

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25288061

研究課題名(和文) 超高緩和性・高安定性・ターゲティング能を有する革新的MRIコントラスト剤

研究課題名(英文) MRI contrast agents for high relaxivity, kinetic stability, and targeting

研究代表者

壹岐 伸彦 (Iki, Nobuhiko)

東北大学・環境科学研究科・教授

研究者番号：50282108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：核磁気共鳴イメージング(MRI)測定では感度とコントラストを向上させる造影剤(CA)としてガドリニウム(Gd)-ポリアミノカルボン酸錯体が多用されるが、感度の頭打ち、腎性全身性線維症の問題が指摘されている。そこで緩和能を向上させ、安定かつターゲティング可能な革新的CAとしてサンドイッチ型多核錯体Gd3TCAS2を提案する。本研究ではその生成、構造、緩和能を評価し、革新的コントラスト剤設計指針を得た。

研究成果の概要(英文)：In about 30% of magnetic resonance imaging (MRI), contrast agents (CAs) are used aiming at enhancing the sensitivity and contrast. Currently, Gd complexes of poly (aminocarboxylate) are commonly used, which however have limitation of sensitivity and side effects known as nephrogenic systemic fibrosis. Here we propose a new molecular motif of CA, Gd3TCAS2, on the basis of a complex of tri-Gd cluster sandwiched between two thiacalixarene (TCAS) ligands. In this study, we elucidated the formation behavior of the trinuclear complex, solution structure, relaxivity of Gd3TCAS2 to lead to design of new CA.

研究分野：分析化学

キーワード：MRI 緩和能 造影剤 金属錯体 速度論的安定性 ターゲティング イメージング

1. 研究開始当初の背景

核磁気共鳴イメージング(MRI)は病態を可視化する画像診断法としてX線CTに次いで多用される。軟組織中の水プロトン¹Hの縦緩和時間 T_1 や横緩和時間 T_2 の差違を可視化する手法で、電離放射線を用いず侵襲性がない。分解能が25-300 μm と高いなどX線CTにはない特長を有している。しかし感度が低い(10^{-3} M $\sim 10^{-5}$ M)、時間がかかるなどの弱点がある。これを克服するのがコントラスト剤(contrasting agent, CA)である。すなわち常磁性緩和により T_1 、 T_2 を短縮して高感度化するものである。現状、MRI検査の3割強でGd-DTPAやGd-DOTAをCAとして使用している。しかしながらCAの緩和性能が低く(緩和性能 $r_1 = 5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度)、大量のCA投与が必要となる点にある(体重65 kgの場合1.2 gのGd)。体内でCAは Ca^{II} や Zn^{II} の攻撃に晒されて解離への推進力を受け、生成した遊離 Gd^{III} は毒性を示す(腎性全身性線維症NSFや Ca^{II} サイトへの Gd^{III} の結合による各種失調)。CAの毒性を軽減するためには速度論的安定性の極めて高い Gd^{III} 錯体の設計が必須であると同時に、リスク軽減の観点から投与量を低減できる超高感度のCAが必要である。一方、最近は特定病変部位へのターゲティング、病態機能イメージング、計測・治療の一体化(セラノスティクス)など、CAに求められる性能はますます高度化している。

2. 研究の目的

我々はこのような状況にあるCA設計の現状を打開すべく、高緩和性を有し、安定かつターゲティング可能な革新的コントラスト剤としてサンドイッチ型多核錯体 Gd_3TCAS_2 を候補として検討することとした。本錯体は Gd^{III} とチアカリックス[4]アレーン-*p*-テトラスルホン酸(TCAS)から自己組織的に生成する。本錯体は Gd^{III} -TCAS間の多重結合に基づき速度論的安定性が極めて高い、 Gd^{III} への配位水分子は2~3と多く錯体として最大9個の配位水分子を有しているなどGd-DTPAやGd-DOTAにはない特徴を持ち、超高感度かつ安定なCAの基体となると着想した。実際それらを凌駕する高い緩和性能を備えており、病変部位に微量(サブ μM)しか存在しない標的分子へのターゲティングへ道を拓く、つまり革新的CAとなると考えた。そこで本研究では分析化学、特に試薬設計の観点から Gd_3TCAS_2 を基体とする超高緩和性・高安定性・ターゲ

ティング能を有する革新的CAの設計原理確立を目的とし、超高感度CAの創製、ターゲティングMRI、Gd投与量の低減、環境負荷の低減など安全・安心・精確かつ環境負荷の少ない医療診断につなげる。これはDOTAやDTPA骨格に縛られてきたCA分子設計を解放し、分析化学・イメージング試薬設計に革新をもたらすものとなる。

