

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16333

研究課題名(和文) 癌特異的タンパク質ナノ造影剤による病態の機能イメージング

研究課題名(英文) Medical imaging of pancreatic tumors with nanocage-based targeted contrast agent

研究代表者

河野 喬仁 (KAWANO, Takahito)

九州大学・先端医療イノベーションセンター・特任助教

研究者番号：90526831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：MRIは非侵襲・無障害な画像診断法で空間分解能に優れているが、組織・疾患特異性が無く、高感度かつ疾患特異的なMRI造影剤の開発が急務である。そこで高感度造影剤の開発を目的とし、造影剤としてsmall heat shock protein 16.5を利用した。ナノカプセルを発現・精製を行い、内部にGdを導入し、膵癌標的ペプチドiRGDをカプセル表面に提示した。MRI測定によってカプセル内の疎水性部位導入によるシグナルの増強が確認された。また膵癌マウスに投与すると、膵癌組織のイメージングに成功し、3次元MRI構築画像や病理的評価から詳細な体内分布が確認された。

研究成果の概要(英文)：Contrast agents with greater specificity and sensitivity are required for the diagnosis of pancreatic cancers by magnetic resonance imaging (MRI). 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. MRI data showed that larger nanocages had higher T1 relaxivity than smaller nanocages. Molecular MRI with protein nanocages was enabled to detect neuropilin-1-positive cells and to produce strong signal enhancement of spontaneous pancreatic tumors in engineered mouse models. Novel iRGD-modified nanocages displayed potential as a specific and sensitive MRI contrast agent for the diagnosis of pancreatic tumors for clinical translation.

研究分野：生体機能材料

キーワード：MRI 造影剤 DDS 画像診断システム

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た。中でも 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。事実、MRI の国内設置数はすでに 8000 台を越え、臨床診断装置として不可欠な役割を担っている。また超音波診断や CT で評価困難な病変の広がりや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。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。特に微小な癌部の検出は、疾患の早期発見と術中における摘出部位の確認のために重要な課題である。

2. 研究の目的

MRI 装置のハードとソフト両面における進歩は、撮像の時間分解能や画像の空間分解能など画像診断情報の質を向上させ、MRI の対象領域をますます拡大している。しかしながらその撮影原理上、MRI によって病変部位を特異的に描出することは困難であり、ほとんどの場合、単純な形態診断法として使われている。この欠点を補完し、病変部位のコントラストを増強するために使われているのが主にガドリニウム錯体である MRI 造影剤である。既に肝臓・脾臓・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。しかし現在臨床で利用されている造影剤は癌などの特定の疾患に対する特異性や感度は低く、未だ発展途上と言わざるを得ない。MRI を単なる形態診断から機能診断へと発展させるためには、病態の分子医学的情報にตอบสนองする新しい高感度機能化造影剤の開発が不可欠である。

本研究では、生体の微小環境を生体内外の環境・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機能化 MRI ナノ造影剤を開発する。この機能化造影剤のプラットフォームとして、タンパク質ナノカプセルを利用する

このバイオナノカプセルは内孔 (内径 10 nm) を有する球状構造体 (24 量体、外径 15 nm) を形成するため、その内部にガドリニウム錯体を内包することが可能である。我々はすでにこのバイオ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。興味深いことに、臨床用 MRI 造影剤であるマグネシトとほぼ同じ分子構造を有する Gd-DTPA を、このバイオナノカプセルの内孔に固定した所、その MRI シグナルはマグネシトのおよそ 20 倍に増強された。おそらくバイオナノカプセルに固定したことによって、Gd-DTPA の運動性が制限され、水分子との

相互作用が効率的に行われたことによるものと推察される。また、担癌マウスを用いた *in vivo* 評価系においても、バイオナノカプセルによって癌組織が MRI で検出可能であることを確認している。

