

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21218

研究課題名(和文) 超高感度化 NMR シグナルによるヘモグロビンの酸素飽和度の観測

研究課題名(英文) Monitoring of the hemoglobin oxygen saturation via the ultra-high sensitive NMR signals

研究代表者

高草木 洋一 (Takakusagi, Yoichi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 分子イメージング診断治療研究部・主任
研究員(任常)

研究者番号：60439916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：核磁気共鳴(画像)法(NMR/MRI)は、生体透過性に優れるラジオ波パルスをもちいた核スピンの励起/緩和を検出原理として、化合物の分子構造の決定や生体深部の非侵襲的撮像に応用されているが、その「感度の低さ」は本法の根本的かつ最大の弱点とされる。このような欠点を克服するため、近年、動的核偏極法(DNP)や化学交換飽和移動法(CEST)などの新たな撮像法が登場している。本研究では、DNPやCESTにより生体内における赤血球ヘモグロビンからの酸素分子の動態を高感度に検出可能な、新しい分子プローブの創製と応用計測を目的とする。

研究成果の概要(英文)：Nuclear magnetic resonance (imaging) (NMR/MRI) is a technique which uses a radio frequency pulse as a principle for the excitation/relaxation of nuclear spins, and widely used not only the determination of the molecular structure of compounds, but also the noninvasive imaging deep part of the body. However, "the low sensitivity" is a fundamental and the greatest drawback of this technique. To address these issues, new imaging methodologies, such as dynamic nuclear polarization (DNP) or chemical exchange saturation transfer (CEST), have recently been emerged. In the present study, generation and application of brand-new MR probes that allow in situ monitoring of the oxygen molecule release from hemoglobin with high sensitivity were conducted.

研究分野：生体医工学

キーワード：超偏極 NMR MRI CEST BOLD ヘモグロビン 酸素 がん

研究開始当初の背景

(1) MRI の特徴と現状

核磁気共鳴画像法 (MRI) は、基礎から臨床まで幅広く利用されている撮像技術であり、以下の特徴を有する。

1. 主に生体構成成分に豊富な ^1H をターゲットとして、生体深部の非侵襲的な撮像が可能
2. 対象に応じて造影剤 (ガドリニウム; Gd 等) を自在に投与し、画像強度の向上が可能
3. 生体内代謝や物質取り込みなど、生命活動の動的現象を定性的、定量的に解析可能

一方、水や脂肪などの生体内主成分を構成する ^1H をターゲットとした従来法では、検出対象の範囲や感度向上に限界があり、使用方法やその用途は一定の範囲に限定されている。

(2) 超偏極-核磁気共鳴法 (DNP-NMR)

近年、MRI の最大の弱点である「感度の低さ」克服やその用途拡大を目的に、超偏極-核磁気共鳴法 (DNP-NMR/MRI) の応用開発が世界的に進められつつある。本法では、NMR 活性核種で標識した分子プローブと、ラジカル化合物の混合物を極低温磁場下 (1.4K, 3.35T) で固化してマイクロ波を照射し、ラジカル化合物の電子スピン偏極を、化合物内の標識核種の核スピンへと移して超偏極させる (図 1)。偏極の緩和プロセスに由来する高感度化 NMR シグナルを足がかりに、プローブ代謝過程の動的可視化や、これに付随する生理作用の非侵襲的な解析が可能である。

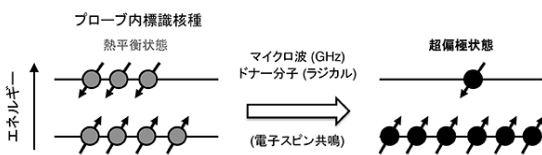


図 1 超偏極による高感度化。極低温磁場下 (3.35T, 1.4 K, 2.8 mbar), ドナー分子の電子スピン偏極を、オーバーハウザー効果によりプローブ内標識核種の核スピンへ移す。これにより、ゼーマン分裂で 2 準位へとほぼ等分裂 (10^{4-5} 分の 1 の差) していた核スピンを一方のエネルギー準位へと極端に偏らせ (超偏極状態), NMR 検出感度を劇的に向上させる。

