科学研究費助成事業

6 月 1 4 日現在 令和 元年

研究成果報告書

機関番号: 32645 研究種目:挑戦的研究(萌芽) 研究期間: 2017~2018 課題番号: 17K20121 研究課題名(和文)遺伝的にコード可能な超音波イメージング造影剤の開発

研究課題名(英文)Development of genetically-encodable contrast agent for ultrasonography

研究代表者

水島 良太(Mizushima, Ryota)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号:10749138

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):光合成細菌planktothrix rubescens/agardhii 由来のガスベシクル遺伝子の一部を ほ乳類細胞で発現することにより、ガスベシクル様の蛋白質ナノ粒子をほ乳類細胞内で発現する方法を開発し、 このほ乳類細胞内で発現したナノ粒子が、超音波エコーイメージングや、Xe-129 HyperCEST MRIにおける遺伝子 コード可能な造影剤として機能することを細胞レベルで示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義 ほ乳類細胞におけるガスベシクル様の蛋白質ナノ粒子を発現する方法を開発することで、遺伝子コード可能な超 音波エコーイメージング、およびHyperCEST MRI造影剤が実用化可能であることを細胞レベルで示した。将来的 には個体レベルで、非侵襲的なイメージング手法であるMRIや超音波エコーイメージングによって、分子細胞レ ベルの現象を可視化できる可能性を示す成果であり、生物医学研究における広範な応用が期待される。

研究成果の概要(英文): I have developed the methodology of mammalian expression of gas vesicle-like protein nanoparticles by inducing the part of gas vesicle genes derived from planktothrix rubescens/agardhii and demonstrated that these nanoparticles could be functionalized as a genetically-encoded contrast agent for ultrasonography and Xe-129 HyperCEST MRI.

研究分野: 生物物理学, 生物工学, NMR/MRI

キーワード: MRI 超音波エコーイメージング ナノ粒子 造影剤 生物工学



様 式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)1.研究開始当初の背景

生命科学研究において、in vivo 観察に用いられてきたのは主に光学顕微鏡であり、個体中の 細胞や組織を高い空間分解能で高速に撮像できる。特に、蛍光蛋白質のようなレポーター遺伝 子は、レポーター分子である蛍光色素の機能を、異種生物の蛋白質で代替し、生体中の遺伝子 を個体レベルで観察できる、医科学研究の重要な手法である。一方で、生体組織での散乱や吸 収のため、生体組織深部を光で非侵襲的に観察するのは難しい。そこで、磁気(静磁場・電磁 波)や超音波を用いた観察手法である、MRI やエコーが、医科学研究の次世代非侵襲 in vivo 観 察・操作手法と期待される。

MRI は、非侵襲的に、個体全体を、高い空間分解能で撮像できる。しかし、MRI には、低い 信号感度という原理的な問題がある。通常 MRI の撮像で使う水分子由来の信号が大きく、生体 中の分子の発現と共役した造影剤が造影効果を生じるには、高い造影剤の濃度(µM-mM)が 必要で、細胞中で少数しか発現しない分子を、個体レベルで造影して検出するのは難しい。超 音波エコーイメージング(UI)は、臨床医学で頻用されるイメージング手法で、非侵襲である ほかに、実時間撮像が可能である。空間分解能も前臨床(小動物用)UI 装置では、20-30µm 程度の機器も実用化している。レポーター分子(造影剤)としては、1-10µm 程度の気泡を脂 質や蛋白質で被覆して安定化したマイクロバブル(MB)が実用化されている。基礎研究では、 より小さいナノサイズの安定化気泡であるナノバブル(NB)も研究されている。NBは、数百 nm の腫瘍血管孔を透過でき、癌の細胞体に蓄積して造影できることが期待されている。しか し、MB/NB は、生体内での安定性が課題であり、特に NB では一般に造影効果が MB に比べ 弱いのが問題である。一方で、遺伝的にコード可能なレポーター遺伝子が、UI にはこれまで存 在せず、医科学研究での利用を限定してきた。もし、NB を代替できる蛋白質が自然界に存在 すれば、その遺伝子は UI のレポーター遺伝子の候補である。

先述した、MRI の信号感度の低さの原理的問題を克服する方法に、超偏極 (Hyperpolarization)希ガスMRI がある。これは、¹²⁹Xe をレーザーで励起し、超偏極状態に して¹²⁹Xe の磁化を数万倍以上増加し、MRI 信号強度を大幅に高める方法である。さらにこの Xe ガス分子をトラップするかご分子のクリプトフェンA (CrA)を用いて、呼気から生体に導 入した超偏極 Xe ガス分子で CEST 造影法を行う、HyperCEST MRI が研究されている。GV を、この CrA の様な HyperCEST 造影剤を代替するレポーター遺伝子に応用できることが報告 された (Nat. Chem., 2014)。その検出可能な濃度は <u>pM-nM</u>のオーダーであり、細胞内で少 数しか発現しない遺伝子を、非侵襲に、1 細胞の空間分解能、個体全体で検出できる、MRI 分 子イメージングの有力候補である。本研究で実現したほ乳類細胞での GV 発現制御技術は、遺 伝子コードされた HyperCEST 法の重要な基盤となる。特に、GV の大きさを制御して、複数 種の分子を検出可能と報告されており、本技術のインパクトは大きい。このように、GV のほ 乳類細胞における発現制御技術は、磁気や超音波を用いた次世代の非侵襲 in vivo イメージン グの基盤技術であり、神経科学や免疫学、医療など広範な医科学分野にインパクトを与える可 能性がある。

2. 研究の目的

そこで近年、ガスベシクル(GV)と呼ばれる、光合成細菌や好塩性細菌で発現する蛋白質ナノ粒子が注目されている。GV は自己組織化する GV 蛋白質(GvpA, GvpC など)が、双円錐型や紡錘型の幾何学的な閉じた構造を形成したウイルスキャプシド様の蛋白質粒子で、大きさは100-600nm 程度である。水を排除して気体を選択的に透過し、内部は、細胞質に溶けた気体分子が、平衡状態に達するまで、拡散して存在する。GV は宿主細菌に浮力を与え、生態系に

おいて、光や栄養の獲得に寄与する。この GV が UI の造影剤に応用できることが最近報告さ れた (Nat. Nano., 2014)。しかし、この報告では、GV のほ乳類細胞での発現を示しておらず、 UI レポーター遺伝子としての GV は、概念にとどまる。実際、GV 遺伝子群は 13-15 個の遺伝 子から構成され、ほ乳類細胞での異種発現は困難と指摘されていた(Angew. Chem., 2016)。 本研究では、このほ乳類細胞におけるガスベシクルの発現手法を確立することで、遺伝子コー ド可能な UI・超偏極キセノン MRI における高感度な造影剤の実現を目指す。

3.研究の方法

本研究で、私は Planktothrix rubescenes/agardii 由来の GV 遺伝子群(GvpA と GvpC の 3 つの変異体 GvpC16/C20/C28)の性質に着目し、これらを人工的に合成した遺伝子を組み合わせ、KPL-4 細胞(ヒト乳がん由来細胞株)に導入し、透過型電子顕微鏡などの方法で、細胞内における GV の発現について調べる。また、超音波エコーや超偏極キセノン MRI における造影効果について細胞レベルで検証する。

4. 研究成果

planktothrix rubescens/agardhii という光合成細菌の GV 遺伝子 gvpA と gvpC16/20/28を Tol2トランスポゾンベクターにクローニングして (Fig.1)、様々な組み合わせで、ほ乳類細胞 に導入して、安定発現細胞株を作成した(Fig.2)。この細胞から GV を精製したところ、それぞ れ異なる大きさや形の GV が透過型電子顕微鏡(TEM)で観察できた(Fig.3)。これらの GV 安 定発現細胞株に 5MHz の超音波を照射したときの、散乱強度を観測したところ、対照細胞に対 して有意な、散乱強度の増加が示された(Fig.4)。これは細胞内で発現した GV が超音波エコー の造影剤として機能することを示す。特に、GV_AC16C20 は、100 nm 以下の大きさであり、 腫瘍血管孔を透過可能な大きさで、強い造影能を示し、腫瘍細胞の造影剤としても有望だと考 えられる。次に、HyperCEST MRI における造影剤として機能するかを調べた。そのために、 飽和パルスの周波数を走査した時の、 溶解相の HPXe の信号強度をプロットした Z スペクトル を測定した (Fig.5, Fig.6)。その結果、GV_AC28 と結合した HPXe は 20 ppm, GV_AC16C20 と結合した HPXe は 60 ppm の飽和周波数を持つことがわかった。これは、それぞれの GV を 発現する細胞を、飽和周波数を変えることで、HyperCEST MRI によって選択的に造影可能で あることを示す。この飽和周波数で、%CEST 造影を計算したときの、飽和時間への依存性を 調べた (Fig.7, Fig.8)。その結果 GV_AC28 においては、in vivo への適用を考えた時に現実的 な飽和時間である2秒でも実用的な%CEST 造影(6.5±0.9%)を得られることがわかった。この GV_AC28 細胞と、対照細胞ファントムについて、HyperCEST MRI 画像を撮像した。その結 果、GV_AC28 細胞で、HyperCEST 造影を得た(Fig.9)。



Fig.2 GV 安定発現細胞株



Error bar : 100 nm (左), 500 nm (中央), 100 nm

Fig.3 精製 GV の電子顕微鏡画像



Fig.5 GV_AC28 細胞の Z スペクトル



Fig.7 GV_AC28 細胞の%CEST 造影 の飽和時間依存性



Fig.9 GV_AC28 細胞と対照(KPL-4) 細胞 ファントムの HyperCEST MRI 画像



Fig.4 細胞内 GV の超音波エコー造影能



Fig.6 GV_AC16C20 細胞の Z スペクトル



Fig. 8 GV_AC16C20 細胞の%CEST 造影の飽和時間依存性

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

 Multiplexed HyperCEST detection of genetically-reconstituted gas vesicle nanoparticles in human cancer cells in vitro. <u>Ryota Mizushima</u>, Kanako Inoue, Atsuko H. Iwane, Tomonobu M. Watanabe, Atsuomi Kimura, 第五十六回日本生物物理学会年会 (2018.9)

2)Development of genetically-encoded contrast agent for ultrasonography. <u>Ryota Mizushima</u>, Kanako Inoue, Atsuko H. Iwane, Tomonobu M. Watanabe 第五十五回日本生物物理学会 年会 (2017.9)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕〇出願状況(計 1件)

名称:「ガスベシクルタンパク質複合体を発現可能な真核細胞の取得方法、真核細胞、真核細胞 を用いたガスベシクルタンパク質複合体の生産方法、およびキット」PCT/JP2017/031637, 2017.9.1 発明者:水島良太、渡邊朋信 権利者:理化学研究所 種類:特許 番号:PCT/JP2017/031637 出願年:2017 年 国内外の別: PCT

```
○取得状況(計 0件)
名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:
```

〔その他〕 ホームページ等: BioRxiv preprint (https://www.biorxiv.org)

Multiplexed HyperCEST detection of genetically-reconstituted gas vesicle nanoparticles in human cancer cells, Ryota Mizushima(80%)*, Kanako Inoue, Neil J. Stewart, Atsuko H. Iwane, , Atsuomi Kimura ,Tomonobu M. Watanabe*, **doi**: https://doi.org/10.1101/599118

6. 研究組織

(1)研究分担者研究分担者氏名:ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名: 研究者番号(8桁):

(2)研究協力者研究協力者氏名:ローマ字氏名:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。