



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	EPRレドックスイメージングと他のイメージング技術の併用によるがん治療応答評価に関する研究
Author(s)	加藤, 千博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第16466号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16466
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95477
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuhiro_Kato.pdf



EPR レドックスイメージングと他のイメージング
技術の併用によるがん治療応答評価に関する研究

(Studies on the evaluation of cancer treatment
response using combined EPR redox imaging and
other imaging techniques)

加藤 千博

Kazuhiro Kato

<目次>

目次	1
略語表	3
学位関連論文リストと各章との関連	4
緒言	5
第一章：腫瘍におけるレドックス状態と糖代謝のマルチモーダルイメージングの実現可能性に関する研究	
1. 序論	8
2. 材料と方法	10
3. 結果	
3-1. 2回のレドックスイメージングにおける3CP還元速度の評価	17
3-2. BSO投与による腫瘍の3CP還元速度の評価	18
3-3. X線照射による腫瘍の3CP還元速度の評価	18
3-4. X線照射による腫瘍の低酸素領域の評価	19
3-5. BSO投与およびX線照射による腫瘍内還元物質の評価	19
3-6. レドックスイメージングと $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ARGとの併用解析	20
4. 考察	28
5. 小括	31
第二章：腫瘍内レドックスイメージングによるフェロトキシス検出	
1. 序論	32
2. 材料と方法	34
3. 結果	
3-1. IKE投与による腫瘍の3CP還元速度の評価	37

3-2. IKE 投与による腫瘍内還元物質と GPX4 発現の評価	37
3-3. IKE 投与による脂質過酸化の評価	38
3-4. レドックスイメージングと免疫組織化学染色の併用によるフェロト ーシス解析	38
4. 考察	43
5. 小括	44
総括	45
謝辞	47
引用文献	48
英文抄録	59

<略語表>

- [¹⁸F]DiFA: 2,2-dihydroxymethyl-3-[¹⁸F]fluoropropyl-2-nitroimidazole
- [¹⁸F]FDG: 2-deoxy-2-[¹⁸F] fluoro-D-glucose
- [¹⁸F]FMISO: [¹⁸F]-fluoromisonidazole
- 3CP: 3-carbamoyl-PROXYL (2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyl-N-oxyl)
- 4-HNE: 4-hydroxynonenal
- [⁶⁴Cu]Cu-ATSM: [⁶⁴Cu]Cu-diacetyl-bis(*N*¹-methylthiosemicarbazone)
- ARG: autoradiography
- BSO: L-buthionine-(*S*, *R*)-sulfoximine
- EPR: electron paramagnetic resonance
- EPRI: electron paramagnetic resonance imaging
- GSH: reduced glutathione
- GSSG: oxidized glutathione
- GPX4: glutathione peroxidase 4
- H&E: hematoxylin and eosin
- HPLC-ECD: high performance liquid chromatography-electrochemical detector
- IKE: imidazole ketone erastin
- PET: positron emission tomography
- PSL: photostimulated luminescence
- RI: radioisotope
- R-SG: 2-(4-((2-(4-amino-4-carboxybutanamido) -3- (carboxymethylamino) -3-oxoproyl thio)methyl)phenyl) -4-pyrrolidino-2,5,5-triethyl-2,5-dihydro-1H-imidazol-1-oxyl
- ROI: region of interest
- ROS: reactive oxygen species
- SE: standard error

＜学位関連論文リストと各章との関連＞

第一章の内容は Free Radical Biology and Medicine 誌に発表済である。

Kato K, Yasui H, Sato-Akaba H, Emoto MC, Fujii HG, Kmiec MM, Kuppusamy P, Mizuno Y, Kuge Y, Nagane M, Yamashita T, Inanami O. Feasibility study of multimodal imaging for redox status and glucose metabolism in tumor. Free Radic Biol Med 218, 57-67, 2024.

第二章の内容は Redox Report 誌に投稿、リバイス改訂中である。

Kato K, Yasui H, Sato-Akaba H, Emoto MC, Fujii HG, Kmiec MM, Kuppusamy P, Nagane M, Yamashita T, Inanami O. Non-invasive electron paramagnetic resonance imaging detects tumor redox imbalance induced by ferroptosis. Redox Rep, revised.

<緒言>

生体内のレドックス反応は様々な機能に関与し恒常性の維持に貢献している。ミトコンドリアを主な供給源とする活性酸素種（ROS）は、DNA 損傷や脂質過酸化を引き起こし、細胞死を誘導する^{51, 60}。生体内では ROS を除去しレドックスバランスを維持するために、様々な抗酸化物質が生成されている¹⁹。がん細胞は正常細胞と異なる代謝と高い増殖能力により、ROS 濃度が上昇している。がん細胞は ROS による細胞死を抑制するために高濃度の抗酸化物質を生成し、レドックスバランスを維持している³¹。したがって、がん細胞のレドックスバランスはかろうじて維持されており、過剰な ROS の負荷や抗酸化物質産生の抑制により容易にそのバランスが崩壊する³⁷。レドックスバランスの崩壊はがん細胞の生存率を低下させるため、腫瘍組織のレドックス状態を理解しモニタリングすることで効率的ながん治療が可能となる。

レドックスに関連する病態の一つにフェロトーシスがある。フェロトーシスは鉄依存性細胞死であり、レドックスバランスの崩壊や脂質過酸化物の蓄積によって引き起こされる¹²。がん細胞の上記のような生理学的特性や鉄の過剰蓄積により、がん治療におけるフェロトーシス誘導は有望な戦略となっている。しかし、イメージングを用いてフェロトーシスを検出することは困難である。

電子常磁性共鳴分光法（EPR）は不対電子を含む物質を直接検出できる唯一の計測手法である。動物に不対電子を持つ分子（プローブ）を投与し EPR イメージング（EPRI）を行う。プローブの特性によって組織中のレドックス状態や酸素分圧、pH の評価ができる^{26, 34, 64}。レドックスイメージングにはニトロキシルプローブである 3-carbamoyl-PROXYL（3CP）が主に使用される。3CP は不対電子を持ち EPR 信号を得られるが、抗酸化物質によって還元され時間と共に信号を喪失する。この変化を計測し生体内レドックス状態を可視化する^{27, 32}。

pH イメージングは pH 感受性ニトロキシルプローブである 2-(4-((2-(4-amino-4-carboxybutanamido) -3- (carboxymethylamino) -3-oxopropylthio)methyl)phenyl) -4-pyrrolidino-2,5,5-triethyl-2,5-dihydro-1H-imidazol-1-oxyl (R-SG) が使用され、腫瘍内のイメージングに成功している³⁴⁾。近年、低酸素を指標としてがん組織の悪性度から治療方針を決定する個別化医療が注目されている。以上のように今まで定量的な評価がされていないレドックス状態や pH の評価ががん治療の新たな鍵となる可能性がある。

従来の EPRI 装置は大型で据え置き型であるため、限られた環境でしか使用できなかった。また、検出感度が低いことから腫瘍内の不均一なレドックス状態の描出が難しく、組織切片や陽電子放射断層撮影 (PET) などのイメージング技術との比較が困難であり、腫瘍微小環境の動態を詳細に把握できないという課題があった。そこで、この課題を克服するために小型で分解と組み立てが容易な高い検出感度を持つ可搬型 EPRI 装置を使用した^{43, 44)}。本装置は任意の組織断面における 3CP の EPR 信号強度の減衰 (還元) 速度定数を再マッピングし、組織断面の還元力の強弱を示すレドックスマップの描出が可能である。このことからレドックスマップと組織切片の免疫染色との比較ができる可能性がある。

がん治療において、放射線治療やフェロトシス誘導による腫瘍のレドックス環境の変化を非侵襲的に検出できれば、治療抵抗性の評価やより効率的な治療方法の開発に役立つことが考えられる。そこで本博士論文では、この最新の可搬型 EPRI 装置による腫瘍のレドックスイメージングを組み込んだマルチモーダルイメージング法を確立し、これを用いて放射線治療前後の変化をモニタリングすること、およびレドックスに関連する病態の一つであるフェロトシスの検出を行うことを目的とした。

第一章では、放射線治療前後の腫瘍のレドックス環境の変化を同一個体で非

侵襲的に検出し、レドックスマップと腫瘍組織切片を比較した。さらに、レドックスマップと 2-deoxy-2-[^{18}F] fluoro-D-glucose ([^{18}F]FDG) を使用したオートラジオグラフィー (ARG) により得られた糖代謝情報を比較した。その結果、グルタチオン合成阻害剤 BSO 処理および X 線照射により、腫瘍内の 3CP 還元速度は有意に減少し、レドックスマップはほぼ同じ断面の組織切片と比較することができた。さらに、EPRI と ARG の比較により、腫瘍内の高い還元力を持つ領域は糖代謝が亢進しているが、この還元力と糖代謝の相関は X 線照射後には消失することが明らかとなった。第二章では、EPRI と腫瘍組織切片の免疫組織化学染色の比較によって腫瘍のフェロトキシス検出を行った。その結果、レドックスマップと腫瘍組織切片の 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) の免疫組織化学染色画像との比較から、腫瘍組織の還元力と脂質過酸化に負の相関があることが明らかになった。

以上より、レドックスマップは ARG や組織切片の免疫組織化学染色と比較することができた。近年、PET-CT や PET-MRI など異なるイメージング法を組み合わせた装置が開発され、得られた複数の生体内機能情報からより正確な診断や治療予後判定が可能となっており、このようなマルチモーダルイメージングの重要性が増している³⁸⁾。腫瘍のレドックス状態やグルコース取り込み、形態画像を同時に評価できれば、高い精度でがん治療による微小環境の変化を判定できるようになる。本装置は PET や ARG などの放射線同位元素 (RI) を使用する特殊施設に持ち込み稼働できるため、これらのイメージング法を組み合わせた新しいマルチモーダルイメージングの開発が期待される。

<第一章>

腫瘍におけるレドックス状態と糖代謝の

マルチモーダルイメージングの実現可能性に関する研究

1. 序論

緒言でも述べたように、がん細胞のレドックスバランスの脆弱性はがん治療において重要な標的となる^{17, 35, 57)}。したがって、腫瘍のレドックス状態を理解することは、効率的ながん治療において重要である。EPRIは生体に投与された常磁性プローブのスペクトル情報の変化を測定することで、組織のレドックス状態²⁶⁾や酸素分圧⁶⁴⁾、pH³⁴⁾を非侵襲的に測定する方法として開発された。レドックスイメージングには様々なニトロキシルプローブが使用されており、その中で3CPはEPRI²⁷⁾やMRI³²⁾において腫瘍のレドックス状態を反映することが報告されている。3CPは体内でヒドロキシルアミンに還元され、不対電子を失いEPR信号を消失する。したがって3CPの還元速度を測定することで、組織の還元力を調べることができる。さらに、ピクセルごとの3CP還元速度定数を再マッピングすることで、組織内の不均一なレドックス状態を反映したレドックスマップを作成することが可能である²⁷⁾。

近年、マルチモーダルイメージングが注目されており、得られた体内の複数の機能情報から、より正確な診断と治療予後判定が可能である。例えば、PET-MRI³⁸⁾やMRI-超音波⁵⁵⁾のように異なるイメージング法を組み合わせた装置が開発されている。マルチモーダルイメージングによって得られた体内の複数の機能情報から、より正確な診断と治療予後判定が可能である。しかし、従来のEPRI装置は大型で重い磁石を使用しているため、他のイメージング装置との併用が困難であった。この欠点を克服するために、小型で分解可能な可搬型EPRI装置を使用した^{43, 44)}。この装置を用いたマウスの脳のレドックスイメージング

にすでに成功している¹³⁾。この装置は放射線管理区域や動物実験施設などの様々な特殊施設に設置可能であり、ARG や PET、質量分析イメージングなど、他のイメージング技術と併用解析をすることが可能であると考えられる。

そこで本章では、EPRI のレドックスイメージングを他のイメージング技術と併用することでがん治療応答を多角的に解析することを目的として、この装置を用いて治療前後における同一個体の腫瘍のレドックス状態の変化を検出し、レドックスマップを腫瘍組織切片と比較した。さらに、この装置を放射線管理区域に設置し、糖代謝を反映する $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ を使用した ARG を行い、レドックスマップと比較した。

2. 材料と方法

2-1. 試薬

3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidiny-N-oxyl (3CP; Cat. No. 206-09241) および L-buthionine-(*S*, *R*)-sulfoximine (BSO; Cat. No. 021-14121) は富士フイルム和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ は北海道大学病院サイクロترون施設 (Sapporo, Japan) で合成されたものを譲受した。

2-2. 細胞株および移植腫瘍モデル

ヒト結腸がん由来 HCT116 細胞は理化学研究所バイオリソース研究センター (Tsukuba, Japan) より入手した。細胞は 10% fetal bovine serum (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を含む McCoy's 5A 培地 (Cat. No. M4892, Sigma-Aldrich/Merck, St. Louis, MO, USA) を用いて、ウォータージャケット式インキュベーターにて 37°C、5% CO_2 条件下で維持した。移植腫瘍モデルは 6~8 週齢の雌の BALB/c Slc-*nu/nu* マウス (日本 SLC, Hamamatsu, Japan) を用いた。マウスは SPF であり照明時間は 1 日 12 時間、室温 $22\pm 4^\circ\text{C}$ および湿度 $50\pm 20\%$ の環境下で飼育された。マウス一匹につき 5×10^6 個の HCT116 細胞を右後肢の大腿部に皮下移植した。腫瘍体積が約 600~1400 mm^3 (移植後 14 日) に達したマウスを EPRI に使用した。腫瘍体積の計測は麻酔下でノギスにて腫瘍の長径、短径を計測したのち、以下の計算式から腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} \times \pi / 6$$

すべての動物実験は「北海道大学動物実験に関する規程」に基づくガイドラインに従い実施され、北海道大学大学院獣医学研究院動物実験委員会によって承認

された（承認番号 23-0010）。

2-3. X線照射

X線発生装置は PANTAK HF-320 型（島津製作所, Kyoto, Japan）を使用し 200 kVp、20 mA、0.5 mm Al+0.5 mm Cu フィルターを用いて線量率 1 Gy/min となる条件で照射した。マウスは全身を 6 mm 厚鉛板により遮蔽し、腫瘍部位のみ局所的に 10 Gy の線量で X 線を照射した。X 線照射時、マウスは 2% イソフルラン吸入麻酔下で照射台に保定され、保温パッドにて体温低下を防止した。

2-4. EPRI による腫瘍のレドックスイメージング

1 回目の EPRI はがん細胞移植後 14 日目に実施した。3CP をレドックス感受性イメージングプローブとして使用し、腫瘍のレドックス状態を可視化した。マウスを 2% イソフルラン吸入麻酔下でプラスチックベッドに置き、EPRI 装置の共振器に取り付けた。29 G の針を使用して尾静脈にカニューレを挿入し、3CP を 1.5 $\mu\text{mol/g}$ の用量で投与した。

