

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成24年 5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659586

研究課題名（和文） 多重共鳴磁気共鳴画像法の開発

研究課題名（英文） Development of the multiresonance magnetic resonance imaging technique

研究代表者

朽尾 豪人 (TOCHIO HIDEHITO)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70336593

研究成果の概要（和文）：蛋白質の構造解析に用いられる多重共鳴 NMR の原理を磁気共鳴イメージング (MRI) に応用すれば分子選択性の高い分子イメージングが可能になると考えられる。本研究では、少なくとも水溶液試料では三重共鳴 MRI が可能であることを実証した。また、 ^{13}C ポリマーを分子プローブとし、これを $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴 MRI で検出することにより、マウスモデルにおいても高感度な分子イメージングが可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：Multiple-resonance NMR is routinely employed in structure analysis of proteins. In this study, application of the multiple-resonance principle to Magnetic Resonance Imaging (MRI) was examined. As a result, triple-resonance MRI has been demonstrated to be feasible at least on aqueous solution sample. In addition, a series of ^{13}C polymers have been shown to be an excellent molecular probe for $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\}$ double resonance MRI in tumor-bearing mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：MRI、NMR、多重共鳴 NMR

1. 研究開始当初の背景

(1) 核磁気共鳴法 (NMR) は、化学・生物学分野において、化合物の同定や蛋白質の立体構造解析に広く用いられている。一方、NMR に使用される数百メガヘルツ帯の電磁波は、生体に対する透過性が高いうえに、侵襲性も低いため、生体計測にも適しており、磁気共鳴イメージング法 (MRI) として、臨床診断にも広く用いられている。

(2) 過去 20 年間で NMR 技術は大きく発展した。特に、蛋白質の構造生物学分野での技術革新が著しく、安定同位体、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N による標識と異種核多重共鳴と呼ばれる技術を用いた多次元 NMR 法の開発により、現在では、NMR 情報に基づいて、水溶液中の蛋白質の立体構造を原子分解能で決定できるようになっており、溶液 NMR 法は、X

線結晶構造解析法と共に、構造生物学的の一翼を担っている。

2. 研究の目的

多重共鳴 NMR 法は蛋白質の構造解析にのみ利用されており、MRI の分野では活用されていない。しかし、多重共鳴法の持つ「化学構造選択的検出能」を MRI に応用すれば、従来よりも遙かに高い分子選択性を備えた分子イメージングが実現できると考えられる。このアイデアを検証することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 多重共鳴 NMR 法の特長の一つは、蛋白質のような複雑な高分子でも、一つ一つの原子核の発する NMR 信号をほぼ完全に分離して観察することを可能にする点である。こ

れを応用すると、例えば、多種多様な分子の混合物中から、特定のパターンで ^{13}C 或いは ^{15}N 標識された分子の NMR 信号のみを選択的に観測できる。仮に、 ^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ - ^{12}CO と ^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ - ^{13}CO のパターンの並びの化学構造を含む 2 種類の分子があるとする。通常の ^1H -NMR や、 ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴法では両者の ^1H の NMR シグナルが観測される。しかし、 ^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ - ^{13}CO という化学構造のみを検出するような三重共鳴 NMR 法を適用すると、後者の分子のみが NMR シグナルを与え、前者は観測されない。そこで、生体内で観察したい分子のみを ^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ - ^{13}CO のパターンで標識しておいてやれば、生体内のような多成分混合物中であっても、狙った分子の NMR 信号のみを取得できると期待される。加えて、その NMR 信号を用いて MRI 画像の構築をおこなえば、当該分子の生体内局在を MRI で可視化することができる。なお、単に ^{13}C で標識した化合物を ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ 二重共鳴法で観測しただけでも、分子選択的な観測はある程度実現できる。しかしながら、天然に存在する炭素の約 1%は ^{13}C であるため、生体内に大量に存在する炭素化合物分子が、 ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ の二重共鳴スペクトル中に無視できない強度の NMR シグナルを与え、必然的にバックグラウンドノイズが大きくなる。このため、観測対象分子の生体内濃度がある程度高い必要がある。一方、天然では ^{12}C と ^{13}C が隣り合う確率は 10000 分の 1 程度であることから、先の三重共鳴では、天然由来 ^{13}C のバックグラウンドノイズを大幅に低減することができるという特長がある。

