ReMI による新たなレドックス分子イメージング法の開発と応用

兵藤 文紀,* 伊藤 慎治, 内海 英雄

Redox Molecular Imaging Using ReMI

Fuminori Hyodo,* Shinji Ito, and Hideo Utsumi

*Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University;
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.*

(Received September 26, 2014)

Tissue redox status is one of the most important parameters to maintain homeostasis in the living body. Numerous redox reactions are involved in metabolic processes, such as energy production in the mitochondrial electron transfer system. A variety of intracellular molecules such as reactive oxygen species, glutathione, thioredoxins, NADPH, flavins, and ascorbic acid may contribute to the overall redox status in tissues. Breakdown of redox balance may lead to oxidative stress and can induce many pathological conditions such as cancer, neurological disorders, and aging. Therefore imaging of tissue redox status and monitoring antioxidant levels in living organisms can be useful in the diagnosis of disease states and assessment of treatment response. *In vivo* redox molecular imaging technology such as electron spin resonance imaging (ESRI), magnetic resonance imaging (MRI), and dynamic nuclear polarization (DNP)-MRI (redox molecular imaging; ReMI) is emerging as a viable redox status imaging modality. This review focuses on the application of magnetic resonance technologies using MRI or DNP-MRI and redox-sensitive contrast agents.

Key words—redox imaging; dynamic nuclear polarization; nitroxyl radical; magnetic resonance imaging

1. はじめに

生体レドックスとは生体内で生じる酸化 (oxidation) 還元 (reduction) 反応を示す。生体はレドックス反応を介し無数の代謝によりホメオスタシスを維持している。例えば解糖系, クエン酸回路, 電子伝達系が関与するエネルギー産生は生体内の最も重要な代謝経路である。ミトコンドリアではクエン酸回路で産生された nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) やコハク酸などの基質を用い電子伝達系において電子の授受を利用して ATP が生成される。その過程で漏れ出た電子と酸素との反応で活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の 1 つであるスーパーオキシド (O_2^-) が生成されるため, ミトコンドリアは生体内の主要な ROS 生成源である。¹⁾ また生体では炎症に応答する好中球やマクロファージなどの炎症細胞の浸潤・活性化に伴い

ROS が産生, また薬物代謝酵素 (シトクロム P-450) 等による異物代謝においても ROS が産生されることが知られている。そして ROS の過剰生成, それに対する防御系であるグルタチオンやアスコルビン酸などの抗酸化物質, グルタチオンペルオキシダーゼやスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) などの抗酸化酵素の増減はレドックスバランスの破綻を誘導する。近年, 糖尿病やがん, 脳疾患などの生活習慣病や, 精神疾患等の病態変化に ROS や抗酸化分子・酵素の関与が報告されている。したがって生体レドックス状態の非侵襲的可視化技術はこれらの病態における新たな診断・創薬ツールとしての展開が期待される。

超音波診断装置や核医学検査 positron emission tomography (PET) や single photon emission computed tomography (SPECT), computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), 蛍光・発光イメージング法などは臨床ないし実験動物を対象に生体機能や組織構造を描写する画像化装置として活用されている。特にがん分野においてイメージング (可視化) 技術は治療計画の立案, 部位の特定,

九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点 (〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1)

*e-mail: hyodof@redoxnavi.med.kyushu-u.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 134 年会シンポジウム S04 で発表した内容を中心に記述したものである。

