

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461901

研究課題名(和文) X線あるいは重粒子線で誘発される組織のレドックス状態変化の画像解析

研究課題名(英文) Time Course Assessment of Changing Tissue RedOx Status after X-ray or Carbon-beam Irradiation using RedOx Imaging Technique

研究代表者

松本 謙一郎 (Matsumoto, Ken-ichiro)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・チームリーダー (定常)

研究者番号：10297046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウス頭部(大脳部)においては、X線照射2日後、炭素線の場合は1日後になんらかのレドックス状態変化が起こると予想された。MC-PROXYLを造影剤とした場合には、放射線照射後にシグナル消失速度の低下が観察されたが、TEMPOLを造影剤とした場合には逆にシグナル消失速度の増加が観察された。レドックス変化が1-2日後に生じていることから、障害されたミトコンドリアからのスーパーオキシドの生成が懸念された。加えて、低分子SODミミックであるTEMPOLでシグナル消失が増加する(速くなる)ことから1-2日後のレドックス変化にスーパーオキシドが関与している可能性が予想された。

研究成果の概要(英文)：The in vivo T1-weighted contrasting abilities and signal decay behaviors of several nitroxyl contrast agents in mouse brain were compared. The amphiphilic 3-methoxy-carbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl (MCP) and 4-hydroxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPOL) had good initial uniform distribution in the brain and showed typical 2-phase signal decay profiles. Nitroxyl contrast agents equipped with a suitable lipophilic substitution group could be BBB-permeable functional contrast agents. Daily variations of redox behavior in mouse brain after irradiation of X-ray or carbon-ion beams were tried to estimate based on the in vivo reduction rate of amphiphilic nitroxyl contrast agents, MCP and TEMPOL. Irradiation of ionized radiation to head could cause alternation of redox status in the brain 2 days after X-ray irradiation or 1 day after carbon-beam irradiation. Superoxide leakage from damaged mitochondria can be concerned due to increased decay rate of TEMPOL.

研究分野：酸化ストレス学、造影剤薬学、磁気共鳴計測学

キーワード：レドックスイメージング 組織レドックス状態 酸化ストレス 放射線 重粒子線 ニトロキシラジカル 活性酸素 フリーラジカル

1. 研究開発当初の背景

生体に放射線が照射されると、生体内の水の電離あるいは励起により、先ずヒドロキシルラジカルをはじめとする非常に反応性の高い活性種が生じることはよく知られている。最初に生じた活性種同士が反応し合い、同時に周辺の酸素との反応を介してヒドロキシルラジカルよりは若干安定なスーパーオキシドや、それよりも更に安定な過酸化水素などが生じる。スーパーオキシドや過酸化水素は比較的長い距離を移動できるので、少し離れた分子まで移動して、そこで反応を起こすことができる。そして反応した分子の機能を失わせ、あるいは狂わせることにより、または反応により生じた分子上の傷等をフラグとするシグナル伝達の結果、最終的に生体組織に放射線障害が生じると考えられている。放射線がん治療においては、この放射線の持つ組織障害性を癌細胞の殺傷に利用しているが、当然ながら放射線はがん組織周囲の正常組織にも影響を及ぼす。そのため、がん組織を選択的に殺傷する方法の開発が古くから試みられている。

放射線の生物影響を考える上では、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキシド、および過酸化水素の3種の活性酸素種が重要と考えられ、これらの生成を制御することが放射線影響の制御につながると言える。放射線防護剤と呼ばれる物質の多くは、抗酸化作用(活性酸素種・フリーラジカル消去作用)を併せ持ち、多くの場合、それらの放射線防護剤を照射30程前に投与する場合に効果が大きい。すなわち、放射線照射中に生じる活性酸素種・フリーラジカル種を消去して反応を制御することが放射線防護のために重要であることが分かる。そのため申請者らは、初期に生

じる活性酸素種の制御を目的として、X線および重粒子(炭素)線の生態モデル試料への照射によって生じる活性酸素種の量と分布(密度)について解析を行ってきた。X線に比べると線量当たりの生成量は少ないが、重粒子線でも上記の3種の活性酸素種が生じることが分かってきた。また重粒子線ではX線に比べて非常に高密度なヒドロキシルラジカル生成があることも明らかとなった。

