

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870359

研究課題名(和文) 生体適合性分子プローブを用いた生体組織修復および再生過程のイメージング

研究課題名(英文) Imaging of Tissue Regeneration and Tissue Engineering using Bioavailable molecular probes

研究代表者

木村 祐 (Kimura, Yu)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定准教授

研究者番号：90566027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞特異的に標識可能な造影剤の開発手法を明らかにするため、新規に開発した高感度Gd-磁気共鳴イメージング(MRI)造影剤に対し標識分子を結合させるための官能基導入を行い、還元処理部分抗体などとの反応によりキラルデンドリマトリアミン配位子-部分抗体およびポリエチレングリコール(PEG)複合体の合成に成功した。細胞特異的標識の検証を水晶発振子マイクロバランス法によって行い、抗原結合能が反応前後で変化しないことを確認した。さらに、培養細胞への標識能、動物における体内動態を確認した。これらの結果を通して、組織再生過程における細胞の動きを明らかにするための知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Novel Gadolinium (Gd)-Magnetic Resonance Imaging (MRI) probes with high-sensitivity were succeeded to synthesize and introduced with functional groups for conjugation of target ligands to specific cells. Complex molecules of novel Gd-MRI contrast agent and antibody fragment or polyethyleneglycol (PEG) was then obtained after the reaction of reduced antibody fragment and activated-PEG. The affinity of cell-specific labeling was evaluated with quartz crystal microbalance measurement and the no change of antigen-binding ability was confirmed before and after the conjugation of Gd-MRI contrast agent. Through evaluation of binding affinity to cultured cells and of body distribution after in vivo administration, many findings to clarify the cell distribution in tissue regeneration process were obtained.

研究分野：バイオイメージング・高分子化学

キーワード：分子プローブ デンドリマー 磁気共鳴イメージング MRI ガドリニウム

1. 研究開始当初の背景

これまで研究代表者は、脂肪組織、骨組織、血管など、種々の生体組織に関する修復および再生条件の探索とその評価を行ってきた。また最近では、分子イメージングプローブの合成に取り組み、新規高感度 Gd (ガドリニウム)-MRI (磁気共鳴イメージング) 造影剤や二種類の診断手法に適用可能なデュアルイメージングプローブの合成に成功し、特許も出願した。これら一連の研究において、生体組織の再生・新生時に、適切な足場材料と生体シグナル因子を用いることで、周辺部位に存在する前駆細胞を組織欠損部位に遊走、定着させ、細胞移植を伴わずに生体組織再生が可能であることを見出した。これらの研究は、生体シグナル因子を用いて周辺部および遠位な場所からの細胞の遊走、定着を促すことで、生体組織欠損の修復や再生が可能であることを示したものである。この知見をさらに深めるため、申請者が新たに得た分子プローブ合成に関する技術をもとに、上記現象に関わる細胞のリアルタイム動態観察にチャレンジした。

