

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18325

研究課題名（和文）インフラマソーム応答型ナノ造影剤によるNASH超早期診断法の開発

研究課題名（英文）Development of cell signal-responsive contrast agent for diagnosis of NASH

研究代表者

村田 正治（Murata, Masaharu）

九州大学・先端医療オープンイノベーションセンター・教授

研究者番号：30304744

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 17,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はインフラマソームに特異的に反応し、その活性に応じてシグナルを変化させることができる機能化造影剤を設計・作製した。そのプラットフォームとしては、タンパク質ベースのナノ構造体を用いた。予備実験において、ナノ構造体の血中安定性は極めて高く、少なくとも1週間は血中酵素に分解されることなく安定に存在した。さらにマウスに投与後、JSCC標準化対応法によって各種の生化学パラメータを測定したところナノ構造体による急性毒性も観察されなかった。そして細胞内引き起こされる炎症応答としてのインフラマソームを、このナノ構造体の構造変化によって定量的かつリアルタイムに観察することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では未だ実現されていない造影剤を使ったインフラマソームのリアルタイムイメージングに成功した。これまでのレポーター遺伝子を使ったインフラマソームの可視化とは異なり、作製したナノ構造体は様々な細胞や動物に応用できる。インフラマソームは炎症応答の促進に直接関わっており、感染症や生活習慣病を含めた様々な疾患との関係が次々と明らかになっている。その中には早期診断が極めて難しい疾患も含まれている。炎症はこれらの疾患の極初期から起こっており、インフラマソームの形成を特異的に捉えることができれば、これらの疾患を極初期の段階で診断することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we designed and constructed a functionalized contrast agent that specifically reacts to inflammasomes and can modify its signal according to its activity. Protein-based nanostructures were used as a platform. In preliminary experiments, the nanostructures were extremely stable in blood and remained stable for at least one week without being degraded by blood enzymes. Furthermore, after administration to mice, various biochemical parameters were measured by the JSCC standard method, and no acute toxicity due to the nanostructures was observed. In addition, the structural changes of the nanostructures allowed quantitative and real-time observation of inflammasomes as an intracellular inflammatory response.

研究分野：ナノ医工学

キーワード：炎症 インフラマソーム ナノメディシン 機能化造影剤

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織に炎症細胞が浸潤していることは、病理学的に古くから知られており、慢性炎症と発がんは密接に関わっていると考えられてきた。特に近年は炎症反応により活性化するシグナル経路が発がんに関与していることが解明されつつあり、炎症応答を制御することでがん化やその進展を制御できる可能性も見えてきた。また炎症性疾患には本研究の目標である NASH をはじめ、機序、診断法、そして治療法が開発途上にあるものも多く、炎症反応の解明が喫緊の課題となっている。炎症反応は生体防御において極めて重要な反応であるが、過剰な炎症性応答は組織障害を惹起する。この炎症において重要な役割を担うのがインフラマソーム (inflammasome) と呼ばれるタンパク複合体である。このインフラマソームは刺激を認識する受容体 (Nod-like receptor や AIM2 等)、ASC というアダプター分子、そしてカスパーゼ 1 から構成されており、細菌やウイルスなどの病原体構成分子や代謝産物などの生体にとっての危険物質を認識すると多量体化して活性化する。インフラマソームは炎症応答の促進に直接関わっており、近年は感染症だけでなく生活習慣病を含めた様々な疾患との関係が次々と明らかになっている。その中にはアルツハイマー病や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、あるいは心筋梗塞など早期診断が極めて難しい疾患も含まれている。炎症はこれらの疾患の極初期から起こっており、インフラマソームの形成を特異的に捉えることができれば、これらの疾患を極初期の段階で診断することが可能となる。

## 2. 研究の目的

炎症反応は生体防御において極めて重要な反応であるが、過剰な炎症性応答は組織障害を惹起する。この炎症において重要な役割を担うのがインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体である。本研究では未だ実現されていない造影剤を使ったインフラマソームのリアルタイムイメージングを目標とする。in vitro ではペプチドやレポーター遺伝子を使ったインフラマソームの可視化に成功しているが、in vivo、特に将来的な画像診断への応用を考えた場合、これらの方法は適しているとはいえない。ヒトを含めホールボディでの可視化では、血中滞留性、細胞・組織への分子標的化、そしてインフラマソーム応答性をすべて高次元で実現する必要がある。我々はこれまでに培った独自のナノ分子工学を駆使することでこれを実現する。その鍵となるのがナノ構造体の分子標的化とインフラマソーム応答性である。このナノ構造体は細胞毒性が低く、生体内での安定性も非常に高い。

