

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790049

研究課題名（和文） 生体内レドックス・酸素濃度の高解像度3Dマッピング法の開発

研究課題名（英文） Development of 3D mapping technique of redox state and oxygen in vivo

研究代表者

安川 圭司（YASUKAWA KEIJI）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：80372738

研究成果の概要（和文）：本研究では、レドックスと酸素濃度の両方を非侵襲かつ高解像度で検出するオーバーハウザーMRI(OMRI)とMRIの3D融合システムを開発し、消化器系疾患の病態解析への応用を目指した。擬似試料での酸素濃度重畳アルゴリズムを検証した。しかし、十分な精度での3D情報取得には、OMRIの時間分解能向上が望まれた。大腸炎モデルマウスで、炎症進展に伴い直腸局所から大腸全体に炎症性シグナル、レドックス変動が広がることを明らかにした。今後、OMRIの性能向上によるレドックス・酸素濃度の解析精度向上が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study is aimed to develop the 3D mapping technique of Overhauser-enhanced MRI (OMRI), which provides non-invasively both redox status and oxygen with high-resolution, and MRI and to apply it to the mechanism analysis for gastrointestinal diseases. The algorithms for oxygen image and its superimposition with redox image were verified using a phantom. However, it was needed to improve the time-resolution of OMRI to obtain 3D information with adequate accuracy. It was founded that inflammatory signal pathways and the downstream redox change expanded from the rectum toward the whole large intestine during the development of dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. In near future, the improvement of accuracy precision of redox status and oxygen concentration would be expected if the performance upgrade of OMRI is achieved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：イメージング、レドックス、酸素濃度、炎症

1. 研究開始当初の背景

健康な生体では、ミトコンドリア電子伝達系などから発生する活性酸素(ROS)・フリーラジカルとそれらを消去するアスコルビン酸やグルタチオン、スーパーオキシドジスムターゼなどの抗酸化物質が均衡を保つ「レド

ックスバランス」が成立している。しかし、化学物質や紫外線、ストレスなどの外的因子や遺伝的因子などによって過剰なROS・フリーラジカルが産生しバランスが破綻すると、それが引き金となって様々な疾患を誘発すると考えられている。よって、レドックスバランス異常の捕捉は疾患の予防や早期診断

に、レドックスバランス正常化作用を有する化合物評価法の確立は新たな創薬シーズの創出に繋がるものと期待される。

また、腫瘍組織ではレドックス変動と併せて急激な血管新生などによる低酸素状態が認められることから、酸素濃度計測（オキシメトリー）により腫瘍進展の程度を推測できると期待される。

オーバーハウザーMRI(OMRI)は、電子スピンの飽和すると核スピンの偏極し NMR 信号が増強される現象を利用して、ESR マイクロ波 ON 画像から OFF 画像の差によりフリーラジカル画像を得る装置であり、レドックス状態や酸素濃度、pH 情報の画像化が報告されている(Krishna M.C. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (2002), Khramtsov V.V. *et al.* J Magn. Reson. (2010))。それに加えて、組織での酸素濃度と組織透過性の同時画像化(Matsumoto S. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (2009))や膜透過性の異なる ^{14}N 、 ^{15}N 体ニトロキシラジカルを用いたリポソーム膜内外のレドックス画像化(Utsumi H. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (2006))も報告されており、多様な生体情報の個体イメージングが可能である。しかも、撮像原理は MRI に基づくため、従来のフリーラジカル画像化装置である電子スピン共鳴画像化装置(ESRI)においてラジカルの ESR 線幅が広い為空間分解能は数 mm に限られるという問題は解決することから、ESRI に替わる新規ラジカル画像化装置として非常に期待できる。

これまでに、本装置を用いてマウス撮像を試み、胃や腸管に滞留したニトロキシラジカルの撮像に成功している。しかし、二次元画像であるため、ニトロキシラジカルの分布領域と臓器や組織との空間的な位置関係を推測することは困難である。その問題点の解決策として、三次元(3D)OMRI 画像より得られるレドックス情報と 3D の MRI 画像により得られる解剖学的情報との融合による空間的な部位の同定が非常に有効と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、OMRI 画像から得られるレドックス変動や酸素分圧に関する情報と MRI 画像から得られる解剖学的情報を三次元的に融合する生体内レドックス・酸素濃度のマッピング法を開発し、病態モデルで病態機序解析への有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

