

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01308

研究課題名(和文) 高分子MRI造影剤による脳微細血管網イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Superfine Magnetic Resonance Imaging of the Cerebrovasculature by polymeric contrast agent

研究代表者

馬原 淳 (Mahara, Atsushi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：80416221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臨床利用されている低分子MRI造影剤で描出できなかった脳の微細血管網を高精細でイメージングするための多分岐型高分子ガドリニウム造影剤を開発した。分子量15kDa程度の分岐型ポリエチレングリコール末端にガドリニウム錯体を結合させた造影剤は、分岐構造による緩和能の増大を示し、投与24時間後で尿中排泄され、血中炎症性マーカーを過剰に誘導せず低毒性であることを明らかとした。この造影剤は100 $\mu$ m程度の微細血管を造影でき、中大脳動脈閉塞モデルラットにおいて脳虚血部位での血管閉塞や側副血行路をMRAにより診断できる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a polymeric Gd-conjugated contrast agent for high-resolution imaging of cerebrovasculature. The branched polyethylene glycols having approximately 15 kDa of molecular weight were conjugated with Gd-chelate and fluorescein. We showed that microvasculature network could be visualized with the resolution of 100  $\mu$ m by using the contrast agents. Experimental results indicated that relaxivity increasing was induced by the branch structure, and the agents were excreted in urine after 24 hours for the administration. Inflammatory markers in the blood were not induced by the injection. Moreover, we succeeded in proving the possibility that cerebral ischemia region and collateral flow were clearly visualized with the polymeric contrast agents in middle cerebral artery occlusion model rats.

研究分野：組織再生工学、バイオマテリアル

キーワード：高分子MRI造影剤 脳血管イメージング MRA

## 1. 研究開始当初の背景

本プロジェクトでは、臨床利用されている低分子 MRI 造影剤によって描出できなかった脳の微細血管網を高精細にイメージングするための高分子 MRI 造影剤を開発し、微細血管網を解剖学的に診断できる MRI イメージングの基礎技術の確立に挑んだ。MRI は、非侵襲に体内の構造を画像化できる手法として広く利用されており、脳梗塞や脳血管障害が疑われる場合には MR アンギオグラフィ (MRA) による血管造影の情報が非常に重要になる。MRI は高い空間分解能による形態的な情報に加え、機能的情報も診断できるツールとして知られている。しかしながら、装置的には高い空間分解能を有するものの、微小な空間から得られる MR シグナルは非常に微弱であることから MRI 画像の S/N 比は低い。このような背景から高磁場 MRI 装置の開発や、クライオプローブ、さらには撮像シーケンスの改良による高感度化が進められている。MRI 造影剤を用いる DSC 法 (Dynamic susceptibility contrast 法) もあるが、既存の MR 造影剤は血管外組織へと直ちに漏出してしまふことから脳微細血管をターゲットとした高感度プローブの設計という観点からは十分な研究が進められていなかった。

近年、ターゲットとする組織に MRI シグナルのコントラストを造影するための種々の高分子 MR 造影剤が報告されている。例えば、ガン組織へターゲティングする造影剤や pH 等の環境に反応してシグナルを変化させるミセル型造影剤がある。これらは特定の組織への集積や、シグナル増強効果でターゲットを識別できることから、新たな診断用造影剤のストラテジーとなる。

一方で MRI は、輝度情報のみならず装置的に高い空間分解能で信号を識別できる。我々は従来のターゲティングの概念とは異なり、高輝度なプローブを撮像時間内のみ血中に循環する高感度 MRI プローブを設計することで、脳内に走行する微細血管網を精密に描出でき、解剖学的な情報から微細血管の狭窄や閉塞等の異常を高精度で診断できる可能性があるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体安全性が高い事が知られているポリエチレングリコール (PEG) を主鎖として Gd 錯体を標識した高分子 MRI プローブを合成し、多分岐構造による MR シグナルの高感度化 (緩和能の向上)、高分子造影剤による一時的な血中循環性と低毒性 (血中タンパク質と相互作用しにくい分子構造)

