

令和元年5月28日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05079

研究課題名(和文) 生体内因性分子をプローブとする磁気共鳴代謝イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of metabolic imaging using DNP-MRI and endogenous molecule as a probe

研究代表者

兵藤 文紀 (Hyodo, Fuminori)

岐阜大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：10380693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内に存在し、酸化還元反応(レドックス)に寄与する内因性分子を造影剤(プローブ)として生体機能や代謝及び病気を検出する新たな方法の開発を行った。磁気共鳴装置としては、MRIの感度を飛躍的に増幅する超偏極技術を利用するDNP-MRIシステムを用いた。DNP-MRIにより5種以上の生体内因性分子のラジカル化および可視化に成功し、それを生体プローブとして活用することで新しい病気の診断法への展開が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体内在性分子のラジカルの発見より約50年間可視化できなかった生体内レドックス分子をDNP-MRIにて初めて可視化に成功した。今後の装置の高感度化が必要となるが、もし生体内のラジカルを直接可視化することが可能となれば、造影剤を投与することなく、病気の診断および代謝情報からより早い段階での予防的診断が可能となるため、患者のリスクを軽減しつつ、新しい医療の提供につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have developed novel metabolic imaging method using endogenous redox molecules as a imaging contrast agent. In vivo dynamic nuclear polarization (DNP)-MRI is a non-invasive imaging method to obtain the spatio-temporal information of free radicals with MRI anatomical resolution. The proton signal of tissue, including free radicals, can be dramatically enhanced by EPR irradiation at the resonance frequency of the free radical prior to applying the MRI pulse sequence. We found that endogenous molecules such as FAD, FMN and CoQ were clearly visualized by DNP-MRI system. In addition, FADH is useful probe for in vivo metabolic imaging of atherosclerosis by DNP-MRI.

研究分野：物理系薬学

キーワード：生体内因性分子 ラジカル レドックス 超偏極 DNP MRI ミトコンドリア 電子伝達系

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

生体内の多くの代謝反応に電子の授受を介したレドックス反応が関与することが知られている。従って生体内因性分子が繰り広げるレドックス代謝反応そのものを調べることができれば、生命活動における代謝反応の本質（正常）とその異常（疾患）を区別でき、疾患の早期診断・未病状態の検出、並びに創薬ツールとしての展開が期待できる。

内因性分子のフリーラジカル中間体に関する研究は1950年～1960年代が旺盛で、1967年発行の *ATLAS of ESR spectra* (ESR スペクトルの辞典) や *Biological Applications of Electron spin resonance* (ESR の生物学応用: 1972 発行) には既に多くの内因性分子のラジカル中間体が掲載され、ESR 法を用いた生物応用研究が期待されていた。1990年代には動物をまるごと計測可能な生体 ESR 法が内海ら（九州大学）を含む世界の数拠点のグループで開発され、生体レドックス変動が疾患の発症や進展に深く関与することが証明された。その後 ESR 画像化法 (ESR imaging: ESRI) でレドックス動態を時間・空間的に捉える研究が展開されが、ESRI 法の画像解像度にはスペクトルの線幅が深く関与するため [画像解像度=スペクトル線幅(G)/磁場勾配(G/cm)]、広線幅、複雑線形を有する生体由来ラジカルへの応用は事実上不可能で、実際には狭線幅のニトロキシラジカルがプローブとして汎用された。(最初の報告から約50年以上、内因性分子の可視化は達成されなかった。)

超偏極もしくは動的核偏極 (Dynamic Nuclear Polarization: DNP) -MRI は磁気共鳴イメージング法で、電子スピン (ラジカル) のエネルギーを核スピンへ遷移させ MRI の感度を最大330倍の高感度化できる。DNP-MRI は目的ラジカル分子の ESR シグナル共鳴ピークを分離できれば、その分子を区別して可視化できる。故に、本法を用いれば複数の内因性分子の代謝反応を同時に可視化し、代謝反応の相関関係を個体レベルで解析することが可能である。

