

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300172

研究課題名(和文) 癌標的化タンパク質ナノカプセルによるマルチモーダル分子イメージング

研究課題名(英文) Protein Nanocages-Conjugated Magnetic Resonance Contrast Agents Displaying High Relaxivity and Tumor Selectivity.

研究代表者

村田 正治 (Murata, Masaharu)

九州大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：30304744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：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ている。なかでも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。MRI造影剤の利用は病変部位の明瞭な描画のために必要不可欠の手段となりつつある。しかし癌など特定の疾患に対する特異性は低く、未だ開発途上と言わざるを得ない。本研究では、タンパク質ベースのナノ構造体を作製することで、高感度化と癌部への分子標的化を両立する新しいナノカプセル型MRI機能化造影剤の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, small heat shock protein 16.5 (Hsp16.5)-based nanocages conjugated with gadolinium(III)-chelated MRI contrast agents were developed for the diagnosis of pancreatic cancer. Nanocages with one to four hydrophobic domains were designed to investigate whether template size influences relaxivity. MRI data showed that larger nanocages have higher T1 relaxivities than smaller nanocages as a result of 1) a reduction in molecular tumbling rates caused by an increase in nanocage size and 2) a robust cage structure resulting from the introduction of hydrophobic domains. The introduction of iRGD peptides that specifically target neuropilin-1 enabled the selective binding of nanocages to pancreatic cancer cells. Therefore, this iRGD-modified Hsp16.5 nanocage displays great potential as a highly specific and sensitive MRI contrast agent for the diagnosis of pancreatic cancer.

研究分野：医工学 ナノ材料

キーワード：分子イメージング ナノ材料 MRI

## 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。なかでも MRI (magnetic resonance imaging) 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。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。最近では Open 型 MRI 装置の登場により、単なる検査機器ではなく、治療も含めた有用性の高い手技として大きく発展している。しかし MRI には、病巣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。また撮像には患者をガントリ内に入れる必要があり、術中リアルタイムに摘出部位の位置を確認するには適していない。そこで本研究では診断の精度と感度を向上させ、疾患の治療効果を上げるために、これまでの造影剤とは一線を画する新しいマルチモーダル型イメージング造影剤の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

MRI の国内設置台数はすでに 5000 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。ハードとソフト両面における MRI 装置の進歩は、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 MRI 造影剤である。既に、肝臓、脾臓、そして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。しかし現在臨床で使用されている MRI 造影剤は、癌など特定の疾患に対する特異性は低く、未だ開発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物質や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、タンパク質ベースのナノカプセルを用いる (図 1)。このバイオナノカプセルは内孔 (内径 10nm) を有する球状構造体 (24 量体 m) 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。昨年度の MRI 感度の高感度化に引き続いて、本年度は脾臓がんへの特異性向上について検討した。

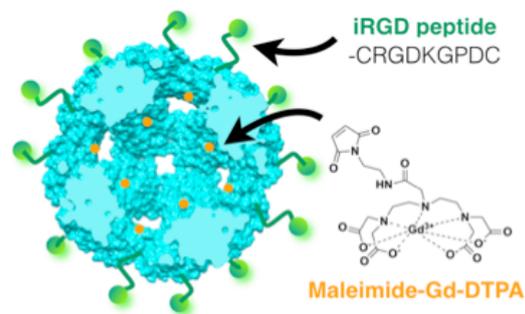


図 1 ナノカプセル型 MRI 造影剤の概念図

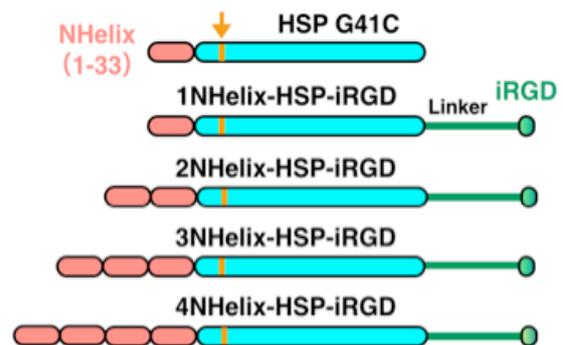


図 2 iRGD ナノカプセルのドメイン構造

## 3. 研究の方法

### ナノカプセル型 MRI 造影剤の形態観察

iRGD ペプチドを表面に有する N 末端ヘリックスリピート体を大腸菌から発現・精製した。これを 2% 酢酸ウラニルで染色し、透過型電子顕微鏡 (TECNAI 20 + Eagle 2k CCD camera (FEI, Hillsboro) 加速電圧 200 kV) で観察した。

