

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月18日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21611011

研究課題名（和文）高磁場 MRI/ESR による生体内酸化還元マッピングための新規プローブ開発

研究課題名（英文）Originally Synthesized Oxy-Redox Sensitive Contrast Substances for in vivo Mapping of Tissue Redox and Oxidant Status in Cancer Using High Field MRI

研究代表者 ジェレフ ジフコ（Zhelev Zhivko）

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：60511532

研究成果の概要（和文）：

私は、電解電量計、電子スピン共鳴スペクトル、および T1 強調 MRI を使って、15 種類の酸化還元反応を感受する nitroxide プローブを、その酸化還元ポテンシャル、親水・疎水性およびプロトンの縦緩和能について調べた。プローブ群は、親水性、やや親水性、疎水性からなる 3 つのグループに分けられた。4 つのプローブが MRI を用いた動物実験における組織酸化還元活性のイメージングに適用するために選ばれた。私は、腫瘍の周辺と中心部との間と同様に、早期と中期・終末期の腫瘍ステージにおける組織酸化還元活性に違いがあることを確立した。

研究成果の概要（英文）：

I investigated the redox potential, hydrophobicity and T₁ relaxivity of 15 redox sensitive nitroxide probes, using voltametry, EPR spectroscopy and T₁ weighted MRI. The probes were classified in three groups, depending on their hydrophobicity - hydrophilic, slightly hydrophobic and strongly hydrophobic. In each group the probes were classified in two subgroups, depending on its resistance to reduction - rapidly reducing and slowly reducing. Four probes were selected for application in imaging of tissue redox activity in experimental animals using MRI. I established that there is difference in tissue redox activity between early and moderate/terminal stage of cancer development, as well as between tumor core and tumor periphery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,100,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：医学物理学・放射線技術学

キーワード：MRI, Cancer, Nitroxyl

1. 研究開始当初の背景

フリーラジカルを始めとする生体内レドックス（酸化還元状態）を非侵襲的に評価することが出来れば、腫瘍を始めとする多くの疾

患の評価に有用である。しかし、これまでヒトに応用不可能な電子スピン共鳴法（ESR/EPR）など限られた手法でしか、評価をすることが難しかった。従来は、スピント

ラップ剤として EPR で使用されていたニトロキシル・ラジカル化合物が、最近になって、臨床でも利用される MRI で検出可能なことが示され、その造影効果の減衰曲線から酸化還元状態のイメージングが可能である事が示され始めた。

2. 研究の目的

本研究計画は、化学治療において腫瘍と正常組織の酸化還元状態、酸化状態（酸素分圧マッピングを含む）を低侵襲あるいは無侵襲の in vivo MR イメージングで評価する新しい技術を開発することにある。そのために、(1) 独自に合成した酸化還元センサー・プローブ（脳腫瘍用の抗癌剤ロムスチンと結合したニトロキシル標識化合物）、(2) 酸化状態の減少 (oxy-reduction potentials) に関する NMR 縦緩和時間変化の非線形モデリングのためのミカエリス・メンテンの変法に基づく独自理論を用いる。

3. 研究の方法

開発項目と適用モデルに関しては、研究成果欄に記載した。共通する方法として、①7 テスラ高磁場動物実験用 MRI および齧歯類専用高周波コイルを使用して、10-20 秒程度の早い撮像方法で MRI を撮像した。②ニトロキシル・ラジカル化合物をモデル動物に投与し、その前後の信号強度を連続で撮像した、③得られた信号強度の変化を、投与前と統計的に比較して信号上昇領域を抽出した。

4. 研究成果

平成 21 年度は、電解電量計、電子スピン共鳴スペクトル、および T1 強調 MRI を使って、15 種類の酸化還元反応を感受する nitroxide プローブを、その酸化還元ポテンシャル、親水・疎水性およびプロトンの縦緩和能について調べた。プローブ群は、親水性、やや親水性、疎水性からなる 3 つのグループに分けられた。4 つのプローブが MRI を用いた動物実験における組織酸化還元活性のイメージングに適用するために選ばれた。次の動物が使用された：nude mice (Balb6; mean weight ~25 g) - healthy mice (control group) および cancer-bearing mice (neuroblastoma)。移植後 7~8 日で腫瘍は 2-3 mm に成長した。担癌モデルは、neuroblastoma に加え、neuro2a についても検討された。MRI の撮像は、FLASH シーケンスによる非コヒーレンス型の T1 強調画像を用い、7T MRI にて isoflurane 麻酔下(1-1.5%, マスク)にて確実な頭部固定を行って撮像された。nitroxide probe は、MRI の連続撮像の最中に、尾静脈より投与され、25 分間継続して撮像し、信号強度の経時的な変化を解析した。対照モデルの正常組織と担癌モデルの

