

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成23年度～平成24年度

課題番号：23710268

研究課題名（和文）多重共鳴NMR法を用いた生体内化学反応プロセスの動的挙動解析

研究課題名（英文）Analysis of In Situ Chemical Reaction Dynamics by a Multiple Resonance NMR Technique

研究代表者

山田 久嗣 (YAMADA HISATSUGU)

京都大学・先端医工学研究ユニット・助教

研究者番号：80512764

研究成果の概要（和文）：

核磁気共鳴(NMR/MR)技術は、生体内での化学反応をその場解析可能な有望な手法である。本課題では、(1) 三重共鳴NMR法をin vivo代謝反応解析に応用して、抗がん剤の副作用発現に関連するウラシル異化代謝反応のその場解析に成功した。(2) 高感度化多重共鳴分子プローブとして二重ラベル化生体適合性高分子プローブ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC)を開発した。マウス肝臓組織抽出液中において、本プローブの ^1H - $\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴シグナルのみが選択的に検出されること、またそのシグナル感度がnMオーダーに達することを明らかにした。(3) 多重共鳴NMR法をMR画像化法に応用した結果、内在性ノイズシグナルを抑制し $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPCのみの多重共鳴MR画像化に成功した。

研究成果の概要（英文）：

NMR/MR is one of the most promising techniques for the in situ analysis of specific biochemical (metabolic) reactions, both *in vitro* and *in vivo*. In this research, we revealed that (1) one-dimensional triple-resonance NMR is applicable to metabolic analysis of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -labeled uracil, (2) integration of stable isotopes into the biocompatible polymer-tag ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC) enabled observation of the selective triple resonance NMR signal of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC at a nano-molar level in a mouse liver lysate, and (3) application of a multiple resonance NMR technique to a MR imaging allows us to obtain the selective MR image of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC without endogenous noise signal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：細胞内化学反応・多重共鳴NMR・分子プローブ・NMRイメージング

1. 研究開始当初の背景

生体内では酵素反応や代謝反応など様々な化学反応が集積し、一連の生体反応を構成している。これら生体内での化学反応プロセスを「その場」で「そのままの状態」で追跡する手法の開発は生体機構や発病機構の解明に大きく寄与する。その手法として、観たい反応基質である「分子プローブ」を駆使した生体イメージング技術が近年精力的に研究されている。中でも、核磁気共鳴(NMR)技術は、低侵襲かつ個体深部の観察に優れて

おり、実際に、水の緩和過程を測定する磁気共鳴イメージング(MRI)として臨床現場で利用されている。

生体内で「標的分子(分子プローブ)」そのものを ^1H NMR観測できれば、生体深部の化学プロセスを低侵襲で「その場」観測できる非常に有用な技術になると考えられる。しかし、 ^1H 核(水の ^1H 核)を観測する通常のMRIでは、生体内に膨大に存在する水や脂質の ^1H 核の中から、「分子プローブ」のシグナルを選択的にかつ感度良く検出すること

は極めて困難であった。生体内での化学反応プロセスを「その場」で「そのままの状態」で追跡する NMR イメージング法の開発には、選択性と感度の問題を克服する必要があった。

選択性の問題を解決するために研究代表者は、蛋白質構造解析の分野で広く用いられている「多重共鳴 NMR 法」に着目した。多重共鳴 NMR 法は、 ^1H 核の磁気共鳴シグナルを隣接する NMR 活性な核 (^{13}C , ^{15}N 核) へと磁化移動させ、結合状態にある ^1H 核のシグナル (^1H - ^{13}C - ^{15}N 配列の ^1H 核) のみを選択的に観測する手法である。また、 ^1H - ^{13}C - ^{15}N 配列の天然存在比率は 0.004% と極わずかである。従って、 ^1H - ^{13}C - ^{15}N 配列を有する分子プローブを外部から投与すれば、膨大な内在性夾雑物の中からプローブ由来のシグナルを高選択的に観測できると考えた。

一方、NMR の最大の弱点は本質的に検出感度が低いことである。上記の多重共鳴法を活用しても分子プローブ自体の感度が低ければ、そのシグナルを MR 画像化することは難しい。しかし、シグナル発信部位としての ^1H - ^{13}C - ^{15}N を集積化 (高分子化) することにより一分子当たりの感度を向上させることは可能であろうと考えた。