本研究では MRI 診断の精度と感度を向上させ、単なる形態診断法とし用いるのではなく、疾患の機能診断を可能とする新しい MRI ナノ造影剤の開発を目指す。タンパク質ナノカプセルを MRI ナノ造影剤のベースとして様々な機能化し、①分子標的により組織・細胞選択性の付与、②MRI 造影剤の内包、③細胞シグナルにตอบสนองした MRI シグナルの増幅を実現する。MRI ナノ造影剤によって組織レベルまでしか検出できなかった MRI 診断の役割を、細胞から分子レベルの病変を見出す、非侵襲の機能診断へと発展させる。

3. 研究の方法

本研究では *Methanococcus jannaschii* に由来する Mj285 が自己組織化によって形成するナノ構造体に着目し、その機能化を目的とする。この構造体は内孔 (径 8 nm) を有する球状構造体 (24 量体、外径 13 nm) を構築することが知られている。X 線結晶構造解析の結果、このタンパク質の C 末端はカプセルの外表面に露出していることが明らかになっており、この領域に標的に対するアンテナ分子を組み込むことが可能である。そこで、腫瘍特異的な iRGD (cyclic (CRGDKGPDC)) ペプチドをこのカプセル表面に提示することを試みた。この iRGD ペプチドは腫瘍の Neuropilin-1 に作用し浸透増強効果をもたらす、次世代の分子標的リガンドとして注目を集めている。

また MRI 造影剤のためのキャリアとして利用するため、ここにガドリニウム錯体を疎水性内孔に内包させた。X 線結晶構造解析の結果、Mj285 の Gly41 がこの内孔に位置することが分かっている。そこで、Dpn1 法により、この Gly41 を Cys に変異させ、ここにマレイミド化 DTPA-Gd 錯体を固定化した。タンパク質に結合したガドリニウム錯体の運動性を抑制するため、タンパク質ナノカプセルの疎水性領域である N 末端ヘリックスを連続的に付加したカプセルを設計した (図 1)。

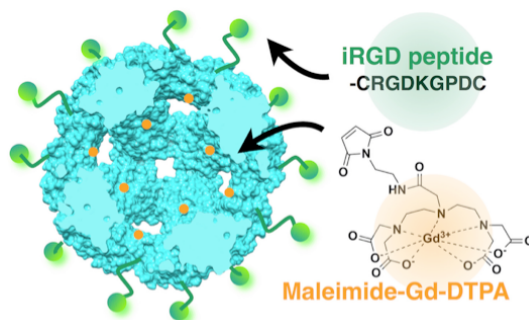


図 1 バイオナノカプセルの分子設計

pET21a に挿入した。DNA シークエンシングで遺伝子配列を確認した後、組み換えベクターを大腸菌株 BL21gold(DE3)へ形質転換した。この菌株を 100 mg/mL のアンピシリンを含む 2× YT 培地に接種し、37°C で振とう培養した。OD600 値が 0.6 に達した際に、終濃度 1mM の IPTG を加えて組み換えタンパクの発現を誘導し、そのまま 4 時間培養を続けた。培養終了後、培地を遠心分離し、得られたペレットを十分に懸濁させた。これをソニケーション(200 W, 45 s)し、4°C で遠心分離(20,000 g, 20 min)した後、不溶性分画を除去した。組み換えタンパク質の精製は HiLoad 26/10 Q Sepharose HPTM アニオン交換カラムでイオン交換クロマトグラフィーを行った。各フラクションを SDS-PAGE で分析した。目的のタンパク質を含むフラクションは、TSKgel G3000SW カラムを用いてゲル濾過精製した。得られたタンパク質は MALDI-TOF 質量分析計によって確認した。動的光散乱法 (DLS) と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察によって、ナノスケールの球状構造体を形成していることを確認した。In vitro における腫瘍特異性の評価については、蛍光ラベル化したナノカプセルとヒト腫瘍由来細胞株 AsPC-1、Suit-2 を用い、共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメーターを用いたナノカプセル細胞導入試験によって定量的に評価した。得られた腫瘍特異的な造影剤の緩和度は、9.4T 高磁場 MRI および 1.5T Open 型 MRI 装置により評価した。

