

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07016

研究課題名(和文) 温度応答性分子を使った疾患イメージングに関する基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental Research of Disease Imaging Taking Advantage of The Thermo-Responsive Molecules

研究代表者

唐澤 悟 (KARASAWA, SATORU)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80315100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：温度応答性ナノ微粒子は温度変化によってがんへの集積が期待されるため、大変興味を持たれる。今回3種類のナノ微粒子を構築し、形態、サイズや機能性を評価した。ガドリニウムを有するナノ微粒子はMRI造影剤として機能し、標準造影剤GdDOTAよりも高い造影能を示した。またサイズが約100 nmであるため、EPR効果によりがんへの集積性が期待される。ラジカルナノ微粒子では、約30 nm程度の球状のナノ微粒子が得られた。今後、造影能や還元剤に対する反応性を調べていく。強発光性ナノ微粒子では、中空のナノ微粒子が得られた。今後は、空隙へ抗がん剤を導入することを検討していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期にがんを見つけること、がん細胞、がん組織を死滅させることは我々人類の願いである。本研究は、がんの高温性を利用したがんイメージングの研究であり、ナノ微粒子を使ってMRIや蛍光によるがん検出・診断を目的としている。MRI用の検出プローブでは、ナノ微粒子化することで高い造影効果が見出された。蛍光プローブでは、ナノ微粒子が中空であることを見出し、今後は中空の中に抗がん剤を導入することを予定している。本研究で得られたナノ微粒子型検出プローブは、早期がん検出・がん死滅に対して有効性が高いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Thermal-responsive nanoparticles(TRNP) are of great significant because the TRNPs were expected to accumulate into tumors by controlling the temperature. Three NPs consisted of Gadolinium (Gd-NPs), radical(RA-NPs), and fluorophore (FL-NPs) were designed and their morphologies, sizes, and physical properties were investigated. The Gd-NPs function as MRI contrast agent and the resulting contrast ability was much larger than those of commercial available agents. In the case of RA-NPs, the spherical NPs with ~ 30 nm were observed by a transmission electron microscopy (TEM). In contrast, the FL-NPs exhibited intensive emission, and the presence of spaces in NPs was observed by TEM images. Accordingly, taking advantage of the spaces, the FL-NPs allows to contain the anti-cancer agents into the spaces.

研究分野：分析化学

キーワード：ナノ微粒子 MRI造影剤 蛍光 温度応答性

## 1. 研究開始当初の背景

早期にがんを見つけること、がん細胞、がん組織を死滅させることは我々人類の願いである。がん細胞・組織と正常組織との間には様々な違いが存在し、最も知られている性質の違いとして、液性の違いと形態の違いがあげられる。がん周辺の微小環境は多量の乳酸産生のため酸性を示す。またがん組織の血管内皮細胞周辺には、数十から数百ナノメートルの空隙が存在する。これらの違いを利用したドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究は盛んであり、特に前田らは形態や空隙サイズの違いに着目し(*Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2011**, 63, 136)、特定のサイズのナノ微粒子が、がん集積に有効であることを提案し、EPR(Enhanced Permeability Retention) 効果と名付けた。この発見により DDS 研究は大いに活性化された背景がある。一方、がんは多くのエネルギー生産に伴い、正常状態よりも若干温度が高い。しかしながら、この現象についての認識は低く特段重要視されて来なかった背景もある。報告例も限られていて以下の数例である。1986年にOlssonらは、重度と軽度の悪性リンパ腫細胞間での温度差を測定し、悪性リンパ腫細胞がより高温を示すことを報告している(*Scand. J. Haematol.* **1986**, 36, 353)。また、Hayashi(*J. Jpn. Surg. Assoc.*, **1997**, 12, 2760)らは、乳がんの一種が通常組織よりも 1 - 2°C高い温度を示すことを報告している。このような例はあるものの、がんの高温性を利用した DDS 研究はさらに限られているのが現状である。この理由は、正常とがん組織の温度差が小さい事、小さい温度差を認識し集積する分子システムが無かったためと推測される。従って、もし小さい温度差を認識し集積できる高性能の分子開発が達成できれば、がんをターゲットとした新たな DDS 研究へと繋がる可能性を秘める。