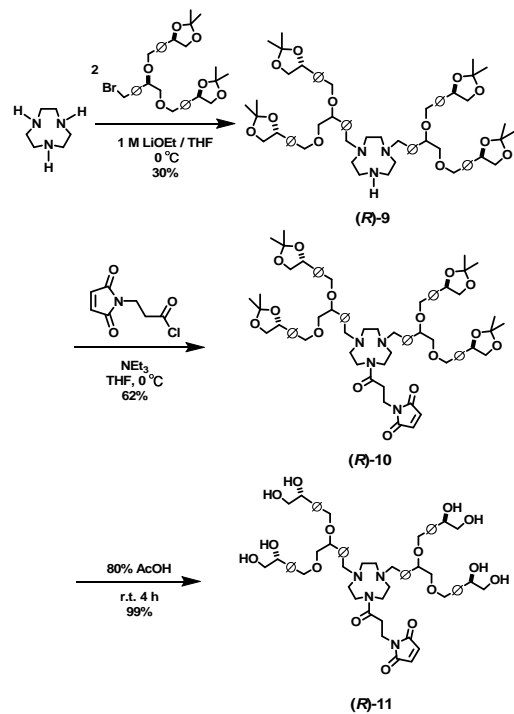
研究開始時までには、外部から移植した細胞の動態に関しては種々の研究が行われている。例えば、移植した骨髄由来細胞の創傷部位への集積 (Chamberlain, G. et al., *Stemcells*, 2007; 25: 2739-49) や、血管新生における造血幹細胞の遊走、集積 (Schulz, C. et al., *Immunol Res*, 2009; 44: 160-8) などの報告がある。これらの評価はいずれも、外部で標識導入した細胞を用いるか、もしくは、組織摘出後の染色作業により行っていることから、実験を行うための障壁が高く、加えてリアルタイムでの測定や反復測定を行うことは困難であった。また、主として免疫細胞や神経修復に関わる細胞などの特定の分野に関して、酸化鉄ナノ粒子を用いた分子プローブ投与により体内に存在する細胞のラベリング、動態解析が行われているが (Rueger, M. et al., *J Neurosci*, 2010; 30: 6454-60, Yang, J. et al., *NeuroImage*, 2009; 48: 319-28), 上記のような生体組織欠損の修復および再生時の体内に存在する細胞動態の解析に関する報告はこれまで皆無であった。

2. 研究の目的

非侵襲で繰り返し全身観察が可能な磁気共鳴イメージング (MRI) に着目し、上記イメージングに適用可能な標的特異性をもった新規高感度分子プローブを合成し、その造影能を評価する ..

3. 研究の方法

申請者の所属研究室で開発されたキラル dendroliamer-アミン配位高感度 Gd-MRI 造影剤 (WO/2009/069833) に対して修飾を容易にするマレイミド基を導入し、組織修復および再生に関わる細胞の表面抗原に対する抗体やアプタマーを結合させる。抗原タンパク質

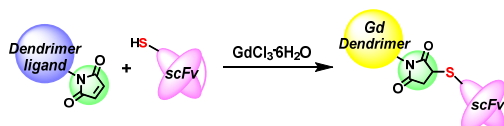


スキーム 1. キラル dendroliamer 配位子の合成

および培養中の細胞との結合を評価したのち、皮膚欠損モデルや血管新生、骨新生モデルを作製したマウスへ投与し、MRI により経時的に全身造影を行って、種々の組織修復および再生時における細胞の全体分布と組織修復部位への集積の機構を明らかにすることを目的とした。

まず、マレイミド基を有するキラル dendroliamer トリアミン配位子を、スキーム 1 に示す経路により合成した。具体的には、4-ピニルベンジルクロリドを出発原料とし、不斉ジヒドロキシル化反応により、キラルジオールを合成した後、このジオール部を 2,2-ジメトキシプロパンで、またベンジル位を p-メトキシフェニル基で保護した。その後、アセトニド部位の脱保護を行い、生成したキラルジオールととの反応により、第二世代キラル dendroliamer を得た。さらに PMP 基の脱保護、水酸基の臭素化ののち、コアである 1,4,7-トリアザシクロノナンの中の窒素原子に結合させ、(R)-9 を合成した。次に (R)-9 をトリエチルアミン存在下、3-マレイミドプロパン酸塩化物と反応させ、アミド基を介してマレイミド基を導入し、80% の酢酸で脱保護した。

pH 6.0 の 2-モルホリノエタンスルホン酸バッファー中、部分抗体 scFv を 4 等量の



スキーム 2. 部分抗体複合化造影剤の合成

TCEP (還元剤) で 5 分間還元した後, 100 等量の dendriマーを加えて 37 で 4 時間攪拌した. 反応溶液を分画分子量 10,000 の限外濾過フィルターで洗浄した結果, マトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析



複合体 Gd-DTPA 造影剤 1

図 1. 各造影剤水溶液の T1 強調 MR 像.

