

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293280

研究課題名(和文)脳疾患モデルマウスの病態解析を可能とする磁気共鳴分子イメージング研究

研究課題名(英文)Molecular imaging of brain disease model mice by MRI and EPR imaging

研究代表者

藤井 博匡 (FUJII, HIROTADA)

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号：70209013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：活性酸素種やフリーラジカルによって引き起こされる酸化ストレスが様々な疾患の原因になっていることが明らかにされてきた。本研究では、MRI・EPR(電子常磁性共鳴法)両手法を合体させた磁気共鳴分子イメージングシステムを作り上げ、脳疾患モデルマウスのレドックス状態を非侵襲的に画像化し、病態の把握並びに新治療薬の開発に挑戦した。脳疾患モデルとして、アルツハイマー病モデル、てんかんモデルなどを取り上げ、これらの病態モデルマウス脳のレドックス画像化に成功した。

研究成果の概要(英文)：Reactive oxygen species (ROS) and free radicals are continuously generated in brains. An excess of ROS has been reported to play an important role in neurodegenerative diseases. In the present study, a new magnetic resonance-based imaging method using electron paramagnetic resonance and MRI was developed in order to visualize redox status in neurodegenerative disease model animals. Three animal models such as Alzheimer disease and epilepsy, were employed. Our new molecular imaging method clearly visualized a change in redox status of mouse brain, and these results can be used for medicine.

研究分野：磁気共鳴イメージング

キーワード：脳疾患 分子イメージング MRI EPR 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種 (ROS) やフリーラジカルによって引き起こされる酸化ストレスが血管や組織などを傷害し、様々な疾病の原因になることが解明され始めた。最近の研究では、体内で発生した ROS はアルツハイマー病やパーキンソン病などの脳疾患のみならず、虚血再灌流障害、がんや加齢等、広範な疾患に関与していることが明らかにされてきた。今後は生体内の酸化ストレスメカニズムの解明を進めるとともに、その英知を利用して生体内の酸化ストレスを巧みに制御し疾患の治療や疾病の予防に努めることが重要であり、国民から期待されているところでもある。酸化ストレスを巧みにコントロールするには現在の研究レベルを一段階高め、in vivo 系での個体レベルにおける研究成果が期待されている。

一方、生命科学の研究分野ではポストゲノム時代と言われて、はや十年以上が過ぎた。生命の統合理解を目的とし、“分子イメージング”という生命に深く関与する分子を可視化する研究が開始され、生命科学の世界はまさに“Gene から Molecular Function の時代”へと移りつつある (Brader P et. al. J Nucl Med, 2013: 54; 67)。「生命を構成している分子の本来の姿とは、生き物が活動している状態でその動態を直接的に観測することが最良である」という観点から、“非侵襲的分子イメージング手法”を利用する生命科学の研究に期待が集まっている。本手法を活用することにより、生命現象に深く関与する分子の動態を in vivo 系で解析することが可能となり、生命活動解明への貢献はもとより、病因の解明や早期診断、治療薬の開発への貢献など、期待が大きく膨らんでいる (Buzsáki G et al. Nat Rev Neurosci, 2012; 13: 407-20)。このような分子イメージング技術の進歩につれ、「酸化ストレス評価研究」を動物個体レベルで非侵襲的に行う事が望ましい、と考えられていたが、技術的に可能な段階にまで達した現在、非侵襲的な解析研究を是非行うべきである、という機運になってきた、という国内外の状況である。また、国内外一般に、動物愛護の理念からも非侵襲的な研究手法や研究成果が望まれているところである。

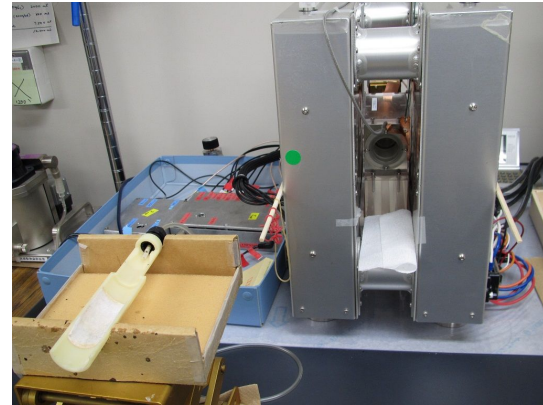
2. 研究の目的

活性酸素種 (reactive oxygen species (ROS)) やフリーラジカルによって引き起こされる酸化ストレスが、様々な疾病の原因になっていることが明らかにされてきた。本研究では、MRI・EPR (電子常磁性共鳴法) 両手法を駆逐した磁気共鳴分子イメージングシステムを構築し、病態モデル動物の酸化ストレス状態を非侵襲的に撮像し、病態と酸化ストレスとの関連性を定量的に画像評価を行う。脳疾患モデルとして、アルツハイマー病モデルマウス、てんかんモデルマウス、覚醒剤投与マウスを用い、開発した分子イメージングシステムにより酸化ストレスの定量的画像評価