スーパーオキシドの生成は放射線の照射中だけではなく、照射後にも起こると考えられる。鹿児島大学の馬嶋らは放射線を照射した細胞のミトコンドリアにおいて電子伝達系が障害される結果、スーパーオキシドの生成が過剰に行われることを明らかにしており、これが放射線照射後の細胞レベルでの障害発生に関与する可能性を示唆している。

過酸化水素の生成は照射中にヒドロキシルラジカル同士の反応によっても起こるが、上で述べたスーパーオキシドの不均化反応によっても生じる。そのため過酸化水素も、照射中だけでなく照射後も多く生成するものと考えられる。過酸化水素の反応性は弱い、それゆえ長い距離を移動でき、また蓄積することも可能と言える。また過酸化水素は遷移金属イオンと反応してヒドロキシルラジカルを生じるため、影響の広がりや後続する影響を考える上で重要と思われる。しかしながら、それ自体の反応性が低いことから、過酸化水素の放射線生物影響への関わりはあまりよくわかっていない。そのため放射線照射によって発生した過酸化水素、あるいはその後の生物化学的過程で発生した過酸化水素がどのタイミングで生体に影響を与えるのかを明らかにしておく必要がある。

一口に活性酸素種と呼ばれることが多い

が、ヒドロキシルラジカル、スーパーオキサイド、および過酸化水素の化学的な性質はそれぞれで全く異なり、また生成するタイミングや分布も異なる。活性酸素種の生成によって組織のレドックス状態（生体分子の酸化が起りやすいか還元が起りやすいか）が変化することが知られており、またどの活性酸素種が主に発生したかによってその変化のしかたが異なることもわかっている。そこで、放射線がん治療における正常組織の防護を考える上で、正常組織とがん組織のそれぞれについて、放射線照射によるレドックス状態の経時変化を調べ、その時点で生成しているであろう活性酸素種に特異的な消去剤をタイミングよく使用することが重要であろうという考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、放射線照射した組織のレドックス状態の経時変化を明らかにすることにより、副作用の予防を目的とする放射線防護剤（抗酸化剤）の使用について、組織のレドックス状態に基づいた有効かつ効率的なタイミングを提案するための基礎情報を得る。申請者らのこれまでの研究から、X線と重粒子線では、最初のヒドロキシルラジカルのでき方（密度）が全く異なることが明らかであるため、その後の生体内レドックス反応の進み方、組織全体のレドックス状態の経時変化も異なるものと思われる。そこで、まず正常組織についてX線あるいは重粒子線照射後のレドックス状態変化を調べる。

正常組織とがん組織では、酸素の供給に大きな違いがあり、細胞内の酸素濃度やグルタチオン生成量、またpHにも違いがあることが知られている。そのため放射線照射後の変

化も両組織では大きく異なることが予想される。そこで次に、腫瘍組織についてX線あるいは重粒子線照射後のレドックス状態変化を調べて正常組織の結果と比較する。

放射線の生物影響の中での関わりがあまりよくわかっていない過酸化水素の影響とそのタイミングを明らかにするため、過酸化水素の分解能を欠くセレン欠乏病態モデルマウスを用いて放射線由来の過酸化水素の影響を調べる。

得られたデータを解析し、特にスーパーオキサイドと過酸化水素が主に影響するタイミングを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ニトロキシル造影剤の選択

代表的な六員環（piperidine系）ニトロキシルラジカルであるTEMPOL（4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl）、およびいくつかの脂溶性の異なる五員環（pyrrolidine系）ニトロキシルラジカル3-carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl（carboxy-PROXYL）、3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl（carbamoyl-PROXYL）、3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl（MC-PROXYL）、acetoxymethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl-3-carboxylate（CxP-AM）、4-(N-methylpiperidine)-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl（23c）について7T MRI装置でマウス脳内の分布およびMR信号の減衰曲線を比較した。

マウスをイソフルランで麻酔し、尾静脈にカニューレを施した。専用のホルダーにマウスを固定し、体温と呼吸をモニターし

て、体温が $36.5 \pm 1^\circ\text{C}$ に安定するのを待った。体温が安定した後、FLASH(高速撮像 T_1 強調) シーケンスによる連続撮像を開始した。1 フレームに 5 スライスを撮像し、1 フレームの撮像時間は約 20 秒で、6 フレーム目の撮像開始と同時にニトロキシル造影剤を投与した。撮像は 70 フレームまで行った。

撮像後、画像を ImageJ で処理し、ニトロキシル造影剤による T_1 増幅信号の分布およびその経時変化(レドックスイメージング)を解析した。

(2) 使用装置の選択

MC-PROXYL 水溶液の希釈列(0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2)を調整し、それぞれをガラスチューブに封入し、6 角形の格子に組んだものをファントムとした。ファントムを共振器内に設置し、同様の FLASH(高速撮像 T_1 強調) シーケンスを用いて 1 T 装置と 7 T 装置でそれぞれ撮像し、MC-PROXYL による T_1 強調信号の増幅率を比較した。また 1 T 装置と 7 T 装置でそれぞれ T_1 マッピングを行い、緩和度(R_1)を求めて比較した。

円筒状の反応容器に mili-Q 水または 2 mM の MC-PROXYL 水溶液を満たした 2 本のシリンジをチューブで繋げ、反応容器とチューブ内は mili-Q 水で満たした。反応容器を共振器内に設置して、(1)と同様のタイミングで経時撮像した。6 フレーム目の撮像開始と同時にシリンジを押して、反応容器内にシリンジ内に送り混合した。1 T 装置と 7 T 装置でそれぞれ同様に撮像を行い、試料溶液の流動による画像への影響を比較した。

造影剤に MC-PROXYL を使用し、1 T 装置と 7 T 装置でそれぞれ(1)と同様の条件で撮像し、得られた画像を比較した。

(3) 放射線照射マウス脳におけるレドックス状態の経日変化

マウス頭部(大脳部)に X 線または炭素線を照射し、照射直後、1、2、4、8 日後に MC-PROXYL を造影剤として、MR レドックスイメージングによる脳内レドックス状態の評価を行った。また炭素線 8 Gy 照射後に、TEMPOL を造影剤として、MR レドックスイメージングによる脳内レドックス状態の評価を行った。

(4) X線の照射

マウス頭部への X 線照射は、PANTAK 320S (島津製作所)で行った。照射条件は、管電圧 = 200 kV、管電流 = 20 mA、プレフィルタは 0.5 mm 厚の Cu 板と 0.5 mm 厚の Al 板、X 線管と試料の距離は 300 mm で行った。この時の実行エネルギーは 80 keV、線量率は 3.3 Gy/min であった。遮蔽用鉛板に開けた直径 1 cm の穴でコリメートし、マウスの頭部のみに X 線を 8 Gy 照射した。マウスはペントバルビタールで麻酔し、マウスの頭部を鉛板の穴に合わせて固定した状態で照射を行った。

(5) 炭素線の照射

マウス頭部への炭素線の照射は、放医研の HIMAC を使用し、290 MeV/n の炭素線モノビームを照射した。マウスはペントバルビタールで麻酔し、専用のマウスホルダーに固定した状態で、2 cm 幅のスリットを通して頭部のみに 8 Gy または 16 Gy の炭素線照射を行った。

(6) 腫瘍モデルの作成

RIF-1 腫瘍を 8 週齢メスの C3H マウスの右大腿部に植え付け、腫瘍のサイズが約 1 cm 程

度になるタイミング（10日後）で実験に使用した。

(7) セレン欠乏モデルマウスの作成

妊娠 15 日目の C3H マウスを購入し、出産 2 週間後までは通常の餌と超純水を与えて飼育した。出産 2 週間後からトルラ酵母を主原料とするセレン欠乏餌と超純水を与えて飼育した。4 週後に仔を離乳し、離乳後は仔マウスにセレン欠乏餌と超純水を与えて飼育し、8 週齢に至ったマウスを実験に使用した。

4. 研究成果

マウス脳への分布およびシグナル減衰パターンを観察した結果、両親媒性化合物である TEMPOL あるいは MC-PROXYL がレドックス造影剤として適当と考えられた（雑誌論文）。

実験動物における MR レドックスイメージングを実施するにあたり、1 T MRI 装置と 7 T MRI 装置の比較を行った。T₁ 強調信号の増幅率および緩和度は、1 T のほうが 7 T 装置よりも大きかったが、1 T 装置では信号/ノイズ比（SNR）が小さく、その結果、マウス脳の連続撮像においては十分な解像度が得られなかった。動物実験のレドックスイメージングでは測定対象が比較的小さいため、使用装置は 7 T 装置とした（投稿中）。

マウス頭部（大脳部）においては、X 線照射 2 日後、炭素線の場合は 1 日後になんらかのレドックス状態変化が起こると予想された。MC-PROXYL を造影剤とした場合には、放射線照射後にシグナル消失速度の低下が観察されたが、TEMPOL を造影剤とした場合には逆にシグナル消失速度の増加が観察された。レドックス変化が 1-2 日後に生じていることか

ら、障害されたミトコンドリアからのスーパーオキシドの生成が懸念された。加えて、低分子 SOD ミミックである TEMPOL でシグナル消失が増加する（速くなる）ことから 1-2 日後のレドックス変化にスーパーオキシドが関与している可能性が予想された（投稿準備中）。

腫瘍モデルについて MC-PROXYL を造影剤としてレドックスイメージングを行ったところ、腫瘍内への MC-PROXYL の分布が予想に反して少なく、解析がそれほど容易ではないことが分かった。組織によって適当な造影剤の選択が必要と思われる。

セレン欠乏マウスを作成するにあたり、当初は、既に報告のあるセレン欠乏ラットモデルと同じ作成法を試みた。ラットモデルでは妊娠 15 日目の親からセレン欠乏餌での飼育を開始するが、マウスではその場合には生まれた仔が離乳まで生存できなかった。そのためセレン欠乏餌での飼育開始のタイミングを遅らせ、出産 2 週間後からセレン欠乏餌を与えた場合に、比較的若い 8 週齢のセレン欠乏マウスを得ることができた。セレン欠乏マウスでは放射線による影響を観察するまでに至らなかったが、セレン欠乏マウス脳におけるレドックスイメージングから、MC-PROXYL の減衰速度が正常マウスよりも遅いことが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Matsumoto K, Yamasaki T, Nakamura M, Ishikawa J, Ueno M, Nakanishi I, Sekita A, Ozawa Y, Kamada T, Aoki I, Yamada K. Brain contrasting ability of blood-brain-barrier permeable nitroxyl

contrast agents for magnetic resonance RedOx imaging. Magn. Reson. Med. 76, 935–945, 2016. 査読有

[学会発表](計6件)

Matsumoto K, Nakamura M, Ueno M, Nakanishi I, Kamada T, Yamada K, Aoki I. Trial of brain redox imaging and estimation of radiation-induced redox change in mouse brain. The 7th International Society of Radiation Neurobiology Conference, Minami-uonuma, Feb. 9–10, 2017. (口頭、ポスター)

松本謙一郎. ニトロキシル造影剤によるMR レドックスイメージング. 第54回電子スピンスイエンズ学会年回. 2015年11月2–4日.(ポスター)

中村美月, 柴田さやか, 尾澤芳和, 上野恵美, 松本謙一郎, 山田健一, 鎌田正, 青木伊知男. 放射線照射後の組織におけるレドックス状態変化の解析. 第29回日本酸化ストレス学会関東支部会, 筑波, 2014年12月20日.(ポスター)

Nakamura M, Shibata S, Ozawa Y, Ueno M, Matsumoto K, Yamada K, Kamada T, Aoki I. Time course analysis of radiation induced alteration of tissue redox status using MR redox imaging. APES-IES-SEST 2014 (Joint Conference of 9th Asia-Pacific EPR/ESR Society Symposium, 1st International EPR (ESR) Society Symposium, and 53th SEST Annual Meeting), Nara, Nov. 12–16, 2014. (ポスター)

中村美月, 柴田さやか, 尾澤芳和, 上野恵美, 松本謙一郎, 山田健一, 鎌田正, 青木伊知男. 放射線照射後に生じる組織レ

ドックス状態の経時変化-MR レドックスイメージングによる画像解析. 日本放射線影響学会第57回大会, 鹿児島, 2014年10月1–3日.(ポスター)

中村美月, 柴田さやか, 尾澤芳和, 上野恵美, 松本謙一郎, 山田健一, 鎌田正, 青木伊知男. 放射線で誘発される組織レドックス状態の画像解析. 第67回日本酸化ストレス学会学術集会, 京都, 2014年9月4–5日.(ポスター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 謙一郎 (MATSUMOTO, Ken-ichiro)
国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・チームリーダー
研究者番号: 10297046