このような背景を踏まえ、本研究では検討課題として下記の2つを提案した。多重共鳴 NMR 法を用いて、生体内における化学 (代謝) 反応過程を超選択的に解析できる新規代謝物プローブの開発と多重共鳴 NMR スペクトロスコーピーから NMR イメージングへの展開が可能な高い選択性と高い感度を有する新規分子プローブの開発である。

2. 研究の目的

本研究の究極的な目標は、生体内での化学反応プロセスを「その場」で「そのままの状態」で追跡する NMR イメージング手法の開発である。しかしそれを達成するために、まず本研究課題では、期間内での短期目標として下記の2課題を設定した。すなわち、「分子プローブ」を選択的に観測できる「多重共鳴 NMR 法」を応用した ①「生体内代謝プロセスの”その場”追跡およびその代謝反応に及ぼす薬剤効果の直接解析法の構築」、②「高感度多重共鳴 NMR 解析および多重共鳴 MR イメージングのための新規分子プローブの開発」を目的とした。

3. 研究の方法と 4. 研究成果

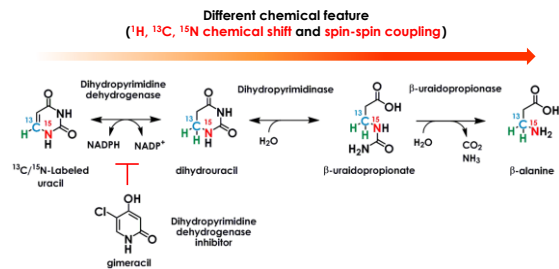
(1) 多核多重ラベル化ウラシルの異化代謝反応および臨床薬剤効果の多重共鳴 NMR 解析

^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴法をピリミジン系抗がん剤の副作用発現に関連するウラシル異

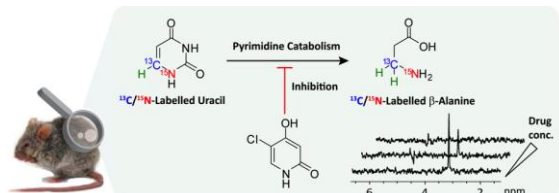
化代謝反応に応用した。

ウラシルは同化代謝 (核酸合成) されるのとともに、異化代謝を受けて β -アラニンに変換される。基質であるウラシルと代謝物である β -アラニンはともに “ $\text{H}-\text{C}-\text{N}$ ” の結合をもつが、その化学シフトやカップリング定数 (J_{CH} , J_{CN}) はそれぞれ異なる。

そこで、我々はウラシルの 6 位の炭素を ^{13}C 核に、1 位の窒素を ^{15}N 核で標識した $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル化ウラシルを異化代謝追跡用の分子プローブとして設計した。すなわち、このプローブの異化代謝反応を、化学シフトとカップリング定数を最適化した ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 NMR でモニターすれば、基質 (ウラシル) と代謝物 (β -アラニン) を化合物選択的に追跡できると考えた。



実際に、異化代謝酵素が多数含まれるマウス肝臓組織抽出液中でのラベル化ウラシルの異化代謝反応を ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 NMR 法を用いて解析した。その結果、 β -アラニン選択的三重共鳴 NMR では代謝物である β -アラニンの ^1H シグナルのみが選択的に観測された。一方、ウラシル選択的三重共鳴 NMR では基質ウラシル由来の ^1H シグナルの減少が観察され、ウラシル \rightarrow β -アラニンへの異化代謝反応を基質/代謝物選択的に検出可能であることが示された。さらに、マウス体内での異化代謝反応を ^1H - $\{^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 NMR 法により検討した結果、この代謝が特異的に肝臓で起こること、臨床薬剤であるギメラシル (5-chloro-4-hydroxy-2-pyridone; ジヒドロピリミジン脱水素酵素阻害剤) がこの反応を阻害することが明らかとなった。



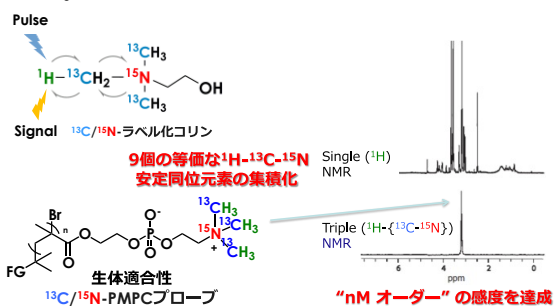
この $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 核を配置した基質分子プローブは同位体効果を除けば、天然物と同一構造である。本結果は、生体内での代謝過程および薬剤活性の生体擬似的解析の可能性を示すとともに、対象となる生体内物質の化学反応を非侵襲的に追跡可能な新しいアプローチへの展開も期待できるものである。

(2) 多重共鳴 NMR シグナル高感度化に向け

た $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル化生体適合性高分子プローブの開発

$^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 NMR / MR イメージングへの展開が可能な高い選択性と高い感度を有する新しい分子プローブとして、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ 核でラベルした生体適合性高分子プローブを開発した。細胞膜脂質の一部であるホスホリルコリンを側鎖にもつ $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ラベル化生体適合性高分子プローブ ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ポリ-2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン; $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC) を原子移動ラジカル重合法により合成した。

実際に、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC プローブ (分子量 $M_n = 18000$) の $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴シグナル強度は、同濃度のラベル化モノマーのシグナル強度の約 40 倍に増大し、30 nM の低濃度においても高感度で検出可能であることが実証された。また、マウス肝臓組織抽出液中においては $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC の $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴シグナルのみが選択的に検出され、そのシグナル感度が nM オーダーに達することを明らかにした。また、この高分子プローブは、末端の保護基を除去してマレイミド基に変換すれば、タンパク質や抗体を「タグ化」して標的指向性をもつ分子プローブに拡張できることも利点である。現在、 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC を用いて乳癌特異的抗 Her2 部分抗体を修飾することに成功し、標的指向性を有する分子プローブへの展開を進めている。



さらに、多重 (三重) 共鳴 NMR 法のパルス系列と MRI の高速スピンエコー法を融合することにより、 $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴 MRI 法の開発に成功し、上述の $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC の溶液レベル (*in vitro*)、組織レベル (*ex vivo*)、さらに動物レベル (*in vivo*) での三重共鳴 MR 画像の取得に世界で初めて成功した。

具体的には、分子プローブ由来の ^1H 核を $^1\text{H}\{-^{13}\text{C}\text{-}^{15}\text{N}\}$ 三重共鳴法により選択・抽出した上で、その空間分布を可視化するために、微弱な信号の検出が必要な *in vivo* MRI に向けて、その高速化により短縮した時間を信号積算に利用する信号雑音比 (SNR) の改善、さらに撮像に時間を要する 3D MRI への拡張を念頭に、高速撮像法を組み込んだ。本手法により、 ^1H のみを観測する従来の磁気共鳴画像化 (MRI) 法における重大な問題であ

った生体内の水や脂質など、内在性ノイズシグナルの完全除去を達成し、安定同位元素ラベル化分子プローブのみの画像化に成功した。さらに、生体適合性 $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -PMPC プローブが EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention Effect) により、マウス腫瘍部位に選択的に集積している様子を *in vivo* で画像化することにも成功した。

本結果で得られた多重磁気共鳴画像化法を用いれば、水の緩和に基づく通常の ^1H MRI 法とは異なり、多重共鳴 MRI システムという1つのモダリティのみで、従来の位置情報に加えて、病態 (がん部位) や代謝などの機能が追跡可能である。この結果は、医療分野への展開も期待できるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件) 全て査読有

- ① Komatsu, H.; Yoshihara, K.; Yamada, H.; Kimura, Y.; Son, A.; Nishimoto, S.; Tanabe, K. “Ruthenium Complexes with Hydrophobic Ligands that are Key Factors for Optical Imaging of Physiological Hypoxia” *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*(6), 1971–1977. DOI: 10.1002/chem.201202809
- ② Ito, T.; Hamaguchi, Y.; Tanabe, K.; Yamada, H.; Nishimoto, S. “Transporting Excess Electrons along Potential Energy Gradients Provided by 2'-Deoxyuridine Derivatives in DNA” *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*(30), 7558–7561. DOI: 10.1002/anie.201202141
- ③ Yamada, H.; Mizusawa, K.; Igarashi, R.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Tabata, Y.; Kimura, Y.; Kondo, T.; Aoyama, Y.; Sando, S. “Substrate/Product-Targeted NMR Monitoring of Pyrimidine Catabolism and Its Inhibition by a Clinical Drug” *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*(3), 535–542. DOI: 10.1021/cb2003972
- ④ Yamada, H.; Kurata, M.; Tanabe, K.; Ito, T.; Nishimoto, S. “Synthesis and Photooxidation of Oligodeoxynucleotides Containing 5-Dimethylaminocytosine as an Efficient Hole-Trapping Site in the Positive-Charge Transfer through DNA duplexes” *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*(10), 2035–2043. DOI: 10.1039/c2ob06642d
- ⑤ Yamaguchi, K.; Ueki, R.; Yamada, H.; Aoyama, Y.; Nonaka, H.; Sando, S. “In Situ Analysis of [8- ^{13}C -7- ^{15}N]-Double-Labelled Theophylline by a Triple Resonance NMR Technique” *Anal. Methods* **2011**, *3*(7), 1664–1666. DOI: 10.1039/c1ay05100h
- ⑥ Tanabe, K.; Yamada, H.; Nishimoto, S.

“Preparation of Functionalized Oligodeoxynucleotides and Photochemical One-Electron Oxidation of 5-Methylcytosine in DNA” *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2011**, 69(7), 814–822.

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 長谷川嘉則、山田久嗣、木村 祐、枋尾豪人、白川昌宏、杉原文徳、今井宏彦、高山裕生、松田哲也、矢野哲哉、山東信介、青山安宏、年光昭夫、近藤輝幸、”安定同位元素を集積化した生体適合性高分子プローブの合成と多重共鳴 NMR 法による機能評価”、第 2 回 CSJ Festa、2012 年 10 月 16 日、東京工業大学、東京
本発表に対し、優秀ポスター賞を受賞
- ② 山田久嗣、長谷川嘉則、木村 祐、枋尾豪人、白川昌宏、矢野哲哉、山東信介、青山安宏、近藤輝幸、”高感度多重共鳴 NMR に向けた安定同位体ラベル化高分子タグの開発”、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム、2012 年 9 月 6 日、北海道大学、札幌、北海道
本発表に対し、第 6 回バイオ関連化学シンポジウム講演賞を受賞
- ③ Yamada, H.; Mizusawa, K.; Igarashi, R.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Tabata, Y.; Kimura, Y.; Kondo, T.; Aoyama, Y.; Sando, S. “Triple resonance NMR in application to in situ monitoring of targeted metabolic reaction and its inhibition by a clinical drug”, 244th ACS National Meeting, August, 21, 2012, Philadelphia, PA
- ④ 山田久嗣、水澤圭吾、五十嵐龍二、枋尾豪人、白川昌宏、田畑泰彦、木村祐、近藤輝幸、青山安宏、山東信介、”基質/代謝物選択的 NMR を応用した生体内代謝プロセスの直接追跡と薬剤活性のその場評価”、第 92 回日本化学会春季年会、2012 年 3 月 26 日、慶応大学、横浜、神奈川
本発表に対し、日本化学会第 92 春季年会優秀講演賞(学術)を受賞
- ⑤ Yamada, H.; Mizusawa, K.; Igarashi, R.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Tabata, Y.; Kimura, Y.; Kondo, T.; Aoyama, Y.; Sando, S. “Direct In Situ Monitoring of Pyrimidine Catabolism and Its Inhibition Using Triple Resonance NMR Analysis”, 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, November, 10, 2011, Hokkaido Univ., Sapporo, Japan

など

〔図書〕(計 1 件)

- ① 山田久嗣、「生体内代謝プロセスの多重共

鳴 NMR モニタリングと多重共鳴 MRI に展開可能な高感度化分子プローブの開発」、(公社)日本化学会 生体機能関連化学部会 ニュースレター vol. 27, No.3, 17–20, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称：多核多重核磁気共鳴画像化方法
発明者：近藤輝幸、青山安宏、山田久嗣、今井宏彦、高山裕生、長谷川嘉則、木村祐、枋尾豪人、白川昌宏、杉原文徳、年光昭夫、松田哲也、山東信介
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-45724
出願年月日：平成 25 年 3 月 7 日
国内外の別：国内

名称：重合体、前記重合体を用いた核磁気共鳴分析用または磁気共鳴イメージング用の造影剤、化合物、前記重合体を用いた核磁気共鳴分析方法および磁気共鳴イメージング方法
発明者：近藤輝幸、青山安宏、山田久嗣、長谷川嘉則、枋尾豪人、木村祐、白川昌宏、杉原文徳、松田哲也、山東信介、南昌人、山内文生、矢野哲哉、都築英寿
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-118061
出願年月日：平成 24 年 5 月 23 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.probe.abe.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 久嗣 (YAMADA HISATSUGU)
京都大学・先端医工学研究ユニット・助教
研究者番号：80512764