## 2. 研究の目的

我々のグループでは、水溶液中で温度にตอบสนองして自己集合化する超分子 UBD の開発を行っている。UBD は水溶液中で、水素結合、疎水性結合や $\pi$ - $\pi$ スタッキングに起因した多点の分子間相互作用により自己集合化し、10 - 100 ナノメートル程度のナノ微粒子を形成する。一方ある温度を超えるとナノ微粒子は、更なる自己集合化を示し、マイクロメートルサイズのグロビュール(無配向の会合体)を形成する。高温で自己集合化する温度を lower critical solution temperature (LCST) といい、この値は分子の水溶性と疎水性の微妙なバランスの上で制御されている。もし UBD の LCST を調整して、がんの示す温度付近に設定出来れば、UBD はがんの中で自己集合化しがんへ浸透保持され、結果としてがんを集積することが可能ではないかと考えた。これが本研究の「鍵」である。そこで UBD 骨格に蛍光団を取り付けた EgX を合成し、得られたナノ微粒子 EgX-NP を担癌マウスへ投与して、蛍光強度からがん集積程度を確かめた。がん温度感応可能にするため、EgX には長さの異なる 3 種類のオリゴエチレングリコール(OEG)を連結させ LCST を調整した。トリエチレングリコールを連結させた Eg3 は、LCST35°Cを示し、テトラエチレングリコールおよびヘキサエチレングリコールを連結させた Eg4 と Eg6 は、それぞれ 37 と 40°Cに LCST を示した。これら 3 種類の EgX を担癌マウスに投与した結果、LCST が最も低い Eg3 のがん集積が最も高いことが蛍光強度から観測された。このことは、EgX ががんの高温性にตอบสนองしてがん集積したことを示唆している(*Karasawa et al. Nano Lett.* **2017**, 17, 2397-2403)。本研究成果は今までに報告例が無いがんの温度をターゲットとした DDS・イメージングプローブとして機能したが、ナノ微粒子 EgX-NP の投与量が多い点、がんへの集積量が少ない点、他の組織への蓄積が観測された点、さらに蛍光波長が短く非侵襲的な診断に適していない点、などの問題点を抱えていた。

そこで今回、高度にがん集積し他の組織への集積を軽減するナノ微粒子開発を目指し、MRI 造影剤用の ガドリニウム微粒子、また同様の目的の ラジカル微粒子、蛍光イメージング用の 強発光性微粒子の開発について報告する。

### 3. 研究の方法

#### ガドリニウム微粒子

先に述べた自己集合化ユニット UBD 骨格を基盤とし、MRI 造影剤であるガドリニウム錯体を UBD へ連結させた 2 種類の超分子化合物を合成した。ガドリニウム錯体と UBD との間をエチレングリコール鎖で接続した Gd-Eg-UBD とアルキル鎖で接続した Gd-Al-UBD の 2 種類を準備し (図 1)、微粒子としての特徴や性質を明らかとした。

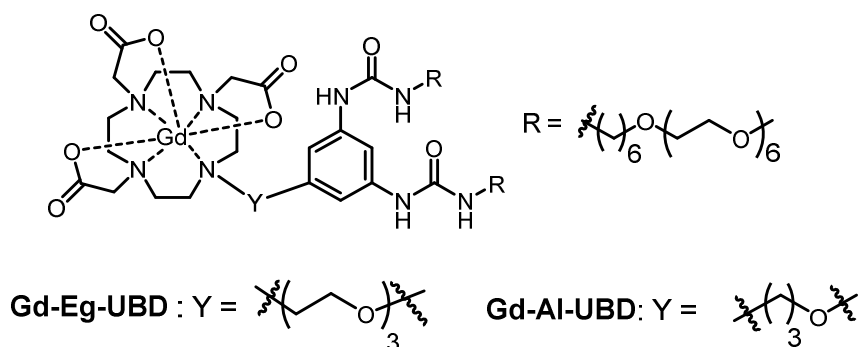


図 1. ガドリニウム錯体の分子構造

#### ラジカル微粒子

水溶性有機ラジカルである PROXYL は五員環構造を有しており、生体内に存在する還元剤に対して抵抗性が高いことが知られている。PROXYL 周辺に 3 種類のアルキル鎖 (メチル、エチル、プロピル) を導入した PDO-Me, -Et, -Pro を準備し (図 2) 微粒子としての特徴や性質を明らかとした。

#### 強発光性微粒子

ヘキサアザペンタセン誘導体(DNP)は蛍光量子収率 70%を超える強い発光団である。水溶性ノナエチレングリコールをヘキサアザペンタセン誘導体へ 1 つまたは 2 つ導入した両親媒性化合物 DNP-1, -2 について (図 3) 微粒子の性質を明らかとした。