3CP プローブの EPRI 画像は、Akaba らが使用したのと同じ構成の可搬型 EPRI 装置で取得した^{43,44)}。共振器のループギャップは $\phi 24 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$ である。測定パラメータ、3CP の還元速度定数の計算およびマッピングは以前の報告に基づいて行われた¹³⁾。画像取得に使用された測定パラメータは、181 投影の 3D ラジアルシーケンス、RF 周波数 760-765 MHz、磁気変調フィールド 0.1 mT、磁場掃引幅 6 mT、磁場勾配 0.5 mT/cm、投影ごとのフィールドスweep 時間 39 ms、1 画像のデータ収集時間 7.14 秒である。画像の視野 FOV は 6 cm で、デジタルバンドパスフィルターの通過帯域幅は 4 kHz に設定され、変調された EPR 信号の復調前に適用された。画像はシングルステップのフィルタ補

正逆投影法を使用して再構築された。高周波ノイズを除去するため、画像再構築時の信号処理では **cosine-tapered window** 関数がローパスフィルターとして使用された。主に分解能を決定するカットオフ周波数は 180 に設定された。シングルポイント分布を仮定すると、任意の方向から得られる投影スペクトルは磁場勾配なしの場合と同じである。フィルタ補正逆投影法プログラムがローパスフィルターを使用して画像を再構築する際、出力は単一のポイントのぼやけた画像になる。ぼやけた画像から 1 次元ラインプロファイルを抽出し、**Gaussian point spread** 関数を使用してフィッティングすることで分解能を決定できる。本研究では、画像の分解能は **Gaussian point spread** 関数の半値全幅として定義され²⁵⁾、その値は 3.7 mm であった。

マウスの腫瘍組織からレドックス情報を得るために、約 25 分間で 200 枚の画像が連続的にスキャンされた。これらの画像は、3CP の EPR 信号の減衰（還元速度）を比較し、レドックスマップを構築するために合計 40 枚に統合された。3CP の EPR 信号は投与後約 2 分でピークに達するため、3CP 投与 100 秒後からデータ取得を開始した。3CP の還元速度定数は、3CP の EPR 信号強度の時間経過に対する半対数プロットを使用して得られた線形部分の擬似一次反応速度定数として計算された。レドックスマップは 3CP の還元速度定数を再マッピングすることによって構築された。

2-5. イメージングの順序

同一のマウスにおいて、治療前後に 2 回レドックスイメージングを行った。2 回目のレドックスイメージングは 1 回目から 24 時間後に行った。BSO 投与群は 2 回目のレドックスイメージングの 6 時間前に BSO (500 mg/kg) を腹腔内投与した。10 Gy 照射群は 1 回目のレドックスイメージングから 3 時間後に腫

瘍に 10 Gy を照射した。2 回目のイメージングの 1 時間前に pimonidazole (Hypoxyprobe™-1; Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) を 60 mg/kg の用量で腹腔内投与し、低酸素領域を標識した。2 回目のイメージング後、腫瘍組織を切除し組織学的解析または抗酸化物質の測定を行った。抗酸化物質の測定用に切除した腫瘍は直ちに-80℃で凍結保存された。組織切断時の矢状面をマーキングし、レドックスイメージング画像と正確に重ね合わせた。ARG との併用解析は、レドックスイメージングの翌日に^[18F]FDG を尾静脈から投与した。

2-6. 組織学的解析および免疫組織化学

腫瘍組織を矢状面で切断し、4%緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋後、滑走型マイクロトームを用いて 7 μm の厚さに薄切した。ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色はパラフィン切片を脱パラフィン後染色し、脱水後に封入した。pimonidazole 染色はパラフィン切片を脱パラフィン後 Hypoxyprobe™-1 キットの説明書に従って行った。切片は NanoZoomer 2.0 RS virtual slide scanner (浜松ホトニクス, Shizuoka, Japan) を使用して画像化された。低酸素領域の検出は、Adobe Photoshop (CC 2018; Adobe, San Jose, CA, USA) でしきい値を選択後、ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて切片全体に対する pimonidazole 陽性領域の比率を定量化することで行った。

2-7. 高速液体クロマトグラフィー-電気化学検出法 (HPLC-ECD) による還元型アスコルビン酸、還元型システイン、還元型グルタチオンの測定

約 100 mg の腫瘍組織と内部標準物質の 10 μM N-アセチルシステインに 0.54 M 過塩素酸および 0.2 mM ジエチレントリアミンペンタ酢酸を加え、2

mm のステンレス鋼ビーズを用いてビーズクラッシャー μ T-12 (3200 r/min, 90 s; タイテック, Saitama, Japan) でホモジナイズし、遠心分離 (4°C, 8000×g, 10 min) した⁶⁾。上清を 0.54 M 過塩素酸および 0.2 mM ジエチレントリアミンペンタ酢酸で 2 倍に希釈し、0.45 μ m フィルターでろ過した。腫瘍サンプルは、勾配ポンプ (PU-2089; Jasco Corporation, Tokyo, Japan)、オートサンプラー (AS-4550; Jasco)、カラムオープン (CO-8020; Tosoh, Tokyo, Japan)、および金電極を備えた電気化学検出器 (ECD-300; Eicom, Kyoto, Japan) を使用した HPLC システムで分析した。システム制御とデータ解析は ChromNAV ソフトウェア (Jasco) を使用した。分離には InertSustain AQ-C18 カラム (4.6 × 150 mm, 3 μ m; GL Sciences, Tokyo, Japan) を使用した。移動相は 50 mM リン酸二水素カリウム、1.2 mM オクタンスルホン酸ナトリウム (pH 2.5)、および 8% メタノールで構成した¹¹⁾。カラム温度 40°C、流速 0.8 ml/min で解析した。金電極の電圧は Ag/AgCl 参照電極に対して +600 mV に設定した。

2-8. グルタチオン測定

グルタチオン濃度は GSSG/GSH 定量キット (Cat. No. G257; Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて測定した⁴⁵⁾。腫瘍を 5% 5-スルホサリチル酸中でビーズクラッシャー μ T-12 (3200 r/min, 90 s) を用いてホモジナイズし、遠心分離 (4°C, 8000×g, 10 min) した。上清の総グルタチオンおよび酸化型グルタチオン (GSSG) を測定した。還元型グルタチオン (GSH) は、メーカーの指示に従って推定した。GSH 濃度は、総グルタチオンと GSSG 濃度から、以下の式を用いて計算した。

$$[\text{総グルタチオン}] = [\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}]$$

酸化ストレスの指標としてグルタチオンの還元型/酸化型 (GSH/GSSG) 比を算出した。

2-9. [¹⁸F]FDG 取り込み測定

腫瘍組織および尾の [¹⁸F]FDG の放射能をガンマカウンター (AccuFLEX γ 7000, ALOKA, Tokyo, Japan) で測定した。腫瘍の [¹⁸F]FDG の取り込みは尾の [¹⁸F]FDG の取り込みを除いた、投与された [¹⁸F]FDG 量に対する %ID として計算した。

2-10. オートラジオグラフィー

レドックスイメージング撮像の翌日、マウスを 12 時間絶食させ、10 MBq [¹⁸F]FDG を尾静脈投与した。1 時間後マウスを安楽死させ、腫瘍組織を矢状面で切除し、ホワイトティッシュコート FL (UI Kasei, Amagasaki, Japan) で包埋し、-80°C で急速凍結した。残りの腫瘍組織および尾を解剖し、 [¹⁸F]FDG の放射能を測定した。腫瘍組織切片は 10 μm の厚さに薄切してガラススライドに置き、乾燥させて室温で固定した。次に、腫瘍組織切片をイメージングプレート (Fuji BAS 2040; Fujifilm, Tokyo, Japan) に一晩 -80°C で露光し、BAS 2500 バイオイメージングアナライザー (Fujifilm) で定量化した。その後、スライドを H&E 染色し、NanoZoomer 2.0 RS virtual slide scanner を使用して画像化した。カウント密度 (面積あたりの輝尽性蛍光, PSL/mm²) をベクレルに換算し、尾を除いたマウスに投与された [¹⁸F]FDG 量の割合として計算した。

2-11. [¹⁸F]FDG 取り込みとレドックス状態の関連性の評価

ARG 画像解析では、2.1 mm × 2.1 mm の関心領域 (ROI) を作成し、

PSL/mm² を取得した。PSL/mm² をベクレルに換算し、尾を除いたマウスに投与された[¹⁸F]FDG 量の割合として計算した。ARG 画像とレドックスマップのスケールを調整し、周囲の正常組織の形状に基づいて画像を重ね、同じ ROI を用いて比較した。ARG 画像から得られた[¹⁸F]FDG 取り込みと、レドックスマップから得られた 3CP 還元速度定数の値を、散布図として示した。コントロール群および 10 Gy 照射群それぞれ 3 匹のマウスのデータをまとめた。

2-12. 統計処理

値は少なくとも 3 回の独立した実験の平均±標準誤差 (S.E.) で示した。2 つのグループ間には、Student の t 検定を用いて評価した。複数群の比較は、一元配置分散分析を行い、Tukey 検定を使用した。有意水準の最小値は $p<0.05$ に設定した。

3. 結果

3-1. 2回のレドックスイメージングにおける3CP還元速度の評価

3CPのEPR信号強度に基づいて、腫瘍の三次元画像を構築した(図1A)。矢状面における腫瘍組織からレドックス情報を得るために、約25分間連続して200枚の画像をスキャンした。200枚の画像を5枚に統合した3CPのEPR信号強度画像を図1Bに示す。2回目のレドックスイメージングは1回目から24時間後に実施された。以降の全ての結果は、3CP還元速度の比較およびレドックスマップの作成のために、それぞれ200枚の画像を5枚ずつ統合した合計40枚の画像を用いた。3CPのEPR信号の振幅は組織内の3CP濃度の変化を反映し、定量的な指標として使用できる。組織内の3CPのEPR信号減衰(還元)速度定数は、ピークに達する3CP投与約2分後からの時間経過を半対数プロットし、擬一次反応速度定数として計算される²⁷⁾。生体への3CP投与後20分間の腫瘍組織における3CPのEPR信号強度の減衰は、組織のクリアランスではなく還元によるものである³²⁾。したがって組織内の3CPのEPR信号強度の減衰の線形部分の傾きである3CP還元速度定数と、それを再マッピングしたレドックスマップは、組織の還元力を反映する。3CPのEPR信号強度を元にして作成された3CP投与直後のイメージング画像と腫瘍組織切片のH&E染色像の縮尺を合わせ正確に一致させ、レドックスマップにも反映させた(図1C)。レドックスマップに示されているように、2回のレドックスイメージングで還元力が変化した領域は確認されなかった。同一のマウスの1回目と2回目のレドックスイメージングにおいて、腫瘍領域からランダムに選択された5つのピクセルにおける3CPのEPR信号強度の平均をプロットした(図1D)。図1Eに示されるように、複数のマウスにおいても2回のレドックスイメージングの3CP還元速度定数は変化しなかった(1回目: 0.0793 min^{-1} vs. 2回目: 0.0752 min^{-1} ;

p=0.2731)。これらの結果は、同じ個体で腫瘍のレドックスイメージングを再現性良く 2 回行うことができ、それゆえ 2 回の撮像の間に行われた処置に対する腫瘍のレドックス状態の変化が検出できること、またレドックスイメージング画像と組織切片画像を比較できることを示している。

3-2. BSO 投与による腫瘍の 3CP 還元速度の評価

これまでにグルタチオン合成阻害剤である BSO 投与の有無による別個体の比較で、腫瘍内グルタチオン量が腫瘍内 3CP 還元速度に影響を与えることが報告されている²⁷⁾。そこで、同一個体において BSO 投与前後でレドックスイメージングを行った (図 2A)。図 2B に示すように、H&E 染色画像で示される腫瘍領域のレドックスマップでは、色の明るい領域すなわち 3CP 還元速度が低下している領域が増加した。BSO 投与により、3CP の EPR 信号強度の減衰が抑制された (図 2C)。図 2D に示すように、複数のマウスにおいても BSO 投与は 3CP 還元速度を有意に低下させた (BSO 投与前 : 0.0767 min^{-1} vs. BSO 投与後 : 0.0566 min^{-1} ; $p=0.0059$)。

3-3. X 線照射による腫瘍の 3CP 還元速度の評価

X 線は水分子を電離および励起させ、非常に反応性の高いフリーラジカルや活性酸素種を生成することから、レドックス状態と X 線は密接に関連している⁴⁹⁾。そこで、EPRI を用いて腫瘍の X 線照射によるレドックス状態の変化を調べた (図 3A)。BSO 投与の場合と同様に 10 Gy 照射によって、レドックスマップでは腫瘍領域における 3CP 還元速度が低下している領域が明らかに増加した (図 3B)。3CP の EPR 信号強度の減衰は 10 Gy 照射によって抑制された (図 3C)。図 3D に示すように、複数のマウスにおいても X 線照射は 3CP 還元速度

を有意に低下させた（10 Gy 照射前：0.0723 min⁻¹ vs. 10 Gy 照射後：0.0536 min⁻¹；p=0.0015）。これらの結果は、X 線照射がグルタチオン合成阻害剤 BSO 投与の場合と同様に、腫瘍内のレドックス環境を変化させる可能性があることを示唆している。

3-4. X 線照射による腫瘍の低酸素領域の評価

複数の先行研究では 3CP 還元速度が pO₂ などの酸素条件に影響を受けることが示されている^{21, 26)}。以前の研究では SCCVII 同種移植モデルにおいて、X 線照射後に腫瘍の再酸素化が誘導された³³⁾。そこでコントロール群と 10 Gy 照射群の腫瘍組織切片の pimonidazole 染色を行った(図 4A)。図 4B に示すように、この研究で使用した HCT116 異種移植モデルでは、X 線照射 24 時間後に pimonidazole 陽性領域で示される低酸素領域が有意に減少した（コントロール vs. 10 Gy; p=0.0270）。

3-5. BSO 投与および X 線照射による腫瘍内還元物質の評価

BSO 投与が腫瘍内のグルタチオン量を減少させることから⁶⁵⁾、X 線照射によって誘導されるレドックス状態の変化もグルタチオン量に関連している可能性があるかと仮定した。この仮説を検証するために、2 回目のレドックスイメージングの後、コントロール群（未処理群）、10 Gy 照射群、および BSO 投与群の腫瘍内の 3 つの還元物質（還元型アスコルビン酸、還元型システイン、還元型グルタチオン）を調べた。図 5A に示すように、HPLC-ECD により腫瘍内還元物質である還元型アスコルビン酸、還元型システイン、N-アセチルシステイン（内部標準）、および還元型グルタチオンが左から右に分離され、検出された。10 Gy 照射群および BSO 投与群において、コントロール群と比較して還元型アスコル

ビン酸および還元型システインの量に変化が見られなかった（図 5B、C）（還元型アスコルビン酸：コントロール vs. 10 Gy; $p=0.1393$ 、コントロール vs. BSO; $p=0.8970$ 、還元型システイン：コントロール vs. 10 Gy; $p=0.3611$ 、コントロール vs. BSO; $p=0.9957$ ）。BSO 投与群の還元型グルタチオンのみがコントロール群よりも有意に低下し、10 Gy 照射群では変化しなかった（図 5D）（還元型グルタチオン：コントロール vs. BSO; $p=0.0010$ 、コントロール vs. 10 Gy; $p=0.3490$ ）。図 5E に示すように、GSSG/GSH 定量キットを使用した総グルタチオン量の測定では、コントロール群と比較して BSO 投与群でわずかな減少が見られた（コントロール vs. BSO; $p=0.1281$ ）が、10 Gy 照射群では変化が観察されなかった（コントロール vs. 10 Gy; $p=0.7822$ ）。GSH/GSSG 比は組織のレドックス状態を示す¹⁶⁾。組織が酸化ストレスにさらされると GSSG が蓄積し、この比は低下する。GSH/GSSG 比は、BSO 投与群においてコントロール群と比較して有意に上昇した（コントロール vs. BSO; $p=0.0462$ ）が、10 Gy 照射群では変化がなかった（コントロール vs. 10 Gy; $p=0.9976$ ）。これらの結果は、グルタチオンが腫瘍内のレドックス環境に部分的に影響を与えるが、X 線によって誘発されるレドックス環境の変化には関連していないことを示唆している。

