

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04470

研究課題名（和文）腫瘍径5mmの超早期膵がんの描出を可能にするインテリジェント型機能化造影剤

研究課題名（英文）Ultrasensitive MRI detection of spontaneous pancreatic tumors with nanocage-based targeted contrast agent

研究代表者

村田 正治（Murata, Masaharu）

九州大学・先端医療オープンイノベーションセンター・教授

研究者番号：30304744

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：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造影剤である。既に、肝臓などの網内系に特異的なMRI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。そこで本研究では細胞機能等を利用して特定の分子を可視化する、いわゆる分子イメージング技術を導入した新しいMRI造影剤を開発した。さらに独自のナノテクノロジーを用いた高感度化技術、そして疾患に応じてシグナルを変化させる疾患応答技術を集積することで、感度と機能性を合わせ持つナノ造影剤となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRIの国内設置台数はすでに7000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、疾患特異的な機能性造影剤の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Contrast agents are used to enhance the contrast of the lesion. MRI contrast agents specific for the reticular system, such as the liver, are already widely used in clinical practice and have achieved significant results in terms of tissue selectivity. However, the MRI contrast agents currently used in clinical practice are less specific to specific diseases, such as cancer, and are still under development. In this study, we developed a new MRI contrast agent that incorporates molecular imaging technology to visualize specific molecules using cellular functions. Furthermore, by combining high-sensitivity and disease-response technologies, we have developed a nanocontrast agent with both sensitivity and functionality.

研究分野：医用工学

キーワード：ナノメディスン MRI 膵がん 機能化造影剤

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵臓がんには特異的な初発症状がなく、膵臓がんと診断された時には大半が高度に進行・転移しているケースが多い。CA19-9 に代表される腫瘍マーカーもがん部が 2~3cm 以上に大きくなると上昇してこないことが多く (偽陰性)、逆に膵臓がん以外の原因でもしばしば上昇してしまうことが知られている (偽陽性)。また、もっとも標準的な腹部超音波検査や CT 検査でも TS1 すい臓がんを早期に発見できる可能性は決して高いとは言えず、超音波検査で 17~70%、造影 CT 検査で 35~75% とされており、上皮内がんに対応する 5mm 以下に至っては現在の画像診断法で認識できる可能性はほとんどない。有効な膵がん治療薬がない現在においては、これまでにない超高感度化技術、膵がん特異的な分子を標的化した分子イメージング技術、そして疾患に応じてシグナルを変化させる疾患応答技術が必要であり、似た様な腫瘍像を呈する腫瘍形成性膵炎などの鑑別を実現することが、膵がん画像診断技術の飛躍的向上につながる。

### 2. 研究の目的

本研究では細胞機能等を利用して特定の分子を可視化する、いわゆる分子イメージング技術を導入した新しい MRI 造影剤を開発する。さらに、我々独自のナノテクノロジーを用いた高感度化技術、そして疾患に応じてシグナルを変化させる疾患応答技術を集積することで、感度と機能性を合わせ持つナノ造影剤を創成する。このナノ造影剤のプラットフォームとして、タンパク質ベースのバイオケージを用いる。このナノケージは内孔 (内径 5nm) を有する球状構造体 (24 量体、外径 10nm) を形成するため、その内部にガドリニウム錯体や蛍光プローブなどの薬剤を内包することが可能である。我々はすでにナノケージ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。本研究では現在、もっとも難治性のがんとされる膵がんを標的とし、市販造影剤より少なくとも 100 倍の高感度化を達成し、MRI、CT、あるいは超音波エコーでは現状診断が不可能な腫瘍径 5mm 以下の超早期膵がんの画像診断システムを開発する。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 ナノケージの遺伝子クローニングと発現

野生型 Hsp16.5 の 41 位の Gly を Cys 残基で置換した Hsp16.5 G41C 変異体をコードする pET21a(+) ベクターを、適切なプライマーを用いた PCR による変異導入により作製した。この Hsp16.5 G41C ベクターを鋳型として、C 末端に iRGD ペプチドと親水性リンカー (-GGG)8-) を含む 1-Nanocage 組換えタンパク質をコードするベクターを、適切なフォワードおよびリバースプライマーを用いた PCR 法による変異導入により作製した。pET21a(+) プラスミドベクターを形質転換した大腸菌 (BL21-Go1d(DE3)) を、アンピシリン (100 mg/l) を添加した 2×YT 培地で培養し、適切なタイミングで 1 mM IPTG により組換えタンパク質の発現を誘導・発現した。

#### 3.2 DTPA-Gd(III) とナノケージのコンジュゲーション

ナノケージ内部を修飾するために、20 モル当量の Gd(III)-DTPA-マレイミドと混合し、MES バッファー (pH 6.5) 中で 24 時間、室温でインキュベートした。タンパク質のナノケージへの修飾は、MALDI-TOF-MS によって確認した。さらにナノケージ中の Gd (III) 含有量は、HP 4500 ICP-MS システム (を用いた誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により測定した。

ナノケージ (10  $\mu$ M) の直径は DLS により測定した。さらに酢酸ウラニルで染色した後に、透過型電子顕微鏡 (TEM) によって観察した。

### 3.3 ナノケージ機能化造影剤の緩和度測定 (*in vitro*)

ナノケージ型機能化造影剤の緩和度は、磁場強度 1.5 T (VivoLVA、日本 REDOX) と 9.4 T (BioSpec Bruker spectrometer, Bruker) の二台の MRI により測定した。各サンプルの T1 緩和は、室温で反転回復パルスシーケンスを用いて測定した。

各種の細胞を 6 ウェルプレートに播種し (100,000 細胞/ウェル)、一晚培養した。培地を除去した後、細胞を DMEM (10%FBS) 中で Gd (III) 結合ナノケージ (Gd 濃度に関して 1  $\mu$ M) と 24 時間インキュベートし、1500rpm で 5 分間遠心分離して細胞を回収した。PBS で 3 回洗浄後、9.4T Biospec MRI スキャナ (Bruker 社製) を用いて MRI を実施した。

## 4. 研究成果

ナノケージのサブユニットをコードする発現ベクターを構築し、大腸菌でリコンビナントタンパク質を発現させた。このナノケージの表面 (サブユニット C 末端側) には膀胱がん特異的な iRGD ペプチドが配向し、内孔には MRI 造影能を有する Gd 錯体が内包されている (図 1a、b)。MALDI-TOF-MS および SEC 分析により、高純度かつ単分散なナノケージが得られたことが確認された。各ナノケージのサイズは、生理的条件下で動的分散乱 (DLS) 分析によって測定された。すべてのナノケージは単分散性が高く、大きな凝集体を形成することなく、水系媒体中でその構造を維持した (図 1c)。

1-ナノケージ、2-ナノケージ、3-ナノケージおよび 4-ナノケージ粒子の平均外径はそれぞれ 16.8、19.5、30.1、37.1 nm で (図 1d)、N 末端の疎水ドメイン長が長くなると粒子サイズが大きくなることが示された。Gd(III) 錯体-ナノケージ複合体は、ナノケージ内に配向した Cys 残基のチオール基と DTPA-Gd(III) のマレイミド基とのマイケル付加反応によって合成できる。MALDI-TOF-MS および SEC 分析の結果、ナノケージの各サブユニットは副反応なしに 1 分子の DTPA-Gd(III) と結合しており、血清存在下でも DTPA-Gd(III) をナノケージ内部に導入してもナノケージの構造およびサイズに大きな影響がないことがわかった。

