

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650266

研究課題名(和文)腫瘍内プロテアーゼ活性をイメージングするオーバーハウザーMRI造影剤の開発

研究課題名(英文)Development of contrast agents that image tumor-specific protease for Overhauser effect-enhanced MRI

研究代表者

新留 琢郎(Niidome, Takuro)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：20264210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：オーバーハウザーMRI(OMRI)はニトロキシラジカルといった常磁性分子の電子スピンとプロトンの核スピンとのオーバーハウザー効果で増強するイメージング技術である。本研究では dendritic poly(L-lysine) を、腫瘍で高発現しているプロテアーゼの基質ペプチドを介して安定ニトロキシラジカル誘導体(TEEPO)で修飾した。この造影剤をプロテアーゼ処理した結果、ペプチドが切断され、ニトロキシラジカルの運動性が増し、OMRIシグナルに変化が認められた。このように、OMRIを使った腫瘍の機能的イメージングの基礎を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Overhauser-enhanced MRI (OMRI) is a double resonance technique that uses the presence of paramagnetic agents such as nitroxyl radicals to enhance the signal intensity from nuclear spins by a process known as the Overhauser effect. In this study, dendritic poly(L-lysine) polymers were modified with stable nitroxyl radicals through substrate peptides of a protease specifically expressed in tumors. Cleavage of the peptides by the protease affected the OMRI signal from the radicals. This system could be the basis of a functional tumor imaging technique by OMRI.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：医用・生体画像 バイオイメージング MRI オーバーハウザー効果 腫瘍 プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

病変部位の画像診断法として、X線CTをはじめ、核磁気共鳴イメージング (MRI)、単一光子放射断層撮影 (SPECT)、ポジトロン断層法 (PET) など多くの手法が開発され、臨床でも利用されている。その中で、MRI は水素の核磁気共鳴を利用したイメージングで、各組織内の水素核の緩和時間の違いを検出し、画像化する。MRI では水の緩和時間を短縮させる物質 (Gd³⁺キレート剤や酸化鉄ナノ粒子) が造影剤となり、血管造影や肝障害の機能イメージングに利用されている。そして現在、高感度化とさらなる機能化が試みられている。

その高感度化・機能化の一つとして、オーバーハウザー効果 MRI (OMRI) が開発された (H. Utsumi et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. **103**, 1463-1468, 2006)。ニトロキシラジカルといった安定ラジカルの電子スピンを飽和させ、この条件下でプロトンの核磁気共鳴 (NMR) 信号を観察することで、電子スピンのエネルギー遷移により NMR シグナルが数十～数百倍にも増強される。

一方、これまで我々は腫瘍に集積するポリマーや、環境に応答して性質が変わるポリマーに関する研究を行ってきた。例えば、アミノ酸から構成される dendrimer 分子 (dendrimer) が Enhanced Permeation and Retention (EPR) 効果により腫瘍に集積することを明らかにしたり (T. Okuda et al., *J. Control. Release* **114**, 69-77, 2006)、プロテアーゼ活性に応答し、特性が変化するポリマーの開発を行ってきた (D. Asai et al., *J. Control. Release* **141**, 52-61, 2010)。同時に、ポリマーにニトロキシラジカル基を修飾することにより、その OMRI での造影能についても検討してきた。しかし、ニトロキシラジカル基をポリマーに修飾することで、ニトロキシラジカル基の運動性が損なわれ、OMRI の造影能は低下した、すなわちシグナルが消失してしまうことがわかった。

2. 研究の目的

本研究ではニトロキシラジカル基とポリマーの間にペプチド鎖を挿入し、このペプチドがプロテアーゼで切断されるとニトロキシラジカル基の運動性が回復し、OMRI シグナルが出現するのではないかと着想した (図 1)。すなわち、プロテアーゼが存在する部位でのみ OMRI により造影されるというシステムである。ここでは、腫瘍に高発現していることが知られているウロキナーゼ様プラスミノゲンアクチベーター (uPA) を対象に、その基質ペプチドを採用した。