3. 研究の方法

(1)ランタニド-サンドイッチ型多核錯体 Ln_3TCAS_2 の自己組織化挙動

Gd^{III} の他Pmを除くランタニドイオン Ln^{III} についてTCASと水溶液中で反応させ、その過程をHPLCでモニターした。ピークの同定にはエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)および吸光・蛍光を用いるモル比法で行った。

(2)水溶液中 Gd_3TCAS_2 構造の決定

水溶液中の Gd_3TCAS_2 および比較として構造のわかっている $\text{Ag}_2\text{Gd}_2\text{TCAS}_2$ および $\text{Ag}_4\text{Tb}_1\text{TCAS}_2$ についてX線吸収スペクトルを取得した。XAFS解析を行い、 Gd_3TCAS_2 の構造を決定した。

(3) Gd_3TCAS_2 の緩和能の評価

Gd_3TCAS_2 の緩衝溶液および人血清アルブミン(HSA)存在下で、反転回復法により縦緩和速度 $1/T_1$ を測定し、その Gd_3TCAS_2 濃度依存性から緩和能 r_1 を決定した。

(4) Gd_3TCAS_2 の速度論的安定性の評価

1.0 Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で $[\text{Zn}^{II}] = 0$ または0.1 mM、 $[(1/3)\text{Gd}_3\text{TCAS}_2] = 0.1 \text{ mM}$ とし、 T_1 の時間依存性を解析し、速度論的安定性を評価した。

(5)水交換速度の決定

重水 H_2^{17}O を添加した Gd_3TCAS_2 水溶液中にて水 ^{17}O の横緩和時間 T_2 を温度可変測定した。 T_2 から換算横緩和速度 R_2 を求め、その温度依存性を解析し、水交換速度 k_{ex} を算出した。

4. 研究成果

(1)ランタニド-サンドイッチ型多核錯体 Ln_3TCAS_2 の自己組織化挙動

pH 7.4および9.5で自己組織化挙動をモニターした。その結果、TCASはまず Ln^{III} と反応し1:1錯体 Ln_1TCAS_1 を生成し、ついで二分子の Ln_1TCAS_1 が反応して2:2錯体 Ln_2TCAS_2 を生成

する。最終的にそれが遊離のLn^{III}と反応してLn₃TCAS₂を与えることがわかった。この自己組織化挙動は非常に遅く、Ln^{III}の種類によるが完了するまでに1~4日かかった。pHとLn^{III}の種類によって微量のLn₁TCAS₁、Ln₂TCAS₂およびLn₄TCAS₂が副生成物として観測された。

(2)水溶液中Gd₃TCAS₂構造の決定

XANES領域について吸収スペクトルを比較したところGd₃TCAS₂の形状はAg₄Tb₁TCAS₂ではなくAg₂Gd₂TCAS₂の形状に類似していた。これはGd^{III}の配位環境(最近接配位領域にOおよびSが配位)の類似性を示唆している。実際、動径構造関数を得たところGd-OおよびGd-Sに帰属できるピークが確認できた。Fourier filteringしたEXAFSスペクトルに対し、各原子対を想定してフィットさせ、原子間距離を見積もった(Ln-O = 2.42, Ln-S = 3.03 Å)。これは類縁体Eu₃TCA₂の結晶構造解析で見られた結合距離の範囲内であり、溶液中でもサンドイッチ構造を維持していることを示している。

(3)Gd₃TCAS₂の緩和能の評価

pH 7.4のHEPES緩衝液中、37°C、0.47 TでGd₃TCAS₂の緩和能 r_1 を決定したところ $r_1 = 17.49 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。これは同条件下でのGd-DTPAの $r_1 = 4.30 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、Gd-DOTAの $r_1 = 4.20 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ よりかなり大きい値となった。ただしGd₃TCAS₂は1分子内に3個のGdを有しているためGdあたりのGd₃TCAS₂の緩和能は $r_1 = 5.83 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ となった。これはGd-DTPAやGd-DOTAの r_1 値より70%程大きな値であった。Gd錯体がHSAなどの高分子量の化合物に結合せず、高速に回転している状況では一般に緩和能は

$$r_1 \propto q\tau_R$$

となる。ここで q : 配位水分子数, τ_R : 回転相関時間である。Gd₃TCAS₂の緩和能が若干高かったのは $q = 2\sim 3$ であること、分子が大きく τ_R も大きいことによると考えられる。