を行う。これらの結果を用いて、病態の非侵襲モニタリングの可能性、並びに治療薬開発への貢献をめざす。

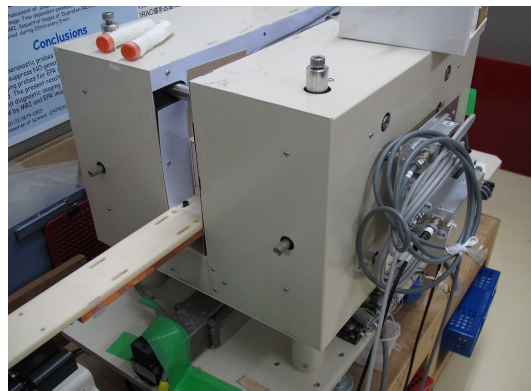
3. 研究の方法

EPR イメージング装置について



上図に示した、自作 750MHz CW EPR イメージング装置を用いた。マウス頭部径は 22 ミリである。

MRI 装置について



MR technology 社製の、0.5Tesla 装置を用いた。装置の外観を上図に示したが、EPR イメージング装置同様、マウス頭部径は 22 ミリに設定し共通のマウスベッドを使用した。

レドックス感受性ニトロキシドプローブについて

3-Methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpiperidine-1-oxyl (MCP, ナード社製) を生理食塩水中で調整した。1.0 $\mu\text{mol/g}$ 体重のドーズでマウスに尾静脈投与した。

EPR・MRI 画像の co-registration について

EPR イメージング画像と MRI 画像の中心点座標が一致するように、両システムでのマウスベッドを設計した。両画像の FOV は EPR 画像が 50mm、MRI 画像が 37mm であるので、両画像の中心で重ね合わせ処理が可能な Matlab ベースのプログラムを作成し、co-registration を実施した。

マウス病態モデルについて

(1) てんかんモデルマウスについて：

Pentylentetrazole(PTZ)を 35mg/kg 体重で約二週間腹腔内投与し、てんかんモデルを製作した。

(2)Methamphetamine 投与マウスについて Methamphetamine (大日本住友製薬)を 1~5mg/kg のドーズでマウスに腹腔内投与した。
(3)アルツハイマー病モデルマウスについてアルツハイマー病モデルマウスは、遺伝子改変モデル (APdE9) を用いた。

4. 研究成果

(1)EPR、MRI 両画像の co-registration について

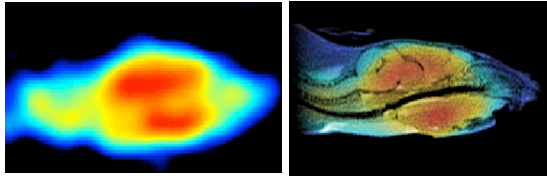


図 1 マウス頭部の EPR 画像 (左) と co-registered 画像 (右)

マウス頭部の MRI 画像に EPR 画像を重ね合わせた。Co-registered 画像により、マウス頭部組織に存在するニトロキシドイメージング剤 (MCP) の画像強度および還元速度定数を定量化することが可能となった。

(2)てんかんモデルマウスの結果について コントロール及び PTZ 投与マウスの EPR イメージング画像を経時的に撮像し、これらからレドックスマップを得た。レドックスマップをマウス頭部 MRI 画像に重ね合わせ、得られた co-registered 画像を以下に示した。

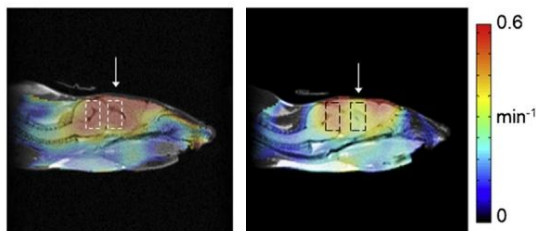


図 2 コントロール(左)および PTZ 投与マウス(右)のレドックスマップ

マウス脳内におけるニトロキシドイメージングプローブ MCP の還元速度定数を比較してみると、明らかに PTZ 投与マウスに於いて還元速度は低下していることが分かる。脳内の組織、特に海馬周辺に於いて、MCP の還元速度が低下していた。

