

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21873

研究課題名（和文）低磁場核偏極NMRと深層学習によるon siteメタボローム診断

研究課題名（英文）On site metabolome analysis using ordinal temp and low-field nuclear polarization and deeplearning

研究代表者

松元 慎吾（Matsumoto, Shingo）

北海道大学・情報科学研究院・准教授

研究者番号：90741041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：常温低磁場核偏極技術によりNMR信号の数万倍の高感度化により、生検中の代謝物群をまとめて励起し、NMR測定する高速メタボローム診断法の開発を行った。1.5T NMR装置における¹³C NMR信号が最大7万倍励起まで大幅に向上し、数10 μ Mの濃度の代謝物が¹³C NMRで検出可能となった。一方でコロナ禍での研究制限と初年度の装置故障による遅れが響き、LC/TOF-MSによる疾患特有の代謝変容の同定は既知の疾患マーカー代謝物群に留まった。誘導体化したカルボン酸を含む代謝物群を、フロー方式でサンプル注入、超偏極誘導、分極移動、後処理までの全プロセスの組込み型マイコンによる自動化システムを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの疾患は何からの代謝変容を伴い、血液や尿中に含まれる数百種類の代謝物濃度を網羅的に計測するメタボローム解析により、多様な疾患が特定できることは無数の臨床研究報告からも自明である。一般にメタボローム解析には質量分析や高分解能NMRなどの大掛かりな装置と、数時間に及ぶ測定時間、煩雑なデータ解析が必要であり汎用の臨床検査ツールとしての利用には至っていない。本研究は、臨床現場で網羅的な疾患検出に繋がる高速メタボローム診断法の基盤技術を創出する。

研究成果の概要（英文）：We have developed a high-speed NMR-based metabolome analysis system that collectively polarized metabolites obtained by biopsy and measured by increasing the NMR signals by tens of thousands of times using ordinal temperature and low magnetic field nuclear polarization technology. The ¹³C NMR signal in the 1.5T NMR apparatus was significantly increased up to 70,000 times, and metabolites with a concentration of several tens of μ M could be detected by ¹³C NMR. On the other hand, due to the delay caused by equipment failure in the first year, the identification of disease-specific metabolic changes by LC/TOF-MS remained in the group of known disease marker metabolites. We constructed an automated system using an embedded microcomputer for all processes from sample injection, hyperpolarization induction, polarization transfer, and post-process to the metabolites containing derivatized carboxylic acid by the flow method.

研究分野：情報科学

キーワード：NMR 核偏極 代謝 メタボローム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国民医療費を抑えつつ健康寿命を延長する鍵は、疾患の早期診断・早期治療に繋がる検査技術にある。医療現場の観点からは、血液や尿のような侵襲性の低い液体生検からあらゆる疾患をその場で検出し特定できる検査が理想となる。多くの疾患は何からの代謝変容を伴い、血液や尿中に含まれる数百種類の代謝物濃度を網羅的に計測するメタボローム解析により、多様な疾患が特定できることは無数の臨床研究報告からも自明と言える。しかしながら、一般にメタボローム解析には質量分析や高分解能 NMR などの大掛かりな装置と、数時間に及び測定時間、煩雑なデータ解析が必要であり汎用の臨床検査ツールとしての利用には至っていない。その一方で、代謝物中に天然に存在する安定同位体である ^1H や ^{13}C 核の偏極率を一時的に数万倍に励起する核偏極の技術開発はこの 20 年で飛躍的に進み、核偏極で得られる超高感度を NMR や MRI の高速測定に応用する多くの試みが世界的に見られる。

2. 研究の目的

採取が容易な液体生検から 1 度に様々な疾患をその場で検出できるのは、臨床検査の 1 つの理想形である。この実現には、生検から出来るだけ多くの情報を高速に計測することが必須となる。本課題では、まず、生検中の代謝物群を常温・低磁場核偏極によりまとめて励起できるように効率的な誘導体化手法を検討する。誘導体化した代謝物群に超偏極誘導し、その超高感度を活かして高速測定した核磁気共鳴分光 (NMR) スペクトルを、機械学習により疾患辞書スペクトルを元にパターン認識することで、疾患を瞬時に特定する診断法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 将来に病院内で on site で診断できる装置開発を目指し、液体生検中の代謝物をまとめて高感度センシングする手法としては、研究代表らが近年開発した、量子状態を揃えた水素ガス (パラ水素) を偏極源に常温・低磁場、つまりは普通の部屋で核偏極誘導が可能なパラ水素誘起偏極法 (ParaHydrogen-Induced Polarization, PHIP) を採用する。

