

平成 30 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03007

研究課題名(和文) タンパク質ナノカプセルによるインテリジェント型マルチモーダル造影剤の開発

研究課題名(英文) Ultrasensitive MRI detection of spontaneous pancreatic tumors with nanocage-based targeted contrast agent

研究代表者

村田 正治 (Murata, Masaharu)

九州大学・先端医療イノベーションセンター・特任教授

研究者番号：30304744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体の機能を生体内外の物質や細胞機能等を利用して分子レベルで可視化する、いわゆる分子イメージング技術を導入した新しいMRI機能化造影剤を開発した。Gd-DTPAを内孔に固定化したナノカプセル型MRI造影剤のT1緩和度を算出したところ、最大で10倍の高感度化に成功した。興味深いことに、得られた緩和度とナノカプセルの粒径をプロットしたところ、高い相関関係が得られた。これはナノ粒子型のMRI造影剤の造影能がその粒径と関係していることを示した初めての例である。さらにこのカプセル表面を機能化することで、膵がん特異性を持たせることにも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, small heat shock protein 16.5 (Hsp16.5)-based nanocages conjugated to gadolinium(III)-chelated contrast agents and iRGD peptides (which target neuropilin-1 expressed on pancreatic cancer cells) were developed. To investigate whether template size influences relaxivity, nanocages with one to four hydrophobic domains were designed. MRI data showed that larger nanocages had higher T1 relaxivity than smaller nanocages, which resulted from a reduction in molecular tumbling rates caused by an increase in nanocage size, and a robust cage structure resulting from the introduction of hydrophobic domains. For in vivo MRI studies, molecular MRI with protein nanocages was enabled to detect neuropilin-1-positive cells and to produce strong signal enhancement of spontaneous pancreatic tumors in KPC genetically engineered mouse models.

研究分野：ナノ医工学

キーワード：ナノ材料 分子イメージング MRI 機能化造影剤

1. 研究開始当初の背景

画像診断法の発展は疾病の早期発見とその治療効果の改善にめざましい進歩をもたらしている。なかでも MRI は非侵襲・無障害であること、そして軟部組織コントラストが高く、空間分解能に優れていることから臨床医学の現場において重要な位置を占めている。MRI 造影剤の利用は病変部位の明瞭な描画のために必要不可欠の手段となりつつある。既に、肝臓、脾臓、そして骨髄といった網内系に特異的な造影剤が臨床において広く使われており、組織選択性という観点では大きな成果を上げている。しかし癌など特定の疾患に対する特異性は低く、未だ開発途上と言わざるを得ない。そこで本研究では、癌部ターゲティングが可能なキャリアと MRI 造影剤の複合化を目的とした

2. 研究の目的

画像診断法の発展は疾病の早期発見とその治療効果の改善にめざましい進歩をもたらした。なかでも MRI (magnetic resonance imaging) は非侵襲・無障害であること、そして軟部組織コントラストが高く、空間分解能に優れていることから臨床医学の現場にお

いて重要な位置を占めている。また超音波診断や CT で評価困難な病変の広がりを容易に把握できることや、骨などのアーチファクトが少ないことも MRI の大きな特徴である。最近では Open 型 MRI 装置の登場により、単なる検査機器ではなく、治療も含めた有用性の高い手技として大きく発展している。しかし MRI には、病巣検出能は高いものの疾患特異性が低いという欠点がある。また撮像には患者をガントリ内に入れる必要があり、術中リアルタイムに摘出部位の位置を確認するには適していない。そこで本研究では診断の精度と感度を向上させ、疾患の治療効果を上げるために、これまでの造影剤とは一線を画する新しいマルチモーダル型イメージング造影剤の開発を目指す。

そこで本研究では、生体の機能を生体内外の物質や細胞機能等を利用して分子レベルで可視化する、いわゆる分子イメージング技術を導入した新しい MRI 機能化造影剤を開発する。この機能化造影剤のプラットフォームとして、タンパク質ベースのナノカプセルを用いる(図1)。このナノカプセルは内孔(内径 10nm)を有する球状構造体(24 量体、外径 15nm)を形成するため、その内部にガドリ