(MALDI-TOF MS) で 28,500 付近に明確な分子イオンピークを示す, キラル dendriマー トリアミン配位子 ($M^+ = 1,180$) - scFv ($M^+ = 27,415$) 複合体の合成に成功した. 新規合成したキラル dendriマー トリアミン配位子-scFv 複合体をガドリニウムに配位させることで, 最終的な Gd-MRI 複合体造影剤 1 とすることに成功し (スキーム 2), 7T 小動物用 MRI 装置を用いた造影能評価の結果, 臨床用造影剤 (Gd-DTPA) よりも同濃度で高い輝度を示し (図 1: より白色が強いほど高輝度であることを示す), 高いプロトン緩和能を有することが明らかになった. 加えて,

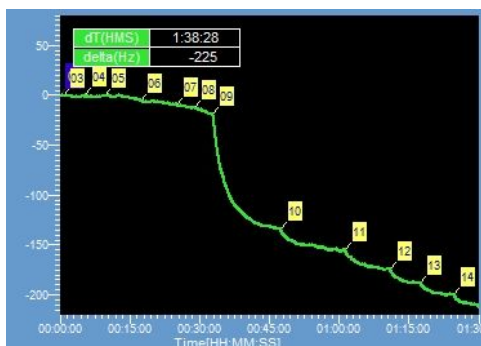
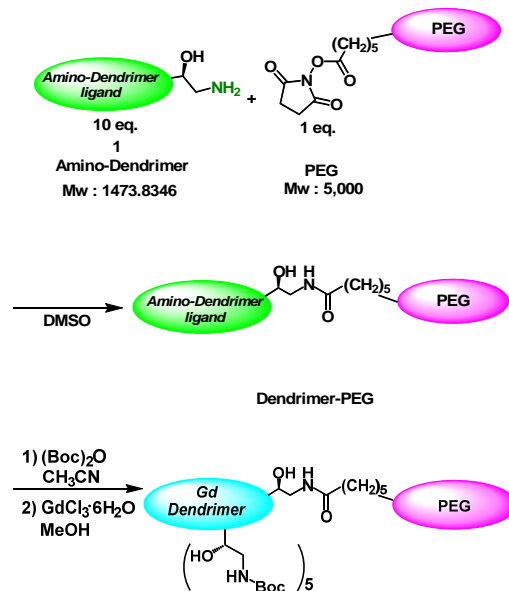


図 2. QCM スペクトル (前半 3-8: 部分抗体なし, 後半 9-14: 部分抗体あり; それぞれの数字は基質添加点を示す. 結合量が多いほど曲線が下へ動いている.)

新規合成した scFv 導入キラル dendriマー トリアミン配位 Gd-MRI 造影剤 1 について, 水晶共振マイクロバランス (QCM) 法によって, 抗原との結合能が, 反応前後で変化しないことを確認した (図 2). 反応効率とその確認に関して種々問題が発生したが, 研究経費で購入したミニ恒温槽を用いて条件検討を行った結果, 最適反応条件および結合反応の確認方法を見出した. また, 抗原分子との結合定数測定についても, 購入した QCM 用分離セルを用いて種々の表面上での結合実験を行い, 最終的に造影剤への結合前後で抗原結合能に差がみられないことを確認することができた. この反応条件は他の標的分子との結合反応に対しても適用可能であり, 有用であると考えられる.

さらに, 新規高感度 Gd-MRI 複合体造影剤 1 に対して, より一般的な標識分子を結合させ



スキーム 3. PEG 複合体 Gd-MRI 造影剤の合成

るための官能基導入を実施した. 具体的には, 先に合成したキラル dendriマー トリアミン配位子に対してオルト酢酸トリメチルおよびトリメチルシリルクロリドをジクロロメタン中で作用させたのち, メタノール中で炭酸カリウムを作用させることで, 末端をエーテル化した. こののち, 1,4-ジオキサン中でアンモニア水存在下, マイクロウェーブ合成装置を用いて 200W のマイクロ波を照射し, 100 °C, 1.4 MPa 加熱加圧下, 60 分間反応を行ってエーテル基を開裂させ, 末端ポリアミノアルコール体である dendriマー 配位子を得た.

