

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253005

研究課題名(和文) OMRIの特性に着目したヒト診断用レドックス解析法の開発

研究課題名(英文) Development of free radical imaging using in vivo DNP-MRI

研究代表者

内海 英雄 (Utsumi, Hideo)

静岡県立大学・薬学部・その他

研究者番号：20101694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNP-MRI(OMRI:Overhauser-MRI)は動的核偏極を用いた新たなフリーラジカルイメージング法である。本研究の目的は、ヒトへの適用性を視野に入れ新たなレドックスイメージングプローブ法を開発することである。今回の研究で以下の成果が得られた。

- 1) CoQ, FADなどから生じる広幅かつ多分裂吸収線を与えるフリーラジカルを複数種同時に可視化できる方法を見出した。
- 2) マウスにmelanomaを移植し移植後軽日的に画像解析した結果、がん組織が増大する前にフリーラジカルが発生すること、ホクロは像を与えないこと、が示された。

研究成果の概要(英文)：Redox reactions that generate free radical intermediates are essential to metabolic processes, and their intermediates can produce reactive oxygen species, which may promote diseases related to oxidative stress. The dynamic nuclear polarization magnetic resonance imaging (DNP-MRI) is a new imaging method for observing free radical species in vivo. We have re-constructed in vivo DNP-MRI system. The external magnetic field are 20 mT for EPR irradiation and 1.5T for MRI. The resolution of free radical imaging with DNP-MRI is comparable with that in MRI. To demonstrate the capabilities of in vivo DNP-MRI to simultaneously image free radical intermediates generated through redox reactions, phantoms filled with either FMNH, FADH, CoQ10H, vitamins E and K radicals, or carbamoyl-PROXYL were simultaneously imaged using a home-made in vivo DNP-MRI system. Melanin, which is a dye in melanoma, is a free radical and we succeeded its imaging melanin from melanoma in mouse using in vivo DNP-MRI.

研究分野：物理薬学

キーワード：磁気共鳴学 フリーラジカル 画像解析学

1. 研究開始当初の背景

近年、生体レドックス制御の破綻により様々な酸化ストレス疾患の発症・病態悪化をもたらすことが明らかになりつつある。この酸化ストレス疾患の予防・治療・医薬の開発にはレドックス制御異常を生体個体そのもので画像解析することはきわめて重要であり、世界中で先端研究が進められている。申請者は(独)医薬品医療機器総合機構審査担当理事を勤め、大学での基礎研究で得た成果・シーズを医療現場で活用することの重要性を痛感し、出口を意識した新たな研究戦略が肝要と考えるに至った。1988年にLurieが開発したDNP-MRIはオーバーハウザー効果でフリーラジカルと相互作用する水分子を分極させ可視化する方法である。申請者は、(独)科学技術振興機構 先端計測分析技術・機器開発事業の支援を受け、2007年に1.5テスラのMRI磁場をもつDNP-MRIの試作に成功し、この成果をもとに、ヒト診断用装置の開発を進めている。

2. 研究の目的

ヒトの体内診断薬として用いるには、安全性に関し、医薬品と同様に非臨床試験や治験など長期にわたる種々の試験が不可欠で10年以上の開発を要する。ヒト診断用に最適なレドックスプローブは内因性フリーラジカルであり、CoQやFAD、ビタミンC、Eなどはレドックス代謝で中間体ラジカルを形成することが古くから知られていた。しかし、そのESRスペクトルは広幅かつ複雑でESRイメージング法では可視化ができなかった。DNP-MRIはラジカルを励起し水の水素核を分極し可視化する方法であり、複雑・広幅なラジカルでも可視化が可能である。本研究目的はこのDNP-MRIの特性に着目して、ヒト診断用機器とするために、有効なレドックス解析法の開発である。

3. 研究の方法

次の一連の基礎研究を行う。

1) 内因性物質由来ラジカルや上市医薬品を中心に生体内レドックスプローブの探索と最適化

1960年後半から電子伝達系補酵素の一電子還元体(FMNH, FADH, CoQ10H)やビタミンC、EなどがESR解析され、これらフリーラジカルが複雑で広幅スペクトルを与えることが知られていた。そこで、これらフリーラジカルラジカルもDNP-MRIなら可視化が可能と考え、水溶性CoQで実験した結果、CoQをアルカリ下、あるいは他の電子供与体共存下で発生させたユビセキノラジカルがDNP-MRIにより可視化できることを明らかにしてきた。

