

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：84404
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K19940
研究課題名（和文）血中循環型高分子MRプローブとMRI磁場を利用した微細脳動脈瘤アブレーション技術

研究課題名（英文）Microaneurysm ablation technique using a supramolecular MR probe and MRI magnetic field

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脳動脈瘤など微細な血管病変を診断するだけでなく、その部位を選択的に治療できる造影剤の開発を目指して、マグネタイト粒子を搭載したフルオレセイン結合分岐型PEGを合成した。合成した分子の構造解析の結果、開発した造影剤は超分子構造体を形成できる事を見出した。さらに細胞障害性も低く血中投与によって微細血管を造影し、さらに外部刺激に反応して発熱反応を誘導できる事を見出した。これらの成果は、超分子構造体が新たな治療・診断プローブとして極めて有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究グループでは、弱い相互作用をもつ超分子構造がMRIによって微細血管を造影する上で極めて有効な分子構造であることを見出した。本研究では、マグネタイト粒子を結合させた分子を設計した。この場合においても、超分子構造体を形成でき血中循環性の向上や造影効果が認められた。これらの結果は超分子構造形成が微細血管用MRプローブ・一時的な血中滞留性や微細血管への分布において有効な分子設計戦略であることを実証でき、学術的意義は高い。また、この分子は外部刺激によって発熱反応を惹起することから診断・治療用分子としても有効である。これは新たな治療法を開発するうえで重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we synthesized fluorescein-conjugated branched PEG loaded with magnetite particles, aiming to develop a contrast agent to diagnose minute vascular lesions such as cerebral aneurysms and selectively treat the affected area. As a result of the structural analysis of the synthesized molecule, we found that the developed contrast agent can form a supramolecular structure. Furthermore, we found that it has low cytotoxicity, can image minute blood vessels when administered into the blood, and can induce a fever reaction in response to external stimuli. These results demonstrated that supramolecular structures are extremely effective as new therapeutic and diagnostic probes.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：超分子構造体 MRI 微細血管 イメージング

1. 研究開始当初の背景

未破裂脳動脈瘤は全人口の 3~5%に存在することが知られており、微細な脳動脈瘤を早期に検出し治療することは予後を改善する上で極めて重要である[1]。MRI は脳に関する疾患を診断するために、日常的に使用されている診断モダリティであり、シーケンスの組み合わせによって様々な生理現象を画像として捉えることが可能である。この MRI による T1, T2 強調画像と MR Angiography (MRA) との併用で、脳構造と血管構造が明確に画像化できることが知られている[2]。しかしながら、MRI で捉える磁場強度の変化は微弱であり、検出できるシグナルも極めて弱いことから、微細な血管からの MR シグナルは極めて弱い。一般的に MRI のシグナル強度を増強させるための手段として、ガドリニウムキレートや鉄粒子からなる造影剤が使用されている。臨床で使用されるこれらの造影剤は、低分子量であるために静脈注射により血管内に投与した場合でも直ちに血管外組織に移行し、尿中排泄経路から代謝されることが知られている。このことから、撮像直前に造影剤を投与して血管構造をわずかでも造影しようとする方法もとられている。

MRI による血管撮像の限界をさらに向上させる手法として、これまでに我々の研究グループでは、血管内に投与した後一時的に血管内に滞留し、その後速やかに尿中排泄される「超分子 MR プローブ」の概念を創出した。この分子は投与前に弱い相互作用によって超分子構造体を形成している。この状態で血流内に投与することによって、血管内で超分子構造体が徐々に崩壊しながら血管外組織には漏れせずに微細血管内に分布することが可能となる。その後、完全に分解された超分子構造体は腎臓から尿中排泄によって代謝される。つまり、この超分子 MR プローブは、微細血管を高感度で造影する一方で、体外へと速やかに排泄される特性を有することから、体内に蓄積することがない極めて低侵襲な MR 造影剤である。このプローブを用いる事で従来では可視化されなかった微細な動脈瘤も MRI によって可視化され、超早期に病変を検出できることが示されている。しかし、微細な脳動脈瘤の検出が可能になった一方で、その領域を如何に治療するかも重要な問題となる。マグネタイト粒子は、磁場に応答することで、発熱反応を惹起することが知られている。具体的には、酸化鉄粒子やマグネシウムフェライトなどは、交流磁場の印加によって組織を焼灼する程度の熱を発生させることが知られている[3]。

そこで本研究では、交流磁場で発熱するマグネタイト粒子を搭載した超分子構造体(図1)を血中投与し動脈瘤に局在化させれば、微細血管イメージングと同時に交流磁場印加で微細脳動脈瘤を焼灼し治療できるのではないかと着想した。このような粒子を担持した超分子構造を投与すれば、一時的な血中循環の間に脳動脈瘤へ集積し、MRI 内の交流磁場によって微細血管の診断と治療が達成できる。このような超分子構造体の体内動態と、MRI の RF パルスによる交流磁場印加と組み合わせは、低侵襲で微小脳動脈瘤を特異的に治療することが可能となる。

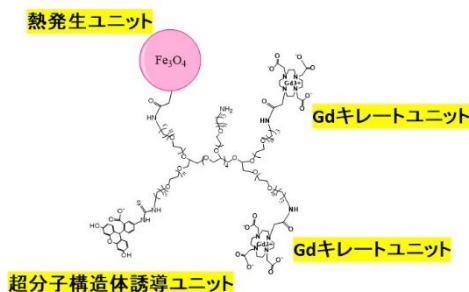


図1 微細血管のイメージングと、焼灼治療を目指した超分子MRプローブ治療マテリアル

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、1分子のフルオレセイン基と3分子のガドリニウム(Gd)キレート基を有する8分岐型ポリエチレングリコール(8-arm PEG-FGd3)を精密合成することで、フルオレセインの電子スタッキング相互作用により繊維状の超分子構造体が形成され、MRI で4.5 μmの微細血管を可視化させることに成功した(図2a) [4-6]。さらに、脳卒中モデルマウスを用いて予備検討した結果、微細血管に形成された脳動脈瘤に造影剤が蓄積しMRIでその形態を可視化できることも実証した(図2b)。これらの研究成果は、MRIにおいて微細血管を超分子MRプローブによってイメージングできる可能性を初めて実証した成果である。診断という点においては極めて有用な手法である一方、検出した微細脳動脈やその疾患を治療する戦略が構築されなければ検出・診断の意義は弱い。

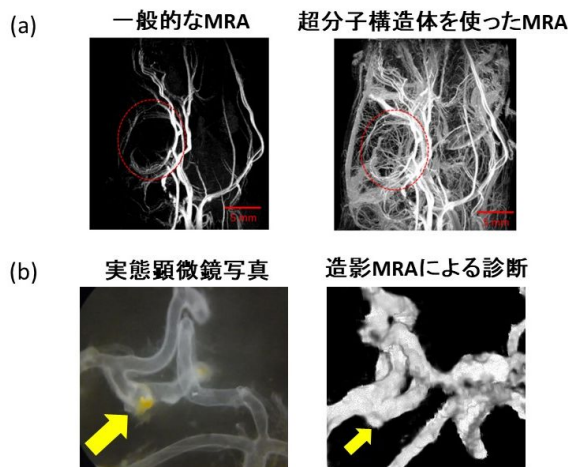


図2 (a) 微細血管イメージング、(b) 超分子構造体による微小脳動脈瘤の診断(矢印:脳動脈瘤)

本プロジェクトでは、MRI 装置の RF パルスで熱を発生する分子を搭載した超分子構造体からなる血中循環 MR プローブ開発することによって、その分子プローブを血中に蓄積させ、交流磁場による焼灼で血液凝固を誘導し脳動脈瘤破裂を未然に防ぐ、微細血管 MR プローブ治療という新たな治療戦略の可能性について検討した。

3. 研究の方法

本申請プロジェクトでは、これまで開発した超分子構造体 MR プローブを基礎骨格として、交流磁場によって熱発生する分子を結合させた超分子構造体の合成と、発生熱量についての基礎データ、in vivo での体内分布を検討した。研究方法の詳細を以下に記載する。

(1) 酸化鉄微粒子を搭載した超分子 MR プローブの合成と物性評価

マグネタイトナノ粒子結合型 4-arm/8-arm PEG-F の合成

4-arm, 8-arm PEG に対して、酸化鉄微粒子を結合させた。酸化鉄微粒子にカルボン酸基を導入し、EDS/NHS によってフルオレセインが結合した 4-arm PEG あるいは 8-arm PEG を結合させた。

合成したマグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F の物性評価

動的光散乱法によって、合成した分子の濃度に対する分子サイズの変化を評価した。さらに、CD スペクトル解析、原子間力顕微鏡ならびに小角 X 線散乱法によって超分子構造体の構造について評価した。

(2) 磁場内での熱量変化、細胞傷害性の検討

交流磁場印加時における熱量変化の定量化

種々の交流磁場を印加した環境で、系全体の熱量変化をサーモグラフィーによって計測した。さらに追加実験として赤外線レーザーを用いた検討も実施した。

合成したマグネタイトナノ粒子結合型 4-arm/8-arm PEG-F の細胞障害性評価

マクロファージ由来 Raw264.7 細胞に対して、マグネタイトナノ粒子結合型 4-arm/8-arm PEG-F を添加し、共培養することでマクロファージの炎症性関連表面マーカーや、遺伝子発現量を FACS、qPCR によって定量した。

(3) ラットを用いた in vivo における血中滞留性と体内分布・MRI による造影効果

合成したマグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F を動脈投与に対して動脈投与し、血中における粒子の血中滞留性を ICP-MS によって定量化した。さらに、投与後のラットの各臓器を摘出し、集積量を定量化した。さらに、7 T-MRI によって投与後の血管造影効果も検討した。

4. 研究成果

(1) マグネタイトナノ粒子結合型 4-arm/8-arm PEG-F の合成

フルオレセインが結合した 2 種類の PEG (分子量 15kDa 程度) (4-arm PEG-F, 8-arm PEG-F) を 10nm のマグネタイトナノ粒子に結合させた分子を合成した。NMR によって PEG 分子を確認した。合成後 7T の磁場における $r1/r2$ を評価した結果、4-arm PEG-F にマグネタイトナノ粒子を結合させた分子の方が、コントラストが良く T1 効果を得られることが示された。さらに、溶液中での分散安定性も極めて高く、PEG の結合によってマグネタイト粒子は 1 週間でも安定に分散していることを認めた。

(1) 合成したマグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F の物性評価

動的散乱法によってマグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F の流体力半径を計測した結果、10mg/ml 以上の濃度域において分子サイズが急激に増加して 1000nm 以上のサイズになることが示された。一方で、コントロールとしてフルオレセインを含まない場合では、サイズの増加は認められなかった。さらに、CD スペクトル測定から、濃度変化に応じてフルオレセインの誘起 CD シグナルを認めた。原子間力顕微鏡によって観察した結果、直径 30-50 nm の直径で繊維状の長い超分子構造体が観察された(図3)。一方で小角 X 線散乱では構造体形成に由来する回折ピークを検出できなかった。これらの結果より、マグネタイトナノ粒子が結合した場合でも、4-arm PEG-F のフルオレセインのスタッキングによって超分子構造体を形成できることを初めて実証できた。一方で、溶液中での分子構造は数種の構造体が存在していると考えられ、今後のより詳細な X 線解析を実施していきたいと考えている。

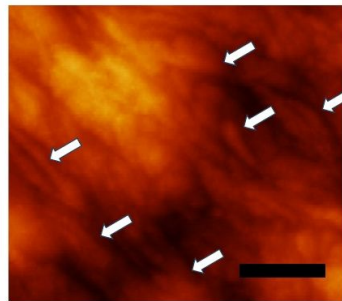


図3 原子間力顕微鏡によるマグネタイトナノ粒子結合4-arm PEG-Fが配列した様子(スケールバー:250nm)
矢印:特徴的な繊維構造

(2) 交流磁場印加時における熱量変化の定量化

合成したマグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F 溶液に対して、交流磁場を 5 分から 1 時間かけて照射して、熱量変化を測定した。その結果、観察範囲、観察濃度率において温度上昇が認められなかった。この原因として磁場強度に問題があると考えられ、今後さらなる高い磁場強度を照射して検討したい。一方で、1W/cm² の強度で赤外線レーザー照射を照射した結果、数分以内にサンプルチューブが 50℃ を超える発熱反応を示した。以上の検討から、赤外線照射による血液凝固誘導についても可能性があることを見出した。

(2) 合成したマグネタイトナノ粒子結合型 4-arm/8-arm PEG-F の細胞障害性評価

マクロファージ由来 Raw264.7 細胞に対してマグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F 溶液を共培養した結果、マクロファージの表面マーカー CD163 および CD209 の発現量が増加することで示された。さらに遺伝子発現解析では、IL10 および TGF β の発現が有意に向上したことを認めた。これらの結果より、マグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F は細胞に対して障害性は低く、さらにマクロファージの極性を M2 有意に誘導することを見出した。このメカニズムについても ROS 発生の抑制が関わっていることを見出している。

(3) ラットを用いた in vivo における血中滞留性と体内分布

マグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F 溶液および、コントロールとして、マグネタイトナノ粒子ならびにフルオレセインを含まないマグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG を血中投与した結果、いずれの時間においてもマグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F の血中濃度が高いことが示された。投与 2 時間後でも投与量の 20% が血中を循環していることを認めた。

さらに、投与後体内から各臓器を回収した結果、マグネタイト粒子は肝臓および脾臓に集積する傾向が認められた。いずれの場合でも、投与後のラットが死亡した例は認められず、急激な毒性を惹起しないともと考えられた。さらに投与によって微細な血管を造影できることも示された。

