

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18680040

研究課題名（和文） 癌特異的 MRI 造影剤の創製と集学的治療への展開

研究課題名（英文） Molecular design of protein-based nanocapsules for
MRI contrast agent

研究代表者

村田 正治（MURATA MASA HARU）

九州大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：30304744

研究成果の概要：

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、疾患シグナルに応答する造影剤の開発を目指す。これを可能にするには、疾患シグナルがスイッチとなり、その物性を大きく変化させる材料が必要である。本研究では古細菌が作る small heat shock protein (Mj285) に着目した。このタンパク質は自己組織化により 24 量体となり、直径約 12nm の球状構造体を構成する。われわれはこのタンパク質を天然のナノカプセルとして捉え、これを遺伝子工学的に改変することで、二重刺激応答的に崩壊するタンパク質ナノカプセルを構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2007年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	21,200,000	6,360,000	27,560,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：インテリジェント材料、MRI、機能化造影剤、癌

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 (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や骨などのアーチファクトが少なく、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。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。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 MRI 造影剤の開発を目指す。

2. 研究の目的

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。基礎研究においては、MRI シグナルに寄与するガドリニウム錯体を病変部位に特異的なアンテナ分子 (抗体など) と複合化させる方法などが報告されているが、現時点で十分な成果は得られていない。

一方、申請者らはこれら従来方法とは異なる新しいターゲティング概念を提示している。

この独自の細胞選択性の概念 (D-RECS: Drug Delivery Responding to Cellular Signal) は、標的細胞のみに送達するのではなく、どの細胞にも送達しておき、疾患細胞に特異的に亢進している細胞シグナルに応答して、輸送した薬剤あるいは遺伝子を活性化させるものである。本申請研究では、この概念を基に、さらに分子生物学的手法を駆使することによって、タンパク質ナノ粒子を用いた新しい MRI 造影剤を開発する。

3. 研究の方法、及び 4. 研究成果

3.1 組み換え Hsp16.5 の遺伝子クローニングと発現・精製

古細菌 *Methanococcus jannaschii* ゲノム遺伝子をテンプレートとした PCR で small heat shock protein (Hsp16.5) 遺伝子を増幅し、発現ベクター pET21 に組み込んだ。さらにこのプラスミド pET21a-G41C-hsp16.5 を大腸菌株 BL21 (DE3) へ形質転換した。

pET21a-G41C-HSP/BL21 (DE3) のフローゼンストックから白金耳で大腸菌を掻き取り、これを 100mg/ml のアンピシリンを含む PG 培地 10ml に加え、37°C で一晚静置培養した。静置培養した菌液 4ml を、100mg/ml のアンピシリンを含む LB 培地 400ml が入ったバツフル付き三角フラスコに添加し、37°C にて振とう培養した。OD₆₀₀ が 0.6~0.7 となったところで、IPTG を終濃度 1.0mM となるように添加し、発現誘導を行った。この菌液を 37°C で 4 時間振とう培養し、発現誘導前および誘導後 2、4 時間の菌液を 1ml サンプルングした。培養後、200ml 遠心管 2 本に移し、3,000g にて 10 分間遠心した。遠心後、上澄みを除去し、イオン交換クロマトグラフィー平衡化 buffer 10ml で懸濁し、-80°C で保存した。以上の操作を三回繰り返して 1.2 L 培地分の菌体を得た。

まずサンプルングした菌液を用いて発現の

確認を行った。発現誘導 4 時間後のサンプルを融解し、リゾチームを少量添加したイオン交換クロマトグラフィー平衡化 buffer(50mM NaH_2PO_4 (pH7.0), 2mM Dithiothreitol, 1mM EDTA)を 75ml 加え、氷浴上で 20 分放置した。リゾチーム処理したサンプル溶液を常時氷冷しながら超音波処理(10 秒×5 回、Amp40%)を行い、15,000rpm で 15 分遠心分離し、上澄みを回収した(可溶性タンパク質成分)。残った沈殿に対しては、イオン交換クロマトグラフィー平衡化 buffer を 75ml 加え、懸濁した(不溶性タンパク質成分)。これらの溶液に対し、NuPAGE® LDS Sample Buffer(Invitrogen)を 1/4 量加え、95°C で 5min 加熱した。加熱後、以上のサンプルを OD_{600} の値が一定となるように NuPAGE™12%Bis-Tris Gel のスロットにアプライし、ゲル電気泳動を行った。結果を図 2-6 に示す。この結果から、発現誘導前に見られなかった分子量 16.5kDa のバンドが発現誘導後に確認され、十分な量のタンパク質が可溶性タンパク質として得られたことが確認された。