体内診断薬として早期に臨床試験に入るには、すでに医薬品として承認されていることが望ましい。ラジカル変化性、レドックス応答性の

観点から上市医薬品を探索した結果、活性型ビタミンB₂としてFAD注射剤が市販されており、静脈内ないし筋肉内投与が行われている。このFADもCoQと同じ条件でラジカル中間体を形成し、線幅が35 Gaussの広幅スペクトルを与える。卓上型汎用DNP-MRI(15ミリテスラ)で可視化を試みた結果、濃度依存的にDNP-MRI画像が得られ、マウスに筋肉内投与した後で明瞭なラジカル画像が撮像された。そこで、ビタミンEなどを含め、一連の生体由来物質について活性酸素や生体レドックスへの応答性を明らかにし、診断薬としての最適化を図る。

2) 酸化ストレス疾患モデルに適用しレドックスイメージング法として最適化

装置とプローブを最適化し、システム化するためには、種々の動物モデルで有効性・安全性を検討することが不可欠である。申請者は既に生体計測ESRIを用いて、多くの疾患モデルでの活性酸素・レドックスと病態の成因・増悪との関係を明らかにしてきた。また、メラノーマ中のメラニンラジカルに関しても、メラノーマ細胞移植マウスで生体計測ESRIを用いて可視化が試みられてきた。そこで、これらモデルを実際に適用し、ヒトでの有効性に向け、非臨床研究を行う。具体的には、ミトコンドリア病や脳梗塞、高血圧症、がんなどの酸化ストレス疾患モデルで、レドックス変動の画像解析に着手する。なお、これらの病態モデルは既に作成済みであり、直ちに研究に着手可能である。

4. 研究成果

ヒトへの適用性を視野に入れ安全性を担保した新たなレドックスイメージング解析法の開発を行った。

MRIは医療機器のクラスIIに分類されることから認証機構での認証を得て医療現場に活用可能となる。しかし、本DNP-MRI装置はDNP現象を活用してレドックス代謝イメージングを行うことから、POP(Proof of Principle)とPOC(Proof of Concept)が求められる。そこで、安全性・安定性・有用性に関して臨床現場を意識した非臨床基礎研究を行い以下の成果を得た。

1) 内因性物質由来ラジカルや上市医薬品を中心に生体内レドックスプローブの探索と最適化

内因性物質由来ラジカルとしてミトコンドリアの電子伝達系補酵素の一電子還元体であるFMNHとFADH、電子伝達分子であるCoQ10Hとvitamin Kラジカル並びに抗酸化剤であるvitamins Cとvitamins Eラジカルを選びDNP-MRIで可視化が可能であるかを検討した。フリーラジカルのDNP効果は先鋭なESRスペクトルを有するラジカルが有効と考えられており、その観点からはvitamins Cが最も有力な候補である。しか

し、十分な DNP 効果を発揮するほどのラジカル量を産生することが困難であった。一方、FMNH、FADH、CoQ10H、vitamin K ラジカル及び vitamins E ラジカルは広幅かつ多分裂の ESR 吸収線を与えるため、これまで ESR イメージング法では可視化できなかった。また、これらのフリーラジカルは、これまで汎用されてきた DNP 効果の記述式からは DNP-MRI で可視化が困難とされる。しかし、実際に検討した結果、高感度で可視化できることが見出された。また、FAD として市販の FAD 注射剤を用いたところ、全く同様に FAD ラジカルが発生し可視化できることが示された。加えて、これらのラジカルを分光学的に同時可視化も可能であることを新たに見出した。これらのことは DNP 効果の機構が従来の考えより複雑である可能性を示唆している。以上の結果から、内因性物質由来ラジカルとしてミトコンドリアの電子伝達系補酵素の一電子還元体である FMNH と FADH、電子伝達分子である CoQ10H と vitamin K ラジカルが DNP-MRI で十分可視化できることを示すとともに、臨床応用への道を大きく前進させる成果が得られた。

2) 酸化ストレス疾患モデルに適用しレドックスイメージング法として最適化

前から melanoma を移植しマウスで melanoma に存在するメラニンラジカルを ESR イメージング法で可視化した論文が複数報告されている。このメラニンラジカル及び melanoma が DNP-MRI で可視化できるかを検討した。メラニンとしてイカのシミ由来のユーメラニンを用いて検討したところ低感度ながら可視化できた。また、melanoma をマウスに移植し移植部位を DNP-MRI で解析した。その結果、感度は低いものの可視化が可能であることを示唆する知見が得られた。

