

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02146

研究課題名(和文)電子スピン共鳴分光による悪性腫瘍の酸素及びpHの三次元イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of a method of 3D oxygen and pH mapping of tumors using electron spin resonance spectroscopy

研究代表者

平田 拓 (Hirata, Hiroshi)

北海道大学・情報科学研究院・教授

研究者番号：60250958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、腫瘍組織における酸素分圧 pO_2 および細胞外pHを定量的に可視化する先進的な計測手法・イメージング技術を構築することである。本研究では、電子スピン共鳴分光を用いて、酸素分圧 pO_2 とpHを三次元的に可視化するイメージング法を開発した。酸素およびpHを同時に測定可能な分子プローブの提供を受け、酸素分圧およびpHを同時に可視化するイメージング法の実現可能性を示すと共に、腫瘍組織へ投与した際の問題点を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の学術的意義は、悪性腫瘍に関する生物学的情報(酸素分圧とpH)を同時に可視化する技術を開発することにある。一般に、個別のイメージング技術で多種類の情報を同時に可視化することは困難であるが、複数の物理化学的環境に感受性を持つ分子プローブを用いることにより同時イメージングが可能になる。悪性腫瘍を多面的に可視化できるイメージング技術は、悪性腫瘍とその治療に関連する研究に貢献することができる。そのため、日本国内で死亡原因の一位である悪性腫瘍の研究に、イメージング技術の側面から貢献する点に本課題の社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop quantitative imaging techniques for the partial pressure of oxygen and extracellular pH for malignant tumors. In this study, electron spin resonance (ESR) spectroscopy was applied to the three-dimensional mapping of the partial pressure of oxygen and pH in solution samples. Using a molecular probe that can concurrently detect the partial pressure of oxygen and pH, we showed the feasibility of concurrent mapping the partial pressure of oxygen and pH in solution samples.

研究分野：計測工学

キーワード：電子スピン共鳴 分子プローブ 酸素分圧 pH イメージング

1. 研究開始当初の背景

我が国において悪性新生物(がん)で死亡する人の数は年々増加しており、日本人の2人に1人はがんに罹患し、3人に1人はがんで死亡する(悪性新生物による死亡37.3万人、死亡総数に占める割合28.5%、平成28年度人口動態統計、厚生労働省)。このような客観的な状況から、がんの診断と治療に関わる学術は、我が国のみならず世界的に極めて重要な分野であり、健康でありたいと願う社会的な要請に答えるための研究領域である。がんの基礎研究において、固形腫瘍の生物学的状況をより良く理解し、診断・治療に役立てるために、先端的なバイオイメージング技術が世界的に研究されている(X. Zhang & R. J. Gillies, J Nucl Med 51, 1167, 2010)。また、病院ではX線トモグラフィ(CT)、磁気共鳴イメージング(MRI)、ポジトロン断層法(PET)、超音波CTなど、多様なイメージング手法が診断のために日常的に使用されている。しかし、悪性腫瘍の生物学的なメカニズムに関係する機能的情報(例えば生体組織中の酸素輸送や細胞の代謝変化)の可視化手法は未だ限られており、新規な可視化技術の開発が世界的に進められている。特に、複数の機能的画像を得るマルチモーダルイメージングは、従来は見るできない多面的な情報が得られることから、バイオイメージング技術の今後進むべき方向と考えられている(例えば、M. I. Menzel et al., J Nucl Med 54, 1113, 2013)。

悪性腫瘍の顕著な特質として、(1)腫瘍組織の内部において酸素が十分に供給されず低酸素状態(ハイポキシア)となること、また、(2)がん細胞がグルコースを代謝してエネルギーを得る過程(解糖系)で乳酸が細胞外に排出されるなど、細胞外液が酸性に傾いた状態(アシドーシス)となること、が知られている(N. C. Denko, Nat Rev Cancer 8, 705, 2008)。この二つの特質の問題点は、がん治療の効果を低下させることにある。何れも、がん治療にとってネガティブな影響を持っており、長年、腫瘍内の低酸素状態やpHの低下を見たいという強い要求がある。そのため、生体組織の酸素分圧イメージングと細胞外pHの高精度イメージングを実現することは、計測工学のみならず、がん研究において極めて重要な課題と考えられている。全ては「視ること」から始まると言われており、酸素分圧や細胞外pHのイメージング技術の開発は、文字通り「視ること」に貢献する計測工学の課題である。