(2) この励起法では、炭素多重結合に一重項の水素分子であるパラ水素を付加することにより生成する 2 つの超偏極 ^1H 核から、周囲の他の ^1H 核や ^{13}C 核スピンへと分極 (量子状態) を移動する。水素付加が可能な炭素多重結合を有する代謝物は非常に限られており、カルボン酸を含む多くの代謝物群をまとめて効率的に励起するために、それらの代謝物を、炭素多重結合を含む不飽和アルコールとのエステル体に効率よく誘導体化する反応条件を検討する。

(3) 核偏極装置を小型化かつディスポ化するため、 ^1H - ^{13}C 偏極移動を誘導する量子操作と脱誘導体化のプロセスにマイクロ化学の手法を取り入れ、理想的には 1 枚、難しければ複数枚のスライドガラスサイズのマイクロ化学チップを連結し、全ての検査プロセスを集約することを目指す。並行して、フロー方式でサンプル注入、超偏極誘導、 ^1H - ^{13}C 分極移動、化学処理、分離・精製までの一連のプロセスを組み込み型マイコンにより全自動化するシステムを構築する。

4. 研究成果

(1) PHIP 法による超偏極誘導においては、偏極源として用いるパラ水素ガスの量子状態の純度が、最終的な偏極率 (=NMR 感度に比例) に大きく影響する。通常の水素ガスをパラ水素に変換する自作のパラ水素変換器において、研究開始時はラマン分光法を用いて確認したパラ水素純度が 60-90% とばらつきが見られた。水素ガスの配管が 20K の極低温にした際に収縮し、低温リークが起きていることが原因と考えられたため、GM 冷凍機が入る真空チャンバー内の配管を全て溶接したところ、安定して 90% 以上の純度のパラ水素ガスが得られた。

(2) 不飽和結合を含む誘導体化は、主に酸触媒による脱水縮合およびカルボジイミド系縮合剤を用いる誘導体化を、モデル代謝物セットを用いて検証した。どちらの誘導体化法も、代謝物の構造により反応効率の差や想定外の副反応が見られ、引き続き検討を進める必要がある。カルボン酸を含む代謝物は水溶性のものが多く、誘導体は脂溶性であるため、脱誘導体化せずに誘導体のまま超偏極 NMR 測定を実施する方が、脱誘導体化に必要なアルカリ加水分解や分液操作にともなう超偏極信号のロス (30-50%) が抑制でき、全体として高い検出感度が得られた。

一方で、誘導体のまま超偏極 NMR 測定に掛けると、当然ながら不飽和アルコール側鎖由来の大きな超偏極 NMR ピークと被り、同定できない代謝物ピークが生じる問題がある。将来的には、励起した代謝物誘導体の溶液をそのまま計測するルートと、脱誘導体化した後に NMR 測定する 2 系統に分け、1 度の励起 (パラ水素付加反応とその後の分極移動) で連続して測定することで、問題点を解消する自動測定システムを構築することも視野に置いて、今後の研究開発を進めていく必要がある。

(3) パラ水素ガスによる水素付加反応は数十秒で完結する必要がある、高温・高圧で反応させることに加え、パラ水素ガスを、マイクロスパージャーを用いて粒径約 2 μ m のマイクロバブル化することでガスの表面積を増やし、励起効率へ与える影響を検証した。マイクロバブル化により水素付加反応効率が改善され、必要な反応時間の短縮と他の装置性能の改善効果と合わせて、1.5T の卓上 NMR 装置における ^{13}C NMR 信号が研究開始当初の 2 万倍励起から、最大 7 万倍励起まで大幅に向上し、数 10 μ M の濃度の代謝物が ^1H および ^{13}C NMR で検出可能となった。

(4) 担がん、老化、肝障害、脂肪肝、心筋梗塞のモデルにおいてメタボローム解析による疾患マーカー代謝物のスクリーニングを予定していたが、初年度のコロナ禍による 4 ヶ月の研究制限と、停電に因る LC/TOF-MS 装置の故障による遅れが響き、疾患特有の代謝変容の同定のほとんどは既知の疾患マーカー代謝物に留まった。並行して、免疫組織染色によるタンパク質レベルでの遺伝子発現を脳、肝臓、心臓で調べ、各疾患に特有と考えられる代謝変容に關与する酵素変動の変動を特定した（未発表データのため詳細は記載を控える）。

また、パラ水素ガスによる核偏極誘導に必須の Rh 触媒が、新型コロナ禍の物流停滞等によるベンダー工場の一時的停止により 2021 年 11 月から翌年 3 月まで長期に渡り入手困難となり、急遽予定を変更して、触媒を使用せずに実施可能な励起装置の性能向上と、LC/TOF-MS 装置によるメタボローム解析データを元に作成した仮想の NMR データを用いた MATLAB による機械学習のシミュレーションおよび解析ソフトウェアの開発を中心に研究を進めた。

