

研究報告書

「超偏極 ^{13}C MRI による恒常性破綻臓器ネットワークの動的可視化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 2 月～平成 30 年 3 月

研究者: 松元 慎吾

1. 研究のねらい

人において生体内恒常性を経時的に計測し、その変容・破綻を捉えようとする場合、その手法は主に2つに大別される。1つは血液、尿、唾液など比較的容易に得られる検体の成分分析、もう1つは非侵襲的な手法であり、特に MRI、PET、超音波エコー等による画像診断が挙げられる。ストレスや加齢、多くの疾患は様々な代謝変化を引き起こす。従って、代謝物・生体内低分子の解析は恒常性を把握する手法として理に適う。血液や尿の成分分析は、質量分析メタボローム解析により 100 種類を超える代謝物を同時定量することで、恒常性の変容を体系的に捉える事が可能であるが、特定臓器で起こる現象の検出は限定的であり、臓器間の機能ネットワークに関わる分子を実際の患者で捉えることは難しい。一方で、臨床で用いられている画像診断技術は多臓器の計測に優れる反面、代謝変化の検出には無力に等しい。 ^1H や ^{31}P の生体計測 NMR で一部の代謝物の検出が可能であるが、その実用性は特定の臓器や疾患に限られる。

Hyperpolarized ^{13}C Magnetic Resonance Imaging (超偏極 ^{13}C MRI) は安定同位体である炭素 13 の NMR 信号強度を数万倍に増幅する MRI の最新技術である。任意の化合物内の特定の炭素を ^{13}C 標識し、励起することで、その生体内における代謝反応をリアルタイムかつ非侵襲的に可視化することを可能とする。欧米では既に ^{13}C 標識ピルビン酸の超偏極 MRI による前立腺癌診断や心機能評価の臨床応用が始まっているが、数億円に上る初期費用がネックとなり、この革新的な代謝イメージング技術の国内普及は進んでいない。

上記の背景を踏まえ、本研究では「様々な要因で起こる恒常性破綻に付随する複数の代謝変容や機能変化を同時かつ非侵襲的に可視化」する基盤技術の創出を主題とした。具体的には、① ^{13}C チャネルの高感度化に特化した $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ MRI 装置、②超偏極 ^{13}C MRI 代謝イメージングによる病態の把握と治療効果の予測技術、③臨床コストを 10 分の 1 に抑制することを指向した新規 ^{13}C 励起装置、④異なる代謝経路を検出する複数の ^{13}C 標識化合物カクテルを同時に投与・画像化するマルチプレックス超偏極 ^{13}C MRI 代謝イメージング技術、の4点について研究開発を行い、生体内恒常性の破綻を包括的に把握する計測技術の確立を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

上記の研究テーマ①において、市販の MRI 装置は ^1H 核による形態像の取得が主目的であり、 ^{13}C 計測では種々の感度ロスを伴う。そこで ^{13}C の高感度計測に特化した $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ MRI 装置を独自に開発した(図1)。主磁場強度、共振器構造、フィルター特性等を全て ^{13}C チャネルの感度を優先してシステムを構築することにより、カルボニル炭素については、市販の高磁場 MRI 装置に比べ 4 倍以上の高感度化を実現した。

次に研究テーマ②として、現行の動的核偏極型の ^{13}C 励起装置を用いて、担癌モデルに

における抗癌治療効果の評価・予測への超偏極 ^{13}C MRI ピルビン酸代謝イメージングの有用性を検証した。放射線治療の開始翌日に一過性の酸化的リン酸化から解糖系(乳酸生成)への代謝シフトが観察された後、3日目では乳酸生成はコントロール群に比べ有意に低下した(図2)。このような治療開始初期においては、通常の形態像には変化が見られず、代謝イメージングにより抗癌治療効果が早期に評価できることが示された。また、治療応答性の異なる3種の膵管癌モデルの比較において、エネルギー代謝フラックの違いから放射線治療や化学療法に対する応答性の違いを予測出来る可能性が示唆された(図3)。