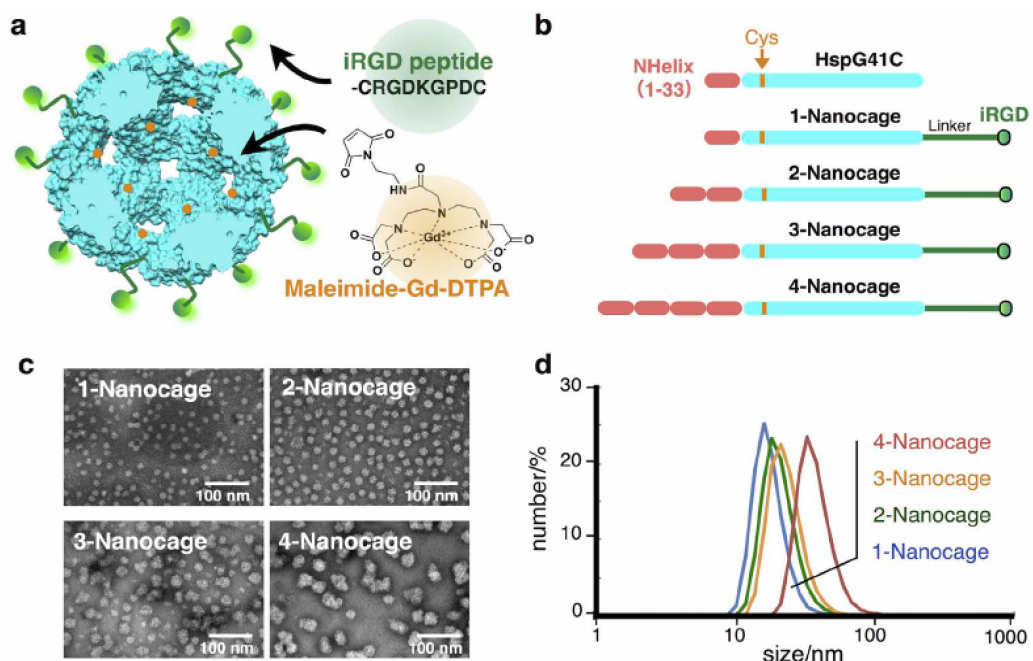


図 1. ナノケージの設計と物性評価

iRGD ペプチドを含むナノケージがNeuropilin-1 を高発現するヒト膵臓がん細胞を選択的に認識できるかどうかを調べた。ナノケージを血清存在下で AsPC-1 および Suit-2 細胞と 3 時間インキュベートし、その後、ナノケージの細胞への取り込みをフローサイトメトリーにより評価した。この結果フローサイトメトリーと共焦点顕微鏡の両方で、iRGD 修飾ナノケージが AsPC-1 および Suit-2 細胞に効果的に取り込まれることが明らかになった (図 2a-d)。さらに、フローサイトメトリーにより、標的細胞の蛍光強度がナノケージサイズに依存することが示された。対照的に Neuropilin-1 低発現株の HeLa 細胞では、蛍光強度に変化は観察されなかった。さらに、培地中に過剰な遊離 iRGD ペプチドを添加すると、AsPC-1 細胞によるナノケージの取り込みは有意に減少した (図 2e)。これらの結果は、ナノケージ表面に配向する iRGD ペプチドは、膵がん細胞に高発現している細胞表面受容体である Neuropilin-1 と特異的に結合することを示唆している。

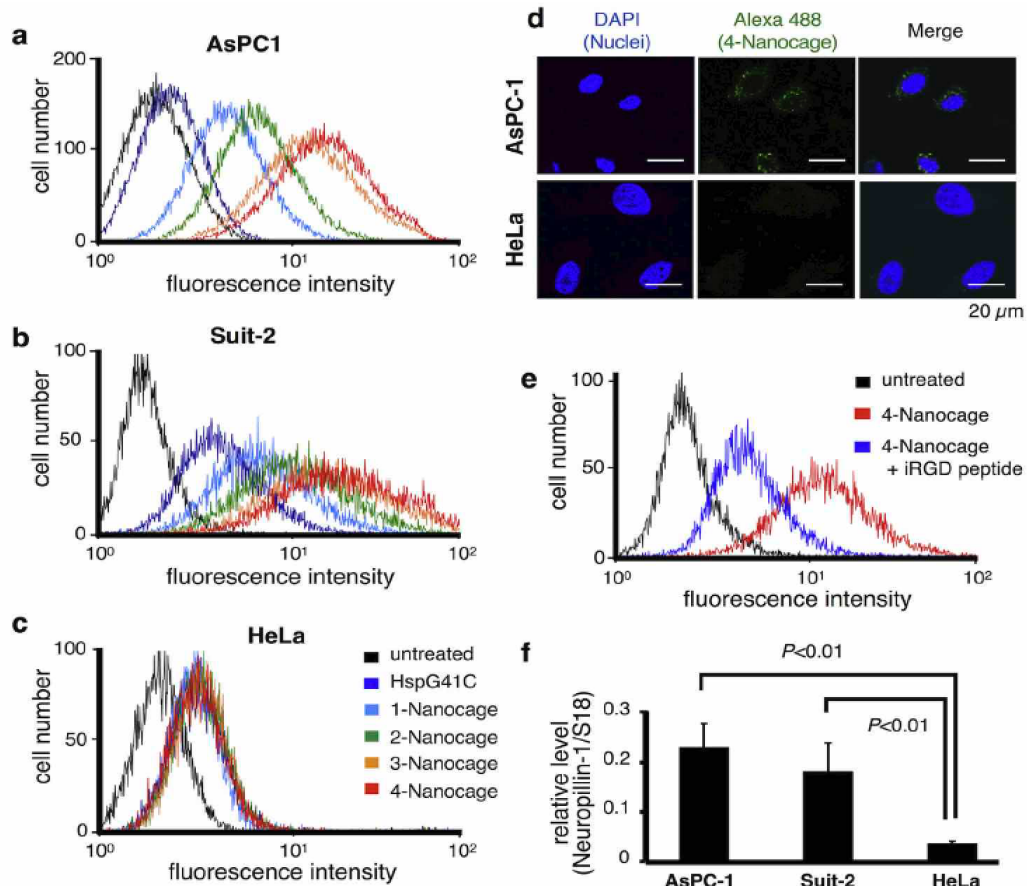


図 2. ヒト膵がん由来細胞によるナノケージの取り込み

次にナノケージのサイズが緩和能に及ぼす影響を調べるために、ナノケージの T1 緩和時間を、磁場強度 1.5 および 9.4 T で T1 飽和回復時間 (0~10,000 ms) 法を使用して測定した。この結果、1.5 T での遊離 DTPA-Gd (III) の緩和能は 4.9 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> であり、これはこれまでの報告と同様であった。その一方で、1-ナノケージ、2-ナノケージ、3-ナノケージ、および 4-ナノケージ粒子の緩和度は、それぞれ 13.5、17.1、35.9、および 47.4 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> であった (図 3a および b)。これらの結果は、N 末端疎水性ドメインの長さが増加するにつれてナノケージ緩和能が増加し、直径が約 40nm の 4-ナノケージが最大の緩和能を示すことを示した。9.4 T の測定においても同様に、ナノケージの緩和度はサイズに依存して増加したが、1.5 T 程の上昇は観察されなかった (図 3c)。サイズと緩和能との相関関係は、Gd (III) 錯体の緩

和能が分子量に大きく依存し、より大きなナノケージはより遅い分子回転速度を示し、より速い T1 緩和速度をもたらすことを示唆した。1.5 T での各ナノケージの縦方向と横方向の緩和能の比率 ( $r_1 / r_2$ ) は、0.63 から 0.78 の範囲であった。これらのデータは、ナノケージが最適な T1 造影剤になる可能性があることを示している。またサーマルシフトアッセイにより、ナノケージタンパク質サブユニットの N 末端に疎水性領域を導入すると、内部の疎水性相互作用とより大きなナノケージの熱安定性が向上することも確認した。

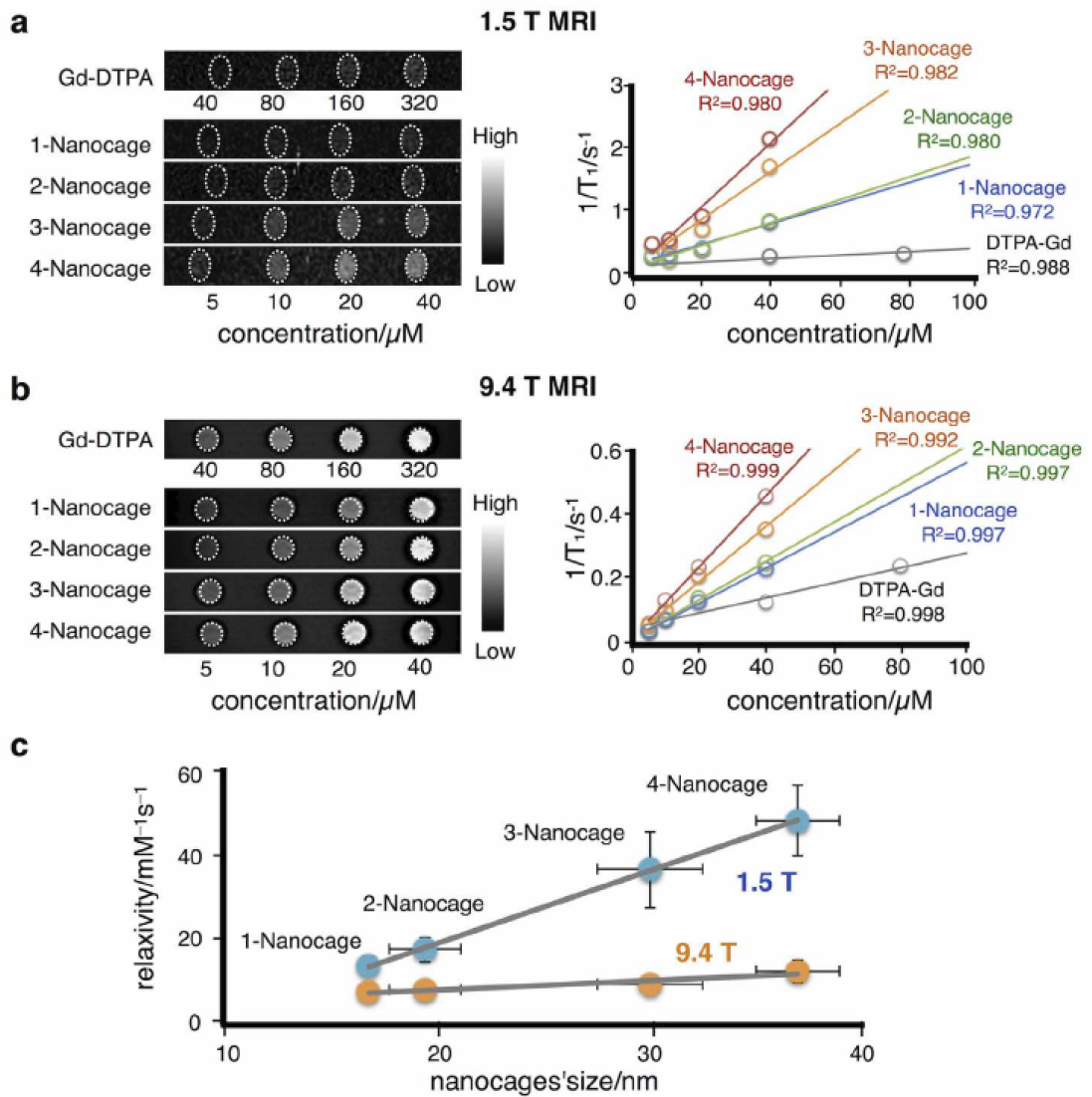


図 3. ナノケージ型 MRI 機能化造影剤の特性

MRI による膵臓がんの診断には、より高い特異性と感度を備えた造影剤が必要である。本研究では、Gd ム (III) キレート造影剤を内包し、さらに iRGD ペプチドを表面に呈示したナノケージ型 MRI 機能化造影剤を開発した。この造影剤の緩和能はナノケージのサイズの増加による分子回転速度の低下と、疎水性ドメインの導入による堅牢なケージ構造の効果と考えられる。引き続き、動物モデルでの実験と臨床検体を使った評価を継続し、特異的かつ高感度な MRI 造影剤として膵臓がんの早期診断の実現に貢献したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Asai Daisuke, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Nakashima Hideki, Toita Riki, Kang Jeong-Hun	4. 巻 69
2. 論文標題 Effect of Fetal Bovine Serum Concentration on Lysophosphatidylcholine-mediated Proliferation and Apoptosis of Human Aortic Smooth Muscle Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 255 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess19268	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chihiro Matsushita, Kazuhiko Tsukagoshi, Katsumi Tsuchiya, Kenichi Yamashita & Masaharu Murata	4. 巻 83
2. 論文標題 Investigation of the Separation Efficiency of Tube Radial Distribution Chromatography with Stationary Outer Phase Using the van Deemter Equation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chromatographia	6. 最初と最後の頁 287-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10337-019-03837-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toita Riki, Asai Daisuke, Otani Kentaro, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Kang Jeong Hun	4. 巻 54
2. 論文標題 Suppression of Lysophosphatidylcholine Induced Human Aortic Smooth Muscle Cell Calcification by Protein Kinase A Inhibition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 465 ~ 470
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asai Daisuke, Murata Masaharu, Toita Riki, Kawano Takahito, Nakashima Hideki, Kang Jeong-Hun	4. 巻 51
2. 論文標題 A high-affinity peptide substrate for G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 973 ~ 976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00726-019-02735-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大内田 研宙  (Ouchida Kenoki)  (20452708)	九州大学・医学研究院・准教授   (17102)	
研究分担者	河野 喬仁  (Kawano Takahito)  (90526831)	九州大学・先端医療オープンイノベーションセンター・特任講師   (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------