

## 磁気共鳴法を用いた生体レドックス画像化

市川和洋,\* 山田健一, 安川圭司, 内海英雄

Analysis of *In vivo* Redox Status with Magnetic Resonance TechniqueKazuhiro ICHIKAWA,\* Ken-ichi YAMADA, Keiji YASUKAWA, and Hideo UTSUMI  
Department of Bio-function Science, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University,  
3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received September 19, 2008)

*In vivo* redox reaction is involved in processes of oxidative diseases. The redox imaging technique is important to diagnose redox-induced diseases and to assess cure effects of pharmaceutical drugs. A group of nitroxyl radicals is sensitive to redox reactions and we have investigated mechanisms of oxidative diseases, including diabetes, ischemia reperfusion injuries and gastric ulcer. ESR technique has been utilized in analysis of free radicals, which is generated through imbalance of *in vivo* redox status. We have been developing magnetic resonance approaches for imaging free radicals/redox status in living animals. Overhauser enhanced MRI (OMRI) is a new technique for imaging *in vivo* redox status in animals via Overhauser effect. We have developed nanometer-scale imaging and simultaneous assessment of redox processes by using OMRI with  $^{14}\text{N}$ - and  $^{15}\text{N}$ - labeled nitroxyl probes with different distribution properties. We also developed a home-built OMRI imager based on an electromagnet for L-band ESRI. This OMRI technique with dual probes may become a powerful tool to clarify mechanisms of disease and to monitor pharmaceutical therapy.

**Key words**—*in vivo* redox status; imaging modality; electron spin resonance; nitroxyl radical; overhauser enhanced magnetic resonance imaging (OMRI)

## 1. はじめに

近年、脳梗塞<sup>1)</sup>や糖尿病<sup>2)</sup>、がんなどの生活習慣病において、活性酸素やフリーラジカルなどの生体レドックス変動が示唆されている。「生体レドックス反応」とは、レドックス反応を介した生理機能発現、それに伴う活性種産生、産生された活性種と生体分子との代謝・反応の全体を表す概念である。生体レドックスの変動は、多くの生理現象やがん・糖尿病をはじめとする生体レドックス疾患に密接に関与することが示唆されている。したがって、生体レドックス状態の可視化は低侵襲的な疾患機序解析、あるいは新規治療薬の開発に新しい方法論を提供する。

画像診断装置は、病因の早期発見・治療戦略に必須のツールとして、医療現場に定着している。画像

診断手法には、X線CTやPET CT, MRIがあるが、空間情報の画像化を行う形態画像化が主として行われてきた。近年、形態画像化に加え、生体内の機能・現象を可視化する、機能画像化が行われるようになってきた。例えば、BOLD (Blood Oxygen Level Dependent)-MRIは、脳組織の附活部位において実際に消費される以上に血流から供給される酸素量が多くなり、増加した酸素(常磁性分子)が組織の $T_2^*$ を延長することで(BOLD効果)、MRI画像輝度に変化を生じることを利用したものである。<sup>3)</sup>また、高磁場MRIでは、試料内ボクセルにおけるNMRスペクトル情報を得るMRS (Magnetic Resonance Spectroscopy)により代謝過程の追跡等が報告されている。

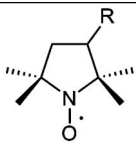
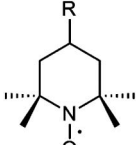
フリーラジカルは、不対電子を有し常磁性であり、したがって磁気共鳴法による計測が適している。そこでわれわれは、特に個体における生体レドックス可視化を目的として、これまでに電子スピン共鳴画像化装置(ESRI)をはじめとする、種々の生体計測磁気共鳴画像装置を開発してきた。内因性

九州大学大学院薬学研究機能分子解析学分野(〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

e-mail: ichikawa@pch.phar.kyushu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会128年会シンポジウムS36で発表したものを中心に記述したものである。