#### ナノカプセル型 MRI 造影剤の特異性評価

ナノカプセル型造影剤の膵がん細胞への特異性をフローサイトメトリで評価した。ヒト膵癌由来細胞株である AsPC-1、Suit-2 そして対照としてヒト子宮頸がん細胞株 Hela を 6well の m-Slides に  $1 \times 10^4$  cells/well となるよう播種した。これを 10vol% FBS、抗生物質(100 U/mL ペニシリン, 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン, 0.25  $\mu$ g/mL アムホテリシン-B)を添加した DMEM 培地 (DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM)を用い、37°C、5%CO<sub>2</sub> 雰囲気にて培養した。一昼夜培養した後、培地交換し、終濃度 1 $\mu$ M (蛍光色素基準) の Alexa488 ラベル化 iRGD ナノカプセルを添加し、そのまま 6 時間培養を続けた。ナノカプセルの細胞への取り込みはフローサイトメトリ (SONY EC800)を用いて評価した。

また MRI 造影能は 1.5T の場合は、VivoLVA (Japan REDOX, Fukuoka, Japan)、9.4 T の場合は BioSpec Bruker spectrometer (Bruker)をそれぞれ使用して測定した。

#### 4. 研究成果

##### ナノカプセル型 MRI 造影剤の物性評価

精製したナノカプセル型造影剤を電子顕微鏡で観察したところ、昨年度の動的光散乱 (DLS) の結果と同様、すべてのカプセルがナノサイズの粒子であることが分かった (図 3)。そのサイズは N 末端ヘリックスのリピート数と共に増大し、1~4 リピート体の平均粒径はそれぞれ、16.8、19.5、30.1 そして 37.1nm であった。この結果は、N 末端ヘリックスのリピート数を増やすことでナノカプセルのサブユニットの間の会合度が上昇する可能性を示した。

##### ナノカプセル型 MRI 造影剤の膵がん特異性

昨年度までに N 末端ヘリックスがリピート (1~4 回) したクローンを作製し、そのリピート数の上昇とともに MRI の感度が向上することを見出した。さらにその外表面にリンカー分子を介して iRGD ペプチド (GCRGDKGPDC) を導入した。iRGD ペプチドは膵がん等で発現が亢進している Neuropilin-1 に特異性を有する。またそれを

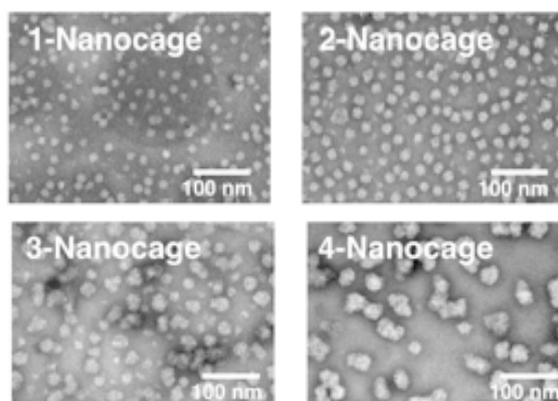


図 3 膵がん特異性を有するナノカプセル型 MRI 造影剤の透過型電子顕微鏡像

つなぐリンカー長はナノカプセルの特異性に影響することも明らかとなっており、我々はその成果をもとにしてリンカー長を最適化した。そこで本年度は膵がんへの集積性について定量的に評価した。

iRGD ペプチドを表面に有する N 末端ヘリックスリピート型ナノカプセルの内孔に蛍光分子をコンジュゲートし、ヒト膵癌由来細胞株である AsPC-1、Suit-2

そしてヒト子宮頸がん細胞株 Hela に対する特異性を評価した。フローサイトメトリおよび蛍光顕微鏡観察の結果、ナノカプセルは二つの膵がん由来細胞株 (AsPC-1、Suit-2) に対してより効率的に取り込まれ、Hela 細胞にはほとんど取り込まれていないことが分かった (図 4A~D)。この結果は、ナノカプセル表面に呈示された iRGD ペプチドの効果であろう。実際、iRGD ペプチドの標的分子である Neuropilin-1 の発現量は、二つの膵がん由来細胞株 AsPC-1 と Suit-2 において有意に高く、さらにナノカプセルのこれらの細胞株による取り込みは、合成 iRGD ペプチドの添加によって効果的に阻害された (図 4E、F)。これらの結果は、ナノカプセル表面の iRGD ペプチドが膵がん表面で高発現している Neuropilin-1 に対する特異的なリガンド分子として機能していることを示している。

