

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26620070

研究課題名(和文) 高感度化を目指した超分子型メタルフリーMRI造影剤の構築

研究課題名(英文) Constructions of supramolecular metal-free MRI contrast agents showing a higher sensitivity

研究代表者

唐澤 悟 (Karasawa, Satoru)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：80315100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：臨床で使われている造影剤はガドリニウムなどの金属が含まれている。金属イオンの影響で、これら造影剤は副作用があり、今回、金属を含まないメタルフリー造影剤の開発を行った。造影剤には磁石のような電子スピンが必要であることから、有機ラジカルでの代替でメタルフリー造影剤を目指した。一方ラジカルは金属よりも磁石としての性質が弱いため、ナノ微粒子化する分子設計に基づき実施した。その結果、ラジカルナノ微粒子は、小さい分子よりも高い感度を示した。また pH に応答する造影剤の開発も行った。がんは正常組織よりも酸性であるため、将来的には、がん集積可能な pH 応答性を有するメタルフリー造影剤の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：MRI contrast agents used in clinical are containing metals such as Gadolinium. Due to influences of the metal ion, the contrast agents often show significant side effects. In order to This time, we developed the metal free contrast agents using organic radicals. However, the contrast agents containing organic radicals exhibit smaller sensitivity than that of metal contrast agents because of smaller spin quantum number. Accordingly, to overcome the disadvantage of the metal free contrast agents and enhance the sensitivity, we used nanoparticles possessing organic radical (RNP). As the results, the RNP showed higher sensitivity than that of radicals consisted of smaller molecules. Furthermore, we successfully prepared the RNP possessing a pH responsiveness. Tumor tissues show the acidic microenvironment than that of normal tissues. Thus, in the future, we will prepare the metal free contrast agent capable of being in response to the tumor that have acidic microenvironment.

研究分野：機能性有機化合物の合成

キーワード：MRI 造影剤 ラジカル ナノ微粒子 がん

1. 研究開始当初の背景

体を非侵襲的に診断する MRI は、全国で約 5000 台設置されていることが示すように、医療現場で欠かせない診断法となっている。多くの場合、造影剤を用いることによって、正常部位と疾病部位とのコントラスト差を生じさせ、診断に用いる。これら造影剤には、レアメタルであるガドリニウムが用いられており、その理由は元素で最も電子スピンを持っているからである。即ち、最も磁石に近い性質と言い換えることができる。MRI は性質上、磁石に対して応答し、磁石周辺の水のプロトンの緩和時間を変化させることができる。強い造影効果は緩和時間を短縮することができる、そのことによって、コントラスト差を大きくすることが可能となる。この短縮効果が大きいことを水プロトン緩和能が大きいと言う。しかしながらガドリニウム造影剤は、何点か潜在的および最近報告された問題点がある。1) ガドリニウムイオンが腎毒性を示すため、透析患者に対してはかなり慎重な対応が必要となる 2) 投与量が多い 3) 脳への蓄積性があり、特に小児に対しての蓄積性が最近報告されている 4) 特異性がない 5) レアメタルを使っている などである。そこで我々は、上記の問題点の解決のため、ガドリニウムなどの金属を使わないメタルフリー造影剤の開発を目指した(図1)。

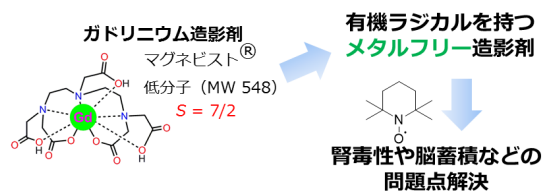


図1. ガドリニウム造影剤の特徴・構造とメタルフリー造影剤開発の狙い。

2. 研究の目的

メタルフリー造影剤開発のため、我々是有機ラジカルでのスピン代替を考えた。しかしながら有機ラジカルは潜在的にスピン量子数が小さい問題点があり、ガドリニウムと同様に水プロトン短縮効果はあるものの、その効果は圧倒的に小さい（緩和能・感度が小さい）。ガドリニウムの代わりに造影剤とするには、ある程度の大きさの緩和能・感度が必要であり、そこで、有機ラジカルをスピン源としながら、別の方法での短縮効果を考えた。1) 造影剤の分子サイズを大きくし、その周辺の水プロトンの緩和時間を短縮させる。2) 造影剤周辺に多くの水を配置させる方法により、造影剤と水との交換を速やかにする。このことによって、水プロトン緩和時間を短縮する。この2点の方法である(図2)。前者と後者を達成するために、造影剤をナノ微粒化すること、造影剤中に親水性のオリゴエチレングリコール(OEG)を導入すること、こ