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17件)

- Eto H, Hyodo F, Kosem N, Kobayashi R, Yasukawa K, Nakao M, Kiniwa M, Utsumi H. Redox imaging of skeletal muscle using in vivo OMRI and its application to an animal model of local inflammation, *Free Radic. Biol. Med.*, in press 2016
- Meenakumari Y, Utsumi H, Jawahar A, Benial AM; ESR line width and line shape dependence of Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging; *Applied Magnetic Resonance* in press 2015
- Maulucci G, Bačić G, Bridel L, Yalçın AS, Schmidt H, Stocker R, Utsumi H, and Spirito M, Imaging ROS and ROS-induced Modifications in living systems, *Antioxi. Redox Signal*, in press 2015
- Utsumi H, Hyodo F. Free Radical Imaging using *in vivo* Dynamic Nuclear Polarization - *MRI Methods in Enzymology* 564 554-571 2015
- Benial AM, Dhas MK, Ichikawa K, Yamada K, Hyodo F, Jawahar A, Utsumi H. Diffusion studies of redox-sensitive nitroxyl spin probes through bilayer lipid membranes using 300 MHz electron spin resonance spectrometer. *Biofizika*. 60(1) 88-94 2015
- Isegawa K, Hirooka Y, Kishi T, Yasukawa K, Utsumi H, Sunagawa K. Benefit of azilsartan on blood pressure elevation around rest- to-active phase in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 37(1) 245-255 2015 doi; 10.3109/ 10641963
- Niidome T, Gokuden R, Watanabe K, Mori T, Naganuma T, Utsumi H, Ichikawa K, Katayama Y. Nitroxyl radicals- modified dendritic poly(L-lysine) as a contrast agent for Overhauser-enhanced MRI. *J Biomater Sci PolymEd*. 14(4) 4957 2014 doi: 10.1080/ 09205063
- Ohgidani M, Kato TA, Setoyama D, Sagata N, Hashimoto R, Shigenobu K, Yoshida T, Hayakawa K, Shimokawa N, Miura D, Utsumi H, Kanba S. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: dynamic microglial dysfunction in Nasu- Hakola disease. *Sci Rep*. 14(4) 4957 2014 doi: 10.1038/ srep04957
- Hyodo F, Ito S, Yasukawa K, Kobayashi R, Utsumi H. Simultaneous and spectroscopic redox molecular imaging of multiple free radical intermediates using dynamic nuclear polarization-magnetic resonance imaging. *Analytical Chemistry* 5 86(15) 7234-8 2014 doi: 10.1021/ ac502150x
- Dhas KM, Utsumi H, Ichikawa K, Yamada K, Hyodo F, Benial M Diffusion Studies of Redox-Sensitive Nitroxyl Spin Probes through Bilayer Lipid Membranes using 300 MHz Electron Spin Resonance Spectrometer *European Journal of Academic Essays* 1(3) 70-75 2014
- Benial M, Dhas K, Ichikawa K, Yamada KI, Hyodo F, Jawahar A, Utsumi H: Permeability Studies of Redox-Sensitive Nitroxyl Spin Probes Through Lipid Membranes Using an L-Band ESR Spectrometer *Applied Magnetic Resonance* 44(4) 439-447 2013
- Watabe M, Kato TA, Tsuboi S, Ishikawa K, Hashiya K, Monji A, Utsumi H, Kanba

- S, Minocycline, a microglial inhibitor, reduces 'honey trap' risk in human economic exchange. *Scientific Reports* 3, 1683, 2013
13. Kato TA, Yamauchi Y, Horikawa H, Monji A, Mizoguchi Y, Seki Y, Hayakawa K, Utsumi H, Kanba S, Neurotransmitters, Psychotropic Drugs and Microglia: Clinical Implications for Psychiatry, *Current Medicinal Chemistry*, 20(3) 331-344, 2013
14. Honda N, Hirooka Y, Ito K, Matsukawa R, Shinohara K, Kishi T, Yasukawa K, Utsumi H, Sunagawa K. Moxonidine- induced central sympathoinhibition improves prognosis in rats with hypertensive heart failure. *J Hypertens* 31(1) 2300-2308 2013
15. Watabe M, Kato TA, Tsuboi S, Ishikawa K, Hashiya K, Monji A, Utsumi H, Kanba S. Minocycline, a microglial inhibitor, reduces 'honey trap' risk in human economic exchange. *Sci Rep.* 3, 1685 2013
16. Kosem N, Ichikawa K, Utsumi H, Moongkarndi P., In vivo toxicity and antitumor activity of mangosteen extract. *J Nat Med.*, 67(2) 255-263 2013
17. Utsumi H, Novel redox molecular imaging "ReMI" with dual magnetic resonance. *Yakugaku Zasshi*, 133(7) 803-814 2013

