

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07829

研究課題名(和文)アルツハイマー病モデルマウスを用いた非侵襲早期診断システムの開発研究

研究課題名(英文)Development of early diagnostic method using Alzheimer's disease model mice

研究代表者

藤井 博匡 (FUJII, Hirotada)

北海道医療大学・その他・客員教授

研究者番号：70209013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化が進むにつれて、アルツハイマー病(AD)患者数が急激に増加している。AD病態の理解を進める一つの糸口として、ADの生理学的情報を非破壊的に可視化し発症予測が可能な非侵襲的イメージング法の出現が求められている。本課題では、酸化ストレス状態がAD病理カスケードの早期段階で変化する点に着目し、ADモデルマウスの脳内酸化ストレス状態を非侵襲で可視化する電子常磁性共鳴法(EPR)を用いたAD病態の早期診断システムを開発した。酸化ストレス状態を早期に発見するニトロキシド分子の選択および高度に画像化出来るEPRイメージング装置を製作し、脳内レドックス状態が7ヶ月齢で変化するのを見つけ出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、ADモデルマウスの脳内レドックス状態を非侵襲で可視化する、電子常磁性共鳴法(EPR)を用いたAD病態の早期診断システムを開発した。本研究で開発したシステムを用いると、ADモデルマウスの脳内にアミロイドタンパク質が蓄積し始める9ヶ月例よりも早い6～7ヶ月齢で脳内酸化ストレス状態が変化するのを検出することが出来た。この研究手法を活用すると、ADモデルマウスにどのような介入をすることでいち早く脳内レドックス状態の変動が起こりうるかを予測することが出来、ADの始まりの状態である軽度認知障害(MCI)への移行を早期に発見でき、AD患者増加の抑制に貢献することが出来る。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease causing progressive cognitive decline. One of the histopathological hallmarks of AD is aggregated amyloid- β (A β) proteins. In addition to the typical pathological changes of AD, oxidative stress is also reported to be an important pathological phenomenon that starts to manifest early in the course of AD. Oxidative stress induced by the generation of reactive oxygen species (ROS) is a prominent phenomenon in AD and is known to occur early in its course. In the present study, we developed a newly designed digital electron paramagnetic resonance (EPR) imager with redox-sensitive piperidine nitroxide probe for early detection of changed brain redox status. Using this system, the obtained brain redox images of AD and control mice clearly showed impaired brain redox status of AD mice compared to control, and this change was apparently seen in 7-month-old AD mice compared with age-matched control mice.

研究分野：磁気共鳴

キーワード：アルツハイマー病 酸化ストレス レドックス EPR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

我が国では急速に高齢化が進み、認知症有病者数は増加の一途をたどっている。近年、認知症に関わる医療費と介護費が国家予算を圧迫し始めており、根本的治療法の開発を含め早急な対策が求められている。ADの発症原因はまだ明らかでは無いが、AD脳において認められる老人斑はアミロイドタンパク質(A β)の脳内蓄積によって形成され、このA β がAD病態形成の根本的な原因あるいは誘導因子と考えられている。脳内でA β が産生されると脳内免疫細胞であるミクログリアが活性化され、活性酸素種(ROS)を生成しADを増悪させるという報告がある。一方で、産生されたROSによりA β の産生が増加し、脳内A β の増加による酸化ストレス亢進によるA β 増加という悪循環が生じると報告され、AD脳を理解し根本的治療法を開発するには、ROS発生の原因となる“酸化ストレス状態”を非侵襲で早期に検知・評価することが重要である。酸化ストレスの発生は脳内でA β の沈着が出現するより早期の段階で起こっているため、酸化ストレスの亢進を検出することは、A β の蓄積やAD病態の発症予測を可能にする手法となる。現在、脳内での酸化ストレス状態の変動を非侵襲かつ高感度で可視化できるのは、ニトロキッド分子をイメージングプローブとする電子常磁性共鳴イメージング法(EPR)である。ニトロキッド分子は体内のレドックス状態を鋭敏に検知しレドックス状態依存的にEPR信号が変化するが、EPRイメージング法はこの信号変化を利用して脳内酸化ストレス指標を画像表示する手法である。

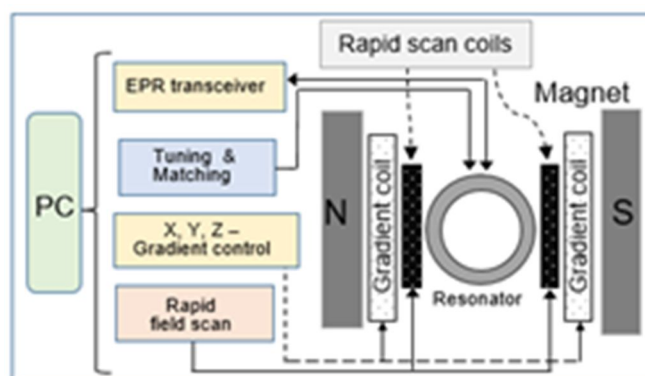
以上の背景から、申請者らはEPRイメージング法を用いADモデルマウスの脳内酸化ストレス動態の可視化技術を開発し、AD病態の発症予測と病態進行度の客観的評価手法の確立をめざすこととした。

2. 研究の目的

アルツハイマー病では、脳内にA β が蓄積するよりも早期の段階で酸化ストレスが亢進している。本研究では、酸化ストレス状態を鋭敏に検知することでADの発症予測が可能なEPRイメージングシステムを開発する。目的達成のため、ADモデルマウス脳内の生理的情報である、レドックス状態、酸素分圧、糖代謝能を測定するイメージングプローブの合成、及び、プローブからの情報を高精度で可視化するEPRイメージング装置を製作する。目的が達成されているかを検証するため、上記の開発システムを用いて、離乳期から老年期までのADモデルマウス脳内のレドックス状態、酸素分圧、糖代謝能を経時的に可視化し、AD発症予測と病態進行度の客観的評価を行う。得られた結果を基に、AD早期診断・評価法の確立を目指す。

3. 研究の方法

・EPRイメージング装置：マウス用イメージング装置は、昨年完成したデジタルEPR装置(特許2017-050576)をベースにrapid-scan coilを追加し、信号を高速に積算することで信号検出感度の向上を目指している(右図：装置概略)。撮像時間は従来の100ミリ秒から大幅に短縮して20ミリ秒まで高速掃引ができるように設計した。同一の撮像時間での測定で比較してみると、少なくとも数十%の高感度化を想定して装置の設計・製作を進めた。



・Nitroxide イメージングプローブ：

レドックス状態評価；従来のプローブ methoxycarbonyl-PROXYL (MCP) よりレドックス状態の変化を敏感に検知するニトロキッド化合物として、Tempone に代表される5種類のnitroxideプローブを評価した。重水素化したTempone (Temp)、Tempo、Carbonyl-PROXYL acetoxymethyl ester (AMCP)、Tempol、hydroxymethyl-PROXYL (HMP)を準備し試験した。これらのプローブは、全て尾静脈投与し、脳内へのイメージングプローブの取り込み活性や、脳内での還元反応速度定数の測定を実施した。

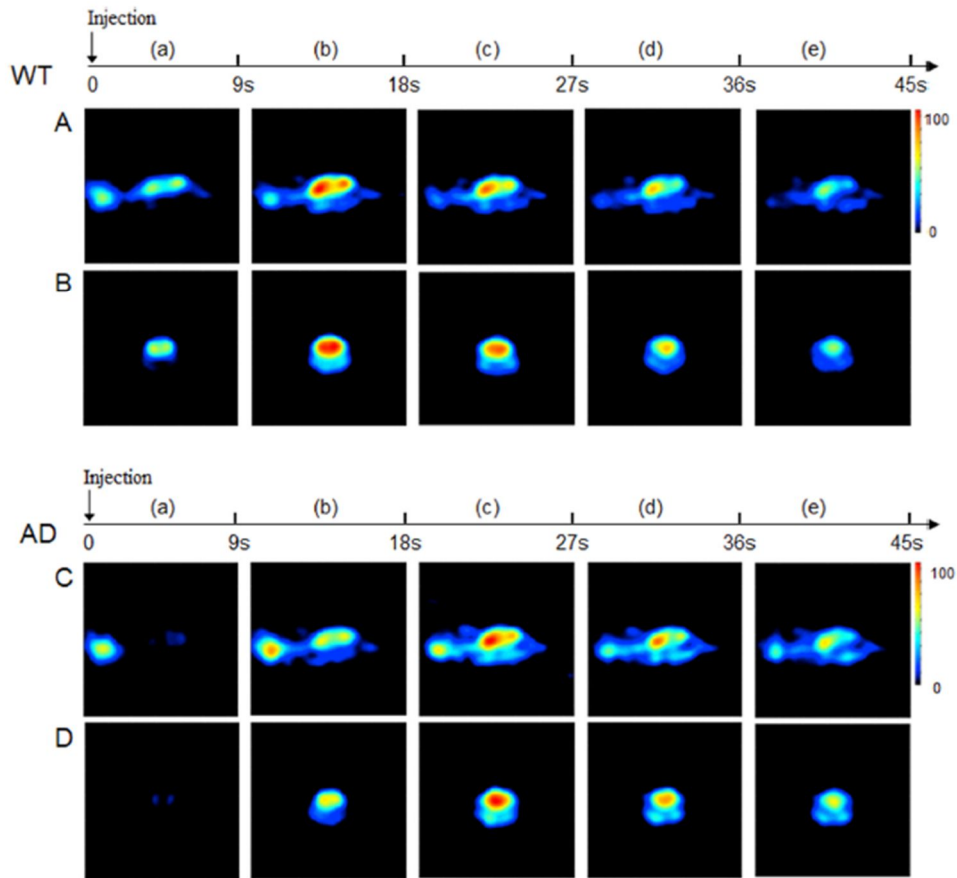
・ADモデルマウス：本課題においてはB6.Cg-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85DboのADマウスを用いてデータを取得した。本モデルマウスはマウスキメリックヒト型遺伝子であるAPP^{swe}と家族性ADから発見された変異遺伝子であるPS1-dE9を組み込んだ遺伝子組み換えマウスであり、ヒトのAD病態を遺伝子レベルで再現したものである。

4. 研究成果

新規開発したオールデジタル化EPRイメージング装置：マウス頭部のレドックスイメージングを可能にするよう、改良を加えた。我々の研究グループに於いて既に開発している従来装置よ

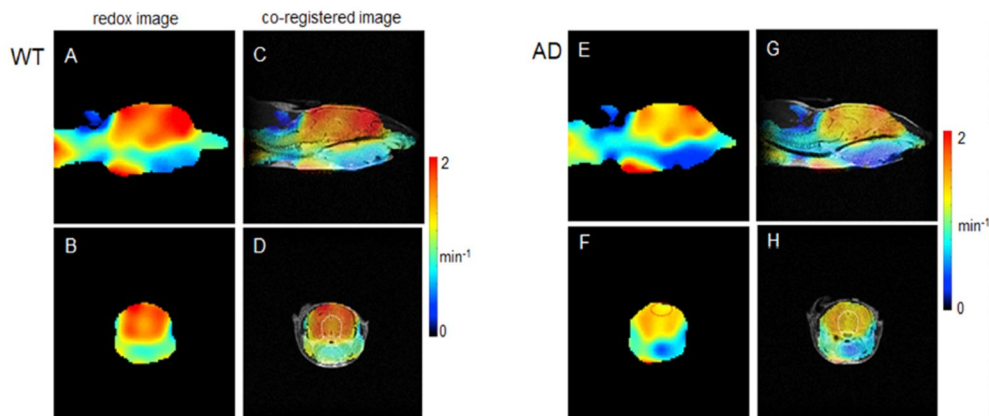
りも 15%程度の感度の向上が見られた。 磁場掃引幅 6mT、掃引速度 40ms、磁場勾配 0.6mT/cm の高速イメージングが可能で、3D イメージングに要する撮像時間は 181 プロジェクションで撮像した場合、約 7sec という撮像時間を達成した。

同一月齢での AD マウスとコントロール (WT) マウスに D 化 Tempone(Temp)を投与して撮像した EPR 画像の経時変化を下図に示した。上段には WT マウス、下段には AD マウスでの二次元 EPR スライス画像の経時変化を示している。A,C では、coronal 方向の、B,D では sagittal 方向に