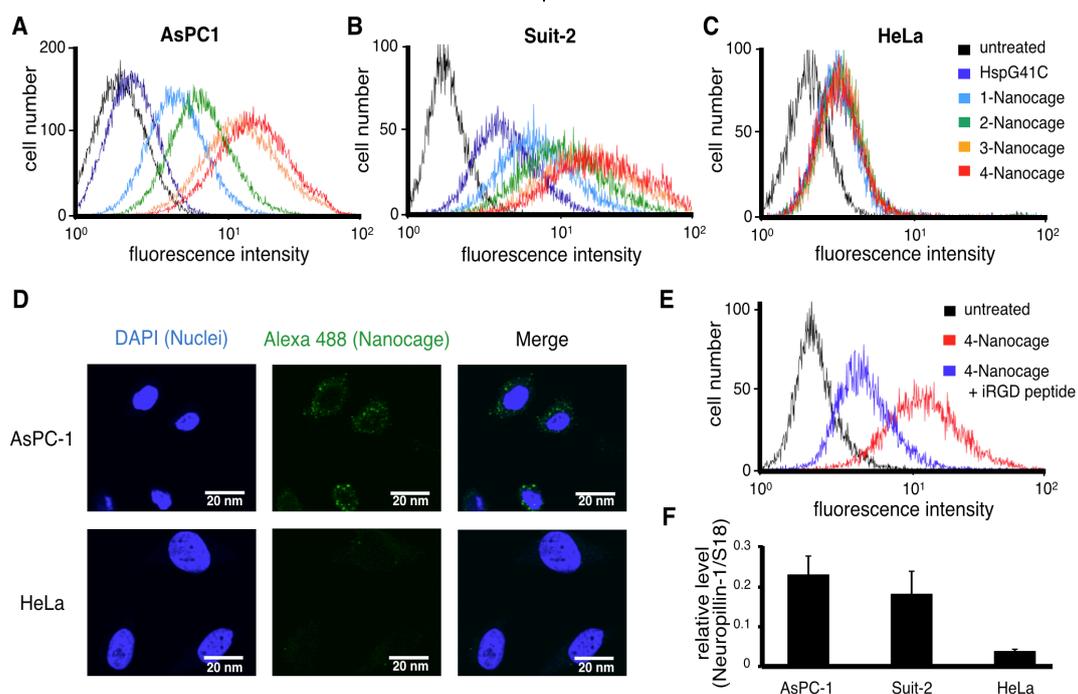


図4 ナノカプセル型MRI造影剤の膵がん特異性評価

## 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 9件)

1. Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida, Takashi Murakami, Makoto Hashizume, “Design and function of engineered protein nanocages as a drug delivery system for targeting pancreatic cancer cells via neuropilin-1”, *Molecular Pharmaceutics*, **12**, 1422-1430(2015).
2. Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jing Shun Piao, Sayoko Narahara, Nobuhito Hamano, Jeong-Hun Kang, Makoto Hashizume, “Systemic Delivery of Protein Nanocages Bearing CTT Peptides for Enhanced Imaging of MMP-2 Expression in Metastatic Tumor Models”, *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 148-158(2015).
3. Masaharu Murata, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Ryo Ugawa, Makoto Hashizume, “Expression and characterization of myristoylated preS1-conjugated nanocages for targeted cell delivery”, *Protein Expression and Purification*, **110**, 52-56(2015).
4. Koichi Kitaguchi, Naoya Hanamura, Masaharu Murata, Masahiko Hashimoto, and Kazuhiko Tsukagoshi, “Tube Radial Distribution Phenomenon with a Two-phase Separation Solution of a Fluorocarbon and Hydrocarbon Organic Solvent Mixture in a Capillary Tube and Metal Compounds Separation”, *Analytical Sciences*, **30**, 687-690(2014).
5. Yoshinori Fujimura, Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Daiki Setoyama, Miho Irie, Daisuke Miura, Hiroyuki Wariishi, Masaharu Murata, Kazuhiro Mizumoto, Makoto Hashizume, Masao Tanaka, “Mass Spectrometry-Based Metabolic Profiling of Gemcitabine-Sensitive and Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells”, *Pancreas*, **43**, 311-318(2014).
6. Daisuke Asai, Riki Toita, Masaharu Murata, Yoshiki Katayama, Hideki Nakashima, and Jeong-Hun Kang, “Peptide substrates for G protein-coupled receptor kinase 2”, *FEBS Letters*, **58**, 2129-2132 (2014).