(学会発表) (計7件)

1. 内海英雄 DNP- MRIを用いた生体レドックスの画像化、システム疾患生命科学による先端医療技術開発シンポジウム(招待講演) 2015年02月27日 東京大学
2. Hyodo F, In vivo Functional Imaging Using Free Radical Molecules, International CMS seminar Kyushu Japan 2015(招待講演) 2015年01月20日九州大学
3. 兵藤文紀, 伊藤慎治, 江藤比奈子, 中路睦子, 安川圭司, 小林竜馬, 内海英雄 生体内分子・医薬品を用いた新たな代謝イメージング法の開発、日本薬学会第136年会 2015年03月26日
4. 江藤比奈子, 兵藤文紀, 中路睦子, 内海英雄 DNP- MRIによるコピキノン類の分子イメージングへ向けた検討、日本薬学会第136年会 2015年03月27日
5. Utsumi H, Development of DNP- MRI for free radicals in living animals. 41st Annual ISOTT Meeting &EPR 2013, 2013年06月26日 Dartmouth College, NewHampshire, USA
6. Utsumi H, Development of Redox Molecular Imaging of Free Radicals in Living Animal. The 55th Rocky Mountain Conference of Magnetic Resonance(招待講演), 2013年07月30日 Crowne Plaza Hotel Colorado, USA

7. 内海 英雄 生体レドックスの新規画像化法 第52回電子スピンスイェンス学会年会 (SEST2013)(招待講演) 2013年10月25日さいたま市大宮区 大宮ソニックシティ

(産業財産権)

- 出願状況(計6件)
- 名称:回転可変装置
発明者:内海英雄、梶原秀則、大久保雄二
権利者:九州大学、富士電機、メイコー
種類:特許
番号:特願 2015-091572
出願年月日:2015年4月28日
国内外の別:国内
- 名称:回路の固定化
発明者:内海英雄、飯倉 淳、杉山英二
権利者:九州大学、富士電機、日立金属
種類:特許
番号:特願 2015-091643
出願年月日:2015年4月28日
国内外の別:国内
- 名称:生体における酸化還元反応を検出する方法
発明者:内海 英雄、伊藤 慎治、兵藤 文紀
権利者:九州大学
種類:特許
番号:PCT/ JP2014/ 064341
取得年月日:2014年05月29日
国内外の別:外国
- 名称:A MEASURING INSTRUMENT AND A METHOD OF MEASUREMENT
発明者:内海 英雄、小林 竜馬
権利者:九州大学
種類:特許
番号:PCT/ JP2014/ 064725
取得年月日:2014年06月03日
国内外の別:外国
- 名称:磁場印加装置
発明者:内海 英雄、市川、長沼、梶原、飯倉、青木、杉山
権利者:九州大学、富士電機、日立金属
種類:特許
番号:PCT/ JP2013/ 067517
取得年月日:2013年06月26日
国内外の別:外国
- 名称:NOVEL IN VIVO REDOX MOLECULAR IMAGIND FOR FREE RADICAL INTERMEDIATES
発明者:内海 英雄、兵藤 文紀、伊藤 慎治
権利者:九州大学
種類:特許
番号:61 / 828442
取得年月日:2013年05月29日
国内外の別:国内

名称:A MEASURING INSTRUMENT AND A
METHOD OF MEASUREMENT
発明者:内海 英雄、小林 竜馬
権利者:九州大学
種類:特許
番号:61/83046
取得年月日:2013年06月03日
国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

内海 英雄 (UTSUMI HIDEO)
静岡県立大学・薬学部・客員教授
研究者番号: 20101694

(2)研究分担者

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

(4)研究協力者

田平知子 (TAHIRA TOMOKO)