そののち, 体内動態改良のためにポリエチレングリコール (PEG) による修飾を行い, MRI 造影剤としての機能評価を行った. 具体的には, 平均分子量 5,000 の活性エステル基を有するポリエチレングリコールと末端ポリアミノアルコール型 dendriマー 配位子 (分子量 1473.8346) とを室温, ジメチルスルホキシド中で 24 時間攪拌した. ゲル浸透クロマトグラフィー (カラム: SB-803HQ, 溶液: 0.1 M 硝酸ナトリウム-0.2w% アジ化ナトリウム, 流速: 1.0 mL/min, カラム温度: 40 °C) を用いて分子量を算出した結果, ポリエチレングリコール鎖 (分子量 5,665) の導入を行った反応溶液中の生成物の分子量は 6,809 であり, 配位子にポリエチレングリコール鎖が 1 つ導入された新規 dendriマー 配位子 が得られたことが明らかとなった. そこで, ゲル浸透クロマトグラフィーでの分取を行い, 凍結乾燥に



複合体 Gd-DTPA 造影剤 2

図 3. 各造影剤水溶液の T1 強調 MR 像.

て白色粉末を得た。得られた生成物に二炭酸ジ-tert-ブチルを加え、アセトニトリル中で室温、24時間攪拌し、t-ブトキシカルボニル基 (Boc) で残り5つのアミノ基が保護されたポリエチレングリコール- dendrimer 配位子を得た (スキーム3)。

次にメタノール中、配位子と塩化ガドリニウムをアルゴン雰囲気下、室温で48時間攪拌した後、エバポレーターで減圧濃縮を行い、Gd-MRI 複合体造影剤2を白色固体として得た。得られたGd-MRI 複合体造影剤について、7 T 小動物用MRI装置を用いた造影能評価の結果、臨床用造影剤 (Gd-DTPA) よりも非常に高いプロトン緩和能 ($52.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$; Gd-DTPA の約15倍) を有することを明らかにした (図3)。これらの結果は、ポリエチレングリコール鎖の導入によりプロトン緩和能を上昇させるとともに造影剤の血中滞留性を向上させ、検出効率を増大させるのみならず、動物実験における標的到達率および標的結合率を向上させることに対して道を拓くものであり、細胞特異性を持たせた新規高感度Gd-MRI造影剤の動物投与後において、標的到達率および標的結合率を向上させることで、特異的結合を増強することが可能と考えられることから非常に有用である。

4. 研究成果

(1) 細胞特異的に標識可能な新規高感度Gd-MRI造影剤の開発手法を明らかにすることを目的とし、研究代表者らのグループで開発した新規高感度磁気共鳴イメージング (MRI) 造影剤に対して、標識分子を結合させるための官能基導入を実施した。具体的には、(1-1) マレイミド部位を有するキラル dendrimer トリアミン配位子の合成に成功し、還元処理を行った scFv との反応により、マトリクス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOF MS) で 28,500 付近に明確な分子イオンピークを示す、キラル dendrimer トリアミン配位子 ($M+ = 1,180$) - scFv ($M+ = 27,415$) 複合体の合成に成功した。(1-2) アミノ基を有するキラル dendrimer トリアミン配位子の合成に成功し、活性化エステルを有するポリエチレングリコールとの反応により、ゲル浸透クロマトグラフィーにおいてキラル dendrimer トリアミン配位子-ポリエチレングリコール複合体が合成されていることを確認した。

(2) 細胞特異的に標識を行う能力の検証を行った。具体的には、(2-1) 新規合成した scFv 導入キラル dendrimer トリアミン配位 Gd-MRI 造影剤について、水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法によって、抗原結合能が反応前後で変化しないことを確認した。さらに、培養細胞への標識能、動物における体内動態を確認した。(2-2) 新規合成したキラル dendrimer トリアミン配位子-ポリエチレングリコール複合体の体内動態の確認を行った。これらの結果を通して、組織再生過