上記の研究と並行して、臨床初期コストの抑制を指向した室温・低磁場で ^{13}C 核スピんに超偏極を誘導できる新規 ^{13}C 励起装置を開発した(特許出願)。現段階で、1.5T の熱平衡状態と比べ約 2 万倍の ^{13}C NMR 信号の励起を達成している。

研究テーマ④では、標的酵素やメカニズムが不明瞭な恒常性の揺らぎを包括的に捉えるために、複数の代謝プローブを投与し、そこから派生する数十種類の代謝物を同時に区別して計測するマルチプレックス代謝イメージングの基盤技術を開発した。具体的には、a) 部分フーリエ法と Homodyne または POCS 再構成法を組み合わせることで撮像時間を約4割短縮し、その節約した時間をスペクトル分解能の向上に当てた。次に、b) 1枚の代謝フラックス画像を計算するのに必要な1万以上のスペクトルデータ全てにフォーク関数でフィッティングを掛け、全ての代謝物のスペクトル情報を抽出後、各代謝物毎にスペクトルを分離して画像再構成することで、スペクトルの重なりがある代謝物も区別して各代謝フラックスを高精度に算出することを可能とする情報処理技術確立した。

(2) 詳細

研究テーマ① 「 ^{13}C チャンネルの高感度化に特化した $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ MRI 装置の開発」

市販の MRI 装置は形態像を得ることが主目的である。従って水分子の ^1H 核の計測に最適化されており、 ^{13}C を含む多核計測においては種々の感度ロスを伴う。本研究では、超偏極 ^{13}C MRI 研究のため、主磁場強度、共振器構造、フィルター特性等を全て ^{13}C チャンネルの感度を最優先して設計した $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ MRI 装置を自作した。特にエネルギー代謝物に多く含まれるカルボニル炭素については、市販の高磁場 MRI 装置に比べ、理論値比較で 4 倍以上の高感度化を実現した。

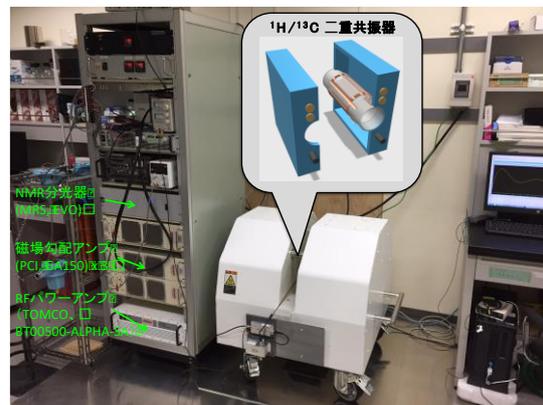


図1 ^{13}C チャンネルの高感度化に特化した $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ MRI装置 (1.5T)

研究テーマ② 「代謝イメージングによる病態の把握と治療効果の予測」

疾患モデル動物のメタボローム研究から、多くの疾患の発症や進展、あるいは治療前後において、様々の代謝変容が起こることが明らかとなっている。本研究では、まず、担癌モデルマウスの放射線治療前後におけるエネルギー代謝を、超偏極 ^{13}C MRI で経時的に計測した。マウス扁平上皮癌 SCCVII とヒト大腸癌 HT29 の 2 種類の腫瘍において、放射線治療の

過程で一過性に酸化的リン酸化から解糖系(乳酸産生)への代謝シフトが起きた後、解糖系の代謝抑制が起きることを非侵襲的に示した(図2)。本成果は *Clinical Cancer Research* に報告した。

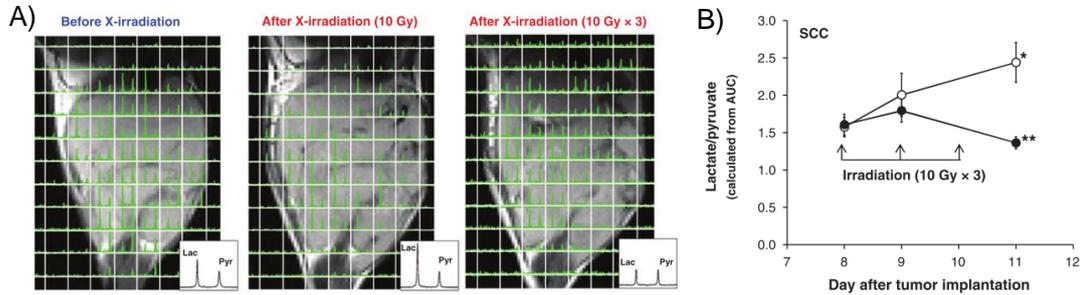


図2 超偏極¹³C MRIによる放射線治療前後のエネルギー代謝変容の可視化 (*Clin Cancer Res* 2015)

次に、治療応答性の異なる3種類のヒト膵管癌モデルにおいて、超偏極 ¹³C MRI 代謝イメージングを行い、非侵襲的に取得したエネルギー代謝情報と、ゲムシタビン(GEM)、低酸素標的薬 TH-302、放射線(XRT)の各治療効果との相関性について検証した。同じヒト膵管癌であっても、エネルギー代謝は細胞により大きく異なり、ピルビン酸を乳酸へと変換する代謝フラックス(LDH 酵素活性に相当)が速い腫瘍はゲムシタビンおよび TH-302 の治療応答性が良く、逆にこの代謝フラックスが遅い腫瘍は放射線治療に高い応答性を示した(投稿中)。

これらの結果より、超偏極 ¹³C MRI によるエネルギー代謝イメージングは抗癌治療効果の確認や事前予測に有用であることが示された。

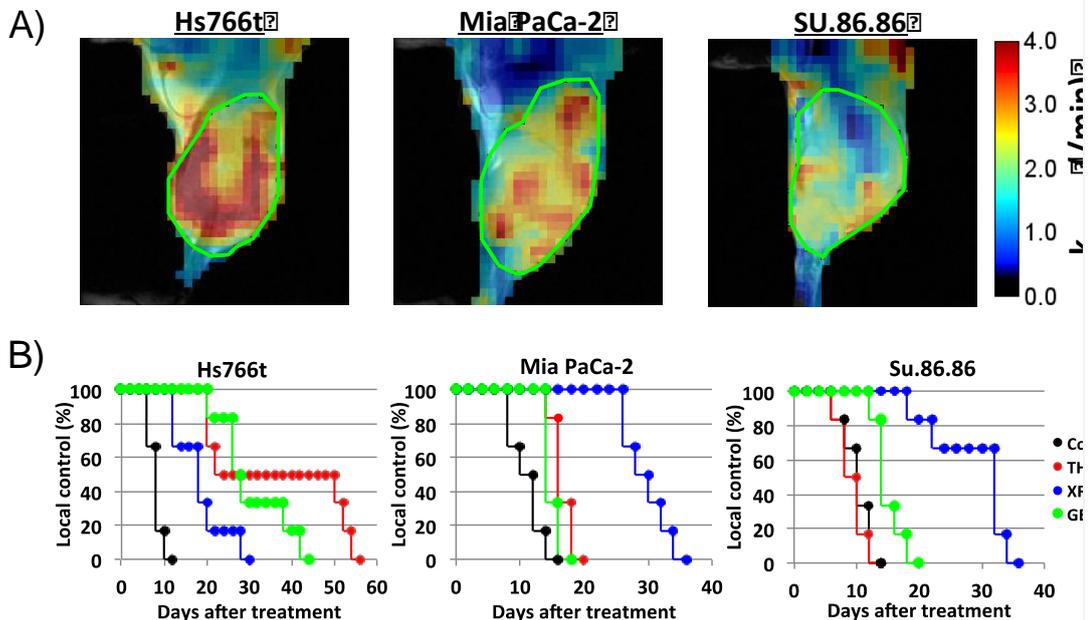


図3 超偏極¹³C MRI代謝イメージングによる抗癌治療効果の予測

研究テーマ③「臨床コストの10分の1に抑制することを指向した新規 ¹³C 励起装置」
 上述のように、3T以上の超電導磁石と、約1Kの極低温下におけるマイクロ波照射を必要

とする現行の動的核偏極型 ^{13}C 励起装置による超偏極 ^{13}C MRI の臨床初期費用は数億円に上り、本技術の国内普及を妨げる主因となっている。本研究では、室温かつ低磁場で ^{13}C 核スピンを励起可能な励起装置を開発し、現在、現行装置と同等の約 2 万倍の ^{13}C MRI 信号の励起を達成している。（未公開の特許技術を含むため、詳細は非公開項目のみに記載）。

研究テーマ④「異なる代謝経路を同時検出するマルチプレックス代謝イメージング技術」

通常の超偏極 ^{13}C MRI では1種類の代謝プローブを用いて特定の代謝フラックスのみを計測することを基本とする。しなしながら、標的酵素やメカニズムが不明瞭な恒常性の揺らぎを包括的に捉えようとする場合、複数の代謝プローブを投与し、そこから派生する数十種類の代謝物を同時に区別して計測することが望まれる。この場合、スペクトルの分解能と各代謝物の NMR スペクトルの重なりが問題となる。スペクトル分解能は時間分解能（撮像時間）とトレードオフの関係にあるため、本研究では、a) MRI 画像データのフーリエ空間における対称性を利用した部分フーリエ法と Homodyne または POCS 再構成法を組み合わせることで（スパースモデリングの一種）撮像時間を約4割短縮し、その節約した時間をスペクトル分解能の向上に当てた。次に、b) 1枚の代謝フラックス画像を計算するのに必要な1万以上のスペクトルデータ全てにフォークト関数でフィッティングを掛け、そこに含まれる全ての代謝物のスペクトル情報を抽出し、各代謝物毎にスペクトルを分離して画像再構成することで、スペクトルの重なりがある代謝物も区別して各代謝フラックスを算出することが可能となり、マルチプレックス代謝イメージングの基盤技術の1つが確立された。

3. 今後の展開

本さがけ研究により、国内では初となる超偏極 ^{13}C MRI 撮像に成功した意義は大きい。開発したマルチプレックス代謝イメージングを様々な疾患モデルに適用し、病態に伴う代謝変容を非侵襲的に捉えることで、新たな病態メカニズムの解明や治療戦略の最適化に繋げる。また、本分子イメージング技術は安定同位体である ^{13}C を分子標識とする点で、蛍光標識等に比べ、汎用性が極めて高く、広く有機合成研究者と連携してくことで、診断に有用な新規代謝プローブの開発に繋げていく。

4. 評価

(1) 自己評価

（研究者）

超偏極 ^{13}C 研究に特化した $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ MRI 装置の作製、低コスト型 ^{13}C 励起装置の開発、マルチプレックス代謝イメージングのデータ解析ソフトウェアの開発などハード・ソフト両面での基盤技術開発に関しては、研究計画上のほぼ全ての研究目的を達成できた。しかしながら、この基盤技術開発に想定以上の時間が掛かり、疾患モデルを用いた応用研究に関しては担癌モデルによるピルビン酸代謝イメージングのみに止まった。基盤技術開発が遅れた要因として、MRI 装置の主磁場となる磁気回路の購入手続きと納品に想定以上の時間が掛かり、第2年度末の納品となったこと、および、 ^{13}C 励起装置を構成する主要部品の相次ぐ故障によ

る修理に計 7 ヶ月を要したため、MRI 研究にも拘わらず、実際に MRI を用いた研究期間が1年半しか確保できなかった点が挙げられる。一方で、この待ち時間に電子常磁性共鳴を用いた 3 次元 pH イメージング技術の開発が進み、MRI との重畳画像システムを構築できたことは、今後の多機能画像システムによる生体内恒常性の包括的理解に繋がる研究成果であると言える。

超偏極 ^{13}C MRI は分子イメージング分野において、今世紀最大の発見と呼ばれるほどの革新的な分子標的技術にも拘わらず、高額な初期コストの問題もあり、日本国内には全く普及していない。本さがけ研究支援により、超偏極 ^{13}C MRI 代謝イメージングを実際に撮像できる、把握する限りでは、国内唯一の研究拠点を北海道大学に立ち上げることが出来た意義は大きく、今後の本研究分野への多くの研究者の新規参入と画像診断技術の向上に貢献できるものとする。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

