

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12079

研究課題名(和文) 癌微小環境を可視化する高感度MRIナノ造影剤の開発

研究課題名(英文) Nano-sized MRI contrast agents for ultra-sensitive imaging of tumor microenvironment

研究代表者

河野 喬仁 (Kawano, Takahito)

九州大学・先端医療オープンイノベーションセンター・特任講師

研究者番号：90526831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：MRI(Magnetic Resonance Imaging)は空間分解能と非侵襲という利点を持つ反面、疾患部位の検出感度が不利な点を有する。本研究ではMRI診断の精度と感度を向上させ、患部の微小環境を可視化し、病態の機能診断を可能とする新しい機能性MRIナノ造影剤の開発を目指した。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、腫瘍選択性をもつiRGDペプチドをナノカプセル表面に組み込み、ガドリニウム分子を内部に内包させ、このナノカプセルを尾静脈投与すると担癌マウスの癌組織をMRIにより検出可能であることを確認した。またこのナノカプセルには細胞毒性がほぼないことも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノカプセルは細胞毒性が低く、その体内動態は特に指向性もなく1時間程度で腎排出されることが分かっているが、今回、分子イメージング技術を用いてカプセル表面に腫瘍特異性iRGDペプチドを提示することで、MRIにより病変部位の検出が可能となった。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MRIの機能診断への可能性を秘めていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：MRI (Magnetic Resonance Imaging) has the advantage of spatial resolution and non-invasiveness, but it has the disadvantage of sensitivity in detecting disease sites. In this study, we investigated to develop a new functional MRI nano-contrast agent that can improve the accuracy and sensitivity of MRI diagnosis, visualize the microenvironment of the tumor, and enable functional diagnosis of pathological conditions. Protein nanocapsules were used as the base of the MRI nanocontrast agent, and tumor-selective iRGD peptides were incorporated into the surface of the nanocapsules and gadolinium molecules were encapsulated inside. When the nanocapsules were administered to tumor-bearing mice, it was confirmed that the tumor could be detected using MRI. We also confirmed that the nanocapsules were almost free of cytotoxicity.

研究分野：生体機能材料

キーワード：MRI 造影剤 タンパク質 癌 ナノ材料 画像診断

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。しかし MRI には、病変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。特に微少な癌部の検出は、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応答する新しい機能化造影剤の開発が不可欠である。

そこで本研究では、生体の機能を生体内外の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ビス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 シグナルはマグネビストのおよそ 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て用いるのではなく、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、分子標的により組織・細胞選択性の付与、

MRI 造影剤の内包、細胞シグナルに応答した 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、その機能化を目的にする。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、膵癌特異的な 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。



図1 バイオナノカプセルの分子設計

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、DpnI 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)。

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。

本研究では、ヒト癌由来細胞株 AsPC-1、HeLa を用いてナノカプセルの細胞毒性を評価した。また、作製したナノカプセルに Gd-DTPA を内部に結合させ、膵癌を移植したマウスに投与し、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 MRI を撮影した。

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) および Maleimide-mono-amide-DTPA (DTPA-mal; Macrocyclics, Inc., Dallas, TX, USA) を内部に結合させナノカプセルを MALDI-ToF 質量分析計によって測定した。目的のナノカプセルのサブユニットタンパク質がそれぞれ得られている事がわかり、Gd-DTPA が結合していることも確認された(図 2)。