酸素やpHイメージングの応用面での重要性は、(i)抗がん剤や放射線照射において治療効果が期待される部分と期待できない部分を画像化できること、(ii)細胞レベルでの代謝変化を「見える化」することにより、抗がん剤や放射線照射への悪性腫瘍の応答を定量的に記録できること、である。酸素及びpHイメージングの三次元画像は、がんの基礎研究や新しい治療の研究に大きく貢献できる。いずれも、従来、病院で日常的に使用されているイメージング法では対応できない測定対象であり、新しい計測手法やイメージング技術の進展が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍組織における酸素分圧 pO_2 およびpHを定量的に可視化する先端的な計測手法・イメージング技術を構築することである。本研究課題では、計測手法としてESR分光を用いて、腫瘍組織の酸素分圧 pO_2 と細胞外pHを三次元的に可視化するイメージング法を開発する。

3. 研究の方法

二つのサブプロジェクトを実施し、研究課題の目標達成を目指した。

サブプロジェクト1: ESRスペクトルから酸素分圧とpHを得るモデルと計算法の開発
分子プローブpITAMについて、酸素分圧とpHをパラメータとしてESRスペクトル線形を定式化し、測定されたESRスペクトルから酸素分圧とpHを計測できることを示した。校正データは研究代表者らが開発した750 MHz CW-ESR分光イメージング装置を用いて取得した。

サブプロジェクト2: 腫瘍内での分子プローブESRスペクトルの寿命と輸送特性の解明
マウスの後肢に作製した腫瘍に直接pITAMプローブを投与した際、どれくらいの時間、ESRスペクトルが観測されるのか明らかにした。

4. 研究成果

(1) ESRスペクトルから酸素分圧とpHを得るモデルと計算法の開発

四次元スペクトル空間イメージング法を用いて、各ボクセルにおけるスペクトル情報をコンピュータ上に再構成し、そのスペクトル線形より酸素分圧およびpHを推定する計算コードを開発した。酸素分圧によるスペクトル線幅の広がりへの影響は、 $0.049 \mu T/mmHg$ であった。また、pHによるスペクトル線形の変化についても校正曲線を作成した。四次元スペクトル空間イメージ