治療効果の判定など必要不可欠な情報を与える。MRI に代表される磁気共鳴現象を利用した磁気共鳴イメージング法は、核や電子が持つ磁気モーメントと磁場との相互作用により生じたエネルギー準位間の電磁波遷移を観測の対象とする。核スピンを観測対象とする場合には MRI を用い、電子スピンを対象とする場合には電子スピン共鳴装置 (electron spin resonance; ESR) が用いられている。磁気共鳴イメージングでは周波数が低く体内透過性の高いラジオ波若しくはマイクロ波を用いるのでヒトや動物において深部計測が可能である。近年、われわれの拠点で開発を進めている動的核偏極 (dynamic nuclear polarization; DNP) を利用する DNP-MRI 法は、フリーラジカルの電子スピンを ESR 遷移させ、電子スピンと核スピンの双極子相互作用により核スピンが偏極する現象 (オーバーハウザー効果) を利用し MRI の感度を劇的に上昇させラジカルの情報を得る技術である。²⁾ 1988 年にアバディーン大学の Lurie らは、この効果を利用した MRI (proton electron double resonance imaging; PEDRI ないし overhauser enhanced magnetic resonance imaging; OMRI と呼ばれている)、すなわち、水分子近傍のフリーラジカルを励起させることで増幅したプロトン信号を MRI で画像化する方法を報告した。³⁾ その後 Philips 社よりプロトタイプ機が世界で数台販売され、そのうちの一台が九州大学コラボステーションに導入された。Figure 1 は Philips 社が試作した PEDRI (DNP-MRI) 装置と日本レドックス社が製作したベンチトップ型 DNP-MRI 装置 (Keller) を示す。DNP-MRI によるラジカル画像は MRI と同等の空間分解能と時間分解能を有し、高磁場型の DNP-MRI は、鮮明な解剖学的情報も同時に得ることが可能である。DNP-MRI 法は近年急速に研究が進み、様々な応用例が示されている。例えばトリアリルメチルラジカル,⁴⁾ あるいはニトロキシルラジカル⁵⁾ をプローブとして、体内分布・動態の画像化、腫瘍内の酸素イメージング⁶⁾ や血管透過性の同時検出,⁷⁾ 脳梗塞モデル動物⁸⁾ のレドックス解析などが報告されている。われわれは DNP-MRI 装置を導入する際に、異なる核種のラジカルを同時分離画像化する方法を新たに測定シーケンスに組み込み、同時分離画像解析に成功している。⁹⁾ この方法は後述するように同一組織あるいは細胞の内外のレ

Fig. 1. Picture of Magnetic Resonance Imaging Systems
Prototype of Philips PEDRI imager, Bench-top type of DNP-MRI (Keller) and 4.7T MRI.

Fig. 2. Reversible One-electron Reduction/Oxidation Showing the Inter-conversion and the Molecular Structure of the Four Nitroxides, B) ¹⁵N-PDT, C) Tempone, D) Carbamoyl-PROXYL and E) Tempol Used in This Work

ドックス反応を分けて解析することが可能であり、今後酸化ストレス疾患モデルを用いた様々な病態応用研究への展開が期待できる。本総説では、MRI と DNP-MRI を用いた磁気共鳴レドックスイメージングについて概説する。

2. レドックス応答磁気共鳴プローブ：ニトロキシルラジカル

ニトロキシルラジカルは分子内に安定ラジカルを有し、フリーラジカルとの反応性や抗酸化作用を示すことが知られている (Fig. 2).^{10,11)} また、このラ

Fig. 3. Comparison of Intensity Change and SNR of Nitroxyl Radicals

The intensity change (left column) and SNR (right column) of nitroxides in A) DNP-MRI and B) MR images are showed. The intensity was calculated for a select ROI from DNP-MRI and MR image of each nitroxyl radical. The intensity change (%) of MRI was calculated based on the intensity of center phantom containing pure water. Number of experiments are 3. (Cited from Hyodo *et al.* J Magn Reson. 2008 190(1): 105–12. 2007)

