

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19385

研究課題名（和文）パラ水素誘起分極¹³C MRIによる細胞死の非侵襲的イメージング技術の開発研究課題名（英文）Parahydrogen induced hyperpolarized ¹³C MRI of cell death

研究代表者

松元 慎吾（Matsumoto, Shingo）

北海道大学・情報科学研究所・准教授

研究者番号：90741041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：炎症性疾患、外傷、虚血や梗塞など多くの疾患において、その重症度を評価する最も端的かつ合理的な指標は“どれだけの細胞が死んでいるのか”である。治療の観点からは、例えば脳梗塞時にどれだけの神経細胞を死から救えたか、あるいは逆に抗癌治療によりどれだけ多くの癌細胞を殺せたのか、が治療効率の判断基準となる。本研究では、パラ水素誘起偏極法により¹³C標識細胞死プローブの核磁気共鳴画像（MRI）信号強度を10万倍以上励起することに成功した。この励起した¹³C標識プローブのMRI撮像により、細胞死に特定的に見られる代謝変化を標的に、体内で起こる細胞死を非侵襲的にイメージングする技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超偏極¹³C MRIは安定同位体の検出感度を一時的に数万倍に増幅することで、核医学検査のような分子イメージング診断を被曝の無いMRIで実施することを可能にする次世代の画像診断技術として注目され、既ががんや心疾患を対象に千人規模の臨床試験が進められている。本研究により、現行の動的核偏極（DNP）法に比べ臨床初期コストが10分の1へ抑制できることが見込まれるパラ水素誘起偏極法による細胞死イメージングの実用化の目処が立ったことは、超偏極¹³C MRIで診断できる対象疾患を広げるとともに、一般病院への普及の促進に繋がる成果である。

研究成果の概要（英文）：In many diseases such as inflammatory diseases, trauma, ischemia and infarction, the most rational index for evaluating their severity is "how many cells are dead". From the viewpoint of treatment, for example, how many nerve cells can be saved from death at the time of cerebral infarction, or conversely, how many cancer cells can be killed by anti-cancer treatment is a criterion for determining treatment efficiency. In this study, we succeeded in enhancing the MRI signal intensity of ¹³C-labeled cell death probe by 100,000 times or more compared to that at thermal equilibrium at 1.5T by the parahydrogen induced polarization method. MRI imaging of the hyperpolarized ¹³C-labeled cell death probe was used for the non-invasively imaging of cell death that occurs in the body, targeting metabolic changes specifically seen in the regions of necrosis.

研究分野：核磁気共鳴画像（MRI）

キーワード：細胞死 超偏極¹³C MRI 代謝イメージング 安定同位体PETイメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞死の検出

炎症性疾患、外傷、血管障害による虚血や梗塞など多くの疾患において、重症度とは極論すればその疾患により“どれだけの細胞が死んだのか”である。治療の観点からは、例えば脳梗塞時にどれだけの神経細胞を死から救えたか、あるいは逆に抗癌治療によりどれだけ多くの癌細胞を殺せたのか、が治療効率の判断基準となる。しかしながら、特定の臓器・組織における細胞死を非侵襲的に評価する手法は確立されていない。血液検査による GOT や LDH など分子マーカーは、全身における細胞死を推定する指標となるが、異常値の原因となる組織の位置情報は与えない。近赤外や蛍光標識した分子マーカーによる光学イメージングは、培養細胞や *ex vivo* においては有用なツールであるが、その検出能は体表面の数 mm に止まり、体深部の非侵襲計測には向かない。遺伝的に制御された細胞死であるアポトーシスは、癌の発症抑制にも関わる重要な生命現象であり、その特徴的な分子シグナルを標的とする PET 用トレーサーが開発されている。しかしながら、炎症性疾患や抗癌治療時に起こる細胞死の大部分は細胞膜の破綻を伴うネクローシス(壊死)であり、アポトーシスの寄与は数%に留まる。従って、疾患の重症度や治療効率の評価という観点では、ネクローシスを含む細胞死を検出する計測技術がより望ましい。

(2) 超偏極 ^{13}C MRI による代謝イメージング

超偏極¹³C核磁気共鳴画像(MRI)は¹³C標識した任意の化合物の¹³C NMR信号を数万倍に増幅することで、その生体内における代謝反応をリアルタイムに可視化する新しい分子イメージング技術である。例えば、¹³C標識したピルビン酸が正常組織ではミトコンドリアの酸化リン酸化により水と二酸化炭素に代謝されるのに対し、腫瘍組織では主に乳酸へと代謝される代謝変化を計測する超偏極¹³C MRIは、既に前立腺癌診断で臨床応用も始まっている(Nelson et al. *Sci Trans Med* 2012)。もし、①正常な組織においては、外来的に投与した基質(¹³C標識代謝プローブ)とは反応しない細胞内に局在する酵素で、②細胞膜の破綻を伴う細胞死により細胞外に放出され、③補酵素を必要とせず、細胞外に放出された後も活性を維持している酵素、を標的に超偏極¹³C MRIで代謝イメージングを行えば、ネクローシス等の細胞膜の破綻を伴う細胞死の生体内分布を非侵襲的に可視化することが可能となる。その一方で、現行のほとんど全ての超偏極¹³C MRI撮像は、動的核偏極(DNP)型の励起装置を用いて¹³C核スピンのMRI信号を数万倍に増幅している。3T以上の超電導磁石と約1Kの超低温下におけるマイクロ波照射を必要とする現行のDNP型¹³C励起装置の臨床初期費用は3億円以上と高額で、この革新的な分子イメージング技術の国内普及を阻む主因となっている。従って、より低コストな手法で¹³C核スピンを励起できることも、臨床応用へ向けた重要な課題となっている。

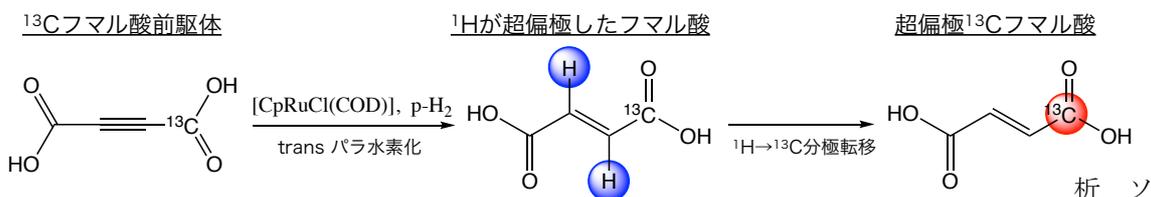
2. 研究の目的

本課題では、細胞膜の破綻を伴う細胞死により細胞外へと放出された酵素の代謝反応を、超高度¹³C核磁気共鳴画像(MRI)により特異的に検出することで、非侵襲的かつ半定量的に細胞死を計測するイメージング技術を開発した。

3. 研究の方法

(1) 細胞死マーカーとする標的酵素として、フマラーゼから研究に着手した。フマラーゼはフマル酸をリンゴ酸へと代謝する酵素であり、既に上記①~③の細胞マーカー要件を満たすことが先行研究により確認されている。培養細胞における膜破壊により細胞外へと放出されたフマラーゼによるリンゴ酸生成量は細胞死の程度に相関し、定量性も期待される。しかしながら、PHIP法で励起したtransアルケンであるフマル酸を得るには難題があった。パラ水素付加後に核偏極を生じる水素化触媒は、2つの水素原子を元の一重項のスピン配向を維持したままペアで渡せる一部のロジウム錯体のみであり、これらは全てcis付加をする。2015年、選択的にtrans水素化するルテニウム錯体が化学分野で報告され、その反応機構として2つの水素原子がペアで渡されることが証明されている(*Angew Chem Int Ed* 2015)。このルテニウム触媒を用いれば、PHIP法により超偏極した¹³Cフマル酸が得られ、超偏極¹³C MRIにより細胞死イメージングが可能となると考えた。

(2) 本課題では、有機合成が専門の連携研究者・橋本が¹³C標識フマル酸の三重結合前駆体の合成および選択的trans水素化触媒のスクリーニングを行った。研究代表・松元は、フマル酸のスピン結合を元に量子統計力学シミュレーションにより、PHIP法の最適励起パラメータを算出し、得られた励起条件を独自開発したPHIP型¹³C励起装置に実装した。¹³C MRIの撮像技術や解



