

氏名（本籍）	子安 憲一	（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1188号	
学位授与日付	令和4年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Spatiotemporal imaging of redox status using in vivo dynamic nuclear polarization magnetic resonance imaging system for early monitoring of response to radiation treatment of tumor	
審査委員	（主査）教授 森田 浩之	
	（副査）教授 道上 知美	教授 坂口 裕和

論文内容の要旨

【背景と目的】 がんに対する放射線治療効果は治療後に画像診断装置を用いて形態学的変化によって評価される。しかし、治療効果を十分に得られない場合には時間的な制約により効果的な他の治療を受ける機会を失うことがあるため治療効果を早期に診断、予測できる技術の開発が急務である。

放射線照射がもたらす主な抗腫瘍効果は直接作用と間接作用があり、X線では間接作用が支配的に起き、水分子との反応によって生じるヒドロキシルラジカルなどの reactive oxygen species (ROS) が腫瘍細胞を酸化させ抗腫瘍効果を引き起こす。正常細胞と比較し腫瘍細胞は多量の ROS と還元分子を発生させ、両者のレドックス制御は高度に維持されており、放射線照射後のこのレドックス状態の変動は、その後の治療効果と関連している可能性がある。しかし、放射線照射後の腫瘍組織におけるレドックス状態の時間・空間的な動態は未だ明らかにされておらず、レドックス状態の変動と治療効果の関連を明らかにできれば、早期画像診断に繋がる可能性がある。腫瘍内レドックス状態を可視化するために、今回我々は *in vivo* 動的核偏極 (dynamic nuclear polarization; DNP) -MRI 装置を使用した。*in vivo* DNP-MRI は、通常のプロトン MRI 信号を収集する前に投与したフリーラジカルの電子スピン共鳴周波数と一致するマイクロ波を照射し電子スピン共鳴を引き起こすことにより、生体内で DNP 効果を誘発し組織内でのフリーラジカルを含むプロトン信号を飛躍的に向上させる装置である。投与したフリーラジカルは腫瘍内でレドックス代謝を受け DNP 信号が減少していくため、この手法を用いることにより腫瘍内レドックス変動を非侵襲的に検出することが可能である。

腫瘍組織は治療抵抗性を獲得するために様々ながん代謝能を持ち合わせている。特に腫瘍細胞は酸素の存在下においても、解糖系を使用して adenosine triphosphate (ATP) を産生していることがワーバーク効果として知られている。この代謝能を評価する方法として positron emission tomography (PET) や超偏極 ^{13}C ピルビン酸を用いた dissolution DNP 法が存在し、PET は全身のがん検査等の画像診断に用いられているが、被ばくを伴うため繰り返しの検査が困難である。dissolution DNP 法は主に超偏極化装置にて超偏極状態にした ^{13}C ピルビン酸溶液を静脈内投与することにより腫瘍のピルビン酸から乳酸へのがん代謝を MR スペクトルにて計測する技術である。

本研究では、*in vivo* DNP-MRI を用いて放射線照射後の腫瘍内レドックス状態の早期の変動を検出し、その変動を引き起こす生体内因子を特定することを目的とした。また、腫瘍内レドックス状態と dissolution DNP 装置 (HyperSense: Oxford instruments 社製) を用いた腫瘍内乳酸代謝とを比較し、両者の早期変動の比較検証を試みた。

【対象と方法】 6週齢の雌マウス (BALB/c-nu mice) の右下肢にヒト膵臓がん細胞株 (MIA PaCa-2)