れらの要素を含んだ OEG 担持型ナノ微粒子を合成し、水中での自己集合化挙動と造影剤としての機能を調べた。

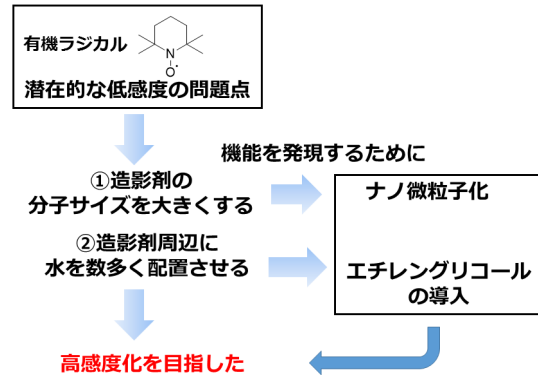


図2. メタルフリー化の潜在的な問題点と本研究課題達成のためのアプローチ。

3. 研究の方法

ナノ微粒子構築にあたり、一般的に高分子もしくは超分子によるアプローチが考えられる。我々は生分解性に優れている点と機能性置換基の導入しやすさを考慮し、後者の超分子による方法によって研究を進めた。自己集合化による分子間の相互作用を利用したナノ微粒子構築を達成するため、水素結合能と相互作用能を有するウレアベンゼンを基本骨格とし、フェニル基に安定有機ラジカル TEMPO を導入した。ウレア基にはアルキル鎖と OEG からなる両親媒性側鎖を導入し、有機ラジカルが導入された水溶性のウレアベンゼン誘導体 (UBD) を得た。また、自己集合化能を調整するため、直線型 (UBD-linear) と分岐型 (UBD-branch) の両親媒性側鎖を準備した(図3)。UBD-linear には、両親媒性側鎖を1本と2本導入した誘導体をそれぞれ合成し、側鎖の数と自己集合化挙動ならびに緩和能との相関について調べた。

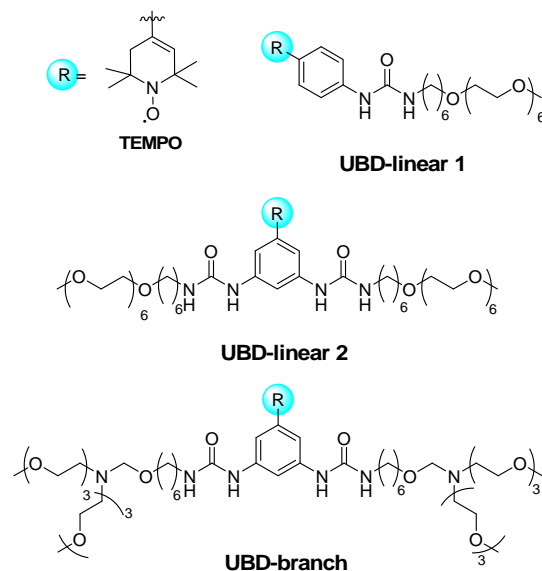


図3. UBD-linear と UBD-branch の分子構造

4. 研究成果

UBD-linear :

水溶液の ESR スペクトルの濃度依存性測定により、臨界会合濃度 (CAC) もしくは臨界転移濃度 (CTC) を調べた。UBD-linear 1 と 2 とともに NO の窒素原子に基づく 3 本線が得られた (図 4 (a)). 黒と赤線は UBD-linear 1 と 2 をそれぞれ示す)。高磁場側のシグナルがその他のシグナルに比べて強度が低下していることから、水溶液中での自己集合化に基づく会合体生成とそれに基づく遅い分子運動性が示唆された。この運動性をキペルソンの式に基づいて評価し、濃度依存性との相関から、UBD-linear 1 と 2 それぞれにおいて、ある変曲点を前後に運動性が変化していることが示唆された (図 4 (b)). 黒と赤マークは UBD-linear 1 と 2 をそれぞれ示す)。UBD-linear 1 と 2 は、 ~ 0.1 および ~ 0.3 mM に変曲点を有していた。この変曲点はそれぞれの CAC (CTC) とみなすことができる。