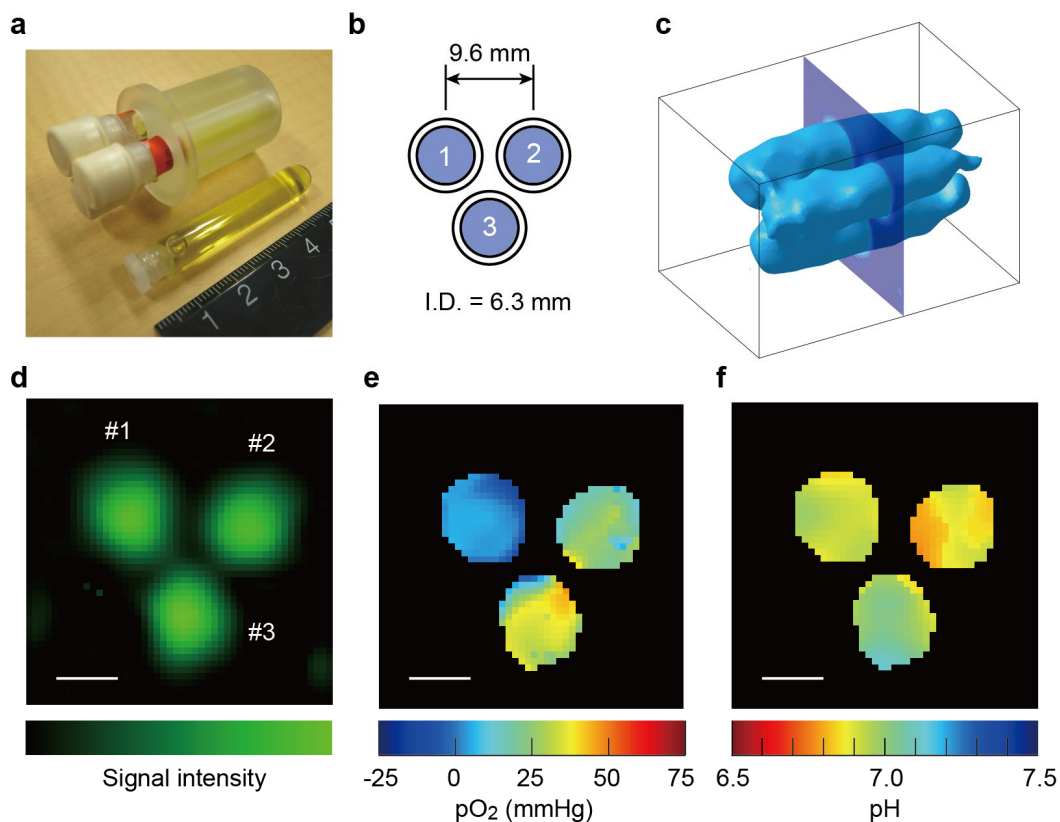


図1 水溶液試料の酸素分圧、pH 同時イメージングの一例 (a) 水溶液サンプルの写真、(b) 試料の断面図、(c) ESR 信号強度のサーフェスレンダリング画像、(d) 信号強度、(e) 酸素分圧、(f) pH のスライス画像。パネル(d-f)のスケールバーは 5 mm。

ングの MATLAB 画像再構成コードに、線幅の広がり（酸素分圧）とプロトン化/脱プロトン化の二つの状態（pH）水素交換率を考慮したスペクトルフィッティングの機能を追加した。この拡張により、p1TAM の ESR スペクトルから酸素分圧、pH、無機リン酸濃度の計測が実現した。このスペクトルフィッティングのコードについては、米国ウエストバージニア大学の V. V. Khrantsov 教授の研究グループに協力していただいた。

酸素分圧と pH の同時イメージングの実現可能性を示すために、水溶液試料による三次元酸素分圧および pH の同時イメージングを行なった。図 1 に水溶液イメージング実験に用いた試料と、サーフェスレンダリング画像、酸素分圧、pH のスライス画像を示す (A. Taguchi et al., Analyst 145, 3236-3244, 2020 より転載)。

悪性腫瘍において酸素分圧と pH を同時に可視化し、互いの関係を明らかにすることは非常に興味深い。そのため、水溶液試料においても同様の情報提示が可能であることを示した。図 2 にボクセル毎の酸素分圧と pH を二次元のヒストグラムまとめた結果を示す。図 1 に示すイメージングのデータからヒストグラムを作成した (A. Taguchi et al., Analyst 145, 3236-3244, 2020 より転載)。

図 2 の二次元のヒストグラムにおいて、三つの水溶液試料が別々の位置にマッピングされている。理想的には、二次元ヒストグラムの三つの位置において小さい点状になることが望ましいが、酸素分圧および pH の計測精度に起因するバラツキがあるため、ヒストグラムの山が広がりを持っている。3つの水溶液試料のうちで最も小さい pH の計測データの標準偏差は 0.05pH 単位、酸素分圧の標準偏差は 7 mmHg であった。これらのバラツキの低減が求められる。

図 1 および図 2 に示した結果は、計測時間が 7.5 分、積算 1 回のデータ取得により求めたものである。ESR スペクトルの信号対雑音比を改善すれば、計測のバラツキは低減されると考えられる。そのため、信号対雑音比を改善するために積算を 4 回とすると、酸素分圧の標準偏差は 5 mmHg、pH の標準偏差は 0.01 pH 単位と改善した。この結果から、ESR スペクトルの検出感度の向上が、最終的なイメージング結果の精度向上に寄与することが分かる。