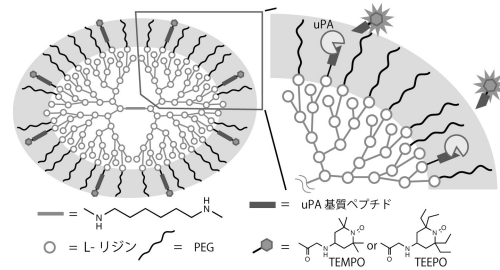


図 1、腫瘍に高発現しているプロテアーゼに応答して MRI シグナルが増強するシステム。

3. 研究の方法

(1) 造影剤の合成：Dendrimeric poly-L-lysine を合成し、そこへ Fmoc-固相法で合成したペプチドおよびポリエチレングリコール (PEG) 鎖を縮合した。その後、ニトロキシラジカルの誘導体、4-oxo-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine 1-oxyl (TEMPO) あるいは 4-oxo-2,2,6,6-tetraethyl-piperidine 1-oxyl (TEEPO) を修飾した。

(2) ペプチド切断による ESR および OMRI 信号の強度変化：合成した造影剤分子に uPA を作用させ、その後 ESR スペクトルを測定した (Bruker EMX-Plus spectrometer, 9.8 GHz with 100 kHz modulation frequency, Bruker Biospin K.K., Kanagawa, Japan)。OMRI 信号は Keller Imager, 磁場強度 18 mT (Japan Redox. Co. Ltd., Fukuoka, Japan) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) ニトロキシラジカルの血中安定性評価：ニトロキシラジカルは安定ラジカルとして知られているが、血中にはアスコルビン酸といった還元剤が存在し、すぐにラジカルが消失する。そこで、ニトロキシラジカルの周囲にテトラメチル基がある TEMPO 誘導体 (M-Rad) とテトラエチル基がある TEEPO 誘導体 (E-Rad) の血中での安定性を評価した。その結果、TEMPO 誘導体は約 40 分でラジカル量が半減したが、TEEPO 誘導体はそのラジカルが 2 時間以上安定に存在した (図 2)。テトラエチル基が立体障害となって、ラジカルを保護していることが示された。

(2) uPA 処理による ESR スペクトル変化：合成した造影剤に uPA を 24 時間作用させ、ESR 信号強度を測定した。その結果、TEMPO 誘導体の場合では ESR 信号強度が 2 倍に回復した (図 3)。ペプチドが切断され、ニトロキシラジカルの運動性が高まり、信号強度が増大したと考えられる。一方、TEEPO 誘導体

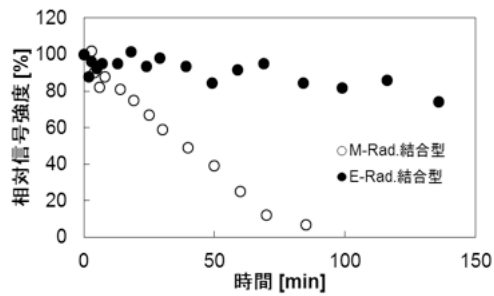


図2、ニトロキシラジカル基の血中安定性

では、その変化はそう大きくなかった。その理由として、切断されたペプチド断片が水に難溶性で、そのため、ESR スペクトルがシャープにならなかったためと考えられる。いずれにせよ、uPA でペプチドが切断され、ESR 信号が増強したことが確認された。これは、ESR 応答で MRI が強調される OMRI において、造影剤となることを示している。