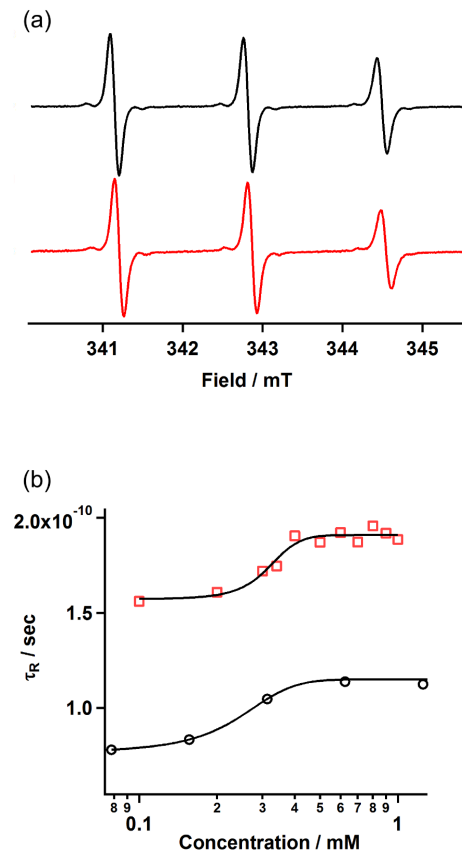


図4. UBD-linear 1 と 2 の水溶液中での ESR スペクトル(a)と分子の運動と濃度依存性の相関。黒と赤線およびマークは UBD-linear 1 と 2 をそれぞれ示す

両親媒性側鎖が 1 本ついた UBD-linear 1 が小さい濃度である ~ 0.1 mM で CAC を示したの

は、疎水性がより高いため低濃度で自己集合化が生じたと考えられる。しかしながら、それぞれの CAC 前後での透過度に関する挙動は異なっていた。UBD-linear 1 の CAC 前の濃度では透明な溶液であるのに対して、CAC より高濃度では濁った溶液を与えた。一方両親媒性側鎖が 2 本の UBD-linear 2 では、CAC 前後での透過度の変化は観測されなかった。これらのことから、CAC 前後で生じている自己集合化挙動に分子レベルで違いが生じている可能性が示唆された。詳細な解析によって、図 5 に示す自己集合化挙動をそれぞれ示すことが明らかとなった。図中では CAC を臨界転移濃度 CTC として表している。

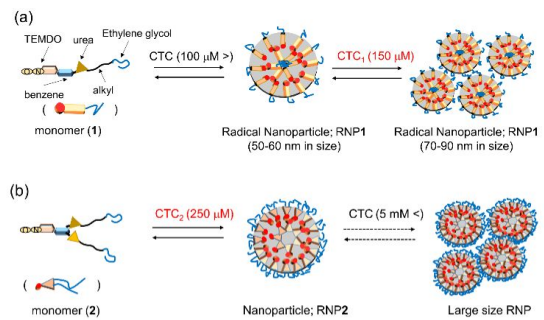


図5. UBD-linear 1(a) と 2 (b) の水溶液中での自己集合化挙動と微粒子の形成。

UBD-linear 1 は疎水性が高いため、CTC 前の濃度ですでに会合体が形成されている。しかしながらサイズが小さいため、溶液に濁りは生じない。一方 CTC 後では、その会合体どうしが、さらに自己集合化し大きなサイズの会合体を形成する。よって、透過度が減少し濁りが生じる (図 5(a))。

一方 UBD-linear 2 の CTC 前の濃度では、モノマーであり、CTC 後ではモノマーどうしが会合した微粒子を形成する (図 5(b))。微粒子どうしの会合に基づく更なる大きな微粒子の存在はこの濃度範囲では確認できなかった (5 mM 以下)。