ジカルはレドックス反応性を示すとともに磁気共鳴法における造影剤としての役割も果たすためニトロキシラジカルは磁気共鳴イメージング (ESRI, MRI, DNP-MRI) におけるレドックス解析のためのプローブとして活用されてきた。^{12–17)} ニトロキシラジカルは生体内で種々のレドックス反応を媒介することがこれまでの研究で明らかになっており、生体内では還元されラジカルを失い主にヒドロキシルアミン体 (非磁性) となる。生体内のレドックス状態に応じて画像強度の消失速度が変化するためこの消失速度をレドックス反応速度として解析している。ニトロキシラジカルには局在性や反応性、機能性の向上を指向した多くの誘導体が存在し、これらを目的に応じ使い分けることで反応部位や、機能などの異なる生体応答を解析することが可能となる。例えば 4-hydroxy Tempo (Tempol) や methoxycarbonyl-PROXYL (MC-PROXYL) は高い細胞膜透過性を持ち、分布した臓器・組織の細胞内レドックス反応を鋭敏に描写する。一方、細胞膜非透過性ニトロキシラジカルである carboxy-PROXYL は、細胞内には移行せず血管内を滞留するため血液中のレドックス解析に適している。ゆえに両者 (細胞膜透過・非透過) のスピンプローブを共投与

したマウスを DNP-MRI で同時分離画像解析すれば、同一個体における細胞内・外のレドックス変動の解析が可能である。¹⁸⁾

ニトロキシラジカルは上述したように分子内に不対電子を持つことから MRI の縦緩和撮像法 (T_1 強調撮像) において造影効果 (T_1 緩和時間短縮効果) を有することが知られている。^{19,20)} しかしニトロキシラジカルの高い生体内反応性は造影 (目的の臓器で安定したコントラストを得る) という観点からは不都合であった。一方、ガドリニウム系の造影剤は生体内で安定かつ造影効果 (緩和度) がニトロキシラジカルに比べて高いために臨床で用いられている。そこでわれわれは反応性に富むニトロキシラジカルの生体レドックス状態を可視化するための MRI 造影剤としての活用性を模索し担がんモデルマウスにおけるレドックス状態の可視化に成功している。^{18,21)}

3. フリーラジカル溶液含有ファントムの可視化

Figure 3 は MRI と DNP-MRI におけるラジカル濃度と画像強度の関係を調べたものである。疑似試料 (ファントム) に 0.2–20 mM の ^{15}N -PDT, Tempol, carbamoyl-PROXYL 溶液を充填し MRI 若しくは DNP-MRI で撮像した。DNP-MRI, MRI と

Fig. 4. Comparison of Image Intensity Decay among Three Magnetic Resonance Modalities

A) Schematic of the phantoms: Tube 1, PBS; Tube 2, 2 mM carbamoyl-PROXYL and 5 mM AsA; Tube 3, 2 mM carbamoyl-PROXYL and 10 mM AsA; Tube 4, 2 mM carbamoyl-PROXYL. Time course images and decay slope of B) ESRI, C) MRI, D) DNP-MRI were obtained. After addition of AsA/PBS solution, the ESRI or DNP-MRI measurements were started immediately and continuously measured up to 20 min. In the case of MRI, AsA/PBS was added using PE-10 tube 2 min after scanning was started. Therefore, time zero in the MRI experiment represents the time at addition of AsA solution. The experiments were repeated three or four times using with freshly prepared solutions. Semi-logarithmic plots of the time course of MRI signal change in the region of interest (ROI: 10×10 pixels) were used for decay rate calculation using imageJ software. Decay rate constants were obtained from the slope of linear portion of the decay curves.

にラジカルを含む場合には PBS のみのファントムに比べ画像強度が上昇した。²²⁾ それぞれのファントムで関心領域 (region of interests; ROI) を設定し画像強度をプロットした場合, DNP-MRI においては ^{15}N -PDT を除くニトロキシルラジカルで 3 mM で強度が最大となり, それ以上の濃度ではラジカル相互作用による線幅のブロードニングにより画像強度の減少が観察された。 ^{15}N -PDT は狭線幅を持つニトロキシルラジカルであるが, この場合では 5 mM が最大値であった。一方, MRI 法においてはすべてのニトロキシルラジカルで同様の挙動を示し, ラジカル濃度として 20 mM まで画像強度が上昇した。これらの結果より MRI 法ではニトロキシルラジカルの線幅に画像コントラストが依存しないため, ESRI や DNP-MRI では感度の低下が懸念されるような線幅の広いプローブも造影剤として活用できることが示唆された。