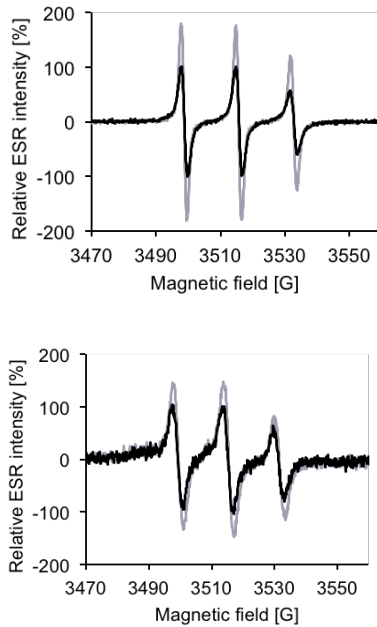


図3、TEMPO ペプチド (上)、TEEPO ペプチド (下) の uPA 切断による ESR 信号変化。黒いラインが uPA 未処理、グレーが uPA 処理後。

(3) ペプチド切断による OMRI 信号の変化：実際に、ESR の電磁波を照射しながら MRI 画像を取得した (OMRI)。その結果、uPA 処理をした造影剤の方で、明らかな OMRI 画像の変化が認められた (図4)。

以上のように、腫瘍イメージングのための OMRI 造影剤として、従来の造影剤の構造を改

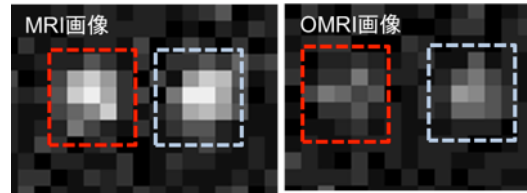


図4、TEEPO 修飾した造影剤の uPA 処理前後での MRI 画像。通常の MRI 画像 (左)、ESR の電磁波を照射した状態での MRI 画像 (OMRI 画像) (右)。赤枠が uPA 未処理、青枠が uPA 処理後。

変したニトロキシ誘導体 TEEPO と、腫瘍特異的に集積する KG6-PEG を組み合わせた高分子型 OMRI 造影剤を作製した。TEEPO は TEMPO よりも高い血中安定性を示した。また、uPA によりペプチド部分が切断されることで、ESR および OMRI 信号強度の増強が認められた。このことより、今回開発した造影剤は、酵素反応によってニトロキシラジカルの運動性が回復し、腫瘍を選択的に造影する分子の基礎となると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

1. T. Niidome, N. Chijiwa, T. Yamsaki, K. Yamada, T. Mori, T. Naganuma, H. Utsumi, K. Ichikawa, Y. Katayama, Change in Overhauser effect-enhanced MRI signal in response to uPA highly expressing in tumor, *Chem. Lett.*, in press (査読有り)
2. Y. Otsubo, H. Ikeda, J. Kamimoto, T. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, A rapid and quantitative detection of cellular protein kinase activity based on MALDI-TOF-MS, *Chem. Lett.*, in press (査読有り)
3. N. Hamano, Y. Negishi, K. Takatori, Y. Endo-Takahashi, R. Suzuki, K. Maruyama, T. Niidome, Y. Aramaki, Combination of bubble liposomes and high-intensity focused ultrasound (HIFU) enhanced antitumor effect by tumor ablation, *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 174-177 (2014) (査読有り)
4. M. Fujii, N. Nakashima, T. Niidome, Y. Niidome, Imaging mass spectrometry of intravenously injected gold nanorods in mice, *Chem. Lett.* **43**, 131-133 (2014) (査読有り)
5. K. Tobinaga, C. Li, M. Takeo, M. Matsuda, H. Nagai, T. Niidome, T. Yamamoto, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, Rapid and serum-insensitive endocytotic delivery of proteins using biotinylated polymers attached via multivalent hydrophobic anchors, *J. Controlled Release*, **177**, 27-33 (2014) (査読有り)

6. S. Kushio, A. Tsuchiya, Y. Nakamura, T. Nobori, C. W. Kim, G. X. Zhao, T. Funamoto, E. K. Lee, T. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, Cancer-specific gene carriers responding to cancer microenvironment: acidosis and hyper-activated protein kinases, *Biomed. Eng-App. Bas. C.*, **25**, 1340005 (2013) (査読有り)
7. K. Wakigawa, A. Gohda, S. Fukushima, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Rapid and selective determination of free chlorine in aqueous solution using electrophilic addition to styrene by gas chromatography/mass spectrometry, *Talanta*, **203**, 81-85 (2013) (査読有り)
8. J.-H. Kang, T. Mori, H. Kitazaki, T. Niidome, K. Takayama, Y. Nakanishi, Y. Katayama, Kinase activity of protein kinase Calpha in serum as a diagnostic biomarker of human lung cancer, *Anticancer Res.*, **33**, 485-488 (2013) (査読有り)
9. H. Tang, H. Kobayashi, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, CW/pulsed NIR irradiation of gold nanorods: effect on transdermal protein delivery mediated by photothermal ablation, *J. Controlled Release*, **171**, 178-183 (2013) (査読有り)
10. Y. Akiyama, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, PEG-silica-modified gold nanorods that retain their optical properties in tumor tissues, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **24**, 2071-2080 (2013) (査読有り)
11. C. W. Kim, R. Toita, J.-H. Kang, K. Li, E. K. Lee, G. X. Zhao, D. Funamoto, T. Nobori, Y. Nakamura, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Stabilization of cancer-specific gene carrier via hydrophobic interaction for a clear-cut response to cancer signaling, *J. Controlled Release*, **170**, 469-476 (2013) (査読有り)
12. Y. Nakamura, C. W. Kim, A. Tsuchiya, S. Kushio, T. Nobori, K. Li, E. K. Lee, G. X. Zhao, D. Funamoto, T. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, Branched polyethylenimine-based PKC α -responsive gene carriers, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **24**, 1858-1868 (2013) (査読有り)
13. S. Shiosaki, T. Nobori, T. Mori, R. Toita, Y. Nakamura, C. W. Kim, T. Yamamoto, T. Niidome, Y. Katayama, A protein kinase assay based on FRET between quantum dots and fluorescently-labeled peptides, *Chem. Commun.*, **49**, 5592-5594 (2013) (査読有り)
14. Y. Sakamura, M. Yoshiura, H. Tang, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Thermal enhancement of gene transfection in tumor cells mediated by the photothermal effect of gold nanorods, *Chem. Lett.* **42**, 767-768 (2013) (査読有り)
15. R. Kurihara, D. Pissuwan, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Biodistribution and tumor localization of PEG-modified dendritic poly(L-lysine) oligonucleotide complexes, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **23**, 2369-2380 (2012) (査読有り)
16. Y. Akiyama, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Conversion of rod-shaped gold nanoparticles to spherical forms and their effect on biodistribution in tumor-bearing mice, *Nanoscale Res. Lett.* **7**, 565 (2012) (査読有り)
17. H. Fukushima, S. Yamashita, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Sequential release of single-stranded DNAs from gold nanorods triggered by near-infrared light irradiation, *Chem. Lett.*, **41**, 711-712, (2012) (査読有り)
18. R. Toita, T. Mori, Y. Naritomi, J.-H. Kang, S. Shiosaki, T. Niidome, Y. Katayama, Fluorometric detection of protein kinase Ca activity based on phosphorylation-induced dissociation of a polyion complex, *Anal. Biochem.*, **424**, 130-136 (2012) (査読有り)
19. K. Nose, D. Pissuwan, M. Goto, Y. Katayama, T. Niidome, Gold nanorods in an oil-base formulation for transdermal treatment of Type 1 diabetes in mice, *Nanoscale*, **4**, 3776-3780 (2012) (査読有り)
20. S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Controlled-release system mediated by a retro Diels-Alder reaction induced by the photothermal effect of gold nanorods, *Langmuir* **27**, 14621-14626 (2011) (査読有り)
21. S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Akiyama, Y. Niidome, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Controlled- release system of single-stranded DNA triggered by the photothermal effect of gold nanorods and its in vivo application, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 2130-2135 (2011) (査読有り)
22. D. Pissuwan, K. Nose, R. Kurihara, K. Kaneko, Y. Tahara, N. Kamiya, M. Goto, Y. Katayama, T. Niidome, A solid-in-oil dispersion of gold nanorods can enhance transdermal protein delivery and skin vaccination, *Small*, **7**, 215-220 (2011) (査読有り)

