

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19103

研究課題名（和文）神経活動履歴を可視化する磁性ナノプローブの開発

研究課題名（英文）Development of magnetic nanoprobes for tracking neural activity

研究代表者

岡田 智（Okada, Satoshi）

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：70785229

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：神経活動を追跡する技術は、発生・成長に伴う脳神経回路の形成や、長期記憶の形成に関わる神経細胞を同定する上で、必要不可欠なツールである。本研究では、神経活動マーカーに応答する磁性ナノプローブを開発し、磁気共鳴イメージング（MRI）により動物が生きたまま脳神経活動を追跡できる技術の確立を目指した。開発したプローブは、活動マーカー濃度依存的に凝集し、NMR横緩和時間を短縮した。さらに、マウス海馬および初代培養神経細胞のライセート中で、活動マーカーの検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、脳神経活動を追跡するには、神経活動マーカーの発現を蛍光免疫染色する必要があるため、同一個体で活動を追跡することは困難であり、実験に多大な労力と時間を要する。本研究では、動物が生きたまま神経活動を長期追跡可能な、これまでに全く報告例がない革新的技術の開発に成功した。本技術が、上記の問題を解決し、長期記憶の形成や脳発生のメカニズム解明にパラダイムシフトを引き起こす可能性も十分に考えられる。

研究成果の概要（英文）：Tracking technology of neural activity is essential to identify neurons involved in the formation of brain neural circuits during development and growth, as well as in the formation of long-term memory. Here, we developed magnetic nanoprobes that respond to neural activity markers, aiming to establish a technology that allows for tracking brain neural activity in living animals using magnetic resonance imaging (MRI). The developed probes aggregated in response to the concentration of activity markers and shortened the NMR transverse relaxation time. Additionally, we successfully detected activity markers in lysates of mouse hippocampus and primary cultured neurons.

研究分野：分子イメージング

キーワード：MRI 酸化鉄ナノ粒子 神経活動記録 プローブ

1. 研究開始当初の背景

神経活動を追跡する技術は、発生・成長に伴う脳神経回路の形成や、長期記憶の形成に関わる神経細胞を同定する上で、必要不可欠なツールである。しかしながら、現在汎用されている神経活動マーカーは、蛍光免疫染色を用いるために、同一個体において長期間連続で活動を追跡することができないという問題を有していた。

2. 研究の目的

本研究では、神経活動マーカーに応答する磁性ナノプローブを開発し、磁気共鳴イメージング (MRI) によって、動物が生きたまま脳活動を連続追跡できる革新的技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) プローブの設計および原理

プローブの母体には MRI 造影剤である酸化鉄ナノ粒子を用いた。酸化鉄ナノ粒子は、粒子間距離に依存した T_2 短縮を引き起こす。この原理に基づき、神経活動マーカーの濃度に依存して凝集し、低信号 T_2 画像をもたらす新規プローブの開発に取り掛かった (図 1)。

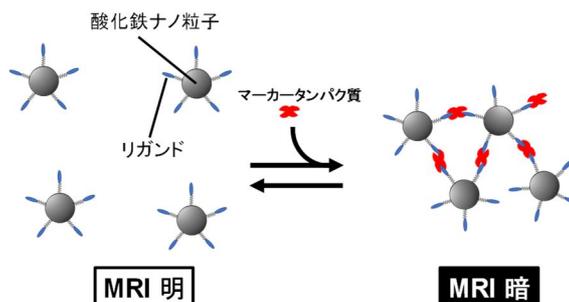


図 1. プローブのデザインと検出原理の概要。

4. 研究成果

(1) プローブの合成

まず、thermal decomposition 法によって、オレイン酸コーティングされた酸化鉄ナノ粒子を合成した。この時、280、300、320 の 3 パターンの反応温度で合成を行ったところ、320 で行った時に、最も単分散かつ分散性に優れた平均粒子径 20 nm の粒子が得られた。よって、320 で合成した粒子をプローブ開発の原料として用いることとした。続いて、神経活動マーカータンパク質のリガンドを末端に共有結合させた PEG 化リン脂質を用いて、Bangham 法により酸化鉄ナノ粒子表面をコーティングし、目的のプローブを調製した。プローブの濃度は、紫外可視吸収スペクトル測定により定量した。また、水溶液中において動的な光散乱を測定すると、粒子径は 99 ± 14 nm であり、水中でも安定に分散することがわかった。

(2) *In vitro* における神経活動マーカーの検出

合成したプローブを分散させた水溶液に、神経活動マーカータンパク質を最終濃度 0 ~ 50 nM となるよう加え、動的な光散乱を測定した。その結果、タンパク質濃度の上昇に伴い、粒子径がおよそ 600 nm まで増大した (図 2a)。一方、過剰の遊離リガンドが存在すると、プローブは凝集しなかった。また、粒子表面にリガンドを有さないプローブは、凝集性を示さなかった。以上から、プローブはリガンド-タンパク質間の相互作用で凝集していることが示唆された。