ついで0.67mM (4.5% wt/vol)のHSA存在下Gd₃TCAS₂の緩和能を測定したところ、Gdあたり $r_1 = 16.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ と僅かに減少した。比較としてHSA結合能を有するMS-325について測定したところ、HSA非存在下で $r_1 = 6.0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、HSA存在下で $r_1 = 41.0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、HSAへの結合に際して大きな増大が見られた。Gd錯

体がHSAなど高分子量の物質に結合すると緩和能は一般に

$$r_1 \propto qk_{ex}$$

となる。ここで k_{ex} は水交換速度である。MS-325の場合、 $q = 1$ であるものの k_{ex} が大きく、 r_1 が増大したと考えられる。それに対しGd₃TCAS₂の場合 k_{ex} がかなり小さいことが示唆される。これは実際、以下の(5)で検討した k_{ex} の測定により裏付けられた。すなわち25°CにてMS-325の場合 $k_{ex} = 5.9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ であったがGd₃TCAS₂について、 $k_{ex} = 2.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ と2桁小さな値であった。これが r_1 が増大しなかった原因と考えられる。今後水交換速度を増大する分子設計が求められる。

(4)Gd₃TCAS₂の速度論的安定性の評価

反応開始直後、縦緩和速度 R_1 の若干の現象が見られたもののその後92%の値を維持した。44時間経過後もGd₃TCAS₂はほぼ解離しないことがわかった。リン酸イオンによる配位子置換反応について安定であることが伺える。また亜鉛存在下でも挙動は変わらず、金属置換反応についても安定であることがわかった。

(5)水交換速度の決定

Gd₃TCAS₂水溶液中での水¹⁷Oの換算横緩和速度 R_{2r} の温度依存性を調べたところ、高温になるにつれ R_{2r} 解析が増大するので、slow exchange regimeにある。よって R_{2r} への配位水¹⁷Oの横緩和時間 T_{2m} の寄与は無視できる。従って、

$$R_{2r} = 1/(T_{2m} + \tau_m) + R_{2OS} \approx k_{ex} + R_{2OS}$$

ここで R_{2OS} は外圏での横緩和速度である。以下の式

$$k_{ex} = 1/\tau_m = {}^{310}k_{ex}(T/310.15)\exp[(\Delta H^\ddagger/R)(1/310.15 - 1/T)]$$

および

$$R_{2OS} = {}^{310}R_{2OS}\exp[(\Delta E_{OS}^\ddagger/R)(1/T - 1/310.15)]$$

で R_{2r} の温度依存性をフィットし $^{310}k_{ex}/s^{-1} = (4.8 \pm 0.7) \times 10^4$, $\Delta H^\ddagger / kJ mol^{-1} = 35 \pm 3$, $^{310}R_{20s}/s^{-1} = 18000 \pm 6000$, $\Delta E_{OS}^\ddagger / kJ mol^{-1} = 30 \pm 8$ と決定した. これから $k_{ex} = 2.7 \times 10^4 s^{-1}$ (25°C)と求めた.

配位水分子の交換速度が小さい理由であるが, Gdの配位環境を原系・生成系とも8配位とすると, 活性化状態で9配位となる. 通常の錯体の場合Gd中心の配位環境をSquare antiprismからtri-capped trigonal prismに変化させ, 活性化エネルギーを低減化することができる. しかしGd₃TCAS₂の場合剛直な構造をしており, 配位環境を調整することができず, 活性化エネルギーが高くなると考えられる. これはGd₃TCAS₂が速度論的に安定である原因と同じであり, k_{ex} を増大させると速度論的安定性が失われる可能性に気をつける必要がある.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

① Topological modulation of the porous structure of a coordination polymer constructed from a flexible building block via framework-guest interaction during self-assembly, Atsuko Masuya-Suzuki, Nozomi Matsubara, Ryunosuke Karashimada, Hitoshi Hoshino and Nobuhiko Iki, *Cryst. Eng. Commun.*, 2016, 18, 872-876. 査読有

doi: 10.1039/C5CE01804H

② Thiacalixarene Assembled Heterotrinary Lanthanide Clusters Comprising Tb^{III} and Yb^{III} Enabling f-f Communication to Enhance Yb^{III}-centered Luminescence, Ryunosuke Karashimada and Nobuhiko Iki, *Chem. Commun.*, 2016, 52, 3139-3142. 査読有