3-6. レドックスイメージングと $[^{18}\text{F}]$ FDG ARG との併用解析

これまでにこの装置を使用したレドックスイメージングによって、レドックスマップと組織切片の比較が可能であることを確認した。がん細胞における高い糖代謝活性は高い還元力と関連している³⁶⁾。腫瘍のレドックス状態と糖代謝の関係を明らかにするために、放射線管理区域で放射性同位体である $[^{18}\text{F}]$ FDG を用いた併用解析を行った（図 6A）。 $[^{18}\text{F}]$ FDG 投与 1 時間後に摘出した腫瘍のガンマカウンターによる $[^{18}\text{F}]$ FDG 測定と ARG を行った。ガンマカウンターの

[¹⁸F]FDG 測定では、腫瘍への [¹⁸F]FDG の取り込みが 10 Gy 照射群で有意に増加したことが示された (図 6B) (コントロール群 vs. 10 Gy; $p=0.0098$)。ARG 画像とレドックスイメージングから得られたレドックスマップを比較した (図 6C)。ARG 画像によって作成された ROI をレドックスマップに適用し、糖代謝活性 ([¹⁸F]FDG の取り込み) と還元力 (3CP 還元速度定数) の比較を行った。3CP 還元速度定数が大きいことは還元力が高いことを示す。図 6D に示すように、コントロール群において糖代謝活性は還元力と有意な正の相関があった ($R^2=0.3834$, $p=0.00003$)。しかし、図 6E に示すように、10 Gy 照射群では相関がなかった ($R^2=0.0735$, $p=0.0624$)。これらの結果は、腫瘍内の高い還元力を持つ領域は高い糖代謝活性を示すが、X 線照射によってこの関連性が失われることを示唆している。

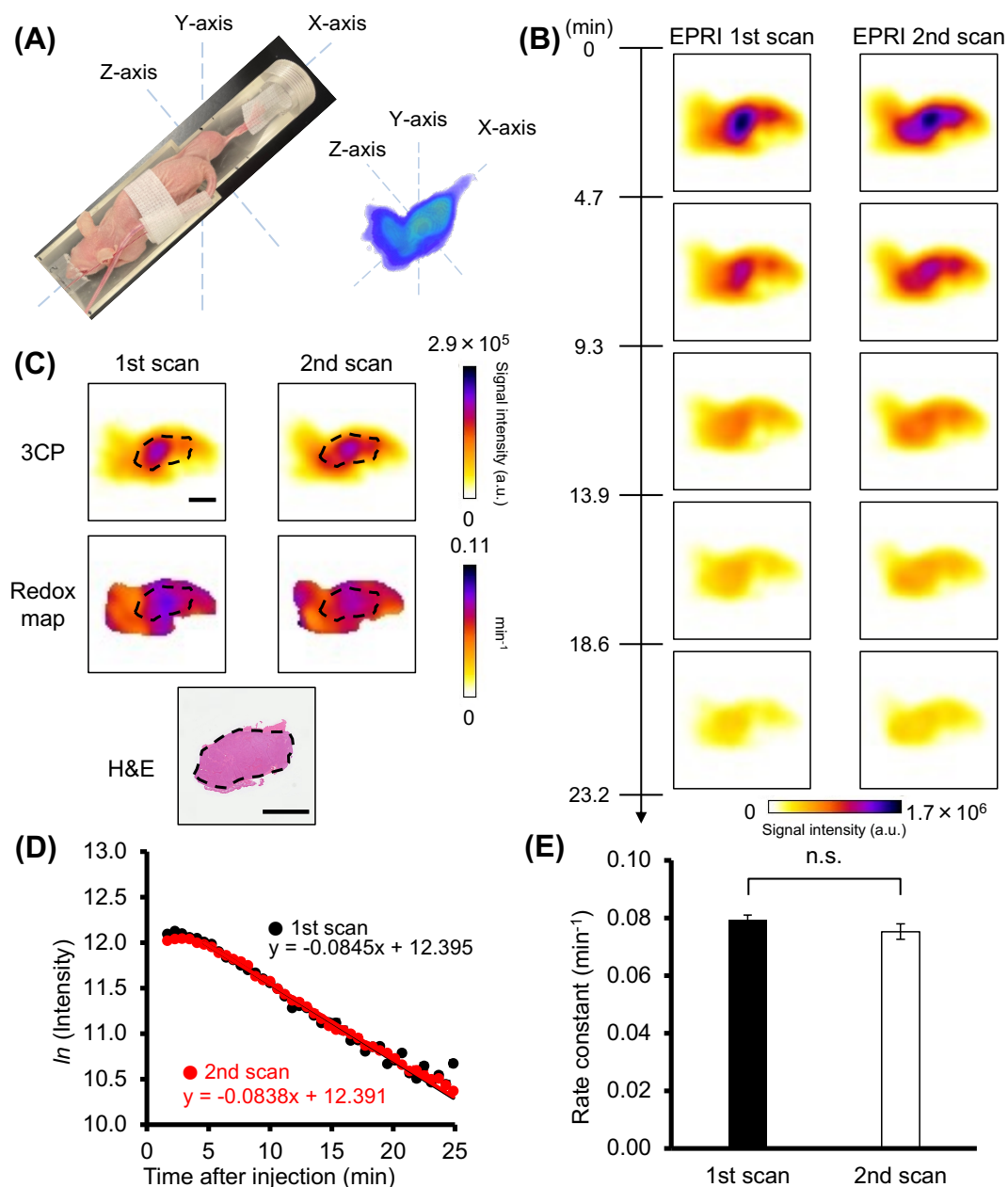


図1. 2回のレドックスイメージングの比較

無処置群において1回目および2回目のレドックスイメージングを比較した。(A) レドックスイメージング中のマウスの体位と、3CPのEPR信号強度から作成した腫瘍の三次元画像を示す。(B) 腫瘍の矢状断面における3CPのEPR信号強度から作成されたレドックスイメージング画像を示す。(C) 腫瘍組織切片のH&E染色像と同じ位置で作成されたレドックスイメージング画像の代表例を示す。それぞれのスケールを調整し、H&E染色像と同一平面上のレドックスマップを作成した。(D) 1回目および2回目のレドックスイメージングにおける腫瘍組織内の3CPのEPR信号強度の経時変化の代表例を示す。(E) 複数のマウスで1回目および2回目のレドックスイメージングにおける3CP還元速度定数を比較した。黒線は5 mmを示す。グラフのカラムおよびバーは平均±S.E.を表し、統計的有意差は1回目に対して有意差なしをn.s.で示した。

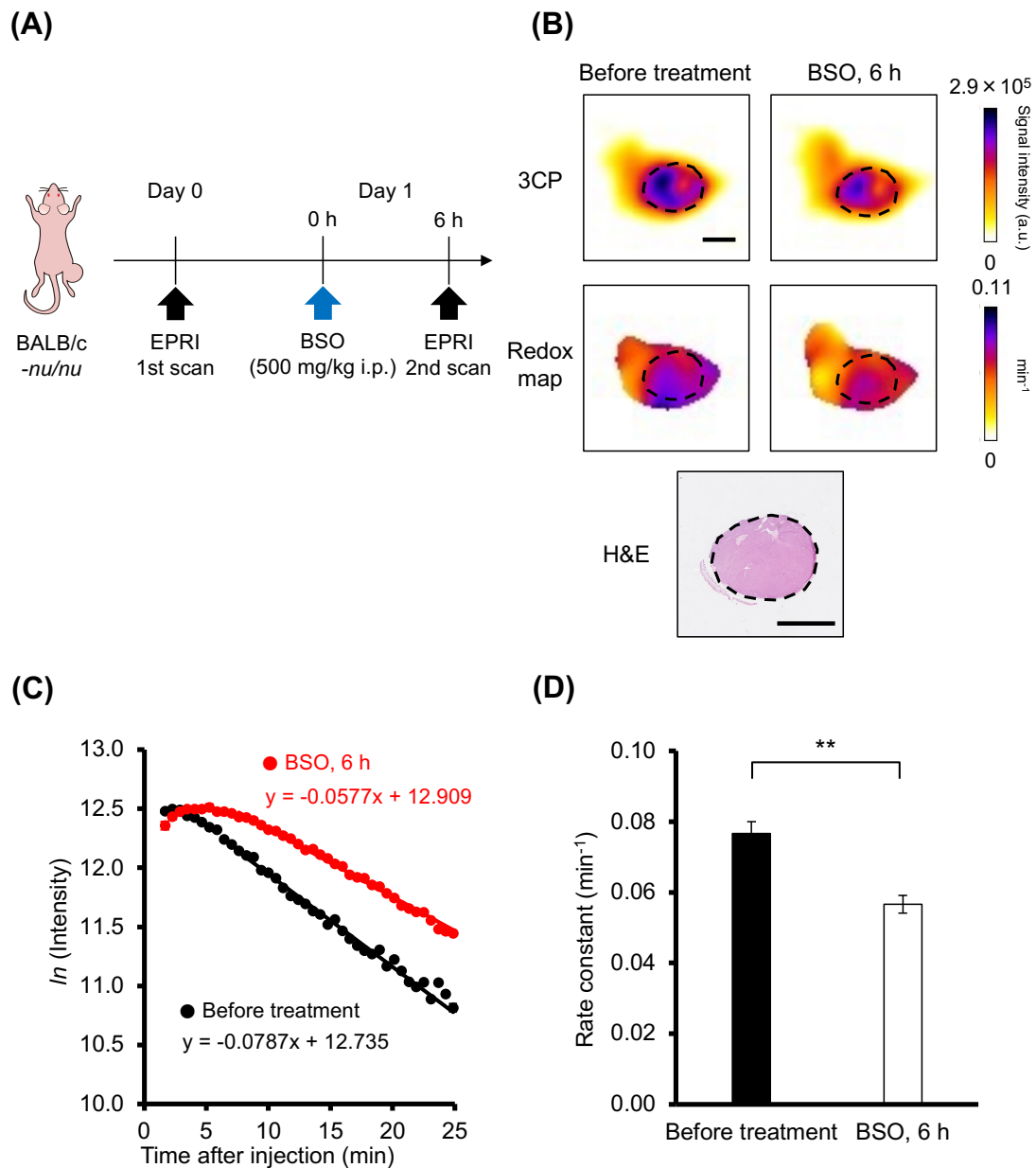


図2. レドックスイメージングによるBSO投与前後の比較

BSO (500 mg/kg、腹腔内投与) 投与前後に腫瘍のレドックスイメージングを行い比較した。(A) レドックスイメージングとBSO投与の実験計画を示す。(B) H&E染色像と同一平面上のレドックスマップを作成した。(C) 腫瘍内の3CPのEPR信号強度の経時変化の代表例を示す。(D) 複数のマウスでBSO投与前後のレドックスイメージングにおける3CP還元速度定数を比較した。黒線は5 mmを示す。グラフのカラムおよびバーは平均 $\pm$ S.E.を表し、統計的有意差はBSO投与前に対して $p < 0.01$ (**)で示した。

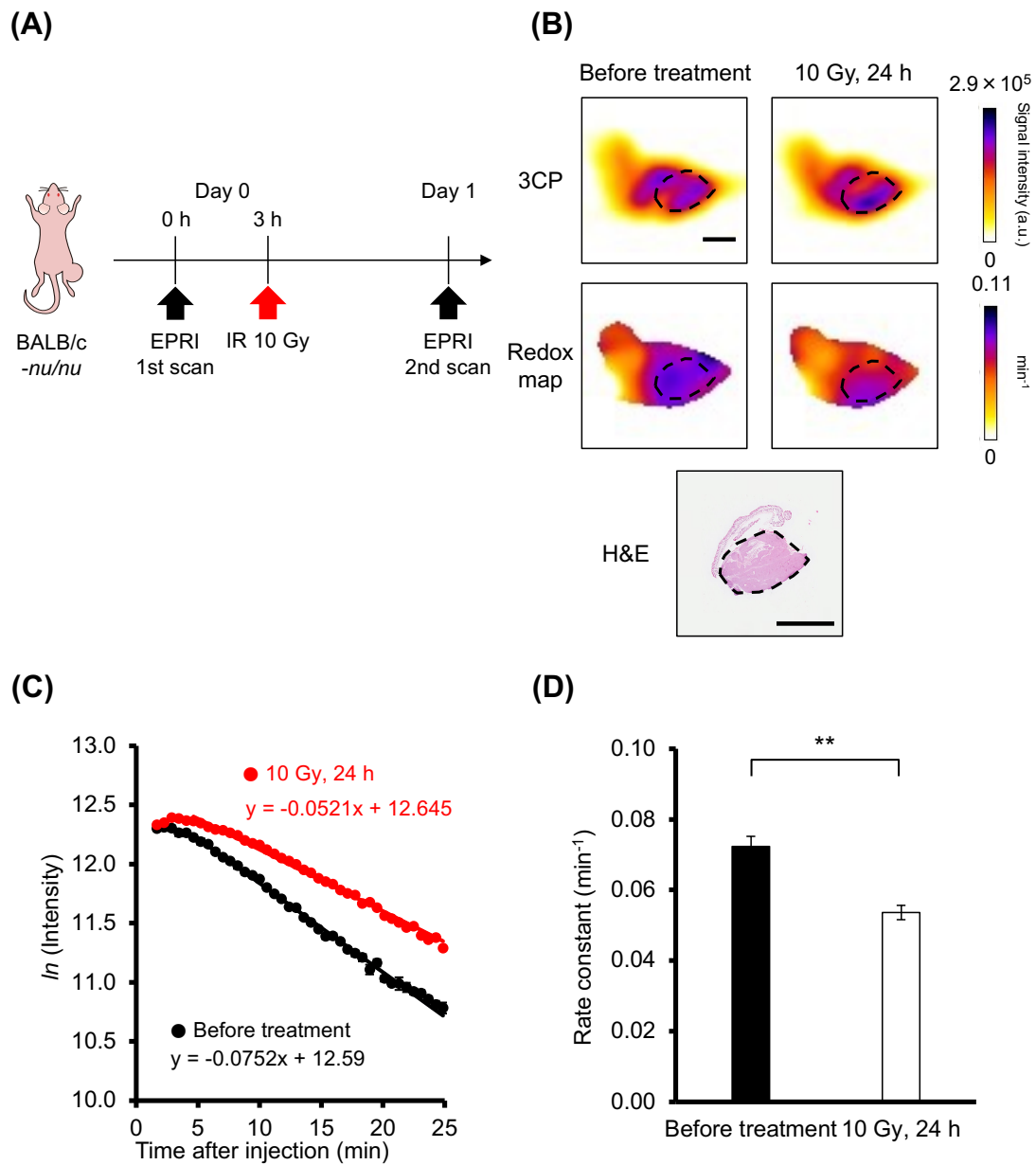
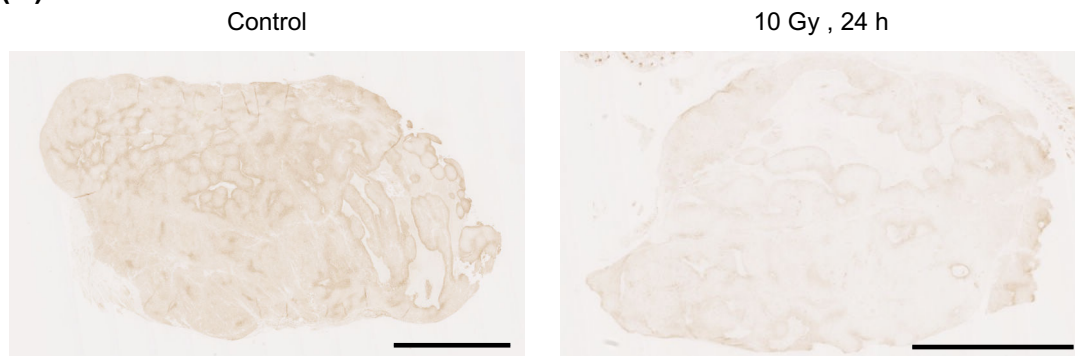