MCP の還元速度を低下させている要因は幾つか考えられるが、酸化ストレス亢進による抗酸化物質の低下が考えられる。そこで、PTZ 投与後のマウス脳内組織中の抗酸化物質 (アスコルビン酸とグルタチオン) の濃度を生化学的手法により測定した。PTZ を投与してもアスコルビン酸量には変化は無かったが、グルタチオン量は明らかに低下していた。コン

トロールマウス脳内のグルタチオン量は $0.8 \mu\text{mol/g}$ であるのに対し、PTZ 投与マウス脳では $0.6 \mu\text{mol/g}$ とほぼ 25%程度低下していることが明らかになった。

(3)Methamphetamine 投与マウス脳での結果 Methamphetamine を 1~5mg/kg マウス腹腔内へ投与したところ、濃度依存的にマウスの活動量 (走行距離で評価) が増加した。コントロールに対し、methamphetamine 5mg/kg 投与マウスでは、活動量が 6 倍程度まで増加したため、本実験では投与 methamphetamine 量を 5mg/kg と定めて EPR イメージング実験を実施した。得られた経時画像から計算されたレドックスマップを以下に示した。

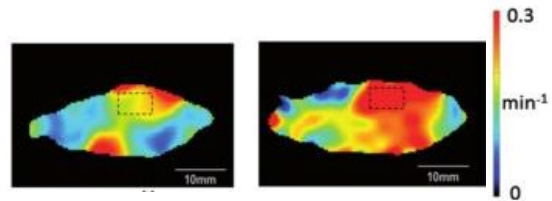


図 3 コントロール (左) および methamphetamine 投与マウス (右) 脳におけるレドックスマップ

Methamphetamine 投与により、マウス脳内での MCP の還元速度は著しく加速されていることが画像化できた。Methamphetamine 投与マウスの脳内での抗酸化物質量を測定したところグルタチオンは増加傾向にあり、酸化ストレスの亢進により抗酸化物質のグルタチオンの合成は促進されることが分かった。グルタチオン量が増加することによって、脳内のシステインの減少が推定できるが、in vitro 系での測定で Methamphetamine 投与によりシステイン量の低下並びに lipid peroxide 量の増加を確認することが出来た。Methamphetamine 投与により、血液脳関門 (BBB) が破綻することが知られているが、常磁性物質であるガドリニウムを用いて BBB の破綻を確認することが出来た。BBB の破綻は時間的に修復される過程を MRI 画像から確認することが出来た。

(4)アルツハイマー病モデルマウスでの結果 生後 3,6,9,12,15 ヶ月齢での、ワイルドおよびモデルマウス頭部でのレドックスマップを測定した。以下に、9 ヶ月齢マウスでのレドックスマップを示した。

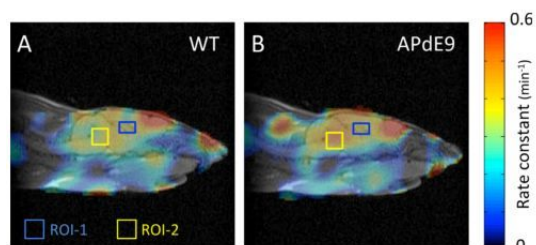


図 4 生後 9 ヶ月でのワイルド(左)およびモデルマウス(右)頭部のレドックスマップ ROI-1 は中脳領域、ROI-2 は海馬領域である。

中脳部分での MCP の還元速度定数はマウスの年齢に関係せずほぼ一定であったが、海馬周辺における還元速度定数は年齢と共に低下傾向にあることを明らかに出来た。MCP 還元速度の低下は、海馬領域に沈着するアミロイド 量の増加とも相関があることを明らかに出来た。これらの結果から、EPR イメージング法でのレドックス評価はアルツハイマー病における酸化ストレスの亢進度合いを非侵襲的に視覚化及び定量的な評価を可能とする手法であることを明らかに出来た。

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 8 件)

1 Emoto MC, Matsuoka Y, Yamada KI, Sato-Akaba H, Fujii HG. Non-invasive imaging of the levels and effects of glutathione on the redox status of mouse brain using electron paramagnetic resonance imaging. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485:802-806. 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.134.

2 Emoto MC, Sato S, Fujii HG. Development of nitroxide-based theranostic compounds that act both as anti-inflammatory drugs and brain redox imaging probes in MRI. *Magn Reson Chem.* 2016; 54: 705-711. 査読有 doi:10.1002/mrc.4431.

3 Sasaki K, Ito T, Fujii HG, Sato S. Synthesis and Reduction Kinetics of Five Ibuprofen-Nitroxides for Ascorbic Acid and Methyl Radicals. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2016;64:1509-1513. 査読有

4 Wang X, Emoto M, Miyake Y, Itto K, Xu S, Fujii H, Hirata H, Arimoto H. Novel blood-brain barrier-permeable spin probe for in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016; 26:4947-4949. 査読有 doi:10.1016/j.bmcl.2016.09.010.