酸素濃度・重畳プログラムの作成と検証

ソフト開発は OS Windows 7 搭載パソコンにて Visual Basic 言語で作成した。

酸素濃度画像プログラムは Matsumoto S. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (2009)の手法に基づいて作成した。酸素濃度計算の検証を行うため、酸素濃度感受性の triarylmethyl (TAM) ラジカルから構成される擬似試料を作成して OMRI 撮像を行った。

OMRI 撮像条件：MRI 磁場 18.6 mT、NMR 周波数 791 kHz、ESR 照射周波数 522.1 MHz、ESR 磁場 18.6 mT、ESR 出力 4.07 W (高出力) および 0.12 W (低出力)、 $T_R/T_E/T_{ESR} = 1000/40/90$ ms、FOV 40×40 mm、matrix 64×64 、スライス厚 100 mm

また、重畳プログラムにおける重畳処理は以下の通りである。

- (1)重畳用画像ボクセルの初期設定 (各方向サイズ、FOV)、画像データ選択
- (2)オリジナルの OMRI または MRI 画像とでサイズが異なる場合には線形補間を行い、重畳用画像ボクセルを埋める。
- (3)円形画像のパターン認識アルゴリズムを用いてマーカー位置を推定し、位置ずれの程度を算出し、補正を行う。
- (4)MRI、X 線 CT、PET 間での重畳を参考に、3D ボリュームレンダリング表示や 3D データから任意のスライスでの OMRI 画像、MRI 画像表示を行う。

病態モデルでの検討

後述の通り、十分な精度での 3D 情報取得には、更なる OMRI の時間分解能向上が望まれることが判明したことから、検証に適した病態モデルの検討を行った。

病態モデルとしては、ヒト潰瘍性大腸炎の実験動物モデルとして汎用されているデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)惹起大腸炎モデルを用いた。DSS 惹起大腸炎は ICR マウス (雄性、5 週齢) に 4%または 5%DSS (分子量 5,000) を 1 週間自由飲水させることで作成した。マウスをウレタン麻酔下、仰臥位で固定し膜透過・非膜透過プローブの混合溶液を注腸し、OMRI 撮像を 15 分間行った。

OMRI 撮像条件：MRI 磁場 14.53 mT、NMR 周波数 617 kHz、ESR 照射周波数 220.6 MHz、ESR 磁場 6.075 mT (膜透過) 6.535 mT (非膜透過)、ESR 出力 53.8 W、 $T_R/T_E/T_{ESR} = 1200/25/500$ ms、FOV 48×48 mm、matrix 64×64 、スライス厚 30 mm

非特異的 NOS 阻害剤 L-NAME (40 mg/kg

/day)と iNOS 特異的阻害剤アミノグアニジン (AG, 40 mg/kg/day)は DSS 飲水開始時より 1 日 2 回経口投与し、NO 捕捉剤 carboxy-PTIO (12 mg/kg/day)は DSS 飲水 4 日目より 1 日 2 回注腸した。

4. 研究成果

まず、酸素濃度計算アルゴリズムの検証を行う目的で、Excel マクロで酸素濃度画像プログラムを作成した。図 1 のように、異なる酸素濃度条件下(0, 1, 2, 5, 8, 20%酸素)での酸素濃度感受性ラジカル(2 mM TAM)を含む擬似試料を調製し、ESR 高出力照射時と低出力照射時の 2 枚の OMRI 画像を取得した。得られた画像に酸素濃度画像プログラムを適用し、酸素濃度画像を得た。各信号領域の中心に近い正方形(3×3 ピクセル)を選択し、その平均値と実測値との関係を調べた。その結果、求めた計算値と実測値の間で非常に良い相関が得られたことから、酸素濃度計算アルゴリズムの正当性を確認し、本 OMRI システムでの酸素濃度計測手法を確立した。

