

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06255

研究課題名(和文) 水素エネルギーを活用した後天的遺伝子変異イメージング技術の創出

研究課題名(英文) Noninvasive imaging of acquired gene mutations using singlet state hydrogen gas.

研究代表者

松元 慎吾 (Matsumoto, Shingo)

北海道大学・情報科学研究院・准教授

研究者番号：90741041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：病因となる遺伝子変異の多くは特徴的な代謝変化を伴う。本研究では、 ^{13}C 標識した生体分子のNMR信号を数万倍に励起することで、遺伝子変異に依存した代謝変化を特異的に検出する核磁気共鳴画像(MRI)技術の開発を行った。一重項の水素ガスの付加反応を用いて ^{13}C NMR信号を生体分子により5～10万倍励起する技術開発に成功した。超偏極誘導した ^{13}C ピルビン酸を担がんモデルに投与し、乳酸脱水素酵素の遺伝子発現量に応じた乳酸の生成を確認した。がん抑制遺伝子であるフマラーゼやコハク酸脱水素酵素の変異を検出する ^{13}C フマル酸では10万倍以上のMRI信号の励起を達成し、代謝MRIの撮像にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの急性・慢性疾患に遺伝的要因が関与する。先天的に受け継いだ遺伝子多型や変異であれば血液検査等により容易に検出できるが、突然変異等により後天的に獲得した遺伝子変異は、体内の奥深く、特定の臓器や組織のみに偏在し、その特定には侵襲的な生検採取が必要となる。もし変異により起こる特徴的な代謝変化をMRIで検出できれば、非侵襲的に後天的遺伝子変異の種類、位置、量を知ることが可能となる。超偏極 ^{13}C MRIは ^{13}C 標識した任意の化合物の生体内代謝を動的に計測する最先端技術である。本研究成果は、非侵襲的遺伝子診断としての価値に加え、数億円に上る現行の超偏極 ^{13}C MRI導入コストの低減にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：Many of the pathogenic gene mutations are associated with characteristic metabolic changes. In this study, we developed a magnetic resonance imaging (MRI) technique that detects specific metabolic changes dependent on gene mutations by exciting the NMR signals of ^{13}C -labeled biomolecules tens of thousands of times. We have succeeded in developing the hyperpolarization technique to enhance ^{13}C NMR signals of biomolecules 50,000 to 100,000 times by using the hydrogenation of singlet state hydrogen gas, which can align quantum states relatively easily. Hyperpolarized ^{13}C -pyruvate was administered to a tumor-bearing mouse, and production of lactate was confirmed according to the gene expression level of lactate dehydrogenase (LDH). MRI signal of ^{13}C fumarate, which is used to detect gene mutations in the tumor suppressor genes fumarase and succinate dehydrogenase, could be enhanced more than 100,000 times, and succeeded to conduct metabolic MRI scan in mice.

研究分野：磁気共鳴画像

キーワード：超偏極 ^{13}C MRI 遺伝子変異 代謝 パラ水素誘起偏極

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 後天的遺伝子変異の非侵襲検出

多くの急性・慢性疾患に遺伝的要因が関与する。先天的に受け継いだ遺伝子多型や変異であれば血液検査等により容易に検出できるが、突然変異等により後天的に獲得した遺伝子変異は、体内の奥深く、特定の臓器や組織のみに偏在し、その特定には侵襲的な生検採取が必要となる。膵炎と続発する糖尿病の原因となる膵消化酵素の変異や、脳腫瘍で高頻度に見られるイソクエン酸脱水素酵素(IDH)の点変異など、変異遺伝子がコードするタンパクには酵素が多く、体内で何らかの代謝反応を触媒している。もし変異により起こる特徴的な代謝変化をMRIで検出できれば、非侵襲的に後天的遺伝子変異の種類、位置、量を知ることが可能となる。

(2) 超偏極¹³C MRIによる代謝イメージングと臨床コスト

超偏極¹³C MRIは¹³C標識した任意の化合物の生体内代謝を動的に計測する最先端技術である。現在、臨床試験を計画している全ての機関は、動的核偏極型の¹³C核励起装置を用いている。3T以上の高磁場と約1Kの超低温を必要とする動的核偏極型の臨床初期費用は数億円にも上り、MRI本体よりも強力な超電導磁石の設置に伴う施設改造の必要性と合わせ、本技術の国内普及を妨げる主因となっている。一方、化学分野で1980年代より知られる、水素分子の核スピン異性体であるパラ水素付加による¹³C核スピンの励起法(ParaHydrogen Induced Polarization, PHIP)は、低磁場(数mT)・室温で行える。もし超偏極¹³C MRIに応用できれば、臨床の初期費用は約5分の1にまで抑制され、MRI前室に容易に設置できるため施設改造も不要となる。更に、政府は水素燃料自動車の普及のため、国内100カ所ほどに水素ステーションの建設を進めている。液体水素が供給される水素ステーションから出るのは高純度のパラ型の水素である(通常水素はオルソ:パラ比が3:1)。理論的に1000円/kgのパラ水素で数10人の超偏極¹³C MRIの撮像が可能であり、これを活用できれば、パラ水素変換器に掛かる費用(最安の市販品2000万円)も抑制できる。