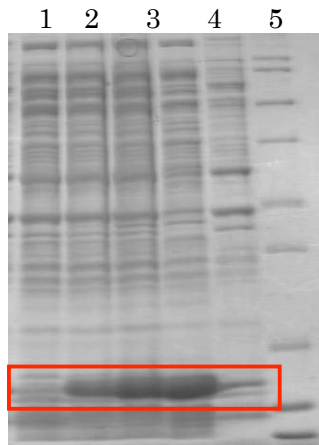


図 1 SDS-PAGE による組み換え hsp16.5 の発現の確認 lane1: 発現誘導前, lane2~3: 発現誘導後 2, 4 時間後のタンパク質成分, lane4: 発現誘導後 4 時間後の可溶性成分, lane5: 発現誘導後 4 時間後の不溶性成分, lane6: 分子量マーカー

3.2 ナノカプセルのキャラクタリゼーション

wild type HSP16.5(WT-hsp16.5)は結晶構造解析から、外径は 12nm であることが知られている。今回発現したナノカプセル G41C-hsp16.5 が目的の粒子構造を取っているかを確認するため、動的光散乱法(Dynamic Light Scattering, DLS)による粒径測定を行った。まず 1.0 mg/ml に調製した G41C-hsp16.5 溶液を、0.22mm スピンフィルターに通し、この溶液を Zetasizer Nano (model : zen3600) にて DLS 測定した(図 2)。これより平均粒径 12.3nm、多分散度 PDI=0.026 の単分散なピークが得られた。この値は、G41C-hsp16.5 を透過型電子顕微鏡 (TEM) で撮影した結果(図 3)と一致した。これらの結果、G41C-hsp16.5 は、wild type HSP16.5(WT-hsp16.5)と同様な立体構造を維持していることが示唆された。

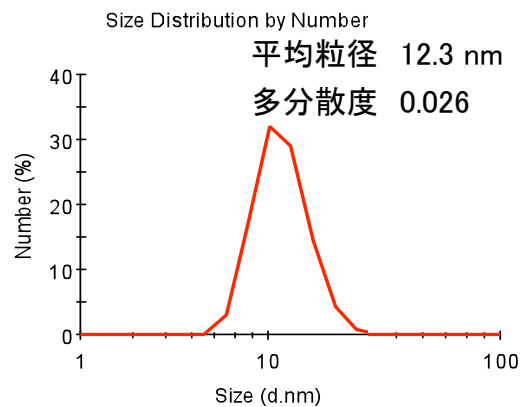


図 2 DLS 測定によるナノカプセルの粒径測定

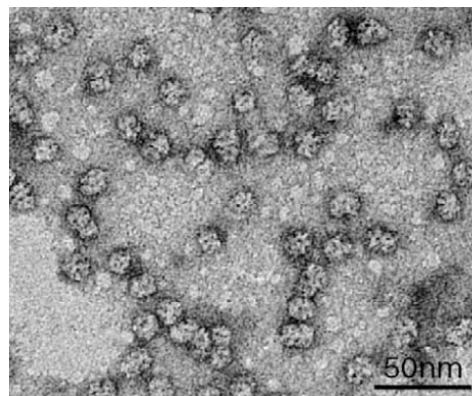


図 3 ナノカプセルの TEM 画像

3.3 マレイミド化DTPAの合成とカプセルへの内包

p-NH₂-Bz-DTPA 30.9 mg (48 μmol)、Sulfo-EMCS 16.5 mg (40 μmol) をそれぞれ、100mM HEPES Buffer (pH 8.5) 0.25 ml に溶解し、室温で20時間攪拌した。反応追跡はTLC (ODS, メタノール/水 = 1/1) で行った。反応溶液を、ODS カラムを用いた HPLC により精製しマレイミド化 DTPA を得た (図 4)。

次に、反応溶液を 1M HCl にて pH を 5 付近に調製した後、1M GdCl₃ 溶液 48 μl (48 μmol) を加え、室温で 20 時間攪拌して錯化させた。

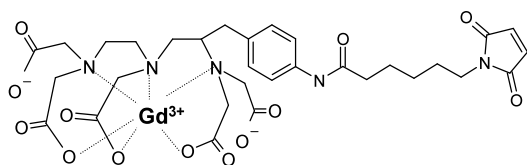


図 4 マレイミド化 DTPA の分子構造

G41C-hsp16.5 (10 mg, 0.6 μmol) を 500mM HEPES Buffer (pH 7.5) 3.0 ml に溶解し、41Cys-HSP 1mol に対して 10 当量の Gd-DTPA-maleimide 反応溶液 (75 μl, 6.0 μmol) を加えて 4°C で 20 時間ゆっくり攪拌して反応させた。Gd-DTPA の結合は SDS-PAGE により確認した。

