

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12758

研究課題名(和文) 生体計測した活性酸素種(ROS)を指標としたアトピー性皮膚炎評価法の開発

研究課題名(英文) Development of atopic dermatitis evaluation method using biometrically measured reactive oxygen species (ROS) as an index

研究代表者

江藤 比奈子 (Eto, Hinako)

九州大学・先端医療オープンイノベーションセンター・特任助教

研究者番号：30557632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動的核偏極磁気共鳴画像(DNP-MRI)装置で生体内に投与したラジカルプロ-ブのラジカル減衰を画像解析する事で、生体内の炎症による活性酸素種(ROS)やROSに起因したレドックス状態(酸化還元バランス)を非侵襲に解析する事ができる。本研究ではアトピー性皮膚炎モデルマウスで、細胞内または細胞外で反応する2種類のプロ-ブの同時撮像解析方法を確立した。これを用いて、皮膚炎が目視では鱗屑(角質層の剥離)などの軽症でも、皮膚組織内では炎症や皮膚厚亢進が起きている事、重症化の手前で炎症細胞によるROS発生が最も高くなっている可能性がある事を、ラジカルプロ-ブのラジカル減衰速度の変化で捉える事ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人のアトピー性皮膚炎患者は社会的ストレスなど複雑な要因が相まって、炎症のコントロールが長期化、複雑化する。またステロイド忌避感情など慢性治療への足かせとなっている。治療継続の指標となる、『潜在的な炎症が残っている期間』を明確にする為にも、見えない皮膚炎を数値化できるバイオマーカーが必須である。本研究でのラジカルプロ-ブのラジカル減衰速度変化は、目視での軽度から中度の皮膚炎と相関した減衰速度の上昇として非侵襲に捉える事ができ、皮膚炎を数値化するバイオマ-カ-と成り得る可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：By analyzing the radical decay of the radical probe administered in vivo with a dynamic nuclear polarized magnetic resonance imaging (DNP-MRI) device, it was caused by reactive oxygen species(ROS) due to inflammation and the redox state (oxidation-reduction balance) causing by ROS. In this study, we established a method for simultaneous imaging analysis of two types of probes that react intracellularly or extracellularly in skin lesions of atopic dermatitis model mice. Using this method, it was possible to detect that even if the atopic dermatitis of the model mouse was visually mild such as scales (exfoliation of the stratum corneum), inflammation and thickening of the skin occurred. And, it was possible to grasp by the change in the radical decay rate of the radical probe, that the occurrence of ROS due to inflammatory cells may be the highest before the severity of the disease.

研究分野：物理系薬学

キーワード：DNP-MRI ニトロキシルラジカル ROS レドックス アトピー性皮膚炎 窒素同位体

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎の国内患者数は推定 4 万 6,000 人で、その 64% が成人である [厚生労働省 平成 26 年患者調査]。成人のアトピー性皮膚炎患者は社会的ストレスなど複雑な要因が相まって、炎症のコントロールが長期化、複雑化する。また患者の 6 割はステロイド忌避感情を持ち [Saeki H et al.2016]、慢性期の治療への足かせとなっている。治療継続の促進にむけて、アトピー性皮膚炎診療ガイドラインで外用薬の継続が推奨される『潜在的な炎症が残っている期間』を明確にする為にも、皮膚炎を数値化できる具体的なバイオマーカーが必須である。アトピー性皮膚炎では、活性酸素種 (ROS : Reactive oxygen species) による修復不可能な酸化ストレスが、レドックス感受性シグナル伝達系 (MAP キナーゼ系など) を誘導し、NF-kB や AP-1 など炎症を惹起する転写因子のスイッチとなる機序が早くから解明されている。しかし酸化ストレスの上流にある皮膚組織内での炎症と ROS の動態は明らかにできていない。

2. 研究の目的

動的核偏極磁気共鳴画像 (DNP-MRI) 装置は、MRI による解剖学的位置情報に、電子スピン共鳴 (ESR) によるラジカル分子情報を搭載した画像化装置である。また、安定ラジカルをもつニトロキシルラジカルは、プローブとして生体内に投与されると、病変部の ROS と反応する事でラジカルを消失し、DNP-MRI での信号強度を失う。よって DNP-MRI で経時的撮像を行い、画像強度減衰の傾きから算出する減衰速度を比較する事で、ROS などの生体内分子の増減を非侵襲に解析できる。よって見た目が軽症なアトピー性皮膚炎でも、表皮下の微細な皮膚組織炎を ROS が鋭敏に検出できると考え、アトピー性皮膚炎症状の重症度変化を、ROS の変化情報を用いてレベル化して評価する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 14N と 15N のニトロキシルラジカルを用いた、複数プロ - プの同時 *in vivo* DNP-MRI 撮像解析法の確立。

DNP-MRI で生体内のレドックス状態を捉えるプロ - プとなるニトロキシルラジカルは、膜透過性や反応性の違いから、それぞれ異なったレドックス反応対象をもつ。よって同じアトピー性皮膚炎の病変でも、反応対象が異なるプロ - プを使う事で複数の情報を得る事ができる。また、一部のニトロキシルラジカルは、14N と 15N の窒素同位体を持ち、これらは DNP-MRI で異なる励起周波数で画像化する事ができる。よって異なった反応対象をもつ 15N と 14N のプロ - プを混ぜてアトピー性皮膚炎モデルマウスの病変部に反応させ、14N と 15N それぞれの励起周波数で交互に DNP-MRI 撮像する事で、同時に 2 種のプロ - プの減衰速度を得る事が可能である。アトピー性皮膚炎モデルマウスを解析する為の、14N と 15N を混ぜたミックスプロ - プを用いた *in vivo* DNP-MRI 撮像解析法を確立する。

(2) 軽度、中度、重度のアトピー性皮膚炎 (AD) 病変の変化とプロ - プ減衰速度変化の相関性評価。

ダニ抗原感作によりアトピー性皮膚炎様皮膚疾患を発症する NC マウスにコナヒョウヒダニ抗原の軟膏を塗布する事でアトピー性皮膚炎モデルマウスを作製する。抗原軟膏の塗布回数が増える事で、皮膚炎は重症化する。モデルマウスの皮膚炎を目視でスコア化し、軽度、中度、重度 (AD_軽度、AD_中度、AD_重度) の皮膚病変を、ミックスプロ - プを用いた *in vivo* DNP-MRI 撮像解析でプロ - プの減衰速度で捉える。in vitro での病理組織検査、生化学検査結果からの、皮膚炎の重症化に伴う変化との相関性から ROS の変化を明らかにする。

4. 研究成果

(1) DNP-MRI で画像化する為の 14N、15N プロ - プの励起周波数を決定した。生体のレドックス病態解析に用いてきたニトロキシルラジカルの中で、14N、15N をもつ tempol、Carboxy-PROXYL、Carbamyl-PROXYL を用いた。それぞれ溶液を充填したファントムを作製し、励起周波数を 420MHz-458MHz まで、1.0MHz ずつ変更しながら DNP-MRI 撮像を行った。各々のファントムの画像強度を解析して、14N または 15N プロ - プ片方のみが高画像強度を示し、片方は低画像強度を示す励起周波数を、それぞれのプロ - プを画像化するための励起周波数とした。マウス生体撮像に調整可能な周波数範囲で、14N:455.0MHz、15N:423.0MHz に決定した。(図 1) プロ - プの種類は、アトピー性皮膚炎の表皮層や真皮層の細胞内変化を捉える為に、膜透過性が高く、ROS などの反応性も高い tempol (14N)、膜透過性が低く細胞外の炎症細胞性 ROS を捉える為に CxP (15N) をミックスプロ - プとして用いる事とした。

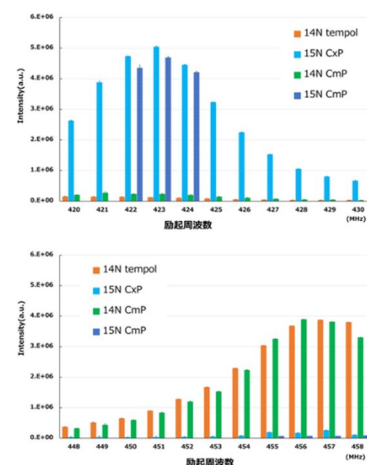


図1 DNP-MRI 励起周波数別、14N、15Nプローブの画像強度。

DNP-MRI のプロ - ブラジカルは、過剰な高濃度ではスピン-スピン相互作用が影響して、画像強度増強効果が低下する特徴をもつ。また種類の異なるプロ - ブは、同一濃度でも画像強度増加効果が異なる。生体投与したラジカルプロ - ブの経時的なラジカル減衰を捉える為には、反応初期の画像強度が十分に必要である。更には、反応性の高い tempol は、反応時間を CxP と合わせて遅らせる必要がある。これらを考慮して、2.0mM 14N tempol + 1.0mM 15N CxP のミックスプロ - ブを用いてアトピー - 性皮膚炎モデルマウスの *in vivo* DNP-MRI 撮像解析を行う事とした。

(2)

アトピー - 性皮膚炎モデルマウスは、皮膚炎の重症度を目視で鱗屑、発赤、肥厚、痂皮、耳介病変項目をスコア化し、AD_軽度(1-3/15)、AD_中度(4-9/15)、AD_重度(10-15/15)に群分けして評価した。これらモデルマウスの血清 IgE 抗体値は正常と AD_軽度には差は無く、AD_中度、AD_重度と重症化につれ有意に上昇していた。

In vivo DNP-MRI 撮像解析は、皮膚炎を作製した頭頸部の皮下にミックスプロ - ブを投与し、投与 1.5 分後から 19.5 分後まで、455MHz、423MHz の励起周波数を交互に 2 分間隔で撮像を繰り返した。撮像画像はイメ - ジングソフトでプロ - ブの画像強度を解析し画像強度の減衰グラフの傾きから、14N tempol、15N CxP それぞれの減衰速度を算出して評価した。14N tempol の減衰速度は、正常に対して AD_軽度、AD_中度と皮膚炎の重症化と共に上昇した。しかし AD_中度のなかでも高スコアから AD_重度にかけては、減衰速度の上昇は低減した。細胞膜非透過性プロ - ブである 15N_CxP も、同様の結果が得られた。次にアトピー - 性皮膚炎組織を採材、ホモジネ - トしたサンプルと 14N tempol、15N CxP の *in vitro* の反応を ESR 装置でのスペクトル解析によって減衰速度を算出して評価した。14N tempol は *in vivo* DNP-MRI 撮像解析による *in vivo* と同結果が得られた。一方、15N CxP は *in vivo* DNP-MRI 撮像解析結果とは異なり、正常、AD_軽度、AD_中度、AD_重度に差が無く、一貫してラジカルの減衰速度は非常に低かった。ここで正常コントロールと AD_中度のアトピー - 性皮膚炎モデルマウスで、*in vivo* DNP-MRI 撮像と同様に 14N tempol、15N CxP それぞれを投与し、10 分後の血中プロ - ブ濃度を測定した。14N tempol は正常と AD_中度の血中濃度に差が無かったのに対し、15N CxP は正常に対して AD_中度は有意に高濃度で、皮下投与後血中への吸収排泄が亢進している事が分かった。よって *in vivo* DNP-MRI 撮像解析による 15N CxP の皮膚炎の重症化に伴う減衰速度の上昇変化は、細胞膜非透過性で細胞に取り込まれない為、皮膚炎の重症化に伴う血管透過性の亢進を反映していると考えられた。一方、投与後速やかに細胞中に取り込まれる為に血中への吸収排泄亢進の無い 14N tempol は、*in vitro* の ESR スペクトル解析の結果と相関した事からも、皮膚炎組織との反応でラジカル消失を起こした為に減衰速度が亢進していると考えられる。正常から AD_軽度、AD_中度、AD_重度と皮膚炎スコアの上昇と共に、皮膚病理組織検査での表皮層、真皮層の有意な肥厚や皮膚組織中のアスコルビン酸濃度の増加していたことから、これらが 14N tempol のラジカル消失反応に影響していると考えられた。しかし、*in vivo* DNP-MRI 撮像解析では、AD_中度の高スコアから AD_重度にかけては、減衰速度の上昇が低減していた。この傾向は、皮膚組織の免疫染色における、マウス成熟マクロファ - ジマーカ - である F4/80 陽性領域の結果と相関した。よって本アトピー - 性皮膚炎モデルにおいては、AD_軽度から AD_中度と重症化するにつれてマクロファ - ジ細胞に関する ROS が増加するが、更なる重症化で ROS の低減が起こり、この変化が 14N tempol の減衰速度に大きく影響していると考えた。

アトピー - 性皮膚炎モデルマウスを非侵襲に 14N tempol と 15N CxP のミックスプロ - ブを用いて *in vivo* DNP-MRI で減衰速度の上昇度で評価する事で、特に低スコアな皮膚炎で、14N tempol で表皮層や真皮層の肥厚程度や ROS の増加程度を、15N CxP で炎症に伴う血管透過性亢進程度を同時に評価する事が可能である。これらは目に見えない表皮下の炎症性変化を非侵襲に評価する事ができ、新たなバイオマ - カ - となりうる可能性がある。

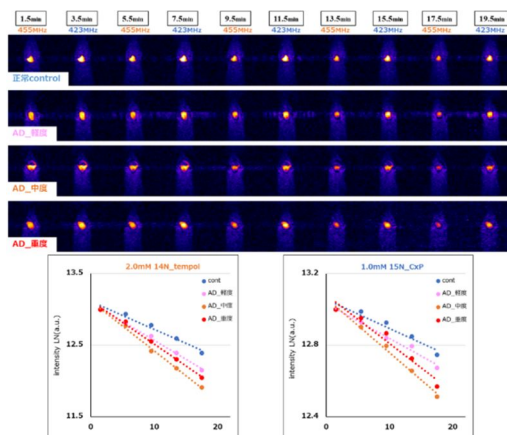


図2 正常、アトピー - 性皮膚炎モデルマウスの *in vivo* DNP-MRI画像と、それを解析した 14N tempol、15N CxPプローブの減衰グラフ。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hyodo Fuminori, Ito Shinji, Eto Hinako, Elhelaly Abdelazim Elsayed, Murata Masaharu, Akahoshi Tomohiko, Utsumi Hideo, Matuso Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Free radical imaging of endogenous redox molecules using dynamic nuclear polarisation magnetic resonance imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2020.1859109	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 Shoda Shinichi, Hyodo Fuminori, Tachibana Yoko, Kiniwa Mamoru, Naganuma Tatsuya, Eto Hinako, Koyasu Norikazu, Murata Masaharu, Matsuo Masayuki	4. 巻 92
2. 論文標題 Imaging of Hydroxyl-Radical Generation Using Dynamic Nuclear Polarization-Magnetic Resonance Imaging and a Spin-Trapping Agent	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 14408 ~ 14414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.0c02331	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 Hosain Md. Zahangir, Hyodo Fuminori, Mori Takeshi, Takahashi Koyo, Nagao Yusuke, Eto Hinako, Murata Masaharu, Akahoshi Tomohiko, Matsuo Masayuki, Katayama Yoshiki	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a novel molecular probe for the detection of liver mitochondrial redox metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73336-1	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hinako Eto, Tatsuya Naganuma, Motonao Nakao, Masaharu Murata, Tomohiko Akahoshi, Fuminori Hyodo
2. 発表標題 Development and basic performance evaluation of a large DNP-MRI system for preclinical in vivo redox metabolism measurement
3. 学会等名 The Society for Redox Biology and Medicine's 26th Annual Conference (SfRBM 2019)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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