を移植し、腫瘍径が 500mm³に達した時点で、放射線照射前の *in vivo* DNP-MRI の撮像を carbamoyl PROXYL (CmP) 投与後に経時的に行った。また、腫瘍部の dissolution DNP-MR スペクトルの計測を超極値 ¹³C ピルビン酸投与後に経時的に行った。その後、放射線治療装置にて腫瘍に対して 5Gy の放射線照射を施行した。放射線照射後、*in vivo* DNP-MRI の経日的な撮像および、24 時間後の dissolution DNP-MR スペクトルの計測を行った。*in vivo* DNP-MRI 撮像後に、1.5T MRI の T1 強調画像を撮像し形態学的評価を行った。得られた *in vivo* DNP 画像からは、腫瘍内 CmP のレドックス代謝速度と経時的なレドックス代謝を一元的に観察することが可能なレドックスマップを算出した。dissolution DNP-MR スペクトルからは ¹³C ピルビン酸と ¹³C 乳酸のスペクトル解析を行った。また、5Gy 照射 24 時間経過後の腫瘍を摘出し、high-performance liquid chromatography (HPLC) を用いて腫瘍内グルタチオンとアスコルビン酸量の定量的解析を行った。

【結果】 *in vivo* DNP-MRI を用いた検討では、DNP 現象を反映した腫瘍部の信号増強が CmP 投与約 4 分後に最大値を示し、その後経時的に減衰した。腫瘍内の CmP のレドックス代謝速度は照射前と比べ、照射後 24 時間、72 時間において著しい低下が認められ、7 日後には照射前の代謝速度と同等となった。レドックスマップにおける腫瘍内のレドックス代謝は、CmP のレドックス代謝速度の結果と同様の変化を示し、照射後 72 時間までは明らかに低下し、7 日後には照射前と同様のレドックス代謝となった。1.5T MRI を用いた形態学的評価では、この間に腫瘍体積に有意な変化は認められなかった。HPLC を用いた定量的解析では、照射後の腫瘍内グルタチオンとアスコルビン酸量はコントロール群と比べどちらも有意に低下していた。一方、dissolution DNP-MR スペクトルを用いた検討では、照射前と照射 24 時間後の乳酸代謝を示す ¹³C 乳酸の信号強度に有意な変化は認められなかった。

【考察】 *in vivo* DNP-MRI を用いたレドックス代謝速度の評価は、放射線照射による形態学的変化よりも早期に変動し、この腫瘍内レドックス代謝が低下する要因は、腫瘍内のグルタチオンとアスコルビン酸量が放射線照射によって低下することにより引き起こされたものと考えられる。また、放射線照射後の腫瘍内代謝変動は、dissolution DNP-MR スペクトルによるピルビン酸から乳酸へのがん代謝に比べ、*in vivo* DNP-MRI によるレドックス代謝が早期に変動していることが示唆された。

【結論】 本研究では、放射線照射後の早期のレドックス状態の時間・空間的な変動を *in vivo* DNP-MRI/CmP プローブ法にて可視化し、この変動には腫瘍内の還元分子であるグルタチオンとアスコルビン酸量の低下が関与していることを明らかとした。

論文審査の結果の要旨

申請者 子安 憲一 は、*in vivo* DNP-MRI/CmP プローブ法を用いて、放射線照射後に腫瘍内でのレドックス状態の早期の変動をレドックスマップとして可視化するとともに、放射線照射によって腫瘍内レドックス代謝速度が低下すること、その低下には腫瘍内のグルタチオンとアスコルビン酸量の減少が関与していることを明らかにした。本研究の成果は、放射線治療の効果が MRI による形態学的変化より *in vivo* DNP-MRI/CmP プローブ法によるレドックス代謝速度の変化の方が早期に診断・予測できることを示唆するものであり、放射線治療学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Norikazu Koyasu, Fuminori Hyodo, Ryota Iwasaki, Hinako Eto, Abdelazim Elsayed Elhelaly, Hiroyuki Tomita, Shinichi Shoda, Masaki Takasu, Takashi Mori, Masaharu Murata, Akira Hara, Yoshifumi Noda, Hiroki Kato, Masayuki Matsuo : Spatiotemporal imaging of redox status using *in vivo* dynamic nuclear polarization magnetic resonance imaging system for early monitoring of response to radiation treatment of tumor
Free Radic. Biol. Med. 179, 170-180 (2022). doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.311.