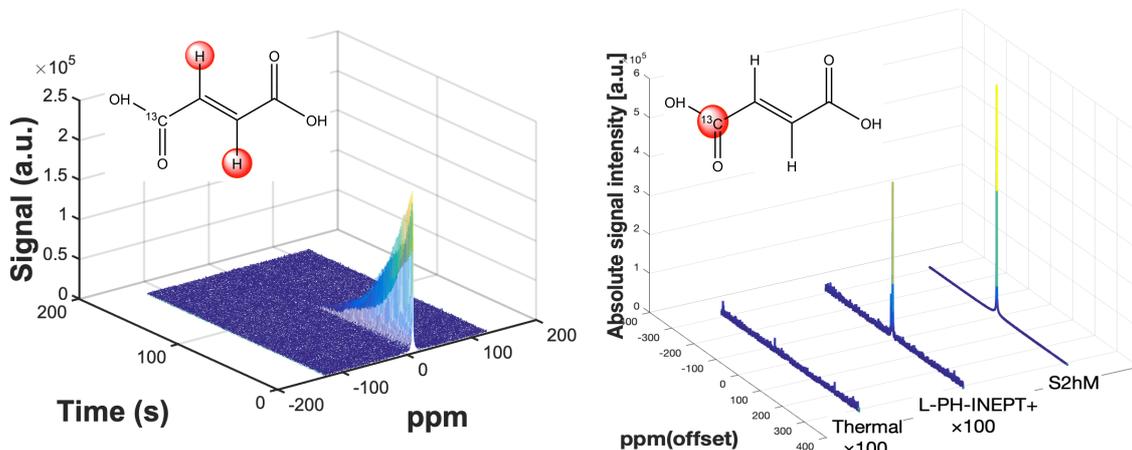
パラ水素誘起分極法による超偏極¹³Cフマル酸の取得 特殊なRu触媒による選択的trans水素化反応により、パラ水素由来の ^1H に核偏極が誘導される。スピン結合を介した分極転移により¹³Cを超偏極したフマル酸が得られる。

フトウェアは従来の動的核偏極法で開発したものを転用して使用した（一部は新規に開発）。

4. 研究成果

(1) ^{13}C フマル酸への超偏極誘導

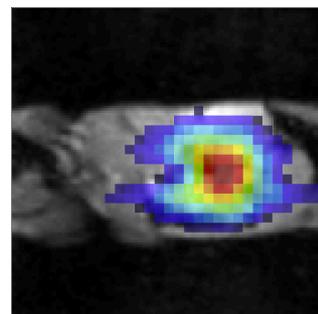
連携研究者・橋本により ^{13}C 標識フマル酸の三重結合前駆体である $[1-^{13}\text{C}]$ アセチレンジカルボニルの高収率な合成ルートを確立した。この前駆体への選択的 trans アルケン化を行うルテニウム触媒を用いたパラ水素付加により、パラ水素由来の2つの超偏極 ^1H が生成されることを ^1H NMR により確認した。生成した超偏極 ^1H から1位の ^{13}C への選択的な分極転移操作により、1.5T の熱平衡状態に比べて ^{13}C MRI 信号が10万倍に励起された超偏極 ^{13}C フマル酸の作成に成功した。実用的な励起時間内に調整できる濃度が5-10mM と低い点は今後の改善点として残った。



(左) 選択的transパラ水素付加による超偏極 ^1H の生成。
(右) 様々な分極転移パルスにより誘導した超偏極 ^{13}C フマル酸の ^{13}C NMRスペクトル

(2) 超偏極 ^{13}C フマル酸による細胞死の検出と ^{13}C MRI 撮像

超偏極誘導した ^{13}C フマル酸を腫瘍ホモジネートと混合した ^{13}C NMR 測定では、細胞死マーカーであるリンゴ酸への代謝反応をリアルタイムに計測することに成功した。また、健常マウスに投与した超偏極 ^{13}C フマル酸のMRI 撮像により、フマル酸の生体内分布の可視化を達成した。健常マウスのMRI 撮像では細胞死マーカーである ^{13}C リンゴ酸の代謝物ピークは検出されなかった。今後は、疾患モデルにおいて、細胞死イメージングの実用性評価を実施する。



パラ水素誘起偏極法により励起した超偏極フマル酸の ^{13}C MRI

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 友広 潤志、StewartJ Neil、平田 拓、松元 慎吾
2. 発表標題 パラ水素誘起偏極法によるINEPT型 ¹³ C NMR計測手法の開発
3. 学会等名 第58回 NMR討論会（2019）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>現在までの成果を論文にまとめており、2020年8月を目処に学術雑誌に投稿予定である。</p>

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
連携研究者	橋本 卓也 (Hashimoto Takuya) (20437198)	千葉大学・大学院理学研究院・准教授 (12501)	