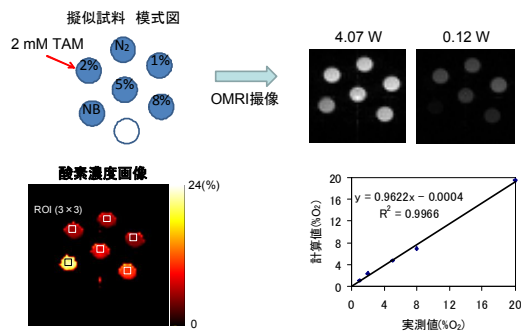


図 1 擬似試料を用いた酸素濃度計測法の検証

次に、重畳プログラムを作成し、3D で OMRI と MRI の重畳精度を検証した。一方、既存の OMRI 装置では、マルチスライス撮像に対応しておらず、複数枚のスライス撮像には数分から 10 分程度を要する。特に、レドックス情報は、外来的に投与された造影剤の画像輝度変化の速度を評価するため、十分な精度での 3D 情報取得には、更なる OMRI の時間分解能向上が望まれた。現在、高分解能化を目指し OMRI 装置改良が鋭意進められているところであるが、病態モデルでの検証が困難と判断した。そこで、炎症モデルでの 3D 解析を円滑に進め、病態機序の解明に繋げる目的で、2D の OMRI 画像解析を行い、炎症の発症・進展過程でのレドックス変動領域の同定を検討することにした。

一方、ヒト潰瘍性大腸炎の実験動物モデル

として DSS 惹起大腸炎モデルが汎用されている。当研究室の実験系では、5%DSS をマウスに飲水開始させて 3~5 日目には主に直腸で発症し、その後、7 日目には結腸に拡大した。当研究室ではすでに、生体計測 ESR 法を用いて、DSS 3 日目よりレドックスが変化し、5 日目では細胞内で活性酸素が産生し、7 日目では細胞内外で活性酸素が産生することを明らかにした。しかし、生体計測 ESR 法はスペクトル情報であるため位置に関する情報は得られない。よって、炎症の発症・進展過程でのレドックス変動領域を検討する病態モデルとして、DSS 惹起大腸炎モデルを選択し、DSS 大腸炎マウスにおける炎症部位とレドックス変動およびその上流のシグナル伝達との関連を検討した。

DSS 大腸炎マウスに膜透過・非透過プロブ剤の混合溶液を注腸し、OMRI 装置で 2 次元画像を撮像し、レドックス変動部位を検討した。その結果、DSS5 日目では直腸の細胞内で活性酸素種(ROS)が産生し 7 日目では大腸全体の細胞内外で ROS が産生することが明らかとなった(図 2)。また、それらの ROS 産生は AG 処置により抑制されたのに対し、L-NAME 処置では逆に増加した。

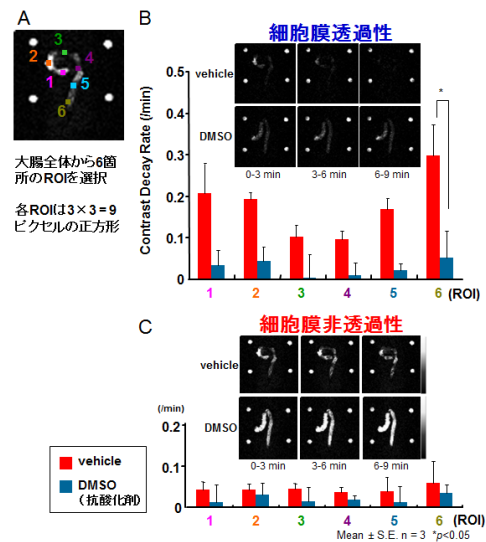


図 2 OMRI を用いた DSS 大腸炎マウス(7 日目)のレドックス変動部位の検討
A: 関心領域(ROI)、B・C: 細胞膜内(B)、外(C)の OMRI 画像と各 ROI での ROS 産生

また、DSS5 日目に、結腸下部と直腸で iNOS 由来の NO 産生が増強し、炎症性サイトカイン TNF-alpha 産生が誘導された。同じく 5 日目に、大腸全体において、内皮接着分子 ICAM-1 や P-selectin の発現が増強し、好中球浸潤が増加した。これらの増加は、AG や c-PTIO の処置によりほぼ完全に抑制された

