

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2019

課題番号：15H03006

研究課題名（和文）完全偏極を指向した超偏極希ガスMRIによる革新的肺機能診断システムの開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of an innovative pulmonary functional diagnostic system using hyperpolarized noble gas MRI aiming at complete polarization

研究代表者

木村 敦臣（Kimura, Atsuomi）

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：70303972

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：独自の連続フロー型超偏極キセノン（HPXe）製造装置をもとに、新たに開発した高出力・狭帯域レーザーを導入することで、XeのMRI感度を飛躍的に向上することに成功し、最高偏極率84%を達成した。これに基づいて、他に類を見ない小動物用HPXe MRI 肺機能診断システムを構築した。このシステムを利用して慢性閉塞性肺疾患や肺線維症など難治性肺疾患に対する前臨床評価を遂行し、新薬シードとしてピルビン酸エチル（EP）を見出した。さらにEPの作用機序を調査し、NF-κBの阻害を通じて傷害関連分子パターンであるHMGB1の発現を下方制御する事で、傷害組織の修復および肺機能の改善を示すことを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

準完全偏極Xe-MRIは肺機能診断の進展に大きく貢献するばかりでなく、慢性閉塞性肺疾患（COPD）や肺線維症など難治性肺疾患の新たな薬物治療戦略の確立に資する。これまで、これらの疾患では有効な薬物の開発が困難であったが、これは肺機能評価系の構築が難しかったことによる。これに対して、呼吸によって肺に取り込まれた超偏極Xe の特徴的な動態を解析する事でユニークな肺機能評価法を提供できた。また、本手法が肺疾患の前臨床評価に有効である事を実証し、新薬シードとしてピルビン酸エチルを見出した。本研究によって、診断の高精度化および新たな治療法の開発を図るうえで意義深い成果を残すことができた。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in improving the MRI sensitivity of Xe by introducing a newly developed high-power, narrow-band laser to our home-built continuous-flow type apparatus for producing hyperpolarized xenon (HPXe), which achieved a maximum polarization level of 84%. Based on this apparatus, a unique HPXe MRI pulmonary functional diagnostic system for small animals was constructed. Using this system, we performed preclinical evaluation for refractory lung diseases such as chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary fibrosis, and found ethyl pyruvate (EP) as a novel drug candidate. Furthermore, the mechanism of EP efficacy was investigated and suggested to be associated with down-regulating the expression of HMGB1, which is one of damage-associated molecular patterns, through inhibition of NF-κB, leading to wound healing of alveolar tissue and improvement of lung function.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：完全偏極キセノン 肺機能診断 難治性肺疾患 新薬探索 ピルビン酸エチル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

キセノン等希ガスの感度を飛躍的に向上する超偏極 (Hyperpolarized) MRI が基礎的発展を遂げ、臨床応用が視野に入ると同時に創薬を目指した前臨床評価にも導入可能となりつつある。このような状況に対して、申請者は独自の超偏極キセノン (HPXe) 生成技術の開発および改良に注力してきた。この過程で「光ポンピング法にて偏極操作を行う際、低圧条件(0.15 気圧)下で消光剤である窒素を混合することでインビボでの偏極率を 10%程度 (理論値は 100%)、即ち感度にして約 1 万倍にも向上できる」という事実を発見し、これに基づいて簡便な連続フロー型 HPXe 製造装置を開発することに成功した。現在、HPXe を約 2L/時間の容量で連続的に生成でき、世界でもトップレベルの製造技術を確立するとともに、他に類を見ない HPXe MRI による肺機能診断システムと前臨床評価系を構築することに成功した。

一方、欧米では 100%の偏極率、即ち 10 万倍の感度向上を目指した装置開発の取り組みが始まっている。ここでは、光ポンピング法で使用するレーザー光の高出力・狭帯域化が偏極率向上に有効である事が明らかとされた。したがって、申請者の開発した HPXe MRI 肺機能診断システムに高出力・狭帯域レーザーを導入することで、偏極率 100%、即ち完全偏極 Xe MRI を実現することも不可能ではない。