得られた会合体のサイズと形態を調べた結果、 ~ 100 ナノメートルサイズの球状のナノ微粒子であることが明らかとなり、両親媒性側鎖の数でのサイズと形態の大きな違いは見出されなかった。

次に得られたナノ微粒子の MRI としての機能を調べるため、水プロトンの緩和時間測定および緩和能の評価を行った。図 6 には、それぞれの化合物の MRI での T_1 強調画像の結果を示す。濃度が高くなるにしたがって、輝度が増強していることがわかる (より白く光る)。これは水の T_1 緩和時間が短縮されていることに起因する。このような濃度変化と輝度の関係は、典型的な T_1 強調型造影剤の示す挙動である。得られた T_1 緩和時間の逆数を濃度に対してプロットすることで得られる直線の

傾きから、緩和能を求めることができる(図7)。CTC前後でのUBD-linear 1と2の緩和能をそれぞれ見積もった結果、UBD-linear 1のCTC前後の濃度では、0.29と0.05 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ で、UBD-linear 2では0.12と0.24 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。一方低分子量のTEMPOラジカルの値は、0.18 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度である。CTC前後の挙動においてUBD-linear 1と2で違いが観測されている。これは、CTC以下でUBD-linear 1ではすでにナノ微粒子を形成しているため、サイズ効果によって運動性が抑制され、その結果低分子TEMPOよりも大きな値を示した。しかしCTC後では緩和能が極端に小さくなった。微粒子を形成しているにも関わらず小さい緩和能を示したのは、脱水効果に起因していると考えられる。即ち、高濃度になるにしたがってOEGの脱水効果が顕著となり、その結果NO周辺に水が存在しにくくなる。そのことで緩和能が極端に小さくなった。一方UBD-linear 2では、CTC前後でモノマーとナノ微粒子間の平衡状態を示しており、緩和能の違いは、分子サイズとその運動性に対応した変化を表した。

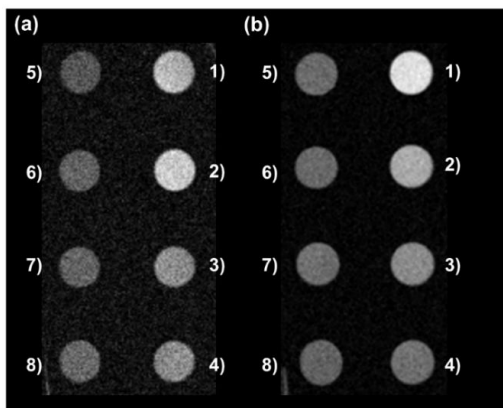


図6 . UBD-linear 1 (a)と2 (b)の T_1 強調画像。1 ~ 5はそれぞれ、5, 2.5, 1.25, 0.73, 0.32, 0.16, 0.08, 0.0 mMの試料濃度を表す。

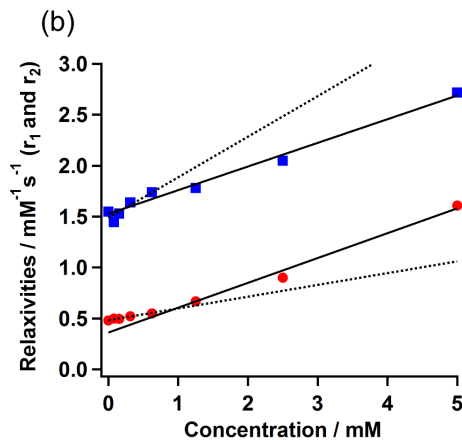
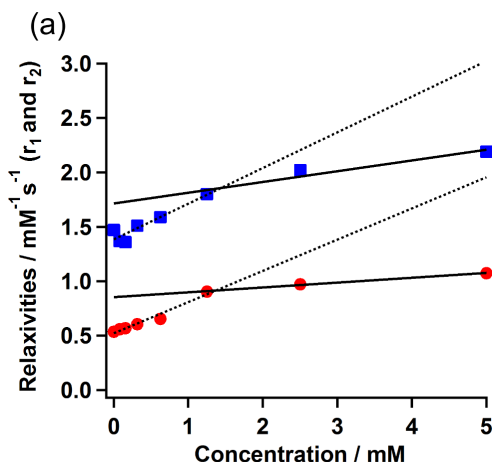


図7 . UBD-linear 1 (a)と2 (b)の緩和能変化。赤と青マークはそれぞれ、縦と横緩和能を表す。実線、点線はそれぞれ、高濃度、低濃度の値に対しての直線を表す。それら直線の傾きが緩和能を表しており、UBD-linear 1では低濃度、UBD-linear 2では高濃度で大きな傾きを示す(高い緩和能)。

以上の結果から、直線型のOEGを有するUBD-linearでは自己集合化に基づく T_1 緩和時間と緩和能変化が観測された。ナノ微粒子形成によって観測された値は、低分子TEMPOよりも大きいことから、分子サイズ効果が顕著に表れた。このことはナノ微粒子化することによって、メタルフリーMRI造影剤開発が可能であることを示唆するものである。

UBD-branch :

OEGが分岐状に結合したUBD-branch型について、上記と同様に自己集合化と緩和能変化を調べた。ESRの濃度依存性の結果、直線型と同様に高濃度になるにしたがって、分子運動性が抑制され、会合体の形成が示唆された。興味深いことに、骨格中に3級アミンが存在するため、顕著なpH応答性を示した。ESRスペクトルから得られた運動性の結果から、pH9.0の塩基性中で最も分子運動性が抑制されていた(図8)。

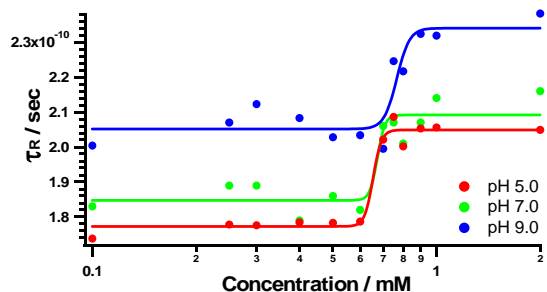


図8 . UBD-branchのpH依存性。分子の運動性と濃度でプロットした。

このことは、酸性中ではカチオンが生じ、そのカチオン同士のクーロン反撥によって運

動性が高まるのに対して、塩基性中ではクーロン反撥が生じないため会合体のサイズ効果による運動性が反映したと示唆される。運動性の順は、酸性 > 中性 > 塩基性の順で速くなった。

造影剤としての可能性を調べるため、緩和能を求めた結果、pH 依存性が観測された。酸性と塩基性で緩和能が低く、中性で最も高くなった。これは ESR から求めた運動性と矛盾する。運動性が真ん中の中性で最も高い緩和能を示したのは、緩和能の大きさは分子の運動性と水の存在量に反映するからである(図9)。酸性では、クーロン反撥で運動性は速くなるがイオンであるため水は豊富に存在する。一方塩基性では、運動性は抑制されるがイオン性でないため水はイオンよりも存在しない。中性条件はそれらの中間に位置する。その結果、中性条件で最も緩和能が大きくなったと考えている。

以上の結果から、UBD-branch は pH によって緩和能が変化する性質を有していた。このことは生体内の pH に応答して緩和能が変化する可能性を示唆しており、酸性条件であるがん組織の MR イメージングへ展開できる可能性を秘める。

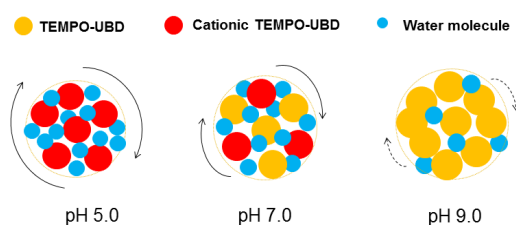


図9 .UBD-branch の pH 変化による分子の運動性と水の存在量の変化。

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)

Takeru Araki, Shuhei Murayama, Kazuteru Usui, Takashi Shimada, Ichio Aoki, Satoru Karasawa, *Nano Lett.* 2017, 17, 2397-2403.
DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b05371.