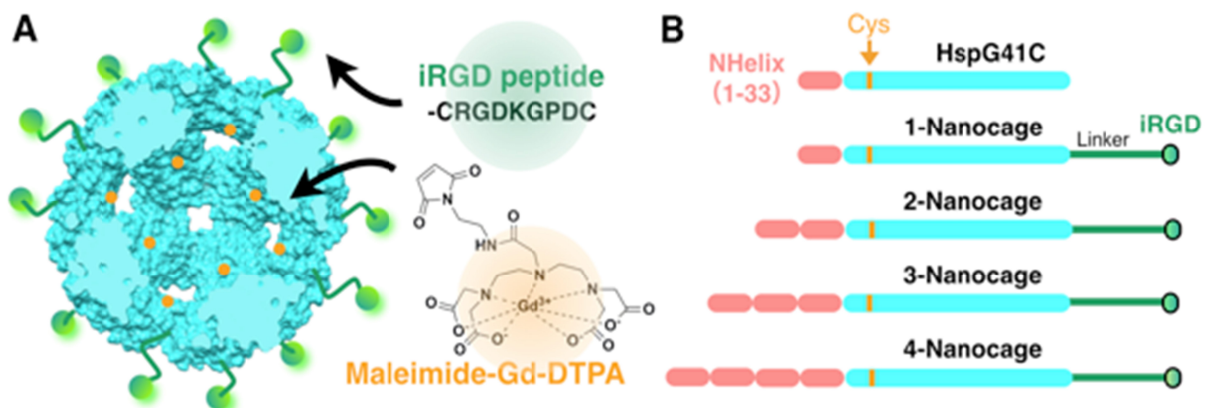


図1 膵がん特異性を有するナノカプセル型 MRI 造影剤の分子設計

(A) Schematic representation and (B) subunit domain boundaries of the engineered Hsp16.5 nanocages. The nanocages were chemically conjugated with Gd(III)-DTPA on the interior surface and genetically modified with iRGD peptide on the exterior surface. The light red rod indicates the helix domains in the N-terminal region (residues 1–33) of Hsp16.5. The green dots and lines indicate the iRGD peptide and hydrophilic linker (-(GGG)₈-), respectively. The orange arrow indicates the Gly residue at position 41, which was mutated to Cys residue for conjugation with Gd(III)-DTPA-maleimide (line) or Alexa Fluor 488-labeled HSPG41 control nanocages (green line) in the presence of 10% fetal bovine serum. Untreated control cells are displayed by a black line.

ニウム錯体を封入することが可能である。我々はすでにこのナノカプセルの遺伝子クローニングに成功し、大腸菌を使った大量発現系と精製法を確立している。昨年度までにN末端ヘリックスがリピート(1~4回)したクローンを作製し、さらにその外表面にリンカー分子を介してiRGDペプチド(GCRGDKGPDC)を導入した。iRGDペプチドは膵がん等で発現が亢進しているNeuropilin-1に特異性を有する。またそれをつなぐリンカー長はナノカプセルの特異性に影響することが共同研究者である村田らによって示されている。我々はその成果をもとにしてリンカー長を最適化した。本年度はこれらのナノカプセル型MRI機能化造影剤の物性評価を調べるとともに、血中での安定性や膵がんへの集積性について定量的に評価した。

3. 研究の方法

ナノカプセル型MRI造影剤の形態観察

iRGDペプチドを表面に有するN末端ヘリックスリピート体が大腸菌から発現・精製した。これを2%酢酸ウラニルで染色し、透過型電子顕微鏡(TECNAI 20 + Eagle 2k CCD camera (FEI, Hillsboro) 加速電圧 200 kV)で観察した。

ナノカプセル型MRI造影剤の機能評価

ナノカプセル型造影剤の膵がん細胞への特異性をフローサイトメトリで評価した。ヒト膵癌由来細胞株であるAsPC-1、Suit-2そして対照としてヒト子宮頸がん細胞株Helaを6wellの□-Slidesに 1×10^4 cells/wellとなるよう播種した。これを10vol% FBS、抗生物質(100 U/mL ペニシリン, 100 μ g/mL ストレプトマイシン, 0.25 μ g/mL アムホテリシン-B)を添加したDMEM培地(DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM)を用い、37、5% CO₂ 雰囲気設定したCO₂インキュベーター内にて培養した。一昼夜培養した後、培地