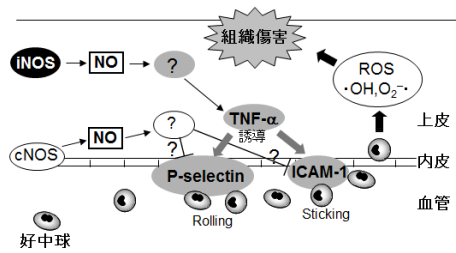


図3 DSS大腸炎の進行と活性酸素産生

のに対し、L-NAME 処置によりさらに増加した。以上より、DSSにより結腸下部と直腸で発現増強した iNOS 由来の NO は、炎症性サイトカイン TNF-alpha 産生を誘導し、大腸全体における内皮接着分子 ICAM-1 や P-selectin の発現を増強させ、好中球浸潤を引き起こすことで活性酸素産生を増大し、病態形成に関与することが示唆された(図3)。

今後、OMRI の性能向上により詳細な部位解析ができれば、炎症や腫瘍の発症・進展過程でのレドックス変動領域を同定する精度が格段に向上し、レドックス関連病態解析や新薬シーズ創出への展開が期待される。また、OMRI では、生体に投与するラジカル種、撮像シーケンス等を変えることで組織 pH に関する情報や異なる生体情報の同時分離画像も得られることから、これらの高解像度 3D 融合画像化による病態解析等への展開も期待できる。将来的に、より高磁場の MRI 磁石を用いた OMRI 装置の開発により MRI によるレドックス情報も付加されることで、肺や腎臓、脳などニトロキシルラジカル消失の比較的速い臓器でのレドックス変動や酸素濃度等と解剖学的情報の高解像度 3D 融合画像も可能になることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. K. Yasukawa, H. Tokuda, X. Tun, K. Yamada: The detrimental effect of nitric oxide on tissue is associated with inflammatory events in the vascular endothelium and neutrophils in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis. Free Radical Research, 査読有, 46, 1427-1436 (2012), doi: 10.3109/10715762.2012.732698

[学会発表] (計6件)

1. 安川圭司、徳田裕人、トンシン、内海英雄、山田健一: DSS 誘発大腸炎における NO の傷害作用は血管内皮-好中球炎症イベントが関与

する、日本薬学会第 133 年会、平成 25 年 3 月 29 日(横浜)

2. 安川圭司、徳田裕人、トンシン、内海英雄、山田健一: DSS 大腸炎マウスにおける NO 産生と血管内皮-好中球炎症イベントとの関連、第 29 回日本薬学会九州支部大会、平成 24 年 12 月 9 日(熊本)

3. 安川圭司、徳田裕人、トンシン、内海英雄、山田健一: DSS 大腸炎マウスにおける NO 産生の血管内皮-好中球炎症イベントに及ぼす影響、第 51 回電子スピンスイエンシ学会年会、平成 24 年 11 月 3 日(札幌)

4. 安川圭司、徳田裕人、山田和範、トンシン、市川和洋、内海英雄、山田健一: NO 阻害剤の DSS 誘発大腸炎マウス大腸内レドックス状態に及ぼす影響のオーバーハウザー MRI を用いた画像評価、第 12 回日本 NO 学会学術集会、平成 24 年 6 月 28 日(神戸)

5. 安川圭司、山田健一: 消化器系疾患における生体レドックスイメージングに関する研究、第 5 回薬学研究フォーラム in 東京、平成 23 年 11 月 14 日(東京)

6. K. Yasukawa, H. Tokuda, K. Yamada, H. Utsumi: Redox mapping using Overhauser-enhanced MRI in colons of mice with DSS-induced colitis. EUROMAR2011, 平成 23 年 8 月 22 日(ドイツ フランクフルト)

[その他]

ホームページ

<http://kaiseki.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安川 圭司 (YASUKAWA KEIJI)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80372738

(2)研究協力者

山田 健一 (YAMADA KEN-ICHI)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：60346806

市川 和洋 (ICHIKAWA KAZUHIRO)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授

研究者番号：10271115

兵藤 文紀 (Hyodo Fuminori)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号：10380693