[学会発表] (計 18 件)

1. 新留琢郎, 組織を加熱することによる遺伝子発現の向上, 第 13 回遺伝子・デリバリー研究会 夏期セミナー, 2013. 7. 24, (Hawaii Prince Hotel, Honolulu, HI, USA)
2. T. Niidome, K. Takahashi, K. Naoyama, H. Yamauchi, T. Mori, and Y. Katayama, Tumor-Selective Anticancer Drug Delivery System Mediated by Dendritic Poly(L-Lysine)s, 2013. 7. 23, The 40th Annual Meeting & Exposition of The Controlled Release Society, (Hawaii Convention Center, Honolulu, HI, USA)
3. 新留琢郎, 近赤外光でコントロールする薬物デリバリーシステム, 第 13 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 2013. 5. 11, 東京都板橋区 (帝京大学薬学部板橋キャンパス)
4. 新留琢郎, 近赤外光でコントロールする薬物デリバリーシステム, 第 13 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 2013. 5. 11, 東京都板橋区 (帝京大学薬学部板橋キャンパス)
5. 新留琢郎, 金属ナノ材料とポリマーを組み合わせた新しい医療材料の構築, 高分子学会第 21 回ポリマー材料フォーラム, 2012. 11. 01, 北九州市 (北九州国際会議場)
6. 新留琢郎, 金ナノロッドのフォトサーマル効果を利用した薬物デリバリーシステム, 第 4 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 2012. 10. 22, 北九州市 (北九州国際会議場)
7. 新留琢郎, 山下秀治, 福島寛満, 森 健, 片山佳樹, 近赤外光照射に应答して薬物を放出する金ナノロッド, 第 61 回高分子討論会, 2012. 09. 20, 名古屋市 (名古屋工業大学)
8. T. Niidome, Development of Novel Therapeutic Techniques using Photothermal Effect of Gold Nanorods, PT-BMES 2012, 2012. 09. 06, 台湾新竹市 (National Tsing Hua University)
9. T. Niidome, DRUG RELEASE SYSTEM CONTROLLED BY PHOTOTHERMAL EFFECT OF GOLD NANORODS, PEM 2012, 2012. 08. 21, 中国吉林省長春市 (Changchun Institute of Applied Chemistry)
10. D. Pissuwan, K. Nose, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Transdermal Insulin Delivery Enhanced by Photothermal Effect of GOLD Nanorods, The 39th Annual Meeting & Exposition of The Controlled Release Society, 2012. 07. 16, カナダ ケベック シティ (Centre des congres de Quebec)
11. T. Niidome, S. Yamashita, T. Mori, Y. Katayama, Controlled release system responding heat produced by photothermal effect of gold nanorods, 9th World Biomaterials Congress, 2012. 06. 04, 中国成都 (The Century City New International Convention & Exhibition Center)
12. T. Niidome, S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Niidome, T. Mori and Y. Katayama, Controlled Release Systems from Gold Nanorods Responding to Near Infrared Light Irradiation, 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム, 2011. 12. 20, 神奈川県横浜市
13. D. Pissuwan, K. Nose, Y. Tahara, M. Goto, Y. Katayama, T. Niidome, Transdermal Insulin delivery using a solid-in-oil dispersion of gold nanorods, 2011 MRS Fall Meeting & Exhibit, 2011. 11. 30, 米国マサチューセッツ州ボストン
14. S. Yamashita, H. Fukushima, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Release of Single Stranded DNA Responding to Near Infrared Light Irradiation, The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2011. 11. 11, 北海道札幌市北海道大学
15. T. Niidome, A. Shiotani, T. Mori, and Y. Katayama, Preparation of Thermo-responsive Polymer-modified Gold Nanorods and Their Delivery to Specific Tissue, Pusan-Kyushu Joint Symposium on High Polymers (15th) and Fibers (13th), 2011. 10. 28, 韓国プサン
16. T. Niidome, S. Yamashita, H. Fukushima, Y. Niidome, T. Mori, and Y. Katayama, Controlled Release System Mediated by Retro Diels-Alder Reaction on Gold Nanorods, 38TH ANNUAL MEETING & EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, 2011. 07. 02, 米国メリーランド州ナショナルハーバー
17. T. Niidome, D. Pissuwan, A. Shiotani, K. Nose, T. Mori, and Y. Katayama, Biomedical applications of gold nanorods: active accumulation system to tumor and enhancement of skin vaccination, The 10th China-Japan-Korea Foresight Joint Symposium on Gene Delivery and International Symposium on Biomaterials 2011, 2011. 05. 03, 中国桂林
18. 新留琢郎, 新留康郎, ピスワン ダークロン, 森 健, 片山佳樹, 金ナノロッド

と近赤外光を組み合わせた新しいイメージング・治療技術の開発, 第50回日本生体医工学会大会, 2011. 04. 29, "東京都千代田区、東京電機大学

[図書] (計9件)

1. 新留琢郎、微粒子材料-未来を拓く機能材料-、高分子学会、第3講金ナノロッドのフォトサーマル効果を利用した新しい治療技術の開発、p65-85、エヌ・ティー・エス、2013
2. 新留琢郎、プラズモンナノ材料開発の最前線と応用、山田 淳 監修、第8章生体計測・生体応用、p181-190、シーエムシー出版、2013
3. 新留琢郎、遺伝子医学 MOOK 別冊、ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線、古くて新しいドラッグデリバリーシステム (DDS)、田畑泰彦編集、第4章3、近赤外光、p334-338、メディカルドゥ、2013
4. 新留琢郎、ドラッグデリバリーシステムの新展開 II-核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術、永井恒司、岡田弘晃 監修、第6章 DDS の新たな可能性、金ナノロッドの DDS テクノロジー、p235-241、シーエムシー出版、2012
5. 新留琢郎、金ナノロッドのフォトサーマル効果を利用したドラッグデリバリーシステム、オレオサイエンス、14、17-21 (2013)
6. 新留琢郎、近赤外光によりコントロールできる薬物放出、薬学雑誌、133、369-372 (2013)
7. 新留琢郎、金ナノロッドと近赤外光を組み合わせた新しい治療技術、光学、41、568-572 (2012)
8. D. Pissuwan, T. Niidome, Gold nanoparticles for the development of transdermal delivery systems, ACS Symposium Series, Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine and Bioelectronic Devices, Volume 2, Chapter 5, 69-80 (2012)
9. D. Pissuwan, T. Niidome, M. B. Cortie, The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems, *J. Controlled Release*, **149**, 65-71 (2011)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計1件)

1. 名称:核酸デリバリー方法および核酸デリバリーデバイス
発明者:新留琢郎、和田富美夫、片山佳

樹、薬丸康介、河野喬仁、山下修蔵
権利者:国立大学法人九州大学、株式会社日本ステントテクノロジー

種類:特許

番号:特許第5105600

取得年月日:2012年10月12日

国内外の別:国内

[その他]

1. ホームページ等
<http://www.chem.kumamoto-u.ac.jp/~niidome>
6. 研究組織
(1)研究代表者
新留 琢郎 (NIIDOME TAKURO)
熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号:20264210
(2)研究分担者
なし
(3)連携研究者
片山 佳樹 (KATAYAMA YOSHIKI)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号:70284528

市川 和洋 (ICHIKAWA KAZUHIRO)
九州大学・レドックスナビ研究拠点・教授
研究者番号:10271115