DOI: 10.1039/C5CC09612J

③ Gd₃TCAS₂: An Aquated Gd³⁺-Thiacalix[4]arene Sandwich Cluster with Extremely Slow Ligand Substitution Kinetics, Nobuhiko Iki, Eszter Boros, Mami Nakamura, Ryo Baba, and Peter Caravan, *Inorg. Chem.*, 2016, **55** (8), 4000-4005. 査読有

DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b00241

④ High kinetic stability of Zn^{II} coordinated by the tris(histidine) unit of carbonic anhydrase

towards solvolytic dissociation studied by affinity capillary electrophoresis, Yosuke Sato, Hitoshi Hoshino, Nobuhiko Iki, *J. Inorg. Biochem.*, 161, 2016, 122-127. 査読有

DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2016.05.013

⑤ Self-assembly of a tri-lanthanide(III) core sandwiched between two thiacalix[4]arene ligands, Nobuhiko Iki, Tepei Tanaka, Shoichi Hiro-Oka, and Kozo Shinoda, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2016: 5020-5027. 査読有

DOI: 10.1002/ejic.201600762

⑥ Crystal Structure of the *cis*-Bis(3-*tert*-butyl-*o*-diiminobenzosemiquinonate)platinum(II) Complex, Atsuko Masuya-Suzuki and Nobuhiko Iki, *X-ray Struct. Anal. Online*, **32**, 41-43 (2016). 査読有

DOI: 10.2116/xraystruct.32.41

⑦ One-Pot Synthesis and Structural Characterization of a Tb(III) Coordination Polymer Based on a Tripodal Schiff Base Ligand Adopting an Exo-Bridging Coordination Mod, Atsuko Masuya, Chikai Igarashi, Masatoshi Kaneshato, Hitoshi Hoshino, Nobuhiko Iki, *Polyhedron*, **85**, 76-82 (2015). 査読有

⑧ Thermodynamics of binding of a sulfonamide inhibitor to metal-mutated carbonic anhydrase as studied by affinity capillary electrophoresis, Yosuke Sato, Hitoshi Hoshino, Nobuhiko Iki, *J. Inorg. Biochem.*, 150, 133-138 (2015). 査読有 doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.06.011

⑨ Regioselective synthesis of 1,2- and 1,3-diaminothiocalix[4]arenes via nucleophilic aromatic substitution and their X-ray structures Hiroshi Katagiri, Shinya Tanaka, Kazuya Ohkubo, Yuki Akahira, Naoya Morohashi, Nobuhiko Iki, Tetsutaro Hattori, Sotaro Miyano, *RSC Advances*, 4, 9608-9616 (2014). 査読有

[学会発表] (計3件)

① Nobuhiko Iki, Lanthanide Clusters Assembled by Thiacalixarene, Rare Earths 2016 in Sapporo, 北海道大学学術交流会館, 札幌市, 2016-6-6. 招待講演.

② Nobuhiko Iki, Eszter Boros, Mami Nakamura, Kozo Shinoda, Peter Caravan, Can Gd₃TCAS₂ be a New Motif of Contrast Agent for MRI? – Unexpected Slow Water Exchange Arising from

the Tri-Gd^{III} Cluster Sandwiched by Two TCAS Ligands (TCAS = Thiocalix[4]arene-*p*-tetrasulfonate), ICC41, Suntec Singapore Convention & Exhibition Centre, Singapore, 2014-07-23.

③ Nobuhiko Iki, Eszter Boros, Mami Nakamura, Kozo Shinoda, Peter Caravan, Can Gd₃TCAS₂ be a New Motif of Contrast Agent for MRI? – Unexpected Slow Water Exchange Arising from the Tri-Gd^{III} Cluster Sandwiched by Two TCAS Ligands (TCAS = Thiocalix[4]arene-*p*-tetrasulfonate), 247th ACS National Meeting and Exposition, Dallas, TX, USA, 2014-02-18.

[図書] (計 1 件)

① Thiocalixarenes, Chap. 13, N. Iki, In: P. Neri, L. J. Sessler, M-X. Wang, editors. Calixarenes and Beyond: Springer International Publishing; 2016. p. 335-362.

DOI: 10.1007/978-3-319-31867-7_13

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/hoshlab/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

壹岐 伸彦 (IKI, Nobuhiko)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号 : 50282108

(2)研究分担者

鈴木 敦子 (SUZUKI, Atsuko)

東北大学・大学院環境科学研究科・助教

研究者番号 : 10633464

高橋 透 (TAKAHASHI, Toru)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号 : 30361166

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

ピーター・キャラバン (CARAVAN, Peter)

ハーバード医科大学・マサチューセッツ総合病院・准教授