Hyperpolarized ^{13}C Magnetic Resonance Imaging(超偏極 ^{13}C MRI)は安定同位体である炭素 ^{13}C の NMR 信号強度を数万倍に増幅する MRI の最新技術である。任意の化合物内の特定の炭素を ^{13}C 標識し、励起することで、その生体内における代謝反応をリアルタイムかつ非侵襲的に可視化することが可能となる。欧米では既に ^{13}C 標識ピルビン酸の超偏極 MRI による前立腺癌診断や心機能評価の臨床応用が始まっているが、数億円に上る初期費用がネックとなり、この革新的な代謝イメージング技術の国内普及は進んでいない。

本研究課題では様々な要因で起こる恒常性破綻に付随する複数の代謝変容や機能変化を同時かつ非侵襲的に可視化する基盤技術の創出を目指し、主磁場強度、共振器構造、フィルター特性等を全て ^{13}C チャネルの感度を優先してシステムを構築することにより、カルボニル炭素については、市販の高磁場 MRI 装置に比べ 4 倍以上の高感度化を実現し、超偏極 ^{13}C MRI の撮影に成功した。論文としての成果はこれからであるが、松元慎吾研究者が数億円以上必用とする機器と同等の機器を本さがけの研究費で独自に作り上げたのは非常に高く評価できる。その結果、現時点で本さがけ研究者のみが我が国において、超偏極 ^{13}C MRI 代謝イメージングを実際に撮像出来る状況にあることは大きな成果といえる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Saito K, Matsumoto S, Takakusagi Y, Matsuo M, Morris HD, Lizak MJ, Munasinghe JP, Devasahayam N, Subramanian S, Mitchell JB, Krishna MC. ^{13}C -MR Spectroscopic Imaging with Hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ pyruvate Detects Early Response to Radiotherapy in SCC Tumors and HT-29 Tumors. Clin Cancer Res. 2015, 21(22), 5073-81
2. Yasui H, Kawai T, Matsumoto S, Saito K, Devasahayam N, Mitchell JB, Camphausen K, Inanami O, Krishna MC. Quantitative imaging of pO₂ in orthotopic murine gliomas: hypoxia correlates with resistance to radiation. Free Radic Res. 2017, 51(9-10), 861-871

3. Takakusagi Y, Kishimoto S, Naz S, Matsumoto S, Saito K, Hart CP, Mitchell JB, Krishna MC. Radiotherapy Synergizes with the Hypoxia-Activated Prodrug Evofosfamide: In Vitro and In Vivo Studies. *Antioxid Redox Signal*. 2018, 28(2), 131-140
4. Kishimoto S, Matsumoto KI, Saito K, Enomoto A, Matsumoto S, Mitchell J, Devasahayam N, Krishna MC. Pulsed EPR imaging: Applications in the studies of tumor physiology. *Antioxid Redox Signal*. 2017, doi: 10.1089/ars.2017.7391. *Epub ahead of print*
5. Amida T, Nakaoka R, Komarov DA, Yamamoto K, Inanami O, Matsumoto S, Hirata H. A 750-MHz electronically tunable resonator using microstrip line couplers for electron paramagnetic resonance imaging of a mouse tumor-bearing leg. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2017, doi: 10.1109/TBME.2017.2743232. *Epub ahead of print*

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 受賞, Distinguished Reviewer Award for Magnetic Resonance in Medicine, from ISMRM, 受賞日 2015年5月30日
2. 招待講演, 生理機能および代謝イメージングによる抗癌治療効果の予測, 日本薬学会第135年会, 2015年3月26日, 神戸市・神戸学院大学
3. 招待講演, 超偏極 ^{13}C MRIによる腫瘍の代謝イメージング, 第43回日本磁気共鳴医学会大会, 2015年9月10日, 東京・東京ドームホテル
4. 口頭発表, 核偏極の代謝イメージングへの応用, 日本物理学会・第72回年次大会, 2017年3月26日, 大阪・大阪大学
5. 招待講演, 磁気共鳴による酸素イメージングの癌治療への応用, 第5回低酸素研究会, 2017年7月29日, 東京・早稲田大学先端医科学センター