おけるスライス画像をまとめている。画像強度の時間的変化を両マウスで比較すると、AD マウス脳において画像強度の変化が遅く、AD 脳では WT に比して Temp の還元反応が遅いことが視覚的に読み取れる。

これらの一連の経時的画像データから、プローブ Temp の還元速度定数を 2D スライス画像の各ピクセルごとに求め、Temp の reduction rate map いわゆるレドックスマップを作成した。WT のレドックスマップは下図(左)に、AD のレドックスマップを下図(右)に示した。A,E は sagittal 方向の、B,F は coronal 方向でのマップである。また、これらのレドックスマップをマウス頭部の MRI 画像上に重ね合わせた融合画像を C,D,G,H に示した。



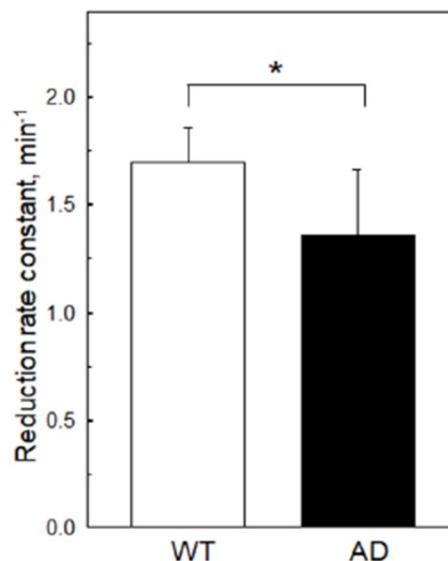
次に、マウス頭部において、A が蓄積しやすい事が明らかとなっている cortex 周辺における

Temp の還元速度定数を融合画像を利用して求めてレドックス状態の指標とした。AD マウスと WT マウスの cortex で求めた速度定数値の比較を行った。結果を右図に示している。WT、AD 両マウス脳の cortex における酸化還元速度定数を比較しているが、明らかに AD マウスの脳内レドックス状態は WT マウスでの脳内レドックス状態とは異なっていることが分かった。

以上の結果から、D 化 Temp をイメージングプローブとしてレドックス状態を評価すると、7 ヶ月齢の AD マウス脳に於いて、既に酸化ストレスの変動が更新していることを明らかにすることが出来た。

MCP をイメージングプローブとした我々の研究報告では、11 ヶ月齢のマウスに於いて初めて脳内酸化ストレスの更新を EPR イメージングで可視化することができていたが、本研究課題のようにレドックス感受性の高い D 化 Temp を使用すると、7 ヶ月齢に於いても脳内酸化ストレスの更新を予測することが可能となった。

本研究成果を利用すれば、AD モデルマウスの脳内レドックス状態の変動を早期に予測ことが可能となり、軽度認知障害 (MCI) の予防のために実施した介入に対する効果をいち早く非侵襲的に評価できる手段となることが期待できる。



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 0件）

1. 著者名 Emoto Miho C., Sato-Akaba Hideo, Hamaue Naoya, Kawanishi Katsuya, Koshino Hisashi, Shimohama Shun, Fujii Hirotada G.	4. 巻 172
2. 論文標題 Early detection of redox imbalance in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 9~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.035	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 Sato-Akaba Hideo, Emoto Miho C., Yamada Ken-ichi, Koshino Hisashi, Fujii Hirotada G.	4. 巻 55
2. 論文標題 Three-dimensional electron paramagnetic resonance imaging of mice using ascorbic acid sensitive nitroxide imaging probes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 950~957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2021.1991918	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 Hideo Sato-Akaba, Yuki Okada, Kentaro Tsuji, Miho Emoto, Hirotada Fujii, Hirotada Fujii	4. 巻 -
2. 論文標題 Design and Fabrication of Compact Arrayed Magnet for Biological EPR Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00723-020-01256-4	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fujii Hirotada G, Sato-Akaba Hideo, Emoto Miho C.
2. 発表標題 Brain imaging of small animals by compact bench-top EPR imager
3. 学会等名 International Society of Magnetic Resonance Conference（国際学会）
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	下濱 俊 (SHIMOHAMA Syun) (60235687)	札幌医科大学・医学部・名誉教授 (20101)	

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