さらに、上記と同様の条件で、プローブの T_2 短縮能を測定した。 T_2 短縮能は、タンパク質濃度の増大に伴い増加し、粒子径の変化に伴った挙動を示した。一方で、リガンドを有さないプローブはほとんど応答しなかった (図 2b)。以上から、プローブが、nM オーダーの活動マーカーを検出できることがわかった。

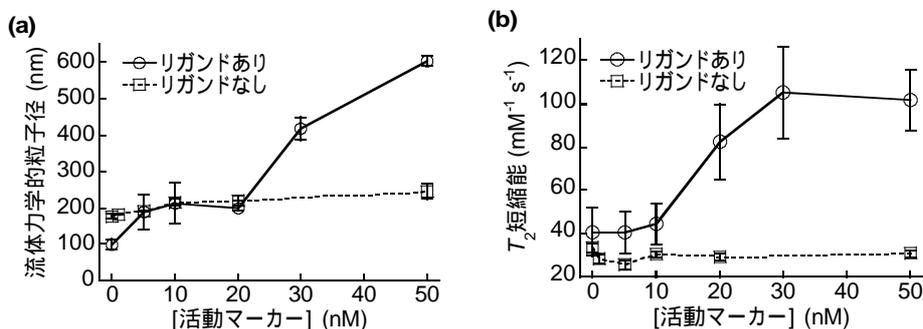


図 2. 活動マーカー濃度に対するプローブの (a) 流体力学的粒子径変化および (b) T_2 短縮能変化。

(3) 初代培養神経細胞ライセート中における神経活動マーカーの検出

In vitro でプローブが機能することがわかったため、初代培養神経細胞を用いて、夾雑物存在下でプローブの応答性を評価した。妊娠 15 日目のマウス胎児の大脳皮質を抽出し、初代培養神経細胞を調製した。細胞を播種してから 1~2 週間経過後に、軸索の伸長を確認し、KCl 添加によって活動マーカーの発現を誘導した。誘導前、誘導後 0.5、5、12、24 時間の細胞を破碎し、ライセート中の総タンパク質量あたりのマーカータンパク質量を ELISA で定量した。その結果、KCl 誘導の 5 時間後以降から、マーカータンパク質の発現量が上昇する傾向が見られた(図 3a)。それぞれのライセートにプローブを加え、 T_2 短縮能を測定すると、発現量の上昇に伴い T_2 短縮能も増大する傾向が見られた(図 3a)。

(4) マウス海馬ライセート中における神経活動マーカーの検出

マウスの海馬ライセートを調製し、プローブの応答性を評価した。神経活動誘発剤を投与してから 1、5、12、24 時間後に海馬を抽出し、ライセートを調製した。また対照群として誘発剤を投与していないマウスの海馬ライセートも同様に調製した。各ライセート中における総タンパク質量あたりのマーカータンパク質量を ELISA で定量すると、24 時間後まで発現量が上昇し続けた。その発現量は、細胞ライセートよりも大きな値を示した。プローブを加え、 T_2 短縮能を測定すると、発現量にともない短縮能が増大することがわかった。以上から、夾雑物存在下においてもプローブがマーカータンパク質を検出できることが示唆された。一方、海馬ライセート中のマーカータンパク質の発現量は、神経細胞ライセートよりも多いものの、 T_2 短縮能は大きな差が見られなかった。

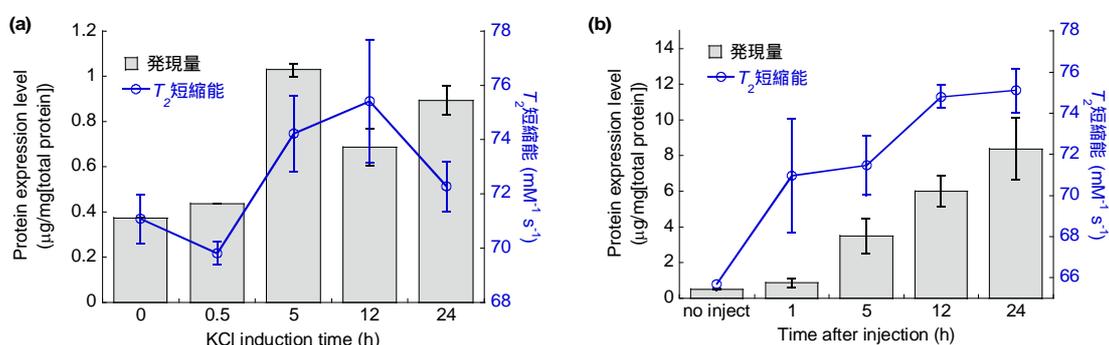


図 3. 初代培養神経細胞およびマウス海馬ライセート中における活動マーカータンパク質発現量と T_2 短縮能の関係。(a) KCl 刺激時間に対する初代培養神経細胞ライセート中のマーカータンパク質発現量とプローブの T_2 短縮能。(b) 活動誘発剤投与後の経過時間に対するマウス海馬ライセート中のマーカータンパク質発現量とプローブの T_2 短縮能。

(5) プローブの細胞毒性評価

異なる鉄濃度のプローブに HeLa 細胞を曝露し、48 時間後の細胞生存率を MTT アッセイにより評価したところ、*in vivo* 投与に用いる濃度である 10 μM 以上においても、顕著な細胞毒性は見られなかった(図 4)。

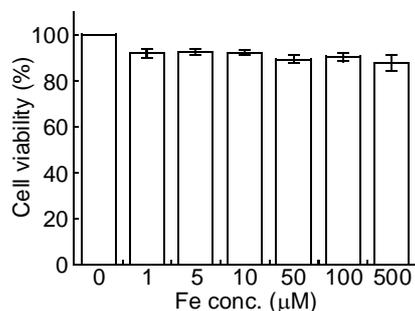


図 4. HeLa 細胞に各濃度のプローブを曝露し、48 時間経過した後の細胞生存率。

以上の結果から、プローブが生体適合性を有し、夾雑物存在下においても活動マーカーを T_2 測定で検出できることが示唆された。今後、*in vivo* における神経活動の非侵襲的なトラッキング法としての応用が大いに期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Orita Yasuhiko, Shimanuki Susumu, Okada Satoshi, Nakamura Kentaro, Nakamura Hiroyuki, Kitamoto Yoshitaka, Shimoyama Yusuke, Kurashina Yuta	4. 巻 94
2. 論文標題 Acoustic-responsive carbon dioxide-loaded liposomes for efficient drug release	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Ultrasonics Sonochemistry	6. 最初と最後の頁 106326 ~ 106326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ultsonch.2023.106326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura Kai, Harrison Suzanna, Kawai Kazuki, Morita Taiki, Miura Kazuki, Okada Satoshi, Nakamura Hiroyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 Iodophenyl-conjugated closo-dodecaborate as a promising small boron molecule that binds to serum albumin and accumulates in tumor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128869 ~ 128869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2022.128869	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 岡田 智, Rohmad Yudi Utomo, 住吉 晃, 青木 伊知男, 中村 浩之	4. 巻 16
2. 論文標題 アミロイド 線維化を検出・阻害するクルクミン誘導体MRIプローブの開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本分子イメージング学会機関誌	6. 最初と最後の頁 26 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Okada Satoshi, Muto Yuka, Zhu Bo, Ueda Hiroshi, Nakamura Hiroyuki	4. 巻 95
2. 論文標題 Development of a Peptide Sensor Derived from Human ACE2 for Fluorescence Polarization Assays of the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 6198 ~ 6202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c05818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Kai, Kashiwagi Hideki, Morita Taiki, Fukuo Yusuke, Okada Satoshi, Miura Kazuki, Matsumoto Yoshitaka, Sugawara Yu, Enomoto Takayuki, Suzuki Minoru, Nakai Kei, Kawabata Shinji, Nakamura Hiroyuki	4. 巻 360
2. 論文標題 Efficient neutron capture therapy of glioblastoma with pteroyl-closo-dodecaborate-conjugated 4-(p-iodophenyl)butyric acid (PBC-IP)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 249 ~ 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2023.06.022	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 Okada Satoshi, Nishimura Kai, Ainaya Qarri, Shiraishi Kouichi, Anufriev Sergey A., Sivaev Igor B., Sakurai Yoshinori, Suzuki Minoru, Yokoyama Masayuki, Nakamura Hiroyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of a Gadolinium-Boron-Conjugated Albumin for MRI-Guided Neutron Capture Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 6311 ~ 6318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00726	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 岡田 智, 西村 開, Qarri Ainaya, 白石 貢一, 鈴木 実, 横山 昌幸, 中村 浩之	4. 巻 17
2. 論文標題 MRI誘導型ホウ素中性子捕捉療法のためのガドリニウム-ホウ素結合アルブミンの開発	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本分子イメージング学会機関誌	6. 最初と最後の頁 21 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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21件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 岡田智、西村開、Qarri Ainaya、白石貢一、鈴木実、横山昌幸、中村浩之
2. 発表標題 MRI誘導型ホウ素中性子捕捉療法を指向したアルブミン薬剤の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第17回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田智、西村開、Qarri Ainaya、白石貢一、鈴木実、横山昌幸、中村浩之
2. 発表標題 MRI誘導型ホウ素中性子捕捉療法のためのガドリニウム-ホウ素結合アルブミンの開発
3. 学会等名 第17回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田智、齋木翔太、三浦悠椰、領家梨恵、住吉晃、川島隆太、中村浩之
2. 発表標題 興奮性神経活動および活動履歴を可視化するMRIプローブの開発
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦悠椰、福地守、中村浩之、岡田智
2. 発表標題 脳神経活動履歴を可視化するMRIプローブの開発
3. 学会等名 第13回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田智
2. 発表標題 MRIプローブによる分子レベルの脳機能イメージング
3. 学会等名 第32回日本バイオイメージング学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田 智
2. 発表標題 磁性プローブが切り拓く分子レベルのfMRI
3. 学会等名 文部科学省学際領域展開ハブ形成プログラム『スピン生命フロンティア』キックオフ会議（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Satoshi Okada, Shota Saiki, Rie Ryoke, Akira Sumiyoshi, Akari Nakanishi, Ryuta Kawashima, Hiroyuki Nakamura
2. 発表標題 Development of K+-responsive MRI probes for excitatory functional imaging
3. 学会等名 The 11th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Satoshi Okada, Shota Saiki, Rie Ryoke, Akira Sumiyoshi, Akari Nakanishi, Ryuta Kawashima, Hiroyuki Nakamura
2. 発表標題 Development of MRI probes for imaging of excitatory neural activity and activity history
3. 学会等名 MRI Symposium Osaka（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大木 岳人、北原 舜也、中村 浩之、岡田 智
2. 発表標題 アルブミン結合性鉄()錯体MRI造影剤の開発
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会(2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 生体イオン応答性MRIプローブの開発
2. 発表標題 中西 明季、中村 浩之、岡田 智
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会(2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岡田智、Rohmad Yudi Utomo、住吉晃、青木伊知男、中村浩之
2. 発表標題 アミロイド 線維化を検出・阻害するクルクミン誘導体MRI プローブの開発
3. 学会等名 第16回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田智
2. 発表標題 磁性分子による脳階層構造の統合解析
3. 学会等名 JST創発融合の場(金沢大学)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武藤有花、岡田智、中村浩之
2. 発表標題 新型コロナウイルスを検出する蛍光ペプチドセンサーの開発
3. 学会等名 日本化学会生体機能関連化学部会若手の会第33回サマースクール
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武藤有花、岡田智、中村浩之
2. 発表標題 SARS-CoV-2を検出する蛍光ペプチドセンサーの開発
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋木 翔太、中村 浩之、岡田 智
2. 発表標題 脳神経活動イメージングのためのK+ 応答性MRIプローブの開発
3. 学会等名 第12回CSJ化学フェスタ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoshi Okada, Vivian Hsieh, Rohmad Yudi Utomo, Akira Sumiyoshi, Ichio Aoki, Alan Jasanoff, Hiroyuki Nakamura
2. 発表標題 Development of MRI Contrast Agent-based Probes for Imaging of Neurotransmitters and Amyloid Fibrils
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-10) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田智、齋木翔太、中村浩之
2. 発表標題 磁性分子による脳階層構造の統合解析
3. 学会等名 JST創発自発的な融合の場 第1回分子生命反応創発討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三浦悠椰、中村浩之、岡田智
2. 発表標題 脳神経活動履歴を可視化するMRI プローブの開発
3. 学会等名 JST創発自発的な融合の場 第1回分子生命反応創発討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田 智、齋木 翔太、領家 梨恵、住吉 晃、川島 隆太、中村 浩之
2. 発表標題 K+応答性MRIプローブの開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高島由佳、中村浩之、岡田智
2. 発表標題 酸化鉄ナノ粒子と温度応答性高分子による薬物徐放システムの開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田智、Qarri Ainaya、西村開、白石貢一、横山昌幸、中村浩之
2. 発表標題 MRI誘導型BNCTを指向したアルブミン結合造影剤の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 岡田智	4. 発行年 2023年
2. 出版社 株式会社化学同人	5. 総ページ数 80
3. 書名 月刊「化学」2023年12月号 Mounji Bawendi 博士の思い出 - MRI がつないだ共同研究	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規蛍光検出薬	発明者 中村浩之、岡田智	権利者 東京工業大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-79168	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	中村 浩之 (Nakamura Hiroyuki) (30274434)	東京工業大学・科学技術創成研究院・教授 (12608)	
研究分担者	三浦 一輝 (Miura Kazuki) (70825330)	東京工業大学・科学技術創成研究院・助教 (12608)	
研究分担者	盛田 大輝 (Morita Taiki) (80881929)	東京工業大学・科学技術創成研究院・助教 (12608)	

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
---------	---------