5 Emoto MC, Yamato M, Sato-Akaba H, Yamada K, Fujii HG. Brain redox imaging in the pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling model of epilepsy by using in vivo electron paramagnetic resonance and a nitroxide imaging probe. *Neurosci Lett.* 2015; 608: 40-44. 査読有 doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.008.

6 Matsumura A, Emoto MC, Suzuki S, Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Suzuki H, Yamauchi A, Sato-Akaba H, Fujii HG, Shimohama S. Evaluation of oxidative

stress in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Free Radic Biol Med.* 2015;85:165-173. 査読有 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.013

7 Emoto MC, Yamato M, Sato-Akaba H, Yamada K, Matsuoka Y, Fujii HG. Brain imaging in methamphetamine-treated mice using a nitroxide contrast agent for EPR imaging of the redox status and a gadolinium contrast agent for MRI observation of blood-brain barrier function. *Free Radic Res.* 2015;49:1038-1047. 査読有 doi:10.3109/10715762.2015.1040787.

8 Emoto MC, Sato-Akaba H, Hirata H, Fujii HG. Dynamic changes in the distribution and time course of blood-brain barrier-permeative nitroxides in the mouse head with EPR imaging: visualization of blood flow in a mouse model of ischemia. *Free Radic Biol Med.* 2014;74:222-228. 査読有 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.026

[学会発表](計 10 件)

1 Fujii HG, Emoto MC, Matsuoka Y, Yamada KI. In Vivo Brain Redox Status in Diethylmaleate-Treated Mice Using EPR Imaging. SFRBM 23rd annual meeting (2016) Nov 16-19 Nov San Francisco, USA.

2 藤井博匡、江本美穂、佐藤慎吾 マウス脳内 REDOX イメージング用 Theranostics プロブの開発 第 44 回日本磁気共鳴医学会大会(2016) 9月9日~11日 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

3 FUJII HG, EMOTO MC, SATO S, Development of blood-brain Barrier permeable nitroxide-based theranostics probes. Drug Discovery and Therapy World Congress 2016 August 22-25 Boston, USA.

4 FUJII HG, EMOTO MC, SATO S, Brain Redox imaging using nitroxide-based theranostic Probes in septic mic. 17th International Conference on Oxidative Stress Reduction, Redox Homeostasis and Antioxidants (2016) June 13-15, Paris, France.

5 Emoto MC, Sato S, Fujii HG. Development of nitroxide-based theranostics probe for brain research by MRI. 24th International Society for Magnetic Resonance Imaging Annual meeting. (2016) May 5-13, Singapore, Singapore.

6 Emoto MC, Sato S, Fujii HG. Novel theranostics work as therapeutic drug and imaging probe for MRI and EPR imaging European Society for Magnetic Resonance in Medical Science ESMRMB2015 (2015) October 1-3, Edinburgh, UK.

7 Emoto M, Sato S, Fujii H. Development of Theranostics Imaging Probe for MRI and EPR Imaging. 23rd International Society for Magnetic Resonance in Medicine (2015) June 1-5, Toronto, Canada.

8 Fujii H, Emoto M, Yamato M, Yamada KI. In Vivo Imaging of Redox Status in Mouse Brains during Pentylentetrazol (PTZ)-Induced Epileptic Seizures. 21st International Society for Redox Biology and Medicine. (2014) November 19-23, Seattle, USA.

9 江本美穂、山田健一、大和真由美、藤井博匡 MRI を用いたアスコルビン酸耐性ニトロキシド化合物 TEEPONE のマウス頭部における動態解析 第 42 回日本磁気共鳴医学会大会 (2014) 9 月 18 ~ 20 日 ホテルグランヴィア 京都 (京都府京都市)

10 Fujii HG, Emoto MC. Brain redox imaging using nitroxide contrast agents and blood-brain barrier function in methamphetamine-treated mice. 22nd International Society for Magnetic Resonance in Medicine (2014) May 10-16, Milan, Italy.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 博匡 (FUJII, Hirotada)
札幌医科大学・医療人育成センター・教授
研究者番号：70209013

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

下濱 俊 (SHIMOHAMA, Syun)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：60235687

佐藤 慎吾 (SATO, Shingo)
山形大学・理工学研究科・教授
研究者番号：30215793

赤羽 英夫 (AKABA, Hideo)
大阪大学・基礎工学研究科・准教授
研究者番号：00552077

(4) 研究協力者

()