交換し、終濃度 1 μ M (蛍光色素基準)のAlexa488ラベル化iRGDナノカプセルを添加し、そのまま6時間培養を続けた。ナノカプセルの細胞への取り込みはフローサイトメトリ(SONY EC800)を用いて評価した。

またMRI造影能は1.5Tの場合は、VivoLVA (Japan REDOX, Fukuoka, Japan)、9.4Tの場合はBioSpec Bruker spectrometer (Bruker)をそれぞれ使用して測定した。

4. 研究成果

ナノカプセル型MRI造影剤の物性評価

精製したナノカプセル型造影剤を電子顕微鏡で観察したところ、昨年度の動的光散乱(DLS)の結果と同様、すべてのカプセルがナノサイズの粒子であることが分かった。そのサイズはN末端ヘリックスのリピート数と共に増大し、1~4リピート体の平均粒径はそれぞれ、16.8、19.5、30.1そして37.1nmであった。この結果は、N末端ヘリックスのリピート数を増やすことでナノカプセルのサブユニットの間の会合度が上昇する可能性を示した。

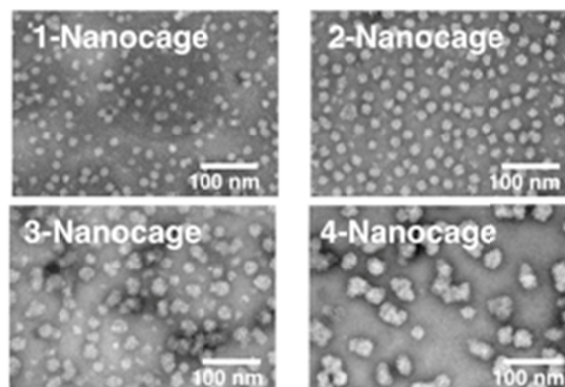


図 2 膵がん特異性を有するナノカプセル型MRI造影剤の透過型電子顕微鏡像

ナノカプセル型MRI造影剤の膵がん特異性

iRGDペプチドを表面に有するN末端ヘリックスリピート型ナノカプセルの内孔に蛍光分子をコンジュゲートし、ヒト膵癌由来細胞株であるAsPC-1、Suit-2そしてヒト子宮頸がん細胞株Helaに対する特異性を評価し