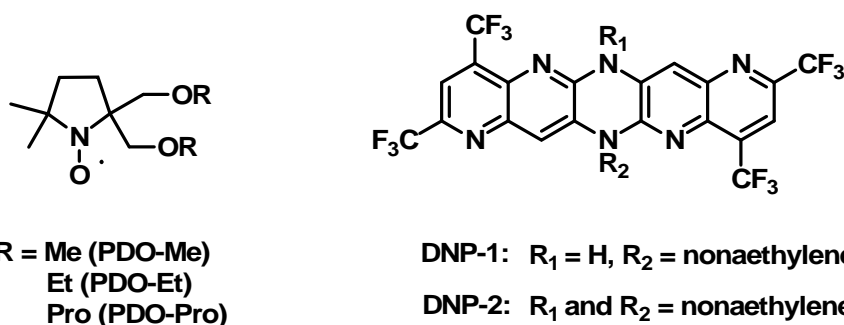


図 2. (左) PROXYL ラジカルと (右) ヘキサアザペンタセン誘導体の分子構造

### 4. 研究成果

#### ガドリニウム微粒子

水溶液中の Gd-Eg-UBD と Gd-Al-UBD の会合状態を動的光散乱 (DLS) と透過型電子顕微鏡 (TEM) により確かめた。DLS では水溶液中の水和直径を求めることができ、図 3(a)に示すように 2 つのガドリニウム錯体はそれぞれ約 100 nm サイズのナノ微粒子であった。次に

微粒子の臨界ミセル濃度 (cmc) を算出するためにピレン法による蛍光強度変化で求めた結果、Gd-Eg-UBD と Gd-Al-UBD はそれぞれ 33 と 24  $\mu\text{M}$  であった (図 3(b))。TEM により得られた微粒子を観察した結果、DLS で求めた 100 nm 以上のサイズの球状ナノ微粒子であった。この結果は TEM の基盤上で微粒子が崩壊したためだと考えられる。

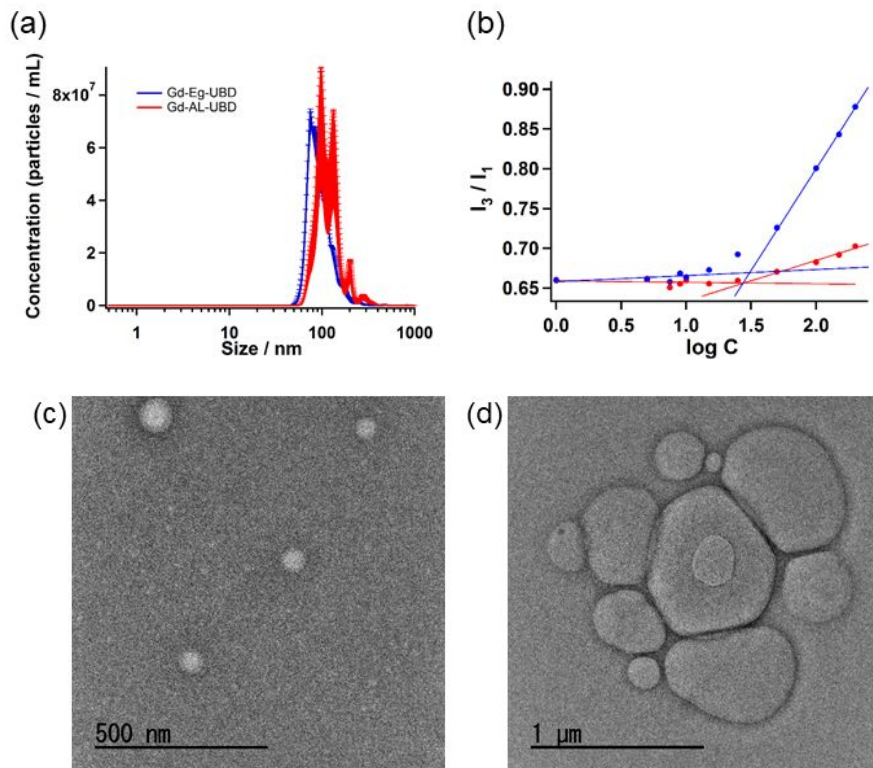


図 3. (a) Gd-Eg-UBD と Gd-Al-UBD の水溶液中の動的光散乱 (DLS)、(b) ピレン法による蛍光強度と濃度の関数プロット。変曲点が臨界ミセル濃度 (cmc) を示す。Gd-Eg-UBD (c) と Gd-Al-UBD (d) の透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像。

得られた微粒子についての MRI 造影剤としての機能性を確かめるために、造影能である水プロトン緩和能  $r_1$  を求めた (図 4)。その結果、臨床現場で用いられている GdDOTA が  $r_1 = 4.4 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  を示すのに対して、Gd-Eg-UBD と Gd-Al-UBD はそれぞれ  $r_1 = 7.7$  と  $10.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  を示し、ナノ微粒子を示さない GdDOTA よりも値は増大し、ナノ微粒子による増大効果が示された。Gd-Eg-UBD と Gd-Al-UBD の  $r_1$  値の差を確かめるため、ガドリニウムイオンに対する水の配位数 ( $q$ ) を求めた結果、それぞれ 1.63、0.96 と見積もられた。水の配位数が高いほど  $r_1$  値が大きくなることが知られており、Gd-Eg-UBD と Gd-Al-UBD で生じた  $r_1$  値の差についても  $q$  値の違いが要因だと考えられる。配位数の少ない Gd-Eg-UBD は、エチレンジアミンリコーダーの酸素原子がガドリニウムイオンへ配位していることが示唆された。

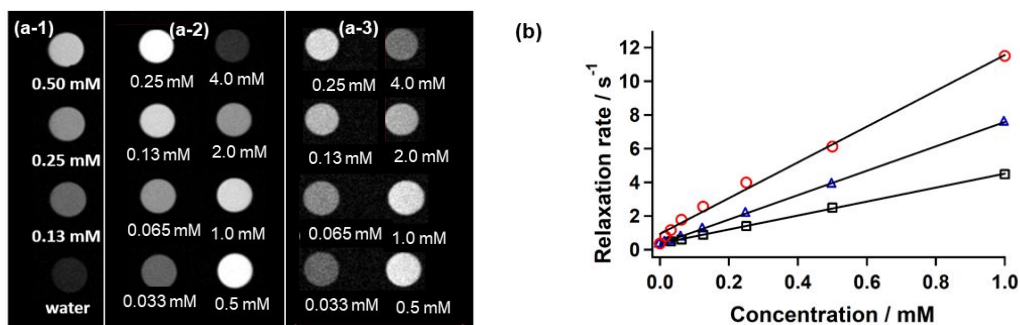


図 4. (a) Gd-DOTA(a-1), Gd-Eg-UBD(a-2)と Gd-Al-UBD(a-3)の  $T_1$  強調画像の濃度依存性。(b) 得られた画像から求めた緩和時間の逆数( $T_1^{-1}$ )と濃度のプロット。黒色□、青色△、赤色○はそれぞれ Gd-DOTA, Gd-Eg-UBD と Gd-Al-UBD の結果を示す。直線の傾きから  $r_1$  が算出される。

#### ラジカル微粒子

得られた 3 種類の微粒子 PDO-Me, -Et, Pro について TEM で微粒子のサイズや形態について観察した。その結果図 5 に示すように、10 - 60 nm サイズの球状のナノ微粒子の形成を確認した。置換基の種類が及ぼす微粒子のサイズや形態の違いについては、現在のところ見られておらず、 $r_1$  や還元剤に対する抵抗性を調べることで今後詳細な性質を調べていきたい。

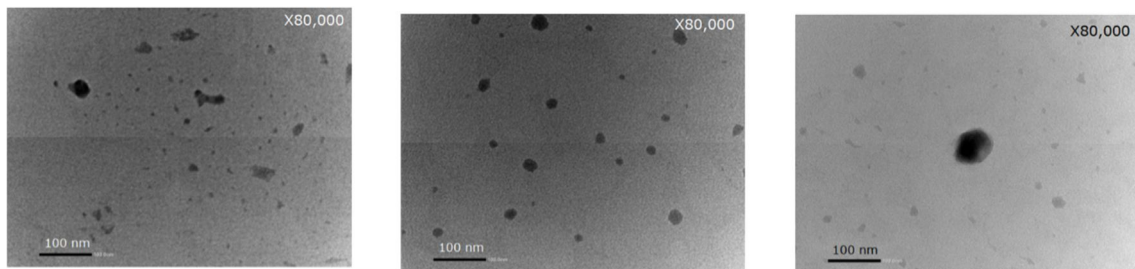


図 5. PDO-Me (左) PDO-Et (真ん中) PDO-Pro (右) の TEM 画像。

#### 強発光性微粒子

ヘキサザペンタセン誘導体にノナエチレングリコールを 1 つ導入した DNP-1 は水への溶解性が低かったため、水溶液中の微粒子の性質を確かめられなかった。2 つ導入した DNP-2 について、DLS と TEM で性質を調べた (図 6)。DLS では約 100 nm のナノ微粒子の存在が明らかとなり、TEM では大変興味深いことに中空構造のナノ微粒子であることが確認された。中空サイズは約 50 nm であり、空隙中へ様々な物質導入が期待できる。

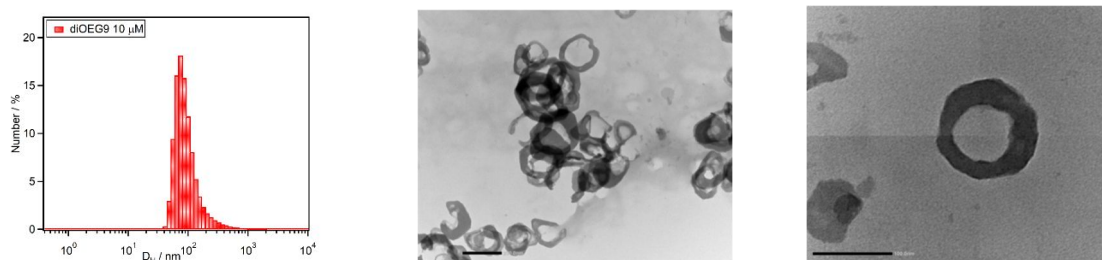


図 6. DNP-2 の DLS (左) と TEM 画像 (右)。TEM により中空のナノ微粒子であることが確認された。

#### 今後の取り組み

ガドリニウム、ラジカル及び強発光性の 3 種類のナノ微粒子を構築した。ガドリニウム微粒子については、臨床で使われている製剤よりも高い造影能を有することが分かった。温度応答性と微粒子サイズの検討から、加温によってサイズアップすることが明らかとなった。今後、担癌マウスでの検討を予定している。ラジカル微粒子は EPR 効果を示す 100 nm よりも若干小さいサイズの微粒子であった。今後、造影能と還元剤抵抗性について検討していく予定である。強発光性のナノ微粒子では、中空の微粒子が得られた。今後は中空に抗がん剤を入れたドラッグデリバリーシステムの構築を予定している。すべてのナノ微粒子について今後はがん集積性について検討していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11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 H. Koi, N. Takahashi, Y. Fuchi, T. Umeno, Y. Muramatsu, H. Seimiya, Satoru Karasawa*, and H. Oguri*	4. 巻 18
2. 論文標題 A fully synthetic 6-aza-artemisinin bearing an amphiphilic chain generates aggregates and exhibits anti-cancer activities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Org. Biomol.Chem	6. 最初と最後の頁 5339-5343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D00B00919A	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 R. Shiraiishi, S. Matsumoto, Y. Fuchi, T. Naganuma, D. Yoshihara, K. Usui, K. Yamada, and Satoru Karasawa*	4. 巻 36
2. 論文標題 Characterization and Water-Proton Longitudinal Relaxivities of Liposome-Type Radical Nanoparticles Prepared via a Supramolecular Approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 5280-5286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c00610	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 Y. Fuchi, T. Umeno, Y. Abe, K. Ikeno, R. Yamasaki, I. Okamoto, K. Usui, and Satoru Karasawa	4. 巻 85
2. 論文標題 Characterization of Push-Pull-Type Benzo[X]quinoline Derivatives (X = g or f): Environmentally Responsive Fluorescent Dyes with Multiple Functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 13177-13190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c01878	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 Y. Fuchi, H. Murase, R. Kai, K. Kurata, S. Karasawa, and S. Sasaki*	4. 巻 32
2. 論文標題 Artificial Host Molecules to Covalently Capture 8-Nitro-cGMP in Neutral Aqueous Solutions and in Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chem	6. 最初と最後の頁 385-393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.1c00012	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 R. Hagihara, T. Umeno, S. Ueki, D. Yoshihara, Y. Fuchi, K. Usui, M. Sakuma, and Satoru Karasawa,*	4. 巻 27
2. 論文標題 Push-Pull Bisnaphthyridylamine Supramolecular Nanoparticles: Polarity Induced Aggregation and Crystallization Induced Emission Enhancement and Fluorescence Resonance Energy Transfer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem Eur J	6. 最初と最後の頁 3039-3046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202003854	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 T. Umeno, K. Usui, S. Karasawa,	4. 巻 -
2. 論文標題 Extended Push Pull Type Bicyclic Fluorophores Based on Quinoline and Naphthyridine Frameworks with an Iminophosphorane Fragment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asian J.Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajoc.202100015	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 Shiraishi Ryoma, Kaneko Tomoyo, Usui Kazuteru, Naganuma Tatsuya, Iizuka Naoko, Morishita Kosuke, Kobayashi Shigeki, Fuchi Yasufumi, Matsuoka Yuta, Hirai Go, Yamada Ken-ichi, Karasawa Satoru	4. 巻 4
2. 論文標題 Effects of Substituents on the Properties of Metal-Free MRI Contrast Agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 20715 ~ 20723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b03003	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 Matsumoto Shota, Fuchi Yasufumi, Usui Kazuteru, Hirai Go, Karasawa Satoru	4. 巻 84
2. 論文標題 Development of Turn-On Probes for Acids Triggered by Aromaticity Enhancement Using Tricyclic Amidine Derivatives	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 6612 ~ 6622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.9b00023	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 Fuchi Yasufumi, Sakuma Masaomi, Ohyama Kohei, Hagihara Ryusuke, Kohno Minaki, Hamada Koichi, Mizutani Akihiro, Karasawa Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Selective synthesis of substituted amino-quinoline derivatives by C-H activation and fluorescence evaluation of their lipophilicity-responsive properties	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53882-z	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 Sakuma Masaomi, Fuchi Yasufumi, Usui Kazuteru, Karasawa Satoru	4. 巻 14
2. 論文標題 Photophysical Properties of Emissive Pyrido[3,2 c]carbazole Derivatives and Apoptosis Induction: Development towards Theranostic Agents in Response to Light Stimulus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 3938 ~ 3945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.201901200	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 Hirota Junko, Usui Kazuteru, Fuchi Yasufumi, Sakuma Masaomi, Matsumoto Shota, Hagihara Ryusuke, Karasawa Satoru	4. 巻 25
2. 論文標題 Fluorescence Properties and Exciplex Formation of Emissive Naphthyridine Derivatives: Application as Sensors for Amines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 14943 ~ 14952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201903643	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7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梅野智大、白井一晃、唐澤悟
2. 発表標題 ペプチド固相合成のための新規アミノ基検出法の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141回年会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 梅野智大、白井一晃、唐澤悟
2. 発表標題 ジヒドロピリダジン環を含むアザ[5]ヘリセンの合成と物性評価
3. 学会等名 日本薬学会 第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasufumi Fuchi・Satoru Karasawa
2. 発表標題 Fluorescence properties of push-pull type benzoquinoline derivatives
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 淵 靖史・池野 敬太・白井 一晃・唐澤 悟
2. 発表標題 三環性プッシュ プル型新規蛍光分子の合成と物性評価
3. 学会等名 第13回有機 電子系シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉田 翔・淵 靖史・甲斐 亮補・佐々木 茂貴・唐澤 悟
2. 発表標題 8-チオグアノシンを標的としたturn-on型蛍光プローブの創製
3. 学会等名 第17回ホスト ゲスト・超分子化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池野 敬太・瀧 靖史・臼井 一晃・唐澤 悟
2. 発表標題 新規N含有三環性蛍光団の合成と蛍光特性評価
3. 学会等名 第30回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本祥汰・臼井一晃・瀧靖史・唐澤 悟
2. 発表標題 芳香族性が制御された三環性アミジン誘導体の合成と蛍光特性
3. 学会等名 第30回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Satoru Karasawa	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Wiley-VCH	5. 総ページ数 8
3. 書名 Molecular Technology Volume2 (Edited by H. Yamamoto and T. Kato)	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 アミン類検出薬	発明者 唐澤 悟・梅野智大・ 松本祥汰・臼井一晃	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-33419	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 新規化合物及び該化合物を含む脂肪滴検出用試薬	発明者 唐澤 悟、瀧 靖史、 大山耕平、佐久間雅 臣 他3名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-090840	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

https://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/bunseki  
昭和薬科大学ホームページ  
https://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/bunseki/top

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	淵 靖史  (FUCHI YASUFUMI)  (40748795)	徳島文理大学・薬学部・助教    (36102)	

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