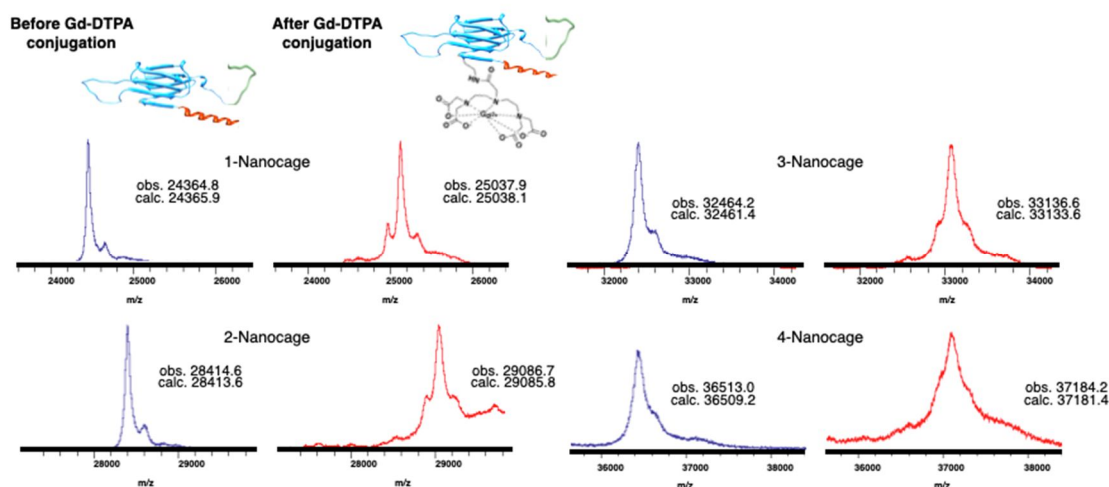


図 2 バイオナノカプセルの MS スペクトル

次に作製したナノカプセルの細胞毒性を評価した。AsPC-1 および HeLa 細胞を初期密度 10,000 細胞/ウェルで 96 ウェルプレートに播種し、37 °C で一晩培養した。ナノカプセルを添加し、24 時間後、CellTiter-Glo 発光細胞生存率アッセイキット (Promega, Madison, WI, USA) を用いて細胞生存率を測定した(図 3)。いずれのナノカプセルも優位な細胞毒性を示していなかった。

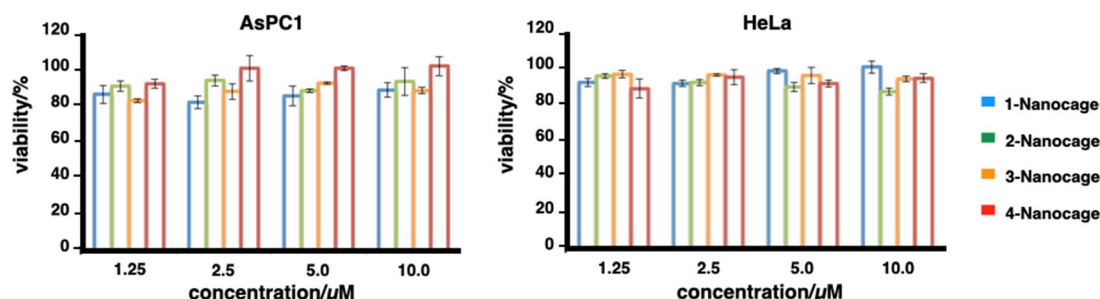


図 3 バイオナノカプセルの細胞毒性評価

Balb/c ノードマウス (KBT Oriental, Ltd., Saga, Japan) に、Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) に懸濁した 2×10^6 AsPC-1 細胞を皮下接種し、AsPC-1 腫瘍モデルを作製した。9.4T Biospec MRI スキャナー (Bruker) を用いて、Gd を基準に $10 \mu\text{mol}/\text{kg}^{-1}$ の用量でタンパク質ナノカプセルを静脈投与し、MR 撮影を行った (図 4)。また対照として、Gd-DTPA を同じ用量でがんの MRI に使用した。T1 強調 MRI のパラメータは、高速スピンエコーシーケンス、繰り返し時間 (TR) = 1200ms、エコー時間 (TE) = 8.5ms、マトリックスサイズ = 256×256 、スライス厚 = 1.0mm、スライス間距離 = 1.0mm、スライス数 = 15、視野 = $40 \times 40\text{mm}^2$ 、励起回数 = 2、スキャン時間 = 3.8 min とした。すべての動物飼育および実験手順は、九州大学動物実験倫理委員会の承認を得て、九州大学動物実験ガイドラインに沿って実施した。T1 強調 MRI では、ナノカプセルを投与した 6 時間後に腫瘍の造影効果が得られ、腫瘍対正常 (T/N) のコントラスト比は 150% となり、臨床的に承認されている造影剤である Gd-DTPA を同量投与した場合の造影効果よりも高くなった ($P < 0.001$)。