### 2. 研究の目的

世界的に先駆けて準完全偏極 Xe MRI による革新的肺機能診断システムの構築を企図し、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) をはじめとする難治性肺疾患の前臨床評価に導入する。また、並行して新たな治療薬探索を行うが、新薬シードとして傷害関連分子パターン分子 HMGB1 の阻害剤であるピルビン酸エチル(EP)を取り上げる。HMGB1 は炎症関連疾患や癌の増悪に関与する一方で、活性を調節すると逆説的に組織修復作用を示すことが分かり、新たな治療標的として注目を集めつつある。そこで、HMGB1 シグナルを下方制御する EP が種々の炎症を基盤とする難治性肺疾患に対して治療効果を示すことを、HPXe MRI 前臨床評価系を用いて実証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 完全偏極を目指した偏極率向上の取り組み

自作の連続フロー型超偏極希ガス製造装置に狭帯域・高出力レーザー(171W、ビーム幅 0.2nm)を導入し、HPXe を生成した。<sup>129</sup>Xe ガスにクエンチングガスとして N<sub>2</sub> ガスを混合させ、インビトロで Xe と N<sub>2</sub> の混合比を変えながら混合ガスの超偏極化を行い、その NMR スペクトルを取得し、HPXe の NMR 信号強度から偏極率を導出して比較した。Xe と N<sub>2</sub> の混合比は、Xe : N<sub>2</sub>=35 : 14、Xe : N<sub>2</sub>=4.5 : 94、Xe : N<sub>2</sub>=4.5 : 145、Xe : N<sub>2</sub>=1.35 : 134 (sccm)とした。偏極率導出に際して、熱平衡状態の Xe と O<sub>2</sub> の混合ガス (Xe : O<sub>2</sub>=50 : 50) の NMR スペクトルを測定し、この信号強度と比較することで、偏極率を算出した。

#### (2) 難治性肺病マウスモデルに対する HPXe MRI による前臨床評価

##### ① COPD マウスモデルの肺機能診断と EP の薬効評価

6 週齢の健全雄性 ddY マウス(N=13)に HPXe を自発呼吸下で吸入させながら MRI 撮像を行った。そのうち 8 匹のマウスに週 1 日のリポ多糖(LPS)の気管内投与と、週 5 日のたばこ煙(CS)全身暴露を 10 週間施し、COPD マウスモデルを作成した。これを病態群とし、5 匹をコントロール群とした。マウスモデル作成の過程で CS 暴露開始 2、6、8、10 週後に同様に MR 撮像を行い、肺機能の経時的変化を追った。また、同様の手順で作成したマウスモデル(N=9)に、CS 暴露開始 6 週後より週 5 日 EP を気管内投与し、EP の薬効評価を行った。肺機能の評価はガス交換能  $f_D$  [%] 及び、呼吸回数に依存した信号の回復曲線から取得した換気能  $r_a$  と、肺組織切片から平均肺胞径(MLI)を測定した。

##### ② 肺線維症マウスモデルの肺機能診断と EP の薬効評価

雄性 ddY マウスにブレオマイシン(BLM)を気管内投与して肺線維症を誘発 (3 週間) 後、病態群 (N=6)、EP 群 (N=6)、アログリブチン(ALG)群 (N=7) に対して生理食塩水、EP、ALG を 3 週間に渡って気管内投与した。EP 投与開始から 1 週毎にガス交換能  $f_D$  [%] 及び換気能  $r_a$  を肺機能指標として健全群 (N=5) と比較後、病理組織切片から肺胞壁厚を取得した。

##### ③ 肺癌マウスモデルの肺機能診断と EP の薬効評価

雄性 ddY マウス(8 週齢)を(i) 病態群(N=5):肺がん誘発のためウレタンを腹腔内投与、および(ii) EP 治療群(N=5)、(iii) EP 予防群(N=5)、(iv)健全群(n=5)の計 4 群に分類した。ウレタン投与後 1 ヶ月経過時点から 3 ヶ月間(ii)に対して EP を麻酔下にて気管内投与し治療群とした。一方、(iii)に対しては、ウレタン投与直前から 4 ヶ月間 EP を投与して予防群とした。(iv)に対しては、生理食塩水を投与した。全ての群に対してウレタン投与直前から 1 ヶ月ごとに HPXe MRI 肺機能診断を行った。肺機能評価の指標として  $f_D$  [%]を用いた。ウレタン投与後 5 ヶ月時にすべてのマウスを安楽死させ、肺を摘出しホルマリンで固定した。病態群と EP 治療群の肺にできた腫瘍数と最大腫瘍径を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 完全偏極を目指した偏極率向上の取り組み

超偏極状態における Xe と N<sub>2</sub> の混合比率と偏極率との関係を下図に示す。Xe : N<sub>2</sub> = 1.35 : 134 (Xe 比率 1%) のとき、最高偏極率 84% を達成することができた。

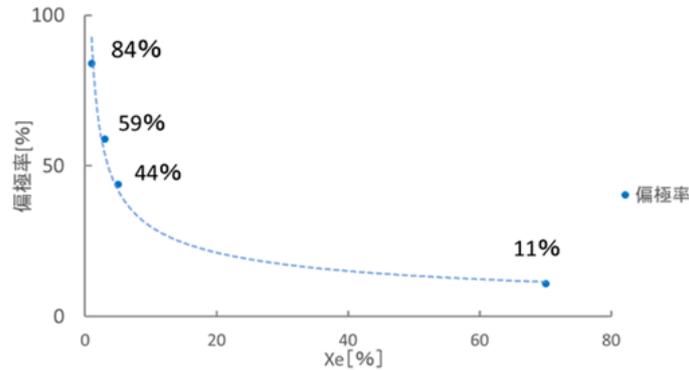


図1 偏極率と混合ガス組成との関係

##### (2) 難治性肺気腫マウスモデルに対する HPXe MRI による前臨床評価

###### ① COPD マウスモデルの肺機能診断と EP の薬効評価

HPXe MRI による肺機能評価において、CS 曝露開始 6 週時の測定で  $f_D$  および  $r_a$  ともにコントロール群と比較して病態群で有意に低下した。また、MLI による病理評価では、CS 群において肺胞の構造破壊がみられ、CS 曝露による COPD マウスモデル作成プロトコルの有効性を確認した。EP 群は、CS 曝露 6 週時で低下した  $f_D$  及び  $r_a$  が、EP 投与 2 週間後には両群ともにコントロール群と同程度まで回復した。また、MLI においても CS 群と比較して EP 群で有意な回復がみられ、EP の抗炎症および組織修復効果を確認した。

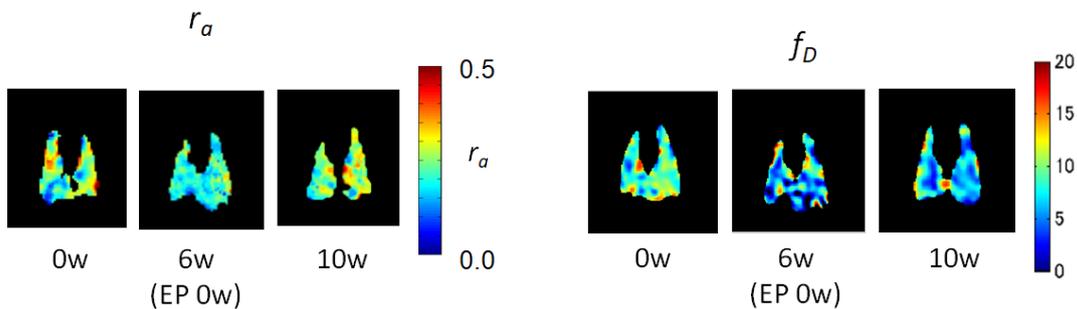


図2 肺機能画像の経時変化。(左図)  $r_a$  マップ、(右図)  $f_D$  マップ

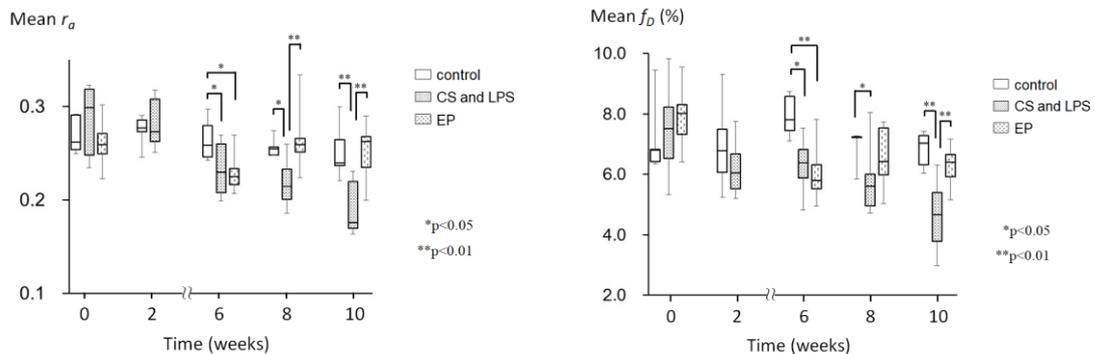


図3 換気能( $r_a$ )およびガス交換能( $f_D$ )の経時変化。(左図)換気能、(右図)ガス交換能

###### ② 肺線維症マウスモデルの肺機能診断と EP の薬効評価

EP を用いて HMGB1 シグナル伝達を下方制御することで BLM 誘発肺障害に伴う組織傷害が修復され、肺機能が改善された。また、この時、肺胞壁厚は、病態群と比較して EP 群で有意に低下した。これは、炎症関連因子 NF- $\kappa$ B の不活化と細胞外シグナル調節キナーゼ ERK1/2 の活性化が協奏的に作用したことを示唆する。一方、ALG によるシグナル制御は、NF- $\kappa$ B 不活化を

伴わないため組織修復作用は示さなかったと思われた。以上の結果から、BLM 誘発肺線維症に対する肺機能改善および組織修復機構として、NF- $\kappa$ B 不活化による HMGB1 シグナル伝達制御と ERK1/2 活性化の協奏的な関与が示唆され、HPXe MRI 前臨床評価系の実効性を確認した。

### ③肺癌マウスモデルの肺機能診断と EP の薬効評価

ウレタン投与後 1 ヶ月時において、(i)の  $f_D$  はウレタン投与が惹起した上皮過形成による肺胞壁肥厚のため健常群と比較して明らかな低値を示し、この低下は観察期間中継続した。これに対して、EP 治療群(ii)の  $f_D$  は治療開始後次第に増加し、ウレタン投与後 4 ヶ月時には健常群のガス交換能と比較して明らかな高値を示した。一方、EP 予防群(iii)のガス交換能はウレタン投与 1 ヶ月時に健常群と比較して有意な低値を示したものの、2 ヶ月時には 1 ヶ月時と比較して有意な高値を示し、肺機能が早期に回復したことが分かった。また、解剖の結果、EP 予防群の腫瘍数は、病態群と比較して 25%程度まで有意に減少し(3 個 vs. 11 個)、最大腫瘍径は病態群の 60%程度に有意に縮小した(2.2mm vs. 3.4mm)。さらに、EP 予防群の腫瘍数は EP 治療群と比較してより低値を示した(3 個 vs. 7 個)。以上のことから、EP は肺癌の予防的治療に有効であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukui E, Funaki S, Kimura K, Momozane T, Kimura A, Chijimatsu R, Kanzaki R, Kanou T, Ose N, Minami M, Miyagawa S, Sawa Y, Okumura M, Shintani Y.	4. 巻 2019
2. 論文標題 Adipose Tissue-Derived Stem Cells Have the Ability to Differentiate into Alveolar Epithelial Cells and Ameliorate Lung Injury Caused by Elastase-Induced Emphysema in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells Int.	6. 最初と最後の頁 5179172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/5179172.	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 Fujiwara H, Imai H, Kimura A.	4. 巻 35
2. 論文標題 Stability Enhancement of (129)Xe Hyperpolarizing System Using Alkali Metal Vapor in Spin-Exchange Optical Pumping Cell to Achieve High NMR Sensitivity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal Sci.	6. 最初と最後の頁 869-873.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.19P047.	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 Hodono S, Shimokawa A, Stewart NJ, Yamauchi Y, Nishimori R, Yamane M, Imai H, Fujiwara H, Kimura A.	4. 巻 17
2. 論文標題 Ethyl Pyruvate Improves Pulmonary Function in Mice with Bleomycin-induced Lung Injury as Monitored with Hyperpolarized 129Xe MR Imaging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Magn Reson Med Sci.	6. 最初と最後の頁 331-337.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2463/mrms	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 Kimura A, Yamauchi Y, Hodono S, Stewart NJ, Hosokawa O, Hagiwara Y, Imai H, Fujiwara H.	4. 巻 78
2. 論文標題 Treatment response of ethyl pyruvate in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease studied by hyperpolarized 129Xe MRI.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Magn Reson Med	6. 最初と最後の頁 721-729.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mrm.	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 Imai H, Yoshimura H, Kimura A, Fujiwara H.	4. 巻 7
2. 論文標題 Continuous flow production of concentrated hyperpolarized xenon gas from a dilute xenon gas mixture by buffer gas condensation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07695-7.	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 Hodono S, Imai H, Yamauchi Y, Kawamura A, Matsumoto H, Okumura S, Fujiwara H, Kimura A.	4. 巻 29
2. 論文標題 Hyperpolarized 129Xe MRI Using Isobutene as a New Quenching Gas	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 NMR Biomed	6. 最初と最後の頁 1414-1419.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/nbm.3585.	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 -

1. 著者名 Kimura A, Yamauchi Y, Hodono S, Stewart NJ, Hosokawa O, Hagiwara Y, Imai H, Fujiwara H.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Treatment response of ethyl pyruvate in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease studied by hyperpolarized 129Xe MRI.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Magn Reson Med	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrm.26458.	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 Imai H, Matsumoto H, Miyakoshi E, Okumura S, Fujiwara H, Kimura A.	4. 巻 28
2. 論文標題 Regional fractional ventilation mapping in spontaneously breathing mice using hyperpolarized 129Xe MRI.	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 NMR Biomed	6. 最初と最後の頁 24-29.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/nbm.	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 木村敦臣
2. 発表標題 Continuous-Flow Type Production of Hyperpolarized 129Xe and Its Application to Preclinical MRI
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akihiro Shimokawa, Shota Hodono, Neil J. Stewart, Hikari Ueda, Yuya Noda, Atsuomi Kimura
2. 発表標題 Evaluation of Drug Efficacy of Ethyl Pyruvate on the Emphysema in Mice by Means of Hyperpolarized 129Xe MRI
3. 学会等名 ICMRBS2016（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Atsuomi Kimura, Akihiro Shimokawa, Shota Hodono, Yu Ozaki, Naoto Miyazaki, Hirohiko Imai, Hideaki Fujiwara
2. 発表標題 Pulmonary Functional Imaging Using Quasi-Completely Hyperpolarized 129Xe MRI
3. 学会等名 ICMRBS2016（国際学会）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 下川晃弘
2. 発表標題 超偏極129Xe MRIを用いた肺がんモデルマウスの病態進行評価に対する試み
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 下川晃弘
2. 発表標題 超偏極129XeMRIを用いた肺気腫に対するピルビン酸エチルの薬効評価
3. 学会等名 第9回呼吸機能イメージング研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shota Hodono, Akihiro Shimkawa, Hideaki Fujiwara, Hirohiko Imai, Atsuomi Kimura.
2. 発表標題 Evaluation of Drug Efficacy of Ethyl Pyruvate on the Pulmonary fibrosis in mice with Hyperpolarized 129Xe MRI Pulmonary Functional Diagnosis
3. 学会等名 1st AOWPFI & 8th JSPFI (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Akihiro Shimkawa, Hironobu Matsumoto, Yukiko Yamauchi, Shota Hodono, Shintaro Okumura, Neil J Stewart, Hirohiko Imai, Hideaki Fujiwara, Atsuomi Kimura.
2. 発表標題 Relationship between Brain and Pulmonary Function Studied by Hyperpolarized 129Xe MRI/MRS
3. 学会等名 1st AOWPFI & 8th JSPFI (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 程野祥太
2. 発表標題 高沸点ガスをクエンチングガスとする超偏極129XeMRIの感度増強と肺線維症診断への応用
3. 学会等名 第43回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 下川晃弘
2. 発表標題 超偏極129XeMRI肺機能診断法によるピルビン酸エチルの薬効評価
3. 学会等名 第43回日本磁気共鳴医学会大会
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Imai H, Kimura A, Fujiwara H.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 15
3. 書名 Hyperpolarized and Inert Gas MRI in Research and Medicine	

1. 著者名 3)Hane F, Imai H, Kimura A, Fujiwara H, Rao M, Jim JM, Albert M.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 12
3. 書名 Hyperpolarized and Inert Gas MRI in Research and Medicine	

1. 著者名 Kimura A, Imai H, Fujiwara H	4. 発行年 2015年
2. 出版社 Cambridge: Royal Society of Chemistry	5. 総ページ数 483
3. 書名 Hyperpolarized Xenon-129 Magnetic Resonance	

〔産業財産権〕

[ その他 ]

<http://sahswww.med.osaka-u.ac.jp/~phy-chem/HP/menu1.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----