2. 研究の目的

本研究では、DNP-MRI の新規プローブ創製を目的とし、生体内に存在する有機化合物やその分子アナログの ^{13}C 同位体標識物の設計・創出と *in vitro* での機能評価を実施する。DNP-MRI プローブとして求

められる化合物の性質としては、

1. 分子構造内に同位体標識可能な核種をもち、超偏極時 (極低温条件下) では非晶質
2. 結合もしくは代謝後に標識核種の化学シフト値が大きく変化する
3. 分子プローブ自体が比較的分子量、単純構造、高溶解性で、生体毒性が低い

などの条件が挙げられる。上記条件を念頭に置き、本課題では、ヘモグロビン (Hb) のアロステリックリガンドに注目し、これをモチーフとした ^{13}C 標識 DNP プローブを創製する。

ヘモグロビン (Hb) のアロステリックリガンドを DNP-MRI へ応用する利点

ヘモグロビン (Hb) のアロステリックリガンドは、Hb へ結合して Hb と酸素分子の親和性を調節し、組織内酸素濃度を正常に保っている。生体内のアロステリックリガンドとしては、2,3-ビスホスホグリセレート (2,3-BPG, 図 2) が知られているが、本分子は、①アスリートの高地馴化による血中濃度増加や、②糖尿病三大合併症 (血管合併症に起因する低酸素症を伴う) の疾患部位や先天性代謝疾患での濃度減少、③老化やアルツハイマー、④癌放射線治療における増感作用 (創薬) など、酸素濃度が重要となる生体内活動・疾患に幅広く関わっている。

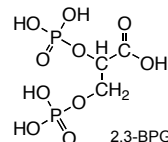


図 2 2,3-BPG の分子構造

このような化合物を DNP-MRI 分子プローブとして応用する利点として、

1. 生体内に存在する低分子であり、毒性が低い (臨床応用性大)
2. Hb に結合し速やかに酸素を放出させることから DNP-MRI の動的解析に最適
3. 他の酸素濃度イメージング (PET, EPRI 等) による *in vivo* 検証試験が可能
4. 糖尿病や虚血性脳疾患 (脳梗塞、アルツハイマー) など、疾患部位における酸素飽和度の超高感度その場測定を実現
5. がん放射線増感剤による治療において重要な、組織内酸素分圧の上昇を可視化する「見える放射線増感剤」として利用

などが挙げられる。本課題期間中には、DNP-MRI の設計・合成と、*in vitro* での酸素分子遊離促進作用、化学シフト変化について評価する。また、候補化合物の物性のチェックや偏極効率の高いドナー分子（ラジカル化合物）も探索し、モデルマウスをもちいた *in vivo* 実験に最適な化合物と計測条件を決定する。

3. 研究の方法

(3-1) 縦緩和時間 (T_1) の計測

ロック用の重溶媒に溶解したサンプルを 5-mm の NMR 管に入れ、400 MHz NMR 装置 (JEOL ECA 400 instrument) をもちいて、Inversion recovery 法により算出した。

(3-2) 化学交換飽和移動 (CEST)

計測には、7T MRI (Bruker) を使用した。ファントム計測については、サンプルの水溶液あるいはラット血液との混合液を 2.5 ml シリンジに封入し、これを水で満たされた 50 ml ファルコンチューブへ更に封入後、MRI の共振器コイルにセットしてボアへ挿入した。

In vivo 実験には、HT1080 担癌モデルマウスを用いた。BALB/c nu/nu マウスの右後足に HT1080 細胞を 1×10^7 cells 接種し、10 日間飼育して約 500 mm³ のサイズまで担癌を生育させた。マウスをイソフルランで麻酔し、ポリプロピレン製のカニューレター (PE10) を尾静脈より確保して共振器コイルに固定した。さらに直腸体温計および呼吸モニターを取り付けた後、MRI 装置のボアへセットした。