Kosuke Morishita, Shuhei Murayama, Takeru Araki, Ichi Aoki, Satoru Karasawa. Thermal- and pH-Dependent Size Variable Radical Nanoparticles and Its Water Proton Relaxivity for Metal-Free MRI Functional Contrast Agents, *J. Org. Chem.* 2016, 81, 8351- 8362.
DOI: 10.1021/acs.joc.6b01509.

Satoru Karasawa, Jun-ichi Todo, Kazuteru Usui, Naomi Harada, Noboru Koga.

Regioselective Photocyclizations of Di(quinolinyl)arylamines and Tri(quinolinyl)amine with Emission Color Changes and Photoreaction-Induced Self-Assemblies, *Chem. Eur. -J.* 2016, 22, 7771-7781.
DOI: 10.1002/chem.201600514.

〔学会発表〕(計 9 件)

ヘテロスピンゲル磁性体の構造と物性
○森 昂也・唐澤 悟、日本化学会第 97 春季年会、横浜市、2017/03/16~2017/03/19.

発光性 1,5-ナフチリジン誘導体によるアミン応答性の検討
○廣田淳子・萩原隆介・臼井一晃・平井 剛・唐澤 悟、日本化学会第 97 春季年会、横浜市、2017/03/16 ~ 2017/03/19.

有機ラジカルを有する超分子化合物の合成と MRI 造影剤への応用
○森下晃佑・村山周平・植木正二・青木伊知男・唐澤 悟、日本化学会第 97 春季年会、横浜市、2017/03/16~2017/03/19.

極性基を導入した水溶性 NO ラジカルの水プロトン緩和能評価
○白石諒馬・森下晃佑・荒木 健・村山周平・青木伊知男・唐澤 悟、日本化学会第 97 春季年会、横浜市、2017/03/16~2017/03/19.

高い水プロトン緩和能を有する超分子ガドリニウム錯体から成る MRI 造影剤の構築
○荒木 健・村山周平・臼井一晃・青木伊知男・唐澤 悟、日本化学会第 97 春季年会、横浜市、2017/03/16~2017/03/19.

Water Proton Relaxivities and Structures in Water Solution of Self-Assemble Organic Radicals Aiming Metal Free MRI Contrast Agents
○Satoru Karasawa, Noboru Koga, ICMM 2016, Sendai, Japan, 2016/09/4~2016/09/08.

Development of MRI Contrast Agents Having Thermal Responsive Functions for Accumulation to the Tumor Tissues
○Takeru Araki, Shuhei Murayama, Noboru Koga, Ichi Aoki, Satoru Karasawa, ICMM 2016, Sendai, Japan, 2016/09/4~2016/09/08.

Structures and Magnetic Properties of Carbene-Fe(II) Complexes Having the Intra-Molecular Ferromagnetic Interaction
○Koya Mori, Kazuteru Usui, Noboru Koga, Satoru Karasawa, ICMM 2016, Sendai, Japan, 2016/09/4~2016/09/08.

Photoreaction of Push-Pull Type

Quinoline Derivatives Accompanied with Emission Change ○ Satoru Karasawa, Kazuteru Usui, Noboru Koga、The 70th Fujihara Seminar、Fukuoka, Japan, 2016/04/17~2016/04/21.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：温度応答性化合物
発明者：古賀 登、唐澤 悟、荒木 健、森下晃佑
権利者：九州大学・日産化学工業
番号：特願 2016-046325
出願年月日：平成 28 年 3 月 9 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/bunseki>

6. 研究組織

(1)研究代表者

唐澤 悟 (KARASAWA, Satoru)
九州大学大学院薬学研究院 准教授
研究者番号：80315100

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

萩原 隆介 (HAGIHARA, Ryusuke)
九州大学大学院薬学府 修士課程 2 年

岡本 優菜 (OKAMOTO, Yuna)
九州大学大学院薬学研究院 技術補佐員

荒木 健 (ARAKI, Takeru)
九州大学大学院薬学府 修士課程 2 年

森下 晃佑 (MORISHITA, Kosuke)
九州大学大学院薬学府 修士課程 1 年

白石 諒馬 (SHIRAIISHI, Ryoma)
九州大学薬学部 学部 4 年