2. 研究の目的

内因性分子やその医薬品の磁気共鳴特性を調べ、DNP-MRI における生体代謝反応可視化のための内因性プローブを創出することを目的とする。また内在性フリーラジカルであるメラニンを用いたプローブフリーの生体イメージングについての実証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

DNP-MRI 装置としては、MRI 磁場が 15mT の低磁場型装置 (Keller、日本レドックス社製) を用いた。DNP 現象を誘発するためのマイクロ波の照射 (EPR irradiation) は 455MHz を中心とするサーフェイコイルを作製し実験に用いた。本研究では 50 種以上の医薬品および内因性分子についてラジカル化の検討を実施し、特に CoQ10、FAD、FMN、VK1、VE などのミトコンドリアに含まれる内在性の分子について生体応用性を検討した。また本研究では内在性フリーラジカルであるメラニンラジカルについても研究を進めるため、ユーメラニンを用いたファントム実験及び、B16F0 メラノーマ細胞を用い腫瘍モデルマウスを作製し、DNP-MRI にて可視化の検討を行った。

4. 研究成果

メラニンラジカルの存在を確認するために、ユーメラニンを7mg/mL含有する水溶液を電子スピン共鳴法 (ESR) でスペクトルを得た。またユーメラニン中のメラニンラジカルは、ユーメラニンの濃度依存的に増加することが明らかとなった (Figure1B)。次に、ユーメラニンを0~20mg/ml含むユーメラニン含有ゲルファントムを作製してDNP-MRIにて撮像した。ゲルはMRI信号に影響を与えない0.2%溶液とした。DNP-MRIにてEPR照射をしてDNP画像を撮像した場合に、EPR照射無しに比べユーメラニン濃度が10mg/mL以下では画像強度の減少を観測した (ネガティブエンハンスメント)。EPR照射OFF画像からEPR ON画像を差し引いた差画像 (Difference) ではユーメラニンの各濃度に対応したDNP画像をえることができた。腫瘍内のメラニン含量は20uM程度であることから、ファントム実験により生体メラノーマ実験においても同様にネガティブエンハンスメントが得られる可能性が示唆された。

続いて、B16F0移植マウスから腫瘍を単離して腫瘍内にメラニンラジカルの存在を *in vivo* ESRを用いて観察した。Figure2Aに示すように単離メラノーマ腫瘍においてもメラニンラジカルが存在することを確認した。次にDNP-MRIにおいて最適なEPR照射周波数を決定するために、摘出したメラノーマ腫瘍をDNP-MRIの検出器内に設置し、周波数を変化させながらDNP画像を取得し、その強度変化をプロットした (Figure2B)。その結果、EPR照射周波数が455MHzの時に最も高いDNPエンハンスメントが得られることがわかった。そこで以降の実験では455MHzをEPRの励起周波数として用いた。B16F0細胞を移植したメラノーマ腫瘍モデルマウスを1.5%のイソフルランで麻酔し、DNP-MRIの検出器の中に設置した。EPR OFF画像では、腫瘍とその輪郭を示す画像が得られ、EPR ON画像では、腫瘍内部における明らかな画像強度の低下が視られた。そこで、差画像を作成すると、メラニンラジカルが存在するメラノーマのみが明白に描写されることがわかった。また同マウスを1.5TのMRIにて撮像した画像では、腫瘍の存在は確認できるが正常組織との境界部が不明瞭であるため、