(2) 腫瘍内での分子プローブ ESR スペクトルの寿命と輸送特性の解明

同時イメージングに用いる p1TAM プローブを静脈へ投与すると、血液中のタンパク質と結合して分子の運動が束縛される。そのため、ESR スペクトルの線幅が広がり信号強度が低下する。この課題を解決するために、腫瘍組織に直接 p1TAM プローブを投与する方法がある (A. A. Gorodetskii et al., Sci Rep 9, 12093, 2019)。腫瘍組織に直接 p1TAM プローブを投与した際のスペクトル取得について実験を行なった。BALB/c-*nu/nu* マウス右後肢の皮下にヒト由来膵管がん細胞 MIA PaCa-2 (ATCC より入手) を移植し、腫瘍が成長するのを待った。腫瘍サイズが約 1 cm³ 程度になったところで、プローブを直接投与し ESR 計測を行なった (北海道大学動物実験承認番号 20-0118)。

腫瘍組織への直接投与に先立ち、p1TAM プローブの濃度がスペクトル線幅に与える影響を確認した。(1)で示した水溶液のイメージング実験では、プローブ濃度は 0.2 mmol/L と低濃度の状態であり、プローブ濃度がスペクトル線幅に影響を与えない領域で測定が行われている。先行研究で報告されている腫瘍組織への直接投与では、数 mmol/L 程度の濃度のプローブ溶液が用いられており、スペクトル線幅(酸素分圧の測定)への影響が見られる領域である。水溶液中の溶存酸素を取り除いて酸素分圧のスペクトル線幅への影響を排除し、スペクトル線幅のプローブ濃度依存性を測定した。その結果、1.38 μ T/(mmol/L)の依存性が認められた。腫瘍組織に直接プローブ溶液を投与する際には、投与するプローブ濃度の影響を考慮して酸素分圧の測定を行う必要がある。また、プローブ溶液の pH を正常な血液の pH (7.4) に調整した。

腫瘍組織の約 10% の体積に相当する 0.1 mL のプローブ溶液 (濃度 5 mmol/L) を投与し、ESR スペクトルを取得した。麻酔下のマウスの腫瘍内に、複数箇所へプローブ溶液を注入した。10 分以上の連続計測においても信号は消失せず、腫瘍内に溶液がとどまっていることが推測された。この実験では、ESR スペクトルの信号対雑音比が低かったため、十分精度の高い計測が行えなかった。スペクトルの信号対雑音比を向上させるために、スペクトルを 5000 回積算した (図 3)。その結果、スペクトル情報からは、酸素分圧 47 mmHg、pH 7.4 の情報が得られた。悪性の腫瘍組織では低酸素状態を示すことが知られているため、この酸素分圧 (47 mmHg) は実際の腫瘍組織の酸素分圧よりも高い値であると思われる。また、pH 感受性ラジカルプローブ dR-SG による同じ腫瘍モデルの細胞外 pH イメージングの結果では、細胞外 pH が 7.0 と得られていることから、本実験の結果は、投与したプローブ溶液が拡散せず、そのまま腫瘍組織内に止まっていることを示唆している。なぜなら、プローブ溶液が腫瘍組織に完全に拡散し、細胞外 pH の値を正確に反映するならば、pH 7.0 程度の値を示すと予想されるためである。

今回の研究期間内では実施できなかったが、腫瘍組織内のプローブ溶液の分布を ¹H-MRI により可視化し、腫瘍組織内で p1TAM 溶液がどのように拡散していくのかを知る必要がある。また、今回使用した p1TAM プローブは、アルブミンなどのタンパク質と結合する性質があるため、静脈投与には適用できない。そのため、タンパク質との結合が少ないプローブが求められる。そのような改良された分子プローブは米国ウエストバージニア大学のグループから報告されていることから、今後、新しい分子プローブを用いて腫瘍組織の同時イメージングが実現すると予想される。その際には、本研究課題で開発したイメージング技術を適用することができるため、腫瘍組織の酸素分圧、pH の同時イメージングに本課題の成果を適用することができる。

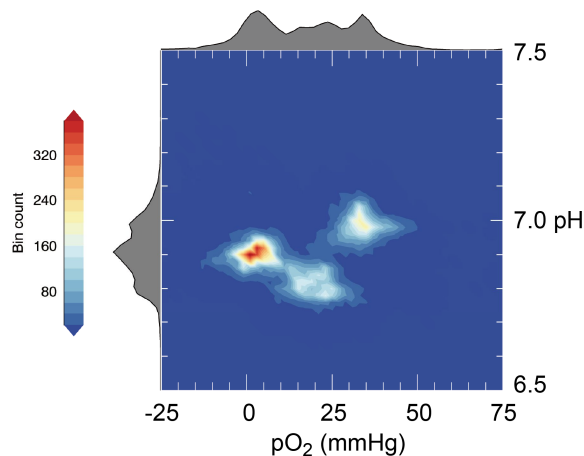


図 2 水溶液試料の酸素分圧 pO₂ と pH の二次元ヒストグラム (三本の水溶液はそれぞれ pO₂ 0, 19, 38 mmHg、pH 6.84, 6.77, 6.95 に調製されている)。

