

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01819

研究課題名(和文) 光超音波 - 磁気共鳴デュアルイメージングプローブの創製

研究課題名(英文) Size-Controlled and Biocompatible Paramagnetic Nanoparticles for Dual Photoacoustic and MR Imaging

研究代表者

近藤 輝幸 (KONDO, TERUYUKI)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：20211914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゼラチンあるいは糖誘導体を用いる表面修飾により、生体適合性に優れ、水中で高分散し、長時間安定な新しい“常磁性金属酸化物ナノ粒子”(Gd₂O₃およびMnO)の合成に成功した。また、これらのナノ粒子が、光超音波イメージング(PAI)と磁気共鳴イメージング(MRI)の双方に有効な分子プローブ型造影剤であることを明らかにした。さらに、これらのナノ粒子造影剤について、EPR効果の発現に適した粒径制御(Gd₂O₃、MnO)、あるいは表面修飾剤であるゼラチンのアミノ基と人工抗体との複合化により(Gd₂O₃)、腫瘍への高い集積性を示す新規ナノ粒子造影剤の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：One of the most rapidly developing and exciting applications of nanotechnology in biomedical research is the development of biocompatible nanoparticles (NPs) for use in multiple powerful and highly complementary imaging modalities. Gd-based inorganic nanoparticles such as Gd₂O₃ have recently been investigated as potential positive contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI). However, our main goal is to synthesize and isolate new size-controlled and biocompatible paramagnetic metal oxide NPs, Gd₂O₃ and MnO, as a bimodal contrast agent for use in photoacoustic (PA) and MR imaging through the fusion of inorganic NPs and organic materials.

研究分野：生体イメージング

キーワード：光超音波イメージング 磁気共鳴イメージング 常磁性金属酸化物 ナノ粒子 分子プローブ 造影剤

1. 研究開始当初の背景

現在の医療現場では、直径 1 mm 程度の“微小がん”の早期診断と治療が目標であり、その最も有効な手段として、短寿命の放射性トレーサーを用いるポジトロン断層法 (Positron Emission Tomography、以下 PET と記す。) による画像診断が行われている。しかしながら、PET 診断を行うためには、病院内に放射性トレーサーを作成するサイクロトロンを設置するスペースを確保すること、また装置が大型で高価であることが、地域医療の中心を担う小・中規模病院や診療所への導入を困難にしている。また、放射性トレーサー(から発生される γ -線)を用いる PET 診断では、1 回の検査で患者が受ける被曝量は、約 2.2 mSv であり、健康者が自然界から受ける放射線量が年間で約 1.5 mSv であることを考慮すると、PET 診断による患者の被曝は許容範囲と考える。しかしながら、PET 撮像に関わる医療スタッフ(医師、看護師、および臨床検査技師 他)は、プロテクトをしているとはいえ、確実に被曝している。

研究代表者は、上記の問題を解決するためには、日本の医療機関への普及率が極めて高く、安全かつ非(低)侵襲的に人体深部の形態と位置情報が得られる磁気共鳴イメージング (Magnetic Resonance Imaging、以下 MRI と記す。) を PET のレベルまで高機能化することが最も有効な方法であると考えた。そこで研究代表者は、MRI と光超音波イメージング (Photoacoustic imaging : PAI) との融合により、被曝ゼロで正確な画像診断が可能であると考えた。光超音波イメージングは、光学イメージングの中で、近年、最も注目されている次世代のイメージング法である。

以上の背景の下、本研究では、生体適合性に優れ、毒性がなく、粒径制御が容易で、水中に高分散し長時間安定な新しい“常磁性金属酸化物ナノ粒子プローブ”の開発を行い、“光超音波 / 磁気共鳴デュアルイメージングプローブ”として有効であることを明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、次世代の PAI の機能と汎用性の高い MRI の機能とを融合することにより、従来は見えなかった発症前の生活習慣病の予見、あるいは発症初期の小さな「がん」病変の発見など、疾病の芽を超早期に発見し、深刻な病態への進行を未然に防ぐことを目的とする。その実現ために必須の“常磁性金属酸化物ナノ粒子プローブ”を創製し、MRI の機能と診断確度を格段に向上させる“光超音波 (PA) / 磁気共鳴 (MR) デュアルイメージングプローブ”として有効であることを明らかにする。