図3. レドックスイメージングによる10 Gy照射前後の比較

10 Gy照射前後に腫瘍のレドックスイメージングを行い比較した。(A) レドックスイメージングと10 Gy照射の実験計画を示す。(B) H&E染色像と同一平面上のレドックスマップを作成した。(C) 腫瘍内の3CPのEPR信号強度の経時変化の代表例を示す。(D) 複数のマウスで10 Gy照射前後のレドックスイメージングにおける3CP還元速度定数を比較した。黒線は5 mmを示す。グラフのカラムおよびバーは平均 $\pm$ S.E.を表し、統計的有意差は10 Gy照射前に対して $p < 0.01$ (**)で示した。

(A)



(B)

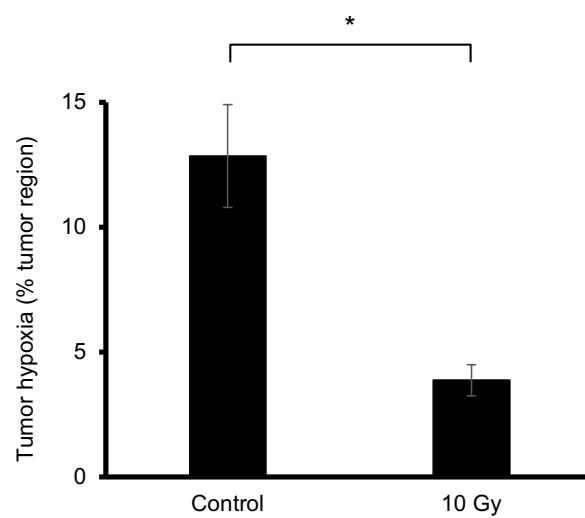


図4. 10 Gy照射による低酸素領域の変化の検出

2回目のレドックスイメージング後、コントロール群および10 Gy照射群において腫瘍の低酸素領域を検出、定量した。(A) pimonidazoleで免疫組織化学染色された各処理群の腫瘍組織切片の代表例を示す。(B) ImageJを用いて得られた腫瘍全体の面積における低酸素領域の割合を算出した。黒線は2.5 mmを示す。グラフのカラムおよびバーは平均±S.E.を表し、統計的有意差はコントロール群に対して $p<0.05$ (*)で示した。

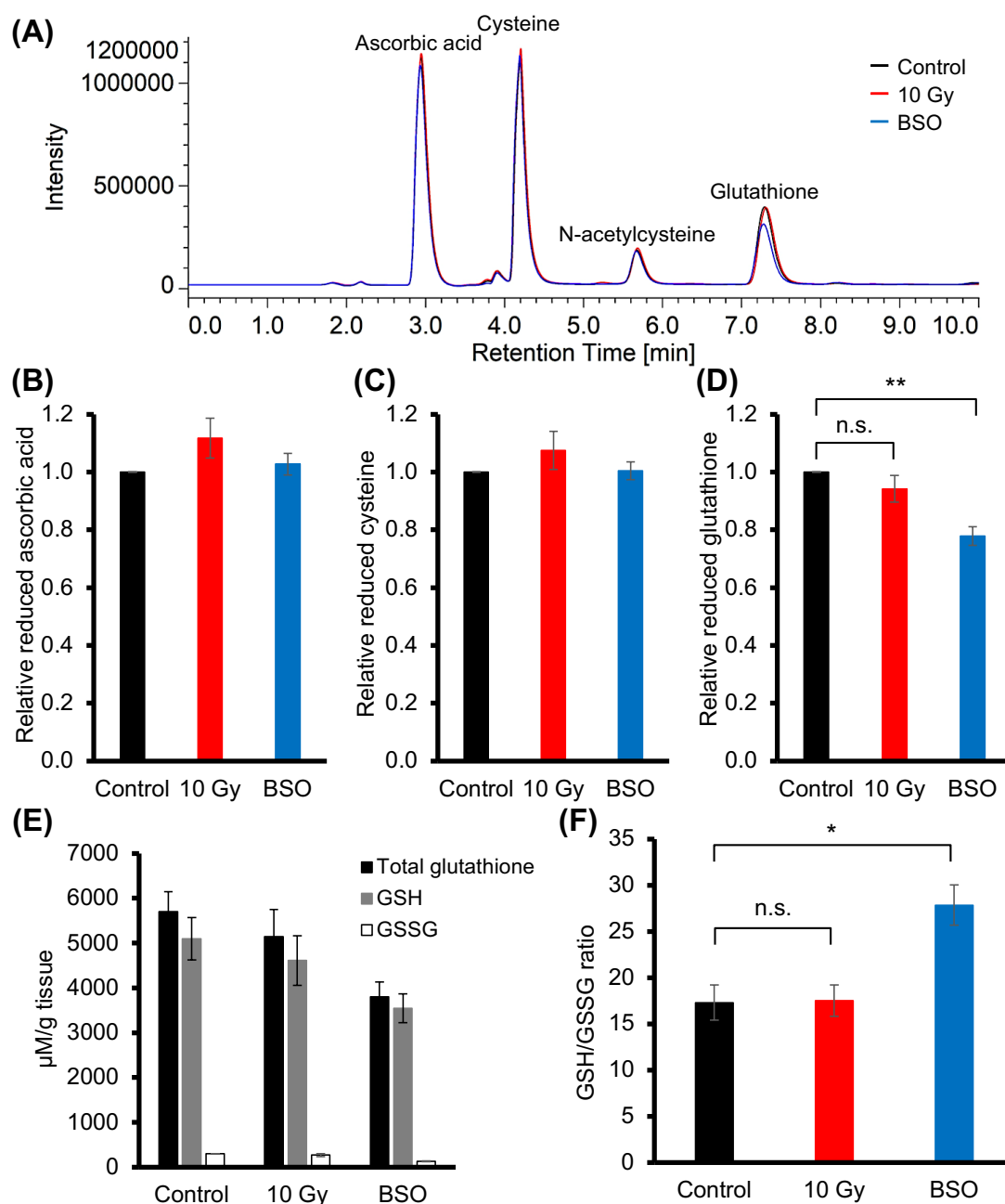


図5. 各処理群における腫瘍内還元物質の測定と比較

2回目のレドックスイメージング後、コントロール（無処置）群、10 Gy照射群、およびBSO投与群の腫瘍内還元物質を定量した。(A) 各処理群の還元型アスコルビン酸、還元型システイン、および還元型グルタチオンの濃度をHPLC-ECDで測定し、代表的なクロマトグラムを示した（N-アセチルシステインは内部標準）。(B-D) HPLC-ECDで測定した各処理群における腫瘍内の還元型アスコルビン酸、還元型システイン、還元型グルタチオン濃度を比較した。(E) 各処理群における腫瘍内の総グルタチオン濃度を比較した。(F) 各処理群における腫瘍内のGSH/GSSG比を比較した。グラフのカラムおよびバーは平均 $\pm$ S.E.を表し、統計的有意差はコントロール群に対して有意差なしをn.s.、 $p<0.05$ (*)、 $p<0.01$ (**)で示した。

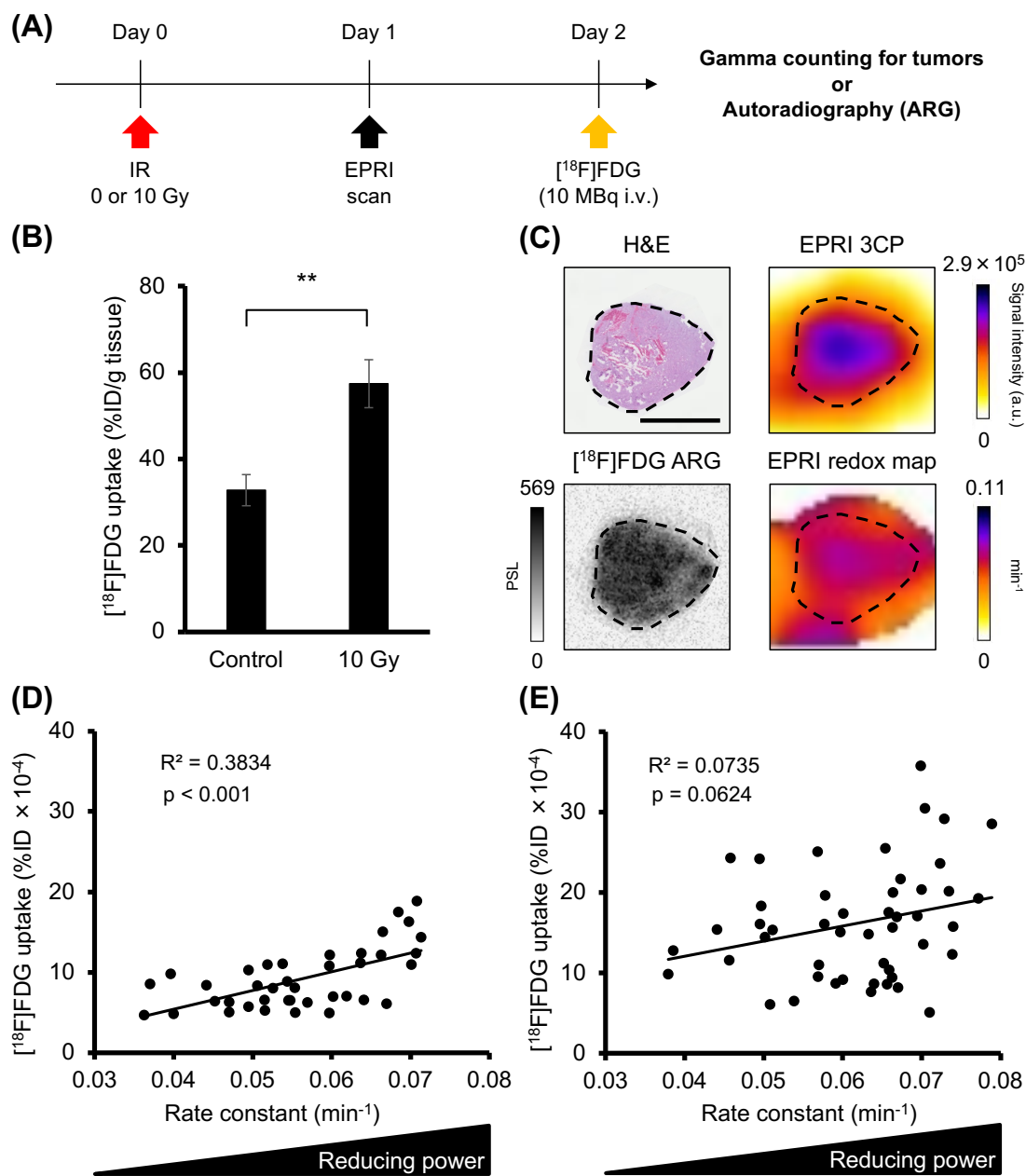


図6. EPRIとARGの併用解析

レドックスイメージングと $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ARGの併用解析を行った。(A) レドックスイメージングと $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ARGの実験計画を示す。(B) コントロール群および10 Gy照射群の腫瘍における組織重量当たりの $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 投与量 (%ID/g) をガンマカウンターで測定した。(C) コントロール群におけるH&E染色、ARG、レドックスイメージング画像を示す。(D) 3匹のコントロール群のマウスにおけるレドックスマップから得られた3CP還元速度定数と、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 取り込みの相関をピアソンの相関分析により評価した。(E) 3匹の10 Gy照射群のマウスにおけるレドックスマップから得られた3CP還元速度定数と、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ 取り込みの相関をピアソンの相関分析により評価した。黒線は5 mmを示す。グラフのカラムおよびバーは平均 $\pm$ S.E.を表し、統計的有意差はコントロール群に対して $p < 0.01(**)$ で示した。 R^2 はピアソンの相関係数を表す。

4. 考察

本章では、可搬型 EPRI 装置の利点を活かすため、組織のレドックス状態を非侵襲的に測定できる EPRI^{3, 13, 24)}を組織学的解析および ARG と組み合わせ、併用解析を行った。以下の 3 点が新しい試みである：(1) 同一個体における腫瘍のレドックス環境の変化の検出。レドックス関連疾患において治療前後のレドックス環境の変化を検出することは、治療法の決定や予後の診断に寄与する可能性がある。(2) がん治療によって引き起こされるレドックス環境変化のメカニズムの解明。(3) 他のイメージング技術との併用によるレドックスに関与する他の因子の調査。

初めに、分解可能で小型化に成功した可搬型 EPRI 装置を使用してレドックスイメージングを実施した⁴³⁾。同一個体に対する 2 日連続のレドックスイメージングで、3CP の EPR 信号強度の減衰に変化が見られなかったことから、このイメージング方法はがん治療による腫瘍のレドックス環境の変化を評価するために使用できることが示された (図 1)。さらに、レドックスイメージングによって得られたレドックスマップと H&E 染色画像における腫瘍の形状および非実質組織の位置が一致しているため、比較することができた (図 1C、図 2B、図 3B、図 6C)。これは、レドックスマップが腫瘍組織切片の免疫組織化学染色画像と比較できることを示しており、第二章のように将来的には様々な生体分子との複合分析が可能となると考えられる。

次に、グルタチオン合成阻害剤である BSO および X 線照射が腫瘍内の 3CP 還元速度を低下させることを明らかにした (図 2、3)。グルタチオンは腫瘍内の主要な還元物質であり、BSO 投与によってグルタチオン量が減少し、還元力を低下させることが知られている²⁷⁾。本研究でも、BSO 投与後にグルタチオン量の低下が確認された (図 5D、E)。対照的に、X 線照射は腫瘍内の 3CP 還元速度

