

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670537

研究課題名(和文)EPRイメージング法を用いる複数生体機能同時画像化手法の開発

研究課題名(英文)Simultaneous imaging of multiple bio-functions by EPR imaging method

研究代表者

藤井 博匡 (Fujii, Hiro tada)

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号：70209013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生物が生きているそのままの状態ですべての生体機能を非侵襲的に画像化するイメージング法は、生命現象を分子の動きからダイナミックに観測することができ、生命活動の解析への貢献はもとより、病因の解明や治療薬の開発への貢献など、期待が膨らんでいる。本課題では、複数の生命機能を非侵襲的に画像化する手法をめざしており、近年開発した電子常時共鳴イメージング(Electron Paramagnetic Resonance Imaging: EPRI)を利用して、生命現象を解明する。

研究成果の概要(英文)：Electron Paramagnetic Resonance Imaging (EPRI) combined with nitroxide imaging probes is known to be a powerful non-invasive method for visualizing the redox status in vivo. Recently we have improved the conventional L-band EPR imager using the rapid-scan technique, and it becomes possible to obtain three-dimensional EPR images of small rodents. Using this improved EPR imager, simultaneous imaging of multiple bio-functions, such as redox status, oxygen concentration, and pH, was carried out non-invasively.

研究分野：医歯薬学

キーワード：視覚化 イメージング EPR ESR

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの基礎的な解読作業が終了し、今世紀に入り“分子イメージング”という生命分子を可視化する新しい研究手法による生命研究が開始された。生き物をそのままの状態で見測する“非侵襲的手法”により進められている分子イメージング法では、生命現象を分子の挙動から観測することが可能となり、生命活動の解明への貢献はもとより、病因の解明や治療薬開発への貢献など、大いに期待が膨らんでいるところである。

分子イメージング研究は、現在多方面に於いて積極的に推進され、以下の方向性が期待されている。“マルチモダリティ化”(Molecular brain imaging in the multimodality era. Price JC. J Cereb Blood Flow Metab. 2012.)と、“複数分子のイメージング”(Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. Jacobs AH, Tavitian B. J Cereb Blood Flow Metab. 2012.)という二つの方向性に大別できる。前者では、各モダリティの融合や専用のプローブ合成が積極的に進められている。一方、後者の複数分子のイメージング技術であるが、その重要性・必要性は誰しも認めるところであり、正に技術開発が待ち望まれている。近い将来、この技術が確立されると、爆発的な応用範囲の広がりをみせることが予想される。例えば、生体内での複数分子の挙動、つまり、互いの分子の共同作用性や競合反応性などの評価が可能となり、体内分子を標的にした複数分子から得られる生体情報をレポートすることが可能となり、実験動物一個体において複数分子の反応性や協奏的・競合的效果を評価でき、個体差による結果の違いを完全に排斥することが可能となる。使用実験動物数を減らすことも可能で、動物愛護の観点から理想に近づく研究手法となる。

2. 研究の目的

EPR (電子常磁性共鳴)イメージング法は、フリーラジカルの発生によって起こる様々な体内機能の変化を非侵襲的に視覚化する分子イメージング法の一手法である。本申請では、複数の常磁性プローブ分子を個別に識別し、複数分子から得られる生体機能情報を同一個体で非侵襲的に同時に画像化する、新しい“複数機能同時イメージング法の開発研究”に挑戦する。この分子イメージング手法を病態モデル動物に適用すると、複数の生体機能情報(本研究では、酸素分圧や pH、薬理効果など)を、同一の動物で同時に取得することが可能となる。本手法を用いて非侵襲的に得られる生体機能情報は、病因の解明や治療薬の開発などの幅広い分野での活用が期待されている。

3. 研究の方法

本申請では、非ラジオアイソトープのレポ

ーター分子を用いて、複数分子からの生体機能情報を同時に同一個体で非侵襲的に画像化する分子イメージング法を開発するものである。本手法の重要性は、同一個体に於いて複数分子の挙動を画像として定量評価できる点になり、その貢献度はとても大きい。複数の薬物の挙動を同一個体で評価できることは重要であり、動物個体差による影響を排除することが可能となる。また、本手法では使用動物数を大きく減らすことができ、動物愛護の観点からも貴重である。本課題では、以下の点に焦点を絞り、研究を行った。

本課題の第一のゴールは、生体機能同時イメージング化を実験動物において実現することである。安定同位体ラベルされた2種類のレポータープローブ分子を利用してマウスを用いた動物実験により実証する。

第二点目のゴールは、体内 pH、脳内酸素濃度、酸化ストレス(レドックス状態)レポーター分子を合成する。これらを複数分子同時イメージング研究に活用できるかどうか、基礎研究からその可能性を検討する。

第三点目のゴールは、上記のレポーター分子を活用し、複数プローブから得られた生体機能の画像化を試みる。

本課題での挑戦点

(1)信号分離技術と画像化: EPR イメージング法で複数分子を個別に画像化する手法の原理を以下に示した(図 1)。実験データに含まれた2種類の信号をそれぞれのスペクトルにフーリエ変換法を用いて分離する。これらのスペクトルを元に filtered back-projection 法を使用して画像化を行う。更に応用例として、¹⁵N ラベルしたニトロキシド分子と1本線スペクトルとの組み合わせも解析可能である。

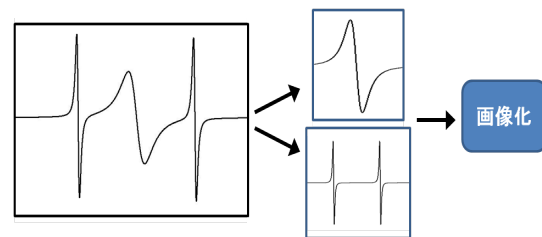


図1 スペクトル分離の原理

(2)信号時間の短縮: 最近実現できた高速 EPR イメージング(EPRI)法(Fujii 共著論文; Mag Reson Med (2011), Anal Chem (2009)など)を利用することにより、3次元画像を10秒以内で撮像することが可能となり、ニトロキシド複数分子の同時イメージング実現の可能性が見え始めてきた。具体的には、磁場掃引時間を短縮する、所謂、ラピッドスキャン法を利用する。ラピッドスキャン法で得られたスペクトルのゆがみ

は補正により除去し、歪みの無いスペクトルを用いた画像再構成を行ってひずみの無い画像撮像を目指す。

4. 研究成果

(1) EPR スペクトル分離プログラムの開発

National Instruments 社 LabVIEW ベースで、複数の EPR スペクトルからそれぞれの信号を分離するプログラムを開発した(図 2)。複数分子を識別する手法として、アイソトープの活用および g 値による識別がある。窒素原子のアイソトープ(14N and 15N の利用)特に非放射性元素(14N and 15N)でイメージングプローブをラベル化することでそれぞれの分子を識別する。

開発したプログラムを以下に示した。14N と 15N の窒素原子でラベル化されたプローブのスペクトルは、前者が 3 本、後者が 2 本のスペクトルを与える。14N ラベル化プローブからは三本の内の中心のピークを、15N ラベル化プローブでは、低磁場側のピークを抜き出すことが可能なプログラムである。計算時間は数秒と一瞬で終了する。磁場勾配下のスペクトル(プロジェクションデータ)に関しても同様の処理を行い、filtered back-projection 法による画像再構成により画像を取得する。

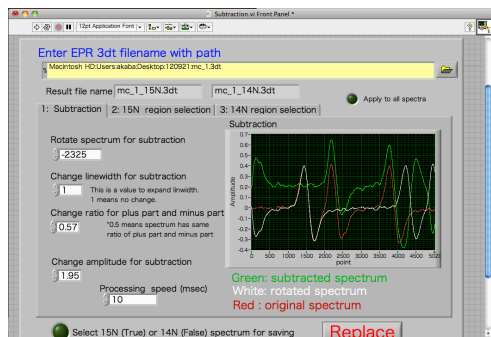


図 2 本課題で開発した LabVIEW ベースのプログラム (MacOS & WindowsOS で稼働)」

(2) アイソトープラベル化プローブの合成

非放射性アイソトープである 14N と 15N を用いてニトロキシドプローブをラベル化した。脳内移行性が有り酸化ストレスマーカーである 3-Methoxycarbonyl-PROXYL (MCP) および脳内移行性が無い酸化ストレスマーカー Carboxy-PROXYL (COP) を 14N と 15N とでラベル化し、EPR スペクトルとして分離しうる条件を整えた。

pH 感受性プローブとして下記の構造を持ったニトロキシドプローブを選び、上記と同様に 14N と 15N とでラベル化した(図 3)。

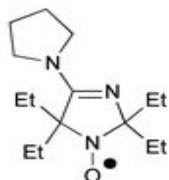


図 3 14N でラベルした pH 感受性プローブ

マウスを用い、in vivo EPR スペクトル測定は、ラピッドスキャン機能を持った EPR イメージング装置で実施した(図 4)