作製したナノカプセルに Gd-DTPA を内部に結合させ、腫瘍を発生させたマウスに投与した。対照群として一般的な造影剤である Gd-DTPA を同等量を投与した。投与前、投与後 1、3、6 時間後に腹部断面 MRI を撮影した。撮影した画像ファイルを再構築し、3 次元画像を得た。最後に腫瘍を摘出し、H/E 染色やマッソントリクローム染色を行い、病理学的評価を行った。

4. 研究成果

今回作製した 4 種類のタンパク質ナノカプセル (1-Nanocage, 2-Nanocage, 3-Nanocage, 4-Nanocage) の粒径と TEM 画像を図 2 に示した。DLS により粒径測定を行うと、平均粒径はそれぞれ 16.5 nm、20.0 nm、30.1 nm、37.1 nm であり、N 末端疎水性領域を付加させることによって、連続的に粒径が増大することが分かり、また単分散なナノカプセルであった。TEM 画像より、どのナノカプセルも単一の構造を形成していることが観察され、カプセル表面に iRGD ペプチドを提示させても構造を保っていた。

次に 1.5 T オープン型 MRI を用いてタンパク質ナノカプセル緩和能の測定を行った。造影剤 Gd-DTPA はカプセル内側のシステインに結合させ、ICP-MS により結合させた Gd 濃度を求めた。緩和能を測定したところ、ナノカプセル 1-Nanocage, 2-Nanocage, 3-Nanocage,

4-Nanocage はそれぞれ $14.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $16.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $34.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $46.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、サイズが増大するにつれ、緩和能の向上が見られた。特に 4-Nanocage はおよそ 40 nm のサイズで、通常の造影剤 Gd-DTPA の 10 倍以上の造影効果を示した。これはタンパク質ナノカプセルのサイズや分子量、疎水性アミノ酸を導入したことによるナノカプセルの高分子効果や剛直性の増大によるガドリニウムと水分子の回転相関時間の短縮によるものと考えられる。

次に蛍光色素 Alexa488 でラベル化したナノカプセルを腫瘍細胞 AsPC-1, Suit-2 細胞と乳癌細胞 HeLa 細胞に添加し、24 時間後の取り込みをフローサイトメトリーにより評価した。ナノカプセル表面には腫瘍細胞をターゲティングする iRGD ペプチドを提示しているため、AsPC-1, Suit-2 には取り込みが認められ、HeLa 細胞には取り込みは見られなかった。表面の iRGD ペプチドが細胞表面の Neuropilin-1 を認識していることが分かった。

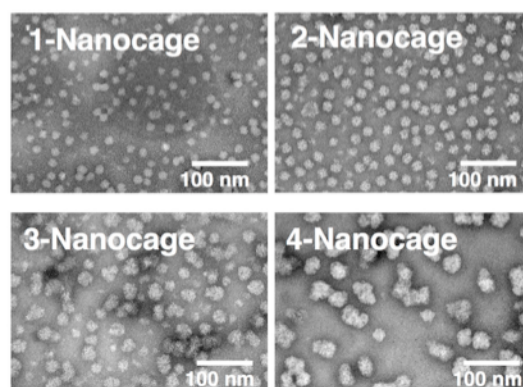


図 2 ナノカプセルの TEM 画像

最後に腫瘍を発生したマウスに対して、ナノカプセルを投与し、1, 3, 6 時間後の MRI 画像を取得した。対照群として Gd-DTPA を投与した。図 3 から、Gd-DTPA 群は腫瘍部位では変化は見られなかったが、ナノカプセル群は、時間が経つにつれ MRI のシグナル強度が上昇し、腫瘍部位を検出できた。さらに得られた MRI 画像を 3 次元構築し、詳細なナノカプセルの分布を追った (図 4)。まず、ナノカプセルは投与後 1-3 時間後では癌周辺部位に蓄積し、その 3-6 時間後、腫瘍内部に取り込まれていたことが分かった。病理学的評価を見ると、血管周辺の多くのナノカプセルが蓄積し、少なからず間質部位にもナノカプセルが蓄積していたことがわかった。推測ではあるが、まずナノカプセルは Neuropilin-1 が多く発現している腫瘍組織の血管付近に集積し、その後組織内部に取り込まれ、間質部分に侵入したと考えられる。