を低下させた（図 3）が、還元物質の量は変化しなかった（図 5）。X 線照射による過剰な ROS 生成によってタンパク質のカルボニル化や脂質過酸化が誘導される^{1, 29, 41)}。他のニトロキシラジカルプローブを用いたレドックスイメージングにおいて、X 線照射された肝臓でプローブの還元速度が低下したが、それは還元物質の変化ではなく過酸化脂質の蓄積に関連していることが示唆されている⁴²⁾。したがって、X 線照射が腫瘍内で過酸化脂質の蓄積を引き起こし、3CP の還元速度を抑制する可能性がある。さらに、いくつかの先行研究では、3CP の還元速度が pO_2 などの酸素条件に影響を受けることが示されている。腫瘍の低酸素状態は 3CP の還元を促進する²⁶⁾が、腫瘍の酸素化は 3CP の還元を抑制させる²¹⁾。本研究の HCT116 異種移植モデルでは、X 線照射 24 時間後に低酸素領域が減少した（図 4）。したがって、腫瘍における 3CP の還元速度の低下は、グルタチオン量の低下ではなく、腫瘍の再酸素化に関連している可能性がある。腫瘍の再酸素化はグルタチオンの形態を変化させる可能性があるが⁹⁾、10 Gy 照射群では GSH/GSSG 比は変化せず BSO 投与群では GSH/GSSG 比が有意に増加しており、この条件下での X 線照射による再酸素化はグルタチオンの形態に影響を与えないことを示している（図 5F）。これらの結果を考慮すると、BSO 投与 6 時間後または 10 Gy 照射 24 時間後に 2 回目のレドックスイメージングと還元物質の測定が行われたという実験条件の違いはあるが、BSO 投与および X 線照射による 3CP 還元速度の低下は異なる反応を反映している可能性がある。今後、X 線照射後の時間経過に伴う腫瘍内レドックス環境および還元物質、および酸素分圧の変化を解明するためのさらなる研究が必要である。

最後に、糖代謝を評価できる $[^{18}F]$ FDG ARG との併用解析を実施した。これは本装置と既存のイメージング技術を使用したマルチモーダルイメージングへの第一歩である。図 1 のように腫瘍組織切片の H&E 染色とレドックスマップを

整合させることができたため、腫瘍組織切片を指標として ARG 画像とレドックスマップを比較した。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ は PET イメージングにおけるがんの検出および病理分類に使用される放射性同位体トレーサーである²⁾。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ はグルコースのアナログであり、その取り込みは糖代謝を反映する⁶⁷⁾。図 6D に示すように、コントロール群では腫瘍組織の糖代謝と還元力の間に正の相関が見られた。この正の相関は糖代謝の促進が GSH の維持に必須である NADPH の合成を促進するためであると考えられる^{36, 40)}。対照的に、10 Gy 照射群では糖代謝と還元力の間に相関は観察されなかった。図 6D および E の各ポイントを比較すると、図 6B の結果を反映するように X 線照射によって $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込みが増加したため、相関の傾きが上方にシフトしている。さらに、X 線照射によって 3CP 還元速度が低下したため (図 3)、糖代謝と還元力の相関はコントロール群よりも弱くなったと考えられる。これは、各腫瘍組織部位の微小環境に依存した細胞代謝応答の違いによる可能性がある。さらに、X 線照射 24 時間後に腫瘍で $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込みが増加したという報告⁸⁾も、減少したという報告⁵²⁾もある。本研究の結果と以前の報告との不一致は、がん細胞の種類や X 線の線量の違いによるものである可能性がある。図 4 の結果により、放射線による腫瘍の再酸素化が 3CP の EPR 信号強度の減衰に影響を与える可能性もある。 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ と低酸素イメージング剤である $[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-diacetyl-bis}(\text{N}^4\text{-methylthiosemicarbazone})$ ($[^{64}\text{Cu}]\text{Cu-ATSM}$) を用いた二重トレーサー ARG 研究では、 $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込み領域は低酸素領域とは明確に異なることが示されている^{10, 53)}。さらに、腫瘍への X 線照射による再酸素化中にグルコース需要が増加する⁶⁸⁾。したがってこの研究では、X 線照射によって再酸素化された領域で $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ の取り込みが増加した可能性がある。組織のレドックス状態、糖代謝、および酸素条件との関係をさらに明らかにするために、低酸素領域のイメー

ジ ン グ 剤 で あ る $[^{18}\text{F}]$ -fluoromisonidazole ($[^{18}\text{F}]$ FMISO)⁵⁶⁾、2,2-dihydroxymethyl-3- $[^{18}\text{F}]$ fluoropropyl-2-nitroimidazole ($[^{18}\text{F}]$ DiFA)⁴⁸⁾、および $[^{64}\text{Cu}]$ Cu-ATSM を用いた PET-CT と EPRI の複合分析を今後行う必要がある。

組織の代謝とレドックス状態の関連解明は重要である。本研究は $[^{18}\text{F}]$ FDG ARG を予備実験として行ったが、今後はグルタチオン、NADH、ビタミン E などのレドックス関連小分子を高感度 MALDI 質量分析イメージング^{4, 18, 58)}や、鉄や銅などの遷移金属を X 線蛍光顕微鏡³⁹⁾を用いて調査することで、腫瘍における酸化ストレスと腫瘍微小環境の関係および治療への応答に関するさらなる調査が可能になると考えられる。したがって、この装置は腫瘍微小環境の解析装置として非常に有用であることを示した。

5. 小括

本章では、可搬型 EPRI 装置が他の分析装置の近くに容易に移動できるため、マルチモーダルイメージングをする上で非常に有用であることを示した。この可搬型 EPRI 装置は、同一個体における腫瘍のレドックスイメージングが可能である。これは様々ながん治療に対する腫瘍の治療反応を分析するのに役立つ可能性がある。さらに、レドックスバランスの崩壊は、がんのみならず、老化、心血管疾患、慢性腎疾患、アルツハイマー病などの他の疾患とも関連している。したがって、他の酸化ストレス関連疾患に対する薬剤の反応を分析できる可能性がある。しかし、X 線照射による 3CP 還元速度の変化のメカニズムを理解するためには、さらなる研究が必要である。さらに本装置を放射線管理区域に導入することで、レドックスイメージングと ARG の併用解析が可能となった。したがって、可搬型 EPRI 装置を用いたレドックス解析はマルチモーダルイメージングに寄与することが示唆された。

＜第二章＞

腫瘍内レドックスイメージングによるフェロトーシス検出

1. 序論

第一章の結果から、可搬型 EPRI 装置を用いたレドックスイメージングはがん治療による腫瘍のレドックス環境の変化を非侵襲的に検出可能であることが明らかとなった。フェロトーシスは鉄依存性細胞死であり、脂質過酸化物の蓄積とレドックスバランスの崩壊によって特徴付けられる^{7, 12)}。がん細胞は鉄を多く含むため、フェロトーシスに着目したがん治療戦略が注目を集めている⁵⁴⁾。フェロトーシス誘導の主要な標的であるシスチン-グルタミン酸アンチポーターシステム xc⁻の阻害は、グルタチオンとグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) の枯渇を引き起こすことでフェロトーシスを誘発する⁶²⁾。イミダゾールケトンエラスチン (IKE) は体内で安定性が高いシステム xc⁻阻害剤であり²⁸⁾、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫異種移植モデルにおいてがん細胞にフェロトーシスを誘導することが報告されている⁶⁶⁾。組織内では、フェロトーシスは過酸化脂質の副産物であるマロンジアルデヒド⁶⁶⁾や 4-ヒドロキシノネナール (4-HNE) 蓄積^{20, 59)}によって評価され、これらはフェロトーシスのマーカーと考えられている。フェロトーシスは組織切片レベルでは検出可能であるが、生体での非侵襲的な検出法は依然として存在しない。

ROS の増加とグルタチオン量の減少によって引き起こされるレドックスバランスの崩壊は、脂質過酸化を介してフェロトーシスを誘発する可能性がある^{14, 23)}。組織内のレドックス変化や脂質過酸化物の検出によって、生体内でのフェロトーシスを検出することが可能である。第一章では可搬型 EPRI 装置から得られたレドックスマップと腫瘍組織切片の比較が可能であることを示した。したがって、レドックスイメージングと腫瘍組織切片の脂質過酸化物の免疫組

組織化学染色を比較することによって、組織内のフェロトーシスを評価できる可能性がある。

そこで本章では、EPRI のレドックスイメージングと腫瘍組織の免疫組織化学染色を比較することで、レドックスに関連する病態の一つであるフェロトーシスを評価することを目的とした。

2. 材料と方法

2-1. 試薬

Imidazole ketone erastin (IKE; Cat. No. 021-14121) は AmBeed, Inc. (Arlington Heights, IL, USA) から購入した。

2-2. 細胞株および移植腫瘍モデル

細胞株および移植腫瘍モデルは第一章に示した方法にて行った。

2-3. EPRI による腫瘍のレドックスイメージング

EPRI による腫瘍のレドックスイメージングは第一章に示した方法にて行った。

2-4. イメージングの順序

IKE 治療前後の同一マウスにおいて 2 回レドックスイメージングを行った。IKE (1 mg/300 μ l) は、5% ジメチルスルホキシド、10% PEG-400、5% Tween-20、および 80% 生理食塩水を用いて溶解した。2 回目のレドックスイメージングは 1 回目から 24 時間後に行った。IKE 投与群は 2 回目のレドックスイメージングの 6 時間前に IKE (50 mg/kg) を腹腔内投与した。第一章と同様に 2 回目のイメージング後、腫瘍組織を切除し組織学的解析または抗酸化物質の測定を行った。

2-5. 組織学的解析および免疫組織化学染色

組織学的解析および免疫組織化学染色は第一章に示した方法にて行った。GPX4 および 4-HNE の免疫組織化学染色のために、10 mM クエン酸ナトリウ

ム緩衝液 (pH 6.0) を用い、圧力鍋で 121℃、2.5 分腫瘍組織切片を加熱すること
とで抗原の賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼと非特異的結合は、0.3%
過酸化水素-メタノールおよび DAKO ブロッキング試薬 (Cat. No. X0909;
Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) でブロックされた。次に、抗 GPX4
抗体 (Cat. No. ab125066; Abcam, Cambridge, UK) または抗 4-HNE 抗体 (Cat.
No. MHN-020P; JaICA, Tokyo, Japan) にて 4℃で一晩処理され、その後、ウ
サギ由来の Envision HRP 結合ポリマー (Cat. No. K4003; Agilent Technologies)
またはビオチン標識されたヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cat. No. BA-9200-1.5 ;
Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) およびアビジン-ビオチン複合体
(Vectastain Elite ABC キット ; Cat. No. PK-6100 ; Vector Laboratories) と
共にインキュベートされた。抗体複合体の可視化には、3,3'-ジアミノベンジジン
(Cat. No. 349-00903; Dojindo) を使用した。切片は NanoZoomer 2.0 RS virtual
slide scanner (浜松ホトニクス) を使用して画像化された。GPX4 陽性領域は、
Adobe Photoshop (CC 2018; Adobe) でしきい値を選択後、ImageJ (NIH) を
用いて腫瘍組織切片全体に対する GPX4 陽性領域の比率を定量化することで行
った。4-HNE 陽性細胞は ImageJ を使用してカウントした。

2-6. レドックス状態と脂質過酸化との関連の評価

2 回目のレドックスイメージングから得られたレドックスマップを 4-HNE 陽
性細胞の数と比較した。腫瘍の解析領域を 4 つに分割し、平均還元力 (3CP 還
元速度定数) および脂質過酸化 (4-HNE 陽性細胞数/mm²) を各解析領域内の 3
つの任意の ROI から算出し、コントロール群と IKE 処理群の間で比較した。

2-7. 統計処理

値は少なくとも 3 回の独立した実験の平均±標準誤差 (S.E.) で示した。2 つのグループ間、Student の t 検定を用いて評価した。有意水準の最小値は $p<0.05$ に設定した。

3. 結果

3-1. IKE 投与による腫瘍の 3CP 還元速度の評価

マウスリンパ腫モデルにおいて、IKE (50 mg/kg) は腹腔内投与 4 時間後に腫瘍内グルタチオン量を有意に低下させ、脂質過酸化を誘導することが報告されている⁶⁶⁾。したがって、同一のマウスで IKE 投与前後にレドックスイメージングを実施した (図 7A)。3CP 投与 100 秒後から約 25 分間、マウスの腫瘍を連続スキャンし、腫瘍の矢状面のレドックス状態を評価した。その後、3CP の EPR 信号強度から得られた画像を 6.5 分ごとに並べ、腫瘍組織切片の H&E 染色画像と重ね合わせた (図 7B)。ランダムに選んだ 5 つのピクセルの 3CP の EPR 信号強度の平均をプロットすると、IKE 投与後に 3CP の EPR 信号強度の減衰が抑制されていた (図 7C)。図 7D に示すように、複数のマウスにおいても IKE 投与は 3CP 還元速度定数を有意に低下させた (IKE 投与前 : 0.0752 min^{-1} vs. IKE 投与後 : 0.0648 min^{-1} ; $p=0.0249$)。したがって、この 3CP 還元速度の変化は、IKE によって誘発される酸化ストレスおよびフェロトーシスを反映している可能性がある。

3-2. IKE 投与による腫瘍内還元物質と GPX4 発現の評価

これまでの結果から、IKE 投与は腫瘍内還元物質および GPX4 発現を低下させる可能性がある。したがって、HPLC-ECD を用いて腫瘍内還元物質 (還元型アスコルビン酸、還元型システイン、内部標準の N-アセチルシステイン、還元型グルタチオン) を分離および検出した (図 8A)。還元型アスコルビン酸および還元型システインはコントロール群と IKE 投与群とで変化しなかった (図 8B、C) (還元型アスコルビン酸 : $p=0.8387$ 、還元型システイン : $p=0.3921$)。唯一、IKE 投与群の還元型グルタチオンはコントロール群と比較して有意に減少した

(図 8D) (還元型グルタチオン : $p=0.0176$)。さらに、図 8E および F に示すように GPX4 の免疫組織化学染色によって、GPX4 陽性領域が IKE 投与によって有意に減少した ($p=0.0126$)。したがって、IKE は腫瘍内の還元物質の中で主にグルタチオン合成と GPX4 を阻害することが確認された。

3-3. IKE 投与による脂質過酸化の評価

IKE は乳がんの異種移植モデルにおいて 4-HNE の発現を誘導することが報告されている⁵⁾。したがって 2 回目のレドックスイメージング後に、コントロール群および IKE 投与群の腫瘍組織切片で 4-HNE の免疫組織化学染色を行った (図 9A)。図 9B に示すように、コントロール群と比較して IKE 投与群では 4-HNE 陽性細胞数が有意に増加した ($p<0.0001$)。図 8 および図 9 から得られた結果は、IKE 投与がグルタチオンおよび GPX4 発現を低下させるだけでなく、脂質過酸化を誘導することを示しており、フェロトーシスが引き起こされていることを示唆している。

3-4. レドックスイメージングと免疫組織化学染色の併用によるフェロトーシス解析

IKE 投与が腫瘍内のレドックス状態を変化させ、脂質過酸化を誘導したため、最後にこれらの変化の相関を調べた。レドックスマップを 4-HNE 免疫組織化学染色画像と重ね合わせた (図 10A)。腫瘍を 4 つの領域に分割し、その中のランダムな 3 つの ROI の 3CP 還元速度定数と 4-HNE 陽性細胞数を定量化しその平均値をその領域の値とした。図 10B に示すように、脂質過酸化領域は還元力が強い領域と有意に逆相関した ($R^2=0.6229$, $p<0.001$)。この結果は、レドックスマップが脂質過酸化を反映する可能性があることを示唆している。