(5) 上述の方法により不飽和エステル誘導体化したカルボン酸を含む代謝物群を、窒素ガスによる圧送によりフロー方式で水素付加反応容器にサンプル注入、指定したガス圧および反応温度でのパラ水素付加反応による超偏極誘導、パラ水素由来の 2 つの超偏極 ^1H から他の ^1H や ^{13}C 核スピンへの分極移動、必要に応じて脱誘導体化や他の後処理までの全測定プロセスを、IoT などで汎用の組込み型マイコンである PSoC による自動化システムを構築した。誘導体化した代謝物群は誘導体のまま NMR 測定に掛けることも、脱誘導体化して本来の代謝物の化学構造に戻して測定することも可能であるが、脱誘導化のプロセス中にも超偏極信号は減衰するため、感度面では誘導体のまま構造解析の方が有利である結果が得られた。また、現状のシステムでは、効率面から検体に含まれる全ての代謝物に対して、 ^1H - ^{13}C 分極移動を誘導する同じパターンの変動磁場サイクルを与えている。実際には、変動磁場サイクルのうち断熱的再磁化の部分は、各代謝物の化学構造により最適な再時間時間が 1-5 秒の範囲で大きくことなる。このことは、疾患の特定に重要な代謝物あるいは比較的濃度の低い代謝物が、その代謝物にとって変動磁場サイクルが最適でないために相対的に低感度になるリスクを含んでいる。今後の改良点として、励起後の代謝物溶液を複数に分け、それぞれ異なるパターンの分極移動の変動磁場サイクルを与え、それぞれ別々に、あるいはそれらを再度混合して超偏極 NMR 測定に掛けるようなシステムを構築することで、代謝物の構造に依存した最適な変動磁場サイクルパターンが異なる問題を解決できると考える。

また当初は、連続的に卓上 NMR の中で超偏極誘導した検体を流しながら 2D-NMR を測定することを想定していた。しかしながら、実際に NMR 測定を実施すると流速による信号強度の低下が想定よりもはるかに大きく、今後、超偏極誘導装置と卓上 NMR の測定タイミングをリンクし、励起装置の制御用 PC からトリガーを入れることで、励起パルスから信号受信中はサンプルの移動を一時停止させて測定を行うような制御ができれば、検出感度が著しく改善されると見込まれる。

(6) 総括として、本課題は提案時点で予備的検討が出来ていたため、2 年間の短期プロジェクトで計画していた。しかしながら、新型コロナウイルス問題が発生し、4 ヶ月に及ぶ研究室の利用制限、半年に及ぶ必要試薬の入手困難に加えて、停電により代謝解析に用いる LC/TOF-MS 装置の故障もあり、研究期間の半分以上に渡って研究に想定外の支障が生じていた中で、当初予定していた研究計画項目のうち約 8 割を実施・達成することが出来た。残った研究項目は次の研究プロジェクトに引き継ぎ、早期の実用化を目指す。

<参考文献>

- 1) Stewart NJ, Kumeta H, Tomohiro M, Hashimoto T, Hatae N, Matsumoto S. Long-range heteronuclear J-coupling constants in esters: Implications for ^{13}C metabolic MRI by side-arm parahydrogen-induced polarization J Magn Reson. 2018 Nov;296:85-92. doi: 10.1016/j.jmr.2018.08.009.
- 2) Stewart NJ, Nakano H, Sugai S, Tomohiro M, Kase Y, Uchio Y, Yamaguchi T, Matsuo Y, Naganuma T, Takeda N, Nishimura I, Hirata H, Hashimoto T, Matsumoto S. Chemphyschem. 2021 May 17;22(10):915-923. doi: 10.1002/cphc.202001038. Hyperpolarized ^{13}C Magnetic Resonance Imaging of Fumarate Metabolism by Parahydrogen-induced Polarization: A Proof-of-Concept In Vivo Study

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 1件）

1. 発表者名 Shingo Matsumoto ¹ , Neil J. Stewart ¹ , Takuya Hashimoto, Shuto Sugai, Mitsushi Tomohiro, Hitomi Nakano, and Hiroshi Hirata
2. 発表標題 Hyperpolarized ¹³ C MRI of Fumarate Using Selective trans-Alkenylation Catalyst with Parahydrogen.
3. 学会等名 The Inaugural Parahydrogen Enhanced Resonance Meeting (PERM) 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------