次に 3 種類 (ESRI, MR, DNP-MRI) の磁気共鳴

イメージングによるレドックス反応の可視化を評価するために, 2 mM carbamoyl-ROXYL を充填したファントムに 5 若しくは 10 mM のアスコルビン酸 (AsA) を加え, 磁気共鳴イメージング法にて経時的に撮像した。AsA は carbamoyl PROXYL のラジカルを濃度依存的に消去する。Figure 4 には 3 種の磁気共鳴装置でファントムを撮像した結果を示す。すべての装置において 2 mM の carbamoyl-PROXYL を含むファントムが可視化されていることがわかる。ESRI 法は直接ラジカルを検出するという利点はあるものの, ラジカルのスペクトル線幅は画像解像度に影響するため, ニトロキシルラジカルのように比較的線幅の広いプローブを用いる場合には空間解像度も低くなる。また画像強度は, AsA の添加によりニトロキシルラジカルが還元されるため時間とともに減少した。最も高い 10 mM AsA を添加したファントムでは画像強度が有意に消失した。このとき, 画像強度の変化を片対数プロットし消失速

Fig. 5. X-band ESR Spectra of ^{14}N -, ^{15}N -nitroxyl Radical

度を算出すると、すべての装置において AsA 添加ファントムの消失速度は同じ傾向を示したことから 3 種の磁気共鳴装置のどれにおいても同様にレドックス反応を検出できることが示された。²²⁾

4. DNP-MRI によるレドックスイメージング

DNP-MRI は前述した通り MRI と同程度の空間解像度を維持しながらフリーラジカルの情報を得ることができる。このときフリーラジカル分子に対す

る電子スピン励起 (ESR ON) を行うに当たり、ラジカル分子のスペクトルのピークに共鳴磁場を設定する。⁹⁾ ゆえに、フリーラジカル分子の電子スピン共鳴スペクトルのピークが重複しない場合は、励起磁場をそれぞれのラジカル分子のピークに設定し電子スピン励起すれば複数のラジカルを分離画像化できる。Figure 5 には ^{14}N と ^{15}N 標識のニトロキシラジカル混合液を X-Band ESR で計測して得たスペクトルを示す。 ^{14}N 、 ^{15}N の核スピンはそれぞれ 1 と 1/2 であり、 ^{14}N ニトロキシラジカルからは 3 本のピークが、 ^{15}N 標識体からは 2 本のピークが得られた。この場合 ^{14}N ニトロキシラジカルと ^{15}N 標識体のピークに相当する磁場で交互に電子スピン励起を行えば 2 種のラジカルが分離画像化できることになる。2 種類のラジカルの分離画像解析の例を示す (Fig. 6)。ファントムの組成は① 1 mM の ^{15}N -carbamoyl-PROXYL, ② 1 mM ^{14}N Tempol, ③ それらの混合液 (終濃度はそれぞれ 1 mM) に 10 mM AsA を添加したものである。このファントムを ^{14}N の中心線の共鳴周波数である 456 MHz と ^{15}N 標識体の高磁場側ピークである 480 MHz で交互に周波

Fig. 6. Simultaneous and Time-dependent DNP-MRI Imaging of ^{15}N -carbamoyl-PROXYL and ^{14}N -Tempol in PBS

DNP-MRI images of ^{15}N - and ^{14}N -nitroxyl radical were obtained with ESR irradiation at 456 MHz or 480 MHz. FOV, 48×48 mm; matrix, 64×64 ; slice thickness, 10 mm; TR/TE/TESR, 1200/25/600 ms.

Fig. 7. Pharmacokinetic Images of ^{14}N - and ^{15}N -nitroxyl Radicals after Injection through Different Routes

The time-dependent simultaneous images of ^{15}N -oxo-TEMPO and ^{14}N -carbamoyl-PROXYL in a living mouse after intragastric and i.v. injection, respectively, and the time course of image intensities at stomach, heart, and bladder. 200 μL of ^{15}N -oxo-TEMPO (10 mM) was administered intragastrically, and then 200 μL of ^{14}N -carbamoyl-PROXYL (300 mM) i.v. Immediately after administrations, DNP-MRI images of ^{14}N - and ^{15}N -nitroxyl radicals were obtained. T_1 -weighted MRI was performed on a clinical MRI instrument, and the DNP-MRI images were superimposed with the MRI image by fitting the position of the markers (six capillaries containing either radical) (FOV, 48 $\times$ 48 mm; matrix, 64 $\times$ 64; slice thickness, 30 mm; TR/TE/TESR, 1100 ms/25 ms/550 ms). (Cited by Utsumi H. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2006 103 (5): 1463–8. 2006)

数を変えながら ESR 励起して画像化を行った。456 MHz で励起を行った場合には carbamoyl-PROXYL が充填されているファントムの画像強度が上昇し、ファントム③では carbamoyl-PROXYL と AsA の反応によるラジカル消失に由来する画像強度の減少がみられた。一方、480 MHz で電子スピン励起した場合には、Tempol 由来ファントムが可視化され、ファントム③では AsA との反応により画像強度の減少が同様にみられた。carbamoyl-PROXYL の場合では AsA 添加後 34 分においても画像強度を得たが、Tempol の場合には AsA 添加直後に画像強度が消失した。これらの結果より DNP-MRI を用いることで同じファントム内における 2 つのレドックス反応を分離して解析することが可能であることが本実験により示した。

Figure 7 には ^{14}N と ^{15}N 標識ニトロキシルラジカルを用いた分離画像化の動物実験の結果を示している。Figure 7 は ^{15}N で標識した oxo-TEMPO を経口投与、 ^{14}N -carbamoyl-PROXYL を尾静脈内投与後、撮像した結果を示した。ここで胃と心臓、膀胱に関心領域を設定すると、胃では ^{15}N -oxo-TEMPO は安定で、ほぼ一定の画像強度を示した。⁹⁾ また膀胱では尾静脈内投与された ^{14}N -carbamoyl-PROXYL の画像強度が経時的に上昇し膀胱に排泄されることがわかった。

5. まとめ

本稿では磁気共鳴手法を用いた生体レドックス状態の可視化について概説した。磁気共鳴イメージングは時間・空間分解能、生体深部計測、繰り返し測定などいくつかの長所を有する一方、光イメージングや PET・SPECT など核医学イメージングに比べ感度が低い点が克服すべき課題であると言える。本稿で紹介した DNP は核スピンの信号強度を劇的に上昇させることで MRI の感度を補間する方法である。2000 年以降 DNP-MRI に関する研究が世界的に拡大されており、われわれもオリジナル DNP-MRI の開発、新規イメージング法に関する研究を進め、生体レドックス情報を中心する新たな診断・前臨床研究へ展開したいと考えている。

謝辞

本研究に際し、九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点 江藤比奈子氏、中路睦子氏には実験の遂行にご協力頂きました。ここに感謝いたします。また本研究は文部科学省地域産学官連携科学技術振興事業費補助金・先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム、日本学術振興会科学研究費助成事業・基盤研究 (A) (25253005)、若手研究 (A) (25713004)、JST 研究成果展開事業、先端計測分析技術・機器開発プログラム・実証・実用化タイプのご支援で進められた研究でここにお礼

