

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861008

研究課題名(和文)EPRイメージング法によるアルツハイマー病モデル動物の病態評価法の開発

研究課題名(英文)Evaluation of oxidative stress in the brain of a mouse model of Alzheimer disease by in vivo EPR imaging system.

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：分子イメージング法の一つである、電子常磁性共鳴(EPR)イメージング法は、活性酸素種等により起こる生体の酸化ストレス状態を、非侵襲的に3次元で画像化できるものである。本研究ではEPRイメージング法とニトロキシド造影剤を用いて、アルツハイマー病(AD)と活性酸素種生成の関連性を画像により検証する事を目的とした。その結果、ADモデルマウスの脳内では、酸化ストレス状態が亢進する部位が存在する事を非侵襲的に画像化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease clinically characterized by progressive cognitive dysfunction. Deposition of amyloid- β (A β) peptides is the most important pathophysiological hallmark of AD. Oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) is prominent in AD, and several reports suggest the relationship between the change in redox status and AD pathology containing progressive A β deposition. Electron paramagnetic resonance (EPR) imaging is used to acquire spatial information about the distribution of free radical species in vivo and visualize oxidative stress derived from ROS. In vivo changes in redox status with age in both wild-type (WT) and AD mouse brains were measured noninvasively by three-dimensional (3D) EPR imaging using nitroxide (MCP) as a redox-sensitive probe. EPR imaging clearly visualized the accelerated change in redox status of AD mouse brain compared with WT.

研究分野：EPRイメージング

キーワード：EPRイメージング アルツハイマー病モデルマウス 酸化ストレス エイジング

1. 研究開始当初の背景

1953年にジェームス・ワトソンとフランシス・クリックによりDNAの二重らせん構造が提唱され、その50年後の2003年にはヒトゲノムの全塩基配列決定をしたヒューマンゲノムプロジェクトが終了し、ポストゲノム時代が到来した。ライフサイエンスの分野において、ポストゲノムからオミクス時代へと時代は移り変わってきている。すなわち *in vitro* の条件下で、分子をターゲットとしたミクロの研究から、生命体を構成する「分子全体を網羅的に」研究する事が時代のニーズとなりつつある。様々な分子の集合体が組織化され、一つの生命体として機能している状態、つまり「個体レベルでの生命活動」= *in vivo* での条件下において、分子の挙動を可視化できる分子イメージング法という研究手法を利用した解析研究が進められている。生体の様々な現象を、そのままの状態で計測でき、かつ、非侵襲的な手法である分子イメージング法は、生命現象を分子全体の挙動として、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、さらには病態形成機序の解明、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、ニトロ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。

2. 研究の目的

アルツハイマー病 (AD : Alzheimer's disease) は認知症を呈する進行性神経変性疾患である。超高齢社会となっている日本において、その患者数は200万人にも及ぶと言われ、2050年までに世界で1億人を越える患者数になるとの予測もあるほど、世界的にみても非常に関心の高い疾患である。病理学的にはアミロイド (A β) を主成分とする老人斑の形成、リン酸化タウを主成分とする神経原線維変化および神経細胞死を特徴とする。このA β が原因で神経細胞障害などが引き起こされ、酸化ストレスが増悪する報告と、一方で、ROSなどの酸化ストレスによりA β が増加するという報告があり、A β と酸化ストレスの関連性について未だ明らかにされていない点がある。脳内酸化ストレスの評価、つまり *in vivo* で非侵襲的にROSを画像から評価する事が出来れば、A β と酸化ストレスの関連性が明らかになり、ADの発症機序解明や早期診断に役立つのではないかと考えた。実際に産生されたROSによる酸化ストレス状態を正確に評価するために、還元反応に対して異なる反応速度を持った多種のニトロキシド造影剤を画像化できるシステムが必要である。抗酸化物質に対して異なった感受性

をもつ複数のニトロキシド化合物を用いる事で、ROSなどにより引き起こされる酸化ストレス状態を、EPRイメージング法により画像から正確に評価する事ができるようになった。よって、本申請の目的は、EPRイメージング法と酸化ストレス感受性ニトロキシド造影剤を利用し、ADモデルマウスの脳内で起きている酸化ストレス状態を非侵襲的に画像として可視化することである。

3. 研究の方法

本研究計画においては、高速EPRイメージング装置とコントラスト剤として酸化ストレス感受性ニトロキシド造影剤を用いて、非侵襲的にADの状態を画像として可視化することを目的としている。計画実現に向け、具体的には以下の3つのstepで、最終的には診断や治療への応用を目指す。

- Step1「ADモデルマウスの経過観察」MRIを使いADモデルマウスの状態を確認する。
- Step2「EPRイメージングにおけるモデルマウスの画像評価」ADモデルマウスの酸化ストレスバランスの変化を評価するため、コントロールマウスおよびADモデルマウスの両者で酸化ストレスバランスの比較を行う。
- Step3「ADの発症機序の探索・治療薬の効果判定への応用」病態のモニタリングと投与した治療薬の効果判定という新しい観点から、画像による病態評価にアプローチする。

4. 研究成果

(1) 年齢による脳内酸化ストレス状態の評価

ADモデルマウスに於ける脳内酸化ストレス状態の評価に先立ち、遺伝子組み換えを行っていない、若い週齢のマウスと高齢のマウスの間で、脳内酸化ストレス状態に変化が起きているかどうか検討した。方法としては、それぞれの週齢のマウスにニトロキシド造影剤の1つであるMCPを投与し、EPRイメージングを行った。酸化ストレス状態の評価を行うため、得られたEPR画像から各部位におけるMCPの減少速度を算出し、レドックスマップを作成した。以下にその画像を示す。