血中からの速やかな体外排泄性を実現化させる造影剤の化学構造に関して評価した。さらに、7T-MRI を用いて正常ラット脳の MRA 撮像により、開発した造影剤による脳血管イメージング効果の in vivo 評価を实

施し、造影剤の化学構造と脳微細血管網のイメージング効果との相関について明らかとした。さらに、脳血管障害のモデルマウスとして、中大脳動脈狭窄モデルの作製法を確立し、脳血管閉塞付近で見られる微細血管網の再構築 (側副血行路の構築) の可視化を試みた。研究結果の詳細について以下に記載する。

## 3. 研究の方法

### 1) 分岐型 PEG に対する Gd キレート の結合反応

速やかな体外排泄性を実現化するための分子設計して分子量 10-20kDa の直鎖、4 分岐、8 分岐型ポリエチレングリコールを主鎖として選択し、DOTA-NHS のキレート剤を介して Gd を結合させた。さらに蛍光トレーサーとして fluorescein を末端 NH 基に対して 200 分の 1 当量で反応させた。反応後、未反応物は透析膜 (MWCO: 1kDa) で精製した。DOTA の導入率は  $^1\text{H-NMR}$ 、Gd の導入率は ICP-MS により評価した。Liner, 4-arm, 8-arm PEG に対して反応し得られた分子を F-liner PEG-Gd, F-4-arm PEG-Gd, F-8-arm PEG-Gd と略す。

### 2) 合成した分岐型 PEG の物性評価

合成した造影剤の緩和能は、300MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy (Gemini 2000/300; Varian Inc., CA) で測定した。また、動的光散乱 (DLS) により水溶液中での流体力学半径を評価した。

### 3) 造影剤の毒性評価

造影剤投与による生体毒性反応を評価するために、臨床でも広く利用されている血中炎症性マーカー (CRP) とインターロイキン (IL-1、IL-6) の血中濃度を ELISA 法により測定した。

### 4) MRI による微細血管の造影効果

微細血管網の造影効果について評価するために、SD rat (7 週齢) を用いて、尾静脈から造影剤を投与 (Gd 濃度で体重 100g あたり  $10 \mu\text{mol}$  投与) した。撮像は、7-T horizontal bore imaging system (BioSpec 70/30 USR; Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) を用いて測定し、T1 強調シーケンスにより 3D TOF-MRA を撮像した (The scan parameters for brain MRA were: repetition time (TR)/echo time (TE), 13.3/3.1 ms; number of averages, 2; matrix size,  $300 \times 300 \times 190$ ; field of view (FOV),  $2.40 \times 2.40 \times 1.52 \text{ cm}^3$ ; spatial resolution,  $80 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$ ; and scan time, 18 min 55 s.)

さらに、脳血管障害モデルマウスとして、中大脳動脈閉塞 (MCAO) モデルを採用した。頸動脈から proline 系を MCA 基部付近まで挿入して、血管閉塞を誘導した。MRI の T2 画像により MCA 近傍に閉塞があるラットを選定し、造影剤を投与して、血管閉塞部位や閉塞部位近傍に再構築された側副血行路の画像化を

試みた。

#### 4. 研究成果

##### 1) 分岐型 PEG に対する Gd キレート の結合反応

NMR、IPC-MS により DOTA や Gd の導入率を評価した結果、DOTA は末端  $\text{NH}_2$  基に対して 36-45%導入でき、Gd はほぼすべての DOTA 基に対してキレートした。DOTA の導入率を増加させることも可能であったが、導入率の増加に伴い水溶性の低下、沈殿などが確認されたため、導入率 40%程度 の分子を用いて以後の実験を進めた。

一方で、Fluorescein 基の導入については、アミノ基末端に対する反応率が低いことから、定量的な導入率の算出が難しかった。そこで合成法を改良して、8-arm PEG 1 分子に対して 1 分子の Fluorescein 基を導入したものを NMR、UV スペクトル測定により確認し、その後未修飾 8-arm PEG と混合することで fluorescein 基の導入率をコントロールした。