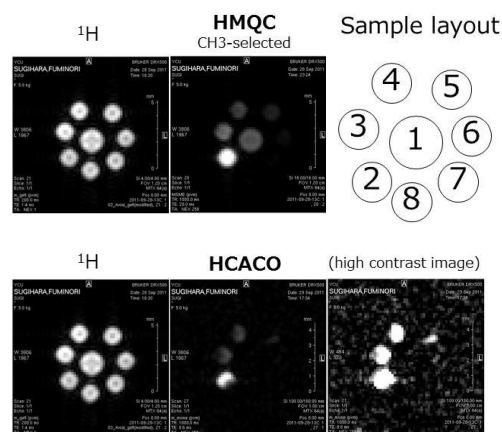
(2) NMR と MRI は同一原理に基づいているが、測定装置のハードウェア (分光計、RF コイル等) のスペックや構成には大きな違いがある。例えば、蛋白質 NMR では、 ^{13}C や ^{15}N 核を利用することは必須であり、しかもこれらの核と ^1H に対して同時に電磁波パルス照射する必要がある、そのように最適化されている。一方 MRI では、 ^{13}C や ^{15}N 核を利用した測定は極めて稀である。さらに、MRI でこれらの核を利用する場合も、通常は直接観測が行われるため、 ^1H と同時に電磁波パルスを照射することは想定されていない。加えて、多重共鳴 NMR では ^1H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 核間で「コヒーレンス」を生成させたり、移動させたりするためのパルス照射が頻繁に繰り返される。その正確な操作のためには、複雑なパルス系列を正確なパルス幅 (例えば、90 度パルスの長さ) 及び電磁波強度で照射する必要がある。これらが、厳密にコントロールされていなければ大きな感度ロスに繋がる。

(3) 以上のことに鑑み、まずは、蛋白質構造解析のための多重共鳴 NMR 法がセットアップされている高分解能溶液 NMR 装置を用いて、二重共鳴及び三重共鳴 MRI が可能かどうかを検証する。溶液用高分解能装置で多重共鳴 MRI が可能であることが示されれば、引き続き、Bruker Biospin 社製の小動物用の MRI 装置 (BioSpec) を利用して、MRI 測定用のプログラムを作成し、測定手法を立ち上げる。最終的には、マウスを対象として多重共鳴 MRI を行う。

4. 研究成果

(1) H-C-C 三重共鳴 MRI

① 高分解能溶液 NMR 専用装置 (Bruker DRX500) を使い、 ^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ - ^{13}CO の三重共鳴 MRI を試みた。本装置における MRI 測定や画像処理には同じく Bruker 社製の MRI 測定・解析ソフトウェア Paravision を用いた。まず、蛋白質主鎖の化学シフト帰属用の三重共鳴測定の一つである HCACO のパルスシーケンスを変更し、MRI で用いられる位相エンコード等を組み込んだパルスプログラムを作成した。このパルスシーケンスを用いて、 ^{13}C 標識アラニンの水溶液を測定した。その結果、良好な HCACO-MRI 画像を得ることに成功した (下図)。三重共鳴である HCACO-MRI は、 ^1H - $^{13}\text{C}\alpha$ - ^{13}CO の構造を持つ均一 ^{13}C 標識アラニンの水溶液を画像化するが、予想通り、2,3 位- ^{13}C -標識アラニンでは、画像を与えなかった。これはカルボニル炭素が ^{12}C であるためである。



Sample 1: 30 mg/ml of 2,3 ^{13}C -labeled alanine

Sample 2-8: 60, 30, 15, 8, 4, 2, 1 mg/ml Uniformly ^{13}C -labeled alanine

②担癌マウスを使った実験も行った。まず、癌を体側に移植したマウスに、 ^{13}C グルコースを尾静脈注射した。腫瘍細胞中ではグルコースは主として乳酸へと代謝されるため、腫瘍部位では ^{13}C 乳酸が産生される。腫瘍部位を切除・摘出し NMR 試料管 (直径 5 mm) に入れて高分解能溶液用の装置で、 ^{13}C 乳酸選択的な HCACO 三重共鳴 MRI を行った。その結果、信号は弱いながらも乳酸の分布を画像化することに成功した。

③ Bruker 社製の小動物用の MRI 装置 (Biospec、7 テスラ) にて HCACO 三重共鳴をセットアップした。DRX500 用に作成したパルスプログラムを、動物用 MRI 装置に移植し、 ^{13}C 標識アラニン水溶液を用いて検討した。その結果、良好な一次元の三重共鳴 HCACO スペクトルの取得に成功した。スペクトルのシグナル対ノイズ比から考えて、少なくともファントムでの画像化は可能であると予想される。

(2) ^1H - ^{13}C 二重共鳴 MRI

① 二重共鳴法の 1 つである、 ^1H - ^{13}C HMQC-MRI 法は 1990 年代に報告されている手法である。これは、三重共鳴法ほど分子選択性は高くないが、検出感度は高い。従来、この手法や、 ^{13}C を直接観測する ^{13}C -MRI は、 ^{13}C グルコースなどの ^{13}C 標識低分子をヒトや動物に投与して、その代謝産物を解析するような研究に利用されてきた。筆者らは、この ^{13}C を利用した MRI 計測法を活用すべく、新たな ^{13}C 標識分子プローブの開発を行った。腫瘍部位に集積することが既に知られている合成高分子を ^{13}C で均一標識し、これを担癌マウスに注射し、 ^1H - ^{13}C HMQC-MRI によって撮像した。その結果、腫瘍部位への分子プローブの集積を画像化することに成功した。

(3) まとめ

① 高分解能溶液 NMR 装置を使い、三重共鳴 MRI が可能であるということを実証できた。三重共鳴 MRI に関しては、研究期間内に生きたマウスでの画像化には到達できなかったが、ハードウェアや用途の大きく異なる動物実験用の MRI 装置でも三重共鳴 NMR が可能であることを示すことができた。

② ^1H - ^{13}C を使った二重共鳴 MRI のための新規な分子プローブを開発できたことも大きな成果である。ここで開発した高分子ポリマーを抗体に繋ぐことによって、当該ポリマーを特定の細胞集団にターゲティングする

ことができる。こうすることにより、特定の病巣に ^{13}C ポリマーを特異的に集積させることが可能となり、これを MRI で可視化できる。将来的には、癌等の早期診断、病巣部位の特定に応用できる可能性がある。

③ 本研究によって、蛋白質の構造解析で培われた NMR 技術を MRI に移植する際の様々なノウハウを蓄積することができた。今回行った HCACO や HMQC の他にも、蛋白質 NMR の分野には生体分子の構造や物性の情報を獲得するための膨大な種類の測定法がある。これら豊富な知的資源を *in vivo* NMR や MRI に適用すれば、前例のない *in vivo* 計測法・画像化法が開発できると予想される。

④ 今後、引き続きマウスでの HCACO-MRI の実現に向けて研究を進める予定である。加えて、二重共鳴 MRI を有効活用するための新規分子プローブの設計・合成を進める。

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 3 件)

- ① Yamada H, Mizusawa K, Igarashi R, Tochio H, Shirakawa M, Tabata Y, Kimura Y, Kondo T, Aoyama Y, Sando S., Substrate/Product-targeted NMR monitoring of pyrimidine catabolism and its inhibition by a clinical drug. *ACS Chem Biol*, 7 巻, pp.535-42(2012) 査読有
- ② 柘尾豪人、白川昌宏、磁気共鳴を使った真核細胞内タンパク質の構造・機能解析、薬学雑誌、132 巻、pp.185-193(2012)、査読無
- ③ Sekiyama N, Jee J, Isogai S, Akagi K, Huang TH, Ariyoshi M, Tochio H, Shirakawa M., NMR analysis of Lys63-linked polyubiquitin recognition by the tandem ubiquitin-interacting motifs of Rap80., *J Biomol NMR*, 52 巻, pp. 339-350(2012) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 柘尾豪人、Magnetic resonance methods for analyses of structure and dynamics of intracellular proteins and cells. 第 49 回生物物理学会年会、2011 年 9 月 16-18 日、姫路
- ② 柘尾豪人、Analysis of proteins inside human cultured cells by NMR.、The 4th Asia Pacific NMR symposium, 2011 年 10 月 16-18 日、Beijing、中国

〔図書〕（計 1 件）

- ① 朽尾豪人、白川昌宏、「蛍光イメージング/MRI プローブの開発」（シーエムシー出版）、第 12 章 核磁気共鳴を利用した生体計測、pp.104-113、2011

〔産業財産権〕

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朽尾 豪人 (TOCHIO HIDEHITO)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70336593