バイオナノカプセルは細胞毒性が低く、申請者はこれまでにナノカプセル表面に肝特

異的 PreS1 ペプチドや高転移性癌特異的 CTT ペプチドなどを提示し、MRI や近赤外イメージングにより病変部位の検出を行ってきた。このナノ造影剤を用いることによって、超早期画像診断の実現や、これまで組織レベルまで拡大進行した病変しか検出できなかった画像診断を、細胞から分子レベルの病変で見いだすことが可能となるであろう。体内のあらゆる臓器・組織に適用できる「イメージングによる病理診断技術」としての実用化が期待され、患者の重症化を回避しうる非侵襲の機能診断へと、MRI 画像診断の役割を飛躍的に発展させる可能性を秘めている。今後、癌の性質を見極める高度な診断や、治療前の効果の予測や治療後の迅速効果判定にも応用できる新しい医療の形成が期待できることが考えられる。

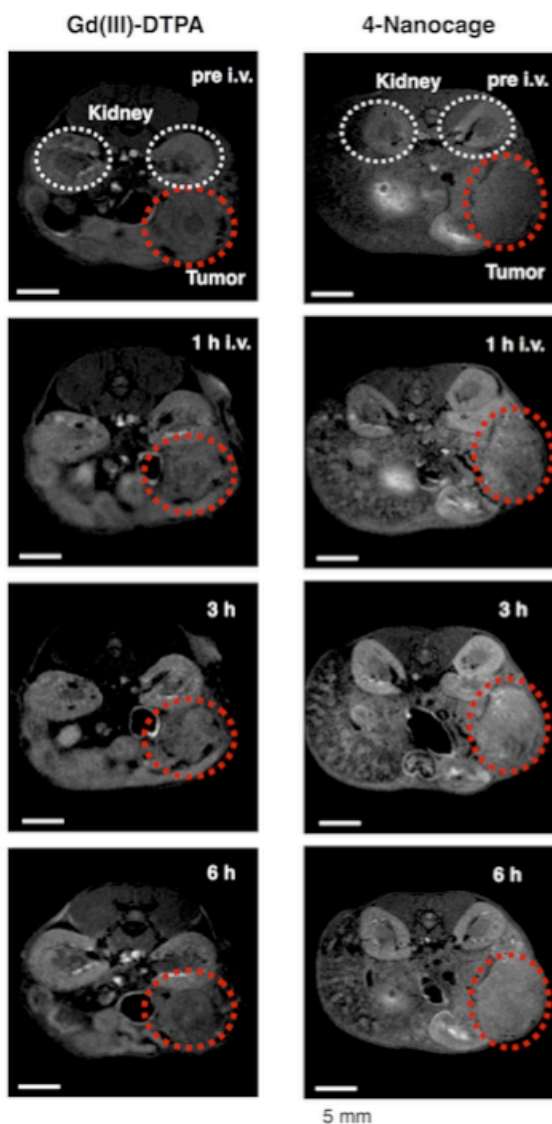


図3 膵癌マウスのMRI腹部断面画像(左図:GD-DTPA、右図:ナノカプセル、赤点線:膵癌組織、白点線:腎臓)