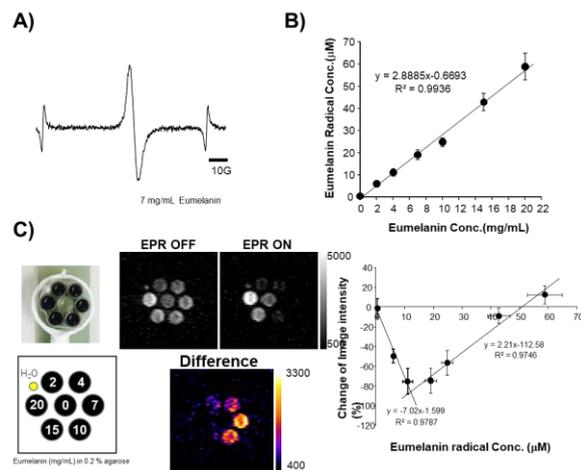


Figure 1: EPR analysis and *in vitro* DNP imaging of eumelanin pigment. A) X-band EPR spectrum (center) of melanin radicals in the eumelanin pigment (7 mg/mL). Two external EPR peaks represent standard Mn^{2+} peak for standardization of experiments. B) Relationship between eumelanin concentration and melanin radical concentration as measured by EPR. C) DNP-MRI phantom imaging experiment including various concentrations of eumelanin with 0.2% agarose gel. EPR irradiation on (DNP ON) and off (DNP OFF) images were obtained. The ratio of DNP enhancement was calculated and shown as a difference image. D) DNP enhancement was changed as a function of melanin radical concentration calculated by the EPR study. Results are from three experiments. (Hyodo et al. Free Radical Biology and Medicine 2019より引用)

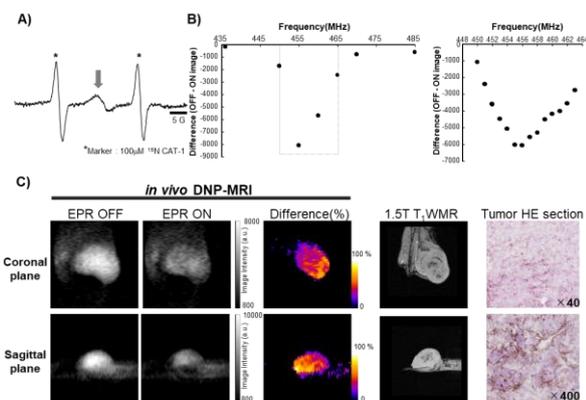


Figure 2: *Ex vivo* DNP and EPR spectra of isolated melanoma using DNP-MRI and EPR spectroscopy. A) EPR spectrum of isolated melanoma tissue with 100 μM ^{15}N CAT-1 radical (1 mL) as a standard marker was obtained by the 1 GHz EPR system. B) DNP spectra of isolated melanoma (day 14, 2.04 g) was measured by DNP-MRI. The DNP effect on DNP ON and OFF images was monitored from 436 to 485 MHz by a volume coil and from 448 to 462 MHz by a surface coil. C) DNP-MR imaging of melanoma on the coronal and sagittal plane with or without EPR irradiation. The melanoma image was obtained by the subtraction of DNP ON images from OFF images. T_1 weighted MR images were obtained by 1.5 T animal MRI. HE image of melanoma tissue. (Hyodo et al. Free Radical Biology and Medicine 2019より引用)