##### 2) 合成した造影剤の物性評価

緩和能を測定した結果、分岐数の増加に伴って緩和能は増加し、8 分岐 PEG に対して DOTA を導入した分子は、Gd-DOTA キレートの約 3 倍となる  $9.3\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  の値を示した。

DLS により流体力学半径を測定した結果、F-8-arm PEG-Gd は尾静脈投与時の濃度において 1000 nm 程度のサイズを示した。投与後の血中濃度に近い濃度域まで希釈すると、流体力学半径は 10nm 程度まで減少した。興味深いことに、Fluorescein 基を導入していない 8-arm PEG-Gd を同様の条件で測定した結果、濃度によらず 10nm 程度の流体力学半径を示した。つまり F-8-arm PEG-Gd の場合にのみ流体力学半径が増加する凝集構造へと変化できることが示された。

##### 3) 造影剤の毒性評価

Gd は生体に対して毒性を有することが知られており、Gd-キレートにすることでその毒性は低減される。つまり Gd キレートを有する造影剤の血中投与による毒性評価は、臨床への展開を考えた場合においても極めて重要な評価となる。そこで血中投与後の炎症性マーカーを ELISA により評価した。その結果、IL-1、IL-6 の血中濃度については投与後 6 時間でわずかに増加したが、投与 24 時間後には正常値まで減少していた。一方、血中 CRP を計測した結果、F-8-arm PEG-Gd を投与しても有意な増加は認められず正常値付近であった。血中に投与された造影剤は、投与後 24 時間で体外排泄されることから、24 時間以上における毒性の増加は考えにくい。以上の結果より、血中投与によりインターロイキンの濃度はわずかに増加するが、CRP で示される *in vivo* での炎症反応についてはほとんど惹起しないことが判明した。

##### 4) MRI による微細血管の造影効果

造影剤の物性評価により、F-8-arm PEG-Gd は、Fluorescein 基の有無により流体力学半径が大きく変化する。そこで、Fluorescein を含まず Gd-Chelate だけ標識された 8-arm PEG (8-arm PEG-Gd) をラットに投与して脳血管構造を撮像した。その結果、造影効果はまったくみられず、投与前後での撮像において差は認められなかった。このことから、Fluorescein 基の導入による流体力学半径の増加は、微細血管網の造影効果に重要である可能性を見出した。さらに、Fluorescein 基の導入率を  $\text{NH}_2$  基あたり 1/200 当量から 1/8 当量まで変化させて造影効果の評価した結果、Fluorescein 基の導入率増加に伴って血管造影効果が向上し、80  $\mu\text{m}$  の微細血管も造影できた。このことから、Fluorescein は造影剤の自己凝集反応を誘導して流体力学半径を増大させて、血中循環性を高めている可能性が示唆された。今後、Fluorescein 基の導入によりどのような相互作用で、どのような分子凝集構造を形成しているのか詳細を解析する予定である。

作製した MCAO モデルの T2 強調画像から、MCA とウリスリング付近が閉塞しているラットモデルを作製できていることを認めた。このモデルラットに対して F-8-arm PEG-Gd を投与した結果、閉塞した血管付近に存在する側副血行路の構築を認めた。さらに、この側副血行路により、ウリスリング付近で完全に閉塞している微細血管の末梢側で、側副路からの血流の流入により血液が供給されている可能性が示唆された。これは、脳梗塞により狭窄した血管網を生体が側副血行路により血液循環をリモデリングさせることで、組織損傷を最小にしていることを示唆するものである。今後このような脳血管障害の形成や、リモデリングの様子を 1 個体で経時的にモニターできれば、脳梗塞発生のメカニズム解明や、脳障害の超早期診断が可能となると期待できる。