3.4 Gd 内包ナノカプセルの MRI 造影能評価

Gd 内包ナノカプセルの MRI 造影能を評価するために Gd-DTPA (SIGMA) と比較して T1 緩和度 (relaxivity) を測定した (図 5)。T1 緩和度の測定は、系列希釈した各サンプルを Open 型 MRI AIRIS (HITACHI 0.3T) で Inversion recovery 法により行った。その結果、HSP-Gd-DTPA は Gd-DTPA よりも 46.5 倍高い T1 緩和度をもつことがわかった。

また、T1 強調 Spin Echo 法により MRI 測定を行い、T1 強調画像のコントラストを比較したところ、HSP-Gd-DTPA は Gd-DTPA と比較し

て 10 倍高い MR シグナルが検出された。(図 6) これらの結果より、HSP-Gd-DTPA はより高感度な MRI 造影を可能にする造影剤であることが示唆された。

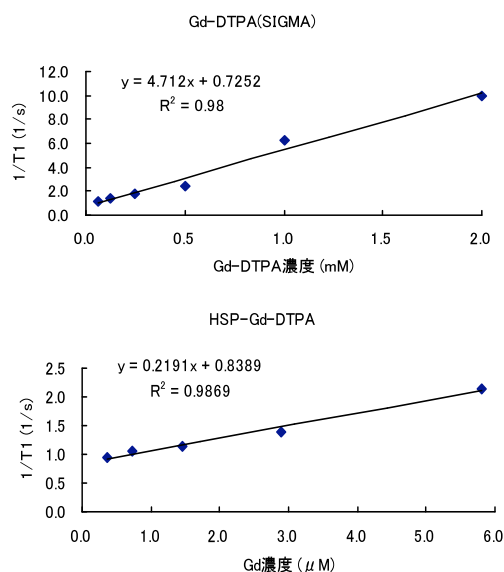


図 5 T1 緩和度の測定

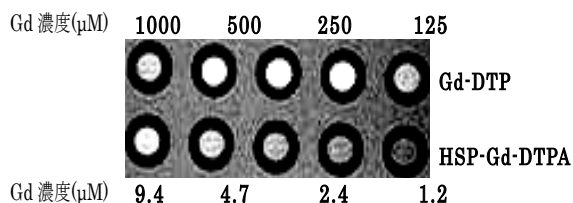


図 6 ナノカプセルの MRI 画像 (T1 強調 SE)

3.5 ナノカプセルの体内動態

ICR マウス (メス 6 週齢) にネブタール 20 μL 投与した後、尾静脈より HSP-Gd-DTPA 200 μl (0.8 μg-Gd 換算量) および Gd-DTPA 200 μl (3.2 μg-Gd 換算量 SIGMA) をそれぞれ投与して、60 分後に麻酔を 20 μL 追加投与した後、尿、血液 200 μL を採取した。続いて、肝臓に切り込みを入れ、心臓の左心室から右心房まで注射針を刺し、ヘパリン含有超純水 100 ml で灌流後、脾臓、腎臓、肺、肝臓を採取した。

小ガラスサンプル管に入れた各組織に濃硝酸 1ml を加えた。1 時間後、過酸化水素水 333

μL を加えて一晩放置した。ドラフト内においてスターラーで加熱しながら濃縮して乾燥させた後、0.1%希硝酸に溶解させて遠心または、フィルターを通して1mLの溶液に調製した。調製した溶液を100ppb以内になるように数倍から数十倍に希釈して、各組織抽出液に含まれるGdをICP-MSによって定量した。また、マウス血液量は、全量を2.0 mLとして換算している。(図7)その結果、Gd-DTPAは投与60分後に速やかに体外排出されているが、HSP-Gd-DTPAは肝臓に集積することがわかった。

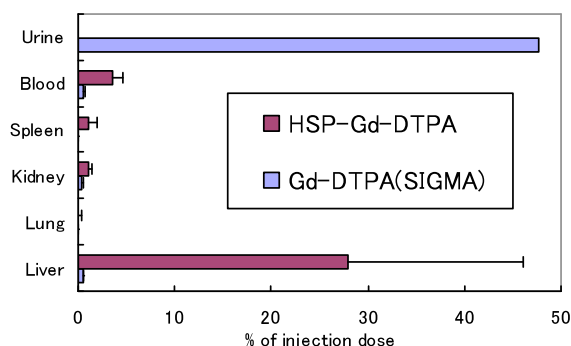


図6 ナノカプセルの体内動態

3.6 ナノカプセル崩壊による影響

HSP-Gd-DTPAにProteinase Kを添加して37°Cで2時間放置した。ナノカプセルの崩壊はSDS-PAGEにより確認した。崩壊させた時のMRシグナル変化をMRI(T1強調SE法)で測定した(図7)。