Table 1. Typical Nitroxyl Radicals Used in Researches for *In vivo* Redox Status

Basic Structure	R	Abbreviation	Po/w
	-CONH <sub>2</sub>	Carbamoyl PROXYL	0.68
	-COOH	Carboxy PROXYL	0.01
	-COOCH <sub>3</sub>	MC PROXYL	8.7
	-COOCH <sub>2</sub> OCOCH <sub>3</sub>	AMC PROXYL	4.1
	-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> I <sup>-</sup>	CAT-1	0.0004

のフリーラジカルは、生理的条件下において短寿命であり、直接計測が困難である。そこで、生体レドックス高感受性のニトロキシルラジカルをプローブ剤として用いる方法（ニトロキシルスピンプローブ法）を提唱し、糖尿病、脳虚血-再灌流、胃潰瘍等の生体レドックス疾患モデルにおいて、生体レドックス動態とこれら疾患成・進展の関連を明らかにしてきた。また、近年報告されたオーバーハウザー効果 MRI (OMRI) を用いる新たな生体レドックス画像化手法の研究を進めている。

本稿では、ニトロキシルプローブへの機能性置換基付与による分子イメージングプローブ開発、及び ESRI, OMRI/スピンプローブ法等の磁気共鳴法を用いた生体レドックス画像化手法について概説する。

## 2. ニトロキシルラジカル/スピンプローブ法

ニトロキシルラジカル (Table 1) は、生体膜標識による膜流動性の研究 (スピンプローブ法) に用いられ、<sup>4)</sup> また、その常磁性を利用した MRI 造影剤応用の試みがなされてきた。<sup>5-11)</sup>

ニトロキシルラジカルは、電子受容体としてヒドロキシルアミン体を形成し、また電子供与体としてオキソアンモニウム体を形成することで、常磁性を失うことが知られている (Fig. 1)。オキソアンモニウム体は、さらに二電子還元を受けてヒドロキシルアミン体になると考えられている。<sup>12)</sup> また、チオール存在下では二級アミンを形成し得る。ニトロキシルラジカルは、ヒドロキシルラジカル<sup>13)</sup> やスーパーオキソアニオンラジカルとの酸化還元反応により常磁性を消失することが知られている。<sup>14,15)</sup> また、ミクロソームにおけるニトロキシルラジカルの常磁性消失への cytochrome P-450,<sup>16)</sup> NAD (P) H 依存性 cytochrome c reductase<sup>17)</sup> の関与、ミトコン

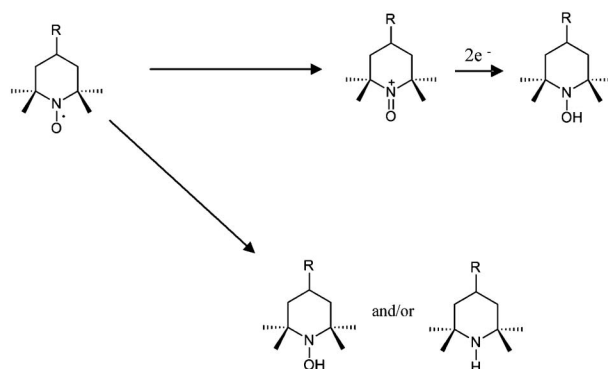


Fig. 1. Reduction Pathway of Nitroxyl Radical

ドリア電子伝達系によるニトロキシル還元<sup>18)</sup> が報告されている。グルタチオンは、ニトロキシルラジカルと直接反応しないが、電子供与体としてニトロキシルラジカル還元に参加することが報告されている。その他、アスコルビン酸などもニトロキシル還元反応に参加している。

上記の通り、ニトロキシルラジカルの還元反応は、生体におけるフリーラジカル反応、レドックス代謝の指標として有用である。これらニトロキシルラジカルの生体内代謝速度を計測することで、生体フリーラジカル反応・レドックス代謝を解析可能である。いくつかの研究グループにおいてニトロキシルラジカルが生体内酸化ストレスに感受性が高いことを利用し、*in vivo* ESR のプローブ剤 (スピンプ