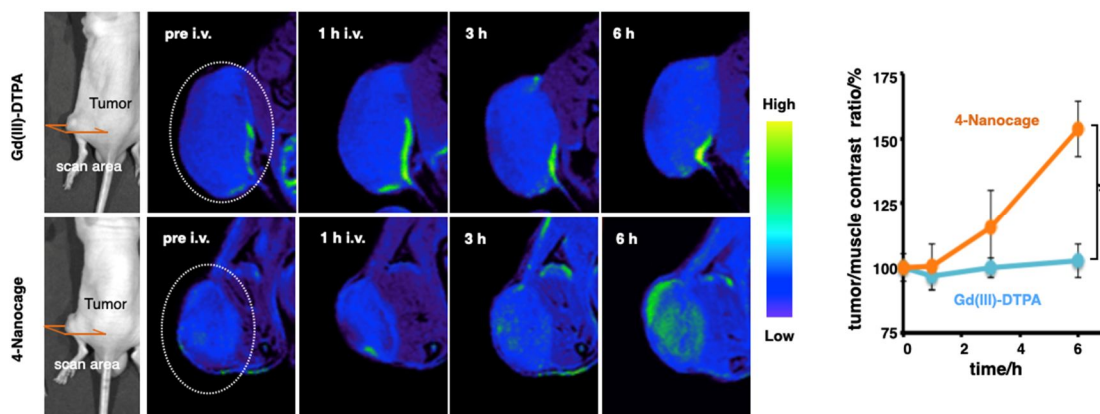


図 4 腫瘍移植マウスの MRI 像

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。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。これにより、悪性度の高い癌組織を、高い解像度で得られ、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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asai Daisuke, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Nakashima Hideki, Toita Riki, Kang Jeong-Hun	4. 巻 69
2. 論文標題 Effect of Fetal Bovine Serum Concentration on Lysophosphatidylcholine-mediated Proliferation and Apoptosis of Human Aortic Smooth Muscle Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 255 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess19268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kang Jeong-Hun, Toita Riki, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Asai Daisuke	4. 巻 52
2. 論文標題 Design of substrates and inhibitors of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) based on its phosphorylation reaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 863 ~ 870
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-020-02864-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Guo Jie, Akahoshi Tomohiko, Mizuta Yukie, Murata Masaharu, Narahara Sayoko, Kawano Takahito, Nagao Yoshihiro, Zhang Shuo, Tomikawa Morimasa, Kawanaka Hirofumi, Hashizume Makoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Histidine rich Glycoprotein alleviate Ischemia/Reperfusion Liver Injury in Mice with Nonalcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Liver Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lt.25960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuta Yukie, Akahoshi Tomohiko, Guo Jie, Zhang Shuo, Narahara Sayoko, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Tokuda Kentaro, Eto Masatoshi, Hashizume Makoto, Yamaura Ken	4. 巻 11
2. 論文標題 Exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate histone-induced acute lung injury by activating the PI3K/Akt pathway in endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-020-02015-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuta Yukie, Tokuda Kentaro, Guo Jie, Zhang Shuo, Narahara Sayoko, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Yamaura Ken, Hoka Sumio, Hashizume Makoto, Akahoshi Tomohiko	4. 巻 257
2. 論文標題 Sodium thiosulfate prevents doxorubicin-induced DNA damage and apoptosis in cardiomyocytes in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118074 ~ 118074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.118074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asai Daisuke, Murata Masaharu, Toita Riki, Kawano Takahito, Nakashima Hideki, Kang Jeong-Hun	4. 巻 51
2. 論文標題 A high-affinity peptide substrate for G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 973 ~ 976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-019-02735-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toita Riki, Asai Daisuke, Otani Kentaro, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Kang Jeong Hun	4. 巻 54
2. 論文標題 Suppression of Lysophosphatidylcholine Induced Human Aortic Smooth Muscle Cell Calcification by Protein Kinase A Inhibition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 465 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawano Takahito, Murata Masaharu, Kang Jeong-Hun, Piao Jing Shu, Narahara Sayoko, Hyodo Fuminori, Hamano Nobuhito, Guo Jie, Oguri Susumu, Ohuchida Kenoki, Hashizume Makoto	4. 巻 152
2. 論文標題 Ultrasensitive MRI detection of spontaneous pancreatic tumors with nanocage-based targeted contrast agent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 37 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2017.10.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Asai Daisuke, Murata Masaharu, Toita Riki, Kawano Takahito, Nakashima Hideki, Kang Jeong-Hun	4. 巻 -
2. 論文標題 A high-affinity peptide substrate for G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-019-02735-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Toita Riki, Otani Kentaro, Kawano Takahito, Fujita Satoshi, Murata Masaharu, Kang Jeong-Hun	4. 巻 209
2. 論文標題 Protein kinase A (PKA) inhibition reduces human aortic smooth muscle cell calcification stimulated by inflammatory response and inorganic phosphate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 466 ~ 471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2018.08.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Hikari, Nakhaei Elnaz, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Kishimura Akihiro, Mori Takeshi, Katayama Yoshiki	4. 巻 34
2. 論文標題 Ligand-Mediated Coating of Liposomes with Human Serum Albumin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 2324 ~ 2331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.7b04024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河野 喬仁・檜原 佐由子・大内田 研宙・赤星朋比古・村田 正治
2. 発表標題 タンパク質ナノカプセルを用いた高感度MRIプローブの開発
3. 学会等名 第25回癌治療増感研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本生体医工学会、平田 雅之、齋藤 充弘、紀ノ岡 正博、和田 成生、伊井 仁志、大谷 智仁、武石 直樹、橋爪 誠、大城 理、岡山 慶太、坂田 泰史、河野 喬仁、村田 正治、佐久間 一郎、篠原 一彦、江藤 正俊、小林 聡、牟田口 淳、今田 憲二郎、冢入 里志、山田 耕嗣、大西 峻、山家 智之、不二門 尚、松村 泰志、野村 泰伸	4. 発行年 2020年
2. 出版社 コロナ社	5. 総ページ数 224
3. 書名 医療に活かす生体医工学	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がんを診断するための方法、がん診断用組成物、がん診断用キット、がんの状態を評価する法、がん予防薬及び/又は治療薬をスクリーニングする方法	発明者 村田正治、河野喬仁、江藤正俊、猪口淳一、姜貞勲	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-220139	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------