2. 研究の目的

本課題では、1)量子状態を揃えた水素ガスを用いて、現行装置の10分の1のコストで導入可能な¹³C励起システムを開発する。この励起装置を用い、2)特異的な代謝変化を指標として、後天的に生じた遺伝子変異の体内分布を非侵襲的に可視化するMRI技術の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) PHIP法では、溶媒中にロジウム等の金属触媒と炭素二重結合を持つ前駆体を溶解し、そこにパラ水素ガスを付加して、核スピんに超偏極を誘導する。従って、患者に投与するためには、反応後、金属触媒を完全に除去しなければならない。励起した核スピンの分極は、反応直後から熱平衡状態へと¹³C核の縦緩和時間T1に依存して戻るため、ゲル濾過等によって触媒を除去しては、MRI撮像までに励起した分極の大半が失われてしまう。そこで、近年化学分野で開発された、白金触媒を網目状に共有結合で強固に架橋した固形触媒の中に、前駆体と水素ガスを流すことで水素付加反応を行う不均一系の水素化触媒を励起装置に応用することを試みた。

分極ロスを最小限に抑えるため、水素化直後は1H核上にある超偏極をT1の長い¹³C核へと移すRFパルスを、触媒反応カラム内部へ直接照射できるよう改良した。反応カラムは溶媒に応じて50~80℃で加温し、パラ水素は8気圧の高圧で噴霧することにより水素化速度の改善を図った。主磁場の発生、パラ水素付加反応のタイミング制御のための電磁弁の開閉、分極転移のためのRFパルス照射、磁場強度や反応温度の計測を全自動で行うソフトウェアを開発した。

(2) 現行の動的核偏極法では、投与したい代謝プローブ自体を直接励起できるが、PHIP法では水素付加反応によって超偏極を誘導するため、炭素二重結合を持つ前駆体を合成する必要がある。励起できる化学構造上の制限を考慮する必要がある。また、代謝プローブとその代謝物の化学シフトの差が大きく、かつ、代謝後もT1の長い炭素核を¹³C標識する点など、これまでの動的核偏極法での研究経験を分子設計に取り入れ高感度化を図った。実用性評価では、既知の遺伝子変異を持つ癌細胞で小動物内に腫瘍を作り、本来起こるべき代謝反応の変化・欠損を指標に超偏極¹³C MRIによる遺伝子変異イメージングの実用性を検証した。MRI装置は、これまでの高磁場MRIに加え、臨床機により近い1.5Tの動物用1H/¹³C MRIシステムも自作し、実用性評価に使用した。

4. 研究成果

(1) 水素化触媒の検討

様々な白金系の不均一触媒を比較検討したが、均一系の触媒に比べ誘導される1Hの偏極率は低く、数%に留まった。偏極率が低い原因は、触媒表面で水素分子が切断され単原子として渡されるため、パラ水素の量子状態が失われると考えられた。粒子サイズを10nm以下にまで小さくすればパラ水素付加後の1H偏極率は改善されるが、この粒子サイズではフィルター濾過が困難となり、不均一系のメリットが実質無くなるため、不均一系の触媒開発は中断し、均一系触媒による¹³C偏極率の改善に方針を変更した。

(2) 最適な¹³C励起条件の検討と装置化

パラ水素誘起偏極型の¹³C励起装置の更なる偏極率の改善に取り組みながら、サイドアーム

型の ^{13}C ピルビン酸励起における加水分解プロセスと、励起過程で生じる夾雑物質のフィルター除去プロセスを実装し、1.5T の熱平衡状態に比べ ^{13}C MRI 信号が 4 万倍に励起された超偏極 ^{13}C ピルビン酸を生成できる装置を開発した。励起プロセスにおいては、 ^{13}C 標識代謝プローブ