市川和洋

1994 年東京大学大学院工学系研究科博士課程中退、1994 年九州大学薬学部助手、2001 年シカゴ大学病院客員研究員、2004 年九州大学大学院薬学研究院助教授、2007 年より九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点・生体レドックス画像化グループ長を兼任。

ローブ)として用いることで, 生体内酸化ストレスを無侵襲評価する方法が行われてきた。われわれのグループでも, これまでに脳虚血再灌流障害<sup>1)</sup>や, 鉄過剰肝障害,<sup>19)</sup> 糖尿病モデル,<sup>2,20)</sup> 酸化ストレス肺障害,<sup>21)</sup> 胃潰瘍,<sup>22)</sup> プロトポルフィリン症<sup>23)</sup>等の病態モデル動物において, 活性酸素・フリーラジカル動態を明らかにし, 本手法による生体酸化ストレス解析が有用であることを報告している。

### 3. 部位特異的なニトロキシルプローブの開発

ニトロキシルラジカル投与後の組織分布は, その基本構造, 置換基の種類により異なる。したがって, 関心領域における生体フリーラジカル反応・レドックス代謝を計測するためには, 分布部位に特異性のあるスピンプローブ開発が必須である。われわれは, ピロリジンニトロキシルラジカルのアセトキシメチルエステル誘導体を合成し, この誘導体が脳血液関門通過性, 細胞内滞留性を有することを報告してきた。<sup>24)</sup> また, 横山らは, ヒドロキシルアミン体にアシル基を保護基として導入し, 細胞内エステラーゼにより切断されることを利用して, 細胞内での酸化反応の画像化を行っている。<sup>25)</sup> これら組織滞留性の異なるスピンプローブ剤を併用することで, 病態モデル動物におけるスピンプローブ代謝部位の同定が, また, ラジカル消去剤・阻害剤, 中和抗体等の併用により, ラジカル種の同定, 生成機序解析が可能と考えられる。

次に, 異なる組織分布を有するニトロキシルプローブの応用例を示す (Fig. 2)。<sup>26)</sup> 移植がんマウスモデルにおける, がん移植肢及び正常肢におけるニトロキシルラジカル (Carbamoyl PROXYL) の代謝速度とラジカル消去剤等の効果を示したものである。がん組織部位において, 正常組織部位に比べてニトロキシルラジカル代謝速度が亢進していることが分かった [Fig. 2(A)]. ニトロキシルラジカル/還元体比は, 対照肢に比べて有意に増加していたことから, がん組織部におけるスピンプローブ代謝速度亢進機序として, ニトロキシル体からヒドロキシルアミン体への還元反応亢進が考えられた。また, がん組織部におけるニトロキシルラジカル代謝速度亢進は,  $\cdot\text{OH}$  スカベンジャーや SOD, カタラーゼにより抑制されず, がん組織における酸化脂質量に, 顕著な増加はみられなかったことから, 活性酸素に依存しないスピンプローブ還元亢進が示唆され

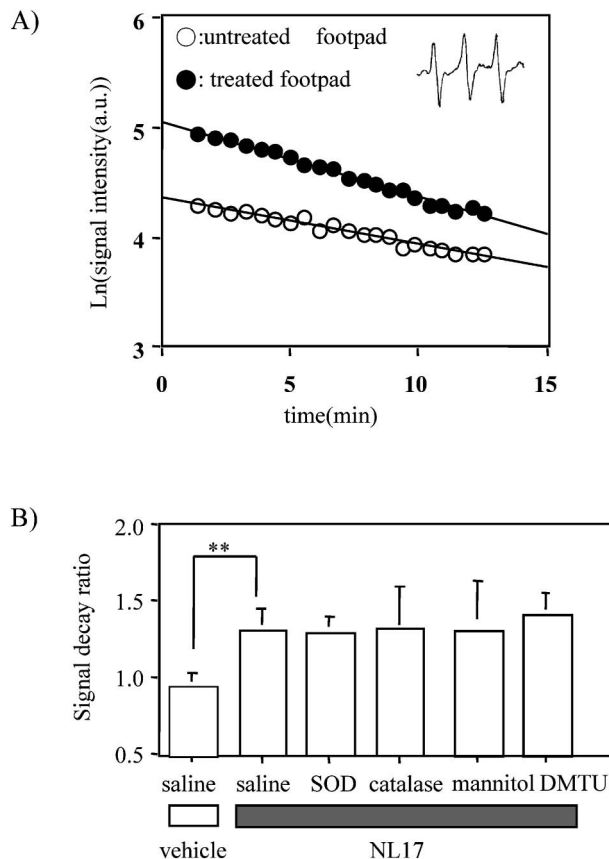


Fig. 2. *In vivo* ESR Signal Intensity of Nitroxyl Radicals and Effects of Antioxidants on the Decay Rates

A) After intravenous injection of carbamoyl PROXYL, ESR signal intensity at lower magnetic field were plotted and signal decay rates were calculated by linear fitting of semi-logarithmic plot of the ESR signal intensities. B) Effect of antioxidants on the signal decay of carbamoyl-PROXYL in NL-17 treated footpad. Four days after the treatment, mannitol, DMU, 1000U SOD or 1000U catalase was intravenously injected with carbamoyl-PROXYL. The data are expressed as ratio in the signal decay rates between control and tumor footpads. All values represent means of 4 to 5 mice with S.D.  $**p < 0.05$ .

た [Fig. 2(B)]. したがって, 生体内酸化還元系や電子伝達系, あるいは種々抗酸化物質変動等のレドックスが, 腫瘍組織において正常組織とは異なる可能性が示唆された。分配係数の異なるニトロキシルラジカルを併用し, 生体レドックス代謝速度の経日的変化を計測したところ, 組織移行性プローブで顕著な代謝速度の亢進が認められたのに対して, 血中滞留性プローブでは, 代謝亢進は認められなかった (Fig. 3)。以上の通り, 組織分布の異なるニトロキシルプローブの併用により, 本移植がんモデルにおいて生体レドックス状態の変動は, 腫瘍組織において生じていることが強く示唆された。

### 4. 生体レドックス状態の画像化

生体におけるラジカル・レドックスの詳細な部位

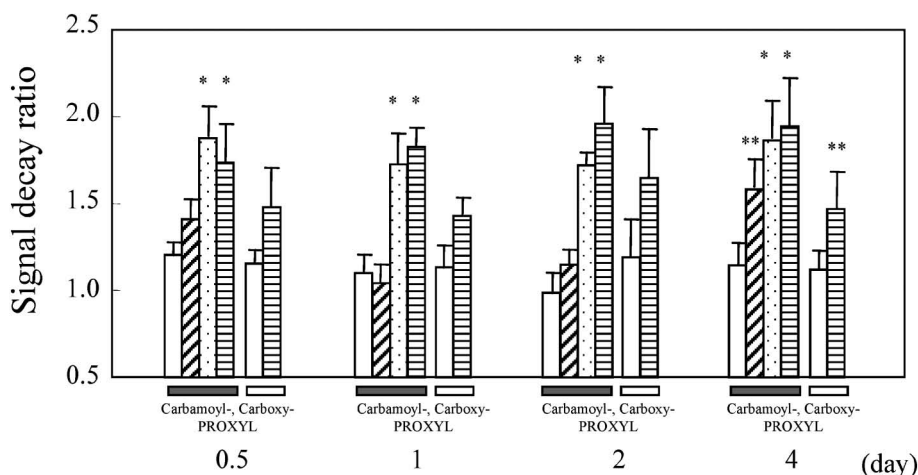


Fig. 3. Time Courses of Signal Decay Ratio after NL-17 Treatment by Using Carbamoyl- or Carboxy-PROXYL as the Nitroxyl Probes

Signal decay rates were calculated by linear fitting of semi-logarithmic plot of the ESR signal intensities. The data are expressed as ratio in the signal decay rates between control and tumor footpads. ESR spectra at footpad domain were measured at 0.5, 1, 2, 4 day after NL-17 treatment. All values represent means of 4 mice with S.D. \*\* $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$ .