DNP-MRI によるメラノーマの可視化は放射線治療などにおける治療領域の決定などに有効性であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. **Hyodo F**, Naganuma T, **Eto H**, Murata M, Utsumi H, Matsuo M. In vivo melanoma imaging based on dynamic nuclear polarization enhancement in melanin pigment of living mice using in vivo dynamic nuclear polarization magnetic resonance imaging. *Free Radic Biol Med*. 2019 Jan 5;134:99-105 (査読有)
2. Cui Y, Masaki M, Zhang X, Yamasaki R, Fujii T, Ogata H, Hayashida S, Yamaguchi H, **Hyodo F**, **Eto H**, Koyama S, Inuma K, Yonekawa T, Matsushita T, Yoshida M, Yamada K, Kawano M, Malissen M, Malissen B & Kira J. A novel model for treatment of hypertrophic pachymeningitis. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2019 Jan 15:1-14 (査読有)
3. Iwashita T, Uemura S, Shimizu M, **Hyodo F**, Tomita H, Iwasaki R, Takasu M, Mori T, Tanaka H, Matsuo M. Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Injection of Hydrogen Peroxide into the Pancreas: Feasibility and Tolerability Study Using a Survival Porcine Model. *Ultrasound Med Biol*. 2019 Feb;45(2):579-585 (査読有)
4. **Hyodo F**, Sho T, Maity B, Fujita K, Tachibana Y, Akashi S, Mano M, Hishikawa Y, Matsuo M, Ueno T. Photoinduced in Vivo Magnetic Resonance Imaging (MRI) with Rapid CO Release from an MnCO-Protein Needle Composite. *Chemistry*. 2018 Aug 9;24(45):11578-11583 (査読有)
5. Irie M, Hayakawa E, Fujimura Y, Honda Y, Setoyama D, Wariishi H, **Hyodo F**, Miura D. Analysis of spatiotemporal metabolomic dynamics for sensitively monitoring biological alterations in cisplatin-induced acute kidney injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 29;496(1):140-146 (査読有)
6. Matsumoto KI, **Hyodo F**, Mitchell JB, Krishna MC. Effect of body temperature on the pharmacokinetics of a triarylmethyl-type paramagnetic contrast agent used in EPR oximetry. *Magn Reson Med*. 2018 Feb;79(2):1212-1218 (査読有)
7. Kawano T, Murata M, Kang JH, Piao JS, Narahara S, **Hyodo F**, Hamano N, Guo J, Oguri S, Ohuchida K, Hashizume M. Ultrasensitive MRI detection of spontaneous pancreatic tumors with nanocage-based targeted contrast agent. *Biomaterials*. 2018 Jan;152:37-46 (査読有)
8. Nakata R, **Hyodo F**, Murata M, **Eto H**, Nakaji T, Kawano T, Narahara S, Yasukawa K, Akahoshi T, Tomikawa M, Hashizume M. In vivo redox metabolic imaging of mitochondria assesses disease progression in non-alcoholic steatohepatitis. *Sci Rep*. 2017 Dec 7;7(1):17170 (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 超偏極 (DNP) MRI を用いた新たな画像診断法の開発と放射線増感研究への応用へ向けた取り組み 兵藤文紀、田中秀和、庄田真一、森崇、高須正規、岩崎遼大、富田弘之、山口尊弘、村田正治、橋爪誠、松尾政之 第 21 回癌治療増感シンポジウム 2019/2/2 国内
2. 超偏極 MRI を用いた放射線照射によるミトコンドリア機能の可視化に関する基礎検討 兵藤文紀、中路睦子、江藤比奈子、田中秀和、森崇、岩崎遼太、高須正規、床田真一、三好利治、山口尊弘、松尾政之 ポスター 日本放射線腫瘍学会 2018/10/12 国内
3. Imaging of mitochondria metabolic change after radiation treatment using dynamic nuclear polarization (DNP)-MRI ポスター Fuminori Hyodo, Hidekazu Tanaka, Ryota Iwasaki, Takashi Mori, Takahiro Yamaguchi, Shinichi Shoda, Masayuki Matsuo Annual Meeting of the American Society for Radiation Oncology (ASTRO) 2018/10/22 国際
4. 兵藤文紀、中田亮輔、江藤比奈子、中路睦子、長沼辰弥、村田正治、橋爪誠、松尾政之 非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスの in vivo DNP-MRI によるレドックス代謝イメージング 第 57 回電子スピンサイエンス学会年会 2018/11/1
5. 中路睦子、長沼辰弥、内海英雄、松尾政、兵藤文紀 メラニンラジカルを指標とする DNP-MRI によるメラノーマ可視化法の開発 第 139 回日本薬学会年会 2019/3/22

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等：<https://hosp.gifu-u.ac.jp/radiology/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：江藤 比奈子

ローマ字氏名：Hinako Eto

所属研究機関名：九州大学

部局名：先端医療イノベーションセンター

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：30557632