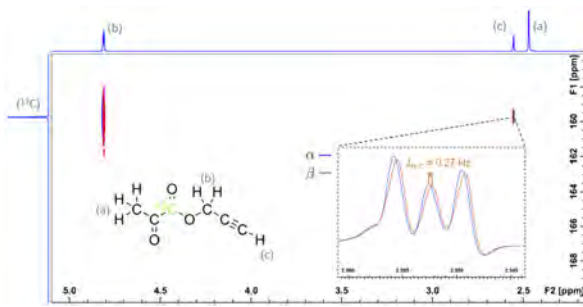


図1 sel-HSQMBC-TOCSYによる長距離J結合の決定

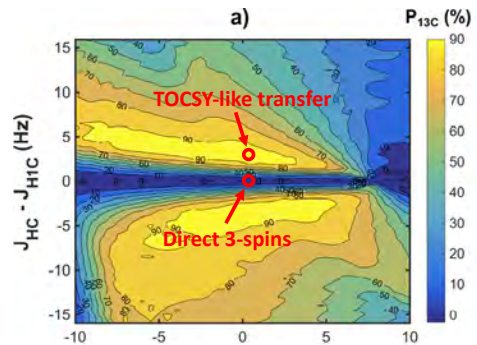


図2 分子のJ結合ネットワークに基づく量子化学計算から ^{13}C 超偏極率を推定

+腫瘍ホモジネート & 20mM NADH 胸腹部の *in vivo* ^{13}C MRS

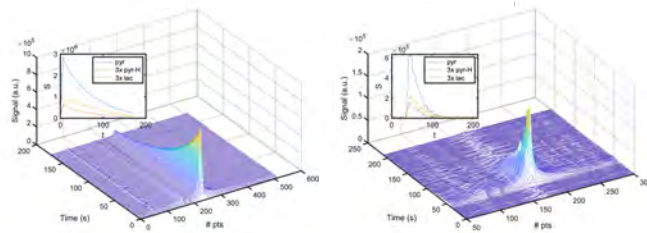


図3 PHIP-SAH法で励起した $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビンを用いた ^{13}C MRS 代謝計測

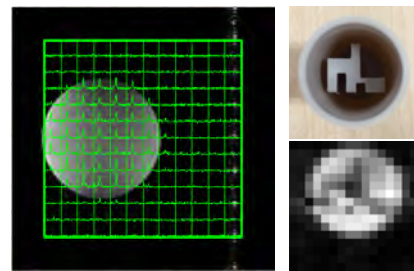


図4 パラ水素誘起偏極による $[1-^{13}\text{C}]$ ピルビン酸アリの超偏極 ^{13}C MRI 撮像

前駆体内の全ての核スピン間の磁気的な結合を高分解能 NMR により決定し、量子化学計算によりパラ水素付加により生じる超偏極 1H から ^{13}C 核への分極移動を最適化することで、最終的な ^{13}C 偏極率の大幅な改善を達成した。

(3) 疾患モデル動物における実用性評価

実用性評価としては、超偏極誘導した ^{13}C ピルビン酸を遺伝子変異が既知の複数の担がんモデルに投与し超偏極 ^{13}C MRI 撮像を行った結果、超偏極 ^{13}C 乳酸の生成速度は乳酸脱水素酵素の遺伝子発現量と高い相関性が見られたことから、代謝フラックス計測より生体内の遺伝子変異がある程度定量的に評価できることが示された。がん抑制遺伝子であるフマル酸脱水素酵素の変異を検出するための超偏極 ^{13}C フマル酸の励起条件も検討し、調整できる濃度は 5mM と低めながら 10 万倍以上の MRI 信号の励起を達成し、正常マウスにおいて代謝イメージングが取得できることを確認した。一方で、代謝 MRI の高速撮像シーケンス開発にも取り組み、深層学習とテンソル分解を組み合わせた画像再構成法や圧縮センシング画像再構成法により、画質を維持したまま、代謝イメージの 1 枚当たり撮像時間が 5 分の 1 に短縮され、より高い時間分解能で遺伝子発現の変容に伴う代謝フラックの変化を追跡する技術開発に成功した。また、米国立がん研究所との共同研究の中で、イソクエン酸脱水素酵素の遺伝子変異を検出する新規の ^{13}C 標識代謝プローブも開発し、特許申請の準備を進めている。

これらの研究成果は、国際磁気共鳴医学会 ISMRM2019 (モントリオール、カナダ) を始め、複数の国内外の学会で発表し、現在までに 4 報の査読のある学術雑誌に発表した。

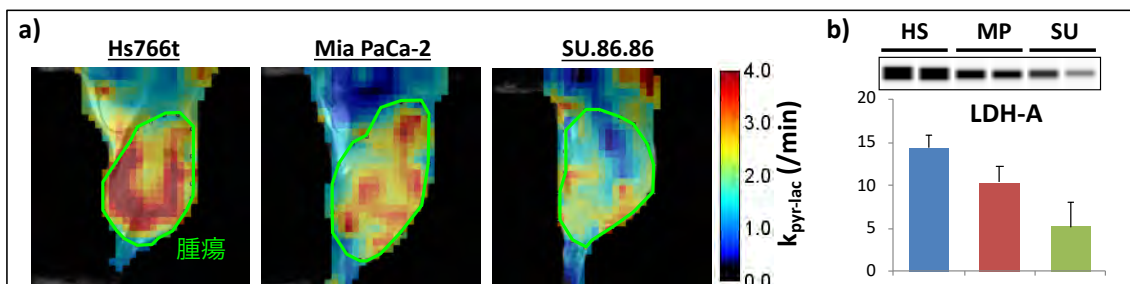


図5 遺伝子発現イメージングの定量性評価 治療応答性の異なる 3 種のヒト由来膵管癌モデルにおいて、超偏極 ^{13}C MRI から求めた *ldh-A* 遺伝子の発現レベル (a) は、免疫プロットの結果 (b) と一致することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Stewart NJ, Kumeta H, Tomohiro M, Hashimoto T, Hatae N, Matsumoto S.	4. 巻 296
2. 論文標題 Long-range heteronuclear J-coupling constants in esters: Implications for ¹³ C metabolic MRI by side-arm parahydrogen-induced polarization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 85-92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmr.2018.08.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saito Keita, Sail Deepak, Yamamoto Kazutoshi, Matsumoto Shingo, Blackman Burchelle, Kishimoto Shun, Brender Jeffrey R., Swenson Rolf E., Mitchell James B., Krishna Murali C.	4. 巻 131
2. 論文標題 Synthesis and evaluation of ¹³ C-labeled 5-5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide aimed at in vivo detection of reactive oxygen species using hyperpolarized ¹³ C-MRI	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 18-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tarasenko Tatyana N., Jestin Maxim, Matsumoto Shingo, Saito Keita, Hwang Sean, Gavrilova Oksana, Trivedi Niraj, Zervas Patricia M., Barca Emanuele, DiMauro Salvatore, Senac Julien, Venditti Charles P., Cherukuri Murali, McGuire Peter J.	4. 巻 97
2. 論文標題 Macrophage derived TNF promotes hepatic reprogramming to Warburg-like metabolism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1231-1243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00109-019-01786-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Stewart Neil J., Matsumoto Shingo	4. 巻 -
2. 論文標題 Biomedical Applications of the Dynamic Nuclear Polarization and Parahydrogen Induced Polarization Techniques for Hyperpolarized ¹³ C MR Imaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance in Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2463/mrms.rev.2019-0094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shingo Matsumoto, Neil J. Stewart, Yuka Fukue, Hiroshi Hirata
2. 発表標題 Parahydrogen induced hyperpolarization of [1-13C] pyruvate for metabolic imaging in cancer research.
3. 学会等名 ISMRM 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻野正之介、Neil J. Stewart、平田拓、松元慎吾
2. 発表標題 テンソル分解による超偏極13C代謝MRI画像からのノイズ除去法の検討
3. 学会等名 第14回 日本分子イメージング学会 総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅井秀斗、Neil J. Stewart、松元慎吾
2. 発表標題 深層学習を利用した超偏極13C MRIの高速撮像法の開発
3. 学会等名 第14回 日本分子イメージング学会 総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingo Matsumoto, Neil J. Stewart, Yuka Fukue, Hiroshi Hirata
2. 発表標題 Parahydrogen induced hyperpolarization of [1-13C] pyruvate for metabolic imaging in cancer research
3. 学会等名 ISMRM 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松元慎吾
2. 発表標題 DDSにおける核偏極MRI技術の可能性
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuto Sugai , Neil J Stewart , Shingo Matsumoto
2. 発表標題 Partial k space chemical shift imaging approach optimized for hyperpolarized 13C MRI
3. 学会等名 日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松元慎吾
2. 発表標題 磁気共鳴による酸素イメージングの癌治療への応用
3. 学会等名 第5回 低酸素研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 内尾佳貴、平田拓、松元慎吾
2. 発表標題 PHIP型の超偏極13C MRI代謝イメージングシステムの構築
3. 学会等名 第44回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中西沙由里、平田拓、松元慎吾
2. 発表標題 超偏極13C MRI代謝イメージングのためのパラ水素誘起分極(PHIP)型13C励起装置の開発
3. 学会等名 第44回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松元慎吾
2. 発表標題 核偏極の代謝イメージングへの応用
3. 学会等名 第72回日本物理学会年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----