## 3. 研究の方法

### ナノカプセルの作製と形態観察

インフラマソームの機能化造影剤プラットフォームとしては、タンパク質ベースのバイオナノ構造体を用いた。線結晶構造解析の結果、このタンパク質の一部はカプセルの外表面に露出していることが明らかとなっており、この領域特定の酵素に対する応答配列を組み込むことが可能である。そこで本研究ではインフラマソームに対して最適化した配列を遺伝子レベルで組み込んだ。ナノ構造体はいずれも大腸菌から大量発現し、クロマトグラフィーによって精製した。動的光散乱法 (DLC) や透過型電子顕微鏡 (TEM) 等によって詳細に物性評価した。

## インフラマソーム応答性評価

ナノ構造体のインフラマソーム応答性を評価するために、インフラマソーム関連酵素に対する感受性を調べた。まずナノ構造体と蛍光分子をモル比で1:1.5の割合で一晩反応させ、蛍光ラベル化した。これをゲル濾過精製した後、インフラマソーム応答性を評価した。ナノ構造体をインフラマソーム関連酵素と混合し、37°Cで3時間インキュベートした。反応後、15-20%トリシリングルを用いて電気泳動し、Typhoon FLA900で蛍光スキャン解析した。さらに溶液中におけるナノ構造体のインフラマソーム関連酵素濃度依存性を蛍光スペクトル変化で追跡した。

## 細胞中におけるナノ構造体のインフラマソーム応答性

THP-1を96wellプレートに播種し、80nM PMA (ホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート)含有培地で3日間培養した。PBSで3回洗浄した後、ナノ構造体を添加し、細胞内へ形質転換させた。これを10 $\mu$ g/ml LPS含有培地でさらに培養を続け、XX時間後に細胞をPBSで洗った。これをTECAN M1000で蛍光スペクトルを測定した。

## 4. 研究成果

本研究はインフラマソームに特異的に反応し、その活性に応じてシグナルを変化させることができる機能化造影剤を設計・作製した。タンパク質ベースのバイオナノ構造体にインフラマソーム関連酵素の応答配列を組み込むことに成功した。このナノ構造体は数十アミノ酸を組み込んで安定な球状構造を維持することができるためはアニオン交換クロマトグラフィーによって粗精製し、最終精製はゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) によって行った。得られた精製物をSDS-PAGEで分析したところ、ほぼシングルバンドであり純度は>90%と確認できた。

ナノ構造体に組み込んだ応答配列はゲル電気泳動において、酵素添加後に分子量の小さい断片が観察されたことから、期待通り切断・分解されていることが確認できた (図1a)。これは期待通り、インフラマソーム関連酵素に反応したことを示している。またこのインフラマソーム応答性は、ナノ構造体に固定化した蛍光応答の変化によってリアルタイムに観察することができた。

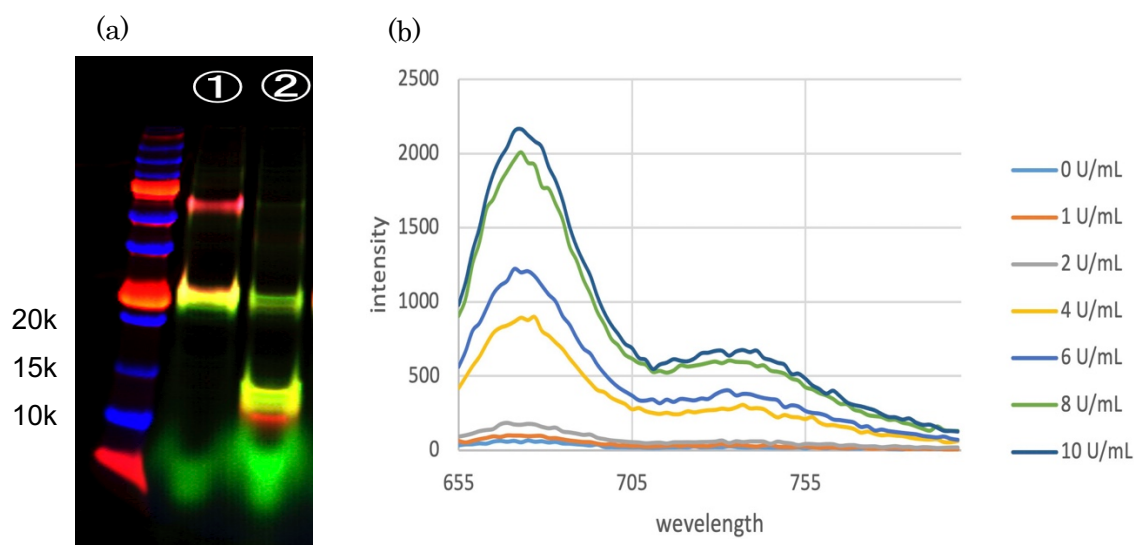


図1 ナノ構造体のインフラマソーム関連酵素に対する応答性

- (a) 蛍光ラベル化したナノ構造体に酵素を加え、37°Cで3時間インキュベートした後、15-20%トリシリングルを用いて電気泳動分析した。①, 酵素添加前; ②, 酵素添加後
- (b) 蛍光ラベル化したナノ構造体に種々の濃度の酵素を加え、37°Cで3時間インキュベートした後、蛍光スペクトルを測定した。

一般に、ナノサイズの構造変化をリアルタイムに観察することは困難であるが、Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET) とよばれる現象を観察することで評価することが可能である。この技術は二つの波長の異なる蛍光分子を組み合わせ、一方が蛍光ドナー、もう一方がアクセプターとして機能させる。これら二つの蛍光はお互いの分子間距離に強く依存するため、その変化を観察することによって両分子の相対的な位置を推定することが可能となる。今回は、インフラマソーム応答型ナノ構造体に二つの蛍光分子 (Alexa647 とそれに対応する Quencher) をラベルした。ナノ構造体に種々の濃度のインフラマソーム関連酵素を作用させたところ、酵素濃度依存的に蛍光スペクトルが変化した (図 1b)。これらの特性を利用して、ヒト単球系白血病細胞株にナノ構造体を形質転換して炎症誘導するとナノ構造体由来の蛍光が増強された (図 2)。以上の結果から、細胞内引き起こされる炎症応答としてのインフラマソームをナノ構造体の構造変化によって定量的に観察することができた。