以下の条件により、 T_2 強調画像 (形態画像) を取得した (RARE sequence, FOV = 3.2 × 3.2 cm, Matrix size = 256 × 256, RARE factor = 4, NEX = 1, TR/TE = 2500/23.13 msec, Slice = 5, Slice thickness = 1.0 mm, Slice gap = 0.3 mm, Total scan time = 2 min 00 sec)。その後、CEST-FISP シークエンスにより CEST 画像を取得し、ParaVision 5.1 あるいは ImageJ を用いて Z-spectra を抽出した (CEST scan: CEST-FISP sequence, FOV = 3.84 × 3.84 cm, Matrix size = 128 × 128, Flip angle = 10°, NEX = 1, Slice = 1, Slice thickness = 3.0 mm.; Presaturation pulse: Length = 5000 msec, 1 pulse, 39.4 dB, 3.5 μT, Acquisition range = -4500 ~ 4500 Hz (-15 ~ 15 ppm), 101 equally spaced points, Total scan time = 11 min/repetition)。

(3-3) パルスオキシメーターをもちいた酸素飽和度のモニター

BALB nu/nu マウスをイソフルランで麻酔し、パルスオキシメーター (MouseOx[®] PLUS, STARR[™] Life Sciences Corp.) のセンサークリップを右後足へセットして直腸体温計により体温を管理した。化合物溶液

200 μl を尾静脈より投与し、これによる酸素飽和度 (sO₂ %) と心拍数 (BPM) の変化を記録した。

$$sO_2 \% = \text{Hb-O}_2 / (\text{Hb-O}_2 + \text{Hb}) \times 100$$

Hb-O₂: オキシヘモグロビン

Hb: デオキシヘモグロビン

(3-4) モデルマウス担癌の BOLD 効果のモニター

CEST 撮像と同様の手順でマウスをセットし、 T_2 強調画像を取得後、以下の条件により SE-EPI を取得した。(BOLD scan: SE-EPI sequence, FOV = 3.84 × 3.84 cm, Matrix size = 64 × 64, Flip angle = 60°, NEX = 2, Slice = 1, Slice thickness = 3.0 mm, Scan repetition number = 480 (4 sec/scan), Total scan time = 32 min 00 sec)。

その後、ParaVision 5.1 あるいは ImageJ を用いて signal intensity を抽出した。

4. 研究成果

(4-1) 候補化合物の縦緩和時間 (T_1) 計測

Inversion recovery 法により、生体内の Hb アロステリックリガンドである 2,3-BPG (図 2) のカルボニル炭素の T_1 を計測した。その結果、 T_1 は 4.4 秒であることが判明した (図 3)。

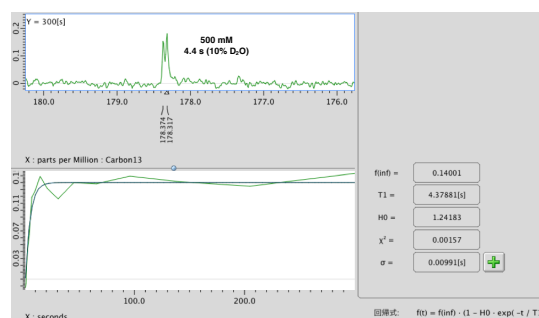


図 3 Inversion recovery 法による 2,3-BPG の縦緩和時間 (T_1) の計測

Billingsley らは、2, 3 位のリン酸基が外れた [1-¹³C]-glycerate の *in vivo* 応用に成功しており、カルボニル炭素の T_1 は約 60 秒であると報告している (*J. Am. Chem. Soc.* 139, 6629, 2017)。このことから、2,3-BPG については、リン酸基がカルボニル炭素 T_1 を短縮する緩和要因となっていることが示唆されたため、DNP-NMR プロープとしての開発を断念した。

一方、2,3-BPG 以外の Hb アロステリックリガンドの中から、*in vivo* 応用に耐えうる $T_1 = 20$ 秒を超える偏極寿命を示す分子を探索した結果、図 4 に示すように $T_1 = 27.6$ 秒の炭素を分子内に有するアロマティック化合物を見出した。