本研究は、我が国を始めとして先進国が直

面する超高齢社会において、人々が生活の質 (QOL) を維持しながら、健康な社会生活を送ることを支援する研究であり、社会へのインパクトと波及効果の高い研究を行う。

3. 研究の方法

PAI : フル 3D-光音響イメージング装置を用い、近赤外パルスレーザー光の照射により、ナノ粒子から疎密波として発生する光音響信号を超音波として検出し、画像構築を行った(図 1)。2011 年に小動物実験用の装置の販売が始まり、医療用診断装置としては、被曝ゼロで撮像時に患者に苦痛を与えない乳癌診断用の光超音波マンモグラフィ (PAM) について、ヒトでの臨床研究が進んでいる。

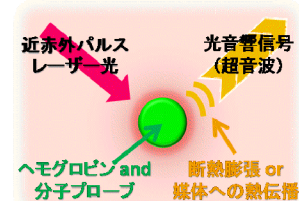


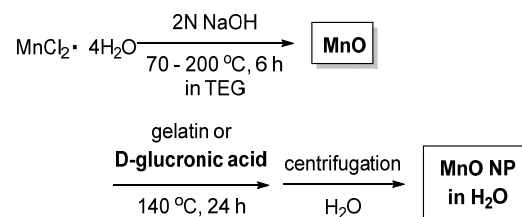
図 1. 光超音波イメージングの原理。

MRI : 7T MRI 装置を用い、室温で測定した。in vitro MRI 評価では、濃度の異なる常磁性金属酸化物ナノ粒子の MRI 撮像により、水の ^1H の $T1$ 短縮能を測定し、緩和能 r_1 値を算出した。その結果、得られたナノ粒子造影剤の r_1 値を、医療現場で使用されている Magnevist[®] の r_1 値と比較し、ナノ粒子造影剤の優位性について検討した。

4. 研究成果

糖誘導体で表面被覆した MnO および Mn_3O_4 ナノ粒子の合成と機能評価 (平成 27 年度)

PA 信号強度の増大と MRI 造影能としての機能向上を目指し、3 価のガドリニウム (Gd_2O_3) と同様に常磁性を有する 2 価マンガんに注目し、水に分散可能な 2 種類のマンガン酸化物ナノ粒子を合成した。まず、経口用 MRI 造影剤としても使用されている $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を原料とし、diethylene glycol (DEG) あるいは triethylene glycol (TEG) 中でのポリオール法により、マンガン酸化物ナノ粒子の合成を行った。また、スキーム 1 に示した様に、適切な反応時間経過後に表面修飾剤として糖誘導体である D-glucuronic acid (GA) を添加することにより、 MnO ナ



スキーム 1. 糖誘導体被覆マンガン酸化物ナノ粒子の合成

ノ粒子の自在な粒径制御に成功した。

次に、DEG 溶媒中で合成した Mn-DEG ナノ粒子、および TEG 溶媒中で合成し GA で表面修飾した Mn-TEG-GA ナノ粒子について、エタノールおよび超純水での洗浄操作を繰り返し、0.10 μm のシリンジフィルターに通すことにより、粒径の揃ったナノ粒子の水分散液を得た。動的光散乱法 (DLS) により、Mn-DEG ナノ粒子の粒径は 97.8 nm、表面電位は -30.6 mV、また Mn-TEG-GA ナノ粒子の粒径は 122 nm、表面電位は -14.2 mV であった。いずれのナノ粒子も安定で、水中で 3 日間放置しても粒径は変化せず、凝集は全く起こらなかった。さらに、それぞれのマンガンナノ粒子の水分散液を凍結乾燥し、粉末 X 線回折 (XRD) による測定を行った結果、Mn-DEG ナノ粒子は Mn_3O_4 のみから、一方、Mn-TEG-GA ナノ粒子は MnO のみから成ることが明らかとなった (図 2)

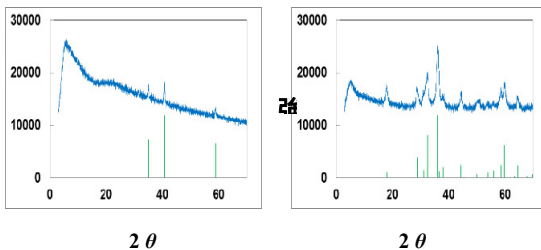


図 2 . 粉末 X 線回折測定 (XRD) の結果:
a) Mn-DEG ナノ粒子、b) Mn-TEG-GA ナノ粒子。

合成した 2 種類のマンガン酸化物ナノ粒子について、それぞれ濃度の異なるナノ粒子の水分散液を調製し、小動物実験用 7T MRI 装置により 25 $^{\circ}\text{C}$ での T_1 強調画像を撮像し (図 3) 水の ^1H の T_1 短縮能を表す緩和能 r_1 値を算出した。その結果、Mn-DEG (Mn_3O_4) ナノ粒子の r_1 値は $2.80 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ と低い値であったのに対し、Mn-TEG-GA (MnO) ナノ粒子では、臨床用 Gd-MRI 造影剤である Magnevist[®] ($r_1 = 4.50 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) の約 4 倍の大きな r_1 値を示した ($17.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)。

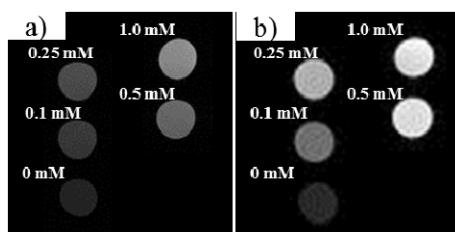


図 3 . T_1 強調 MRI 画像: a) Mn-DEG (Mn_3O_4) ナノ粒子、b) Mn-TEG-GA (MnO) ナノ粒子 (7T, 25 $^{\circ}\text{C}$)。

一方、710 nm の近赤外パルスレーザー光を照射した際に発生する PA 信号を (37 $^{\circ}\text{C}$) オシロスコープを用いる電位差測定により評価した。その結果、いずれのマンガン酸化物ナノ粒子もゼラチン被覆 Gd_2O_3 ナノ粒子

よりはるかに強い PA 信号を発生した (Mn-TEG (Mn_3O_4): 最大 35.0 VM^{-1} 、Mn-TEG-GA (MnO): 最大 55.4 VM^{-1}) (図 4)。従って、糖修飾 MnO ナノ粒子は、これまでのゼラチン被覆 Gd_2O_3 ナノ粒子よりも優れた PA/MR デュアルイメージングプローブであることが明らかになった。

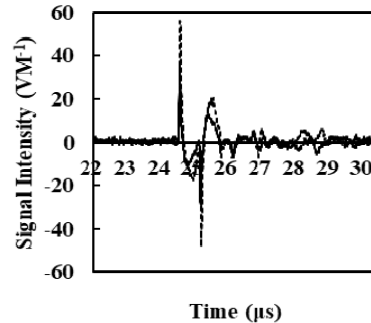
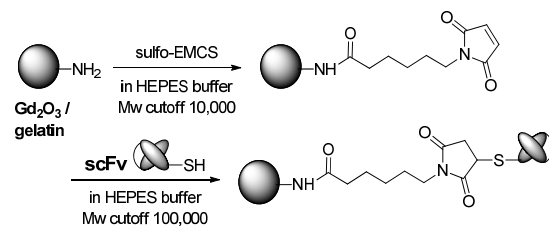


図 4 . 光超音波信号の強度: Mn-DEG (Mn_3O_4) ナノ粒子 (実線)、Mn-TEG-GA (MnO) ナノ粒子 (点線) (710 nm, 100 μJ , 37 $^{\circ}\text{C}$)。

ゼラチン被覆 Gd_2O_3 ナノ粒子への抗 HER2 人工抗体 (ScFv) 導入による高機能化 (平成 28 年度)

研究代表者らは、既に、先駆的に独自の方法により、生体適合性に優れ、水に高分散し長時間安定なゼラチン被覆 Gd_2O_3 ナノ粒子の合成と、その PA/MR デュアルイメージングプローブとしての有効性を明らかにし報告している。

そこで、ゼラチン上の NH_2 基を利用し、乳がん特異的な HER2 抗原を認識する抗 HER2 人工抗体 (scFv) を導入することにより、乳がん細胞への能動的集積の可能性について検討した。すなわち、本研究では、scFv を導入したゼラチンを用いて表面被覆した Gd_2O_3 ナノ粒子を新規に合成した (スキーム 2)。



スキーム 2 . ゼラチン被覆 Gd_2O_3 ナノ粒子への抗 HER2 人工抗体 (ScFv) 導入による高機能化

HER2 陰性腫瘍細胞 (Colon26) と HER2 陽性腫瘍細胞 (SKBR3) に対して、抗体量を変化させた複合ナノ粒子を暴露後、洗浄、遠心分離により細胞塊を得た。続いて、それらの細胞塊について、7T MRI 装置による T_1 強調画像を撮像した。

その結果、抗 HER2 人工抗体である ScFv を複合化したゼラチン被覆 Gd_2O_3 ナノ粒子

を暴露した HER2 陽性 SKBR3 細胞塊の輝度はいずれも高く、さらにこの輝度は、Gd₂O₃ ナノ粒子への抗体の導入量に依存することが明らかになった。

一方、HER2 陰性の Colon 26 細胞塊についても同様の操作を行ったが、Gd₂O₃ ナノ粒子への抗体の導入量に依存せず、いずれのナノ粒子を暴露しても低い輝度を示した。

以上の結果から、抗 HER2 人工抗体 ScFv 複合化 Gd₂O₃ ナノ粒子は、HER2 陽性腫瘍細胞への能動的ターゲティング能を有する分子プローブ型 MRI 造影剤として有効であることが明らかになった。

新規ゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子 (DOX-Gd-NPs) の合成と機能評価：セラノスティックプローブの開発(平成 29 年度)

ゼラチンと安定な複合体を形成する抗癌剤ドキソルピシン(DOX)との複合化により、新規ゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子(DOX-Gd-NPs)の合成と機能評価を行った。まず、塩基性条件下、Gd(NO₃)₃ · 6H₂O をジエチレングリコール(DEG) 溶媒中で加熱することにより、DEG に分散した Gd₂O₃ ナノ粒子を得た。続いて、アセトン加え、遠心沈降により集めた沈澱を洗浄後、超純水に分散させた溶液に、PEG 化ゼラチンと DOX との混合水溶液を加え、室温で 12 時間攪拌した後、未反応の DOX を限外濾過により除去し、DOX-Gd-NPs を得た。

合成した DOX-Gd-NPs の水分散液に、近赤外パルスレーザー光(710 nm, 100 μJ, 10 Hz, Δt ~ 20 ps) を照射した結果、明瞭な光音響(PA) 信号が観測された。そこで、マウス背部に DOX-Gd-NPs を皮下投与し、PA イメージングを行った結果、DOX-Gd-NPs を投与した部位のみが明瞭に画像化された。

一方、磁気共鳴イメージング(MRI, 7T, 室温) により、DOX-Gd-NPs による水の ¹H の T₁ 短縮能(r₁ 値) を算出した結果、DOX-Gd-NPs の r₁ 値は 6.6 mM⁻¹s⁻¹ であり、Magnevist® (r₁ = 4.50 mM⁻¹s⁻¹) よりも優れた陽性 MRI 造影剤であることが明らかになった。

さらに、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に DOX-Gd-NPs および DOX 単体をそれぞれ

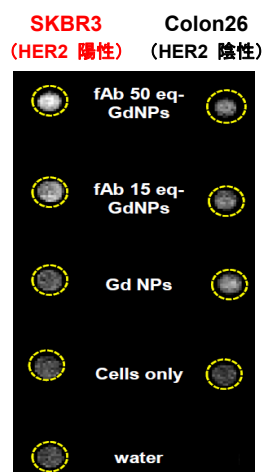


図 5 . 7T MRI 撮像による抗 HER2 人工抗体 ScFv を導入したゼラチン被覆 Gd₂O₃ ナノ粒子の腫瘍細胞選択性。

投与した結果、いずれも高い細胞増殖抑制効果を示した。

以上の結果から、新たに合成した DOX-Gd-NPs は、PA / MR デュアルイメージングプローブとして有効であるとともに、DOX 由来の顕著な細胞増殖抑制効果を併せ持つ“セラノスティック”プローブであることが明らかになった。

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 11 件)

Yamada H.; Hasegawa Y.; Suzuki Y.; Imai H.; Matsuda T.; Kimura Y.; Toshimitsu A.; Aoyama Y.; Kondo T. “Magnetic Resonance Imaging of Tumor with a Self-Traceable Polymer Conjugated with an Antibody Fragment”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2675–2678 (査読有). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.04.072>

Miyake Y.; Ishikawa S.; Kimura Y.; Son A.; Imai H.; Matsuda T.; Yamada H.; Toshimitsu A.; Kondo T. “Pharmacokinetics of Chiral Dendrimer-Triamine-Coordinated Gd-MRI Contrast Agents Evaluated by *in vivo* MRI and Estimated by *in vitro* QCM”, *Sensors* **2015**, *15*, 31973–31986 (査読有). [10.3390/s151229900](http://dx.doi.org/10.3390/s151229900)

Miyake Y.; Kimura Y.; Orito N.; Imai H.; Matsuda T.; Toshimitsu A.; Kondo T. “Synthesis and Functional Evaluation of Chiral Dendrimer-Triamine-Coordinated Gd Complexes with Polyaminoalcohol End Groups as Highly Sensitive MRI Contrast Agents”, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 4438–4444 (査読有). <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2015.04.050>

Yamada H.; Hasegawa Y.; Imai H.; Takayama Y.; Sugihara F.; Matsuda T.; Tochio H.; Shirakawa S.; Sando S.; Kimura Y.; Toshimitsu A.; Aoyama Y.; Kondo T. “Magnetic Resonance Imaging of Tumor with a Self-Traceable Phosphorylcholine Polymer”, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 799–806 (査読有). [10.1021/ja510479v](http://dx.doi.org/10.1021/ja510479v)

Yamada H.; Kameda T.; Kimura Y.; Imai H.; Matsuda T.; Sando S.; Toshimitsu A.; Aoyama Y.; Kondo T. “¹³C/¹⁵N-Enriched L-Dopa as a Triple-Resonance NMR Probe to Monitor Neurotransmitter Dopamine in the Brain and Liver Extracts of Mice”, *ChemistryOpen* **2016**, *5*, 125–128 (査読有). [10.1002/open.201500196](http://dx.doi.org/10.1002/open.201500196)

Umehara Y.; Son A.; Kondo T.; Tanabe K. “Dioxetane Formation and Chemiluminescent

Emission upon the Combination of a Vinylphenol Derivative with Naphthalene Endoperoxide”, *RSC Adv.* **2017**, 7, 9472–9475 (査読有).
10.1039/C6RA28079J

Kondo T., “Ruthenium- and Rhodium-Catalyzed Strain-Driven Cleavage and Reconstruction of the C–C Bond”, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 1232–1242 (査読有).
10.1002/ejoc.201501291

Yoshimura T.; Naito S.; Yuanjun D.; Son A.; Kimura Y.; Toshimitsu A.; Kondo, T. “Yb(OTf)₃-Catalyzed Synthesis of 2-Substituted 4(3H)-Quinazolinones via Cleavage of a Carbon–Carbon Bond”, *Heterocycles* **2016**, 93, 816–823 (査読有).
10.3987/COM-15-S(T)59

Kondo T.; Kimura Y.; Yamada H.; Aoyama Y. “Polymeric ¹H MRI Probes for Visualizing Tumor *In Vivo*”, *Chem. Rec.* **2017**, 17, 555–568 (査読有).
DOI: 10.1002/tcr.201600144

Hara D.; Umehara Y.; Son A.; Asahi W.; Misu S.; Kurihara R.; Kondo T.; Tanabe K. “Tracking the Oxygen Status in the Cell Nucleus with a Hoechst-Tagged Phosphorescent Ruthenium Complex”, *ChemBioChem* **2018**, 19, 956–962 (査読有).
DOI: 10.1002/cbic.201700685

Kondo T.; Taniguchi R.; Kimura Y. “Ruthenium- and Rhodium-Catalyzed Ring-Opening Coupling Reactions of Cyclopropanones with Alkenes or Alkynes”, *Synlett* **2018**, 29, 717–722 (査読有).
10.1055/s-0037-1609339

〔学会発表〕(計 8 件)

近藤輝幸, “有機合成化学を基盤とする生体イメージングのための革新的分子プローブの開発”, 第 2 回京都コモンズワークショップ - 京都大学工学研究科化学系基礎研究(有機合成化学)ワークショップ - (招待講演), 2016 年 02 月 24 日, 京都市成長産業創造センター (ACT Kyoto).

近藤輝幸, “MPC を基盤とする高度機能性イメージングプローブの創製”, 京都大学テックコネクタ新技術説明会 2016 (招待講演), 2016 年 03 月 11 日, 京都大学大学院工学研究科イノベーションプラザ.

近藤輝幸, “双極性ポリマー PMPC を基盤とする高次生体イメージングプローブの創製”, 青山学院大学化学・生命科学科・講

演会 (理工学会共催、招待講演), 2016 年 09 月 13 日, 青山学院大学相模原キャンパス.

Teruyuki KONDO, “Innovative Techno-Hub for Integrated Medical Bio-Imaging”, Week26 International and Innovation Week (Université de Bordeaux) (Invited Lecture, 国際学会), 2017 年 06 月 28 日.

Teruyuki KONDO, “Development of Novel Molecular Probes for MRI and the Next-Generation PAI”, The 3rd Bordeaux-Kyoto Symposium: Creating the Science and Technology Innovation in the Cutting-Edge (Invited Lecture, 国際学会), 2017 年 06 月 29 日.

Teruyuki KONDO, “Development of Novel MRI Contrast Agents for Macrophage Imaging Enables Risk Evaluation of Unruptured Cerebral Aneurysm”, The 3rd Bordeaux-Kyoto Symposium: Creating the Science and Technology Innovation in the Cutting-Edge (Invited Lecture, 国際学会), 2017 年 06 月 29 日.

Teruyuki KONDO, “Rare Earth Metal Triflates-Catalyzed Synthesis of Benzoazoles via Cleavage of a C–C Bond”, Nordic/Kyoto OMCOS 2017 (Invited Lecture, 国際学会), 2017 年 06 月 24 日.

近藤輝幸, “躍進する化学 ~最先端材料の創製から医療応用まで~: 双極性ポリマーを基盤とする次世代イメージングプローブの創製”, 「京都アカデミアフォーラム」 in 丸の内・京大テックフォーラム (招待講演), 2017 年 12 月 18 日.

〔図書〕(計 1 件)

近藤輝幸, 木村祐, 三宅由花, “がんの分子イメージング”, 化学同人, 2015, 総ページ数 269.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: Polymer and Contrast Agent for Photoacoustic Imaging, Including the Polymer
発明者: 近藤輝幸, 木村祐, 山田久嗣 他
権利者: 国立大学法人 京都大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2015/079388
出願年月日: 2015 年 10 月 09 日
国内外の別: 外国

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.abe.ehcc.kyoto-u.ac.jp/>

6．研究組織

- (1) 研究代表者
近藤 輝幸 (KONDO Teruyuki)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20211914
- (2) 研究分担者
木村 祐 (KIMURA Yu)
京都大学・学際融合教育研究推進センター・准教授
研究者番号：90566027
- 山田 久嗣 (YAMADA Hisatsugu)
徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・講師
研究者番号：80512764
- (3) 連携研究者
()
- (4) 研究協力者
()