周辺の正常と考えられる組織との間で顕著な、信号減衰の差が見られた。本年度は、in vivo における最初の試験であり、今後、例数を増やし、統計的な記述を行う。

平成 22 年度は、(1) 担癌マウスの準備：大腸癌細胞 (colon26) の皮下移植担癌マウス (移植後 2~6 週目) を使用し、in vivo 実験を行った。(2) 独自に合成されたニトロキシル派生物から、oxy-reduction potentials と抗酸化作用を考慮し、invitro 実験に使用するロットを選択した。本実験のために (A) voltametry を用いて、ニトロキシル派生物の oxy-reduction potentials を選択したロットが十分に機能を有しているか計測、(B) 電子スピン共鳴スペクトル法のスペクトル解析を用いて、抗酸化作用を試験した。(3) 担癌マウスにおいてニトロキシル派生物の経静脈投与後の分布を MR イメージングにて可視化する。7T-MRI (放医研と JASTEC の共同開発、Bruker 社製コンソール) およびマウス体幹専用の 2 チャンネル・フェイズドアレイ RF コイルを使用した。マウスの全身を撮像し、脳、肝臓、腎臓、腫瘍部などにおけるニトロキシル派生物の動態を解析した。(4) 担癌マウスにおいて、正常組織と腫瘍組織において、ニトロキシル派生物から発生する信号の違いを解析した。正常組織では酸化状態がとても飽和的であるのに対して、腫瘍部では、フリーラジカルの酸化作用であったとしても、酸化に対して強い抵抗性を示す事が知られている。腫瘍を持つ個体において、その正常組織において、MRI の信号減衰が遅れる傾向を示した。

平成 23 年度は、昨年度までに準備した実施しない担癌マウスを、独自に合成されたニトロキシル派生物から、oxy-reduction potentials と抗酸化作用を考慮し、invitro 実験に使用するロットを選択、MR 容積測定を用いて、ニトロキシル派生物の oxy-reduction potentials を選択したロットが十分に機能を有しているか計測、電子スピン共鳴スペクトル法のスペクトル解析を用いて、抗酸化作用を試験した。治療を実施する担癌マウスに対して、(1) 担癌マウスの治療として、全ての担癌マウス (神経芽細胞腫同所移植、大腸がん皮下移植、グリオーマ同所移植、および対照) に、抗がん剤ロムスチン治療を実施、(2) 高磁場 MRI を用いて、抗がん剤ロムスチン治療における腫瘍の増殖を可視化し評価、(3) ロムスチン治療後の担癌マウスにおいて、4 種類のニトロキシル派生物の経静脈投与後のダイナミクスを MRI にて可視化し、ニトロキシル派生物の動態を解析した。(4) 縦緩和時間の変化を半減期を指標に解析し、酸化還元のマッピングを作成、各モデルで特徴的な結果を得た。本法は、がん組織評価法と有用と考えられた。

これらの結果は、英語論文にまとめ、成果として国際誌に発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Bakalova R, Zhelev Z, Kokuryo D, Spasov L, Aoki I, Saga T. Chemical nature and structure of organic coating of quantum dots is crucial for their application in imaging diagnostics. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1719-32. Epub 2011 Aug 18.
- ② Tomizawa A, Ishii I, Zhelev Z, Aoki I, Shibata S, Kitada M, Bakalova R. Carbamoyl-PROXYL-enhanced MRI detects very small disruptions in brain vascular permeability induced by dietary cholesterol. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Dec;1810(12):1309-16. Epub 2011 Jun 29.
- ③ Tomizawa A, Hadjidekov G, Ishii I, Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Saga T, Kitada M. Nitroxide derivatives for imaging of hypercholesterolemia-induced kidney dysfunction and assessing the effectiveness of antilipidemic drugs. *Mol Pharm*. 2011 Oct 3;8(5):1962-9. Epub 2011 Aug 15.
- ④ Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Gadjeva V, Kanno I. Imaging of cancer by redox-mediated mechanism: a radical diagnostic approach. *Mol Biosyst*. 2010 Dec;6(12):2386-8. Epub 2010 Oct 8.
- ⑤ Zhelev Z, Matsumoto K, Gadjeva V, Bakalova R, Aoki I, Zheleva A, Anzai K. EPR signal reduction kinetic of several nitroxyl derivatives in blood in vitro and in vivo. *Gen Physiol Biophys*. 2009 Dec;28(4):356-62.
- ⑥ Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Matsumoto K, Gadjeva V, Anzai K, Kanno I. Nitroxyl radicals for labeling of conventional therapeutics and noninvasive magnetic resonance imaging of their permeability for blood-brain barrier: relationship between structure, blood clearance, and MRI signal dynamic in the brain. *Mol Pharm*. 2009 Mar-Apr;6(2):504-12.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Zhelev Z, K. Matsumoto, V. Gadjeva, A. Zheleva, R. Bakalova, I. Aoki, and K. Anzai. - EPR signal dynamic of several nitroxyl-labeled anticancer drugs in blood in vitro and in vivo,

5th International Conference on Nitroxide Radicals SPIN' 2008, September 7-11, 2008, Ancona, Italy (P-22).

- ② Zhelev Z., R. Bakalova, K. Matsumoto, I. Aoki, V. Gadjeva, K. Anzai, and I. Kanno. - Nitroxyl labels in brain imaging using T1-weighted MRI, 5th International Conference on Nitroxide Radicals SPIN' 2008, September 7-11, 2008, Ancona, Italy (P-59).
- ③ Zhelev Z., Bakalova R., Matsumoto K., Aoki I., Gadjeva V., Anzai K., Kanno I. - Nitroxide radicals in brain imaging using T1 weighted MRI, Annual Meeting of the Japanese Society for Molecular Imaging, Tokyo, May 2009, Vol. 2, No. 2, p. 114.
- ④ Zhelev Z., Bakalova R., Matsumoto K., Aoki I., Gadjeva V., Zheleva A., Anzai K., Kanno I. - Real-time MRI of blood-brain barrier permeability of conventional therapeutics using nitroxides as spin-labels, 4th European Molecular Imaging Meeting, Barcelona, Spain, May 27-30, 2009-11-24.
- ⑤ Zhelev Z., Bakalova R., Saito S., Aoki I., Gadjeva V., Kanno I. - Diagnostic Potential of Nitroxide Radicals in Cancer Using Magnetic Resonance Imaging Tomography, First International Workshop "Antioxidants and Health Protection, November 1-3, 2009, Stara Zagora, Bulgaria.
- ⑥ Bakalova, R., Z. Zhelev, S. Shibata, L. Spasov, and I. Aoki. - Nitroxide probes as redox sensors for imaging of cancer in vivo, International Conference on Biomaterials Science, March 15-18, 2011, Tsukuba, Japan.
- ⑦ Zhelev, Z., R. Bakalova, S. Shibata, L. Spasov, and I. Aoki. - Magnetic resonance imaging of redox activity in the brain of normal and cancer-bearing mammals: a radical diagnostic approach, XXVth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function, May 24-28, 2011, Barcelona, Spain.
- ⑧ Bakalova, R., I. Ishii, Z. Zhelev, S. Shibata, I. Aoki, and M. Kitada. - Magnetic resonance imaging of very small disruptions of blood vessel

permeability in hypercholesterolemia mice using nitroxide probes, Annual Conference of the Japanese Society for Molecular Imaging, May 21-23, 2010, Kyoto, Japan, JSMI Report '2010, p. 85.

〔その他〕

メディアによるアウトリーチ活動：
NHK 国際放送「効き目が見える抗がん剤」ラジオジャパン・フォーカス，2009年5月18日（月）放送

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ジェレフ ジフコ (Zhelev Zhivko)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：60511532

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

青木伊知男 (AOKI ICHIO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・チームリーダー

研究者番号：10319519

バカロバ ルミアナ (Bakalova Rumiana)

独立行政法人放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：30469936