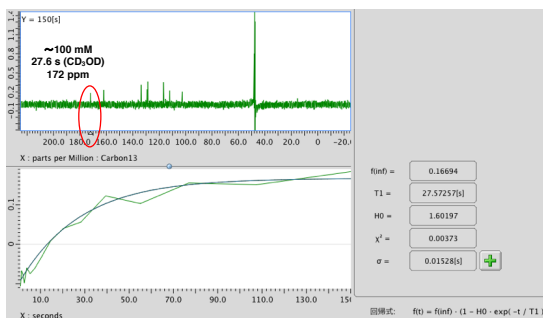


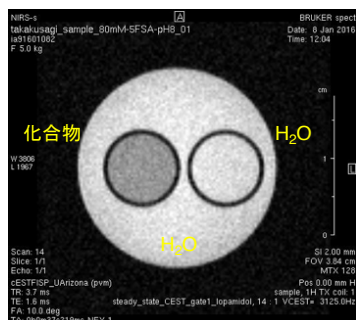
図 4 Inversion recovery 法によるアロマティック化合物の縦緩和時間 (T_1) の計測

(4-2) アロマティック化合物の CEST 計測

(4-1) で見出したアロマティック化合物は、DNP-NMR への応用に十分な偏極寿命のカルボニル炭素に加えて、分子内に CEST ユニットを併せ持つことに注目した。すなわち、本化合物は CEST 造影剤としての応用性も併せ持つことが示唆されたことから、その基礎検討を実施した。

図 5 に CEST-FISP 計測により得られた Z-spectra の結果を示す。図 5-1 に示すように、化合物の存在下では、10.2 ppm の化学シフト値において水プロトンの飽和および H の化学交換に由来するネガティブコントラストが選択的に得られた。図 5-2 に示したように、10.2 ppm でのコントラスト減少は、化合物の存在下のみで観測されたことから、化合物の分子構造、すなわち CEST ユニットに由来するシグナル減少であることが示唆された。

5-1



5-2

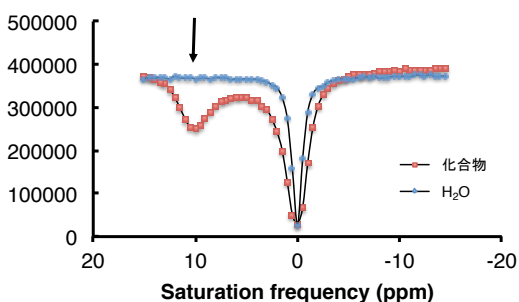


図 5 アロマティック化合物の CEST-FISP 計測。5-1, CEST-FISP 画像。5-2, 各サンプルの Z-spectra。化合物: 80 mM, H₂O (pH 8.0), r.t.

この 10.2 ppm におけるシグナル減少率は、化合物の濃度に依存して大きくなり、また、溶液内の pH が 6.5-8 付近で生じることも観測された (data not shown)。また、ラット血液中からもシグナル減少を検出することに成功しており、*in vivo* 計測への応用可能性が示唆された (図 6)。

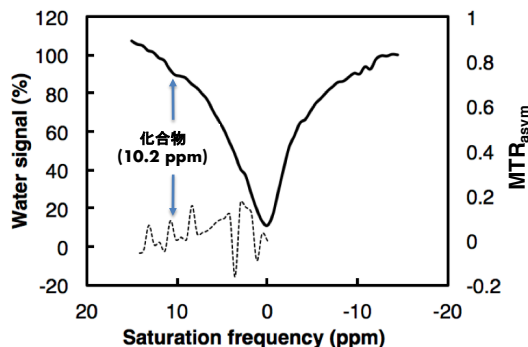


図 6 ラット血液中からのアロマティック化合物の CEST-FISP 計測。化合物: 16 mM, pH 7.4, r.t. $MTR_{asym} = (S^{-\Delta\omega} - S^{+\Delta\omega})/S_0$ 。S₀: -15 ppm における水プロトンのシグナル強度 (基準強度), S: 周波数 $-\Delta\omega$ あるいは $+\Delta\omega$ における水プロトンのシグナル強度。