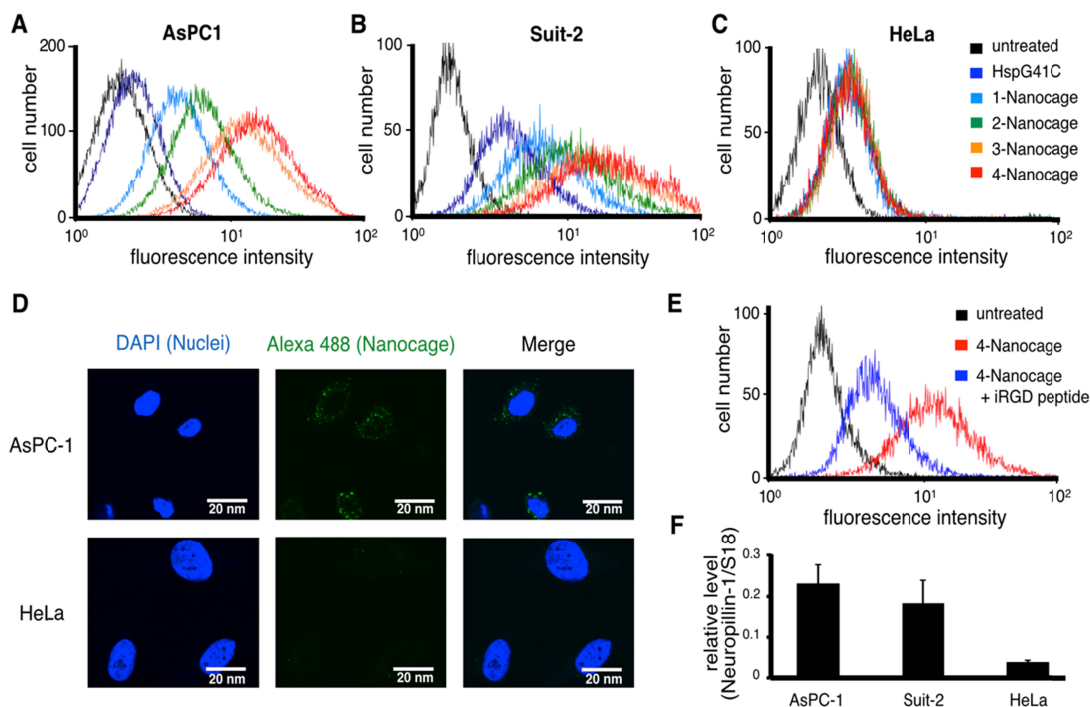


図3 ナノカプセル型MRI造影剤の膵がん特異性評価

Representative histograms of the fluorescence intensities of (A) AsPC-1 cells, (B) Suit-2 cells and (C) HeLa cells incubated with fluorophore-labeled nanocages in the presence of 10% FBS for 3h. (D) Confocal fluorescence microscopic observation of the uptake of 4-Nanocages in AsPC-1 and HeLa cells. Images were obtained 3 h after addition of 4-Nanocage. (E) Uptake inhibition assay of Alexa Fluor 488-labeled 4-Nanocages in the presence of excess iRGD peptides. AsPC-1 cells were co-incubated with the nanocages (0.1 μ M) and iRGD peptides (100

た。フローサイトメトリおよび蛍光顕微鏡観察の結果、ナノカプセルは二つの膵がん由来細胞株 (AsPC-1、Suit-2) に対してより効率的に取り込まれ、HeLa 細胞にはほとんど取り込まれていないことが分かった (図 3A~D)。この結果は、ナノカプセル表面に呈示された iRGD ペプチドの効果であろう。実際、iRGD ペプチドの標的分子である Neuropilin-1 の発現量は、二つの膵がん由来細胞株 AsPC-1 と Suit-2 において有意に高く、さらにナノカプセルのこれらの細胞株による取り込みは、合成 iRGD ペプチドの添加によって効果的に阻害された (図 3E、F)。これらの結果は、ナノカプセル表面の iRGD ペプチドが膵がん表面で高発現している Neuropilin-1 に対する特異的なリガンド分子として機能していることを示している。

ナノカプセル型MRI造影剤の造影能

クリックケミストリーを用いて Gd-DTPA

を内孔に固定化したナノカプセル型MRI造影剤を 100mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で希釈し、所定の濃度に調整した後、磁場強度 1.5T および 9.4T のMRIを用いて T1 強調画像を撮影した。この結果、各ナノカプセル型造影剤は実験条件下において優れた造影能を示すことが分かった。インバージョンリカバリー法により各ナノカプセル型造影剤の T₁ 緩和度を算出したところ、NHelix 1 は 14.9mM⁻¹s⁻¹、NHelix 2 は 16.5 mM⁻¹s⁻¹、NHelix 3 は 34.6 mM⁻¹s⁻¹ そして NHelix 4 では 46.4 mM⁻¹s⁻¹ に向上した。臨床でも使用されているMRI造影剤 Gd-DTPA 錯体の緩和度が 4.9 mM⁻¹s⁻¹ であることと比較すると、ナノカプセル型MRI造影剤はいずれもより高感度な撮影が可能であることを示した (磁場強度 1.5T)。とりわけ NHelix 4 ではほぼ 10 倍の高感度化がなされており、N 末端ヘリックスのリピート数

の増加が緩和能の向上に寄与していることが示された。興味深いことに、得られた緩和度とナノカプセルの粒径をプロットしたところ、高い相関関係が得られた。これはナノ粒子型のMRI造影剤の造影能がその粒径と関係していることを示した初めての例である。さらに本ナノカプセルを用いて、自然発症型膵がんモデルマウスに投与したところ、直径約 10mm のがん部を特異的に描出することに成功した（図 4）。

