する。さらにミトコンドリア電子伝達経路における複合体 IV の阻害剤であるシアン化カリウム(KCN)の添加によって CmP 代謝に変化があるのか確認することで、CmP の心臓における代謝が主にミトコンドリア電子伝達系によるのか、それとも抗酸化酵素等によるのかメカニズムを明らかにする。
- ミトコンドリアの代謝を明らかにするため、酸素消費速度の測定を行い電子伝達系の機能評価を行う。

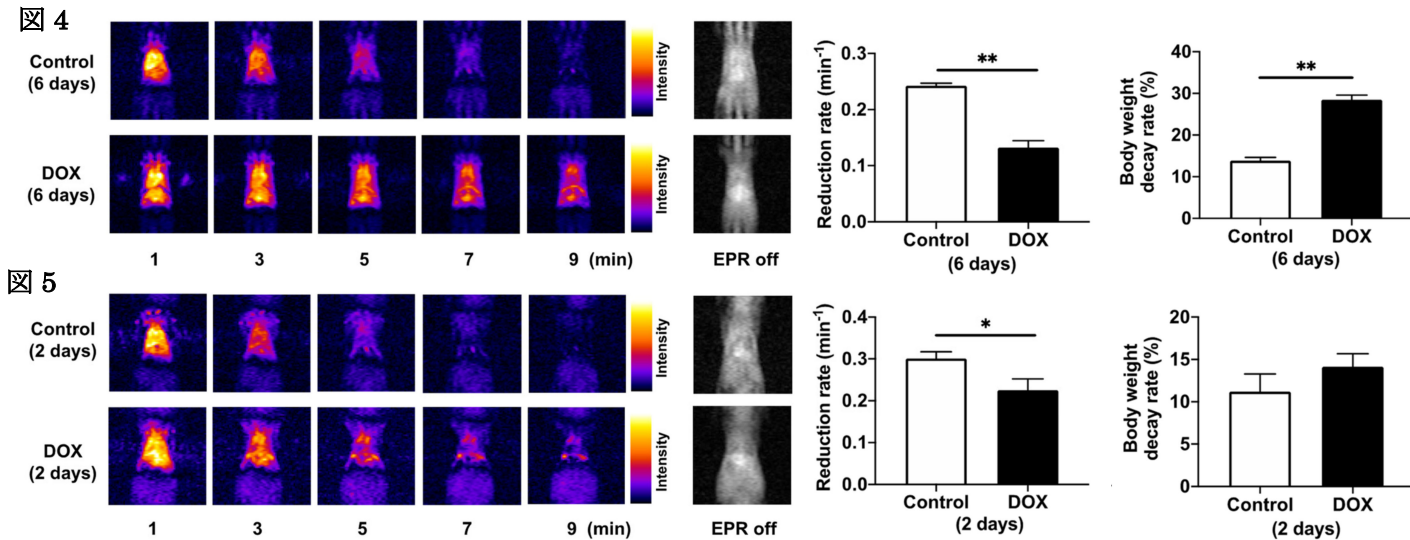
#### 4. 研究成果

##### (1) 薬剤性心筋炎モデル動物作成及びDNP-MRIでの画像評価

- ドキシソルビシン投与後、経時的に左心室の収縮能が徐々に低下し(図1)、H&E染色では心筋の腫脹、筋原線維の減少、核周囲の空胞化、細胞質の空胞化が認められた(図2)。また酸化的DNA損傷を反映する8-OHdG陽性核の割合が増加した(図3)。



- in vivo DNP-MRI ではドキシソルビシン投与マウスの画像強度の減少率は、コントロールマウスに比べ有意に低かった(図4)。さらに、投与6日目はマウスの体重減少など全身状態の低下も認めていたが、投与2日目という体重減少に有意差がない早期でもDNP-MRIの画像強度の減少率に有意差を認めた(図5)。



##### (2) in vitroでのCmPプローブの反応メカニズムの検討

- 心筋細胞自体の酸化還元反応のメカニズムを明らかにするために、H9c2(ラット横紋筋由来細胞)ホモジネートとCmPの反応をX-band EPRで計測した。EPR信号の減少率は、ミトコンドリアETCの複合体IVの阻害剤であるKCNを添加することにより有意に抑制された(図6)。このことから、H9c2細胞におけるCmPの酸化還元代謝はミトコンドリア代謝を反映していると考えられた。また、ドキシソルビシンを投与したH9c2細胞ではコントロールに比べEPR信号の減少率が抑制された(図7)。これらの結果からドキシソルビシンを投与したH9c2細胞のCmP酸化還元代謝は、ミトコンドリア機能

障害により低下していることが示唆された。

- さらにミトコンドリア機能を解明するために、H9c2 細胞の酸素消費速度を測定したところ、ドキソルビシンを投与した H9c2 でコントロールと比較し有意に低下していた (図 8)。以上から、少なくとも *in vitro* ではミトコンドリア機能障害により、ドキソルビシン投与心筋の CmP レドックス代謝が低下していることが示唆された。

図 6



図 7

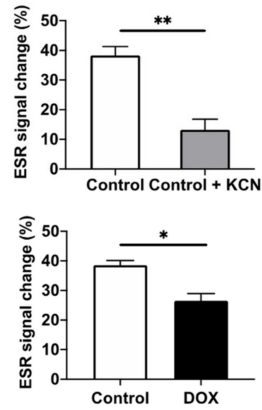
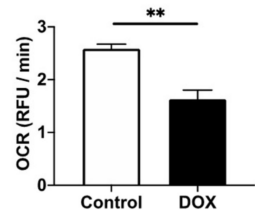


図 8



以上より、マウスの全身状態が悪化する以前の早い段階から有意差が見られたことから、*in vivo* DNP-MRI は心筋症の早期診断に有用であることが示唆された。さらに、心筋での CmP の代謝はミトコンドリア機能を反映していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yukie Mizuta, Tomohiko Akahoshi, Hinako Eto, Fuminori Hyodo, Masaharu Murata, Kentaro Tokuda, Masatoshi Eto, Ken Yamaura	4. 巻 11(8)
2. 論文標題 Noninvasive Diagnosis of the Mitochondrial Function of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Using In Vivo Dynamic Nuclear Polarization-Magnetic Resonance Imaging.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants.	6. 最初と最後の頁 1454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11081454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水田 幸恵, 赤星 朋比古, 村田 正治, 徳田 賢太郎, 山浦 健
2. 発表標題 生体内レドックス代謝イメージングによるマウス心筋炎の病態評価
3. 学会等名 日本麻酔科学会第69回学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------	---------