(4-3) パルスオキシメーターをもちいた酸素飽和度のモニター

(4-1) で見出したアロマティック化合物が、Hb アロステリックリガンドとして機能することを確認するため、パルスオキシメーターをもちいてマウス血中の酸素飽和度 (sO₂) の変化をモニターした。

結果を図 7 に示した。100 mM の化合物水溶液 (PBS, pH 7.5) を 200 μ l 尾静注した結果、右後足を取り付けたセンサークリップを通じて血中酸素飽和度の減少 (~9%) と心拍数 (BPM) の乱れが観察された。30 秒後、sO₂ は再び上昇し、約 2 分後には sO₂ および心拍数ともに元の安定状態へと回復した。このことから、アロマティック化合物がオキシヘモグロビン (Hb-O₂) へと結合して O₂ 分子を解離させ、デオキシヘモグロビン (Hb) 濃度が一時的に上昇したことを示唆していた。また、化合物投与によるマウスの急性毒性は認められなかった。

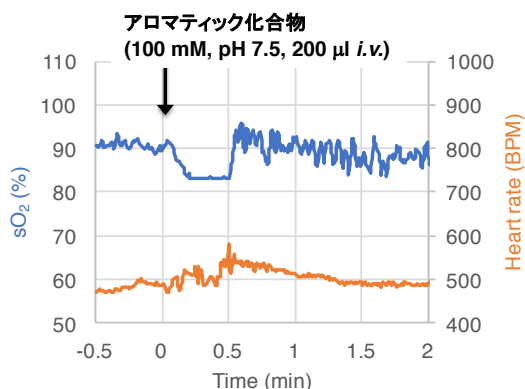


図 7 パルスオキシメーターによる、アロマティック化合物投与前後の大腿血管内 sO_2 (%) および心拍数 (BPM) のモニター

(4-4) マウス担癌におけるアロマティック化合物の BOLD 効果および Z-spectra の計測

7T MRI (Bruker) をもちいて、アロマティック化合物投与前後における、マウス担癌からの BOLD 効果の検出および Z-spectra の計測を試みた。HT1080 担癌マウスをイソフルラン麻酔下、共振器コイルにセットして MRI のボアへ挿入し、呼吸や体温をモニターしながら化合物投与前後の SE-EPI および CEST-FISP のスキャンを実施した。

図 8 に HT1080 担癌より取得した BOLD 効果の追跡結果を示す。化合物を尾静注したところ、シグナル強度が徐々に上昇し、投与後約 3 分で平衡に達して 7-8 分間維持された (5~9% 上昇)。これは、投与した化合物が引き起こす、「反磁性のオキシヘモグロビン (Hb-O₂) 濃度の減少と磁性のデオキシヘモグロビン (Hb) 濃度の上昇作用」に矛盾せず、O₂ 分子の放出が間接的に捉えられていると考えられた。その後、シグナル強度は徐々に減少しはじめ、約 10 分で投与前のレベルまで戻った。

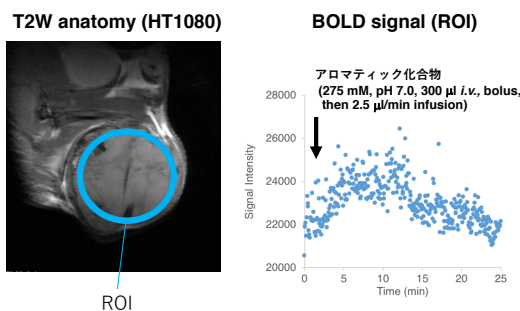
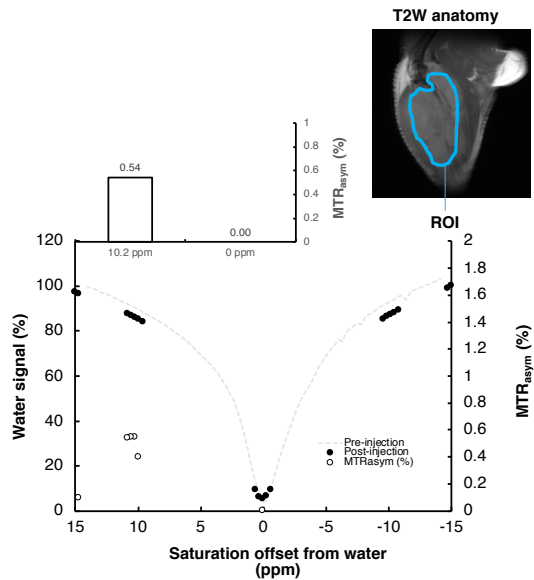


図 8 アロマティック化合物投与前後における HT1080 担癌内 BOLD 効果の追跡

同様の条件で CEST-FISP を計測したところ、化合物内の CEST ユニットプロトンの交換に由来すると思われる 10.2 ppm のシグナル減少が HT1080 担癌より観測された (図 9)。したがって、Z-spectra を取得することにより、尾静注後の化合物が担癌内に到達したことを直接捉えることに成功した。

図 9 アロマティック化合物投与前後における Z-spectra の計測。Pre-injection: 4 scan の平均値, Post-injection: 6 scan の平均値。MTR_{asym} (%) = $(S^{-\Delta\omega} - S^{+\Delta\omega})/S_0 \times 100$ 。S₀: 15 ppm における水プロトンのシグナル強度 (基準強度), S: 周波数 $-\Delta\omega$ あるいは $+\Delta\omega$ における水プロトンのシグナル強度。いずれの周波数も, preinjection 時のシグナル強度で規準化してある。



以上の結果を総合すると、尾静脈より投与された本化合物は、担癌内血管へと到達し、血管内に存在する赤血球オキシヘモグロビン (Hb-O₂) に結合して O₂ 放出を促進することにより sO_2 の減少 (デオキシヘモグロビン濃度の上昇) を引き起こしたと推測される。BOLD および CEST 計測を併用することで、本化合物投与後のマウス体内動態や局在、および HT1080 担癌内での O₂ 放出作用を直接観測できることが示唆された。

現在、血中から酸素分子を受け取った担癌組織側の酸素分圧 (pO₂) の上昇について調べており、化合物と Hb-O₂ との相互作用 (Hb-O₂ 濃度の減少; sO_2 減少) が担癌内イベントであることを検証している。同時に、治療用エックス線の担癌生育抑制作用の増感効果を確認することで、さまざまな腫瘍に対する「CEST を介して動態追跡が可能な放射線増感剤 (CEST-based radiotheranostics)」としての応用性を検討している。同様に、DNP-NMR/MRI での応用も視野に入れ、DNP/CEST デュアルプローブとしての可能性も検討している。

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 5 件) (査読有)

- (1) Takakusagi Y. et al. Radiotherapy synergizes with the hypoxia-activated prodrug evofosfamide: in vitro and in vivo studies. *Antioxid. Redox Signal.* 28, 131-40, 2018 10.1089/ars.2017.7106
- (2) Takakusagi Y. et al. Effect of ionic interaction between a hyperpolarized magnetic resonance chemical probe and a gadolinium contrast agent for the hyperpolarized lifetime after dissolution. *J. Magn. Reson.* 270, 157-60, 2016 10.1016/j.jmr.2016.07.015

- (3) Hata R. Nonaka H. Takakusagi Y. Ichikawa K. Sando S. Design of a hyperpolarized molecular probe for detection of aminopeptidase N activity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 55, 1765-8, 2016 10.1002/anie.201509457
- (4) Saito K. Matsumoto S. Takakusagi Y. et al. ¹³C-MR spectroscopic imaging with hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate detects early response to radiotherapy in SCC tumors and HT-29 tumors. *Clin. Cancer Res.* 21, 5073-81, 2015 10.1158/1078-0432.CCR-14-1717
- (5) Hata R. Nonaka H. Takakusagi Y. Ichikawa K. Sando S. Design of a hyperpolarized (15)N NMR probe that induces a large chemical-shift change upon binding of calcium ions. *Chem. Commun. (Camb.)* 51, 12290-2, 2015 10.1039/c5cc04597e

[学会発表] (計 15 件)