解析には、生体内ラジカル・レドックスの画像化 (ESRI; Electron Spin Resonance Imaging) が必須である。一方、ESRI はフリーラジカルを特異的に測定する手法であり、組織情報は得られないことから、ESRI 単独では、ROS 産生、あるいはレドックス代謝部位が明確でない。そこで、ESRI に MRI 画像を重畳する装置開発が試みられてきた。<sup>2,27)</sup> われわれも、ESRI・MRI 融合型磁気画像解析装置の開発を行い、<sup>2)</sup> 生体内での酸化ストレス・レドックス代謝と解剖学的組織情報を重畳することで、より詳細な病態解析を行っている (Fig. 4)。

さらに、近年、核・電子間のオーバーハウザー効果を利用したオーバーハウザー効果 MRI (OMRI; Overhauser Enhanced Magnetic Resonance Imaging) が開発された。<sup>28)</sup> オーバーハウザー効果は、電子・核スピンの相互作用とそれによる磁化変化を伴う現象である。<sup>29-31)</sup> 現在では、より一般化され核スピン間の相互作用を表す核オーバーハウザー効果 (NOE; Nuclear Overhauser Effect)、あるいは動的核偏極 (DNP; Dynamic Nuclear Polarization) と呼ばれ、NMR 計測で汎用されている。OMRI/スピンプローブ法では、ニトロキシルプローブの電子スピンを励起し、1 H NMR 信号の変化を計測することで、理論的には 1 H 信号が約 300 倍まで増加する。

ニトロキシルプローブの既存計測法である ESRI との最も大きな違いは、その画像解像度にある。

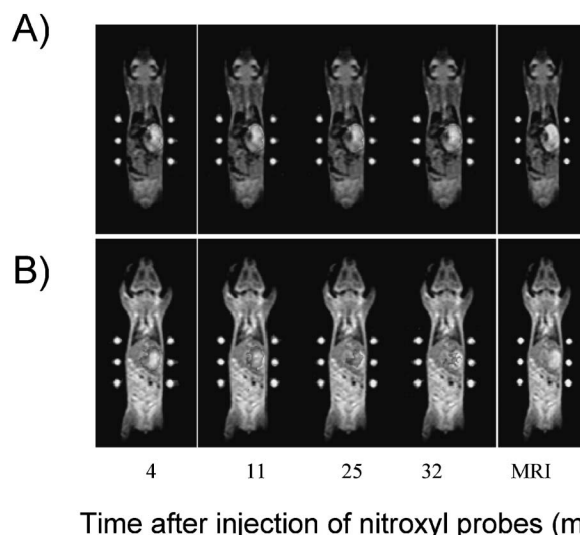


Fig. 4. Typical Demonstration of ESRI and MRI Coregistration

Both images were superimposed by using 6 fiducials which contained nitroxyl radical solution. Free radicals were artificially generated by intragastric injection of Haber-Weiss reagents (0.33 mM Cu ion, 3.3 mM hypoxanthine and 0.5 units of xanthine oxidase with nitroxyl radicals. A) vehicle group, B) Haber-Weiss group.

ESRI の画像解像度は、ニトロキシルプローブの吸収線幅と傾斜磁場強度に依存するため数 mm 程度であり、また画像内の高周波情報をフィルタリングで欠損するため、エッジの検出に劣る。一方、OMRI では直接の測定対象は水素核であることから、ニトロキシルラジカルの吸収線幅に依存する画像分解能の低下が生じない。

われわれは、2003 年に本装置を導入するととも

に、新たに画像撮像シーケンスを開発した。すなわち、ニトロキシラジカルの窒素核の核スピニングに着目し、 $^{14}\text{N}$ あるいは $^{15}\text{N}$ で標識することで、 $^{14}\text{N}$ 体と $^{15}\text{N}$ 体ニトロキシラジカルの情報を同時にかつ分離して画像解析する手法を確立した。<sup>32)</sup> 本手法を用いて、ファントム中に酸化剤、あるいは還元剤を添加することで、酸化・還元反応の画像化に成功するとともに、アスコルビン酸含有リポソームを用い、リポソーム膜内・外での反応を区別して画像解析できることを示した (Fig. 5)。すなわちニトロキシラジカルの物性を生かすことで、レドックス反応やリポソーム膜内外を切り分けて、それぞれで生じる反応を同時に分離して画像解析できることに初めて成功した。

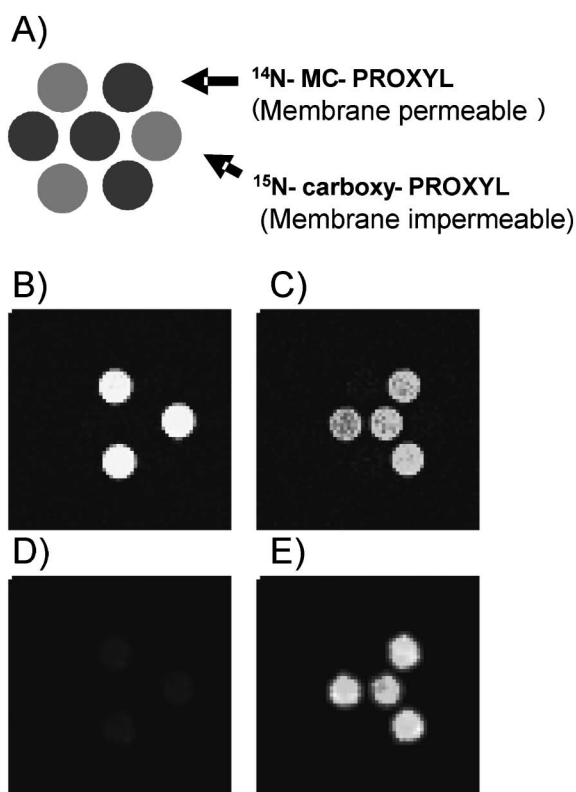


Fig. 5. Simultaneous OMRI of  $^{14}\text{N}$ -MC-PROXYL and  $^{15}\text{N}$ -carboxy-PROXYL in liposomes encapsulating AsA (100 mM)

Seven phantom tubes containing  $^{14}\text{N}$ -labeled or  $^{15}\text{N}$ -labeled nitroxyl radicals and liposomes were placed in the OMRI scanner (A). The  $^{15}\text{N}$ -nitroxyl radicals are shown by the red color, and  $^{14}\text{N}$ -nitroxyl radicals are in the blue color. The OMRI images were shown for  $^{15}\text{N}$ -, or  $^{14}\text{N}$ -nitroxyl radicals (B, or C). The decay rates in the image intensity were calculated by assuming first-order kinetics for the time-dependent decrease of the contrast for  $^{15}\text{N}$ -, or  $^{14}\text{N}$ -nitroxyl radicals (D, E). Note that only MC-PROXYL showed decay images in OMRI. FOV:  $48 \times 48$  mm, matrix:  $64 \times 64$ , slice thickness: 10 mm,  $T_R/T_E/T_{ESR}$ : 1200/25/600 ms.

## 5. まとめ

本稿では、磁気共鳴手法による生体レドックス状態計測における、造影剤プローブ、計測手法について概説した。われわれのグループでは OMRI 装置の開発を進めており、今後、様々な酸化ストレス性疾患におけるレドックス動態を非侵襲的に、高感度画像解析することで、酸化ストレス性疾患の機序解明や創薬研究・治療戦略の構築につながると考えている。

## REFERENCES

- 1) Yamato M., Egashira T., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 1619–1631 (2003).
- 2) Matsumoto S., Koshiishi I., Inoguchi T., Nawata H., Utsumi H., *Free Radic. Res.*, **37**, 767–772 (2003).
- 3) Ogawa S., Lee T. M., Kay A. R., Tank D. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 9868–9872 (1990).
- 4) Suzuki T., Utsumi H., Inoue K., Nojima S., *Biochim. Biophys. Acta*, **644**, 183–191 (1981).
- 5) 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).
- 6) Bryant R. G., Polnaszek C., Kennedy S., Hetzler J., Hickerson D., *Med. Phys.*, **11**, 712–713 (1984).
- 7) Griffeth L. K., Rosen G. M., Rauckman E. J., Drayer B. P., *Invest. Radiol.*, **19**, 553–562 (1984).
- 8) Keana J. F., Van Nice F. L., *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, **16**, 477–480 (1984).
- 9) Keana J. F., Pou S., *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, **17**, 235–240 (1985).
- 10) Lamarque J. L., Almes C., Rouanet J. P., Prat X., Bruel J. M., Pujol J., Rodiere M. J., Martin J. M., Lopez P., Rossi M., *Eur. J. Radiol.*, **6**, 48–52 (1986).
- 11) Rosen G. M., Griffeth L. K., Brown M. A., Drayer B. P., *Radiology*, **163**, 239–243 (1987).
- 12) Krishna M. C., Grahame D. A., Samuni A., Mitchell J. B., Russo A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 5537–5541 (1992).
- 13) Xavier S., Yamada K., Samuni A. M., Samuni

- A., DeGraff W., Krishna M. C., Mitchell J. B., *Biochim. Biophys. Acta*, **1573**, 109–120 (2002).
- 14) Voest E. E., van Faassen E., Marx J. J., *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 589–595 (1993).
- 15) Krishna M. C., Russo A., Mitchell J. B., Goldstein S., Dafni H., Samuni A., *J. Biol. Chem.*, **271**, 26026–26031 (1996).
- 16) Utsumi H., Shimakura A., Kashiwagi M., Hamada A., *J. Biochem. (Tokyo)*, **105**, 239–244 (1989).
- 17) Iannone A., Tomasi A., Vannini V., Swartz H. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1034**, 290–203 (1990).
- 18) Quintanilha A. T., Packer L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 570–574 (1977).
- 19) Phumala N., Ide T., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1209–1217 (1999).
- 20) Sano T., Umeda F., Hashimoto T., Nawata H., Utsumi H., *Diabetologia*, **41**, 1355–1360 (1998).
- 21) Han J. Y., Takeshita K., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 516–525 (2001).
- 22) Yasukawa K., Kasazaki K., Hyodo F., Utsumi H., *Free Radic. Res.*, **38**, 147–155 (2004).
- 23) Takeshita K., Takajo T., Hirata H., Ono M., Utsumi H., *J. Invest. Dermatol.*, **122**, 1463–1470 (2004).
- 24) Sano H., Naruse M., Matsumoto K., Oi T., Utsumi H., *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 959–969 (2000).
- 25) Yokoyama H., Itoh O., Aoyama M., Obara H., Ohya H., Kamada H., *Magn. Reson. Imaging*, **18**, 875–879 (2000).
- 26) Ichikawa K., Sakabe E., Kuninobu K., Yamori T., Tsuruo T., Yao T., Tsuneyoshi M., Utsumi H., *Antioxid. Redox Signal*, **9**, 1699–1707 (2007).
- 27) He G., Deng Y., Li H., Kuppasamy P., Zweier J. L., *Magn. Reson. Med.*, **47**, 571–578 (2002).
- 28) Lurie D. J., Bussell D. M., Bell L. H., Mallard J. R., *J. Magn. Reson.*, **76**, 366–370 (1988).
- 29) Overhauser A. W., *Phys. Rev.*, **92**, 411–415 (1953).
- 30) Overhauser A. W., *Phys. Rev.*, **89**, 689–700 (1953).
- 31) Kittel C., *Phys. Rev.*, **95**, 589–590 (1954).
- 32) Utsumi H., Yamada K., Ichikawa K., Sakai K., Kinoshita Y., Matsumoto S., Nagai M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 1463–1468 (2006).