以上、高分子 MRI 造影剤により血中循環時間の増加にともなう微細血管網の造影についての可能性について検討してきた。この研究から、F-8-arm PEG-Gd は、微細血管網を MRA により診断するのに極めて有用な分子であることが見出され、さらに毒性などの問題もクリアできることが示唆された。この結果は、今後の臨床応用を視野に入れた研究の展開において非常に有益な結果であると考えている。さらに、造影メカニズムについても「一時的な分子の凝集構造」が関わっていることを本研究で明らかにできた。この分子凝集メカニズムは極めてユニークであり、またこの原理が適応された造影剤は未だ報告されていないことから、この分子凝集体構造による造影剤は学術的にも新規な分子設計法であると考えている。また、脳閉塞モデルへの適応も実証できたことから、今後造影剤の分子

設計と分子構造を基にして、新規な高分子凝集体の解明のみならず、さらなる高感度化造影剤の開発や応用研究に繋がっていくと確信している。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Atsushi Mahara, Jun-ichiro Enmi, Yu-I Hsu, Naoki Kobayashi, Yoshiaki Hirano, Hidehiro Iida, and Tetsuji Yamaoka, Superfine Magnetic Resonance Imaging of the Cerebrovasculature Using Self-Assembled Branched Polyethylene Glycol-Gd Contrast Agent, *Macromolecular Bioscience*, 18(5) (2018) e1700391. 【査読有】

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1) 馬原淳、徐于懿、圓見純一郎、飯田秀博、山岡哲二、脳微細血管造影を目指した自己凝集型高分子MRI造影剤、第66回高分子討論会(愛媛大)、2017/9/21
- 2) Atsushi Mahara, Jun-ichiro Enmi, Yui Hsu, Hidehiro Iida and Tetsuji Yamaoka, MR imaging of the cerebrovasculature by self-assembled 8-arm polyethylene glycol-Gd contrast agent, 第45回日本磁気共鳴医学大会(栃木、栃木総合文化センター)、2017/9/14
- 3) Atsushi Mahara, Yu-I Hsu, Jun-ichiro Enmi, Hidehiro Iida and Tetsuji Yamaoka, Super-fine magnetic resonance imaging probe for the cerebrovasculature using self-assembled polymers, 52nd ACS Fall meeting (Washington DC), 2017/8/23
- 4) 馬原淳、徐于懿、圓見純一郎、飯田秀博、山岡哲二、Gd 標識分岐型ポリエチレングリコールによる脳微細血管イメージングの造影メカニズム、第12回分子イメージング学会総会・学術集会(横浜)、2017/5/25
- 5) Atsushi MAHARA, Hsu Yui, Jun-ichiro ENMI, Hidehiro IIDA and Tetsuji YAMAOKA, Brain microvessel imaging with polymeric MRI contrast agent, TERMIS-AM (San Diego, CA), 2016/12/13
- 6) 馬原淳、徐于懿、圓見純一郎、飯田秀博、山岡哲二、脳微細血管を可視化する高分子MRI造影剤、第65回高分子討論会(神奈川)、2016/9/15
- 7) 馬原淳、圓見純一郎、徐于懿、飯田秀博、山岡哲二、脳微細血管を可視化する高分子MRI造影剤、第45回医用高分子シンポジウム(東京)、2016/7/26
- 8) Atsushi MAHARA, Jun-ichiro ENMI, Naoki KOBAYASHI, Yoshiaki HIRANO, Hidehiro IIDA, Tetsuji YAMAOKA, Brain microvessel imaging by polymeric MRI contrast agent, 第64回高分子年次大会

(札幌)、2015/5/28

- 9) Atsushi MAHARA, Jun-ichiro ENMI, Naoki KOBAYASHI, Yoshiaki HIRANO, Hidehiro IIDA, Tetsuji YAMAOKA, Brain microvessel imaging by polymeric MRI contrast agent, 第10回日本分子イメージング学会学術集会(船堀)、2015/5/20

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 高分子化造影剤

発明者: 山岡哲二、馬原淳

権利者: 独立行政法人 国立循環器病研究センター

種類: 特許権の取得

番号: 特開 2015-40242 (P2015-40242A)

出願年月日: 2013年8月21日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬原 淳 (MAHARA Atsushi)

国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号: 80416221

(2) 研究分担者

山岡 哲二 (YAMAOKA Tetsuji)

国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号: 50243126

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし