

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03527

研究課題名(和文) ソフトな分子間相互作用が造影メカニズムとなる微細血管用高分子MRIプローブ

研究課題名(英文) Visualizing microvessels in magnetic resonance images via polymeric MRI contrast agents

研究代表者

馬原 淳 (Mahara, Atsushi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：80416221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ソフトな分子間相互作用によって一時的に血中循環する微細血管造影用高分子MRI造影剤を作製し、従来法では可視化できなかった脳微細血管のMRI造影法を開発した。分子構造を最適化した高分子MRI造影剤は、自己組織化形成により大きな繊維状の構造を形成することを突き止めた。この造影剤を血中投与しMR撮像すると45 μmの解像度で脳内の微細血管網をイメージングすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ガドリニウムキレートとフルオレセインを結合させた分岐型ポリエチレングリコールが高濃度条件においてのみ自己組織化構造を形成し、特有の繊維構造を形成していることを見出した。さらにこの自己組織化構造の形成メカニズムについても解明できた。この分子を血中へ投与することで通常のMRI撮像では見られない微細血管網を可視化することができ、新たな脳卒中の画像診断法として有効であることを実証した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed polymeric MRI contrast agents which have an adequate half-life in the blood and visualized the capillaries of the brain in magnetic resonance imaging (MRI).

We found that the fluorescein and Gd-chelate conjugated 8-arm polyethylene glycol formed supramolecular fiber structure under only high concentration condition. When the agents were injected into the blood, we succeeded in visualizing the microvessel structure with the resolution of 45 μm on MRI scan.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：高分子 自己組織化構造 画像診断 MRI 脳卒中 イメージング 血管

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) MRI により微細血管網を描出させる手法として、高次場 MRI 装置、クライオ受信コイル、撮像シーケンスの改良により高い空間分解能が実現化されている。一方シグナルを高感度化する手法としては、頸部の血流に RF パルス照射して磁化ベクトルを反転させたスピンを脳血管内に灌流する Arterial Spin Labeling (ASL) 法 [1,2] や、DSC 法 (Dynamic susceptibility contrast) [1,3] が開発されているが、得られる信号強度の S/N 比が低いことや、既存の造影剤を使用しても造影剤の血中滞留性が低く微細な血管領域から信号を抽出できない。
- (2) 近年、高分子化合物を用いた種々の機能をもつ MRI 造影剤の開発が進められている。例えば、血管造影を狙ったアルブミン結合型造影剤や高分子ミセル型造影剤が挙げられる。投与後、血中アルブミンと結合した造影剤が安定に血中循環するため血管構造を可視化するものである [4]。高分子ミセル構造をもつ造影剤は、血中の他の生体分子と相互作用せず安定にミセル構造を形成しながら血中循環する [5]。一方で、細胞外組織への漏出を完全に抑制できず、また体内で長期残存するため炎症反応を惹起してしまう。

このように装置的な改良によって MRI の高い空間分解能は実現化されている一方で、微細血管網を非侵襲で画像化する高感度プローブの設計という観点では、未だ十分な研究・開発が進められていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、高分子造影剤の新たな分子設計として、凝集と緩やかな高分子凝集体の崩壊を応用した「一時的な血中循環性」を「ソフトな分子間相互作用」により実現化することによって微細血管網を高精細に可視化するプローブを開発する。これを進めるにあたって以下の 2 つの目的を設定した。

- (1) 種々の分子構造 (分子量、分岐構造) をもつポリエチレングリコールに対して、ガドリニウムキレートと、フルオレセインを導入した高分子 MRI 造影剤を合成し、分子サイズ、ガドリニウムの緩和時間や分子の自己組織化構造、構造形成に関わる分子メカニズムについて検証する。
- (2) 正常ラットを用いて頭部の MRI 撮像を実施し、投与量や投与濃度が、脳微細血管網の造影効果に与える影響を調べる。また高分解能の条件で撮像し、造影剤投与によって得られる高分解能の MRI 撮像条件を検討した。さらに、脳動脈瘤モデルラットを用いて微細血管に生じる脳動脈瘤の可視化を試みた。

### 3. 研究の方法

- (1) 直鎖型ポリエチレングリコール、4 分岐、8 分岐型ポリエチレングリコールに対してフルオレセインならびにガドリニウムキレートを導入した高分子造影剤を合成し、NMR、ICP-MS により合成を確認した。次いで、動的光散乱法によって溶液中での分子サイズを定量化した。また、自己組織化構造が形成されたときのフルオレセインの分子環境を調べるために、吸収スペクトル、蛍光異方性、NMR、CD スペクトルを測定し、フルオレセインの配向や自己組織化形成における熱力学的安定性について評価した。
- (2) 投与濃度・投与量が造影効果に与える影響を調べるために、尾静脈ラインを確保した正常ラットに対して造影剤濃度一致で投与量を変化させた場合と、投与量を一定にして投与濃度を変化させた時の脳血管 MRI 画像の造影効果を評価した。また、撮像条件を最適化した条件において脳領域の MRI 画像を取得して、得られる画像の解像度について検討した。さらに、脳動脈瘤形成モデルラットに対して、造影剤分子構造や投与量を最適化した条件で投与して、微細血管領域で形成される動脈瘤の可視化の可能性を検討した。

### 4. 研究成果

- (1) ポリエチレングリコールの分子構造と自己組織化構造形成  
ポリエチレングリコールの分子量や分岐構造が自己組織化構造形成に及ぼす影響を調べるために、分子量 10kD から 40kDa で分岐構造として直鎖状、4 分岐型、8 分岐型ポリエチレングリコールを選択した。それぞれのポリマーにフルオレセインを結合させて、動的光散乱法によって分子サイズを定量化した結果、15kDa の分子量をもつ 8 分岐型ポリエチレングリコールにフルオレセイン 1 分子を導入した場合に、効率よく自己組織化構造が形成される事が判明した [6,7]。分岐構造や分子量が構造体形成に与える影響は判明したが、アームの

長さがどのような規則によって構造形成に寄与しているかは完全に解明できなかった。今後、*in silico* での凝集体形成のシミュレーション解析も含めて解明を進めたい。この検討から、フルオレセイン 1 分子導入した 8 分岐ポリエチレングリコールが最適構造であることを見出したので、この分子にガドリニウムキレート 3 分子を導入した造影剤 (8-arm PEG-FGd<sub>3</sub>) (図 1) を以後の検討で用いた。

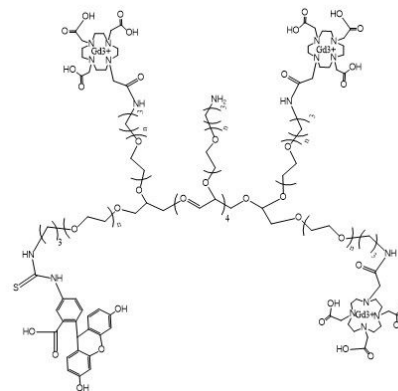


図 1 8-arm PEG-FGd<sub>3</sub> の分子構造

- (2) 分光学的手法による自己組織化構造の解析  
造影剤投与の条件である 200mg/ml の 8-arm PEG-FGd<sub>3</sub> 水溶液を調製し、分子間力顕微鏡により構造体を観察した。その結果、Core-Shell 型のナノ粒子が 4 つ平面状に会合し、その会合体が繊維軸上にスタックする形で繊維状に配列する超分子構造体を形成していることを見出した (図 2)。

フルオレセイン分子が導入されていない場合には観察されないことから、フルオレセインによる特異的な自己組織化であると考えられた。フルオレセインの吸収スペクトル変化を濃度に対してプロットした結果、2 状態遷移のプロファイルを示した。さらに、その変化に伴ってエキシトンカップリング型の誘起 CD シグナルも示された。また、蛍光異方性強度をプロットすると濃度増加にともなって偏光が解消されていたことから、フルオレセイン分子がスタッキングしていることが明らかとなった。NMR 測定においても、重水中ではフルオレセインの NMR シグナルが遮蔽されてピークが減少することから、フルオレセインを中心とした Core-Shell 型のナノ粒子の形成であることが明らかとなった。

吸収スペクトルの 2 状態遷移プロファイルや CD スペクトル解析から、会合体の自由エネルギーは -28kJ/mol であることが見積もられた。フルオレセイン分子のスタッキングは -3.9kJ/mol 程度であることが報告されていることから、自己組織化構造体全体の安定化にはポリエチレングリコールが大きく寄与していると考えられる。

以上の結果より、8-arm PEG-FGd<sub>3</sub> の超分子構造体形成にはフルオレセインのスタッキングが駆動力として関与していることを突き止め、この分子間力がソフトな分子間相互作用の主要因であることを明らかとできた [7]。

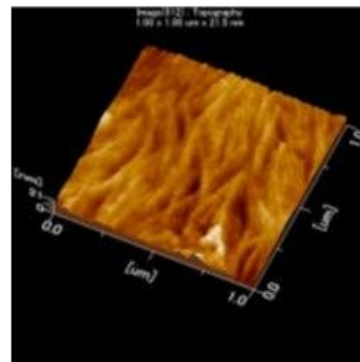


図 2 形成した繊維状の超分子構造体の原子間力顕微鏡写真

- (3) MRI を用いた超高解像度の脳微細血管イメージング

最も安定に自己組織化構造体を形成する条件を用いて、MRI の高精細イメージングを試みた。正常ラットに対して尾動脈ラインを確保し 200mg/mL の造影剤を投与して、MRI スキャンを実施した。この造影剤を使った MR シグナル造影効果は、投与量ではなく投与時の造影剤濃度に依存することが示された。造影剤濃度を 200mg/ml の条件で投与した結果、図 3 に示すように脳内の微細な結果を精細にイメージングできることが示された。得られた画像シグナルのラインプロファイルをガウシアンフィッティングして半値幅を解析した結果、装置設定解像度と同じ 45 μm の半径の血管構造を描写していた [7]。造影剤投与前では、全く造影できなかった脳内の微細血管網が精細に描出され、投与後 24 時間で完全に尿中排泄されることから、1 個体をこの造影剤で連続検査することも可能である。解像度については本研究で開発した造影剤で飛躍的に向上させられ、MRI での微細血管イメ



図 3 頭部 MRI 画像 (左: 造影剤なし、右: 造影剤投与)

ージングという新たな方法論になるものと期待できる。一方、目的とする 10  $\mu\text{m}$  程度の毛細血管網の可視化には至らなかったことから、今後血中滞留性を 3 倍程度増加できる分子を設計し、毛細血管網も画像化できる造影剤として

(4) 脳動脈瘤モデルを用いた微細血管脳動脈瘤形成の可視化

脳動脈瘤形成モデルに対して、最適化した造影剤投与条件で微細な脳動脈瘤の可視化を試みた。脳動脈瘤の形成を誘導する処置をしたラットに対して、最適化した条件で造影剤を投与し脳領域での MRI 画像を取得した結果、100  $\mu\text{m}$  程度の微小な脳動脈瘤形成を可視化できることが確認できた。今後、モデル動物に対する連続的な投与も含めて、微細な脳動脈瘤の診断の可能性について検討を続ける。

< 引用文献 >

- [1] Weber MA et al. Cancer Imaging (2006)6, S32.
- [2] Williams et al. Pro Natil Acad Sci USA (1992)89. 212.
- [3] Rosen BR et al. Magn Reson Med (1990)14, 249.
- [4] Longo D.L. et al. Biomaterials (2016) 75, 47.
- [5] Kono K. et al. Biomaterials (2011) 32, 1387
- [6] Mahara, A., et al. Chem Commu (2020) 56, 11807.
- [7] Mahara, A., et al. Macromol Biosci (2018) 18, e1700391.

## 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 Atsushi Mahara, Shigeyoshi Saito, Tetsuji Yamaoka	4. 巻 56
2. 論文標題 Visualising brain capillaries in magnetic resonance images via supramolecular self-assembly	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11807-11810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0cc04372a	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 Atsushi Mahara, Naoki Kobayashi, Yoshiaki Hirano, and Tetsuji Yamaoka	4. 巻 51
2. 論文標題 Sonoporation based labeling of mesenchymal stem cells with polymeric MRI contrast agents for live-cell tracking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 685-692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-019-0177-4	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 Yu-I Hsu, Atsushi Mahara, and Tetsuji Yamaoka	4. 巻 2018
2. 論文標題 Influence of Molecular Mobility on Contrast Efficiency of Branched Polyethylene Glycol Contrast Agent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Contrast Media & Molecular Imaging	6. 最初と最後の頁 1259325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/1259325	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 Atsushi Mahara*, Jun-ichiro Enmi, Yu-I Hsu, Naoki Kobayashi, Yoshiaki Hirano, Hidehiro Iida and Tetsuji Yamaoka	4. 巻 18
2. 論文標題 Super-fine magnetic resonance imaging of the cerebrovasculature using self-assembled branched polyethylene glycol-Gd contrast agent	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Macromol Biosci,	6. 最初と最後の頁 e1700391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mabi.201700391	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8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 馬原 淳
2. 発表標題 小口径脱細胞人工血管と微細血管用高分子MR造影剤
3. 学会等名 第71回医用高分子研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬原 淳、齋藤茂芳、青木友浩、山岡哲二
2. 発表標題 GdキレートとFluoresceinが結合した分岐型ポリエチレングリコールが形成する 自己組織化構造の評価と微細血管MRイメージング
3. 学会等名 第69回高分子年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬原 淳、齋藤茂芳、岡美栄子、青木友浩、山岡哲二
2. 発表標題 微細な血管構造を可視化する高分子MRI造影剤の 開発と脳動脈瘤イメージング
3. 学会等名 第14回日本分子イメージング学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Mahara, Shigeyoshi Saito, and Tetsuji Yamaoka
2. 発表標題 Microvascular MR imaging by self-assemble structure of fluorescein and Gd-chelate modified 8-arm PEG
3. 学会等名 第68回高分子年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Mahara, S. Saito, Y. Hsu, T. Yamaoka
2. 発表標題 Transient self-assembled polymeric contrast agents for superfine cerebrovasculature MR imaging.
3. 学会等名 ACS Fall 2019 National Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Mahara, S. Saito, and T. Yamaoka
2. 発表標題 Microfibrinous self-assembly of fluorescein and Gd-chelate conjugated 8-arm polyethylene glycol for MR contrast agent
3. 学会等名 5th International Symposium on Advances in sustainable polymer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬原淳
2. 発表標題 高分子MRI造影剤による微細血管網の可視化技術
3. 学会等名 第48回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬原淳
2. 発表標題 Gd修飾8分岐型ポリエチレングリコールの自己凝集構造による高精細細脳血管イメージング
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

〔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	山岡 哲二  (Yamaoka Tetsuji)  (50243126)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長   (84404)	
研究 分担者	齋藤 茂芳  (Saito Shigeyoshi)  (40583068)	大阪大学・医学系研究科・准教授   (14401)	

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