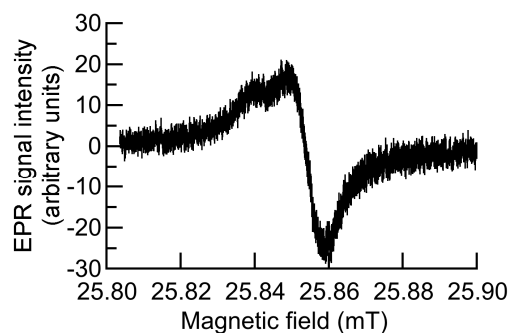


図 3 腫瘍に直接投与した p1TAM プローブの電子スピン共鳴スペクトル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 K. Kimura, N. Iguchi, H. Nakano, H. Yasui, S. Matsumoto, O. Inanami, H. Hirata	4. 巻 36
2. 論文標題 Redox-sensitive mapping of a mouse tumor model using spares projection sampling of electron paramagnetic resonance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants and Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 57-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ars.2021.0003	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 A. Taguchi, S. DeVience, B. Driesschaert, V. V. Khramtsov, H. Hirata	4. 巻 145
2. 論文標題 In vitro simultaneous mapping of the partial pressure of oxygen, pH and inorganic phosphate using electron paramagnetic resonance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 3236-3244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0an00168f	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 R. Nakaoka, H. Hirata	4. 巻 9
2. 論文標題 Noise characteristics of a 750-MHz electronically tunable resonator for electron paramagnetic resonance spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 75312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5099381	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 H. Hirata
2. 発表標題 Simultaneous mapping of the partial pressure of oxygen and pH using electron paramagnetic resonance
3. 学会等名 Modern Development of Magnetic Resonance 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Taguchi, S. DeVience, B. Driesschaert, V. V. Khramtsov, and H. Hirata
2. 発表標題 Simultaneous mapping of the partial pressure of oxygen, pH and inorganic phosphate using electron paramagnetic resonance
3. 学会等名 22nd International Society of Magnetic Resonance Conference (ISMAR) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Taguchi, S. DeVience, B. Driesschaert, V. V. Khramtsov, and H. Hirata
2. 発表標題 Simultaneous mapping of the partial pressure of oxygen, pH and inorganic phosphate using electron paramagnetic resonance: in vitro experiments.
3. 学会等名 International Society on Oxygen Transport to Tissue 2021 (ISOTT 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井口奈美、平田拓
2. 発表標題 プローブ濃度の影響を排除したCW-EPR酸素分圧計測法の開発
3. 学会等名 第59回電子スピンサイエンス学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A. Taguchi, S. DeVience, B. Driesschaert, V. V. Khramtsov, H. Hirata
2. 発表標題 Simultaneous measurement of pH and partial pressure of oxygen in solutions using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy: A feasibility study by 750 MHz EPR
3. 学会等名 The 47th Meeting of the International Society on Oxygen Transportation to Tissue (ISOTT) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口晃裕, S. DeVience, B. Driesschaert, V. V. Khrantsov, 平田拓
2. 発表標題 CW-EPRによるpO ₂ /pH同時イメージング法の開発
3. 学会等名 第58回電子スピンサイエンス学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中岡梨々子, 平田拓
2. 発表標題 EPR分光のための750MHzチューナブル共振器雑音特性の解明
3. 学会等名 第58回電子スピンサイエンス学会年会
4. 発表年 2019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
研究分担者	稲波 修 (Inanami Osamu) (10193559)	北海道大学・獣医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	安井 博宣 (Yasui Hironobu) (10570228)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	松元 慎吾 (Matsumoto Shingo) (90741041)	北海道大学・情報科学研究院・准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------