その結果、崩壊によりMRシグナル強度が36%減少した。また、崩壊前でも高いMRシグナルが検出されていることから、ナノカプセル内部の環境は比較的疎水性は高いが、Gd-DTPAへの水分子の配位を十分に制限できていない可能性が考えられる。また、Gd-DTPAは高分子鎖に導入することでT1緩和度が上昇することが報告されていることから、崩壊により低分子化したことでT1緩和度が減少したことも示唆された。

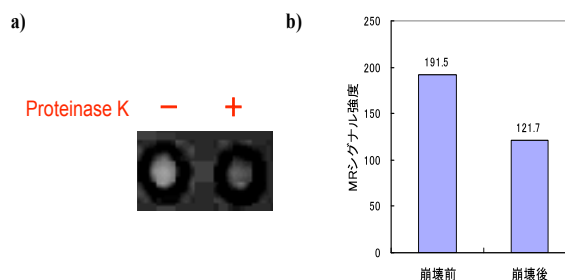


図7 ナノカプセル崩壊によるMRIシグナル変化

3.7 まとめ

Gd-DTPAをタンパク質ナノカプセルに封入したことで、高いT1緩和度をもつナノカプセル型造影剤(G41C-HSP16.5)を開発した。また、マウスを用いた体内分布の評価では、最大でHSP-Gd-DTPAの約50%が肝臓に集積していることが示された。これは、肝細網内皮系のKupffer細胞により貪食された結果であると考えられる。今後、HSP-Gd-DTPAを用いたMRイメージングにおいて、肝組織の機能評価が期待できるかもしれない。

またPEG修飾したナノカプセル型造影剤(PEG化G41C-HSP16.5)の体内分布では、ナノカプセルの血中滞留性の向上が示されたことから、今後の臨床において血管造影剤としての応用が可能である。腫瘍モデルマウスを用いた蛍光イメージングでは、PEG修飾したナノカプセルの血中滞留性が向上した結果、がん組織への集積がみられ、MRIによる高感度ながん組織検出の可能性も示唆された。

本報告には記載していないが、本ナノカプセルにプロテアーゼ応答配列を組み込んだ、プロテアーゼ応答型ナノカプセルの構築にも成功している。今後は、がん組織において異常亢進しているMMP等に応答して崩壊するMRI分子イメージングの実現を目指す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- Jun Oishi, Kenji Kawamura, Jeong-Hun Kang, Kota Kodama, Tatsuhiko Sonoda, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, "An intracellular kinase signal-responsible gene carrier for disordered cell-specific gene therapy", *J. Control. Release*, **110**, 431-436, 2006
- Aishan Han, Tatsuhiko Sonoda, Jeong-Hun Kang, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, "Development of a fluorescence peptide chip for the detection of caspase activity", *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 9(1), 21-25(2006).
- Kentaro Sao, Masaharu Murata, Kaori Umezaki, Yuri Fujisaki, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Makoto Hashizume, "Molecular design of protein-based nanocapsules for stimulus-responsive characteristics", *Bioorganic Medical Chemistry*, **17**, 85-95(2009).
- Kentaro Sao, Masaharu Murata, Kaori Umezaki, Yuri Fujisaki, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Makoto Hashizume, "A novel protease activity assay using a protease-responsive chaperon protein", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **383**, 293-297(2009).
- Ryuhei Nishiyabu, Nozomi Hashimoto, Ten Cho, Kazuto Watanabe, Takefumi Yasunaga, Ayataka Endo, Kenji Kaneko, Takuro Niidome, Masaharu Murata, Chihaya Adachi, Yoshiki Katayama, Makoto Hashizume, and Nobuo Kimizuka, "Nanoparticles of Adaptive

Supramolecular Networks Self-Assembled from Nucleotides and Lanthanide Ions", *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 2151-2158(2009).

- Koji NAKANO, Hideshi MATSUNAGA, Masaharu MURATA, Nobuaki SOH, and Toshihiko IMATO, "Synthesis Of Circular Double-Stranded DNA Having Single-Stranded Recognition Sequence As Molecular-Physical Probe For Nucleic Acid Hybridization Detection Based On Atomic Force Microscopy Imaging", *Analytical Sciences*, **19**, 1569-1573(2009).

[総説] (計3件)

- 村田正治, 片山佳樹, 橋爪 誠, "電気化学バイオセンサによる蛋白質機能解析", *臨床検査*, **50**, 1477-1486(2006)
- 村田正治, 橋爪 誠, "マイクロ技術と先端医療", *電気学会*, **128(10)**, 369-372(2008)
- 村田正治, 橋爪 誠, "プロテインチップ", *臨床検査*, **52(11)**, 1159-1164(2008)

[学会発表] (計5件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

出願準備中

[その他]

ホームページ

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/camit/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 正治 (MURATA MASAHARU)

九州大学・大学院医学研究院・特任准教授

研究者番号：30304744