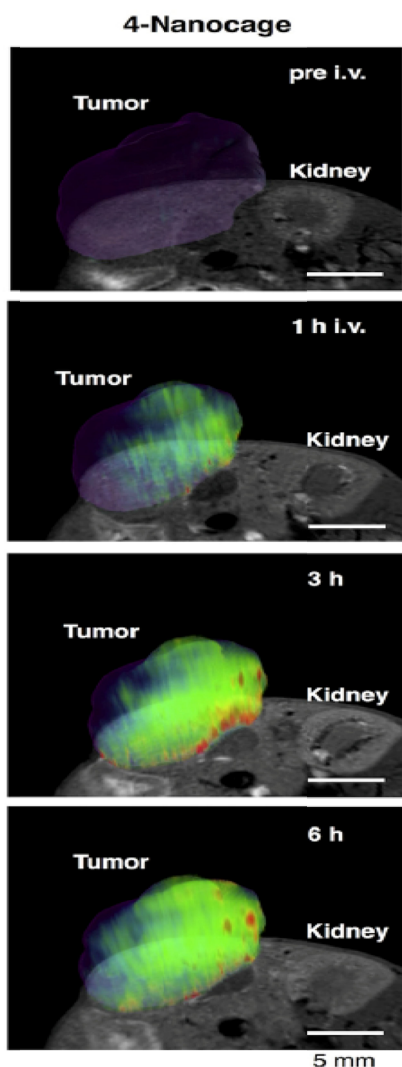


図 4 ナノカプセル型機能化造影剤による膵がんの MR イメージング

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 12 件）

1. Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang, Jing Shu Piao, Sayoko

- Narahara, Fuminori Hyodo, Nobuhito Hamano, Jie Guo, Susumu Oguri, Kenoki Ohuchida, Makoto Hashizume, "Ultrasensitive MRI Detection of Spontaneous Pancreatic Tumors with Nanocage-Based Targeted Contrast Agent", *Biomaterials*, **152**, 37-46 (2018).
2. Naoya IMANISHI, Tetsuo YAMASAKI, and Kazuhiko TSUKAGOSHI, Masaharu MURATA, "Phase Separation Multi-Phase Flow Using an Aqueous Two-Phase System of a Polyethylene Glycol/Dextran Mixed Solution", *Analytical Sciences*, in press.
3. Riki TOITA, Takahito KAWANO, Satoshi FUJITA, Masaharu MURATA, Jeong-Hun KANG, "Increased hepatic inflammation in a normal-weight mouse after long-term high-fat diet feeding", *Journal of Toxicologic Pathology*, **31**, 43-47 (2018).
4. Sho Endo, Kohei Nakata, Kenoki Ohuchida, Shin Takesue, Hiromichi Nakayama, Toshiya Abe, Kazuhiro Koikawa, Takashi Okumura, Masafumi Sada, Kohei Horioka, Biao Zheng, Yusuke Mizuuchi, Chika Iwamoto, Masaharu Murata, Taiki Moriyama, Yoshihiro Miyasaka, Takao Ohtsuka, Kazuhiro Mizumoto, Yoshinao Oda, Makoto Hashizume, Masafumi Nakamura, "Autophagy Activates Pancreatic Stellate Cells, Which Associates With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice", *Gastroenterology*, **152**, 1492-1506 (2017).
5. Ryosuke Nakata, Fuminori Hyodo, Masaharu Murata, Hinako Eto, Tomoko Nakaji, Takahito Kawano, Sayoko Narahara, Keiji Yasukawa, Tomohiko Akahoshi, Morimasa Tomikawa, and Makoto Hashizume, "In vivo redox metabolic imaging of mitochondria assesses disease progression in non-alcoholic steatohepatitis" *Scientific Reports*, **7**, 17170-17182(2017).
6. Takahito Kawano, Masaharu Murata, Fuminori Hyodo, Hinako Eto, Nuttavut Kosem, Ryosuke Nakata, Nobuhito Hamano, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Tomohiko Akahoshi and Makoto Hashizume, "Noninvasive mapping of the redox status of dimethylnitrosamine induced hepatic fibrosis using in vivo dynamic nuclear polarization magnetic resonance imaging", *Scientific Reports*, **6**, 32604 (2016).
7. Daisuke Asai, Masaharu Murata, Riki Toita, Takahito Kawano, Hideki Nakashima, and Jeong-Hun Kang, "Role of amino acid residues surrounding the phosphorylation site in peptide substrates of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)", *Amino Acids*, in press.