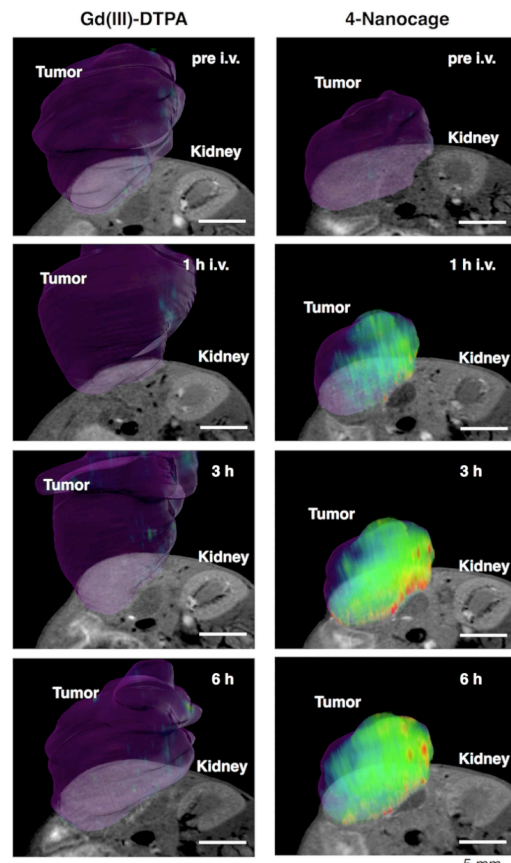


図4 膵癌の三次元MRI画像(左図:GD-DTPA、右図:ナノカプセル)

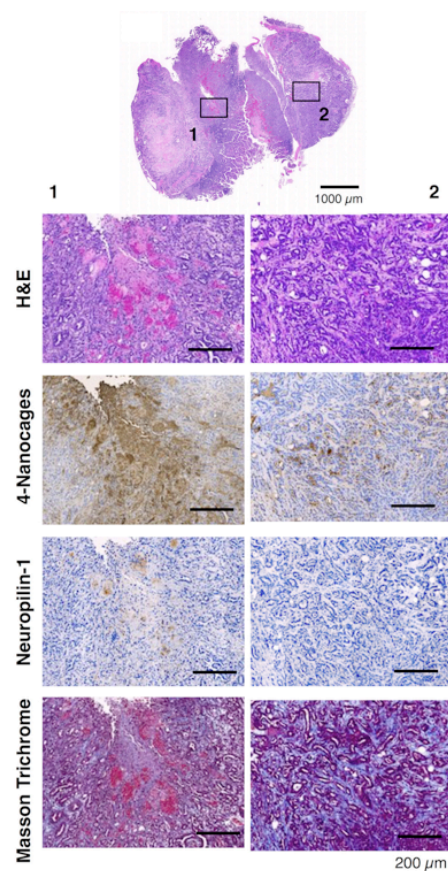


図5 ナノカプセル投与後の膵癌病理的評価

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 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)

doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.10.029

2. Hikari Sato, Elnaz Nakhaei, Takahito Kawano, Masaharu Murata, Akihiro Kishimura, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, “Ligand-Mediated Coating of Liposomes with Human Serum Albumin” *Langmuir*, **34**, 2324-2331 (2018)

doi: 10.1021/acs.langmuir.7b04024

3. Ryosuke Nakata, Fuminori Hyodo, Masaharu Murata, Hinako Eto, Tomoko Nakaji, Takahito Kawano, Sayoko Narahara, Keiji Yasukawa, Tomohiko Akahoshi, Morimasa Tomikawa, Makoto Hashizume, “In vivo redox metabolic imaging of mitochondria assesses disease progression in non-alcoholic steatohepatitis” *Scientific Reports*, **7**, 17170 (2017)

doi: 10.1038/s41598-017-17447-2

4. 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 (2017)

doi: 10.1293/tox.2017-0038

[学会発表] (計 1 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, “Protein NanoCages Conjugated Magnetic Resonance Contrast Agents with High Relaxivity Properties” Biomaterials International 2018(国際学会), 2017年

[その他]

• <http://www.cmeit.org>

• <http://camiku.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 喬仁 (TAKAHITO KAWANO)

九州大学先端融合イノベーションセンター
一・特任助教

研究者番号:90526831