7. Megumu Mori, Toru Chiba, Akira Nakamizo, Ryuichi Kumashiro, Masaharu Murata, Tomohiko Akahoshi, Morimasa Tomikawa, Yuichirou Kikkawa, Koji Yoshimoto, Masahiro Mizoguchi, Tomio Sasaki, Makoto Hashizume, “Intraoperative visualization of cerebral oxygenation using hyperspectral image data: a two-dimensional mapping method”, *International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery*, **9**, 1059-1072(2014).
8. Jeong-Hun Kang, Riki Toita, Daisuke Asai, Tetsuji Yamaoka, and Masaharu Murata, “Liver cell-specific peptides derived from the PreS1 domain of human hepatitis B virus”, *Journal of Virological Methods*, **201**, 20-23(2014).
9. Jeong-Hun Kang, Riki Toita, Daisuke Asa, Tetsuji Yamaoka, Masaharu Murata, “Reduction of inorganic phosphate-induced human smooth muscle cells calcification by inhibition of protein kinase A and p38 mitogen-activated protein kinase”, *Heart and Vessels*, **29**, 718–722(2014)

[学会発表] (計 13 件)

1. 村田 正治、檜原 佐由子、朴 晶淑、河野 喬仁、濱野 展人、大内田 研宙、橋爪 誠、組み換え型タンパク質ナノカプセルによる膵癌への DDS, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014/5/30, 名古屋国際会議場
2. 河野 喬仁、村田 正治、朴 晶淑、檜原 佐由子、大内田 研宙、橋爪 誠、カドリニウム錯体内包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, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014/5/29 名古屋国際会議場
3. 濱野 展人、村田 正治、河野 喬仁、檜原 佐由子、朴 晶淑、大内田 研宙、橋爪 誠、脳標的型タンパク質カプセルの開発, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014/5/29 名古屋国際会議場
4. Kawano T, Murata M, Hsp16.5 Protein Nano-Cages Conjugated Magnetic Resonance Contrast Agents with High

Efficient Relaxivity Properties, 第 41 回 Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2014/7/15 Hilton Chicago

5. Hamano N, Murata M, Molecular design and biological evaluation of brain-targeting protein cage, 第 41 回 Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2014/7/15 Hilton Chicago
6. Murata M, Targets Drug Delivery Using Genetically Engineered Protein Nanocage for Pancreatic Cancer, 2nd Annual Conference on International Translational Nanomedicine, 2014/7/26 Northeastern 大学
7. 村田 正治、河野 喬仁、檜原 佐由子、朴 晶淑、濱野 展人、橋爪 誠、低侵襲医療に向けたタンパク質ナノカプセル型機能化造影剤の開発, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014/7/31 慶應義塾大学・薬学部
8. 河野 喬仁、村田 正治、朴 晶淑、檜原 佐由子、濱野 展人、大内田 研宙、橋爪 誠、タンパク質ナノカプセルを用いた高感度膵癌標的化 MRI プローブ, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014/7/31 慶應義塾大学・薬学部
9. 濱野 展人、村田 正治、河野 喬仁、朴 晶淑、檜原 佐由子、大内田 研宙、橋爪 誠、脳内デリバリーを可能とする AchR 標的化タンパク質ナノカプセルの開発, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014/7/31 慶應義塾大学・薬学部
10. 檜原 佐由子、村田 正治、朴 晶淑、河野 喬仁、濱野 展人、大内田 研宙、橋爪 誠、膵癌を標的化したタンパク質ナノカプセルの機能評価, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014/7/31 慶應義塾大学・薬学部
11. 朴 晶淑、村田 正治、檜原 佐由子、河野 喬仁、濱野 展人、大内田 研宙、橋爪 誠、タンパク質ナノカプセルによる肝実質細胞のターゲティング, 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 2014/7/31 慶應義塾大学・薬学部

12. Murata M, Narahara S, Piao J,Kawano T,  
Hamano N, Hashizume M, Genetically  
engineered nano-cage for targeted drug  
delivery, 15th Tetrahedron Symposium  
Asian Edition, 2014/10/30 Singapore  
EXPO
13. 濱野 展人, 村田 正治, 河野 喬仁,  
檜原 佐由子, 朴 晶淑, 大内田 研宙,  
橋爪 誠, 脳を標的とした RVG ペ  
プチド修飾タンパク質ナノキャリア  
の開発と機能評価, 日本薬学会 第  
135 年会, 2015/3/26 神戸サンホール

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：ナノカプセル、組成物、ポリヌクレ  
オチド、組換えベクター及び形質転換体

発明者：村田 正治、橋爪 誠

権利者：九州大学

番号：PCT/JP2014/057776

出願年月日：2014 年 3 月 20 日

国内外の別：海外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cmeit.org>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

村田正治 (MURATA MASAHARU)

九州大学先端融合医療レドックスナビ

研究拠点・准教授

研究者番号：30304744

### (2)連携研究者

橋爪 誠 (HASHIZUME MAKOTO)

九州大学大学院医学研究院・教授

研究者番号：90198664

河野 喬仁 (TAKAHITO KAWANO)

九州大学先端融合医療レドックスナビ

研究拠点・特任助教

研究者番号：90526831

濱野展人 (NOBUHITO HAMANO)

九州大学先端医療イノベーションセン

ター

研究拠点・特任助教

研究者番号：80708397