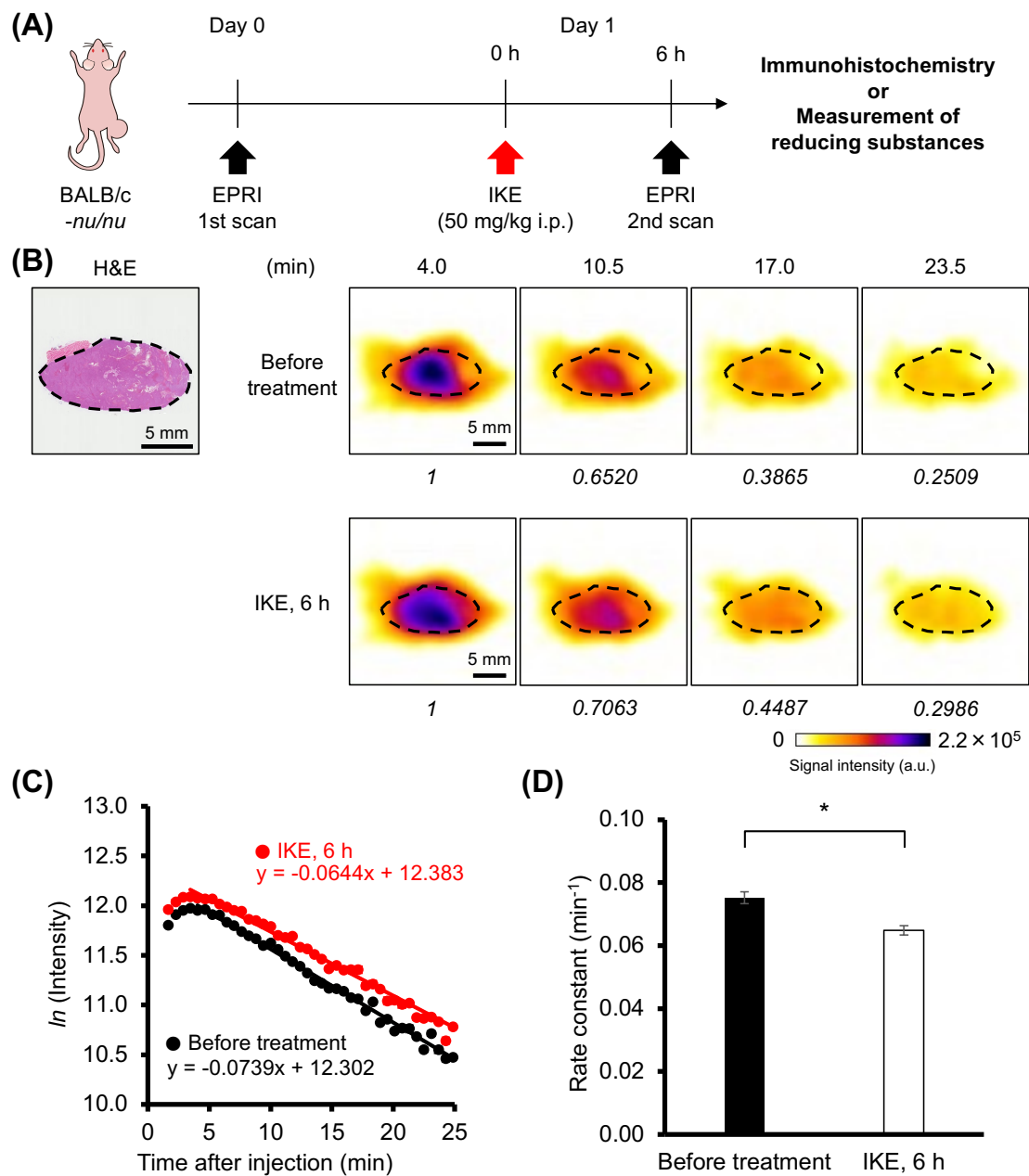


図7. レドックスイメージングによるIKE投与前後の比較

IKE (50 mg/kg、腹腔内投与) 投与前後に腫瘍のレドックスイメージングを行い比較した。(A) レドックスイメージングとIKE投与の実験計画を示す。(B) H&E染色像と同一平面上のレドックスマップを作成した。3CP投与後からの各時間において3CPのEPR信号強度画像を作成した。各画像の下に5ピクセル平均の3CP信号強度の相対値 (3CP投与4分後との比較) を示した。(C) 腫瘍内の3CPのEPR信号強度の経時変化の代表例を示す。(D) 複数のマウスでIKE投与前後のレドックスイメージングにおける3CP還元速度定数を比較した。黒線は5 mmを示す。グラフのカラムおよびバーは平均±S.E.を表し、統計的有意差はIKE投与前に対して $p<0.05$ (*)で示した。

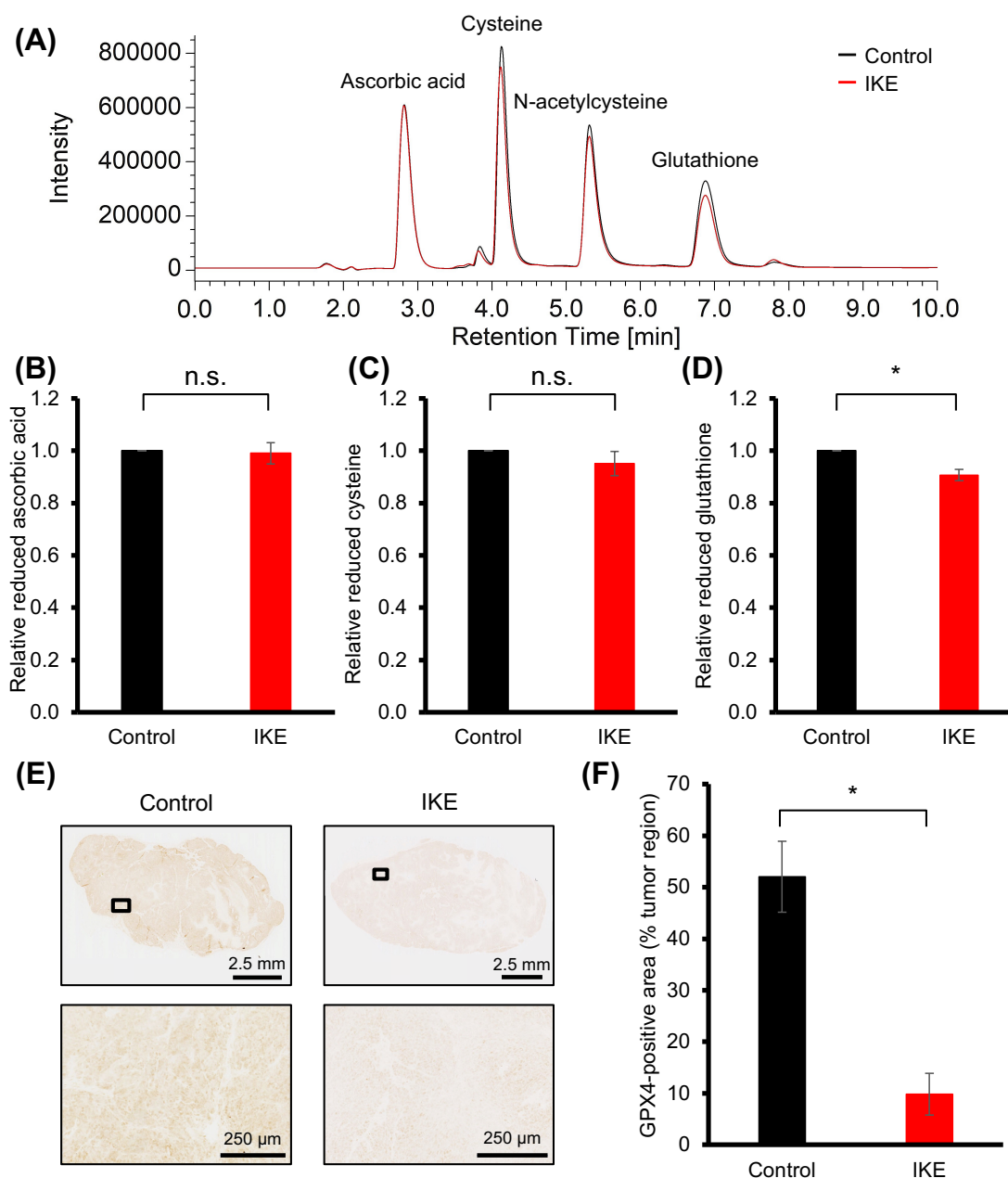


図8. IKEによる腫瘍内還元物質への影響

2回目のレドックスイメージング後、コントロール群およびIKE投与群の腫瘍内還元物質を定量した。(A) 各処理群の還元型アスコルビン酸、還元型システイン、および還元型グルタチオンの濃度をHPLC-ECDで測定し、代表的なクロマトグラムを示した (N-アセチルシステインは内部標準)。(B-D) HPLC-ECDで測定した各処理群における腫瘍内の還元型アスコルビン酸、還元型システイン、還元型グルタチオン濃度を比較した。(E) 各処理群の腫瘍組織切片におけるGPX4の免疫組織化学染色を行った。(F) 各処理群の3匹のマウスにおいてGPX4陽性領域面積を比較した。グラフのカラムおよびバーは平均 $\pm$ S.E.を表し、統計的有意差はコントロール群に対して有意差なしをn.s.、 $p < 0.05$ (*)で示した。

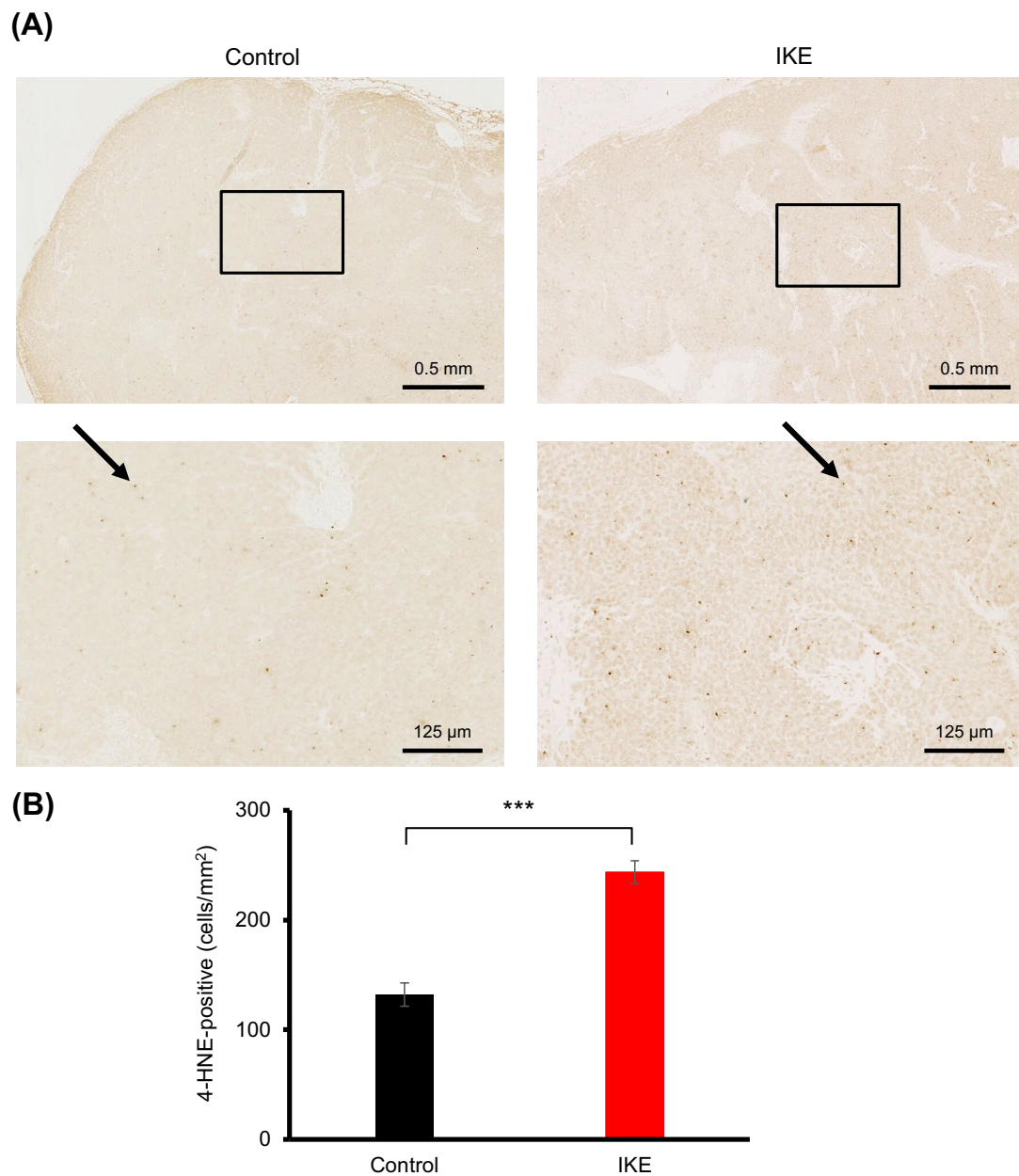


図9. IKEによる腫瘍の脂質過酸化の評価

2回目のレドックスイメージング後、コントロール群およびIKE投与群の腫瘍内の4-HNEを免疫組織化学染色により評価した。(A) コントロール群およびIKE処理群における代表的な4-HNE免疫組織化学染色画像。(B) 各群3匹のマウスの4つのランダムな画像を用いて、1 mm²あたりの4-HNE陽性細胞数を定量した。黒矢印は4-HNE陽性細胞を示す。グラフのカラムおよびバーは平均 $\pm$ S.E.を表し、統計的有意差はコントロール群に対して $p<0.001$ (***)で示した。

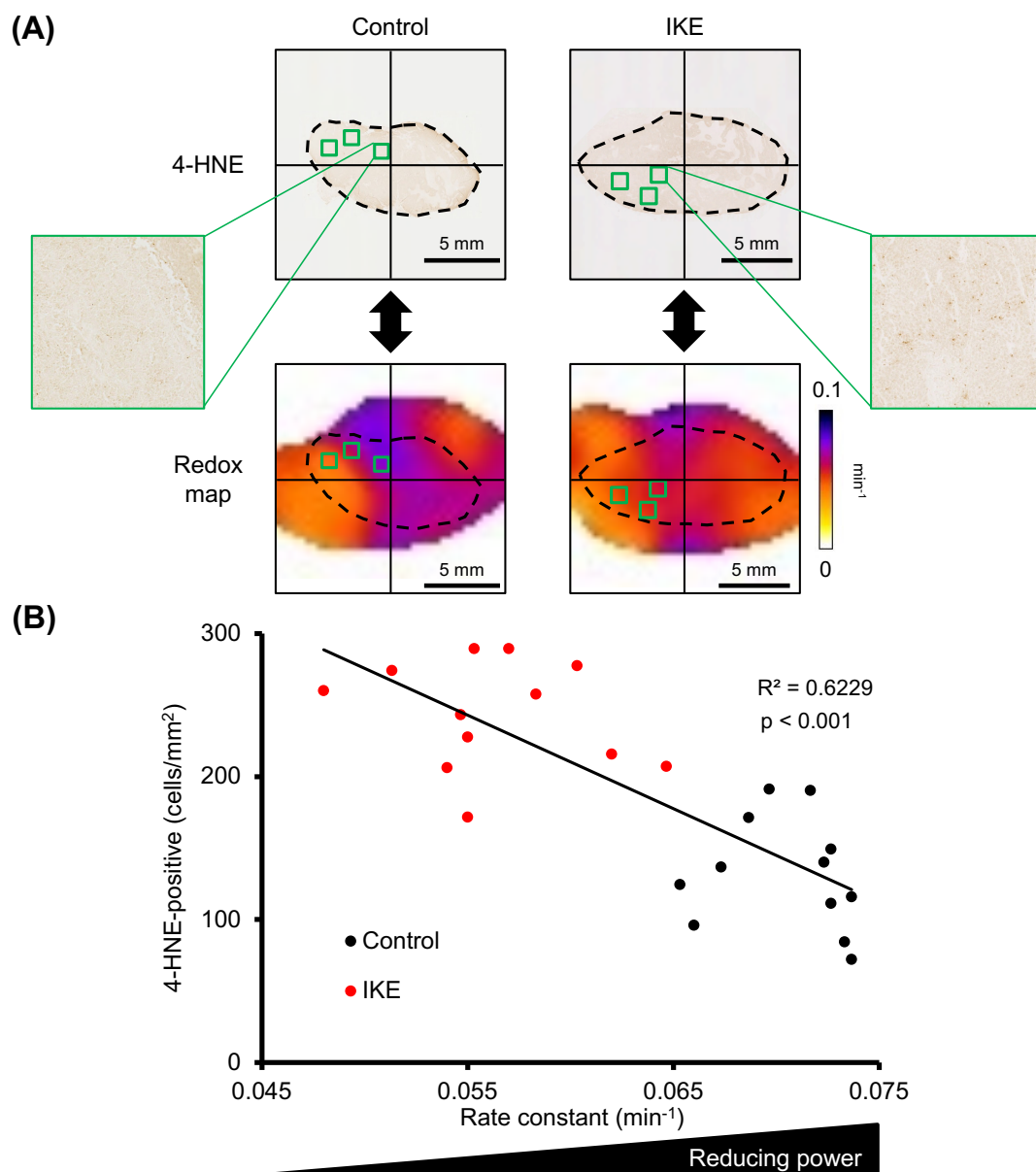


図10. EPRIと免疫組織化学染色の併用解析

レドックスイメージングと4-HNE免疫組織化学染色の併用解析を行った。(A) レドックスマップと4-HNE免疫組織化学染色画像の比較方法を示す。(B) 各群3匹のマウスにおけるレドックスマップから得られた3CP還元速度定数と4-HNE陽性細胞数の相関をピアソンの相関分析により評価した。黒線は5 mmを示す。 R^2 はピアソンの相関係数を表す。

4. 考察

本章では、フェロトーシス誘導剤によって誘発される腫瘍のレドックス状態の変化を初めて検出した (図 7)。レドックスマップと 4-HNE 免疫組織化学染色画像の比較は、還元力の低下と脂質過酸化の間に関連があることを示唆している (図 10)。IKE 投与後に 3CP 還元速度が減少したにもかかわらず (図 7D)、グルタチオン量の著しい減少は観察されなかった (図 8D)。これは脂質過酸化物の蓄積が 3CP 還元速度の低下に関与している可能性を示している (図 9)。したがって、これらの結果は EPRI を用いた非侵襲的なレドックスイメージングがレドックス状態に基づいて組織中のフェロトーシスを検出できる可能性を示唆している。第一章においてグルタチオン合成阻害剤 BSO および X 線照射が腫瘍の還元力を低下させることを確認したが、IKE も同様の効果を示した。BSO 投与および X 線照射はフェロトーシスを誘導するため、これがレドックスイメージングに反映された可能性がある^{29, 62)}。

フェロトーシスはがん、神経疾患、急性腎障害など多くの疾患と関連している^{30, 54)}。フェロトーシスマーカーとして機能する可能性がある遺伝子は多数特定されているが、生体内でのフェロトーシスを検出するための普遍的なマーカー遺伝子は依然として存在しない⁵⁰⁾。したがって組織中のフェロトーシスは、鉄、脂質過酸化物、レドックス状態、およびフェロトーシス関連マーカー遺伝子と組み合わせて評価する必要がある²²⁾。さらに、蛍光プローブ¹⁵⁾およびナノ粒子⁶¹⁾を使用して生体内でフェロトーシスを検出した研究もあるが、これらの方法には生体組織における蛍光透過性や解像度の点で限界がある。EPRI によるレドックスイメージングはこれらの欠点を持たないという利点がある。

IKE 投与後にグルタチオン量および GPX4 発現の有意な減少 (図 8) と 4-HNE の有意な誘導 (図 9) を確認した。今後の研究では他のフェロトーシス誘

導剤（例：RSL3⁶³⁾、FIN56⁴⁷⁾）やフェロトーシス阻害剤（例：デフェロキサミン¹²⁾、リプロクスタチン-1⁶⁹⁾）によって誘発されるレドックス状態の変化を調査する必要がある。また、フェロトーシス感受性はがん細胞株間で異なるため⁴⁶⁾、HCT116 細胞以外のがん細胞由来の腫瘍に関する研究も必要である。

5. 小括

本章では、EPRI を用いたレドックスイメージングと腫瘍組織切片における 4-HNE の免疫組織化学染色画像を比較することによって生体内でのフェロトーシス検出を試みた。レドックスイメージングによってフェロトーシス誘導剤 IKE 投与による腫瘍のレドックス状態の変化を検出できた。また、レドックスマップと 4-HNE 陽性細胞数の比較により、腫瘍組織の還元力と脂質過酸化に負の相関があることが明らかとなった。以上より、EPRI を用いたレドックスイメージングは生体内のフェロトーシス検出に貢献できる可能性があることが示唆された。

＜総括＞

一般的にがん細胞は正常細胞と異なり、高い酸化ストレス環境に耐えるために高濃度の抗酸化物質を産生し、レドックスバランスを保っていると考えられている。したがって、さらなる酸化ストレスの誘導や抗酸化物質産生の抑制ががん治療において重要な戦略となっている。このことから、がん治療による腫瘍のレドックス環境の変化を検出し、他のパラメーターとも比較することができれば、がん治療戦略の開発や改良に大きく資することになると考えられる。そこで本研究では、新しい可搬型 EPRI 装置を用いたレドックスイメージングと ARG や免疫組織化学染色を併用することで、腫瘍の還元力を元に放射線照射やフェロトシス誘導などのがん治療による変化の検出および評価を行った。

第一章では、可搬型 EPRI 装置を用いた同一個体におけるがん治療前後のレドックス環境の変化の評価法およびレドックスマップと腫瘍組織切片の比較法を確立した。グルタチオン合成阻害剤 BSO 投与および X 線照射はともに 3CP 還元速度を低下させたが、それはグルタチオン量の低下および再酸素化という別の因子が関与している可能性があることを明らかにした。さらに、EPRI と $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ ARG の併用方法を確立し、腫瘍の還元力と糖代謝との関連および X 線照射によるその関連の変化を検出した。以上の結果から、本装置は腫瘍のレドックス状態およびがん治療の有効性を評価するためのマルチモーダルイメージングに適しており、他のイメージング技術と組み合わせた解析に使用できることが示された。

そこで、第二章では具体的にレドックスに関連する病態の解明を目的として、EPRI と免疫組織化学染色との併用によってフェロトシスの解析を行った。フェロトシス誘導剤 IKE は腫瘍内グルタチオン量や GPX4 の減少を誘導し、3CP 還元速度を低下させることを明らかにした。さらに、腫瘍組織切片の免疫

組織化学染色によって、フェロトーシスマーカーである 4-HNE 陽性細胞を検出し、レドックスマップと比較した。その結果、腫瘍の還元力と脂質過酸化に負の相関関係が確認された。以上より、本装置によるレドックスイメージングはフェロトーシスの検出に寄与することが示唆された。

以上の結果をまとめると、可搬型 EPRI 装置によるレドックスイメージングは、がん治療によるレドックス環境の変化を検出し、ARG や免疫組織化学染色との併用解析が可能であることを示した。しかし、3CP 還元速度には抗酸化物質のみならず酸素分圧が関与することが明らかになったため、組織の還元力をより正確に反映するプローブの開発が必須である。さらに、より正確な解剖学的情報を得るために、CT や MRI などとの併用が必要である。

本研究は EPRI のレドックスイメージングを組み込んだマルチモーダルイメージング開発の第一歩として意義あるものであると考えられる。

<謝辞>

本稿を終えるにあたり、御指導賜りました北海道大学大学院獣医学研究院放射線学教室の稲波修教授および安井博宣准教授に深く感謝いたします。また、本研究に用いた可搬型 EPRI 装置やソフトウェア開発および測定法に関してご指導頂きました静岡大学大学院の赤羽英夫准教授、北海道医療大学の藤井博匡客員教授および江本美穂講師に深く感謝いたします。最後に、本論文を御校閲頂きました本研究院実験動物学教室の森松正美教授ならびに本学 One Health リサーチセンターの池中良徳教授に厚く御礼申し上げます。

<引用文献>

- 1) Azzam, E. I., Jay-Gerin, J. P. and Pain, D. 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*, **327**: 48-60.
- 2) Ben-Haim, S. and Ell, P. 2009. 18F-FDG PET and PET/CT in the evaluation of cancer treatment response. *J Nucl Med*, **50**: 88-99.
- 3) Berliner, L. J., Fujii, H., Wan, X. M. and Lukiewicz, S. J. 1987. Feasibility study of imaging a living murine tumor by electron paramagnetic resonance. *Magn Reson Med*, **4**: 380-384.
- 4) Bowman, A. P., Bogie, J. F. J., Hendriks, J. J. A., Haidar, M., Belov, M., Heeren, R. M. A. and Ellis, S. R. 2020. Evaluation of lipid coverage and high spatial resolution MALDI-imaging capabilities of oversampling combined with laser post-ionisation. *Anal Bioanal Chem*, **412**: 2277-2289.
- 5) Brown, C. W., Chhoy, P., Mukhopadhyay, D., Karner, E. R. and Mercurio, A. M. 2021. Targeting prominin2 transcription to overcome ferroptosis resistance in cancer. *EMBO Mol Med*, **13**: e13792.
- 6) Campbell, E. J., Vissers, M. C., Bozonet, S., Dyer, A., Robinson, B. A. and Dachs, G. U. 2015. Restoring physiological levels of ascorbate slows tumor growth and moderates HIF-1 pathway activity in Gulo(-/-) mice. *Cancer Med*, **4**: 303-314.
- 7) Cao, J. Y. and Dixon, S. J. 2016. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci*, **73**: 2195-2209.
- 8) Chung, Y. H., Yu, C. F., Chiu, S. C., Chiu, H., Hsu, S. T., Wu, C. R., Yang, C. L., Hong, J. H., Yen, T. C. and Chen, F. H. 2019. Diffusion-weighted MRI

- and ^{18}F -FDG PET correlation with immunity in early radiotherapy response in BNL hepatocellular carcinoma mouse model: timeline validation. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **46**: 1733-1744.
- 9) De Pascali, F., Hemann, C., Samons, K., Chen, C. A. and Zweier, J. L. 2014. Hypoxia and reoxygenation induce endothelial nitric oxide synthase uncoupling in endothelial cells through tetrahydrobiopterin depletion and S-glutathionylation. *Biochemistry*, **53**: 3679-3688.
 - 10) Dence, C. S., Ponde, D. E., Welch, M. J. and Lewis, J. S. 2008. Autoradiographic and small-animal PET comparisons between (18)F-FMISO, (18)F-FDG, (18)F-FLT and the hypoxic selective (64)Cu-ATSM in a rodent model of cancer. *Nucl Med Biol*, **35**: 713-720.
 - 11) Dennison, D. B., Brawley, T. G. and Hunter, G. L. 1981. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid and combined ascorbic acid-dehydroascorbic acid in beverages. *J Agric Food Chem*, **29**: 927-929.
 - 12) Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B. and Stockwell, B. R. 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, **149**: 1060-1072.
 - 13) Emoto, M. C., Sato-Akaba, H., Hamaue, N., Kawanishi, K., Koshino, H., Shimohama, S. and Fujii, H. G. 2021. Early detection of redox imbalance in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging. *Free Radic Biol Med*, **172**: 9-18.
 - 14) Endale, H. T., Tesfaye, W. and Mengstie, T. A. 2023. ROS induced lipid

- peroxidation and their role in ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*, **11**: 1226044.
- 15) Fang, H., Chen, Y., Geng, S., Yao, S., Guo, Z. and He, W. 2022. Super-Resolution Imaging of Mitochondrial HClO during Cell Ferroptosis Using a Near-Infrared Fluorescent Probe. *Anal Chem*, **94**: 17904-17912.
 - 16) Giustarini, D., Colombo, G., Garavaglia, M. L., Astori, E., Portinaro, N. M., Reggiani, F., Badalamenti, S., Aloisi, A. M., Santucci, A., Rossi, R., Milzani, A. and Dalle-Donne, I. 2017. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radic Biol Med*, **112**: 360-375.
 - 17) Glasauer, A. and Chandel, N. S. 2014. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol*, **92**: 90-101.
 - 18) Hattori, K., Kajimura, M., Hishiki, T., Nakanishi, T., Kubo, A., Nagahata, Y., Ohmura, M., Yachie-Kinoshita, A., Matsuura, T., Morikawa, T., Nakamura, T., Setou, M. and Suematsu, M. 2010. Paradoxical ATP elevation in ischemic penumbra revealed by quantitative imaging mass spectrometry. *Antioxid Redox Signal*, **13**: 1157-1167.
 - 19) He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T. and Ma, X. 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem*, **44**: 532-553.
 - 20) Ide, K. and Souma, T. 2022. In Vivo Assessment of Ferroptosis and Ferroptotic Stress in Mice. *Curr Protoc*, **2**: e413.
 - 21) Ilangoan, G., Li, H., Zweier, J. L., Krishna, M. C., Mitchell, J. B. and Kuppusamy, P. 2002. In vivo measurement of regional oxygenation and imaging of redox status in RIF-1 murine tumor: effect of carbogen-

- breathing. *Magn Reson Med*, **48**: 723-730.
- 22) Jiang, X., Stockwell, B. R. and Conrad, M. 2021. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **22**: 266-282.
- 23) Kajarabille, N. and Latunde-Dada, G. O. 2019. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. *Int J Mol Sci*, **20**.
- 24) Khramtsov, V. V. 2018. In Vivo Molecular Electron Paramagnetic Resonance-Based Spectroscopy and Imaging of Tumor Microenvironment and Redox Using Functional Paramagnetic Probes. *Antioxid Redox Signal*, **28**: 1365-1377.
- 25) Kimura, K., Iguchi, N., Nakano, H., Yasui, H., Matsumoto, S., Inanami, O. and Hirata, H. 2022. Redox-Sensitive Mapping of a Mouse Tumor Model Using Sparse Projection Sampling of Electron Paramagnetic Resonance. *Antioxid Redox Signal*, **36**: 57-69.
- 26) Kuppusamy, P., Afeworki, M., Shankar, R. A., Coffin, D., Krishna, M. C., Hahn, S. M., Mitchell, J. B. and Zweier, J. L. 1998. In vivo electron paramagnetic resonance imaging of tumor heterogeneity and oxygenation in a murine model. *Cancer Res*, **58**: 1562-1568.
- 27) Kuppusamy, P., Li, H., Ilangovan, G., Cardounel, A. J., Zweier, J. L., Yamada, K., Krishna, M. C. and Mitchell, J. B. 2002. Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels. *Cancer Res*, **62**: 307-312.
- 28) Larraufie, M. H., Yang, W. S., Jiang, E., Thomas, A. G., Slusher, B. S. and Stockwell, B. R. 2015. Incorporation of metabolically stable ketones into a small molecule probe to increase potency and water solubility. *Bioorg Med*

- Chem Lett*, **25**: 4787-4792.
- 29) Lei, G., Zhang, Y., Koppula, P., Liu, X., Zhang, J., Lin, S. H., Ajani, J. A., Xiao, Q., Liao, Z., Wang, H. and Gan, B. 2020. The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression. *Cell Res*, **30**: 146-162.
- 30) Li, J., Cao, F., Yin, H. L., Huang, Z. J., Lin, Z. T., Mao, N., Sun, B. and Wang, G. 2020. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*, **11**: 88.
- 31) Liou, G. Y. and Storz, P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*, **44**: 479-496.
- 32) Matsumoto, K., Hyodo, F., Matsumoto, A., Koretsky, A. P., Sowers, A. L., Mitchell, J. B. and Krishna, M. C. 2006. High-resolution mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents. *Clin Cancer Res*, **12**: 2455-2462.
- 33) Nagane, M., Yasui, H., Yamamori, T., Zhao, S., Kuge, Y., Tamaki, N., Kameya, H., Nakamura, H., Fujii, H. and Inanami, O. 2013. Radiation-induced nitric oxide mitigates tumor hypoxia and radioresistance in a murine SCCVII tumor model. *Biochem Biophys Res Commun*, **437**: 420-425.
- 34) Nakaoka, R., Kato, K., Yamamoto, K., Yasui, H., Matsumoto, S., Kirilyuk, I. A., Khramtsov, V. V., Inanami, O. and Hirata, H. 2023. Electron Paramagnetic Resonance Implemented with Multiple Harmonic Detections Successfully Maps Extracellular pH In Vivo. *Anal Chem*, **95**: 3940-3950.