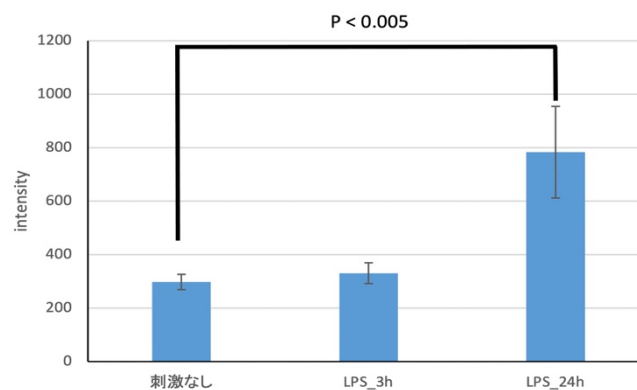


図 2 ナノ構造体のインフラマソーム関連酵素に対する応答性

蛍光ラベル化したナノ構造体を THP-1 細胞に形質転換し、80nM PMA および酵素 10 $\mu$ g/ml LPS で刺激してインフラマソームを誘導した。この時の蛍光強度変化を測定した (Ex:646nm Em:671nm)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Mamoru, Nakano Michitaka, Ariyama Hiroshi, Yamaguchi Kyoko, Tanaka Risa, Semba Yuichiro, Sugio Takeshi, Miyawaki Kohta, Kikushige Yoshikane, Mizuno Shinichi, Isobe Taichi, Tanoue Kenro, Taguchi Ryosuke, Ueno Shohei, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Baba Eishi, Akashi Koichi	4. 巻 532
2. 論文標題 Macrophages are primed to transdifferentiate into fibroblasts in malignant ascites and pleural effusions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 215597 ~ 215597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2022.215597	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 Koyasu Norikazu, Hyodo Fuminori, Iwasaki Ryota, Eto Hinako, Elhelaly Abdelazim Elsayed, Tomita Hiroyuki, Shoda Shinichi, Takasu Masaki, Mori Takashi, Murata Masaharu, Hara Akira, Noda Yoshifumi, Kato Hiroki, Matsuo Masayuki	4. 巻 179
2. 論文標題 Spatiotemporal imaging of redox status using in vivo dynamic nuclear polarization magnetic resonance imaging system for early monitoring of response to radiation treatment of tumor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 170 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.311	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 Hyodo Fuminori, Eto Hinako, Naganuma Tatsuya, Koyasu Norikazu, Elhelaly Abdelazim Elsayed, Noda Yoshifumi, Kato Hiroki, Murata Masaharu, Akahoshi Tomohiko, Hashizume Makoto, Utsumi Hideo, Matsuo Masayuki	4. 巻 36
2. 論文標題 <i>In Vivo</i> Dynamic Nuclear Polarization Magnetic Resonance Imaging for the Evaluation of Redox-Related Diseases and Theranostics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 172 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2021.0087	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, Eto Hinako, Hyodo Fuminori, Murata Masaharu, Tokuda Kentaro, Eto Masatoshi, Yamaura Ken	4. 巻 11
2. 論文標題 Noninvasive Diagnosis of the Mitochondrial Function of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Using In Vivo Dynamic Nuclear Polarization?Magnetic Resonance Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1454 ~ 1454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11081454	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, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Kang Jeong-Hun	4. 巻 131
2. 論文標題 Bioinspired macrophage-targeted anti-inflammatory nanomedicine: A therapeutic option for the treatment of myocarditis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Science and Engineering: C	6. 最初と最後の頁 112492-112492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msec.2021.112492	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 Takagishi Soh, Arimura Koichi, Murata Masaharu, Iwaki Katsuma, Okuda Tomohiro, Ido Keisuke, Nishimura Ataru, Narahara Sayoko, Kawano Takahito, Iihara Koji	4. 巻 8
2. 論文標題 Protein Nanoparticles Modified with PDGF-B as a Novel Therapy After Acute Cerebral Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eneuro	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0098-21.2021	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, Shimizu Eiko, Murata Masaharu, Kang Jeong-Hun	4. 巻 330
2. 論文標題 Protective and healing effects of apoptotic mimic-induced M2-like macrophage polarization on pressure ulcers in young and middle-aged mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 705-714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2020.12.052	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 Eto Hinako, Naganuma Tatuya, Nakao Motonao, Murata Masaharu, Elhelaly Abdelazim Elsayed, Noda Yoshifumi, Kato Hiroki, Matsuo Masayuki, Akahoshi Tomohiko, Hashizume Makoto, Hyodo Fuminori	4. 巻 169
2. 論文標題 Development of 20cm sample bore size dynamic nuclear polarization (DNP)-MRI at 16mT and redox metabolic imaging of acute hepatitis rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 149-157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.017	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 Iwaki Katsuma, Takagishi Soh, Arimura Koichi, Murata Masaharu, Chiba Toru, Nishimura Ataru, Ren Nice, Iihara Koji	4. 巻 50
2. 論文標題 A Novel Hyperspectral Imaging System for Intraoperative Prediction of Cerebral Hyperperfusion Syndrome after Superficial Temporal Artery-Middle Cerebral Artery Anastomosis in Patients with Moyamoya Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cerebrovascular Diseases	6. 最初と最後の頁 208-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000513289	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	梅野 太輔 (Umeno Daisuke)  (00400812)	早稲田大学・理工学術院・教授  (32689)	
研究分担者	赤星 朋比古 (Akahoshi Tomohiko)  (20336019)	九州大学・医学研究院・准教授  (17102)	
研究分担者	河野 喬仁 (Kawano Takahito)  (90526831)	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  (17102)	

#### 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
---------	---------