8. Riki Toita, Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jeong-Hun Kang, "Anti-obesity and anti-inflammatory effects of macrophage-targeted interleukin-10-conjugated liposomes in obese mice", *Biomaterials*, **110**, 81-88 (2016).
9. Nobuhito Hamano, Masaharu Murata, Takahito Kawano, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Ryosuke Nakata, Tomohiko Akahoshi, Tetsuo Ikeda, and Makoto Hashizume, "Förster Resonance Energy Transfer-Based Self-Assembled Nanoprobe for Rapid and Sensitive Detection of Postoperative Pancreatic Fistula", *ACS Applied Materials & Interfaces*, **8**, 5144-5123(2016).
10. Kazuya Yokota, Takeyuki Saito, Kazu Kobayakawa, Kensuke Kubota, Masamitsu Hara, Masaharu Murata, Yasuyuki Ohkawa, Yukihide Iwamoto, "The feasibility of in vivo imaging of infiltrating blood cells for predicting the functional prognosis after spinal cord injury", *Scientific reports*, in press.
11. Go Kagiya, Ryohei Ogawa, Fuminori Hyodo, Kei Yamashita, Mizuki Nakamura, Ayumi Ishii, Yukihiko Sejimo, Shintaro Tominaga, Masaharu Murata, Yoshikazu Tanaka & Masanori Hatashita "Development of a real-time imaging system for hypoxic cell apoptosis", *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, **5**, 16009-16017(2016).
12. Ryuichi Kumashiro, Kozo Konishi, Tohru Chiba, Tomohiko Akahoshi, Shotaro Nakamura, Masaharu Murata, Morimasa Tomikawa, Takayuki Matsumoto, Yoshihiko Machara and Makoto Hashizume, "Integrated Endoscopic System Based on Optical Imaging and Hyperspectral Data Analysis for Colorectal Cancer Detection", *Anticancer Research*, **36**, 3925-3932 (2016).

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 4件)

名称：光走査装置および内視鏡
 発明者：石川範明、橋爪 誠、澤田廉士、兵藤文紀、村田正治
 権利者：九州大学、富士電機(株)
 種類：特許
 番号：特願 2015-181231
 出願年月日：2016年2月26日
 国内外の別：国内

名称：光走査装置および内視鏡
 発明者：石川範明、橋爪 誠、澤田廉士、兵藤文紀、村田正治
 権利者：九州大学、富士電機(株)
 種類：特許
 番号：特願 2015-181173
 出願年月日：2016年2月26日
 国内外の別：国内

名称：光走査装置および内視鏡
 発明者：石川範明、橋爪 誠、澤田廉士、兵藤文紀、村田正治
 権利者：九州大学、富士電機(株)
 種類：特許
 番号：特願 2015-181239
 出願年月日：2016年2月26日
 国内外の別：国内

名称：フリーラジカルの消費速度情報の取得方法およびNASHの判定方法
 発明者：村田正治、兵藤文紀、橋爪 誠、中田亮輔、赤星朋比古
 権利者：九州大学
 種類：特許
 番号：特願 2016-117335
 出願年月日：2016年6月13日
 国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕
 ホームページ等
<http://camiku.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
 村田正治(MURATA MASAHARU)
 九州大学先端医療イノベーションセンター・特任教授、研究者番号：30304744
- (2)研究分担者
 橋爪 誠(HASHIZUME MAKOTO)
 九州大学大学院医学研究院・教授、研究者番号：90198664
- (3)研究分担者
 富川盛雅(TOMIKAWA MORIMASA)
 九州大学病院先端医工学診療部・准教授、研究者番号：60325454
- (4)研究分担者
 河野 喬仁(TAKAHITO KAWANO)
 九州大学先端医療イノベーションセンター・助教、研究者番号：90526831