1. Yoichi Takakusagi “Accessories and Techniques that Maximize MRI as a Quantum Technology” A Workshop on Drawing Biological Information through Quantum Spin Systems, 2017/11/28, NCI/NIH, Bldg10, Bethesda Campus (Invited)
2. 高草木洋一「超偏極-核磁気共鳴分子プローブの創製と応用計測 ～次世代画像診断技術としての実用化を目指して～」第45回磁気共鳴医学会大会 シンポジウム 2017年9月 栃木県総合文化センター/宇都宮東武ホテルグランデ (依頼講演)
3. 高草木洋一「動的核偏極-核磁気共鳴分子プローブの創製と応用計測」次世代MRI・造影剤アライアンス キックオフ国際シンポジウム 2017年5月 日本科学未来館 (依頼講演)
4. 高草木洋一「革新的診断技術の創製をめざして」第116回 NIH 金曜会 2017年2月 NIH Bldg37, Bethesda Campus
5. Yoichi Takakusagi et al. “Hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate magnetic resonance spectroscopy for noninvasive assessment of energy metabolism transition induced by the 3D spheroidal culture of tumor cells” Gordon Research Conference: Physical Science of Cancer, 2017/2/5-9, Galveston, Houston
6. 高草木洋一「アミノ酸をモチーフとした超偏極-核磁気共鳴分子プローブの設計と応用」第44回日本磁気共鳴医学会「超偏極による他核 MRSI の高感度計測」スタディーグループ 2016年9月 大宮ソニックシティ (依頼講演)
7. 高草木洋一「Dissolution DNP-MRI 研究の

- 概略と画像診断への応用」第2回超偏極ワーキンググループ 2016年5月 岐阜大学医学部 (依頼講演)
8. 高草木洋一「Dissolution DNP-MRI についての概要」超偏極ワーキンググループキックオフミーティング 2016年2月 じゅうろくプラザ (岐阜) (依頼講演)
 9. 高草木洋一「Hyperpolarized (DNP) MR Imaging」第6回放射線生物学セミナー 2016年2月 名古屋市立大学 (依頼講演)
 10. Shingo Matsumoto, Keita Saito, Shun Kishimoto, Yoichi Takakusagi et al. “EPR based imaging biomarkers to guide treatment in tumor bearing mice” The 54th Annual Meeting of the Society of Electron Spin Science and Technology (SEST2015) International EPR Society Silver Medal Award Lecture Nov. 15th, 2015, Niigata
 11. Yoichi Takakusagi et al. “Noninvasive assessment of drug actions in tumor microenvironment by the EPR oxygen imaging” 第54回電子スピンサイエンス学会年会 (SEST2015) 2015年11月 新潟コンベンションセンター
 12. 高草木洋一「超偏極-磁気共鳴分子プローブの設計」第43回日本磁気共鳴医学会「超偏極による他核 MRSI の高感度計測」スタディーグループ 2015年9月 東京ドームホテル (依頼講演)
 13. Yoichi Takakusagi et al. “Effect of ionic charge of gadolinium complex for polarization and spin-lattice relaxation of [¹³C] hyperpolarized chemical probes after dissolution” 5th DNP Symposium, 2015/8/31-9/5, Egmond aan Zee, Netherland
 14. Yoichi Takakusagi et al. “Increase in tumor oxygenation and radiosensitivity caused by SQAP (CG-0321): the mechanism of actions revealed by in vivo imaging studies” International Conference of Radiation Research (ICRR2015), 2015/5/25-27, Kyoto
 15. Keita Saito, Shingo Matsumoto, Yoichi Takakusagi et al. “¹³C-MRI with hyperpolarized [1-¹³C]pyruvate detects metabolic changes in SCC tumors and HT-29 tumors by radiotherapy” International Conference of Radiation Research (ICRR2015), 2015/5/25-27, Kyoto

6. 研究組織

(1) 研究代表者 高草木 洋一

(TAKAKUSAGI YOICHI)

量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所・分子イメージング診断治療研究部機能分子計測チーム・主任研究員
研究者番号：60439916