図 4 ラピッドスキャン機能を備えた EPR イメージング装置 (藤井研究室で稼働中)

(3) 複数機能同時イメージング

マウス(C57BL/6)に 15N 化 MCP と 14N 化 COP 混合溶液を同時に尾静脈投与し、それぞれのプローブのスペクトル計測を行い、それぞれの分子の画像化を行った。得られた画像を以下に示した(図 5)。MCP は脳全体を含む頭部全体に広がっていることが分かる。脳内に移行しない COP は舌を中心に分布していることが分かる。

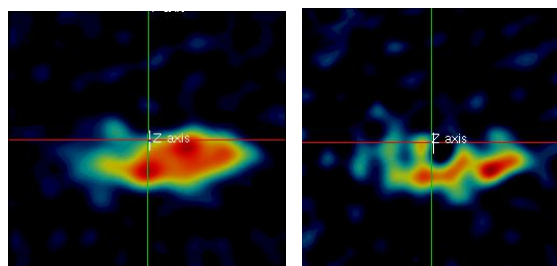
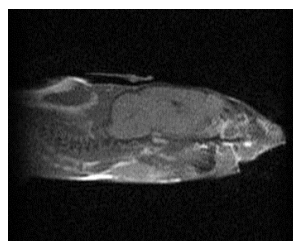


図 5 15N 化 MCP の分布 (左) と 14N 化 COP (右) の分布



同種・同サイズのマウスの MRI 画像を左に示したが、MCP および COP の分布が確認できる。

(4) 上記の手法を現在、pH 感受性プローブに応用し、酸化ストレスと pO₂ との相関について画像による検討を実施している。

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 3 件)

Matsumura A, Emoto MC, Suzuki S, Iwahara N, Hisahara S, Kawamata J, Suzuki H, Yamauchi A, Sato-Akaba H, Fujii

HG, Shimohama S. Evaluation of oxidative stress in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. 査読有 Free Rad Biol Med. 2015 in press.

Emoto MC, Sato-Akaba H, Hirata H, Fujii HG. Brain Imaging in Methamphetamine-Treated Mice using a Nitroxide Contrast Agent for EPR Imaging of the Redox Status and a Gadolinium Contrast Agent for MRI Observation of Blood-Brain Barrier Function. 査読有 Free Rad Research. 2015 in press

Emoto MC, Sato-Akaba H, Hirata H, Fujii HG. Dynamic changes in the distribution and time course of blood-brain barrier-permeative nitroxides in the mouse head with EPR imaging: visualization of blood flow in a mouse model of ischemia. 査読有 Free Radic Biol Med. 2014; 74; 222-228. doi:10.1016/j.

〔学会発表〕(計 4 件)

Fujii HG, Emoto MC, Ysmsto M, Yamada K. Brain redox imaging using nitroxide contrast agents in pentylenetetrazol-kindled mice with EPR imaging. ISMRM2015, June 04 '2015 予定, Toronto (Canada).

Fujii HG, Emoto MC, Ysmsto M, Yamada K. Fujii HG, Emoto MC, Yamato M, Yamada K. In vivo imaging of redox status in mouse brains during pentylenetetrazol(PTZ)-induced epileptic seizures. SFRBM, Nov 20 '2014, Seattle (USA).

Fujii HG. In vivo EPR imaging studies of a brain disease mouse model. SEST2014, Nov14 '2014, Todaiji Museum (Nara-city)

Fujii HG, Emoto MC, Ysmsto M, Yamada K. Brain redox imaging using nitroxide contrast agents and blood-brain barrier function in methamphetamine-treated mice. ISMRM, May02 '2014, Milano (Italy).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 博匡 (FUJII HIROTADA)

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号：70209013

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

赤羽 英夫 (AKABA HIDEO)

大阪大学大学院・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：00552077