以上の結果より、超分子構造体を形成したマグネタイトナノ粒子結合 4-arm PEG-F は、血中の滞留時間を維持する効果が認められた。

以上の研究成果より、マグネタイト粒子を搭載した場合でも、フルオレセイン結合分岐型 PEG の修飾によって、超分子構造体を形成することが初めて実証できた。さらに発熱を惹起することも認められたことから、この分子を診断用のみならず治療プローブとして応用できることが判明した。

【参考文献】

1. Chalouhi N, et al. Stroke 2013, 44, 3613.
2. El-Koussy M. et al. Eur Neurol 2014, 72, 309.
3. Aono H, J Ceram Soc Jpn, 2014, 122, 237.
4. Mahara A, et al. Chem Commun 2020, 56, 11807,
5. Mahara A, et al. Macromol Biosci, 2018, 18, e1700391.
6. Mahara A, et al. Colloids Surf B Biointerfaces, 2023, 230, 113525.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Atsushi Mahara	4. 巻 78
2. 論文標題 Polymeric MR Contrast Agents for Microvascular Imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi .	6. 最初と最後の頁 520-525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.6009/jjrt.2022-2021.	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 Atsushi Mahara, Keigo Shima, Raghav Soni, Ryutaro Onishi, Yoshiaki Hirano, Shigeyoshi Saito, Tetsuji Yamaoka	4. 巻 230
2. 論文標題 In vivo MR imaging for tumor-associated initial neovascularization by supramolecular contrast agents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 113525
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.colsurfb.2023.113525	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 馬原 淳、ソニ ラグハブ、齋藤 茂芳、山岡 哲二
2. 発表標題 "自己組織化形成型MR造影剤による 微細血管構造のin vivoライブイメージング"
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会（東京）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soni Raghav, Atsushi Mahara and Tetsuji Yamaoka
2. 発表標題 Synthesis of fluorescein/Fe3O4nanoparticle-conjugatedpolyethylene glycol forself-assemble MR contrast agent
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会（東京）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬原 淳、ソニ ラグハブ、齋藤 茂芳、山岡 哲二
2. 発表標題 微細血管構造のライブイメージングを可能にする高分子MR造影剤の自己組織化形成
3. 学会等名 第71回高分子討論会（北海道大学）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬原 淳、齋藤 茂芳、島 慧伍、平野 義明、山岡 哲二
2. 発表標題 高分子MR造影剤による血管新生のin vivo live imaging
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会(web)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬原 淳・島 慧伍・齋藤 茂芳・平野 義明・山岡 哲二
2. 発表標題 Gd修飾8分岐型ポリエチレングリコールの自己組織化形成による微細血管イメージング
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Mahara、Raghav Soni、Shigeyoshi Saito、Tetsuji Yamaoka
2. 発表標題 Supramolecular MR Contrast Agents for Visualizing Cancer Angiogenesis
3. 学会等名 第72回高分子学会年次大会(高崎)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Raghav Soni, Tetsuji Yamaoka, and Atsushi Mahara
2. 発表標題 Synthesis of fluorescein conjugated iron-oxide nanocluster for MR contrast agent
3. 学会等名 第72回高分子学会年次大会(高崎)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Mahara, Raghav Soni、Shigeyoshi Saito, Tetsuji Yamaoka
2. 発表標題 Supramolecular MR Contrast Agents for Visualizing Cancer Angiogenesis
3. 学会等名 第52回医用高分子シンポジウム(東京)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Raghav Soni, Tetsuji Yamaoka, and Atsushi Mahara
2. 発表標題 Self-assemble iron-oxide nanocluster for MR contrast agent
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第18回若手研究発表会(京都)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 馬原 淳、ソニ ラグハブ、齋藤 茂芳、山岡 哲二
2. 発表標題 脳血管疾患の時空間MRイメージングを 実現化する超分子MR造影剤
3. 学会等名 第72回高分子討論会(香川)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 馬原 淳、ソニ ラグハブ、齋藤 茂芳、山岡 哲二
2. 発表標題 微細血管ライブイメージングを実現化した 自己組織化MR造影剤の構造と血中循環性
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会(神戸)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Mahara, Soni Raghav, Shigeyoshi Satio, Tetsuji Yamaoka
2. 発表標題 Microvascular imaging in brain tumors by supramolecular MR contrast agents
3. 学会等名 2023 MRS Fall Meeting & Exhibit(Boston)(国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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
研究協力者	ソニ ラグハブ (Soni Raghav)		

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
---------	---------