申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Murphy M. P., *Biochem. J.*, **417**, 1–13 (2009).
- 2) Overhauser A. W., *Phys. Rev.*, **92**, 411–415 (1953).
- 3) Lurie D. J., Bussell D. M., Bell L. H., Mallard J. R., *J. magn. Reson.*, **76**, 366–370 (1988).
- 4) Li H., Deng Y., He G., Kuppusamy P., Lurie D. J., Zweier J. L., *Magn. Reson. Med.*, **48**, 530–534 (2002).
- 5) Kosem N., Naganuma T., Ichikawa K., Phumala Morales N., Yasukawa K., Hyodo F., Yamada K., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **53**, 328–336 (2012).
- 6) Krishna M. C., English S., Yamada K., Yoo J., Murugesan R., Devasahayam N., Cook J. A., Golman K., Ardenkjaer-Larsen J. H., Subramanian S., Mitchell J. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2216–2221 (2002).
- 7) Matsumoto S., Yasui H., Batra S., Kinoshita Y., Bernardo M., Munasinghe J. P., Utsumi H., Choudhuri R., Devasahayam N., Subramanian S., Mitchell J. B., Krishna M. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17898–17903 (2009).
- 8) Yamato M., Shiba T., Yamada K., Watanabe T., Utsumi H., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **29**, 1655–1664 (2009).
- 9) Utsumi H., Yamada K., Ichikawa K., Sakai K., Kinoshita Y., Matsumoto S., Nagai M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 1463–1468 (2006).
- 10) Soule B. P., Hyodo F., Matsumoto K., Simone N. L., Cook J. A., Krishna M. C., Mitchell J. B., *Free Radic. Biol. Med.*, **42**, 1632–1650 (2007).
- 11) Soule B. P., Hyodo F., Matsumoto K., Simone N. L., Cook J. A., Krishna M. C., Mitchell J. B., *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 1731–1744 (2007).
- 12) Fujii H. G., Sato-Akaba H., Emoto M. C., Itoh K., Ishihara Y., Hirata H., *Magn. Reson. Imaging*, **31**, 130–138 (2013).
- 13) Hyodo F., Soule B. P., Matsumoto K., Matsumoto S., Cook J. A., Hyodo E., Sowers A. L., Krishna M. C., Mitchell J. B., *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**, 1049–1060 (2008).
- 14) Alecci M., Seimenis I., McCallum S. J., Lurie D. J., Foster M. A., *Phys. Med. Biol.*, **43**, 1899–1905 (1998).
- 15) Biller J. R., Tseitlin M., Quine R. W., Rinard G. A., Weismiller H. A., Elajaili H., Rosen G. M., Kao J. P., Eaton S. S., Eaton G. R., *J. Magn. Reson.*, **242**, 162–168 (2014).
- 16) Takeshita K., Utsumi H., Hamada A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**, 874–880 (1991).
- 17) Yokoyama H., Lin Y., Itoh, O., Ueda Y., Nakajima A., Ogata T., Sato T., Ohya-Nishiguchi H., Kamada H., *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 442–448 (1999).
- 18) Hyodo F., Matsumoto K., Matsumoto A., Mitchell J. B., Krishna M. C., *Cancer Res.*, **66**, 9921–9928 (2006).
- 19) Brasch R. C., London D. A., Wesbey G. E., Tozer T. N., Nitecki D. E., Williams R. D., Doemeny J., Tuck L. D., Lallemand D. P., *Radiology*, **147**, 773–779 (1983).
- 20) Brasch R. C., Nitecki D. E., Brant-Zawadzki M., Enzmann D. R., Wesbey G. E., Tozer T. N., Tuck L. D., Cann C. E., Fike J. R., Sheldon P., *AJR Am. J. Roentgenol.*, **141**, 1019–1023 (1983).
- 21) Matsumoto K., Hyodo F., Matsumoto A., Koretsky A. P., Sowers A. L., Mitchell J. B., Krishna M. C., *Clin. Cancer Res.*, **12**, 2455–2462 (2006).
- 22) Hyodo F., Murugesan R., Matsumoto K., Hyodo E., Subramanian S., Mitchell J. B., Krishna M. C., *J. Magn. Reson.*, **190**, 105–112 (2008).