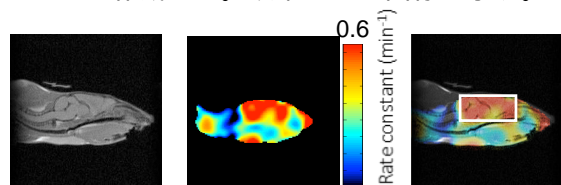


Fig.1 若い週齢のマウス脳内レドックスマップ 左)MRI(sagittal) 中央)EPR レドックスマップ 右)MRI とレドックスマップの重ね合わせ

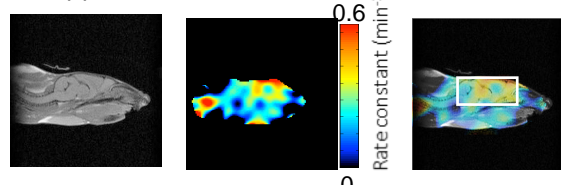


Fig.2 高齢のマウス脳内レドックスマップ 左)MRI(sagittal) 中央)EPR レドックスマップ 右)MRI とレドックスマップの重ね合わせ

上記のイメージング結果より、脳内の ROI (重ね合わせ画像の白い四角で囲った領域) の速度定数 (rate constant) をヒストグラムで示した (下図)、その広がりが高齢マウスの方が有為に大きいことが明らかとなった。

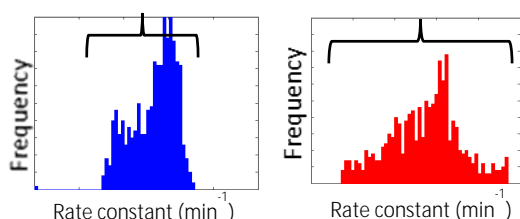


Fig.3 脳内 ROI に於ける速度定数の頻度
左)若い週齢のマウス 右)高齢マウス

これらの結果より、若い週齢のマウスに比べて、高齢マウスの脳内酸化ストレス状態は、不均一性が高い事が明らかとなった。

(2)AD モデルマウスの脳内酸化ストレス状態の評価

次いで、高齢の AD モデルマウスと遺伝子組み換えをしていない高齢マウスで EPR イメージングを行った。用いたマウスの月齢は 3, 6, 9, 12, 18 ヶ月齢であった。

先の遺伝子組み換えを行っていないマウスの結果より、高齢マウスは脳内の酸化ストレス状態にばらつきがある事が明らかになったので、特に AD モデルで影響が大きいと考えられる海馬付近の酸化ストレスの変化を、比較的影響が少ない中脳で規格化して、評価した。その結果を下に示す。

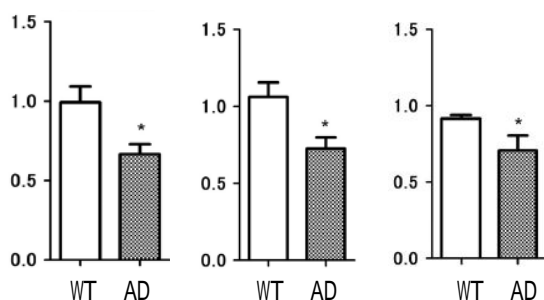


Fig.4 中脳で規格化した海馬の速度定数の比較 左)9ヶ月齢 中央)12ヶ月齢 右)18ヶ月齢 各グラフとも右側の白いバーが遺伝子組み換えではないマウス、左側のグレーのバーが AD マウス

これらの結果より、9ヶ月以降の AD マウスでは、中脳と比較して、海馬付近が著しく酸化ストレス状態に変化を生じている事が示された。

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 6件)

1. Emoto MC, Yamato M, Sato-Akaba, Yamada KI, Fujii HG. Brain redox

imaging in the pentylentetrazole (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)

2. 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 Radical Research* 2015; 49(8):1038-1047(査読有)

3. 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)

4. 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)

5. X. Wang, M. Emoto, A. Sugimoto, Y. Miyake, K. Itto, M. Amasaka, S. Xu, H. Hirata, H. Fujii, and H. Arimoto. Synthesis of ¹⁵N-labeled 4-oxo-2,2,6,6-tetraethylpiperidine nitroxide for EPR brain imaging. *Tetrahedron Letters* 2014; 55(13): 2146-2149(査読有)

6. Enomoto A, Emoto M, Fujii H, Hirata H. Four-channel surface coil array for sequential CW-EPR image acquisition. *J Magn Reson* 2013; 234:21-29(査読有)

[学会発表](計 5件)

1. M.C. Emoto, S Sato, H.G. Fujii
Novel theranostics work as therapeutic drug and imaging probe for MRI and EPR imaging
ESMRMB2015(2015) 1-3 October, Edinburgh, UK

2. Emoto, Miho Sato, Shingo Fujii, Hirotsada G. Development of Theranostics Imaging Probe for MRI and EPR Imaging 第23回国際磁気共

鳴医学会(2015) 1-5 June 2015、
Toronto, Canada

3. Miho C Emoto, Akihiro Matsumura, Hiromi Suzuki, Shun Shimohama, And Hirotsada G Fujii. The Effect of Aging for Oxidative Stress in Mouse Brains by EPR Imaging Method. 第 21 回米国フリーラジカル生物医学会議 (2014) November 19-23, Seattle, WA, USA.

4. 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)

5. MC Emoto, H Sato-Akaba, H Hirata, HG Fujii. Co-registered EPR and MRI of the mouse head indicates detailed distributions of piperidine nitroxides. 第 22 回国際磁気共鳴医学会(2014) 10-16 May 2014、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

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

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：