程における細胞の動きを明らかにするための知見を得ることができた。

これらの結果は、これまで細胞動態観察によく用いられている蛍光観察やポジトロン放射断層撮像法 (PET) や単一光子放射断層撮像法 (SPECT) に比べて、全身を含む深部の観察が可能であることや非侵襲であることなど、多くの優れた点を持った画像化法である磁気共鳴イメージング (MRI) を用いた繰り返し全身細胞のリアルタイム観察を可能にする技術について、造影剤の高感度化を図ることにより、その問題点である低感度を克服するための端緒を開くものであると考えられる。また本研究で得られた知見は将来的に、再生医療の実現に向けた革新的技術としても大きな意義を持つ。本研究の知見をもとに造影剤を開発し、体内で血液を介して全身へ分布すると考えられる組織修復時における種々の細胞について、生体内での動きを捉えることができれば、現状の「再生医療」の大きな問題である、移植治療など体外での細胞の取扱いに対する高いコストや障壁を解決し、薬剤や生理活性物質を用いたこれら細胞の制御を行うことで、それら細胞の効率よい利用法の開発につながり、新たな戦略を見出すことが可能になると考えられる。

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3件)

Kimura, Yu, Kurimoto, Takuya, Imai, Yuta, Sugii, Hiro-aki, Toshimitsu, Akio, Matsuda, Tetsuya, Imai, Hirohiko, Yamada, Hisatsugu, Kondo, Teruyuki, Novel Biocompatible Cobalt Oxide Nanoparticles for Use in Dual Photoacoustic and Magnetic Resonance Imaging. *JSM Biotech. Biomed. Eng.*, 2 (2014), 1043-1047

Miyake, Yuka, Ishikawa, Syungo, Kimura, Yu, Son, Aoi, Imai, Hirohiko, Matsuda, Tetsuya, Yamada, Hisatsugu, Toshimitsu, Akio, Kondo, Teruyuki, Pharmacokinetics of Chiral Dendrimer-Triamine-Coordinated Gd-MRI Contrast Agents Evaluated by in Vivo MRI and Estimated by in Vitro QCM. *Sensors*, 15 (2015), 31973-31986.
DOI: 10.3390/s151229900

Miyake, Yuka, Kimura, Yu, Orito, Naomi, Imai, Hirohiko, Matsuda, Tetsuya, Toshimitsu, Akio, Kondo, Teruyuki Synthesis and functional evaluation of chiral dendrimer-triamine-coordinated Gd complexes with polyamino-alcohol end groups as highly sensitive MRI contrast agents. *Tetrahedron*, 71 (2015), 4438-4444
DOI:10.1016/j.tet.2015.04.050

〔学会発表〕(計1件)

木村祐, 沖塚真珠美, 三宅由花, 松田哲也, 今井宏彦, 年光昭夫, 近藤輝幸, HER2 部分抗体を結合した新規キラルデンドリマートリアミン配位 Gd-MRI 造影剤の合成と機能評価, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 03 月 27 日, 名古屋大学東山キャンパス(名古屋市)

〔図書〕(計3件)

Kondo, Teruyuki; Kimura, Yu; Yamada, Hisatsugu; Toshimitsu, Akio, Nova Science Publishers, Magnetic nanoparticles for multimodal bio-imaging (In Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Physicochemical Properties and Role in Biomedicine; Sabbas, Nora P., Eds.), 2014, 69-93

木村祐, メディカルドゥ, 「生体高分子(タンパク質)」(田畑泰彦編; 細胞の3次元組織化 - その最先端技術と材料技術), 2014, 64-68

近藤輝幸, 木村祐 他, 化学同人, がんの分子イメージング, 2015, 78-87

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村祐 (Kimura, Yu)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定准教授

研究者番号: 90566027

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし