

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791318

研究課題名(和文) EPRイメージング法による脳腫瘍の非侵襲的な評価法の開発

研究課題名(英文) Non-invasive assessment of mouse brain tumor by EPR imaging

研究代表者

江本 美穂 (EMOTO, Miho)

札幌医科大学・医療人育成センター・研究員

研究者番号：10578735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：血液脳関門を通過し、脳組織に移行する複数種のナイトロオキシド化合物の3DEPRイメージング撮像に成功した。得られたEPR画像とMRIを重ね合わせるにより、それぞれのナイトロオキシド化合物の分布を明らかにすることができた。装置を高速化することで、従来では画像化できなかったナイトロオキシド化合物まで画像化し、複数種のナイトロオキシド化合物の分布と還元速度を詳細に検討することができた。最終目標である脳腫瘍の治療薬の評価については、今後も継続して研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：Electron paramagnetic resonance (EPR) imaging is a noninvasive imaging method for visualizing redox status using nitroxide as an imaging probe. In this project, using an improved EPR imaging system, I showed the distribution and redox status in mouse brain by using some nitroxides, which have five-membered ring or six-membered ring. Three-dimensional EPR image was obtained in about 15 sec from 181 projection data. This data acquisition time was fast enough to visualize and evaluate pharmacokinetics of some nitroxides used in this project. Further, we obtained anatomical information of mouse brain with MRI. By superimposed EPR image on MRI, I clarified behavior of some nitroxides in mouse brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：EPRイメージング MRI 酸化還元 酸化ストレス 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

DNAの発見によりサイエンス分野において、分子生物学という新たな領域・研究手法が急速に広まり、30億ともいわれるヒトDNAの塩基配列決定をした human genome project が終了してから、10年あまりが経過した。これら成果は、生体内からサンプルを取り出し、解析を行う in vitro の研究によるものであった。ポストゲノムと言われて久しい現在では、生命を構成する分子を生きのまま、つまり in vivo で可視化する分子イメージング法という、新たな研究手法の開発が進められている。生物の様々な現象をそのままの状態で見ることができる、非侵襲的な手法である分子イメージング法は、生命現象を分子の挙動としてダイレクトに可視化することができる手法である。分子イメージング法はより現実に即した生命現象の解明を可能とし、さらには病態の解明、早期診断、創薬、治療薬の効果や病態進行のモニタリングなど、幅広い分野での応用が期待される。本研究で用いる電子常磁性共鳴 (electron paramagnetic resonance : EPR) イメージング法は、フリーラジカルなどの常磁性物質の空間分布を画像化できる手法で、活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) などの発生を、ナイトロオキシド化合物をコントラスト剤として利用し画像化するものである。ナイトロオキシド化合物は酸化還元状態により、常磁性と反磁性に状態を変化させる。生体内の酸化還元状態に依存して還元反応を受ける事で、EPR 信号を失う。この EPR 信号の消失速度から酸化還元バランス (レドックスバランス) が評価でき、生体内のレドックスバランス指示薬として作用することが明らかにされてきた。これにより、ナイトロオキシド化合物は、レドックス感受性のコントラスト剤として酸化ストレスの程度を画像化する事を可能にした。また、ナイトロオキシド化合物は常磁性物質なので、MRI においては T1 の造影剤としての効果もある。つまりこのナイトロオキシド化合物を用いる事で、EPR 画像と MRI の両方で生体内の分子の挙動を可視化する事ができ、生体機能の情報を非侵襲的に画像化する事が可能となり、様々な疾患モデル動物における病態のイメージングなどが行われている。

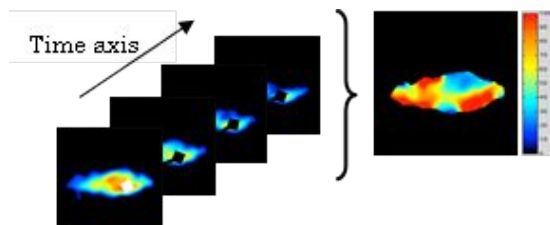
2. 研究の目的

生体は様々なストレス刺激により、ROS などが過剰に産生され、これらが原因で生体内のレドックスバランスが崩れた状態(酸化ストレス)になり、疾患が引き起こされるという報

告が数多く存在する。疾患により、実際に過剰に産生された ROS などをより正確に評価するためには、生体内に多く存在するアスコルビン酸やグルタチオンなどの抗酸化物質の影響を受けないナイトロオキシド化合物の開発をする事が重要課題である。この問題にアプローチするため、研究代表者・江本はマウスにアスコルビン酸耐性ナイトロオキシド化合物を投与した3DのEPRイメージングに世界で初めて成功した (Emoto et al. Free Radical Research;2011)。よって、このナイトロオキシド化合物を用いる事で、ストレス刺激により実際に生じた酸化ストレスを、アスコルビン酸の影響を考慮せずに評価する事ができるようになった。そこで、細胞を取り出して病態の評価をする事ができない脳組織において、ROSの過剰産生による炎症が原因とされる腫瘍を EPR イメージング法により非侵襲的に画像として可視化する。さらに、本方法により、脳腫瘍における病態の進行過程のモニタリングや治療薬の開発へ繋がる、新たな病態評価法の確立を目指すことを着想した。

3. 研究の方法

脳腫瘍モデルマウスの作成と並行し、コントロールマウスにおいて血液脳関門を通過し脳組織に入る複数種のナイトロオキシド化合物 (アスコルビン酸に強い耐性のある種類と、耐性のない種類の 3-hydroxymethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl : HMP や methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-1-oxyl:MCP) を投与し、頭部におけるその分布や代謝速度などの画像評価を行う。コントロールマウスに、様々な体内分布や代謝速度のナイトロオキシド化合物を使用して EPR イメージングを行う事で、脳腫瘍モデルマウスが確立できた際の、比較対象としての基礎データを得る。現在、稼働している高速 EPR イメージング装置を使用すると、マウスの頭部におけるナイトロオキシド化合物の 3D イメージングを 30 秒ごとに撮像することが可能となっている。また、得られた画像データのボクセルごとの信号強度の経時変化から、ナイトロオキシド化合物の消失反応の速度定数および、半減時間を 2D スライス画像にマッピングすることができる。このマッピングにより、どの部位でレドックスバランスに変化が生じたのかを画像から判断する事が可能である。下図にレドックスバランスのマッピングのスキームを示した。



経時的に得られた2DEPR画像(左)と、それらから算出したレドックスマップ(右)

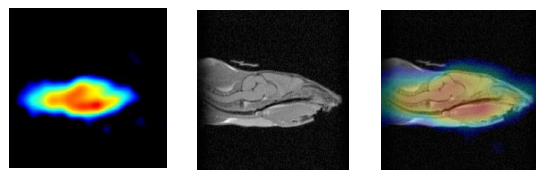
さらに、脳腫瘍モデルマウスを用いて、コントロールマウスと同様のナイトロオキシド化合物を投与する。MRI で腫瘍が認められる程度に症状が進行した状態で、EPR イメージングを行う。脳腫瘍を作る事で過剰に ROS を産生させ、酸化ストレスを誘発し、ナイトロオキシド化合物の挙動の変化を画像化する。MRI で確認できた腫瘍の位置と、EPR 画像を対応させることで、脳腫瘍による ROS の影響を EPR 画像上で明らかにする。得られたナイトロオキシド化合物の経時的な変化から、消失速度定数を算出し、その定数から求めた半減時間を EPR 画像上にマッピングする。コントロールマウスと脳腫瘍モデルマウスのレドックスマップを比較検討することで、どの位置で ROS の影響が出ているかを明らかにする。

現在行われている画像評価法 (MRI や PET など) は病態がある程度進行してしまったものに対してのみ有効である。MRI で腫瘍が認められるようになる前から、継続的に EPR イメージングを行い、ナイトロオキシド化合物の分布や消失速度などを観察する。そこで得られた情報からレドックスバランスの変化を画像化し、経時的にモニタリングすることにより、脳腫瘍の発症過程において脳内で実際に起きている現象を捉え、脳腫瘍の早期発見への応用を目指す。また、脳腫瘍の影響がレドックスバランスの変化として見られたものに関して、臨床の治療薬であるテモゾロミドを投与し、その効果についても画像により評価する。

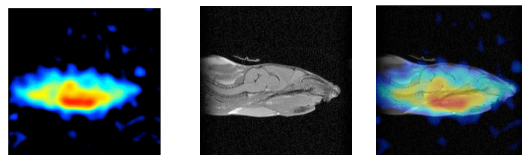
4. 研究成果

血液脳関門を通過し、脳組織に移行する複数種のナイトロオキシド化合物の、3 DEPR イメージング撮像に成功した。また、得られた EPR イメージから、それぞれのナイトロオキシド化合物の分布を明らかにすることができた。従来の EPR イメージングでは、ナイトロオキシド化合物の還元時間に比べて、EPR イメージング装置の撮像時間が長かったために、イ

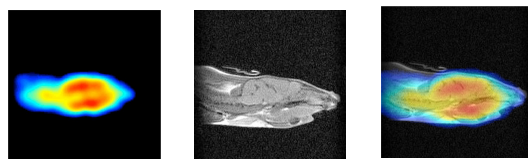
メージングプローブとして使用できるナイトロオキシド化合物が多くなかった。本研究では、上記の問題を克服し、以下に示す複数種のナイトロオキシド化合物の EPR イメージングを行うことができた。EPR イメージングの弱点として、EPR 画像には位置情報、つまり、解剖情報が無いために、「どこに」ナイトロオキシド化合物が分布しているのかを明確に示すことができなかった。今回得られたナイトロオキシド化合物の分布を明らかにするために、MRI との重ね合わせを行い、複数のナイトロオキシド化合物の分布を明らかにすることができた。以下に EPR 画像と、MRI と、それらの重ね合わせた画像を示す。



血液脳関門透過性のあるナイトロオキシド化合物である TEMPONE の EPR 画像(左)、MRI (中央)、EPR 画像と MRI の重ね合わせ(右)



血液脳関門透過性のあるナイトロオキシド化合物である TEMPOL の EPR 画像(左)、MRI (中央)、EPR 画像と MRI の重ね合わせ(右)



血液脳関門透過性のあるナイトロオキシド化合物である MCP の EPR 画像(左)、MRI (中央)、EPR 画像と MRI の重ね合わせ(右)

これらの重ね合わせ画像により、脳内移行性が認められているナイトロオキシド化合物も、その種類により分布する場所やタイミングに差異が生じている事が明らかとなった。TEMPONE や MCP は脳内への局在性が非常に高いが、TEMPOL や HMP は脳内へ移行するものの、TEMPONE や MCP 程の脳内局在性は認められない事が示された。

また、本研究期間中に EPR イメージング装置の撮像時間を、計画当初よりもさらに高速化

することに成功したために、還元時間が早いとされる6員環構造を基本骨格とする TEMPOL や TEMPONE の画像化、およびレドックスマップ作成にも成功した。レドックスマップを作成したところ、脳内におけるナイトロオキシド化合物の還元速度は、頭部の他の領域(頸部や舌など)に比べて速い事が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Emoto MC, Yamada K, Yamato M, Fujii HG. Novel ascorbic acid-resistant nitroxide in a lipid emulsion: an efficient brain imaging contrast agent for MRI of small rodents. *Neurosci Lett.* **査読有り**; 546:11-15 (2013)
doi: 10.1016/j.neulet.2013.04.044.
2. Fujii HG, Sato-Akaba H, Emoto MC, Itoh K, Ishihara Y, Hirata H. Noninvasive mapping of the redox status in septic mouse by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging.* **査読有り**; 31:130-138 (2013)
doi: 10.1016/j.mri.2012.06.021.
3. Miho C Emoto, Hideo Sato-Akaba, Hiroshi Hirata, and Hirotada G Fujii. Redox Mapping in LPS-Treated Mouse Brain by Using Three-Dimensional EPR Imaging System. *Free Radical Biology and Medicine* **査読有り**; s45(2013)
[http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(12\)01715-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(12)01715-7)
4. MC Emoto, H Sato-Akaba, H Hirata, HG Fujii. Redox map of mouse brain by three-dimensional EPR imaging with six-membered nitroxyl radicals. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, **査読有り**; 21:1986 (2013)
5. MC Emoto, H Sato-Akaba, H Hirata, HG Fujii. Difference in distribution and reduction rate of BBB permeable nitroxides by in vivo EPR imaging method. *Free Radical Biology and Medicine* **査読有り**; 53:s65 (2012)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.195>
6. MC Emoto, H Sato-Akaba, H Hirata, HG Fujii. Distribution and time course of Blood-Brain Barrier-permeable nitroxides in mouse head by MRI and EPR imaging. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, **査読有り**, 20:1709 (2012)
7. Fujii H, Emoto M. EPR-MRI studies of small rodents by the use of paramagnetic compounds. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* **査読有り**; 140:11-15 (2012)
doi: 10.1254/fpj.140.156

[学会発表](計 7件)

1. Redox Mapping in LPS-Treated Mouse Brain by Using Three-Dimensional EPR Imaging System. Miho C Emoto, Hideo Sato-Akaba, Hiroshi Hirata, and Hirotada G Fujii. フリーラジカル生物医学会議 2013年11月21日 サンアントニオ アメリカ合衆国
2. Redox map of mouse brain by three-dimensional EPR imaging with six-membered nitroxyl radicals. MC Emoto, H Sato-Akaba, H Hirata, HG Fujii. 国際磁気共鳴医学会 2013年4月25日 ソルトレイクシティ アメリカ合衆国
3. 血液脳関門透過性 nitroxide を用いたマウス頭部の高速 EPR イメージングと MRI 江本美穂・赤羽英夫・平田拓・藤井博匡 電子スピンサイエンス学会 2013年10月24日 大宮ソニックシティ
4. 高速EPRイメージング法を用いた酸化ストレスを可視化する分子イメージング手法の開発 江本美穂・赤羽英夫・平田拓・藤井博匡 日本磁気共鳴医学会 2013年9月19日 アスティ徳島
5. Difference in distribution and reduction rate of BBB permeable nitroxides by in vivo EPR imaging method. MC Emoto, H Sato-Akaba, H Hirata, HG Fujii. フリーラジカル生物医学会議 2012年11月15日 サンディエゴ アメリカ合衆国
6. Distribution and time course of Blood-Brain Barrier-permeable nitroxides in mouse head by MRI and EPR imaging. MC Emoto, H Sato-Akaba, H Hirata, HG Fujii. 国際磁気共鳴医学会 2012年5月8日 メルボルン オーストラリア
7. EPR イメージングによる六員環ナイトロキシドのマウス頭部における酸化還元状態の評価 江本美穂・赤羽英夫・平田拓・藤井博匡 電子スピンサイエンス学会 2012年11月3日 札幌コンベンションセンター

6 . 研究組織

(1)研究代表者

江本 美穂 (EMOTO, Miho)

札幌医科大学・医療人育成センター・研究
員

研究者番号：10578735