- 35) Ozben, T. 2007. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci*, **96**: 2181-2196.
- 36) Patra, K. C. and Hay, N. 2014. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci*, **39**: 347-354.
- 37) Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G. and Migliaccio, A. 2020. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Exp Mol Med*, **52**: 192-203.
- 38) Pichler, B. J., Kolb, A., Nägele, T. and Schlemmer, H. P. 2010. PET/MRI: paving the way for the next generation of clinical multimodality imaging applications. *J Nucl Med*, **51**: 333-336.
- 39) Pushie, M. J., Pickering, I. J., Korbas, M., Hackett, M. J. and George, G. N. 2014. Elemental and chemically specific X-ray fluorescence imaging of biological systems. *Chem Rev*, **114**: 8499-8541.
- 40) Ren, Y. and Shen, H. M. 2019. Critical role of AMPK in redox regulation under glucose starvation. *Redox Biol*, **25**: 101154.
- 41) Rosen, E., Kryndushkin, D., Aryal, B., Gonzalez, Y., Chehab, L., Dickey, J. and Rao, V. A. 2020. Acute total body ionizing gamma radiation induces long-term adverse effects and immediate changes in cardiac protein oxidative carbonylation in the rat. *PLoS One*, **15**: e0233967.
- 42) Saito, K., Okazaki, S., Tachibana, Y., Anzai, K., Ozawa, T. and Takeshita, K. 2020. In vivo ESR imaging of redox status in mice after X-ray irradiation, measured by acyl-protected hydroxylamine probe, ACP. *Free Radic Biol Med*, **160**: 596-603.
- 43) Sato-Akaba, H., Emoto, M. C., Hirata, H. and Fujii, H. G. 2017. Design

- and testing of a 750MHz CW-EPR digital console for small animal imaging. *J Magn Reson*, **284**: 48-58.
- 44) Sato-Akaba, H., Okada, Y., Tsuji, K., Emoto, M. and Fujii, H. 2021. Design and Fabrication of Compact Arrayed Magnet for Biological EPR Imaging. *Applied Magnetic Resonance*, **52**: 1017-1029.
- 45) Shibata, Y., Yasui, H., Higashikawa, K., Miyamoto, N. and Kuge, Y. 2019. Erastin, a ferroptosis-inducing agent, sensitized cancer cells to X-ray irradiation via glutathione starvation in vitro and in vivo. *PLoS One*, **14**: e0225931.
- 46) Shimada, K., Hayano, M., Pagano, N. C. and Stockwell, B. R. 2016. Cell-Line Selectivity Improves the Predictive Power of Pharmacogenomic Analyses and Helps Identify NADPH as Biomarker for Ferroptosis Sensitivity. *Cell Chem Biol*, **23**: 225-235.
- 47) Shimada, K., Skouta, R., Kaplan, A., Yang, W. S., Hayano, M., Dixon, S. J., Brown, L. M., Valenzuela, C. A., Wolpaw, A. J. and Stockwell, B. R. 2016. Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis. *Nat Chem Biol*, **12**: 497-503.
- 48) Shimizu, Y., Zhao, S., Yasui, H., Nishijima, K. I., Matsumoto, H., Shiga, T., Tamaki, N., Ogawa, M. and Kuge, Y. 2019. A Novel PET Probe "[¹⁸F]DiFA" Accumulates in Hypoxic Region via Glutathione Conjugation Following Reductive Metabolism. *Mol Imaging Biol*, **21**: 122-129.
- 49) Spitz, D. R. and Hauer-Jensen, M. 2014. Ionizing radiation-induced responses: where free radical chemistry meets redox biology and medicine. *Antioxid Redox Signal*, **20**: 1407-1409.

- 50) Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Fulda, S., Gascón, S., Hatzios, S. K., Kagan, V. E., Noel, K., Jiang, X., Linkermann, A., Murphy, M. E., Overholtzer, M., Oyagi, A., Pagnussat, G. C., Park, J., Ran, Q., Rosenfeld, C. S., Salnikow, K., Tang, D., Torti, F. M., Torti, S. V., Toyokuni, S., Woerpel, K. A. and Zhang, D. D. 2017. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, **171**: 273-285.
- 51) Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F. and Peng, Z. Y. 2019. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*, **2019**: 5080843.
- 52) Sugiyama, M., Sakahara, H., Sato, K., Harada, N., Fukumoto, D., Kakiuchi, T., Hirano, T., Kohno, E. and Tsukada, H. 2004. Evaluation of 3'-deoxy-3'-¹⁸F-fluorothymidine for monitoring tumor response to radiotherapy and photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med*, **45**: 1754-1758.
- 53) Tanaka, T., Furukawa, T., Fujieda, S., Kasamatsu, S., Yonekura, Y. and Fujibayashi, Y. 2006. Double-tracer autoradiography with Cu-ATSM/FDG and immunohistochemical interpretation in four different mouse implanted tumor models. *Nucl Med Biol*, **33**: 743-750.
- 54) Tang, Z., Huang, Z., Huang, Y., Chen, Y., Huang, M., Liu, H., Ye, Q. A., Zhao, J. and Jia, B. 2021. Ferroptosis: The Silver Lining of Cancer Therapy. *Front Cell Dev Biol*, **9**: 765859.
- 55) Tempany, C. M., Jayender, J., Kapur, T., Bueno, R., Golby, A., Agar, N. and

- Jolesz, F. A. 2015. Multimodal imaging for improved diagnosis and treatment of cancers. *Cancer*, **121**: 817-827.
- 56) Toyonaga, T., Hirata, K., Shiga, T. and Nagara, T. 2017. Players of 'hypoxia orchestra' - what is the role of FMISO? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, **44**: 1679-1681.
- 57) Trachootham, D., Alexandre, J. and Huang, P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, **8**: 579-591.
- 58) Uruno, A., Matsumaru, D., Ryoke, R., Saito, R., Kadoguchi, S., Saigusa, D., Saito, T., Saido, T. C., Kawashima, R. and Yamamoto, M. 2020. Nrf2 Suppresses Oxidative Stress and Inflammation in *App* Knock-In Alzheimer's Disease Model Mice. *Mol Cell Biol*, **40**.
- 59) Wang, M. E., Chen, J., Lu, Y., Bawcom, A. R., Wu, J., Ou, J., Asara, J. M., Armstrong, A. J., Wang, Q., Li, L., Wang, Y., Huang, J. and Chen, M. 2023. RB1-deficient prostate tumor growth and metastasis are vulnerable to ferroptosis induction via the E2F/ACSL4 axis. *J Clin Invest*, **133**.
- 60) Wiseman, H. and Halliwell, B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*, **313 (Pt 1)**: 17-29.
- 61) Yang, W., Wang, Y., Fu, C., Li, C., Feng, F., Li, H., Tan, L., Qu, H., Hui, H., Wang, J., Tian, J. and Long, L. 2024. Quantitative visualization of myocardial ischemia-reperfusion-induced cardiac lesions via ferroptosis magnetic particle imaging. *Theranostics*, **14**: 1081-1097.
- 62) Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R.,

- Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L. and Stockwell, B. R. 2014. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, **156**: 317-331.
- 63) Yang, W. S. and Stockwell, B. R. 2008. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol*, **15**: 234-245.
- 64) Yasui, H., Matsumoto, S., Devasahayam, N., Munasinghe, J. P., Choudhuri, R., Saito, K., Subramanian, S., Mitchell, J. B. and Krishna, M. C. 2010. Low-field magnetic resonance imaging to visualize chronic and cycling hypoxia in tumor-bearing mice. *Cancer Res*, **70**: 6427-6436.
- 65) Yu, N. Y. and Brown, J. M. 1984. Depletion of glutathione in vivo as a method of improving the therapeutic ratio of misonidazole and SR 2508. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **10**: 1265-1269.
- 66) Zhang, Y., Tan, H., Daniels, J. D., Zandkarimi, F., Liu, H., Brown, L. M., Uchida, K., O'Connor, O. A. and Stockwell, B. R. 2019. Imidazole Ketone Erastin Induces Ferroptosis and Slows Tumor Growth in a Mouse Lymphoma Model. *Cell Chem Biol*, **26**: 623-633.e629.
- 67) Zhao, S., Kuge, Y., Mochizuki, T., Takahashi, T., Nakada, K., Sato, M., Takei, T. and Tamaki, N. 2005. Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in 18F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor. *J Nucl Med*, **46**: 675-682.
- 68) Zhong, J., Rajaram, N., Brizel, D. M., Frees, A. E., Ramanujam, N.,

- Batinic-Haberle, I. and Dewhirst, M. W. 2013. Radiation induces aerobic glycolysis through reactive oxygen species. *Radiother Oncol*, **106**: 390-396.
- 69) Zilka, O., Shah, R., Li, B., Friedmann Angeli, J. P., Griesser, M., Conrad, M. and Pratt, D. A. 2017. On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin-1 and Liproxstatin-1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. *ACS Cent Sci*, **3**: 232-243.

**Studies on the evaluation of cancer treatment response using combined EPR redox
imaging and other imaging techniques**

Kazuhiro Kato

*Laboratory of Radiation Biology,
Graduate School of Veterinary Medicine,
Hokkaido University, Sapporo 060-0818, Japan*

Redox reactions *in vivo* play a critical role in maintaining homeostasis by contributing to various biological functions. Reactive oxygen species (ROS), primarily generated by mitochondria, induce cell death through mechanisms such as DNA damage and lipid peroxidation. To remove ROS and maintain redox balance, cells produce a variety of antioxidants. Cancer cells exhibit elevated ROS levels due to their distinct metabolism and rapid proliferation. To avoid ROS-induced cell death, cancer cells maintain their redox balance by producing high concentrations of antioxidants. Consequently, the redox balance in cancer cells is fragile and can be disrupted by excessive ROS or suppression of antioxidant production, leading to reduced survival. Therefore, understanding and monitoring the redox status of tumor tissues can facilitate effective cancer therapies.

One of the pathologies associated with redox is ferroptosis. Ferroptosis, a form of iron-dependent cell death, is induced by redox imbalance and lipid peroxidation. Given the

unique physiological characteristics of cancer cells, such as excessive iron accumulation, inducing ferroptosis represents a promising cancer treatment strategy. However, detecting ferroptosis using imaging techniques remains challenging.

Electron paramagnetic resonance (EPR) is the only method capable of directly detecting unpaired electrons. EPR imaging (EPRI) involves administering spin probes with unpaired electrons to animals, enabling assessment of redox states, oxygen partial pressure, and pH within tissues. For redox imaging, 3-carbamoyl-PROXYL (3CP), a nitroxyl radical probe, is widely used. The reduction of 3CP by antioxidants leads to a loss of EPR signals over time, allowing visualization of redox states. For pH imaging, the nitroxyl probe R-SG is used, and our research has successfully achieved imaging within tumors. Personalized medicine, based on hypoxia as an indicator of tumor malignancy, has gained attention in recent years. Quantitative evaluation of redox states and pH, which were previously unmeasured, could offer new opportunities for cancer treatment.

Conventional EPRI devices are large and stationary, limiting their usage to specific environments. Furthermore, their low sensitivity makes it difficult to visualize the heterogeneous redox states within tumors and to compare EPRI results with other imaging modalities such as histological analysis or positron emission tomography (PET). To address these limitations, we utilized a portable EPRI device with high sensitivity and ease of assembly. This device is capable of remapping the decay (reduction) rate constant of the EPR signal intensity of 3CP in any tissue section and depicting a redox map showing the strength of the reduction power in the tissue section.

In cancer therapy, non-invasive detection of changes in the redox environment of tumors caused by radiotherapy or induction of ferroptosis could be useful in assessing treatment resistance and developing more efficient treatment methods. Therefore, this study aims to establish a multimodal imaging approach incorporating tumor redox imaging using the portable EPRI device. This method was applied to monitor changes before and after radiotherapy and to detect ferroptosis, a redox-related pathological process.

In the first chapter, we noninvasively detected redox changes in tumors before and after the glutathione synthesis inhibitor BSO treatment or radiotherapy within the same individual and compared redox maps with tumor tissue sections. Additionally, redox maps were compared with glucose metabolism data obtained via autoradiography (ARG) using 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose ([^{18}F]FDG). Results showed that BSO treatment and X-irradiation significantly reduced 3CP reduction rates in tumors. Redox maps corresponded well with histological sections, and regions with high reductive capacity were associated with increased glucose metabolism, a correlation that disappeared after X-irradiation.

In the second chapter, ferroptosis detection was conducted by comparing EPRI-derived redox maps with immunohistochemical staining of tumor sections. A negative correlation between tumor reductive capacity and lipid peroxidation was identified through comparisons of redox maps with 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) staining images.

In conclusion, redox maps could be compared with ARG and immunohistochemical

staining of histological sections. Recent advancements in multimodal imaging systems, such as PET-CT and PET-MRI, allow simultaneous acquisition of multiple functional parameters, enabling more accurate diagnosis and prognosis. Simultaneous evaluation of tumor redox states, glucose uptake, and morphological imaging could provide precise insights into microenvironmental changes during cancer therapy. This novel portable EPRI device, capable of operating in specialized facilities using radiolabeled isotopes (RI) such as PET or ARG, holds promise for the development of novel multimodal imaging techniques.